

n° d'ordre: 2084

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR ES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

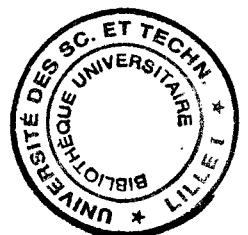
par

William FAUQUETTE

**MODELES *IN VITRO* DE DEVELOPPEMENT MAMMAIRE
NORMAL ET CANCEREUX:
ROLE DES INTERACTIONS EPITHELIO-MESENCHYMATEUSES
DANS LES PHENOMENES DE MIGRATION ET D'INVASION
CELLULAIRES ET CORRELATION AVEC DES VARIATIONS
D'ACTIVITE α PA ET DE TAUX DE PAI-1**

Soutenu le vendredi 10 octobre 1997 devant le jury composé de:

Président :	Professeur Bénoni BOILLY	USTL, Lille
Directeur de thèse :	Professeur Xavier DESBIENS	USTL, Lille
Rapporteurs :	Professeur Michel CREPIN	Faculté de Médecine, Paris
	Professeur Philippe BIREMBAUT	CHU Maison Blanche, Reims
Examineurs :	Docteur Xuefen DONG-LE BOURHIS	USTL, Lille
	Docteur Michel DISERBO	CRSSA, La Tronche



**L'espace d'une vie est le même,
qu'on le passe en chantant ou en pleurant.**

proverbe japonais

à la mémoire de Tonton Roger.

à Maman.

et à Papa...

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, dans le Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement, Unité "Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses", sous la direction du Professeur Xavier DESBIENS.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur Bénoni BOILLY de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Ces années ont été pour moi une expérience très formatrice et très enrichissante.

Je remercie très chaleureusement mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Xavier DESBIENS, pour sa disponibilité à toute épreuve, sa rigueur scientifique et ses conseils judicieux.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Messieurs les Professeurs Michel CREPIN et Philippe BIREMBAUT pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse et de porter un intérêt à mes travaux. Merci également pour le don des cellules HBL-100.

J'exprime également mes plus sincères remerciements au Docteur Xuefen DONG-LEBOURHIS pour avoir accepté d'examiner ce travail. Tu as mis au point les techniques de dosages d'activité uPA et de PAI-1. Tu as également réalisé pour moi, et pour bien d'autres, toutes les cultures primaires de cellules épithéliales mammaires. Merci pour ton aide, ton soutien moral et...ta joie de vivre! 谢谢

Mes plus vifs remerciements au Docteur Michel DISERBO, "Mon Commandant", d'avoir accepté également d'être examinateur de ce travail. Tes remarques concernant l'écriture de ce manuscrit et de l'article ainsi que tes encouragements me furent une aide très précieuse. Ce fut un véritable plaisir que de travailler pour toi et ton équipe pendant une année complète lors de mon "séjour national" au CRSSA. Puisse notre collaboration se poursuivre un jour...

Je remercie également Monsieur le Professeur Roberto MONTESANO de m'avoir enseigné la technique des cultures en gel de collagène, Monsieur le Professeur Jean-Philippe PELLERIN pour les dons d'échantillons mammaires, le Docteur Jean-Philippe PEYRAT pour les dons de cellules cancéreuses mammaires ainsi que le Docteur Toshikazu NAKAMURA pour les dons d'HGF/SF et d'anticorps anti-HGF.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, participé à la réalisation de ce travail:

Loïc BRUNET pour les photos et Magali PUECH pour ses conseils en dépannage informatique, ainsi que tout le personnel technique du bâtiment SN3.

Pour leur aide, leur sympathie, leur bonne humeur et leur soutien moral, je n'oublie pas: Ikram, Maryse "Texas Girl", Simon, Eric, Thierry, Albine, Anne-Sophie, Valérie, Sylviane, Monique, Chantal et Francine. Bon vent à tous et bon courage pour ceux qui n'ont pas encore fini...

Merci à Monsieur le Professeur VILAIN et à toute son équipe pour leur soutien durant l'année universitaire 1996-1997.

Merci également à tous mes amis et à tous ceux qui ont fait de moi ce que je suis devenu aujourd'hui: Isabelle "mon amourrr!", Guillaume "mon bébé", Silvie "ma grenouille", Véro "mais j'ouvre la bouche quand je chante!" et Jean-Marc "c'est quoi la note?", Cécile "maman!", Denis "Stop-au-puce", Bernd "du sprichst deutsch?", les choristes du CMUL, Virginie "ma puce", Alexandra et Olivier, Catherine, Annick, Cathy et Isabelle, Jacques, Christophe, Sandrine, Pascale, ma famille, sans oublier Mylène FARMER pour "On a besoin d'amour..." et Greta GARBO pour "I want to be alone...". Je vous aime.

Remerciement spécial à Christine. Pour sa présence, son soutien permanent et sa compréhension. Merci de tout mon coeur...

PUBLICATIONS

Fauquette W, Dong-Le Bourhis XF, Delannoy-Courdent A, Boilly B and Desbiens X. Characterisation of morphogenetic and invasive abilities of human mammary epithelial cells: correlation with variations of urokinase-type plasminogen activator activity and type-1 plasminogen activator inhibitor level. *Biology of the Cell*. sous presse.

Delannoy-Courdent A, **Fauquette W**, Dong-Le Bourhis XF, Boilly B, Vandebunder B and Desbiens X (1996) Expression of *c-ETS-1* and *uPA* genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering. *Int J Dev Biol* 40, 1097-1108.

Delannoy-Courdent A, Mattot V, Fafeur V, **Fauquette W**, Pollet I, Calmels T, Vercamer, Boilly B, Vandebunder B and Desbiens X. Constitutive expression of a dominant negative mutant of the c-Ets-1 transcription factor in mammary epithelial cells decreases uPA proteolytic activity and cell motility, and impairs tubulogenesis and scattering. soumis à *J. Cell Science*.

CONGRES

Boilly-Marer Y, El Yazidi I, **Fauquette W**, Boilly B. Evidence of Fibroblast Growth Factor production by a breast cancer cell line. Conférences Jacques MONOD, Aussois, octobre 1992

Adriaenssens E, Curgy JJ, Delannoy A, Desbiens X, Dugimont T, **Fauquette W**, Dong-Le Bourhis XF. Du développement à la cancérogenèse de la glande mammaire: implication d'oncogènes. Colloque "Lille-Université Libre de Bruxelles", Lille, 30 mai 1995.

Desbiens X, Curgy JJ, Dong-Le Bourhis XF, **Fauquette W**, Delannoy A, Adriaenssens E. Développement et cancérogenèse de la glande mammaire. Colloque "Lille-Université Libre de Bruxelles", Lille, 30 Mai 1995.

Fauquette W, Dong-Le Bourhis XF, Lambrecht V, Boilly B, Desbiens X. In vitro characterization of specific morphogenesis and invasiveness ability exhibited by various human mammary epithelial cells. EDBC-Congress of the European Developmental Biology Organisation, Toulouse, July 9-13, 1995.

Delannoy A, **Fauquette W**, Bouali F, Boilly B, Desbiens X. C-ets-1, a proto-oncogene involved in both epithelial and mesenchymal cells during morphogenesis and metastatic process of mammary gland. EDBC-Congress of the European Developmental Biology Organisation, Toulouse, July 9-13, 1995.

Mattot V, Calmels T, Vercamer C, Begue A, Fafeur V, Vandebunder B and Delannoy-Courdent A, **Fauquette W**, Desbiens X. The induction of epithelial tubular morphogenesis by fibroblasts-derived soluble factors is inhibited by the expression of a dominant negative mutant of Ets-1. International Congress of the French Society of Developmental Biology: Gènes maternels et zygotiques au cours du développement embryonnaire, Caen (France), May 29-31, 1996.

Mattot V, Gilles F, Calmels T, Wernert N, Vercamer C, Begue A, Fafeur V, Stehelin D, Vandebunder B and Delannoy-Courdent A, **Fauquette W**, Desbiens X. Expression and role of the Ets1 transcription factor during invasive processes. Sixth International Congress of the Metastasis Research Society. University of Gent (Belgium), September 8-11, 1996.

Mattot V, Vercamer C, Huguet C, Calmels T, Stehelin D, Fafeur V, Vandebunder B and Delannoy-Courdent A, **Fauquette W**, Desbiens X. Effect of a dominant negative mutant of Ets1 on invasive process. Sixth International Congress of the Metastasis Research Society, University of Gent (Belgium), September 8-11, 1996.

Adriaenssens E, Dumont L, **Fauquette W**, Dong-Le Bourhis XF, Dugimont T, Coll J, Curgy JJ. Modulations of the *H19* gene expression in normal or malignant mammary epithelial cells. Société de Biologie Cellulaire de France, Euroconference Meeting on "Cell Proliferation and Tumour Suppressors", Le Corum, Montpellier, 25-27 Novembre 1996.

Mattot V, Gilles F, Calmels T, Wernert N, Vercamer C, Begue A, Fafeur V, Stehelin D, Vandebunder B and Delannoy-Courdent A, **Fauquette W**, Desbiens X. Expression and role of the Ets1 transcription factor during invasive processes. Colloque "Université Libre de Bruxelles-Lille", Bruxelles, Campus Erasme, 9 janvier 1997.

Adriaenssens E, Dumont L, **Fauquette W**, Dong-Le Bourhis XF, Dugimont T, Coll J, Curgy JJ. Modulations de l'expression du gène *H19* dans des cellules épithéliales mammaires normales ou cancéreuses. Colloque "Université Libre de Bruxelles-Lille", Bruxelles, Campus Erasme, 9 Janvier 1997.

Mattot V, Delannoy-Courdent A, Vercamer C, **Fauquette W**, Calmels T, Fafeur V, Desbiens X, Vandebunder B. ETS family members play a functional role during invasive processes and uPA expression in normal and cancerous mammary epithelial cells. Joint meeting of the Biomed 1 project "Proteases and Cancer" and the Deutsche Forschungsgemeinschaft at the German Cancer Research Center, Heidelberg, March 6-8, 1997.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	15
GENERALITES	18
I LE DEVELOPPEMENT DE LA GLANDE MAMMAIRE	19
II ROLE DES HORMONES DANS LE DEVELOPPEMENT MAMMAIRE	23
1 : Les androgènes	23
2 : Les oestrogènes et la progestérone	24
3 : La prolactine, l'hormone de croissance et les glucocorticoïdes	26
4 : Les lactogènes placentaires	27
III ROLE DES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LE DEVELOPPEMENT MAMMAIRE	27
1 : L'EGF	28
2 : Le TGF- α	28
3 : L'IGF-1	29
4 : Les FGF	29
5 : L'HGF/SF	31
6 : Les facteurs inhibiteurs: MDGI et TGF- β	32
IV FACTEURS DE CROISSANCE ET CANCEROGENESE MAMMAIRE	33
1 : L'EGF, le TGF- α , les IGF et leurs récepteurs	33
2 : Les FGF et leurs récepteurs	34
3 : L'HGF/SF et son récepteur C-MET	36
4 : Le TGF- β	36
V MATRICE EXTRACELLULAIRE ET MORPHOGENESE MAMMAIRE	37
VI PROTEASES ET MORPHOGENESE MAMMAIRE	39
1 : Les protéases à cystéine	40
2 : Les métalloprotéases (MMP) matricielles	40
3 : Les protéases à sérine	40
OBJECTIFS DE RECHERCHE	44

CHAPITRE I

MISE AU POINT DE MODELES IN VITRO DE RECONSTITUTION MAMMAIRE

INTRODUCTION	48
MATERIEL ET METHODES	48
I REPERAGE DES GLANDES MAMMAIRES DE SOURIS	48
1 : Repérage des glandes mammaires sur les embryons de souris	49
2 : Prélèvement des glandes mammaires sur souris femelles néo-natales et adultes	50
II EXPLOITATION HISTOLOGIQUE ET MONTAGES <i>IN TOTO</i>	50
1 : Coupes histologiques	50
2 : Colorations histologiques	50
3 : Montages <i>in toto</i>	51
III CULTURES ORGANOTYPIQUES	51
1 : Préparation des gels de collagène	51
2 : Cultures organotypiques d'ébauches mammaires embryonnaires	52
IV CULTURES CELLULAIRES	52
1 : Lignées fibroblastiques	52
2 : Préparation du milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5	53
3 : Lignées épithéliales mammaires	53
4 : Cultures primaires de cellules épithéliales et de fibroblastes de sein	54
V ETUDE DU COMPORTEMENT DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES EN CULTURES BIDIMENSIONNELLES (2 D)	55
VI ETUDE DU COMPORTEMENT DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES EN CULTURES TRIDIMENSIONNELLES (3 D)	55
VII CONTROLE DE LA NATURE DU FACTEUR MESENCHYMATEUX D'ESSAIMAGE ET DE TUBULOGENESE	56
RESULTATS	56
I COMPORTEMENT DES EBAUCHES MAMMAIRES EMBRYONNAIRES DE SOURIS EN CULTURES 3 D	56
1 : Repérage anatomo-morphologique de la glande mammaire chez la souris	56
2 : Modèle de reconstitution <i>in vitro</i> réalisé à partir d'ébauches embryonnaires	57

II COMPORTEMENT DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES EN CULTURES 2 D	60
1 : Cellules normales (CEMN)	60
2 : Cellules HBL-100	62
3 : Cellules MCF-7	62
4 : Cellules MDA-MB-231	62
III COMPORTEMENT DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES EN CULTURES 3 D	64
1 : CEMN	65
2 : Cellules HBL-100	66
3 : Cellules MCF-7	68
4 : Cellules MDA-MB-231	68
IV IMPLICATION DE L'HGF/SF DANS NOS MODELES DE RECONSTITUTION MAMMAIRE <i>IN VITRO</i>	70
DISCUSSION	72

CHAPITRE II

VARIATIONS DE L'ACTIVITE uPA ET DES TAUX DE PAI-1 DANS LES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES: CORRELATION AVEC LEUR COMPORTEMENT MIGRATOIRE ET INVASIF

INTRODUCTION	80
MATERIEL ET METHODES	81
I IMMUNOHISTOLOGIE	81
II DOSAGE DE L'ACTIVITE uPA ET DU TAUX DE PAI-1 DANS LES CULTURES DE CELLULES EPITHELIALES	83
1 : En cultures bidimensionnelles	83
2 : En cultures tridimensionnelles	83
3 : Dosage de l'activité uPA	84
4 : Dosage des niveaux de PAI-1	84
5 : Dosage d'ADN	85
RESULTATS	86

I MISE EN EVIDENCE PAR IMMUNOLOCALISATION DE PAI-1, uPA ET uPAR DANS LES CULTURES 3 D	86
1 : Détection de l'uPA et de son récepteur uPAR	86
2 : Détection de PAI-1	86
II DOSAGE DE L'ACTIVITE uPA PRESENTE DANS LES CULTURES 2 D ET 3 D DE CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES	88
1 : En cultures bidimensionnelles	88
2 : En cultures tridimensionnelles	88
III DOSAGE DES NIVEAUX DE PAI-1 DANS LES CULTURES 2 D ET 3 D DE CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES	90
1 : En cultures bidimensionnelles	90
2 : En cultures tridimensionnelles	90
DISCUSSION	92
1 : Variations de la balance activité uPA/niveau de PAI-1	92
2 : Mise en évidence d'une corrélation entre des variations de la balance activité uPA/niveaux de PAI-1 et des modifications du comportement des cellules épithéliales	94
3 : Origine des fluctuations d'activité uPA et des niveaux de PAI-1	96
4 : Variations de dégradation matricielle et mécanismes d'adhérence cellulaire	98

CHAPITRE III

VARIATIONS DE L'ACTIVITE uPA ET DES TAUX DE PAI-1 DANS LES FIBROBLASTES MRC-5:

ROLE DU MESENCHYME SUR LE COMPORTEMENT MIGRATOIRE ET INVASIF DES CELLULES EPITHELIALES

INTRODUCTION	101
MATERIEL ET METHODES	101
I PREPARATION DU MILIEU CONDITIONNE PAR LES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES HUMAINES	101
II DOSAGES DE L'ACTIVITE uPA ET DES NIVEAUX DE PAI-1 DANS LES FIBROBLASTES MRC-5	102
1 : En cultures bidimensionnelles	102
2 : En cultures tridimensionnelles	102
RESULTATS	103

I DOSAGE DE L'ACTIVITE αPA PRESENTE DANS LES CULTURES 2 D ET 3 D DE FIBROBLASTES MRC-5	103
1 : En cultures bidimensionnelles	103
2 : En cultures tridimensionnelles	104
II DOSAGE DES NIVEAUX DE PAI-1 PRESENTS DANS LES CULTURES 2 D ET 3 D DE FIBROBLASTES MRC-5	105
1 : En cultures bidimensionnelles	105
2 : En cultures tridimensionnelles	106
DISCUSSION	107
CONCLUSION GENERALE	111
BIBLIOGRAPHIE	114

ABREVIATIONS

- ADN:** acide désoxyribonucléique
AEC: 3-amino-9-éthylcarbazole
ARNm: acide ribonucléique messenger
ATCC: American Tissue Culture Collection
BSA: sérum-albumine bovine
CEMN: Cellules Epithéliales Mammaires Normales
C-MET: Récepteur de l'HGF/SF
Da/kDa: Dalton/kiloDalton
DAPI: 4,6-Diamidino-2-phenylindole
DME/HAM F-12: Dulbecco's Modified Eagle's medium/nutrient medium F-12 HAM
D.O: densité optique
E12: douzième jour de stade embryonnaire
EDTA: éthylènediamine tétra-acétate
EGF: Epidermal Growth Factor
EHS: matrice préparée à partir du sarcome murin de Engelbreth-Holm-Swarm
ELISA: Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
FGF: Fibroblast Growth Factor
FGF-R: récepteur des FGF
G: phase de gestation
GH: Growth Hormone
HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HGF/SF: Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor
HSPG: protéoglycane de type héparane sulfate
IGF: Insulin-like Growth Factor
IGF-BP: Insulin-like Growth Factor-Binding Protein
J25: vingt-cinquième jour après la naissance
KGF: Keratinocyte Growth Factor
L: phase de lactation
MC: Milieu Conditionné
MDGI: Mammary Derived Growth Inhibitor
MEM: Minimum Essential Medium
MMP: Matrix Metalloprotease
NGF: Nerve Growth Factor
PAF: Paraformaldéhyde
PAI: inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PBS: Phosphate Buffer saline

PCR: polymerase chain reaction
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
PRL: Prolactine
P477: nombre de repiquages cellulaires (ex: 477)
S-2251: D-Val-Leu-Lys-paranitroaniline dihydrochloride
SVF: sérum de veau foetal
TBS: Tampon Tris/HCl
TGF- α : Transforming Growth Factor- α
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
TIMP: Tissue Inhibitor of Metalloprotease
TMB: perborate/3,3',3,5'-tétraméthylbenzidine
tPA: activateur du plasminogène de type tissulaire
uPA: activateur du plasminogène de type urokinase
uPAR: récepteur de l'uPA
UI: unités internationales
2D: cultures bidimensionnelles (sur fond de boîtes de culture)
3D: cultures tridimensionnelles (en collagène)

INTRODUCTION

La genèse d'un organe résulte d'une série très complexe d'interactions entre les différents compartiments cellulaires qui composent cet organe. L'un des modèles les plus intéressants d'étude d'interactions épithélio-mésenchymateuses est la glande mammaire. En effet, cet organe est, d'une part, très facile d'accès et, d'autre part, il a la particularité de se développer essentiellement non pas au cours de la vie foetale mais lors de la vie post-natale. De plus, il va subir de profonds remaniements morphologiques tout au long de la vie adulte: alors que durant les phases foetales et néo-natales, son développement est faible, cet organe va présenter à la puberté une poussée de sa croissance canalaire. Ensuite, lors de la gestation, il va se différencier pour acquérir sa fonction sécrétrice et produire le lait. Enfin, lors de l'involution, la glande mammaire va perdre son activité sécrétrice et revenir dans un état de repos jusqu'à la prochaine gestation.

Les mécanismes mis en jeu lors de ces différentes étapes commencent à être connus. Ils impliquent des variations de la composition du système endocrinien de l'organisme mais sont le résultat également d'interactions épithélio-mésenchymateuses mammaires mettant en jeu différents facteurs de croissance (facteurs activateurs et facteurs inhibiteurs).

Chaque année, 135 000 nouveaux cas de cancer du sein apparaissent dans le monde et 42 300 femmes décèdent de cette maladie. Une série de facteurs pronostiques a été associée à ce fléau, tels que la présence d'oncogènes mutés ou amplifiés. Par ailleurs, ces tumeurs épithéliales se développent à l'intérieur même de la glande mammaire de sorte que des perturbations de l'expression de certains facteurs de croissance ou d'oncogènes non seulement dans les cellules épithéliales mais aussi dans le tissu mésenchymateux situé à proximité des canaux mammaires peuvent contribuer au comportement invasif des tumeurs épithéliales.

La mise en place du développement mammaire, qu'il soit normal ou cancéreux, se fait au sein d'une matrice extracellulaire avec laquelle les cellules établissent des connexions via des récepteurs membranaires de types E-cadhérine, intégrines, thrombospondine... La modification des mécanismes d'adhérence cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire est un élément clé des processus migratoires et invasifs

présentés par les cellules épithéliales au cours de la morphogenèse mammaire normale et tumorale. La régulation de ces processus est orchestrée par des variations d'expression des molécules de dégradation matricielle telle que les cathepsines, les métalloprotéases matricielles (MMP) et les protéases à sérine comme, par exemple, la plasmine.

La mise au point de modèles *in vitro* de reconstitution mammaire normale ou cancéreuse pourrait nous permettre de mieux comprendre la modulation des mécanismes de migration et d'invasion cellulaires mis en jeu au cours d'un développement mammaire normal et d'un développement mammaire tumoral. La mise au point de ces modèles pourrait ainsi nous permettre de cibler des thérapies fines visant à réguler les processus invasifs des cellules épithéliales cancéreuses mammaires.

GENERALITES

I LE DEVELOPPEMENT DE LA GLANDE MAMMAIRE:

La formation de la glande mammaire débute pendant l'embryogenèse et se poursuit après la naissance, notamment pendant la période pubertaire. L'ébauche ainsi formée se renouvelera ensuite périodiquement lors de gestations successives.

L'étude du développement de la glande mammaire de souris (Grasset, Imagawa et al., 1994 ; Sakakura, 1991) illustre ces différentes étapes et a permis de définir certaines modalités et conditions de cette organogenèse:

- chez l'embryon de souris âgé de 10 jours (stade E10), la morphogenèse de la glande mammaire débute par l'apparition d'une bande d'ectoderme surélevé qui s'étend de la racine du membre antérieur à la base du membre postérieur en position dorso-latérale, de chaque côtés du tronc.

- A l'intérieur de cette bande mammaire, un étroit ruban ectodermique va alors faire saillie (E11) et constituer la crête mammaire (pl. 1A).

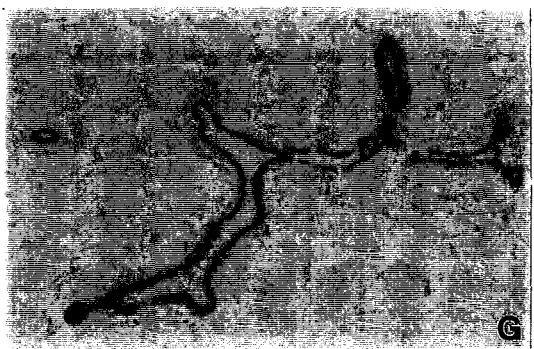
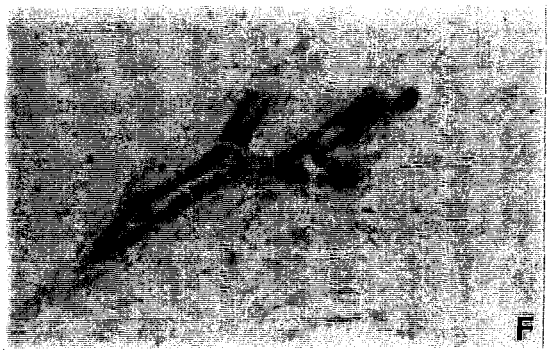
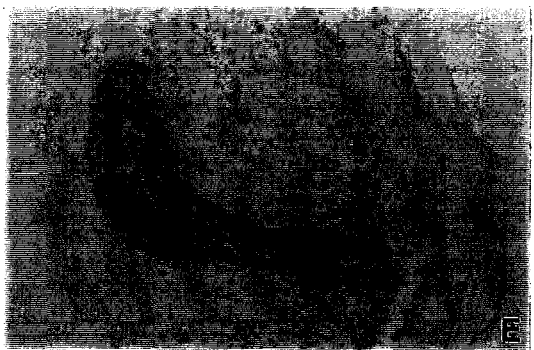
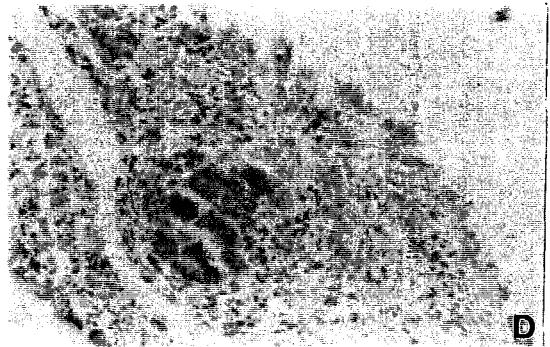
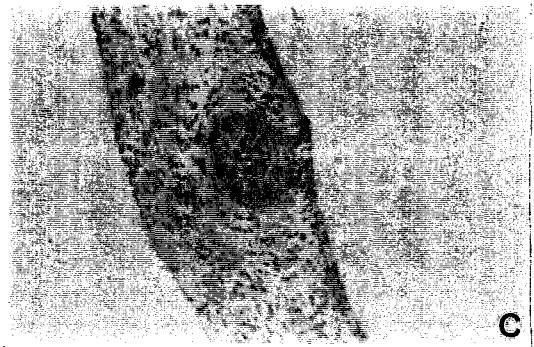
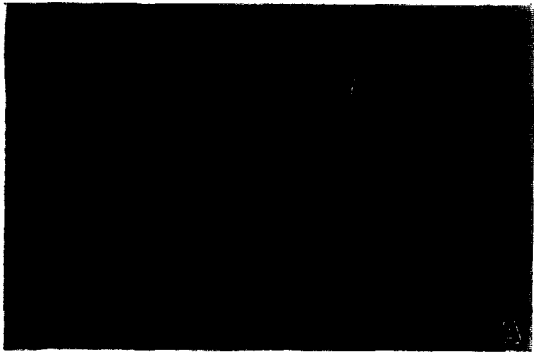
- Par un mécanisme de migration cellulaire, les cellules de la crête mammaire vont se regrouper en 5 amas ectodermiques distincts (E12) et former de véritables ébauches mammaires individuelles situées au niveau du thorax (3 paires) et des régions inguinales (2 paires), vers le côté ventral (pl. 1B).

- Viennent ensuite le stade lenticulaire (E13) où l'ébauche mammaire commence à s'enfoncer dans le derme et le stade sphérique (E14). A ce stade, le bourgeon mammaire primaire se caractérise par une augmentation en taille de l'ébauche lenticulaire (150 μ m de longueur, pl. 1C) et par une modification du mésenchyme sous-jacent: une partie des cellules se regroupe pour constituer plusieurs couches parallèles tout autour du bourgeon épithélial (c'est le mésenchyme dense) et une autre partie, plus éloignée du bourgeon épithélial, va former le précurseur du tissu adipeux.

- Alors que chez l'embryon mâle le bourgeon va involuer, chez l'embryon femelle le bourgeon va progressivement s'enfoncer dans le mésenchyme de sorte qu'au stade embryonnaire E16, l'ébauche mammaire sera formée d'une extrémité distale enflée reliée à l'épiderme par un étroit pédoncule (pl. 1D).

Planche 1 : histologie de la glande mammaire de souris embryonnaire (E) et juvénile (J).

A: E11,5. La flèche indique la crête mammaire ; B: E12,5 ; C: E14,5 ; D: E16,5 ; E: souris néo-natale ; F: J9 ; G: J30 ; H: bourgeon mammaire à J25.



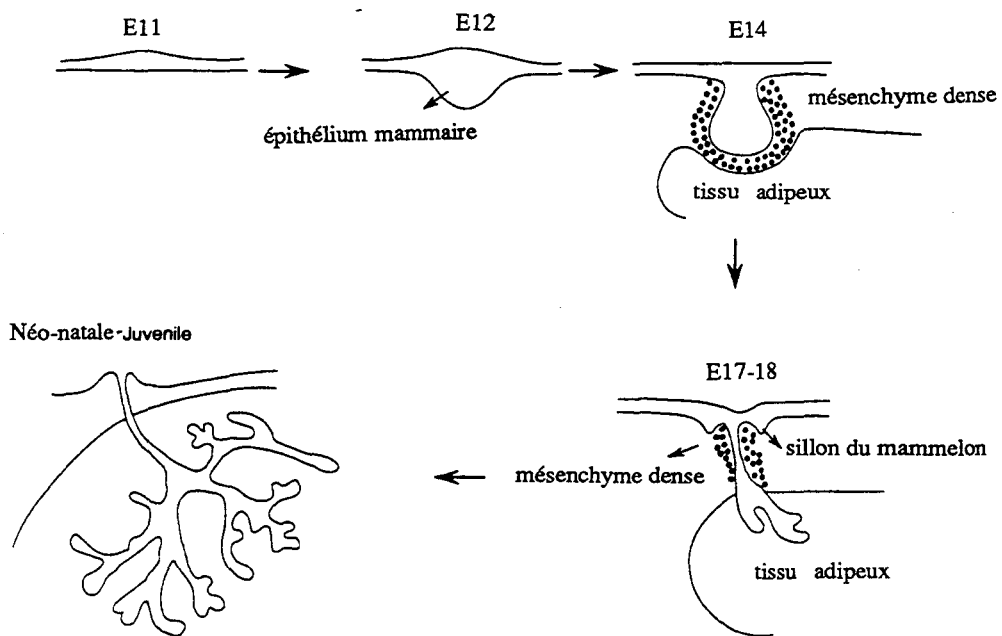


Figure 1 : développement précoce de la glande mammaire chez la souris (d'après Sakakura, 1991).

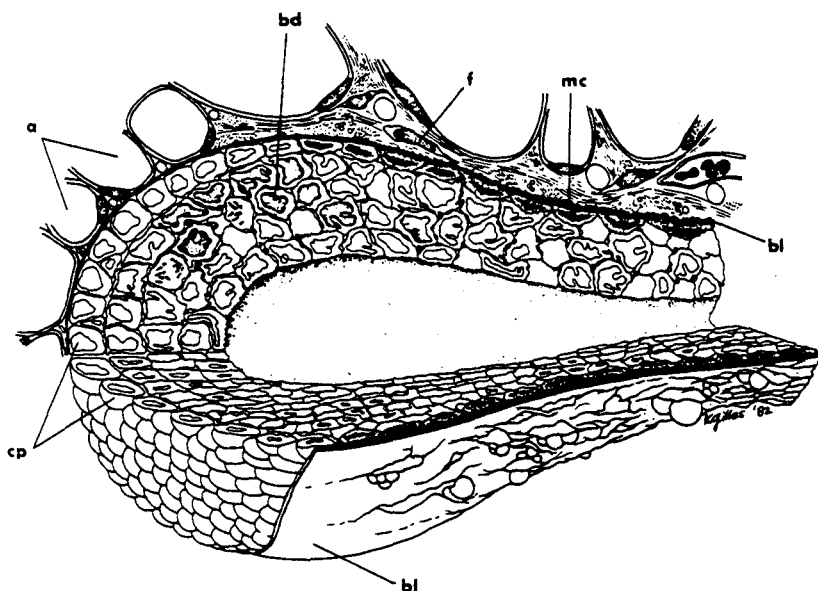


Figure 2 : structure d'un bourgeon mammaire terminal (d'après Imagawa et al., 1994).
 (cp) cellules souches, (a) adipocytes, (bd) cellules intermédiaires, (f) fibrocytes, (mc) cellules myoépithéliales, (bl) lame basale.

- Par un phénomène de prolifération cellulaire, le bourgeon va poursuivre son élongation dans le mésenchyme et se transformer au fur et à mesure en un cordon mammaire primaire qui représente, en fait, l'ébauche du canal galactophore (pl. 1E).

- Ce cordon, en poursuivant son élongation, va se ramifier (bourgeons secondaires et tertiaires) et à la naissance (stade J0), la glande mammaire sera constituée d'une arborisation épithéliale rudimentaire (15 à 20 canaux) d'environ 2 mm de longueur enfouie dans un tissu de soutien lâche et séparée de celui-ci par une membrane basale (pl. 2A).

Les différentes étapes du développement mammaire embryonnaire sont regroupées schématiquement sur la figure 1.

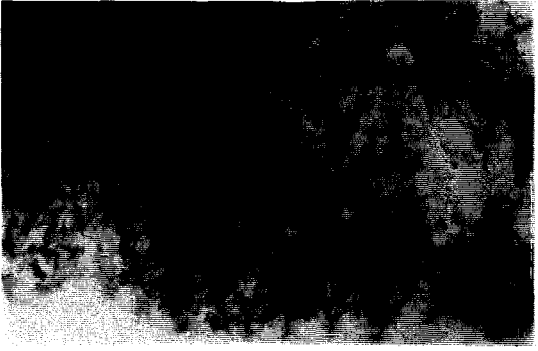
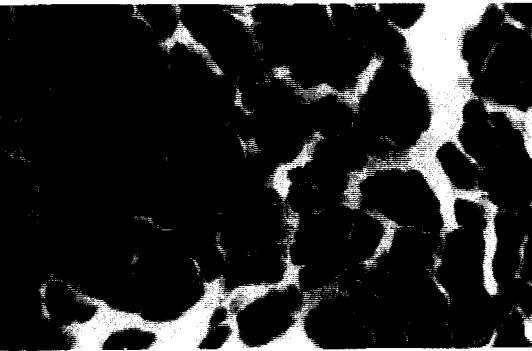
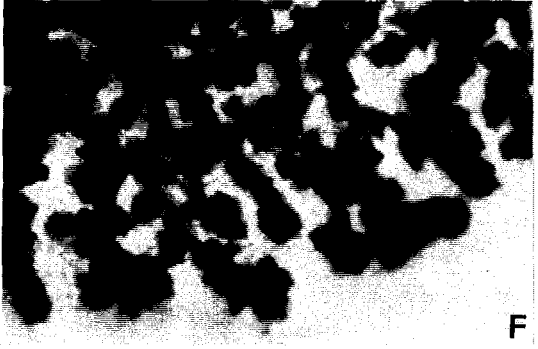
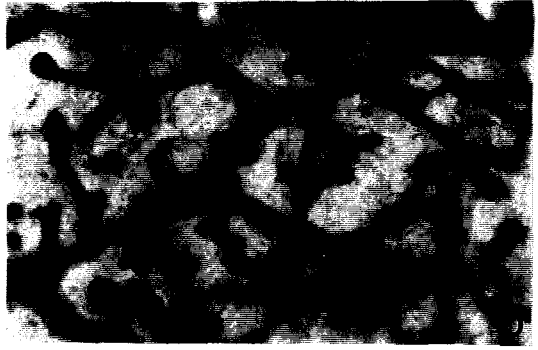
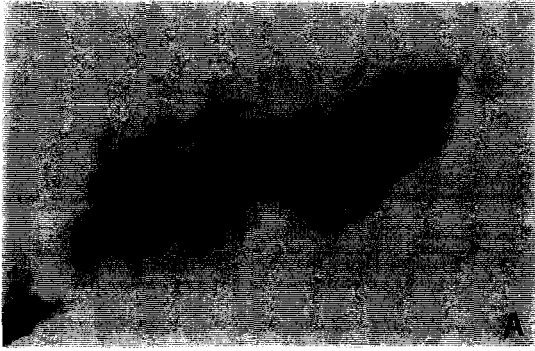
- De la naissance à la puberté (stades J0 à J25), la glande mammaire de la souris ne va pas subir de bouleversements morphologiques importants. On n'observera qu'une augmentation de son volume de manière isométrique (Knight and Peaker, 1982) c'est-à-dire en rapport avec la croissance de la taille du corps de l'animal (pl. 1F, 2B-C).

- Lors de la maturation sexuelle (25-35 jours après la naissance), les extrémités terminales des canaux mammaires vont reprendre leur croissance et former des structures particulières appelées bourgeons terminaux (pl. 1H) qui vont complètement envahir le tissu adipeux mammaire au stade adulte sous l'effet d'une augmentation du degré de branchement des canaux (pl. 2D-E). Chacun des canaux sera alors constitué d'une couche interne de cellules épithéliales luminales entourées d'une couche de cellules myoépithéliales, elles-mêmes séparées du mésenchyme mammaire par la membrane basale. Par contre les bourgeons terminaux sont formés de cellules non différenciées qui constituent le point de croissance du bourgeon (figure 2).

- Lors d'une éventuelle gestation, les canaux mammaires vont à nouveau produire des bourgeons mammaires qui vont subir une différenciation en structures lobulo-alvéolaires de sorte que le tissu adipeux sera complètement masqué (pl. 2F).

Planche 2 : montages *in toto* de glande mammaire de souris.

A: néo-natale ; B: J10 ; C: J15 ; D: J23 ; E: J35 ; F: gestation ; G: lactation ; H: involution.



- Lors de la lactation (pl. 2G), l'épithélium situé à l'intérieur de ces structures va produire les protéines du lait. Celui-ci sera expulsé à l'extérieur par l'intermédiaire des canaux galactophores qui vont se contracter sous l'effet de l'ocytocine.

- Au cours de la phase d'involution (pl. 2H), les cellules sécrétrices du lait vont se détacher et la glande mammaire va revenir dans l'état auquel elle se trouvait avant la gestation (diminution du nombre de lobules et augmentation des dépôts adipeux).

II ROLE DES HORMONES DANS LE DEVELOPPEMENT MAMMAIRE :

Il est important de constater que contrairement à la plupart des organes, la majorité du développement de la glande mammaire se déroule lors de la période post-embryonnaire, pendant des stades où de nombreux bouleversements hormonaux apparaissent (puberté, gestation, lactation). De nombreux travaux ont été réalisés afin de déterminer le rôle que pouvaient jouer les hormones lors des différentes périodes de croissance ou de différenciation de la glande mammaire. Malgré les résultats parfois contradictoires obtenus en fonction des modèles utilisés (souris, rat ...), des opérations réalisées (hypophysectomie, surrénalectomie, ovariectomie), de la méthodologie employée (études *in vivo* ou *in vitro*, cultures de cellules ou cultures d'organes ...), les études ont pu mettre en évidence l'implication des hormones stéroïdiennes (androgènes, oestrogènes, progestérone), des hormones hypophysaires (prolactine, hormones de croissance) et des glucocorticoïdes dans le contrôle du développement mammaire.

1 : Les androgènes

La première action hormonale influençant le devenir de la glande mammaire de la souris apparaît chez les embryons mâles âgés de 14 jours (E14). Nous avons vu précédemment qu'à ce stade, le bourgeon mammaire ne va plus évoluer alors que chez l'embryon femelle, il va poursuivre sa pénétration dans le mésenchyme sous-jacent. Les premières études réalisées par Raynaud dans les années 40 ont montré que la destruction des gonades du fœtus mâle entraîne un développement mammaire semblable à celui

observé chez les foetus femelles. Chez un embryon femelle, l'injection de testostérone inhibe le développement mammaire. Cette inhibition par les androgènes est le résultat d'une condensation du mésenchyme autour du pédoncule du bourgeon mammaire qui va se détacher de l'épiderme et ne plus évoluer. Des marquages autoradiographiques par utilisation de [³H] 5-Dihydrotestostérone (Heuberger et al., 1982) ont révélé que le tissu cible de l'hormone mâle était ce mésenchyme situé tout autour du bourgeon mammaire et que la présence de récepteurs aux androgènes était induite par l'épithélium mammaire lui-même. Des expériences de recombinaisons entre de l'épithélium mammaire ou d'autre origine et du mésenchyme de différents organes n'ont fait apparaître un marquage radioactif qu'au niveau d'associations spécifiques entre mésenchyme mammaire et épithélium mammaire également. Ces expériences révèlent donc une situation où l'épithélium mammaire va provoquer sa propre destruction en induisant la présence de récepteurs aux androgènes sur les cellules mésenchymateuses périphériques (aussi bien chez le mâle que chez la femelle) qui, lorsqu'elles seront stimulées par la testostérone (donc chez le mâle uniquement), vont isoler le bourgeon mammaire épithélial. Les facteurs inducteurs épithéliaux tout comme les mécanismes conduisant le mésenchyme à se condenser autour de l'épithélium restent à définir. Il est également important de noter que ces phénomènes sont clairement établis chez la souris alors qu'ils n'ont pas été démontrés chez le lapin par exemple. De plus, chez le rat mâle adulte qui possède une glande mammaire relativement développée, une gonadectomie va de façon inattendue produire une diminution du développement mammaire qui pourra dans certains cas être rétabli par injection de testostérone.

2 : Les oestrogènes et la progestérone

Les oestrogènes exercent leur contrôle sur le développement mammaire en agissant de manière directe sur les cellules mammaires elles-mêmes (épithéliales et/ou mésenchymateuses), de manière indirecte par le biais ou en combinaison avec d'autres hormones ou encore en augmentant le nombre de récepteurs à la progestérone. De manière directe, il a été montré que l'injection d'oestrogènes à des souris ovariectomisées

entraîne une croissance tubulaire qui reste cependant localisée au niveau des bourgeons terminaux et non au niveau des cellules des canaux. L'utilisation d'oestrogènes radioactifs chez des jeunes souris a permis de mettre en évidence la présence de sites de fixation non seulement dans le compartiment épithélial (au niveau des bourgeons mais pas dans les cellules souches) mais également au niveau des cellules du compartiment mésenchymateux (stroma mammaire) (Haslam et Nummy, 1992). Une analyse plus fine a permis de montrer que les oestrogènes stimulent la synthèse d'ADN dans les cellules du stroma avant que ne soit observée une synthèse d'ADN dans les cellules épithéliales. La croissance épithéliale observée après injection d'oestrogènes passerait donc par le biais d'une stimulation provenant des cellules stromales (Shyamala et Ferenczy, 1984). Cette hypothèse est de plus renforcée par le fait que, *in vitro*, des cellules épithéliales qui peuvent pousser en absence d'oestrogènes ne seront pas stimulées par ces hormones alors qu'une augmentation de leur prolifération sera observée dans des conditions de co-culture avec des fibroblastes mammaires en présence d'oestrogènes (Haslam, 1986). Il est probable que les oestrogènes jouent un rôle dans le développement mammaire de manière indirecte en augmentant la sécrétion de prolactine par l'hypophyse ou en stimulant une production locale de facteurs de croissance qui vont à leur tour stimuler le développement de la glande mammaire. Par ailleurs, les oestrogènes vont surtout augmenter le taux de récepteurs à la progestérone sur les cellules épithéliales, ceci contrairement aux cellules stromales dont le taux de récepteurs à la progestérone reste stable (Haslam et Shyamala, 1979, 1980, 1981).

Il est clairement établi que la progestérone joue un rôle fondamental dans la croissance mammaire en intervenant sur le développement lobulo-alvéolaire et canalaire. L'augmentation du nombre de récepteurs à la progestérone par les oestrogènes ne pourra que potentialiser ce phénomène. Parallèlement, la progestérone va inhiber la synthèse de caséine lors de la gestation en stimulant la production d'un facteur inhibiteur (le PMF, Pregnancy-specific Mammary nuclear Factor, Lee et Oka, 1992) qui va se lier sur deux sites situés dans la région promotrice du gène de la caséine. En fin de gestation, le taux de récepteurs à la progestérone va être fortement diminué. La glande mammaire a alors atteint

son maximum de développement lobulo-alvéolaire. Après la parturition, une chute du taux de progestérone induit une diminution du taux de PMF et la lactation pourra alors avoir lieu. Chez la femme, le développement de l'épithélium mammaire observé lors de la deuxième moitié du cycle menstruel semble être relié à une augmentation de la sécrétion de progestérone et d'oestrogènes et une élévation du nombre de récepteurs à ces deux hormones a pu être observée. De même, lors d'une grossesse, la glande mammaire subit de profonds remaniements morphologiques. Or, c'est à cette période que les ovaires produisent le plus d'oestrogènes et de progestérone.

Cependant, des variations dans la production d'oestrogènes et de progestérone ne suffisent pas à elles seules à expliquer le développement de la glande mammaire. Ces substances agissent souvent en combinaison avec d'autres hormones dont les plus importantes sont la prolactine, l'hormone de croissance, les glucocorticoïdes et les hormones d'origine placentaire.

3 : La prolactine, l'hormone de croissance et les glucocorticoïdes

De nombreuses études ont montré que les effets provoqués par les oestrogènes sont nettement amoindris lorsque les animaux ont subi au préalable une hypophysectomie et une surrénalectomie. Des injections d'extraits hypophysaires, de prolactine ou d'hormone de croissance en association avec des glucocorticoïdes et des oestrogènes vont rétablir un développement mammaire normal dans le sens d'une formation de canaux épithéliaux. L'injection simultanée de progestérone, d'oestrogènes et de prolactine va aboutir à la formation de lobules de petite taille. L'adjonction d'hormone de croissance à ces trois hormones va entraîner un développement alvéolaire complet semblable à celui obtenu en fin de lactation (Talwalker and Meites, 1961). Lors de la grossesse chez la femme, le développement complet de la glande mammaire en acini peut être corrélé avec de hauts niveaux d'oestrogènes, de progestérone et de prolactine (Jacobs, 1977). Quant au rôle de la prolactine dans la lactation, il a été clairement établi sur des animaux hypophysectomisés qui n'ont pu retrouver un taux normal de synthèse de lait qu'après injection de prolactine (Cowie et al., 1969). Des études récentes ont pu montrer que la

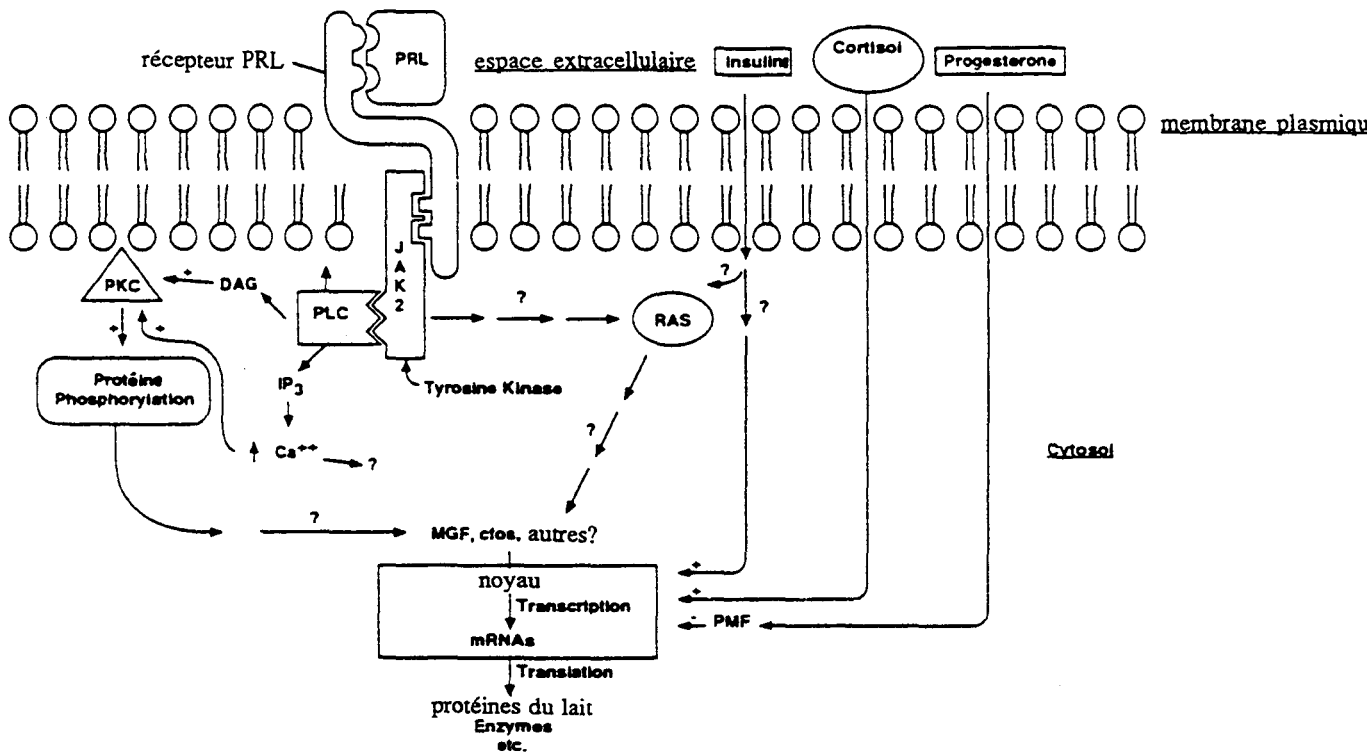


Figure 3 : transduction du signal dans les cellules épithéliales alvéolaires lors d'une stimulation hormonale (d'après Rillema, 1994).

Tableau 1 : régulateurs du développement mammaire et de la lactation (d'après Rillema, 1994)

a Développement		
Foetal	Pubertaire	Gestation
action inhibitrice des androgènes	Oestrogènes GH Cortisol Insuline Facteurs de croissance	Oestrogènes Progesterone GH Prolactine Cortisol Insuline Facteurs de croissance
b Lactation		
Initiation	Maintien	Expulsion
Retrait des oestrogènes et de la progesterone Prolactine Cortisol	Prolactine Insuline Cortisol	Ocytocine

stimulation des gènes de protéines du lait se fait par l'intermédiaire d'un récepteur "longue forme" de la prolactine (PRL-RL ; Ali et al., 1992). Ce récepteur est associé à une protéine douée d'activité tyrosine kinase (JAK 2) qui participera à la transduction du signal vers le noyau (figure 3).

4 : Les lactogènes placentaires

De nombreux travaux mettent également en évidence le rôle d'hormones d'origine placentaire dans le développement de la glande mammaire lors de la gestation. Ces hormones, regroupées sous le nom de lactogènes placentaires présentent des homologies de séquence (variables suivant les espèces) avec la prolactine et l'hormone de croissance et peuvent se substituer à celles-ci dans des expériences de stimulation de croissance mammaire et de synthèse des protéines du lait (Byatt et al., 1994).

Le tableau 1 résume succinctement le rôle des différents effecteurs intervenant dans le contrôle du développement et de la différenciation mammaire .

Ainsi, les hormones jouent un rôle essentiel dans la croissance de la glande mammaire et ce, aux différents stades de son développement. Ce rôle est variable selon les hormones (croissance ou différenciation mammaire) et peut être très différent selon l'espèce étudiée. Cependant, de nombreux auteurs ont pu montrer qu'outre la participation des hormones dans le développement mammaire, d'autres substances pouvaient intervenir en stimulant ou, au contraire, en inhibant la formation des canaux épithéliaux et pouvaient être à l'origine des dérèglements engendrant la formation d'un phénotype cancéreux: les facteurs de croissance.

III RÔLE DES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LE DÉVELOPPEMENT MAMMAIRE :

Les facteurs de croissance intervenant dans le contrôle du développement de la glande mammaire peuvent être regroupés en deux grandes classes :

- les facteurs stimulant la croissance (EGF, TGF- α , IGF-1, FGF et HGF/SF)
- les facteurs inhibant la croissance (TGF- β essentiellement)

1 : L'EGF

L'Epidermal Growth Factor (EGF) est une molécule polypeptidique de 6 000 Da dont la source principale dans l'organisme est la glande salivaire. Le rôle de l'EGF dans le développement mammaire a pu être mis en évidence chez des souris ayant subi une ablation des glandes salivaires: ces souris présentent des glandes mammaires peu développées, une production de lait diminuée. Une injection d'EGF à ces souris aboutira à la formation de glandes mammaires normales (Okamoto et Oka, 1984). De même, chez des souris présentant un faible développement mammaire après ovariectomie, l'utilisation *in situ* d'implants délivrant des doses d'EGF directement dans la glande mammaire va réactiver la croissance canalaire au niveau de la zone entourant l'implant (Coleman et al., 1988) et l'apparition de bourgeons terminaux (Snedeker et al., 1991). Des études réalisées sur des préparations membranaires de glandes mammaires à des stades différents ont montré la présence de sites de fixation de haute affinité pour l'EGF. Elles ont également mis en évidence une augmentation du nombre de ces récepteurs lors de la gestation (période pendant laquelle la glande se développe de manière importante) et une diminution pendant la lactation (Edery et al., 1985). Des études *in vitro* suggèrent que cette diminution du taux de récepteurs à l'EGF serait induite par la prolactine (Fenton et Sheffield, 1993).

2 : Le TGF- α

Le Transforming Growth Factor- α (TGF- α) est un polypeptide de 50 acides aminés structurellement et biologiquement homologue à l'EGF (42% d'homologie) qui se lie au même récepteur que celui-ci. *In vivo*, tout comme l'EGF, le TGF- α va stimuler le développement lobulaire de la glande mammaire (Vonderhaar, 1987). Par hybridation *in situ*, l'expression des ARNm du TGF- α a été détectée dans l'épithélium et le stroma

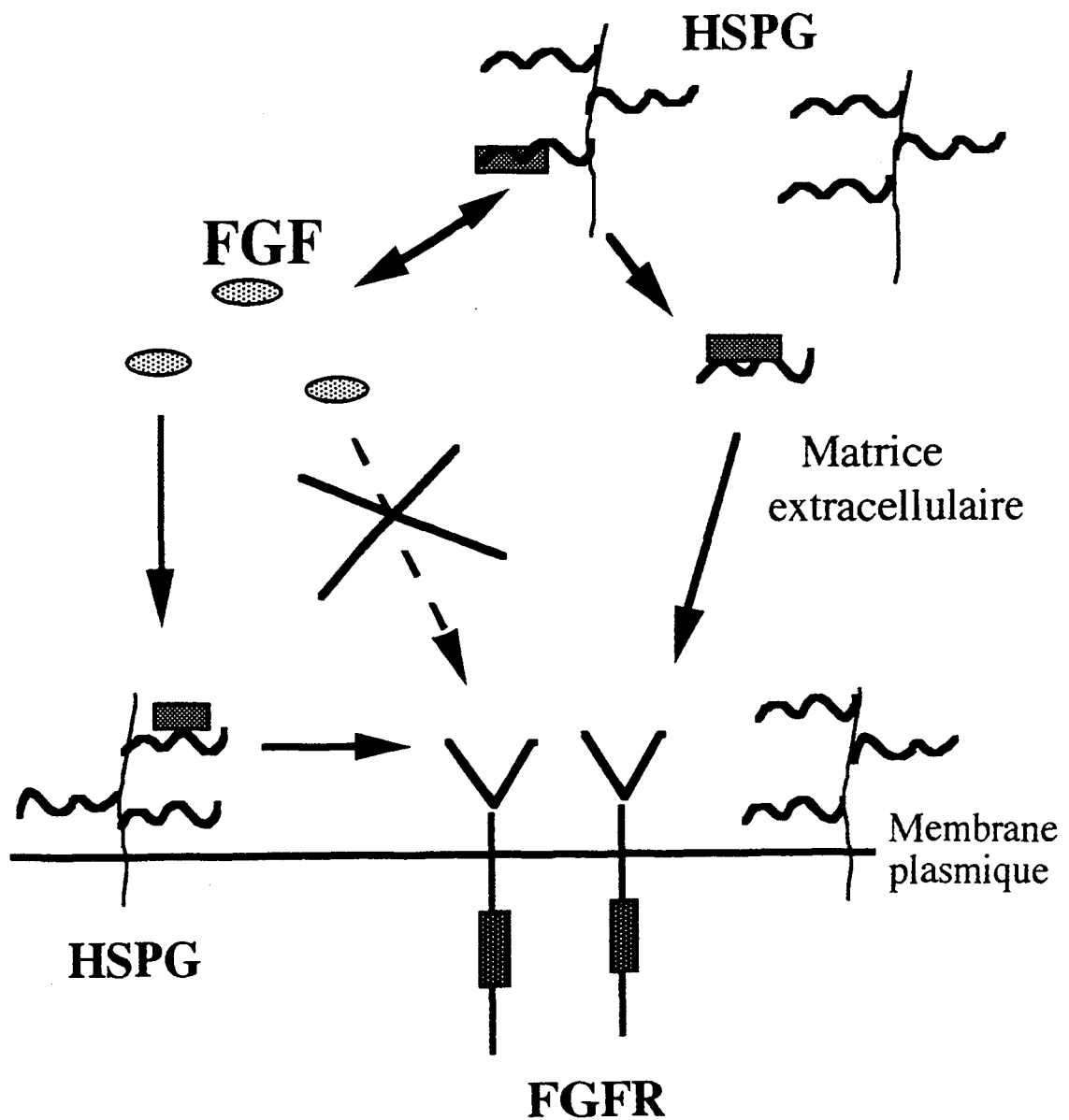


Figure 4 : Rôle des Protéoglycans de type Héparane Sulfate (HSPG) dans la liaison du FGF à son récepteur membranaire doué d'une activité tyrosine kinase (FGFR): modification de la conformation du FGF lié aux HSPG de la matrice extracellulaire ou de la surface membranaire. Seule cette conformation est reconnue par les FGFR (d'après Hubert Hondermarck).

mammaire. Elle se voit augmentée lors de la gestation et surtout lors de la lactation chez le rat (Liscia et al., 1990) alors que chez la souris, il ne semble pas y avoir d'expression de TGF- α lors de la lactation (Snedeker et al., 1991). Des études immunologiques récentes ont cependant mis en évidence la présence de TGF- α à ces différents stades chez la souris (Harigaya et al., 1994).

3 : L'IGF-1

Le rôle de l'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), proche de l'insuline (47% d'homologie), dans le développement mammaire a pu être mis en évidence par une étude de Ruan et al. (1992) dans laquelle des implants contenant différents types d'IGF-1 (forme normale et forme courte) et introduits dans la glande mammaire de rats hypophysectomisés induisent la formation de bourgeons terminaux et de structures alvéolaires. Il semble que la stimulation de la croissance mammaire induite par l'hormone de croissance (GH) se fasse par l'intermédiaire d'une augmentation de l'expression des ARNm de l'IGF-1 (Kleinberg et al., 1990) mais certaines études ont pu montrer un rôle direct de la GH sans passage par l'IGF-1 (Plaut et al., 1993).

4 : Les FGF

La famille des Fibroblast Growth Factor (FGF) se compose actuellement de 14 membres dont les plus étudiés sont le FGF acide (FGF-1) et le FGF basique (FGF-2). Ils interagissent au niveau cellulaire par le biais de récepteurs membranaires de haute affinité et à activité tyrosine kinase de 4 types (FGF-R1 à FGF-R4) mais cette interaction nécessiterait la présence de sites de fixation de plus faible affinité de type Héparane Sulfate Protéoglycanes (figure 4). Le rôle des FGF dans le développement mammaire a été analysé à partir des observations faites *in vitro* qui montraient que les FGF-1 et 2 étaient produits respectivement par des fibroblastes mammaires et des cellules myoépithéliales mammaires (Barraclough et al., 1990). *In vivo*, Gomm et al. (1991) ont mis en évidence la présence de FGF-2 au niveau des cellules épithéliales de sein. Chez le rat, une étude immunologique fine de détection du FGF-2 a permis de mettre en évidence

des différences de localisation de celui-ci en fonction des types cellulaires et du stade de la glande mammaire (Rudland et al., 1993). Dans les canaux en quiescence et dans les alvéoles en gestation et lactation, le FGF-2 est localisé principalement au niveau de la membrane basale et plus discrètement dans les cellules myoépithéliales. Au contraire, dans les canaux et les bourgeons terminaux en croissance, le FGF-2 a été détecté au niveau des cellules épithéliales et myoépithéliales, c'est-à-dire au niveau des cellules qui se trouvent en prolifération. Une étude détaillée a permis de détecter l'expression de différents membres de la famille des FGF dans les divers composants de la glande mammaire à différents stades (Coleman-Krnacik et Rosen, 1994). Alors que le FGF-3 (int 2) et le FGF-5 ne sont jamais exprimés, le FGF-1, le FGF-2, le FGF-4 (hst/k-FGF) et le FGF-7 (KGF) sont exprimés lors des stades de croissance canalaire et parfois lors de la gestation et de la lactation mais à des niveaux réduits (FGF-1) ou quasiment nuls (FGF-2). Dans le cas du KGF, c'est la taille du transcrit qui est modifiée lors de la lactation. Quant à la localisation des ARNm de ces différents facteurs, il semble que le FGF-1 soit exprimé dans les cellules luminales, le FGF-2 dans le stroma et les cellules myoépithéliales, le KGF exclusivement dans le stroma et que l'expression du FGF-2 et du KGF dans le stroma soit induite par l'épithélium mammaire. L'expression exclusive du KGF dans les cellules mammaires stromales a été confirmée *in vitro* par Wilson et al. (1994) et son effet sur la croissance des canaux mammaires a pu être mis en évidence chez des rats et des souris (Ulich et al., 1994 ; Yi et al., 1994). Les FGF se fixent sur des récepteurs à haute affinité dont la présence a pu être localisée dans la glande mammaire par hybridation *in situ*, PCR et analyse de Scatchard. L'expression du FGF-R2 (sous la forme de deux transcrits codant l'un pour le récepteur appelé BEK et l'autre pour le récepteur du KGF) a été démontrée sur des bourgeons mammaires d'embryon de souris à E14,5 (Orr-Urtreger et al., 1993). De même l'expression du FGF-R1 a pu être détectée sur des coupes de sein au niveau des canaux épithéliaux (Jacquemier et al., 1994) et peut être accompagnée d'une expression du FGF-R2 (Luqmani et al., 1992).

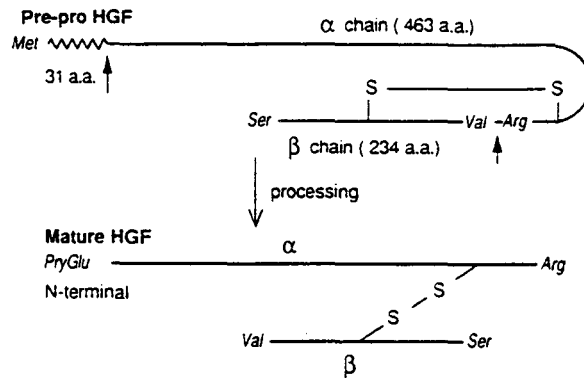


Figure 5 : Représentation schématique de la maturation de l'HGF/SF (d'après Matsumoto et Nakamura, 1992). Le pré-pro HGF est synthétisé sous forme d'une simple chaîne linéaire qui sera clivée en deux chaînes (α et β) par des protéases telles que la plasmine. Les grosses flèches indiquent les sites de coupure.

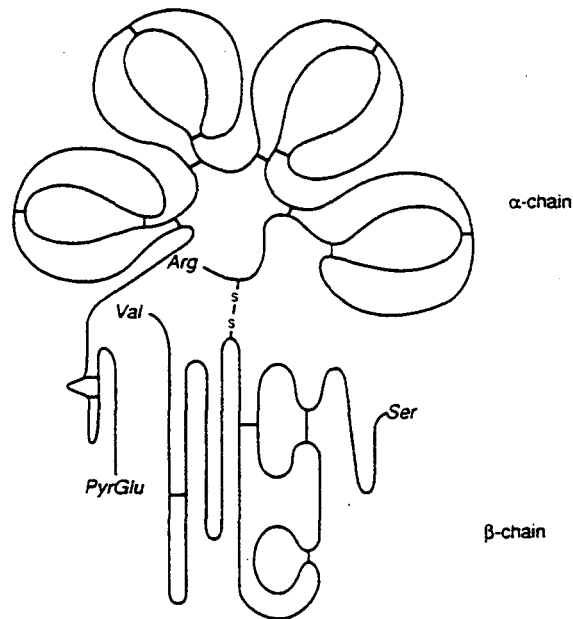


Figure 6 : Structure schématique de l'HGF/SF mature présentant quatre triple boucles (chaîne α) et deux chaînes (α et β) reliées par un pont disulfure (d'après Matsumoto et Nakamura, 1992).

5 : L'HGF/SF

Un autre facteur de croissance pouvant influencer la croissance mammaire est l'Hepatocyte Growth Factor (HGF), appelé également Scatter Factor (SF). Celui-ci est synthétisé sous la forme d'un précurseur (pro-HGF/SF) qui, après clivage en deux chaînes, formera un HGF/SF mature (figure 5) présentant une structure tridimensionnelle en boucle (figure 6) et agira au niveau cellulaire par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire identifié en tant que proto-oncogène: C-MET (Weidner et al., 1993 ; Naldini et al., 1991). Ce facteur, tout comme le FGF-2, possède des propriétés angiogènes (Grant et al., 1993) mais il possède également la propriété d'induire la formation de tubules par des cellules épithéliales rénales (Montesano et al., 1991 a et b) de sorte que son rôle en tant que facteur de tubulogenèse dans la glande mammaire a été recherché. Wilson et al. (1994) ont mis en évidence par PCR l'expression des ARNm de l'HGF/SF et de son récepteur dans des tissus mammaires normaux sans pouvoir déterminer le compartiment exact d'expression. Par hybridation *in situ*, l'expression des ARNm de l'HGF/SF a pu être localisée au niveau des cellules des acini sécréteurs de sein en lactation (Wang et al., 1994). Tsarfati et al. (1992) ont pu détecter par immunohistologie la présence du récepteur C-MET dans du tissu mammaire normal humain au niveau des cellules épithéliales bordant la lumière des canaux. L'étude de Yang et al. (1995) réalisée sur des glandes mammaires en cultures d'organe a montré que l'HGF/SF entraîne la formation de ramifications canalaire et une inhibition de la production de protéines du lait. Parallèlement, ils ont également pu montrer que cette morphogenèse pouvait être inhibée en bloquant l'expression endogène d'HGF/SF par des oligonucléotides antisens, expression qui s'est révélée être localisée *in vivo* au niveau du compartiment mésenchymateux. L'expression des ARNm codant pour l'HGF/SF et son récepteur est régulée lors des différents stades de morphogenèse de la glande mammaire: cette expression diminue de manière très importante lors de la gestation, est non détectable lors de la lactation et reprend lors de la phase d'involution (Pepper et al., 1995). Ces auteurs ont également pu démontrer que la prolactine pouvait réguler négativement le niveau d'expression des ARNm codant pour le récepteur C-MET ce qui explique les

faibles niveaux rencontrés lors de la lactation. *In vitro*, des fibroblastes mammaires normaux murins et humains produisent de l'HGF/SF (Sasaki et al., 1994 ; Niranjan et al., 1995). Des lignées épithéliales mammaires normales murines et humaines expriment le récepteur C-MET (Niranjan et al., 1995) et sont capables de former des tubules sous l'action de l'HGF/SF (Berdichevsky et al., 1994 ; Soriano et al., 1995 ; Brinkmann et al., 1995) lorsqu'elles sont cultivées en collagène.

Ainsi nous venons de voir que différents types de facteurs de croissance sont présents dans la glande mammaire, essentiellement lors des stades de croissance canalaire, et qu'ils joueraient un rôle dans la prolifération ou l'organisation des cellules épithéliales et myoépithéliales. Il existe également des facteurs qui vont réguler négativement la prolifération cellulaire et donc inhiber le développement mammaire.

6 : Les facteurs inhibiteurs : MDGI et TGF- β

Le premier de ces facteurs est le Mammary-Derived Growth factor Inhibitor (MDGI) isolé à partir de glande mammaire bovine en lactation (pour revue, voir Imagawa et al., 1994). Son rôle en tant que facteur inhibiteur a été clairement établi par le fait qu'il est exprimé et produit uniquement lors de la gestation et de la lactation dans les lobules alvéolaires et les canaux qui présentent un faible taux de prolifération et une forte différenciation. Il agit donc en tant que régulateur négatif de la croissance mammaire.

Le facteur le plus étudié dans le contrôle de l'inhibition mammaire est le Transforming Growth Factor- β (TGF- β). Silberstein et Daniel (1987) en introduisant des implants contenant du TGF- β dans une glande mammaire de souris ont pu montrer que ce facteur inhibe la croissance des canaux mais pas la formation des alvéoles lors de la gestation (Daniel et al., 1989). *In vivo*, les différents types de TGF- β (β 1, β 2 et β 3) sont exprimés par les cellules épithéliales des canaux en croissance, en quiescence ou lors de la gestation (Robinson et al., 1991) mais également par les cellules du stroma. Par contre, lors de la lactation, leur expression est fortement diminuée. Un marquage immunologique a permis de localiser le TGF- β au niveau de la membrane basale entourant les canaux

mammaires mais pas au niveau des bourgeons terminaux. L'effet inhibiteur du TGF- β passerait par une augmentation de la synthèse des composants matriciels par les cellules épithéliales, composants qui stabiliseraient le patron de développement de la glande mammaire et qui, en même temps, accumuleraient le TGF- β à la périphérie des canaux (Silberstein et al., 1990, 1992). Parallèlement, le TGF- β régulerait la différenciation des cellules épithéliales en inhibant la synthèse de caséine et d' α -lactalbumine lors de la gestation (Daniel et Robinson, 1992 ; Yamamoto et al., 1994 ; Sudlow et al., 1994). Associée à d'autres événements, la chute du taux de TGF- β lors de la lactation entraînerait les cellules dans la voie d'une différenciation terminale caractérisée par la synthèse de caséine.

Il apparaît donc à la lueur de ces résultats que les facteurs de croissance sont des éléments importants qui participent au dialogue qui s'établit entre l'épithélium mammaire et le mésenchyme environnant et régulent la morphogenèse de la glande mammaire.

Dans le cas d'un développement pathologique anormal, de nombreux travaux ont également pu mettre en avant l'implication de ces facteurs de croissance dont l'expression, ou celle de leurs récepteurs, se voit modifiée ou amplifiée selon les cas.

IV FACTEURS DE CROISSANCE ET CANCEROGENESE MAMMAIRE

1 : L'EGF, le TGF- α , les IGF et leurs récepteurs

Le récepteur à l'EGF humain est présent dans 30 à 50% des tumeurs mammaires (Toi et al., 1989 ; Bevilacqua et al., 1990 ; Tsutsumi et al., 1990) et semble surexprimé dans environ 10% de ces tumeurs. De plus, des anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire du récepteur à l'EGF humain sont capables de provoquer la rémission de tumeurs mammaires produites chez la souris nude par injection de cellules tumorales MDA-MB-468 qui surexpriment précisément le récepteur à l'EGF (Modjtahedi et al., 1993). Par ailleurs, l'expression du récepteur à l'EGF semble être associée à un mauvais pronostic clinique mais cette observation fait souvent l'objet de controverses. *In vitro*,

l'EGF stimule les capacités invasives d'une lignée épithéliale mammaire dérivée d'un carcinome mammaire de rat, capacités pouvant être inhibées par des anticorps neutralisants anti-EGF (Hamada et al., 1995).

En ce qui concerne le TGF- α , bien que surexprimé dans de nombreuses tumeurs mammaires, il ne semble pas être corrélé à une valeur pronostique pour le patient (Mizukami et al., 1990). Cependant, associée au récepteur de l'EGF, l'expression du TGF- α pourrait caractériser des sous-populations cellulaires plus aptes à croître ou à produire des métastases (Castellani et al., 1994).

Les tumeurs cancéreuses semblent exprimer au niveau de la surface cellulaire également un taux beaucoup plus important de récepteurs à l'IGF-1 que les lésions bénignes (Peyrat et al., 1990) et seraient donc *a priori* plus sensibles à ce facteur. Cependant le fait que la présence de récepteurs à l'IGF-1 soit corrélée de manière positive avec la présence de récepteurs aux oestrogènes et à la progesterone indique que les cellules tumorales sont sous des formes relativement différenciées (des cellules tumorales peu différenciées n'expriment pas ces deux derniers récepteurs) et pourra donc être associée à un bon pronostic. Les IGF, quant à eux, sont présents dans les tumeurs cancéreuses mais leur biodisponibilité est étroitement régulée par des protéines qui se lient aux IGF de façon très spécifique (IGF-BP) et qui pourront ainsi empêcher la liaison des IGF à leurs récepteurs (Yee et al., 1994).

2 : Les FGF et leurs récepteurs

En vertu de leurs propriétés mitogènes et motogènes importantes, de nombreuses études ont été menées afin de déterminer le rôle des FGF et de leurs récepteurs dans la carcinogenèse mammaire. Lidereau et al. (1988) ont mis en évidence une amplification du proto-oncogène *int-2* (FGF-3) dans 16% des tumeurs mammaires étudiées et ces résultats ont pu être confirmés par Machotka et al. (1989) qui ont, de plus, relevé une amplification plus importante dans les rechutes (27% des cas) que dans les tumeurs primaires (5% des cas). Ceci suggère un rôle de *int-2* en tant que facteur de progression tumorale associé à un mauvais pronostic. Dib et al. (1994) ont pu également montrer une amplification du

FGF-6 dans 3,6% des cas de tumeurs de sein étudiés et Theillet et al. (1989) ont observé dans 17% des cas une co-amplification de *hst* (FGF-4) et *int-2*. En ce qui concerne les deux membres les plus étudiés de la famille des FGF (FGF-1 et FGF-2), la détection de leurs ARNm a pu être réalisée sur différents tissus mammaires de stades cancéreux différents et l'étude a révélé que l'expression de ces ARNm était plus importante dans les tissus sains que dans les tissus cancéreux (Luqmani et al., 1992 ; Anandappa et al., 1994). Cependant les auteurs suggèrent que la présence de FGF dans les tissus cancéreux pourrait avoir une importance significative sur l'angiogenèse tumorale et participerait ainsi au développement de la lésion. Parallèlement, des études effectuées *in vitro* ont permis de mettre en évidence l'expression des ARNm et des protéines FGF-1 et 2 par des lignées tumorales mammaires hormo-dépendantes et hormono-indépendantes (Flamm et al., 1989 ; Li et Shipley, 1991 ; Anandappa et al., 1994 ; El Yazidi et Boilly-Marer, 1995 ; Renaud et al., 1996) ainsi qu'une stimulation possible de la croissance de ces lignées par du FGF-1 ou 2 (Takahashi et al., 1989 ; Peyrat et al., 1991 ; Yamaguchi et al., 1992). Les récepteurs à haute affinité des FGF sont également présents dans les tumeurs et les lignées cancéreuses mammaires. Adnane et al. (1991) ont détecté une amplification des gènes codant pour les récepteurs FLG (FGF-R1) et BEK (FGF-R2) dans 12% des tumeurs mammaires étudiées. Dans le cas de FLG, l'amplification génique peut être corrélée avec une amplification des gènes *int-2* et *hst* et laisse supposer ainsi l'existence d'une boucle autocrine de stimulation. Par hybridation *in situ*, Jacquemier et al. (1994) ont pu localiser l'expression des ARNm du FGF-R1 dans le compartiment épithélial. D'autres auteurs ont également pu mettre en évidence l'existence de sites de fixations de haute mais aussi de basse affinité pour les FGF dans des biopsies cancéreuses mammaires (Luqmani et al., 1992 ; Wilson et al., 1994). Ces résultats trouvent leur pendant dans des études menées *in vitro* où des récepteurs du type HSPG ont pu être caractérisés sur des lignées épithéliales cancéreuses mammaires (Peyrat et al., 1991 ; Luqmani et al., 1992 ; Wilson et al., 1994 ; Mc Leskey et al., 1994 ; Delehedde et al., 1996, 1997).

3 : l'HGF/SF et son récepteur C-MET

De plus en plus de travaux mettent en avant le rôle de l'HGF/SF et de son récepteur C-MET dans les cancers du sein. Plusieurs auteurs ont décrit l'expression des ARNm du récepteur de l'HGF/SF à la fois dans le compartiment épithélial et dans le compartiment stromal de tumeurs mammaires (Wilson et al., 1994 ; Nagy et al., 1996) et, *in vitro*, des lignées épithéliales cancéreuses mammaires expriment ce récepteur (Tsarfaty et al., 1992 ; Wilson et al., 1994 ; Byers et al., 1994). L'HGF/SF est exprimé dans les tumeurs mammaires. Cette expression se cantonne généralement aux cellules stromales (Wilson et al., 1994 ; Rahimi et al., 1994) mais peut être présente également au niveau des cellules épithéliales (Wang et al., 1994 ; Nagy et al., 1996). Des taux importants d'HGF/SF dans les tumeurs vont de plus être associés à un mauvais pronostic (Nagy et al., 1994 ; Yamashita et al., 1994). Il semble donc que l'HGF/SF, synthétisé par les cellules du stroma, puisse agir de manière paracrine sur les cellules épithéliales sensibles à ce facteur et faciliter ainsi leur mobilité et leur prolifération (Byers et al., 1994 ; Rahimi et al., 1994). Des travaux ont montré que des cellules épithéliales cancéreuses mammaires sont capables de contrôler à leur tour l'expression de l'HGF/SF par les cellules du stroma via la synthèse de facteurs activateurs et inhibiteurs (TGF- β) (Rosen et al., 1994 a et b ; Seslar et al., 1993, 1995). Récemment, les travaux de Besser et al. (1997) ont montré qu'une forme constitutivement active du récepteur C-MET activait le gène de l'uPA (activateur du plasminogène de type urokinase), molécule impliquée dans les processus de dégradation matricielle par la plasmine.

4 : le TGF- β

Les études concernant l'implication du TGF- β dans le cancer mammaire restent quant à elles conflictuelles. Alors qu'*in vitro*, des lignées épithéliales cancéreuses mammaires qui expriment le TGF- β ainsi que ses récepteurs répondent au TGF- β par une inhibition de leur croissance (Arteaga et al., 1988 ; Sun et al., 1994), que la stimulation de la croissance de cellules hormono-sensibles est accompagnée d'une chute de l'expression du TGF- β et que des anti-oestrogènes vont stimuler cette expression et inhiber la

croissance cellulaire (Arrick et al., 1990 ; Knabbe et al., 1987, 1988), les résultats obtenus *in vivo* ont souvent montré une corrélation positive entre le TGF- β 1 et la progression de la maladie (Walker et al., 1994). Le traitement, par exemple, d'une lignée normalement régressive avec du TGF- β pendant 24 h va induire cette lignée à produire des tumeurs après transplantation (Li et al., 1993). Il semble que dans l'interprétation des résultats, il faille considérer plusieurs critères comme le taux d'expression des ARNm mais aussi la quantité effective de protéine, le type de TGF- β produit (β 1, β 2 ou β 3), le stade de la tumeur, le type de traitement déjà reçu par le patient ainsi que les localisations tissulaires de l'expression et du produit du gène (Mc Callum et al., 1994 ; Benson et Baum, 1994).

Le développement normal et pathologique de la glande mammaire est donc le résultat d'interactions très étroites entre les cellules mammaires (épithélium et stroma) et l'organisme complet (interactions de type endocrine mettant en jeu différents facteurs de croissance et hormones véhiculés par la circulation sanguine) mais également entre le compartiment épithélial et le compartiment stromal (interactions de type paracrine à l'intérieur du même organe). Ceux-ci sont séparés l'un de l'autre par une membrane basale qui pourra réguler ces interactions. Une balance entre le stockage et la libération de facteurs de croissance, liée respectivement à la formation ou à la dégradation de la matrice extracellulaire environnante, pourrait orchestrer ces interactions.

V MATRICE EXTRACELLULAIRE ET MORPHOGENESE MAMMAIRE

La matrice extracellulaire joue un rôle important dans le processus de morphogénèse mammaire (Pour revue, Bissell et Hall, 1987). L'élongation du réseau canalaire épithélial lors du développement mammaire est accompagné d'une formation de la lame basale par les cellules myoépithéliales (Daniel et Silberstein, 1987) qui sera de plus en plus épaisse au fur et à mesure que l'on s'éloignera des bourgeons terminaux et quasiment absente au niveau de ceux-ci (environ 20 fois plus fine qu'autour des canaux).

Stade embryonnaire



FN
LN
PGs
COL(I,IV)
TN

Juvenile



FN
LN
PGs
COL(I,IV)
TN

FN : Fibronectine
LN : Laminine
PGs : Proteoglycans
COL(I,IV) : Collagene I, IV
TN : Tenascina

Adulte

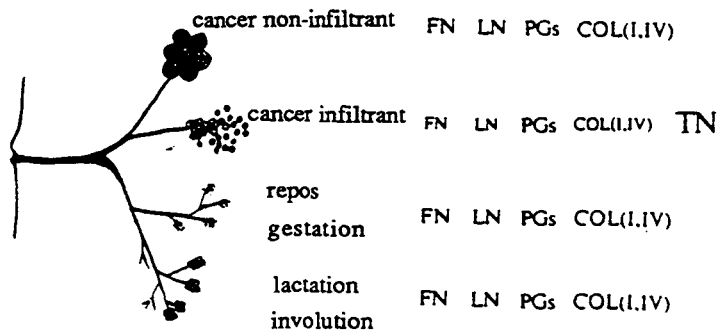


Figure 7 : Distribution des composants de la matrice extracellulaire lors du développement et de la cancérogenèse mammaire (d'après Sakakura, 1991).

Cette matrice se compose essentiellement de collagène de type I et de type IV, de protéoglycanes, de lamine, de fibronectine, de ténascine qui ont la propriété de pouvoir interagir les uns avec les autres grâce à des domaines spécifiques de liaison. Ces constituants pourront contribuer aux modifications de l'architecture des organes en interagissant par le biais de récepteurs membranaires tels que les intégrines, les cadhérines, le syndécanne présents à la surface des cellules. De par leur constitution, ils auront aussi la propriété de pouvoir séquestrer des facteurs de croissance tels, par exemple, les facteurs pouvant se fixer à l'héparine et aux héparanes sulfates (FGF...). La distribution des différents composants de la matrice extracellulaire dans la glande mammaire est résumée dans la figure 7. *In vitro*, de nombreux auteurs ont tenté d'analyser les relations entre les cellules épithéliales et la matrice extracellulaire en recréant une matrice artificielle sur laquelle sontensemencées des cellules mammaires. Le premier type de matrice utilisée est le collagène de type I préparé à partir de queues de rat. Emerman et Pitelka (1977) ont cultivé en monocouche des cellules issues de glandes mammaires de souris en pré-lactation sur différents substrats (plastic, collagène) en présence d'hormones et n'ont obtenu une différenciation complète avec présence de vésicules sécrétrices que dans le cas d'une culture en collagène flottant dans le milieu de culture. Par la suite, d'autres travaux sont parus sur la formation de structures tubulaires par des cellules épithéliales mammaires cultivées en collagène (Bennett, 1980 ; Ormerod et Rudland, 1982 ; Richards et al., 1983) mais rares sont les études qui ont réussi à reproduire une glande mammaire présentant des bourgeons terminaux ou totalement différenciée présentant à la fois des alvéoles creuses et une synthèse de toutes les protéines du lait. L'expérience de Daniel et al. (1984) a d'ailleurs pu montrer que le collagène de type I ne représentait qu'une matrice primitive: en plaçant du collagène contenant un fragment d'épithélium mammaire dans du tissu adipeux mammaire de souris, l'épithélium contenu dans le collagène ne forme que des structures "pointues" alors que l'épithélium qui a réussi à envahir le tissu adipeux et à entrer en contact avec les adipocytes va former de véritables bourgeons terminaux. C'est pourquoi, de nouvelles matrices ont été recherchées et celle qui a donné les meilleurs résultats est une matrice

préparée à partir du sarcome murin de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Alors qu'en gel de collagène ne sont détectées que peu de protéines de lait (transferrine, caséines), la culture des cellules épithéliales mammaires (isolées à partir de souris en gestation) en EHS conduit à la formation de structures alvéolaires polarisées et creuses (présentant donc une lumière) ainsi qu'une forte synthèse et production de protéines de lait (Barcellos - Hoff et al., 1989 ; Aggeler et al., 1991). Ainsi, l'utilisation d'une matrice extracellulaire reconstituée riche en composants (Laminine, collagène de type IV, HSPG, entactine, vitronectine, TGF- β , FGF-2, EGF, IGF-1, PDGF, NGF ; cf: Santos et Nigam, 1993) est capable à elle seule d'induire une morphogenèse mammaire semblable à celle observée *in vivo* avec possibilité de phénotype différencié suivant l'origine des cellules utilisées. Cette matrice a ensuite été régulièrement utilisée en tant que substrat pour étudier par exemple le développement mammaire à partir de micro-fragments mammaires (organoïdes) isolés (Darcy et al., 1991 ; Kim et al., 1993) ou le comportement cellulaire de lignées normales ou tumorales vis à vis du substrat (Petersen et al., 1992 ; Bergstraesser et Weitzman, 1993).

Nous venons de présenter certaines données relatives à la formation de la lame basale tout au long de la morphogenèse mammaire et à l'implication des hormones et des facteurs de croissance dans la croissance des cellules épithéliales (qu'elles soient normales ou cancéreuses). Cependant, ces mécanismes nécessitent également un remaniement de la matrice extracellulaire et de nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer le rôle éventuel d'enzymes protéolytiques dans le processus d'invasion du compartiment stromal par les cellules épithéliales lors des étapes du développement normal de la glande mammaire.

VI PROTEASES ET MORPHOGENESE MAMMAIRE

L'implication de protéases dans le développement des mammifères et dans l'invasion tumorale et la métastase a fait l'objet de nombreuses publications et revues

(Alexander et Werb, 1989 ; Matrisian et Hogan, 1990 ; Stetler-Stevenson et al., 1993 a et b ; Mignatti et Rifkin, 1993 ; Wolf et al., 1994 ; Jiang et al., 1994). Elles mettent essentiellement en avant l'intervention de trois familles distinctes de protéases: les protéases à cystéine, les métalloprotéases matricielles et les protéases à sérine (système de la plasmine).

1 : Les protéases à cystéine

Les protéases à cystéine regroupent les endo et exo-peptidases telles que les cathepsines B, H, L et N. Elles sont souvent synthétisées sous la forme de pro-enzyme et doivent subir un clivage protéolytique pour acquérir une forme catalytique. Leur activité est contrôlée à l'intérieur tout comme à l'extérieur des cellules par des inhibiteurs spécifiques regroupés sous le nom de cystatines (Mignatti et Rifkin, 1993).

2 : Les métalloprotéases (MMP) matricielles

Les MMP constituent une large famille de 14 protéases regroupant les collagénases interstitielles, les stromélysines, les gélatinases... Elles sont également synthétisées sous la forme de proenzymes devant être clivées pour pouvoir exercer leur activité catalytique. Elles ont la propriété de posséder un atome de Zinc dans leur site actif et sont capables de dégrader la plupart des constituants de la matrice extracellulaire, avec cependant une certaine spécificité pour chacune d'entre-elles. Leur activité peut être inhibée par au moins trois inhibiteurs spécifiques (TIMP 1 à TIMP 3 , pour Tissue Inhibitor of MetalloProteases) qui ont pour propriété soit de bloquer le site catalytique par un phénomène d'encombrement stérique, soit de se fixer à la pro-enzyme et empêcher ainsi sa conversion en protéase active (Ray et Stetler-Stevenson, 1994).

3 : Les protéases à sérine

Cette famille regroupe l'élastase leucocytaire et les protéines du système de la plasmine. Celui-ci est un système complexe dans lequel le plasminogène, une protéine du plasma sanguin, va être converti en plasmine, protéase capable de dégrader des

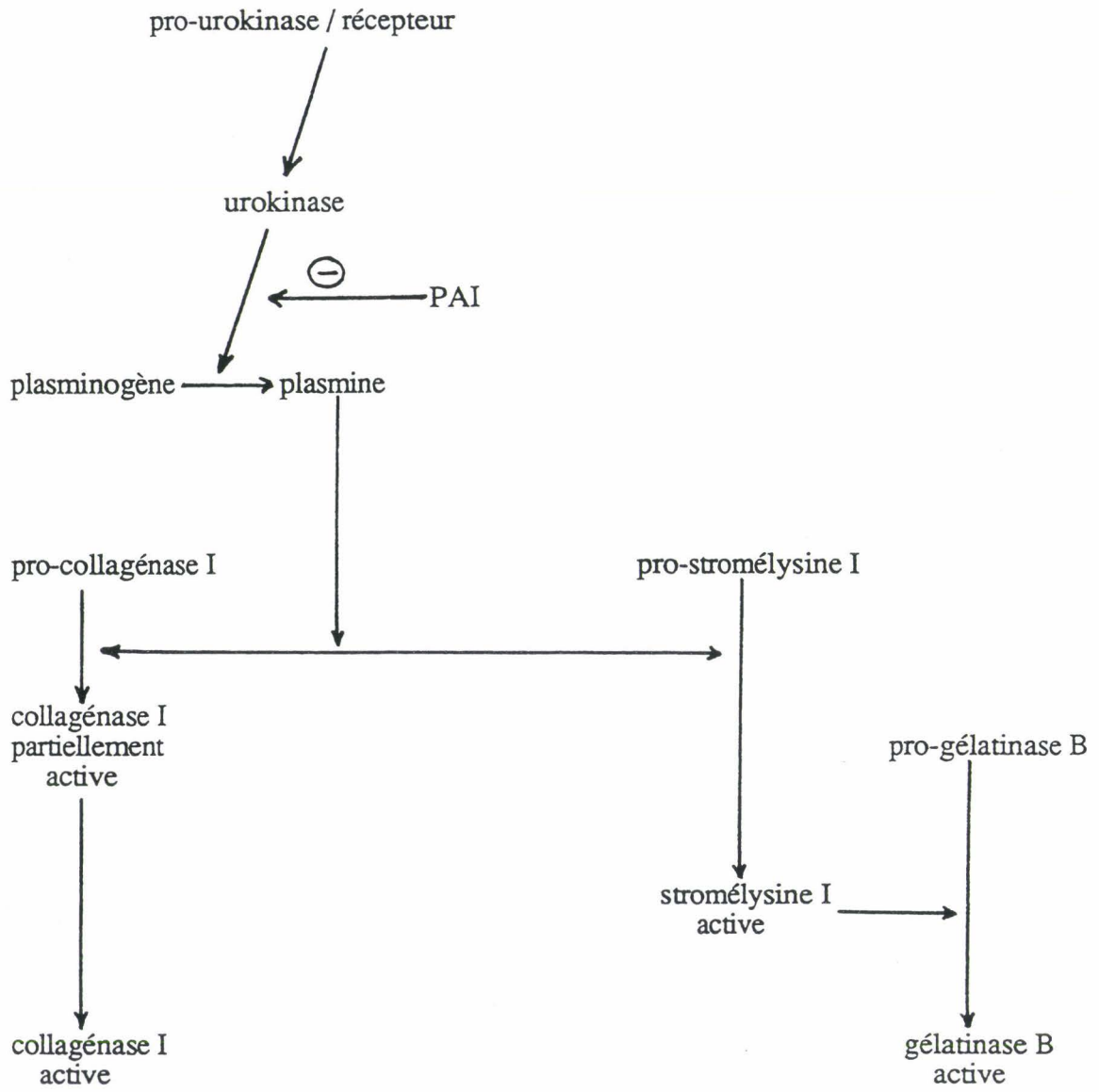


Figure 8 : cascade d'activation des protéases par l'uPA (schéma hypothétique d'après Wolf et al., 1994).

constituants matriciels tels que la fibronectine, la laminine, les gélatines et les protéoglycanes. Par ailleurs, la plasmine aura également la propriété de cliver différents zymogènes tels que les pro-stromélysines, les pro-collagénases, les élastases latentes (Mignatti et Rifkin, 1993) qui, activées, pourront à leur tour dégrader la matrice extracellulaire. Cette cascade d'activations protéasiques est représentée par la figure 8. La conversion du plasminogène en plasmine, quant à elle, est assurée par le biais de deux activateurs du plasminogène (PA), l'un de type tissulaire (tPA) ayant un rôle dans la thrombolyse, l'autre de type urokinase (uPA) ayant un rôle plus marqué dans le remodelage de la matrice (pour revues, voir Plow et al., 1995 ; Maksimenko, 1995 ; Tkachuk et al., 1996). Notons que ce dernier est synthétisé sous une forme inactive (pro-uPA) et que son clivage sous une forme active est réalisé par diverses protéases dont la plasmine elle-même (figure 9). L'activité des PA va être régulée de deux manières. La première fait intervenir un récepteur membranaire (par exemple uPAR) sur lequel l'activateur du plasminogène de type urokinase, synthétisé sous la forme de pro-activateur inactif, va se fixer avec une haute affinité et être clivé, entre autre par la plasmine, pour acquérir sa forme active. Cette interaction aura en plus pour effet de localiser l'activité enzymatique de l'uPA au niveau membranaire. Le deuxième type de régulation de l'activité des PA met en jeu des molécules inhibitrices regroupées sous le nom de PAI (Plasminogen Activator Inhibitor) dont les plus étudiés actuellement sont le PAI-1 et le PAI-2. L'association du PAI à l'uPA lui-même associé à son récepteur va permettre l'internalisation et la dégradation de ce complexe à l'intérieur de la cellule et réguler de manière négative la conversion du plasminogène en plasmine à l'extérieur de la cellule.

Le rôle de l'uPA dans les mécanismes de migration et d'invasion cellulaire a été clairement établi par Pepper et al. (1987) qui ont pu montrer que des cellules endothéliales en migration présentaient une forte activité uPA alors que la cessation des mouvements migratoires était reliée à une chute de l'activité uPA. Par ailleurs, une stimulation de l'angiogenèse par le FGF-2 provoque une augmentation de la production d'uPA (Montesano et al., 1986) qui peut être inhibée par des anticorps anti-FGF-2 (Sato et Rifkin 1988), ainsi qu'une augmentation du nombre d' uPAR à la surface cellulaire et de

complexes uPA-uPAR. De manière étonnante, l'angiogenèse est également accompagnée d'une élévation du taux de PAI-1 dont le rôle serait de contrôler la dégradation matricielle et de la limiter à certains endroits bien précis (Pepper et al., 1992 b). Il semble également qu'il faille dissocier l'effet du FGF-2 sur le système uPA de l'effet du FGF-2 sur la prolifération des cellules endothéliales (Isacchi et al., 1991). Par ailleurs des agents inhibiteurs de l'angiogenèse tels que le TGF- β ou des stéroïdes angiostatiques vont exercer leur effet en diminuant le taux d'activité uPA ou en augmentant la quantité de PAI synthétisée par les cellules endothéliales (Blei et al., 1993 ; Pepper et al., 1991). Dans un modèle de tubulogenèse *in vitro* induite par des fibroblastes MRC-5 sur des cellules épithéliales rénales, Montesano et al. (1991a) ont pu montrer que l'effet tubulogène des fibroblastes sécréteurs d'HGF/SF entraînait une augmentation de l'expression et de l'activité uPA ainsi qu'une augmentation des uPAR et que ces deux phénomènes pouvaient être inhibés par l'addition d'anticorps anti-HGF/SF (Pepper et al., 1992 a) ou d'aprotinine, inhibiteur de protéases.

Dans le cas de la morphogenèse mammaire, la stromélysine-1 jouerait un rôle dans le branchement des canaux mammaires (Sympson et al., 1994). De hauts niveaux de collagénases ont pu être relevés lors de la gestation alors qu'ils sont plus faibles durant la lactation (Talhok et al., 1991). Les ARNm du tPA commencent à être exprimés quatre jours après le début de l'involution mammaire chez la souris, période au cours de laquelle les alvéoles sécrétrices se dédifférencient (élimination de l'épithélium sécréteur de lait) et retrouvent leur anatomie de pré-gestation (Talhok et al., 1992). Cette expression est accompagnée d'une expression des ARNm de la gélatinase et de la stromélysine sur une durée totale de sept jours (Talhok et al., 1992 ; Dickson et Warburton, 1992). Parallèlement, les ARNm des TIMP et de PAI-1 subissent un pic d'expression à 4-5 jours après le début d'involution. Ces deux molécules auraient un rôle dans le contrôle de l'involution en régulant le rapport entre protéases et inhibiteurs. Seules les alvéoles mammaires seraient alors modifiées et pas le mésenchyme mammaire environnant. Dans le cas du cancer du sein, des études immunologiques directes ou indirectes (dosages ELISA) ont mis en avant l'implication du système uPA/PAI dans l'invasion tumorale et

l'ont corrélée avec un mauvais pronostic. Jankun et al. (1993) ont mis en évidence une expression de l'uPA, de l'uPAR mais aussi du PAI-1 plus forte dans les tumeurs mammaires malignes que dans les tumeurs bénignes ou dans le sein normal. Les études immunologiques réalisées par Pyke et al. (1993) dans les tumeurs mammaires ont également mis en évidence l'implication des macrophages qui expriment les uPAR dans 32 cas sur 40. Des taux élevés d'uPA et de PAI-1 vont être associés à un pronostic défavorable quant au temps de rechute et la survie du patient (Jänicke et al., 1994 ; Foekens et al., 1994 ; Bouchet et al., 1994), ce qui peut paraître étonnant dans le cas de PAI-1 mais qui pourrait s'expliquer par le fait que PAI-1 stabiliserait la matrice en des points précis favorisant l'implantation des cellules tumorales (au niveau de la tumeur mais aussi au point de croissance de la métastase), la formation du stroma tumoral et l'angiogenèse tumorale (Foekens et al., 1994). Par contre, un taux élevé de PAI-2, qui a une affinité plus élevée pour l'uPA que le PAI-1, va pouvoir être associé à un pronostic favorable (Bouchet et al., 1994 ; Foekens et al., 1995 a).

Ainsi, le développement normal et pathologique de la glande mammaire est un phénomène complexe mettant en jeu de nombreux facteurs de types endocrines ou paracrines, des interactions complexes entre l'épithélium mammaire, la membrane basale, le mésenchyme et le tissu adipeux mammaires ainsi qu'une balance étroite de la régulation des mécanismes de formation et de dégradation de la matrice extracellulaire.

OBJECTIFS DE RECHERCHE

Sur la base de ces données bibliographiques et considérant le rôle important des migrations épithéliales dans les phénomènes de morphogenèse normale ou cancéreuse, nous avons voulu analyser l'implication éventuelle de l'uPA et de son inhibiteur, le PAI-1, en créant des modèles *in vitro* de migration et d'invasion épithéliales mammaires. Dans notre étude, nous définissons la migration cellulaire comme un déplacement de cellules selon un plan bidimensionnel (à la surface de boîtes de culture par exemple). Quant à l'invasion cellulaire, nous la définissons selon un espace tridimensionnel, dans une matrice extracellulaire.

Notre travail a consisté dans un premier temps à mettre au point des modèles *in vitro* de développement mammaire normal et pathologique pouvant réunir, de façon simplifiée, les différents effecteurs de ces phénomènes :

- 1 - une matrice extracellulaire
- 2 - un mésenchyme inducteur
- 3 - un épithélium mammaire

1 - la matrice extracellulaire

Afin de réaliser des cultures tridimensionnelles, c'est-à-dire donner la possibilité à des cellules de se mouvoir dans tous les axes de l'espace, différents types de matrices extracellulaires sont disponibles dans le commerce et le plus utilisé en culture cellulaire est l'EHS. Cependant, sa composition riche en facteurs de croissance de tous types est un élément limitant dans l'interprétation des résultats obtenus avec cette matrice. Afin de ne pas faire intervenir ces facteurs de croissance exogènes, nous avons opté pour l'utilisation d'une matrice plus simple de composition: le collagène de type I, obtenu à partir de tendons de queues de rat (technique apprise dans le Laboratoire de Morphogenèse du Pr. Montesano à Genève).

2 - le mésenchyme inducteur

Dans nos modèles de reconstitution *in vitro*, nous nous sommes basés sur les résultats de Montesano et al. (1991 a, b) pour le choix du mésenchyme inducteur. En effet, cette étude a montré que des fibroblastes de types MRC-5, NIH 3T3, Swiss 3T3 ainsi que leur milieu conditionné étaient capables d'induire une tubulogénèse à partir d'une suspension de cellules épithéliales de rein (MDCK) et que cette induction était le fruit de l'expression d'un facteur d'essaimage et de tubulogénèse: l'HGF/SF. Nous avons donc utilisé ces différents types de fibroblastes en tant que mésenchyme inducteur.

3 - l' épithélium mammaire

La première approche a été d'utiliser comme épithélium un bourgeon mammaire prélevé au stade le plus précoce de la morphogénèse mammaire. Des coupes histologiques ainsi que des montages *in toto* ont été effectués sur des glandes mammaires de souris embryonnaires, néo-natales, pré-pubertaires et pubertaires afin d'évaluer l'état d'avancement morphologique de ces glandes au cours du développement. Chez des embryons de souris au stade embryonnaire E12 (12^{ème} jour d'incubation), nous avons appris à localiser les bourgeons mammaires à leur stade initial. Ceux-ci, ainsi que ceux correspondant à des stades plus avancés, ont été utilisés initialement en tant qu'épithélium dans nos modèles. Autant que faire se peut, nous nous sommes attachés à travailler en système homologue (fibroblastes et cellules épithéliales issus de la même espèce). Cependant, les échecs successifs rencontrés quant à l'obtention d'une véritable morphogénèse mammaire nous ont obligés à changer notre orientation expérimentale. Nous avons alors utilisé non plus des bourgeons embryonnaires murins mais des lignées cellulaires humaines. Des cultures primaires de cellules épithéliales de sein nous ont donné des résultats morphologiques semblables à ceux que l'on peut observer *in vivo* (formation de tubules mammaires en présence de fibroblastes) lors des stades précoces de développement mammaire. L'utilisation de lignées immortalisées ainsi que de lignées cancéreuses hormo-dépendantes ou non nous a permis de pouvoir comparer le comportement de cellules qui ont perdu leur statut normal par rapport à celui des cultures primaires.

Après avoir défini les caractéristiques morphologiques de nos modèles de reconstitution *in vitro* et établi le rôle des différents effecteurs de cette morphogénèse expérimentale (rôle de la matrice extracellulaire, implication de facteurs de croissance), nous avons dans un deuxième temps appliqué ces modèles à l'étude des mécanismes de dégradation matricielle par les protéases dans les phénomènes de migration et d'invasion cellulaires. Nous nous sommes penchés plus particulièrement sur le rôle joué par l'uPA et l'un de ses inhibiteurs, le PAI-1, tous deux impliqués dans la cascade d'activation du plasminogène en plasmine dont la conséquence directe sera une dégradation de la matrice extracellulaire.

Nous avons analysé le rôle de chacun des compartiments cellulaires (épithélium et mésenchyme) afin de déterminer s'il existe un "rapport de force" entre ces deux compartiments ou si chacun participe de manière active aux mécanismes de migration et d'invasion des cellules épithéliales mammaires.

Dans cette optique, nous avons tout d'abord réalisé des dosages d'activité uPA ainsi que des dosages de PAI-1 dans nos modèles de reconstitution. Ces différents dosages ont été réalisés sur les lysats cellulaires épithéliaux ainsi que sur leurs surnageants dans des conditions où les cellules épithéliales sont induites ou non par le mésenchyme. Les dosages de l'activité uPA ont été faits de manière indirecte par mesure d'une dégradation d'un substrat chromogène. Les dosages de PAI-1 ont été réalisés à partir de kits ELISA.

Nous avons ensuite cherché à déterminer l'implication de la composante mésenchymateuse dans ces mécanismes d'invasion et de migration cellulaire épithéliale. Nous avons donc également réalisé des dosages d'activité uPA et de PAI-1 sur du mésenchyme soumis à l'action d'une stimulation épithéliale (fibroblastes stimulés par du milieu conditionné par les différents types épithéliaux utilisés précédemment).

Nous avons analysé les résultats obtenus à partir des dosages d'activité uPA et de PAI-1 réalisés sur les cellules épithéliales ainsi que sur les fibroblastes afin d'appréhender le rôle de ces deux molécules dans nos modèles de reconstitution *in vitro* d'invasion et de migration cellulaires épithéliales mammaires.

CHAPITRE I

**MISE AU POINT DE
MODELES IN VITRO DE
RECONSTITUTION MAMMAIRE**

INTRODUCTION

Dans cette première partie, notre travail a consisté à mettre au point des modèles *in vitro* de développement de glande mammaire normale ou cancéreuse afin de caractériser la capacité de cellules épithéliales à entreprendre une réorganisation morphologique.

Une première série d'expériences a été effectuée à partir de prélèvements de bourgeons mammaires sur des embryons de souris âgés de 12,5 à 14,5 jours. Ces bourgeons ont été cultivés *in vitro* en matrice de collagène et en présence de fibroblastes connus pour produire un facteur d'essaimage et de tubulogenèse, l'HGF/SF. Nous avons travaillé dans un système homologue, c'est-à-dire dans lequel toutes les cellules proviennent d'une même espèce animale (dans ce premier cas, nous travaillons dans un système souris).

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons non plus utilisé des bourgeons mammaires embryonnaires mais réalisé des cultures à partir de cellules épithéliales mammaires humaines normales, immortalisées ou cancéreuses. Dans ce cas, le type de fibroblastes utilisés est la lignée pulmonaire embryonnaire humaine MRC-5. Les cellules épithéliales ont été cultivées tout d'abord en boîtes de culture en présence ou non de milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5. Elles ont ensuite été placées dans un système tridimensionnel (gel de collagène) dans des conditions de co-culture avec les fibroblastes MRC-5 ou en présence de leur milieu conditionné.

Enfin, dans une troisième série d'expériences, nous avons contrôlé la nature du facteur mésenchymateux produit par les fibroblastes MRC-5 et entraînant l'essaimage de certains de nos types cellulaires épithéliaux.

MATERIEL ET METHODES

I REPERAGE DES GLANDES MAMMAIRES DE SOURIS

Les glandes mammaires (paires abdominales n°4 et n°5) ont été prélevées sur des souris Swiss femelles à différents stades: embryonnaire (E), nouveau-né (N), jeune (J), jeune pré-pubertaire (J25: 25 jours après la naissance), jeune femelle vierge (J35), femelle

en gestation (G) et femelle en lactation (L). Les stades embryonnaires sont déterminés à partir de l'observation des bouchons vaginaux (jour embryologique E0) sur des femelles mises en accouplement pendant une nuit. A partir des prélèvements, trois types de manipulation ont été réalisés:

- colorations histologiques, pour les stades E11, E12, E14, E16, N, J10, J20, J25, J30, J35, L31.
- montages *in toto*, pour les stades N, J9, J15, J23, J35, G17, L15.
- cultures organotypiques en gel de collagène, pour les stades embryonnaires E12 à E14.

1 : Repérage des glandes mammaires sur les embryons de souris

Les souris femelles gravides sont tuées par dislocation cervicale au jour de gestation désiré. Après désinfection à l'alcool 96°, la peau est incisée circulairement sous les membres antérieurs et retournée pour laisser apparaître la paroi abdominale. Une entaille est pratiquée stérilement dans la cavité abdominale. Les cornes utérines sont prélevées à l'aide de pinces fines et plongées dans une solution saline de Earle (Eurobio). Elles sont ensuite découpées en fragments à partir desquels seront retirés les embryons un à un. Après lavage en solution saline, ceux-ci sont fixés au Bouin ou au PAF, déshydratés, inclus en paraffine et sectionnés (cf: chapitre II-1 ci-après). Les coupes de 7 μm d'épaisseur sont alors colorées au rouge nucléaire et au micro-indigo-carmin (cf: chapitre II-2 ci-après) et les sections situées au niveau des bourgeons mammaires sont localisées sous microscope. Afin de repérer ces bourgeons plus facilement sur les coupes (diamètre d'un bourgeon mammaire embryonnaire au stade E14: 150 μm), une autre méthode a consisté à prélever sous loupe binoculaire les glandes directement sur de jeunes embryons fixés au PAF (après avoir vérifié par examen des gonades que ce sont des femelles) et à les pré-inclure dans une solution de gélose à 1,5% colorée à l'éosine à 0,1% et rendue liquide par chauffage. Celle-ci est refroidie, des petits cubes de gélose contenant les fragments mammaires sont isolés, inclus en paraffine et sectionnés. Les glandes

mammaires qui ont été colorées de manière passive par la gélose sont ainsi localisées plus aisément que sur les coupes d'embryon complet.

2 : Prélèvement des glandes mammaires sur souris femelles néo-natales et adultes

Des stades néo-nataux au stade lactation, les souris femelles sont tuées par dislocation cervicale, les glandes prélevées sous loupe binoculaire, fixées au PAF et préparées comme décrit ci-dessus pour les embryons (technique de pré-inclusion pour les glandes mammaires de souris néo-natales).

II EXPLOITATION HISTOLOGIQUE ET MONTAGES IN TOTO

1 : Coupes histologiques

Les échantillons sont fixés toute une nuit dans une solution de paraformaldéhyde (PAF 4% ; phosphate monosodique 0,1 M ; phosphate disodique 0,1 M ; NaCl 9 g/l ; MgCl₂ 0,5 mM ; pH 7,4) ou dans une solution de Bouin Hollande acétique (acétate de cuivre 125 mM ; acide picrique saturé 116 mM ; 10% d'une solution de formol à 40% ; acide acétique pur 1,5%). Ils sont ensuite rincés au PBS ou à l'eau (pour le bouin), déshydratés dans des bains d'alcools croissants (30° ; 70° ; 96° ; 100° ; 2 fois 30 mn chacun puis butanol toute une nuit) et inclus en paraffine après 6 h d'imprégnation. Les blocs de paraffine sont sectionnés en coupes de 7 µm d'épaisseur collées sur des lames enduites au préalable d'ovalbumine. Celles-ci sont enfin mises à sécher à 37°C pendant une semaine minimum.

2 : Colorations histologiques

Pour réaliser les colorations histologiques, les lames sont déparaffinées trois fois 5 mn dans du toluène et rehydratées dans des bains d'alcools décroissants (alcool 100°, 2 fois 5 mn ; alcool 96°, 5 mn ; alcool 70°, 5 min ; eau bidistillée, 10 mn). Elles sont ensuite plongées dans une solution de rouge nucléaire (0,1 g de rouge nucléaire dans 100 ml de sulfate d'aluminium à 5%) pendant 10 mn, rincées 10 mn à l'eau courante et plongées 30 sec. dans une solution de picro-indigo-carmin (0,25 g de carmin d'indigo dans 100 ml

d'une solution aqueuse saturée d'acide picrique). Elles sont enfin passées rapidement dans une solution d'eau acétique à 0,3%, déshydratées (alcool 70°, 30 sec. ; alcool 96°, 30 sec. ; alcool 100°, 2 fois 5 mn ; toluène, 3 fois 5 mn) et montées au Xam (GURR, BDH Laboratory, England).

3 : Montages *in toto*

Les souris femelles sont tuées et les glandes mammaires prélevées sous loupe binoculaire à l'aide de pinces fines et de ciseaux de Dowell. Après fixation une nuit au Carnoy (6 V d'éthanol 100, 3 V de chloroforme, 1 V d'acide acétique), les glandes sont dégraissées dans l'acétone (3 bains), réhydratées dans des bains d'alcools décroissants (96° et 70°) jusqu'à l'eau bidistillée puis colorées dans une solution de rouge nucléaire. Après rinçage à l'eau courante, les glandes sont alors déshydratées dans des bains d'alcools croissants jusqu'au xylène puis montées au Xam dans des lames creuses.

III CULTURES ORGANOTYPIQUES

1 : Préparation des gels de collagène

Les gels de collagène sont préparés stérilement à partir de tendons de queues de rat dissous dans l'acide acétique: les tendons sont prélevés sur des queues de rat stérilisées dans de l'alcool à 70° puis mis à sécher. Ils sont ensuite plongés dans de l'acide acétique 1/1 000 en respectant la proportion de 1g de tendon sec pour 300 ml d'acide acétique. L'ensemble est mis en agitation pendant 48 h à 4°C. La solution subit alors une première centrifugation à 2 000 g pendant 10 mn à 4°C pour éliminer les grosses fibres puis subit une deuxième centrifugation à 16 000 g pendant 1h à 4°C. Les surnageants sont ensuite aliquotés et congelés à -20°C jusqu'à utilisation. Après décongélation, chaque surnageant est dialysé contre 20 volumes de MEM dilué 10 fois pendant 18 h à 4°C en agitation. La solution stock de collagène ainsi préparée peut alors être gardée plusieurs jours à 4°C. Pour faire un gel de collagène (1,5-2 mg/ml), il suffit ensuite de mélanger rapidement sur un lit de glace 8 V de solution stock de collagène, 1 V de bicarbonate de Sodium à 22,2

g/l et 1 V de MEM 10 fois concentré, de répartir le mélange dans des plaques multipuits (24 puits, Greiner) et de laisser à température ambiante pendant 10 mn.

2 : Cultures organotypiques d'ébauches mammaires embryonnaires

La technique a consisté à prélever des bourgeons mammaires sur des embryons de souris aux stades E12 à E14 et à les cultiver en gel de collagène en présence ou non de différents types de fibroblastes (3T3, MRC-5, fibroblastes de sein) ou de milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5. Toutes les manipulations sont réalisées en conditions stériles (salle stérile, instruments passés au poupinel, solutions filtrées sur membranes Millipore de porosité 0,22 μ m). Les embryons sont prélevés stérilement selon la technique décrite dans le paragraphe I-1 et déposés dans une solution saline de Earle. Sous loupe binoculaire, les bourgeons mammaires sont disséqués et plongés dans diverses solutions de trypsine (Trypsine Difco à 2% ; Trypsine/EDTA Séromed à 0,5%/0,2% diluée ou non au 1/2 ; Trypsine/EDTA Eurobio à 0,05%/0,025% ; Trypsine Eurobio à 2,5%). L'épithélium mammaire est délicatement pelé du mésenchyme sous-jacent et l'action enzymatique est stoppée par utilisation de MEM contenant 50% de SVF. L'épithélium est ensuite emprisonné entre deux couches de collagène (2 x 300 μ l/puits de 16 mm de diamètre) et le tout est recouvert de 500 μ l de milieu conditionné ou non par les MRC-5 à diverses dilutions. Il peut également être emprisonné entre deux couches de collagène contenant pour la couche inférieure les fibroblastes (100 000 à 300 000 fibroblastes/ml de collagène), le puits étant alors rempli de milieu de culture non conditionné. Les gels sont alors mis à 37°C en étuve de culture.

IV CULTURES CELLULAIRES

1 : Lignées fibroblastiques

Les NIH-3T3, fibroblastes embryonnaires de souris (fournis par C. Lagroux, IBL-UMR 319, Institut Pasteur, Lille, France) et les MRC-5, fibroblastes de poumons embryonnaires humains (ATCC: CCL 171, Eurobio, Les Ulis, France) ont été cultivés

dans du milieu essentiel minimum de Eagle avec sels de Earle (Earle's salt MEM, Eurobio) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF, Eurobio) préalablement décomplémenté par chauffage 30 mn à 56°C, 100 UI/ml de péniciline (Eurobio), 100 µg/ml de steptomycine (Eurobio), 40 µg/ml de gentamycine (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA), 2 mM de L-glutamine (Eurobio) et 1% d'acides aminés non essentiels (Eurobio). Leur repiquage en boîte de culture se fait après rinçage dans une solution saline de Earle sans calcium ni magnésium (Eurobio) et passage 5 mn à 37°C dans une solution de Trypsine/EDTA (0,05%/0,025%, Eurobio).

2 : Préparation du milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5

Les fibroblastes MRC-5 sont ensemencés à raison de 120 000 cellules/ml en boîtes de culture (12 ml/boîte de 75 cm²). A subconfluence, le milieu de culture est aspiré, les cellules rincées deux fois puis chaque boîte de 75 cm² est remplie avec 12 ml de milieu complet (avec sérum) ou de sevrage (milieu sans sérum contenant 5 µg/ml d'insuline, 30 µg/ml de transferrine et 2 µg/ml de fibronectine). Après 48 h d'incubation, les milieux sont récupérés dans des tubes siliconés, centrifugés à 500 g pendant 10 mn pour éliminer les débris cellulaires et stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

3 : Lignées épithéliales mammaires

Les cellules MDA-MB-231 (ATCC: HTB 26), cellules épithéliales hormono-indépendantes de cancer de sein et les cellules MCF-7 (ATCC: HTB 22), cellules épithéliales hormono-dépendantes de cancer de sein, ont été fournies par le Dr. J-P. Peyrat du Centre Oscar Lambret (Lille) et cultivées respectivement entre les passages P477 à P506 et P20 à P47. Les cellules HBL-100 (ATCC: HTB 24), cellules isolées à partir de lait humain mais immortalisées par l'antigène T du SV40, ont été fournies par le Pr. Crépin (Bobigny, France) et cultivées entre les passages P50 à P70. Ces trois lignées mammaires ont été cultivées dans un milieu identique au milieu des fibroblastes MRC-5 mais contenant en plus 5 µg/ml d'insuline (Organon, Sérifontaine, France). Toutes les lignées cellulaires sont incubées à 37°C en atmosphère humide dans un mélange 5% CO₂, 95% air.

4 : Cultures primaires de cellules épithéliales et de fibroblastes de sein

Les cultures primaires de cellules épithéliales mammaires normales humaines (CEMN) et de fibroblastes mammaires normaux humains ont été préparées par le Dr. Xuefen Dong-Le Bourhis à partir de réductions mammaires selon la technique de Berthon et al. (1992): l'échantillon mammaire est dégraissé et dilacéré en fins morceaux dans du SVF puis mis à 37°C en agitation en présence de collagénase de type XI (450 à 500 UI/ml, Sigma) et de hyaluronidase (150 à 250 UI/ml, Sigma) pendant 4 à 5 h en milieu sans sérum. Les organoïdes (amas de cellules) sont ensuite récupérés par centrifugation (1000 g, 30 mn) sur gradient de densité (ficoll, 10 ml/tube de 50 ml). L'interface est récupérée et rincée deux fois dans du milieu sans sérum par centrifugation (1 000 g, 15 mn). Le dernier culot est repris dans du milieu de base: milieu constitué de DME/HAM F-12 (1/1, Sigma), d'HEPES à 10 mM, de L-Glutamine à 2 mM, de péniciline à 100 UI/ml, de streptomycine à 100 µg/ml, de gentamycine à 4 µg/ml et de fongizone à 0,25 ng/ml. Ce mélange est centrifugé rapidement à 200 g et le surnageant contenant les fibroblastes est récupéré pour être mis en boîtes de culture. Ces fibroblastes mammaires sont ensuite cultivés comme les fibroblastes MRC-5. Le culot contenant les organoïdes épithéliaux est réparti en boîtes de culture dans un milieu riche: milieu identique au milieu précédent mais contenant en plus de l'insuline à 10 µg/ml, du cortisol à 5×10^{-6} M (Sigma), de la toxine cholérique à 100 ng/ml (Sigma), de l'EGF à 2 ng/ml (Sigma), du CaCl₂ à 1,05 mM, du sérum de veau foetal à 5%. Les organoïdes vont adhérer au fond des boîtes et après quelques jours, des cellules épithéliales vont commencer à essaimer sur le plastique. Lorsque les cellules sont confluentes, on les met en présence d'un milieu à faible teneur en calcium (CaCl₂ 60µM ; sérum de veau chélaté sur Chelex 100, Sigma) qui permettra aux cellules en division de se détacher du tapis épithélial et de flotter dans le milieu de culture. Ces cellules pourront être récupérées par centrifugation et réparties dans de nouvelles boîtes en présence de milieu riche.

V ETUDE DU COMPORTEMENT DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES EN CULTURES BIDIMENSIONNELLES (2 D)

Les cellules épithéliales ont étéensemencées sur revêtement plastique traité pour la culture cellulaire à raison de 60 000 cellules/ml (10 000 cellules/cm²) dans leur milieu respectif et leur comportement a été observé sous microscope inversé à contraste de phase (Olympus IMT2).

L'effet du milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5 a été observé en mettant les cellules épithéliales en présence d'un mélange de milieu complet et de milieu conditionné MRC-5 (1/1), mélange renouvelé tous les 2 jours pendant 6 jours.

VI ETUDE DU COMPORTEMENT DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES EN CULTURES TRIDIMENSIONNELLES (3 D)

La technique consiste à recréer un épithélium mammaire primitif en déposant à haute densité des cellules épithéliales entre deux couches de collagène. Un premier gel contenant 500 000 fibroblastes/ml est coulé au fond d'un puits (300 μ l) et recouvert par 150 μ l de gel ne contenant pas de cellules. Au centre de cette couche est alors déposée une goutte (10 μ l) de suspension concentrée de cellules épithéliales contenant 20 000 cellules MCF-7 , 25 000 cellules MDA-MB-231, 25 000 cellules HBL-100 ou 50 000 CEMN. L'ensemble est mis à 37°C pendant 1 h pour permettre l'attachement des cellules. Après ce laps de temps, la suspension cellulaire constitue une micromasse et est recouverte de 200 μ l de gel puis de 500 μ l de milieu de culture pour cellules épithéliales. L'ensemble est mis à 37°C en étuve de culture. Dans les puits témoins, le gel inférieur ne contient pas de fibroblastes. Le milieu est renouvelé tous les 2 jours.

L'effet du milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5 sur les cellules épithéliales est apprécié en supprimant les fibroblastes du gel inférieur et en traitant les micromasses avec un mélange (1/1) de milieu de culture de cellules épithéliales et de milieu conditionné MRC-5, mélange renouvelé tous les deux jours pendant 7 jours.

Chaque type de culture a été fixé et inclus en paraffine selon la technique précédemment décrite et utilisé ensuite pour la réalisation de colorations histochimiques ainsi que pour des tests immunocytologiques.

VII CONTROLE DE LA NATURE DU FACTEUR MESENCHYMATEUX D'ESSAIMAGE ET DE TUBULOGENESE

Les cellules HBL-100 ont été cultivées en collagène selon la technique décrite précédemment. Différents types de stimulations ont été réalisés:

- stimulation par de l'HGF/SF recombinant humain (fourni par le Dr. Nakamura, Japon) à la concentration de 20 ng/ml.
- co-culture avec des fibroblastes MRC-5 (protocole standard) en présence d'anticorps neutralisants anti-HGF (fourni par le Dr. Nakamura) dilués au 1/500.
- stimulation par du milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5 (protocole standard) pré-incubé au préalable pendant 6 h à 37°C avec des anticorps neutralisants anti-HGF dilués au 1/500.

RESULTATS

I COMPORTEMENT DES EBAUCHES MAMMAIRES EMBRYONNAIRES DE SOURIS EN CULTURES 3 D

1 : Repérage anatomo-morphologique de la glande mammaire chez la souris

Avant d'effectuer les tests expérimentaux de cultures en collagène, une étude anatomo-morphologique de la glande mammaire de souris a été nécessaire afin d'apprendre à localiser ces glandes mammaires non seulement chez la souris jeune ou adulte mais également, et surtout, sur les stades embryonnaires. Nous avons donc réalisé des séries de coupes histologiques et de montages *in toto* sur des embryons murins (stades E11,5 à E19,5), des glandes mammaires de souris femelles aux stades néo-natal, prépubertaire, pubertaire, adulte, en gestation, en lactation et en involution. Les résultats

sont regroupés sur les planches 1 et 2. Ils montrent la formation de la crête mammaire (pl. 1A) puis le regroupement des cellules de cette crête pour constituer les ébauches (bourgeons) mammaires (pl. 1B). Ces bourgeons augmentent de taille et s'enfoncent dans le mésenchyme sous-jacent (pl. 1C-D). A la naissance, la glande est constituée d'un réseau tubulaire primitif (pl. 1E et 2A) qui va évoluer lentement chez la jeune souris (pl. 1F, 2B-C) puis plus rapidement lors de la puberté, avec apparition des bourgeons tubulaires terminaux (pl. 1H). En fonction de l'état physiologique de l'animal (gestation pl. 2F, lactation pl. 2G), nous voyons que ce réseau tubulaire a une structure qui évolue avec mise en place des acini dans lesquels le lait va être stocké. Au moment de l'involution, la glande mammaire subit un profond remaniement morphologique avec disparition des acini sécréteurs (pl. 2H) puis elle va retourner dans un état physiologique comparable à celui observé avant la gestation.

Grâce à cette étude préliminaire d'observation de coupes histologiques, nous avons appris à repérer les stades de développement mammaire embryonnaire (stade lenticulaire, en bourgeon...), étape nécessaire pour l'établissement des conditions de prélèvements dans le protocole de culture *in vitro*. Cette étude conforte les données générales extraites de la littérature (cf. Généralités, Chap. I).

2 : Modèle de reconstitution *in vitro* réalisé à partir d'ébauches embryonnaires

Nous avons tenté de mettre au point un modèle simple de développement normal de glande mammaire *in vitro* en prélevant des ébauches épithéliales mammaires sur de jeunes embryons de souris (stades E12 à E14) et en les nettoyant de leurs fibroblastes. Ces ébauches ont ensuite été cultivées dans un gel de collagène reconstitué contenant des fibroblastes inducteurs, ceci afin de fournir un environnement et un contexte tridimensionnel nécessaires à une formation tubulaire.

Nous avons tout d'abord testé différents types de solution de dissociation épidermique de concentration variable en trypsine afin de déterminer la solution optimale permettant de prélever de l'épiderme mammaire avec le moins de contamination mésenchymateuse.

Les ébauches embryonnaires de stade E14,5 présentent un bourgeon mammaire relativement bien développé (pl. 1C) *a priori* facilement prélevable sur les embryons. Cependant, de part leur constitution (long pédoncule reliant le bourgeon à l'épiderme), elles ont dû être abandonnées car trop souvent lors de la dissection, le pédoncule se rompt ou, lorsqu'il est présent, il amène une contamination mésenchymateuse. Les différentes mises au point ont été poursuivies à partir d'embryons murins âgés de 12,5 jours présentant des ébauches embryonnaires nettement moins développées (pl. 1B) mais situées en surface. A partir de différentes ébauches embryonnaires prélevées à ce stade, nous avons pu déterminer des conditions de dissociation épiderme-mésoderme qui consistent en une solution de trypsine à 2,5 % dans laquelle les ébauches sont placées pendant 15 mn à température ambiante.

Quelques résultats obtenus à partir de ces différentes cultures d'ébauches mammaires en collagène sont regroupés sur les planches 3 et 4.

Dans un seul cas (planche 3), nous avons obtenu un début de développement tubulaire mammaire en co-cultivant une ébauche mammaire E12,5 avec des fibroblastes 3T3: après 5 jours de culture, une excroissance s'est développée sur l'ébauche et s'est mise à se diviser pour former deux cordons qui ont poursuivi leur croissance jusqu'au huitième jour après la mise en culture, date à laquelle l'explant s'est entièrement nécrosé.

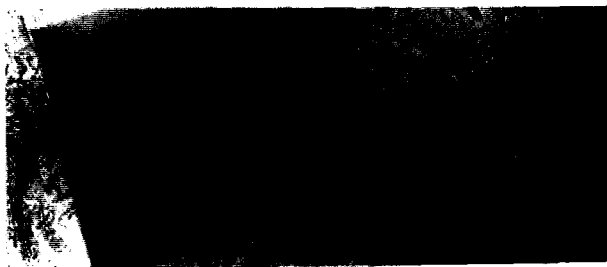
Dans les autres cas (planche 4), la culture d'ébauches embryonnaires, que ce soit en présence de fibroblastes murins (pl. 4G) ou d'autres fibroblastes tels que les MRC-5 ou des fibroblastes issus de sein, ou en présence de milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5 (pl. 4D-F), n'a pas abouti à la formation de structures tubulaires nettement définies et morphologiquement différentes de celles obtenues en conditions témoins (pl. 4A-C).

A la suite de ces résultats, nous avons modifié notre protocole expérimental en utilisant en lieu et place de l'épithélium mammaire embryonnaire un épithélium mammaire recréé à partir de quatre types cellulaires épithéliaux mammaires cultivés *in vitro*. L'utilisation de ces différents types cellulaires nous a permis de mettre au point différents

Planche 3 : bourgeon mammaire embryonnaire cultivé en collagène en présence de fibroblastes 3T3. Après 5 j de culture, remarquer l'apparition d'un tubule. Après 8 j, le tubule s'est divisé en deux et poursuit son élongation à l'intérieur du gel de collagène.



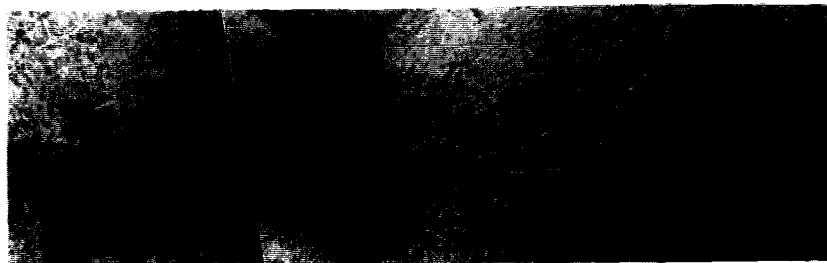
5j



6j



7j



8j

modèles *in vitro* de reconstitution mammaire (développement mammaire normal et développement mammaire cancéreux) :

- Dans un premier temps, nous avons cultivé ces types cellulaires sur un support plastique spécialement traité pour la culture et observé l'effet du milieu conditionné préparé à partir de fibroblastes inducteurs MRC-5. Nous avons pu ainsi déterminer si ces types cellulaires étaient sensibles à des facteurs diffusibles sécrétés par la composante mésenchymateuse.

- Dans un deuxième temps, nous avons réalisé les mêmes expériences que celles décrites ci-dessus en apportant comme élément nouveau la présence d'une matrice extracellulaire (gel de collagène). Nous établissons ainsi des conditions expérimentales proches de celles rencontrées *in vivo* lors du développement mammaire, qu'il soit normal ou cancéreux: présence d'une matrice extracellulaire supportant les mécanismes d'adhérence et d'invasion cellulaire, de dégradation matricielle et présence d'un mésenchyme inducteur.

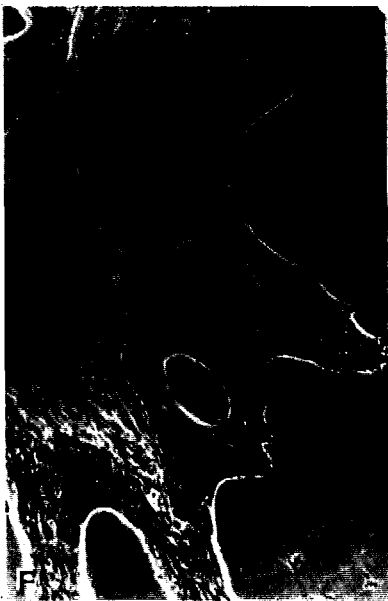
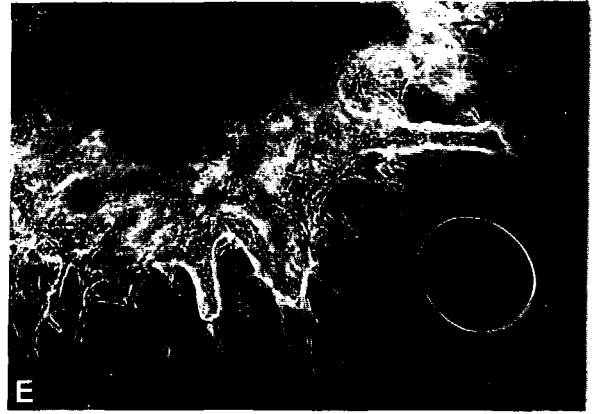
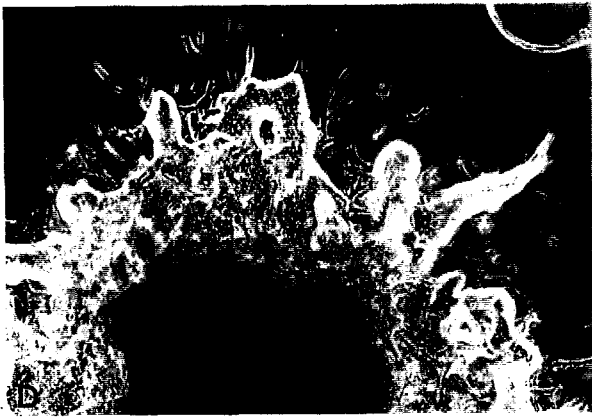
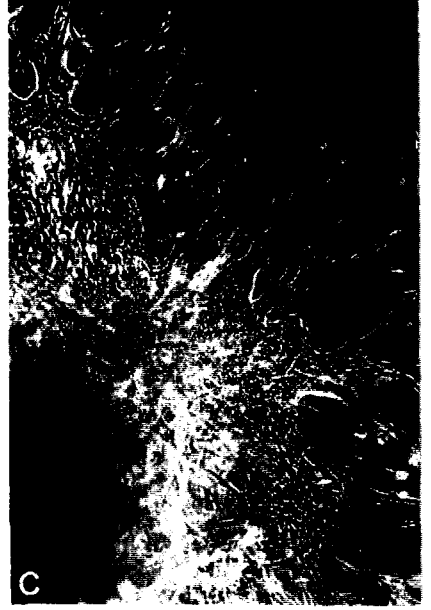
II COMPORTEMENT DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES EN CULTURES 2 D

Dans cette expérience, les différents types cellulaires sont ensemencés en boîtes de culture et mis en présence de 50% de milieu de culture de cellules épithéliales et 50% de milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5. Leur comportement est observé pendant 6 jours de cultures.

1 : Cellules normales (CEMN)

En conditions standards, c'est-à-dire en absence de milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5, les CEMN forment une population hétérogène composée de cellules rondes à cuboïdales plus ou moins dispersées, formant par endroits un épithélium à confluence, et de cellules bipolaires présentant des expansions cytoplasmiques (pl. 5A).

Planche 4 : Cultures organotypiques en gel de collagène d'explants mammaires prélevés sur des embryons de souris âgés de 12,5 à 14,5 jours. A: épithélium+mésenchyme non dissociés ; B-C: épithélium seul ; D, F: épithélium seul+milieu conditionné MRC-5 après 7j ; E: épithélium seul+milieu conditionné MRC-5 après 9j ; G: épithélium seul co-cultivé en présence de fibroblastes 3T3. La morphologie des explants reste similaire quelles que soient les conditions de cultures.



En présence de milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5, la morphologie des CEMN ne semble pas affectée puisqu'elle reste semblable à celle observée précédemment (pl. 5E).

2 : Cellules HBL-100

En cultures témoins, ces cellules présentent une morphologie typiquement épithéliale avec une population cellulaire homogène poussant en clones et formant rapidement un épithélium sur le fond de la boîte (pl. 5B).

En présence de milieu conditionné par les fibroblastes, les cellules HBL-100 adoptent une morphologie complètement différente de celle observée en conditions témoins puisqu'au lieu de pousser sous la forme de clones, les cellules se dispersent sur tout le fond de la boîte et présentent de nombreuses expansions qui leur donnent une allure fibroblastoïde (pl. 5F). Ainsi, ce type cellulaire semble répondre à un inducteur de type "facteur d'essaimage" apparemment présent dans le milieu conditionné.

3 : Cellules MCF-7

Ces cellules de morphologie typiquement épithéliale poussent sous la forme de clones compacts qui présentent à leur périphérie des cellules étoilées (pl. 5C).

En présence de milieu conditionné, le comportement de ces cellules n'est pas modifié (pl. 5G).

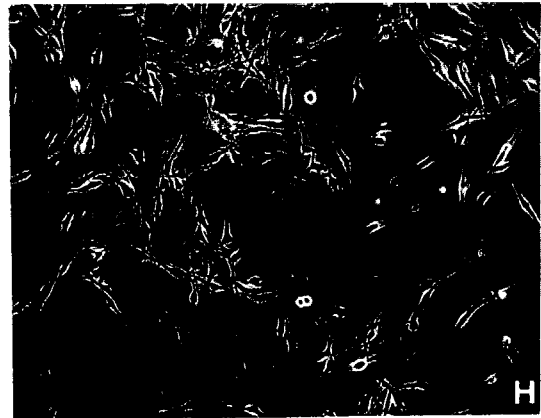
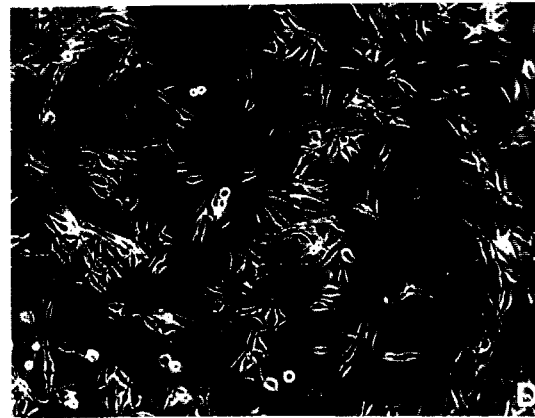
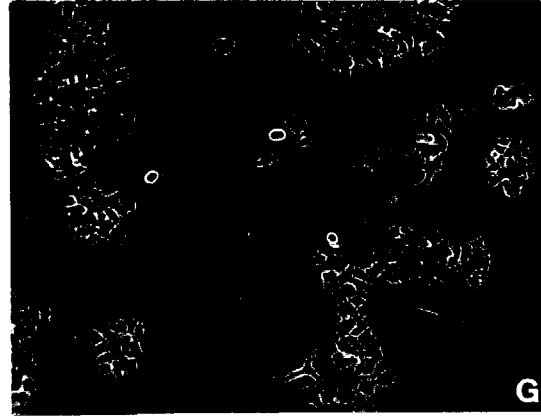
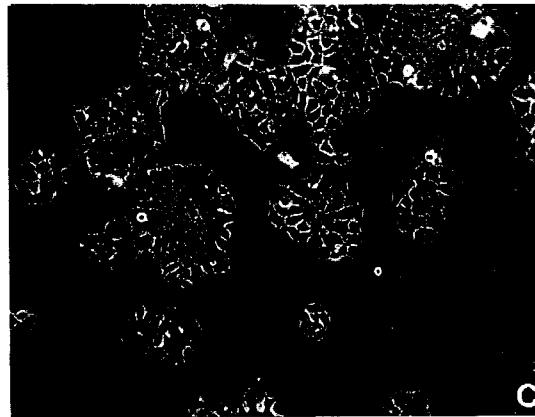
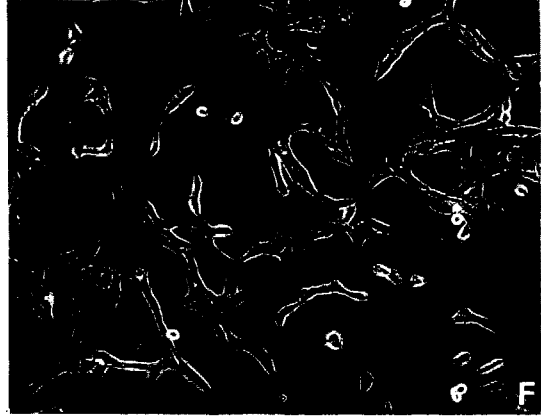
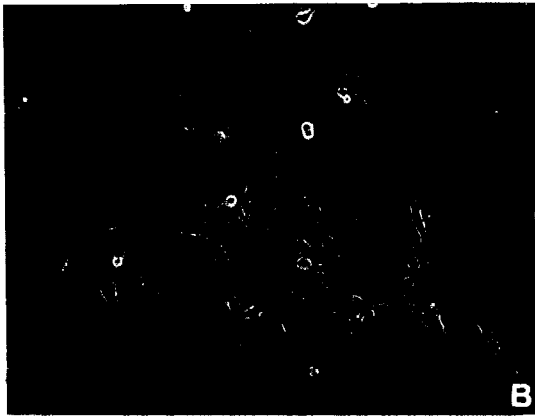
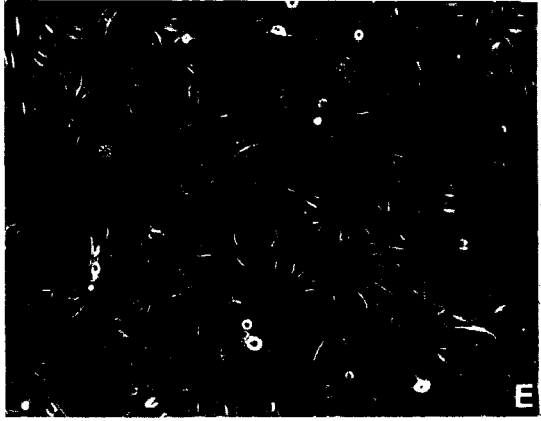
Il est à noter que dans les deux cas, arrivées à confluence, les cellules se nécrosent rapidement et meurent. De plus, lors du repiquage, le rinçage des cellules par une solution sans Calcium ni Magnésium avant passage dans la trypsine augmente considérablement leur décollement comparé à l'utilisation de trypsine seule, ce qui souligne l'importance des mécanismes d'adhérence et de cohésion cellulaires dans cette lignée de cellules cancéreuses.

4 : Cellules MDA-MB-231

Parmi les quatre types cellulaires étudiés, c'est cette lignée qui présente la plus importante faculté de migration puisque déjà en culture témoin, les cellules MDA-MB-231

Planche 5 : effet du milieu conditionné des fibroblastes MRC-5 sur la morphologie des cellules épithéliales mammaires humaines en cultures bidimensionnelles.

A, B, C, D : cultures témoins. E, F, G, H : stimulation par le milieu conditionné MRC-5.
A, E : CEMN. B, F : cellules HBL-100. C, G : cellules MCF-7. D, H : cellules MDA-MB-231.



ne poussent pas en clônes mais se répartissent de manière uniforme sur le fond des boîtes de culture. Plutôt qu'épithéliale, leur morphologie est d'allure fibroblastoïde et se traduit par une forme allongée et souvent bipolaire (pl. 5D).

La présence de milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5 ne fait qu'accentuer cet aspect, ce qui se traduit par un effilement encore plus important des cellules (pl. 5H). Cet effilement reflète un phénomène de dispersion cellulaire et révèle ainsi qu'un facteur mésenchymateux stimule la motilité de ces cellules. Cette lignée semble donc être également sensible à un facteur mésenchymateux d'essaimage.

Ainsi, dans cette première série expérimentale, nous avons pu mettre en évidence deux lignées cellulaires qui répondent sur le plan morphologique à une stimulation par le milieu conditionné des fibroblastes MRC-5:

- la lignée HBL-100 qui répond aux fibroblastes MRC-5 par un phénomène d'essaimage et de migration,
- la lignée MDA-MB-231 qui répond aux fibroblastes MRC-5 par une accentuation de son phénotype fibroblastoïde et de sa dispersion.

III COMPORTEMENT DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES EN CULTURES 3 D

Dans ce protocole expérimental, les cellules épithéliales sontensemencées à forte concentration dans des gels de collagène en présence ou non de fibroblastes MRC-5 ou de 50% de milieu conditionné par ces fibroblastes et de 50% de milieu de culture de cellules épithéliales. Leur comportement est observé pendant 7 jours. Les gels sont ensuite fixés, inclus en paraffines et analysés par histochimie (coloration au picro-indigo-carmin/rouge nucléaire ou coloration à l'hématoxyline de Hansen).

Avant d'effectuer ces observations, nous avons au préalable réalisé une série de cultures afin de déterminer la concentration optimale du dépôt de cellules épithéliales entre les deux couches de collagène. Ainsi, nous avons testé des gammes de concentration décroissante en cellules épithéliales: 100 000, 50 000, 25 000, 12 500 et 6 250

cellules/10 μ l. Après 7 jours de culture, l'état de la micromasse est observé: pour tous les types cellulaires, il y a nécrose complète pour la concentration de 100 000 cellules/10 μ l. Dans le cas des cellules normales dont la croissance est relativement lente, la concentration de 50 000 cellules/10 μ l permet de maintenir les micromasses pendant plus d'une semaine sans apparition de nécrose cellulaire. Pour les lignées cellulaires qui ont une croissance plus rapide, nous avons du utiliser la concentration de 25 000 cellules/10 μ l dans le cas des cellules HBL-100 et des cellules MDA-MB-231. En ce qui concerne la lignée MCF-7, nous avons utilisé une concentration inférieure (20 000 cellules/10 μ l) pour laquelle les cellules forment encore un épithélium jointif lors du dépôt. Cependant, la nécrose est rapide et inévitable et les cultures n'ont pu être menées à terme (6 à 7 jours) que dans de rares cas. Des stimulations hormonales (oestrogènes) ont été réalisées sur ce type de cultures mais n'ont pas amélioré la survie en collagène.

1 : CEMN

Lorsque les cellules normales sont cultivées en absence de fibroblastes MRC-5 ou de milieu conditionné, on observe au niveau de l'épithélium reconstitué en gel de collagène la formation de quelques cordons épithéliaux sans pour autant pouvoir déceler et pendant la culture et à l'observation sous microscope inversé la mise en place de lumière à l'intérieur de ces cordons (pl. 6A). Sur coupes histologiques, on peut voir que l'épithélium est pseudo-stratifié mais que les cordons ne présentent effectivement pas de lumière (pl. 6B).

Par contre, en condition de co-culture (pl. 6C) ou en présence de milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5 (pl. 6E), on observe après 3 jours une morphologie rappelant un développement normal avec apparition de nombreux tubules périphériques qui augmentent en nombre et en taille au fil des jours et s'organisent en arborescence. Les coupes réalisées à partir de ces cultures (pl. 6D) ont permis de confirmer l'existence d'une lumière au niveau des tubules mammaires périphériques mais également au niveau de la zone d'ensemencement qui se délamine, suggérant ainsi une polarisation des cellules épithéliales mammaires. Elles ont de plus montré l'importante

pénétration des cellules épithéliales sous forme de tubules au niveau des gels inférieurs et supérieurs tout autour de la micromasse.

La culture en collagène de ce type cellulaire normal permet de décrire l'acquisition par ces cellules d'un phénotype nouveau suggérant:

- une capacité de répondre à un stimulus provenant de facteurs diffusibles mésenchymateux,

- une capacité de former des tubules mammaires analogues à ceux observés *in vivo* lors des stades précoces de développement mammaire.

Notons que les mêmes résultats ont été obtenus en présence de fibroblastes isolés à partir de biopsies mammaires normales.

2 : Cellules HBL-100

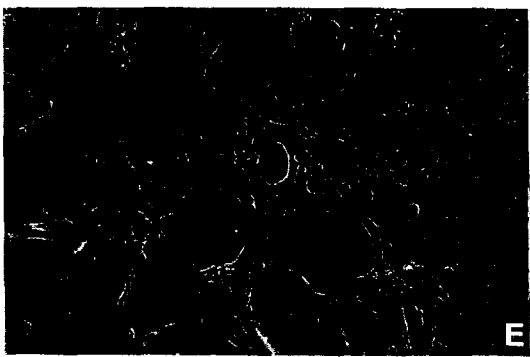
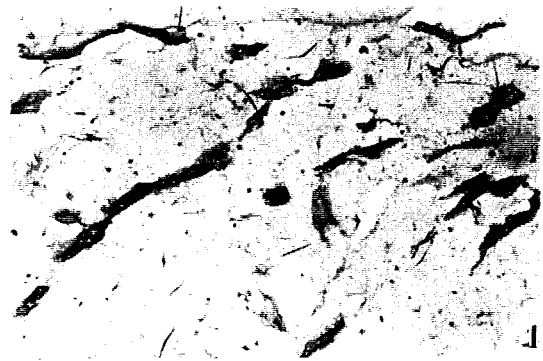
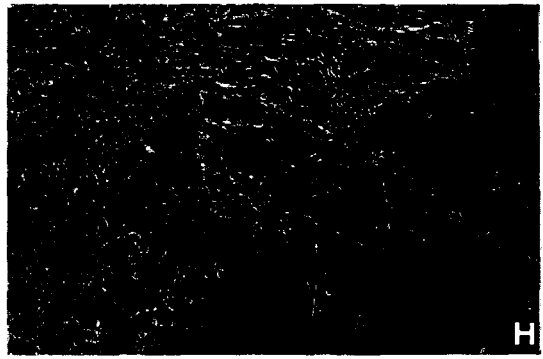
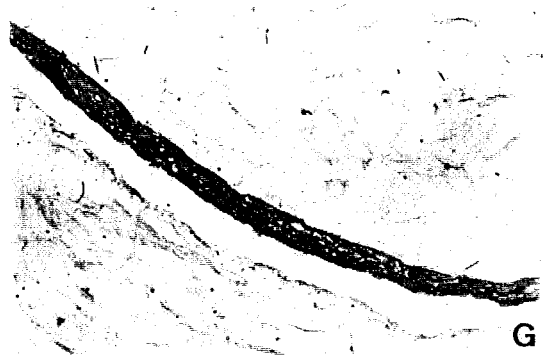
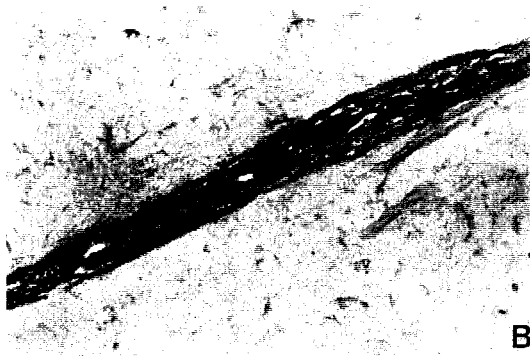
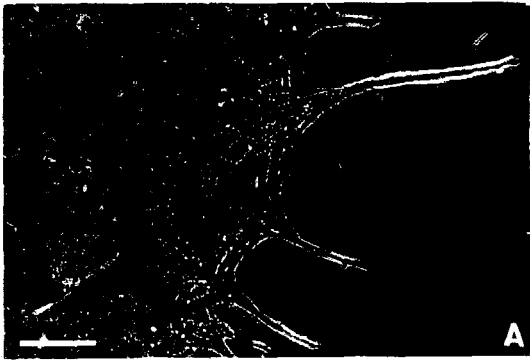
En conditions témoins, l'épithélium reconstitué par les cellules HBL-100 présente à sa périphérie de nombreuses cellules émettant vers l'extérieur des prolongements cytoplasmiques qui restent cependant de taille réduite (pl. 6F). En coupe, on observe un épithélium unistratifié n'émettant pas de cellules vers les deux gels environnants (pl. 6G).

En présence de fibroblastes MRC-5 (pl. 6H) ou de leur milieu conditionné (pl. 6J), le comportement des cellules HBL-100 est modifié dans le sens d'une formation d'un réseau de fins cordons épithéliaux qui s'étirent en périphérie de l'inoculat et qui vont croître avec la durée de la co-culture ou du traitement par le milieu conditionné. On ne peut cependant pas parler de structures tubulaires au sens strict puisque, comme l'ont confirmé les coupes histologiques, il n'y a jamais de formation de lumière mais plutôt un alignement de cellules les unes derrière les autres (pl. 6I).

Dans ces conditions, les cellules présentent donc une capacité à répondre morphologiquement à une induction mésenchymateuse. Cette réponse se traduit dans un contexte tridimensionnel par une invasion du collagène sous forme de cordons cellulaires qui certes ne peuvent être morphologiquement comparables à une structure mammaire normale mais présentent cependant une organisation relative (invasion groupée).

Planche 6 : effet des fibroblastes MRC-5 et de leur milieu conditionné sur la morphologie des CEMN et des cellules HBL-100 en cultures tridimensionnelles.

A, B, C, D, E : CEMN. F, G, H, I, J : cellules HBL-100. A, F : cultures témoins. B, G : coupes histologiques des cultures témoins. C, H : co-cultures en présence de fibroblastes MRC-5. D, I : coupes histologiques des co-cultures. E, J : stimulation par le milieu conditionné MRC-5.



3 : Cellules MCF-7

En conditions témoins, ces cellules ont la faculté de former des amas cellulaires isolés à partir desquels cependant aucune formation tubulaire n'émergera (pl. 7A). Sur les coupes histologiques, on peut s'apercevoir que l'inoculat initial a disparu et se trouve remplacé par des amas (pl. 7B) qui peuvent être séparés les uns des autres par des débris cellulaires que nous considérons comme le résultat de la dégradation de cellules mortes.

En conditions de co-culture (pl. 7C) ou en présence de milieu conditionné (pl. 7E), le phénotype observé est le même que celui obtenu en conditions témoins. On pourra remarquer cependant dans quelques cas la présence d'une cavité à l'intérieur des amas (pl. 7D).

Dans ce cas donc, contrairement aux cellules normales et aux cellules HBL-100, l'environnement tridimensionnel ne permet pas aux cellules de manifester des capacités morphogènes en réponse à un stimulus mésenchymateux.

4 : Cellules MDA-MB-231

Lorsque ces cellules sont cultivées en gel de collagène sous forme d'épithélium reconstitué, celui-ci laisse apparaître dès 48 h de culture de nombreuses expansions cytoplasmiques provenant des cellules situées à la périphérie de la zone d'ensemencement qui se mettent à envahir le collagène environnant. Après 7 jours de culture, l'invasion des cellules MDA-MB-231 a abouti à la formation d'un épithélium pluristratifié (pl. 7F) et d'un réseau périphérique constitué d'un enchevêtrement anarchique de cellules (pl. 7G).

La présence de fibroblastes MRC-5 (pl. 7H) ou de leur milieu conditionné (pl. 7J) n'entraîne pas la mise en place de formations tubulaires ni de cordons cellulaires mais accentue la rapidité d'invasion du collagène. Les coupes histologiques réalisées sur ce type de culture confirment l'importante pénétration des cellules dans le collagène environnant à partir d'un épithélium pluristratifié présentant à sa périphérie de nombreuses cellules filiformes (pl. 7I).

Planche 7 : Effet des fibroblastes MRC-5 et de leur milieu conditionné sur la morphologie des cellules MCF-7 et des cellules MDA-MB-231 en cultures tridimensionnelles.

A, B, C, D, E: cellules MCF-7. F, G, H, I, J: cellules MDA-MB-231. A, F: cultures témoins. B,G: coupes histologiques des cultures témoins. C, H: co-cultures en présence de fibroblastes MRC-5. D, I: coupes histologiques des co-cultures. E, J: stimulation par le milieu conditionné MRC-5.

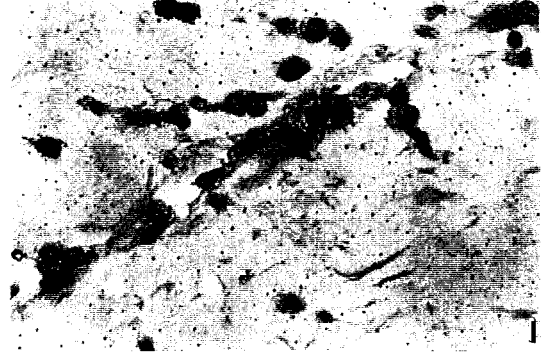
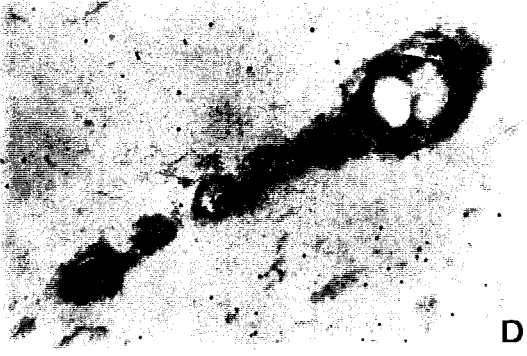
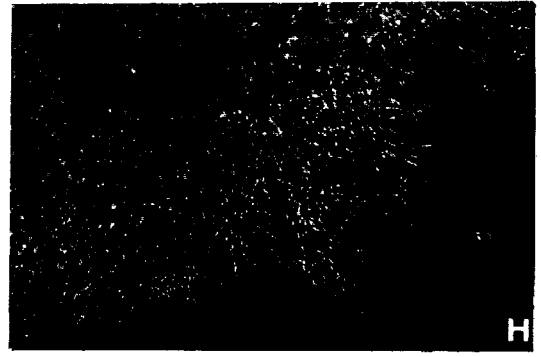
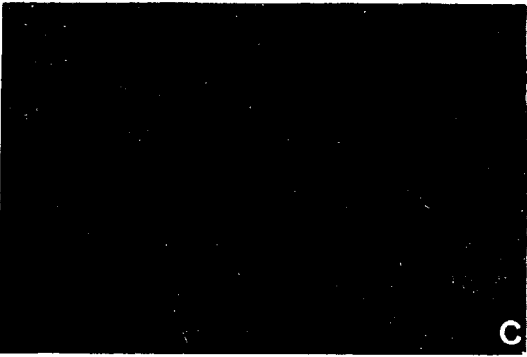
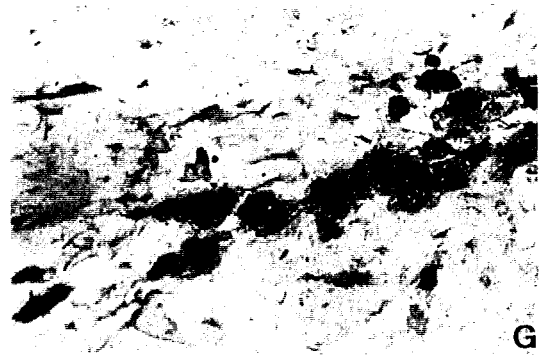
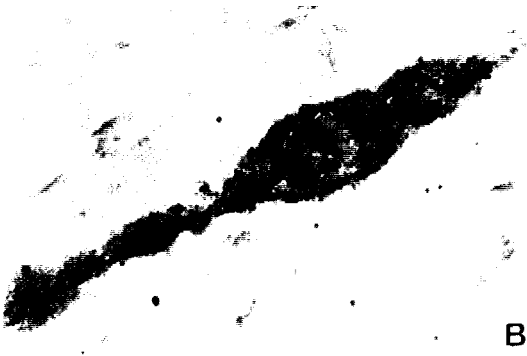
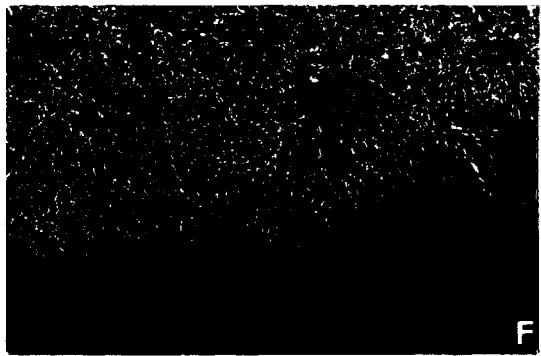
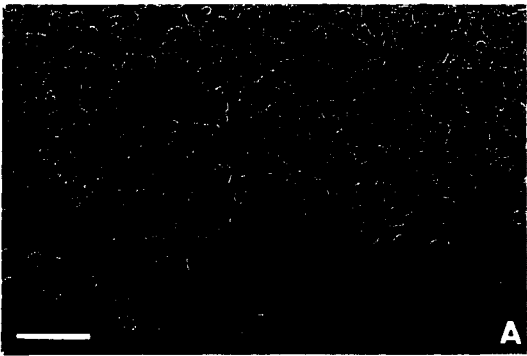


Tableau 2: effets des fibroblastes MRC-5 ou de leur milieu conditionné (MC) sur le comportement des cellules épithéliales mammaires humaines en cultures 2 D et 3 D.

	2 D		3 D	
	Témoin	MC	Témoin	MRC-5 ou MC
CEMN	population hétérogène	pop. hétérogène	épithélium unistratifié quelques cordons	tubules lumière
	⇒ aucune modification		⇒ tubulogenèse	
HBL-100	aspect épithélial clônes	aspect fibroblastoïde répartition uniforme	épithélium unistratifié peu d'expansion	épith. pluristratifié cordons pluricellulaires
	⇒ essaimage		⇒ invasion groupée	
MCF-7	clônes	clônes	amas cellulaires	amas cellulaires (quelques cavités)
	⇒ aucune modification		⇒ aucune modification	
MDA-MB-231	aspect fibroblastoïde répartition uniforme	cellules + effilées répartition uniforme	épith. pluristratifié dissémination	épith. pluristratifié dissémination + forte
	⇒ essaimage potentialisé		⇒ invasion potentialisée	

Les différents résultats obtenus avec les quatre types cellulaires utilisés aussi bien en cultures bidimensionnelles qu'en cultures tridimensionnelles ont été résumés dans le tableau 2.

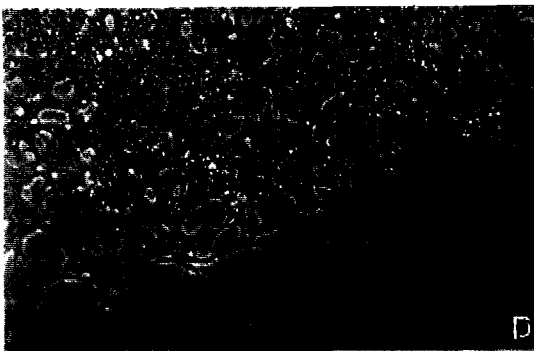
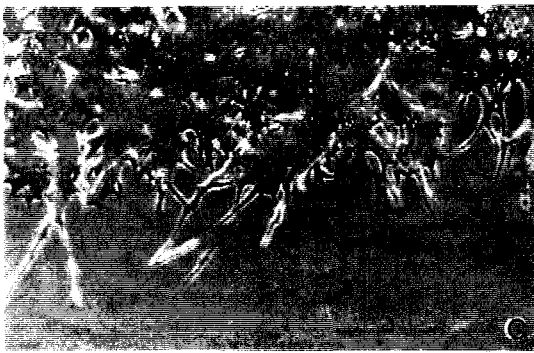
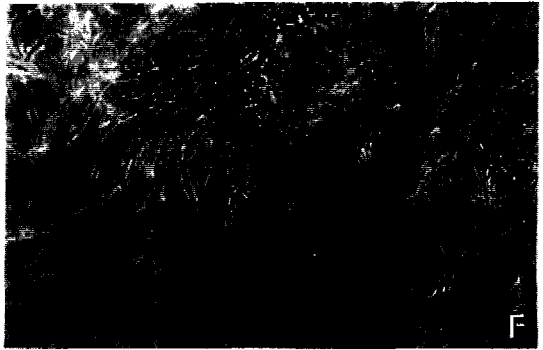
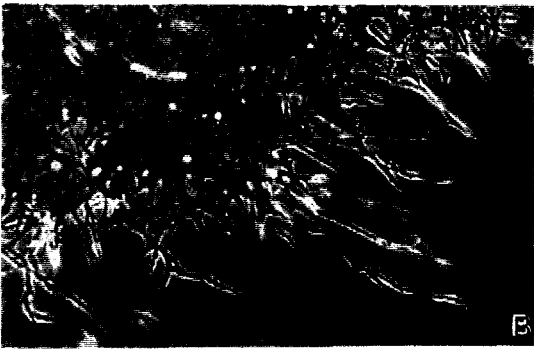
A la lueur de ces résultats, nous observons que la présence d'un contexte tridimensionnel influe sur les capacités morphogènes de certains types épithéliaux mammaires sous l'action d'un stimulus mésenchymateux: alors qu'en deux dimensions, la réponse des cellules ne peut se concrétiser que dans le sens d'un essaimage sur le plastique, nous voyons qu'en trois dimensions, cette réponse se fait dans le sens d'une organisation semblable à celle qu'auraient les cellules dans un contexte physiologique rencontré *in vivo*. Des cellules normales (CEMN) vont donner un réseau tubulaire, des cellules immortalisées (HBL-100) vont donner un réseau moins organisé mais pas encore anarchique. Le contexte tridimensionnel va potentialiser les capacités invasives des cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231 mais il semble sans effet sur les cellules MCF-7 hormono-dépendantes.

IV IMPLICATION DE L'HGF/SF DANS NOS MODELES DE RECONSTITUTION MAMMAIRE IN VITRO

Afin de mieux cerner la nature du (ou des) facteur(s) de stimulation mésenchymateux sur le comportement des cellules mammaires cultivées en trois dimensions et en nous basant sur les résultats de Montesano et al. (1991 b), nous avons pris comme postulat de départ qu'un candidat possible était l' HGF/SF. Sur la lignée cellulaire HBL-100, nous avons réalisé des tests d'inhibition par utilisation d'anticorps neutralisants anti-HGF en présence de fibroblastes MRC-5 ou de milieu conditionné par ces fibroblastes. Nous avons également tenté de mimer la morphologie obtenue sur les cellules HBL-100 stimulée par les fibroblastes MRC-5 en utilisant de l'HGF/SF recombinant humain. Les résultats sont regroupés sur la planche 8. En présence d'anticorps neutralisants anti-HGF, nous avons mis en évidence l'incapacité des cellules à former des cordons cellulaires épithéliaux sous l'effet des fibroblastes MRC-5 (pl. 8H) ou

Planche 8 : morphogenèse tridimensionnelle des cellules HBL-100 et rôle de l'HGF/SF.

A: culture témoin. B: stimulation par du milieu conditionné MRC-5. C: stimulation par du milieu conditionné + anticorps non relevant. D: stimulation par du milieu conditionné + anticorps anti-HGF/SF. E: stimulation par de l'HGF/SF. F: co-cultures HBL-100/MRC-5. G: co-cultures + anticorps non relevant. H: co-cultures + anticorps anti-HGF/SF.



de leur milieu conditionné (pl. 8D). La morphologie obtenue est semblable à celle obtenue avec des cellules HBL-100 non stimulées (pl. 8A). De plus, des cellules HBL-100 cultivées en trois dimensions sans fibroblastes ni milieu conditionné vont développer sous l'action d'une stimulation par de l'HGF/SF recombinant humain une poussée de cordons cellulaires (pl. 8E) identique à celle obtenue sur des cellules stimulées par des fibroblastes MRC-5 (pl. 8F) ou leur milieu conditionné (pl. 8B). Il semble donc que le facteur de stimulation présent dans le milieu conditionné des fibroblastes MRC-5 (ou dans les co-cultures) et à l'origine du changement morphologique des cellules HBL-100 cultivées en collagène soit une (des) molécule(s) immunologiquement apparentée(s) à l'HGF/SF.

DISCUSSION

Comme nous l'avons décrit précédemment, les interactions épithélio-mésenchymateuses via la production de facteurs de croissance sont l'un des éléments clés de la formation de la glande mammaire. Dans cette première partie de notre travail, nous avons voulu établir *in vitro* des modèles simplifiés de reconstitution mammaire normale ou cancéreuse en prenant comme élément de départ de l'épithélium mammaire que nous avons soumis à l'influence de mésenchyme inducteur. Les travaux réalisés par David et Propper (1964) sur des glandes mammaires embryonnaires de lapin en culture organotypique avaient permis l'obtention d'une morphogenèse mammaire normale mais limitée à ses stades les plus primitifs: après une semaine de culture, le stade de développement d'un bourgeon mammaire prélevé sur un embryon âgé de 12 jours correspond au stade mammaire observé chez l'embryon de 20 jours. Les études menées sur de l'épithélium mammaire dissocié et réassocié à différents types de mésenchymes (Propper, 1972 ; Sakakura et al., 1976) de même que des expériences de co-culture épithélium mammaire-adipocytes avaient mis en évidence l'importance du mésenchyme sur la morphogenèse de l'épithélium mammaire. Puis, dans les années 1990, de nombreux travaux ont révélé le rôle de l'HGF/SF en tant que facteur morphogène sécrété par les fibroblastes. Des expériences de co-cultures effectuées sur des cellules épithéliales rénales (MDCK) et différents types de fibroblastes (Montesano et al., 1991a) ont abouti à

la formation d'une tubulogenèse par les MDCK et ces mêmes auteurs ont pu démontrer que le facteur impliqué dans cette tubulogenèse était l'HGF/SF (Montesano et al., 1991b). Plus récemment, les travaux de Brinkmann et al (1995) ont révélé que l'HGF/SF était capable d'induire des réponses morphogènes sur de nombreux types cellulaires épithéliaux: cellules de colon, de pancréas, de prostate, de poumons... Ces différents résultats nous ont amenés à utiliser dans nos expériences des fibroblastes connus pour produire l'HGF/SF: les fibroblastes MRC-5 et les fibroblastes 3T3. En co-cultivant avec ces fibroblastes des ébauches mammaires épithéliales prélevées sur des embryons de souris ou en soumettant ces ébauches à du milieu conditionné par ces mêmes fibroblastes, nous avons vu qu'une morphogenèse mammaire considérée comme normale n'était obtenue que dans de rares cas seulement. De plus, les résultats obtenus sur des ébauches mammaires cultivées en conditions témoins étaient parfois morphologiquement identiques à ceux obtenus sur des ébauches placées en condition de stimulation. A partir de ces résultats, nous pouvons définir deux éléments limitants :

- a - les conditions expérimentales de prélèvements et de culture
- b - la capacité des ébauches embryonnaires à répondre aux facteurs d'induction mésenchymateux

a - les conditions expérimentales de prélèvements et de culture

Lors des étapes de dissociation des ébauches mammaires embryonnaires (séparation de l'épithélium et du mésenchyme), nous avons dû tester de nombreuses concentrations et de nombreux lots différents de solution de trypsine avant de pouvoir déterminer des conditions de dissociation qui nous paraissaient optimales. Cependant, les résultats laissent à penser qu'une contamination mésenchymateuse reste souvent présente et pourrait expliquer l'absence de différences morphologiques entre ébauches témoins et ébauches sous stimulation. Par ailleurs, l'utilisation d'un milieu de culture de composition trop faible en hormones peut également expliquer l'absence de morphogenèse caractérisée.

b - la capacité des ébauches embryonnaires à répondre aux facteurs d'induction mésenchymateux

Des études récentes ont montré que l'HGF/SF était exprimé et produit dans la glande mammaire au niveau des fibroblastes et que le récepteur à l'HGF/SF, C-MET, était lui aussi présent dans la glande mammaire au niveau de l'épithélium (Tsarfatty et al., 1992 ; Sasaki et al., 1994 ; Niranjana et al., 1995 ; Pepper et al., 1995). Cependant, ces différents travaux ont été menés sur des glandes mammaires jeunes ou adultes, lors de stades de remaniements morphologiques (gestation, lactation, involution...). A notre connaissance, aucune étude de détection d'HGF/SF n'a encore été menée sur les stades embryonnaires de la glande mammaire. Nous n'avons donc aucune certitude que l'épithélium mammaire embryonnaire exprime C-MET et puisse ainsi être doté d'une capacité de réponse à l'HGF/SF, bien que Sonnenberg et al. (1993) aient montré l'existence de l'HGF/SF et de son récepteur dans d'autres systèmes d'interactions épithélium-mésenchyme (rein, poumon...) durant l'embryogenèse murine.

Par la suite, nous ne nous sommes non plus intéressés à des ébauches embryonnaires de souris mais à des lignées épithéliales mammaires humaines. Nous avons cultivé nos cellules épithéliales mammaires sur des surfaces planes (cultures bidimensionnelles) ou en collagène (cultures tridimensionnelles) afin d'observer leur capacité à entreprendre une migration ou une invasion.

En cultures bidimensionnelles témoins, nous voyons que les cellules normales (CEMN), les cellules HBL-100 et les cellules MCF-7 restent statiques et poussent en colonies tandis que les cellules MDA-MB-231 ont la faculté de se disperser sur le fond des boîtes de culture. Sous l'action d'une stimulation par le milieu conditionné MRC-5, les cellules HBL-100 perdent la capacité de pousser en clones et se dispersent sur toute la surface des boîtes de culture. Les cellules MDA-MB-231 sont plus effilées et plus dispersées. Ces résultats nous indiquent que les deux lignées HBL-100 et MDA-MB-231 sont sensibles à un facteur d'essaimage présent dans le milieu conditionné MRC-5.

Dans nos conditions expérimentales, les CEMN ne répondent pas morphologiquement au milieu conditionné MRC-5. Ces résultats semblent en contradiction avec ceux obtenus par Niranjana et al. (1995) qui ont montré que des cellules épithéliales et myoépithéliales mammaires cultivées en 2 D sur plastique sont capables de se disperser sous l'action de l'HGF/SF. Cependant, la concentration utilisée est élevée (50 ng/ml) et peut ne pas refléter les niveaux d'HGF/SF présents dans le milieu conditionné MRC-5. Par ailleurs, d'autres cellules épithéliales mammaires telles que les cellules NMuMG (clône TAC-2) de souris cultivées sur des surfaces planes n'ont pas présenté de dispersion sous l'effet de l'HGF/SF (Soriano et al., 1995).

En cultures tridimensionnelles témoins, seules les cellules MDA-MB-231 présentent un phénotype invasif dans les gels de collagène. En présence de fibroblastes MRC-5 ou de milieu conditionné MRC-5, on observe des modifications morphologiques chez 3 types cellulaires: les CEMN, les cellules HBL-100 et les cellules MDA-MB-231. Les CEMN présentent une tubulogenèse primitive, semblable à celle observée *in vivo* lors de l'allongement et du creusement du bourgeon mammaire embryonnaire. Ces résultats sont en accord avec différents travaux récemment publiés: Berdichevsky et al. (1994) ont obtenu par exemple une tubulogenèse mammaire en cultivant des cellules épithéliales mammaires obtenues à partir de lait (lignée 1-7 HB2) en gel de collagène en présence de différents types de fibroblastes (HFF, MRC-5, Swiss 3T3, fibroblastes de sein), de leur milieu conditionné ou en présence d'HGF/SF. Il en est de même pour les travaux de Soriano et al. (1995) réalisés sur des cellules mammaires murines cultivées en gel de collagène en présence de milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5 ou Swiss 3T3. Niranjana et al. (1995), quant à eux, ont obtenu une tubulogenèse tridimensionnelle en traitant directement des cellules épithéliales mammaires humaines avec de l'HGF/SF. Dans le cas des cellules HBL-100, qui sont des cellules épithéliales mammaires immortalisées, on s'aperçoit qu'elles répondent à une induction mésenchymateuse mais qu'elles ne sont plus en mesure de produire une morphogenèse normale puisque certes, on obtient la formation de cordons épithéliaux mais ceux-ci ne sont jamais creusés d'une lumière. Ils semblent plutôt être le résultat d'un alignement de cellules les unes derrière les

autres sans organisation en structure tubulaire impliquant une polarisation des cellules. Cette observation nous montre que plus les cellules perdent leur caractère "normal", plus elles perdent la faculté d'entreprendre une morphogenèse "normale" dans les cas où elles sont sensibles à une stimulation mésenchymateuse. Ce fait est confirmé par les cultures 3 D de cellules MDA-MB-231. En l'absence de stimulation, ces cellules présentent des capacités importantes d'envahissement des gels de collagène (cf. le développement anarchique des tumeurs cancéreuses) et ce phénotype est à relier directement au caractère hautement invasif des cellules MDA-MB-231. Lorsque celles-ci sont incubées avec des fibroblastes MRC-5 ou leur milieu conditionné, on observe une avancée de la limite d'invasion des gels de collagène par les cellules. Nous pouvons mettre ces résultats en liaison avec les travaux de Brouty-Boyé et Raux (1993) ainsi que ceux de Noël et al. (1993 a) qui ont montré que la présence de fibroblastes augmente la croissance tumorale des cellules MDA-MB-231 chez la souris nude. Dans notre cas, nous ne pouvons dire cependant si l'effet morphologique des fibroblastes MRC-5 est dû à une augmentation effective de l'invasion cellulaire ou à une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales, ou les deux à la fois. Des tests d'incorporation de BrdU ou de thymidine tritiée sont envisageables pour répondre à cette interrogation.

Tout comme en culture 2 D, notre lignée MCF-7 ne semble pas répondre morphologiquement aux fibroblastes MRC-5 ou à leur milieu conditionné lorsqu'elles sont cultivées en gel de collagène. Que ce soit en conditions témoins ou sous l'action d'une stimulation mésenchymateuse, les cellules forment des amas, présentant occasionnellement une lumière en conditions de stimulation mais qui se nécrosent rapidement. Plusieurs travaux relatent l'effet de fibroblastes sur les cellules MCF-7. L'injection sous-cutanée de cellules MCF-7 en souris nude ne produit pas de tumeur alors qu'injectées en présence de fibroblastes humains de peau, ces cellules forment des tumeurs après une période de 2 mois (Noël et al. 1993 a). En fonction de l'origine des fibroblastes, on observe une variation de la prolifération des cellules MCF-7 (Adam et al. 1994 ; Ryan et al., 1993 ; Lefebvre et al., 1995 ; Van Roozendaal et al., 1996). Brouty-Boyé et al. (1994) ont montré que la croissance des cellules MCF-7 cultivées sous forme

de nodules était augmentée en présence de fibroblastes issus de tissus mammaires normaux. Ces fibroblastes ont de plus un effet différenciateur puisque, à long terme, ces nodules pouvaient présenter des structures glandulaires avec parfois formation de structures tubulaires. Par contre, en présence de fibroblastes issus de tissus mammaires cancéreux, ces nodules gardent une morphologie dédifférenciée.

Dans une dernière série d'expériences, nous avons voulu contrôler la nature de l'inducteur mésenchymateux produit par les fibroblastes MRC-5. En effet, nous avons utilisé ces fibroblastes parce que nous savons qu'ils sécrètent de l'HGF/SF (Montesano et al., 1991 b). De plus, il a été clairement démontré que ce facteur est capable d'induire la motilité de nombreux types cellulaires tels que les MDCK, les cellules C2 et H5-6 d'hépatome de rat, les cellules EMT-6 de carcinomes mammaires, des cellules de carcinomes épidermiques, des monocytes humains, des cellules d'adénocarcinomes gastriques (Shibamoto et al., 1992 ; Tajima et al., 1992 ; Li et al., 1994 ; Rosen et al., 1994 b). Les travaux de Byers et al. (1994) ont montré que des cellules mammaires cancéreuses relativement différenciées (cellules MCF-7...) expriment peu ou pas le récepteur C-MET et sont peu ou pas sensibles à l'HGF/SF alors que des cellules mammaires cancéreuses faiblement différenciées (cellules MDA-MB-231...) expriment C-MET et sont sensibles à l'HGF/SF. Si l'on se base sur l'hypothèse que l'effet du milieu conditionné MRC-5 sur nos différents types épithéliaux mammaires est dû à l'HGF/SF, les différents résultats morphologiques que nous avons obtenus sont en accord avec les observations décrites ci-dessus sur les cellules cancéreuses ainsi que celles décrites sur d'autres lignées épithéliales mammaires normales stimulées directement avec l'HGF/SF. Nous avons pré-incubé le milieu conditionné des fibroblastes MRC-5 avec des anticorps neutralisants anti-HGF/SF puis nous avons stimulé les cellules HBL-100 en 3 D avec ce milieu conditionné. Nous n'avons plus observé de structures en forme de cordons, signe que la (les) molécule(s) inductrice(s) est (sont) une (des) molécule(s) immunologiquement identique(s) à l'HGF/SF. Par ailleurs, en stimulant les cellules HBL-100 avec de l'HGF/SF recombinant, on obtient une morphologie semblable à celle observée en

présence de milieu conditionné ou de fibroblastes MRC-5. Tous ces résultats appuient l'hypothèse que l'inducteur mésenchymateux sécrété par les fibroblastes MRC-5 et responsable des modifications morphologiques obtenues sur nos cellules épithéliales mammaires est l'HGF/SF. Les différences phénotypiques observées entre les 4 types épithéliaux mammaires lors des expériences décrites précédemment peuvent trouver une explication dans la sensibilité des cellules épithéliales mammaires à l'HGF/SF. Comme nous l'avons déjà précisé, les cellules épithéliales mammaires, qu'elles soient normales ou cancéreuses, possèdent à leur surface membranaire le récepteur C-MET mais des différences au niveau du nombre de récepteurs C-MET par type cellulaire peuvent entraîner une variation de sensibilité vis à vis de l'HGF/SF. Il serait intéressant de réaliser des dosages de récepteur C-MET sur les cellules épithéliales mammaires normales et immortalisées (CEMN et cellules HBL-100).

Les mécanismes de migration et d'invasion cellulaires nécessitent un remaniement important des molécules d'adhérence cellulaire. Ces phénomènes sont régulés par des molécules ayant un rôle important dans le contrôle des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire: les protéases matricielles. Dans ce premier chapitre, nous avons établi à partir de quatre types épithéliaux mammaires différents, des modèles *in vitro* de reconstitution mammaire pour lesquels nous avons pu définir des capacités distinctes d'invasion, de migration ou de morphogenèse liées à la présence d'un substrat et d'une induction mésenchymateuse. Dans le chapitre suivant, nous allons maintenant utiliser ces modèles de reconstitution pour étudier les mécanismes de dégradation matricielle indissociables des processus migratoires et invasifs. Nous porterons notre étude plus particulièrement sur l'implication du système de la plasmine dans ces phénomènes. Cette étude portera sur la détection de deux molécules spécifiques de ce système: l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et l'un de ses inhibiteurs, le PAI-1.

CHAPITRE I I

VARIATIONS DE L'ACTIVITE uPA ET DES TAUX DE PAI-1 DANS LES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES : CORRELATION AVEC LEUR COMPORTEMENT MIGRATOIRE ET INVASIF

INTRODUCTION

De nos jours, il est clairement établi que la mise en place du développement ou de la métastase mammaires met en jeu des mécanismes de dégradation matricielle ainsi que des modifications des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire. La plupart des études a été réalisée *in vivo* sur différents stades de développement mammaire (formation du réseau tubulaire mammaire, involution...) ainsi que sur des broyats de tumeurs cancéreuses et met le plus souvent en avant le rôle du compartiment mésenchymateux dans ces mécanismes. Les études moléculaires réalisées au sein de notre groupe sur des coupes de glandes mammaires murines à différents stades (embryonnaire, néo-natal, pré-pubertaire, pubertaire) ainsi que sur nos différents modèles de reconstitution ont mis en évidence une activité basale de transcription du gène *uPA* dans les cellules épithéliales elles-mêmes lors de ces remaniements morphologiques (Delannoy-Courdent et al., 1996). Dans notre étude, nous allons observer s'il existe une corrélation entre des variations des niveaux d'activité *uPA* et de PAI-1 et les phénomènes de migration et d'invasion cellulaires épithéliales observés dans nos modèles *in vitro* de reconstitution mammaire. A partir de coupes histologiques réalisées sur nos différents modèles de reconstitution mammaire en collagène (développement normal et développement cancéreux), nous allons tenter de mettre en évidence la présence d'*uPA*, de son inhibiteur PAI-1 et de son récepteur *uPAR* à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces trois molécules. Nous allons ensuite poursuivre notre étude par une mesure des variations de l'activité *uPA* et des niveaux de PAI-1. La recherche d'une activité *uPA* nous fournira des renseignements plus précis que ceux fournis par une présence, ou une absence, de protéine *uPA*. En effet, la localisation de la protéine, à elle seule, ne nous donne aucun renseignement sur son action protéolytique puisque cette enzyme, si elle est associée à l'un de ses inhibiteurs, peut ne posséder aucun pouvoir de dégradation. Par contre, les mesures des variations de l'activité *uPA* et des taux de PAI-1 reflèteront le potentiel de dégradation matricielle et de modification des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire accessibles par les cellules épithéliales :

- une augmentation d'activité uPA sans modification des niveaux de PAI-1 tout comme une diminution des niveaux de PAI-1 sans variation d'activité uPA pourront être corrélées à une élévation de la capacité de dégradation matricielle et une diminution des interactions cellulaires, ces deux phénomènes devant se traduire par une élévation des capacités de migration et d'invasion cellulaires

- par contre, une augmentation ou une diminution concomitante de l'activité uPA et des niveaux de PAI-1 pourront être corrélées à une absence de modification du potentiel de dégradation matricielle et d'interactions cellulaires et donc une absence de migration ou d'invasion cellulaires

MATERIEL ET METHODES

I IMMUNOHISTOLOGIE

Les coupes histologiques réalisées à partir des cellules épithéliales cultivées en trois dimensions sont déparaffinées et réhydratées jusqu'à l'eau. Les coupes sont alors saturées et les peroxydases endogènes inhibées par incubation dans du PBS contenant 1% de H₂O₂ à 30% et 1,5% de sérum de chèvre. Elles sont ensuite rincées 2 x 5 mn dans du PBS puis incubées pendant une nuit à 4°C en chambre humide avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS contenant 0,5% de sérumbumine bovine (BSA) et 0,5% de Tween 20 (anticorps monoclonal de souris anti-uPA, # 3689, American Diagnostica Inc. dilué au 1/50 ; anticorps monoclonal de souris anti-PAI-1, # 3780-85, American Diagnostica Inc. dilué au 1/20 ; anticorps monoclonal de souris anti-uPAR, # 3936, American Diagnostica Inc. dilué au 1/50). Les coupes sont alors rincées 2 x 5 mn avec du PBS puis incubées en présence de l'anticorps secondaire biotinylé anti-souris (kit Sigma) dilué au 1/20 dans du PBS, 0,5% BSA, 0,5% Tween 20 pendant 1 h 30 en agitation, en atmosphère saturée en humidité et à température ambiante. Après rinçage 2 x 5 mn dans du PBS, les coupes sont ensuite mises en présence du système d'amplification extravidine-peroxydase dilué au 1/20 dans du PBS/BSA 0,5% pendant 1 h 30 en agitation, dans les mêmes conditions physiques que précédemment puis rincées au PBS. Pour la révélation, le système de

coloration à l'AEC a été utilisé: une solution stock de 3-amino-9-éthylcarbazole (AEC, Sigma) est préparée au préalable en dissolvant une pastille de 20 mg d'AEC dans 2,5 ml de diméthylformamide et conservée à 4°C. Extemporément, à 200 µl de solution stock AEC sont ajoutés 3,8 ml de tampon acétate 0,05 M, pH 5 et 20 µl de H₂O₂ à 30%. Cette solution est alors répartie sur les coupes et laissée jusqu'à obtention d'une coloration rouge (après 5 à 10 mn). La réaction colorimétrique est stoppée en plongeant les lames dans de l'eau bidistillée puis les coupes sont contre-colorées par passage rapide (20 à 30 secondes) dans une solution d'hématoxyline de Hansen. La différenciation de la contre-coloration bleue est obtenue par rinçage dans l'eau courante puis les lames sont montées au Glycergel (Dako) préalablement chauffé à 50°C.

Dans les cas d'immunocytologie avec les anticorps anti-uPA et anti-uPAR, trois autres techniques ont été utilisées afin de dévoiler d'éventuels sites antigéniques masqués:

- la première a consisté à tremper les coupes dans un bain d'acétone après déparaffinage pour solubiliser les lipides des membranes cellulaires et favoriser l'accès aux protéines membranaires

- la deuxième a consisté à incuber pendant 15 mn à 37°C les coupes dans une solution de protéinase K à 1 µg/ml préparée dans du tampon Tris/HCl 100 mM ; pH 8,0 ; EDTA 50 mM. Cette étape est effectuée avant l'incubation de l'anticorps primaire et est suivie de 3 rinçages dans du PBS pendant 5 mn.

- la troisième a consisté à placer les coupes dans une solution de citrate 0,01 M pH 6,0 et de passer l'ensemble pendant 2 x 5 mn dans un four à micro-ondes à puissance maximale (750 W) en changeant la solution entre les 2 passages. Les coupes sont ensuite laissées à température ambiante pendant 20 mn, rincées dans du tampon TBS (Tris/HCl 0,05 M ; NaCl 0,15 M ; pH 7,4) puis incubées avec l'anticorps primaire.

II DOSAGE DE L'ACTIVITE uPA ET DU TAUX DE PAI-1 DANS LES CULTURES DE CELLULES EPITHELIALES

La technique a consisté à cultiver les cellules épithéliales en deux ou trois dimensions en absence ou en présence de 50% de milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5 et 50% de milieu de cultures des cellules épithéliales et de mesurer l'activité uPA et la quantité de PAI-1 présents à la fois dans le surnageant de culture et dans les cellules. Il est alors possible d'apprécier les variations entraînées par le milieu conditionné sur la balance activité uPA/niveaux de PAI-1 lors des remaniements morphologiques observés.

1 : En cultures bidimensionnelles

Les cellules sontensemencées à raison de 60 000 cellules/ml en boîte de Pétri de 35 mm de diamètre (2 ml) et mises en présence d'un mélange de milieu complet et de milieu de sevrage conditionné ou non par les fibroblastes MRC-5 (1/1). La culture est maintenue dans ces conditions pendant 5 jours (avec renouvellement du milieu tous les deux jours) puis les cellules sont rincées pendant 1 h avec du milieu sans sérum. Elles sont alors incubées pendant 24 h en présence de ce même mélange mais ne contenant ni sérum ni rouge de phénol. Le surnageant est prélevé et congelé à -20°C. Les cellules sont récupérées par grattage dans 500 µl de tampon d'extraction à 4°C (Tris/HCl 100 mM ; pH 7,6 ; EDTA 2 mM ; Triton X-100 0,4%) puis congelées à -20°C jusqu'à utilisation.

2 : En cultures tridimensionnelles

Les cellules épithéliales sontensemencées selon la technique décrite précédemment sur un gel ne contenant pas de fibroblastes MRC-5 mais en présence de 1 V de milieu complet sans rouge de phénol et 1 V de milieu de sevrage sans rouge de phénol conditionné ou non par les fibroblastes MRC-5 (500 µl final/puits). Le milieu est renouvelé tous les jours afin d'éliminer les traces de rouge de phénol contenues dans le MEM 10 fois concentré et introduites lors de la préparation du gel. Après 5 jours de culture, les cellules sont rincées pendant 2 h avec du milieu sans sérum puis incubées 24h avec le même mélange que celui décrit ci-dessus mais ne contenant pas de sérum. Le surnageant est ensuite récupéré et congelé à -20°C. Chacun des gels est récupéré et mis en

digestion à 37°C pendant 30 mn en agitation avec 25 µl de collagénase de type XI à 20 000 UI/ml (Sigma) dans 1 ml de MEM contenant 10% de SVF. Ils sont ensuite centrifugés à 200 g pendant 10 mn. Le culot est repris dans 200 µl de tampon d'extraction à 4°C puis congelé à -20°C jusqu'à utilisation. .

Après extraction, les cellules subissent une congélation/décongélation puis sont passées deux fois aux ultra-sons pendant 30 sec. Une partie de l'extrait cellulaire est utilisée pour le dosage d'ADN selon la technique du DAPI et le reste est utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique uPA et du taux de PAI-1.

3 : Dosage de l'activité uPA

Le principe du dosage enzymatique de l'activité uPA repose sur la libération d'un chromogène à partir d'un substrat synthétique (D-Val-Leu-Lys-paranitroaniline dihydrochloride, S-2251, Sigma) clivé par la plasmine, elle-même issue de la conversion du plasminogène par l'uPA contenu dans les cellules et les surnageants (Reinartz et al., 1993). A 50 µl d'extrait cellulaire dilué au 1/20 (cultures 2 D) ou au 1/50 (cultures 3 D) dans un tampon de dosage (phosphate monosodique 0,1M ; EDTA 10 mM ; NaN₃ 0,01% ; Triton X-100 0,01% ; pH 7,3) ou de surnageant dilué au 1/20 (cultures 2 D) ou au 1/10 (cultures 3 D), sont ajoutés 50 µl de solution 0,45 mM de S-2251 et 50 µl de solution de plasminogène (Sigma, solution à 60 µg/ml dans de l'eau distillée). Le tout est mis en incubation à 37°C pendant 6 h puis l'absorbance à 405 nm est estimée sur un lecteur de plaque Elisa. Les valeurs sont ensuite ramenées en unité d'absorbance par microgramme d'ADN pour chaque lignée cellulaire (valeurs totales comprenant les valeurs obtenues avec les surnageants + les valeurs obtenues avec les lysats) en fonction des volumes initiaux de surnageants et de lysats cellulaires, de la dilution et de la quantité d'ADN que l'on a dosée au DAPI.

4 : Dosage des niveaux de PAI-1

Le dosage des niveaux de PAI-1 a été réalisé par dosage ELISA avec le kit "IMUBIND Tissue PAI-1" (American Diagnostica Inc., Orthodiagnostic system, Roissy Ch. De Gaulle, France) selon le protocole fourni: après éventuelle dilution au 1/2 ou au

1/4, les lysats cellulaires (100 μ l), les surnageants (100 μ l) ainsi que des solutions étalons sont incubés au fond de la plaque ELISA pendant une nuit à 4°C en chambre humide. Les puits sont lavés puis incubés pendant 1 h à température ambiante en présence d'un anticorps anti PAI-1 biotinylé (100 μ l). Après rinçage, on introduit dans les puits 100 μ l de Streptavidine-Péroxydase. Après 1 h à température ambiante, on rince à nouveau puis on incube pendant 20 mn à température ambiante en présence de perborate/3,3',3,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) qui a la faculté de produire une coloration bleue sous l'action de la peroxydase. L'adjonction d'acide sulfurique 0,5 M entraîne une augmentation de la sensibilité par apparition d'une coloration jaune. Le taux de PAI-1 est alors estimé par lecture de l'absorbance à 450 nm et comparaison avec les valeurs obtenues au moyen des solutions étalons. Les valeurs sont ensuite ramenées en nanogramme de PAI-1 par microgramme d'ADN pour chaque lignée cellulaire (valeurs totales comprenant les valeurs obtenues avec les surnageants + les valeurs obtenues avec les lysats) en fonction des volumes initiaux de surnageants et de lysats cellulaires, de la dilution et de la quantité d'ADN que l'on a dosée au DAPI.

5 : Dosage d'ADN

Le principe du dosage d'ADN consiste à mesurer la fluorescence émise à 450 nm par un intercalant de l'ADN, le 4,6-diamidino 2-phénylindole (DAPI, technique de Brunk et al., 1979). Une gamme étalon (0 à 2 μ g dans 3 ml de tampon NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, DAPI 100 ng/ml, Tris 10 mM, pH 7,0) est réalisée à partir d'une solution d'ADN de saumon à 2 μ g/ml. Les valeurs de densité optique (excitation à 360 nm, émission à 450 nm) obtenues à partir des lysats cellulaires dilués au 1/4 (50 μ l, 75 μ l et 100 μ l) sont reportées sur la courbe étalon et la quantité d'ADN contenue dans nos extraits cellulaires est ainsi déterminée en μ g d'ADN/ml.

RESULTATS

I MISE EN EVIDENCE PAR IMMUNOLOCALISATION DE PAI-1, uPA ET uPAR DANS LES CULTURES 3 D

A partir de coupes histologiques réalisées sur nos différents modèles de reconstitution mammaire en collagène (développement normal et développement cancéreux), nous avons recherché la présence de l'uPA, de son récepteur uPAR et de son inhibiteur PAI-1 à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces trois molécules.

1 : détection de l'uPA et de son récepteur, uPAR

L'utilisation d'anticorps anti-uPA et anti-uPAR n'a pas permis de mettre en évidence les deux molécules par cette technique (pl. 9C-E). Des modifications de protocole (augmentation de la concentration en anticorps, des paramètres d'incubation, changement de fixateurs...) ainsi que l'emploi de techniques connues pour faciliter la présentation des antigènes aux anticorps (digestion à la protéinase K, passage au micro-onde...) n'ont également pas permis de révéler la présence d'uPA et d'uPAR par immunohistologie.

2 : Détection de PAI-1

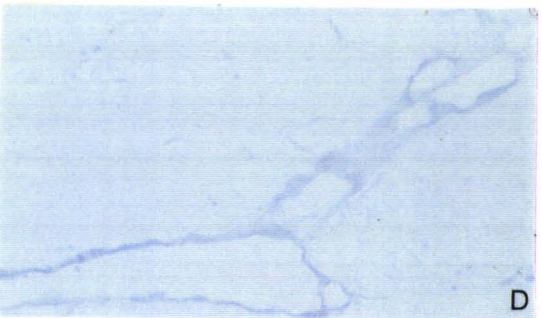
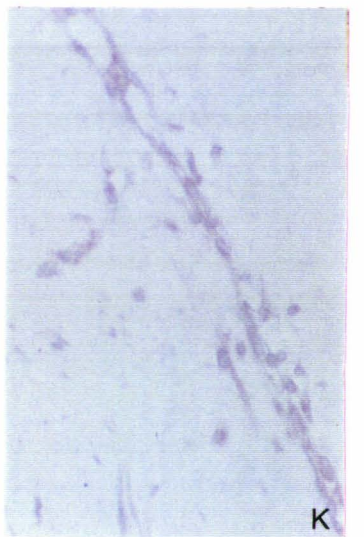
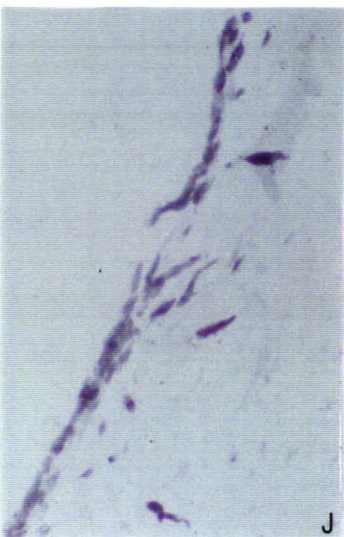
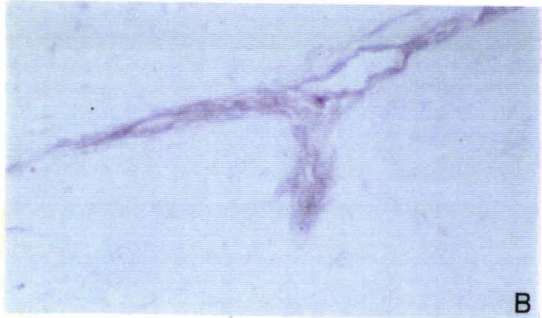
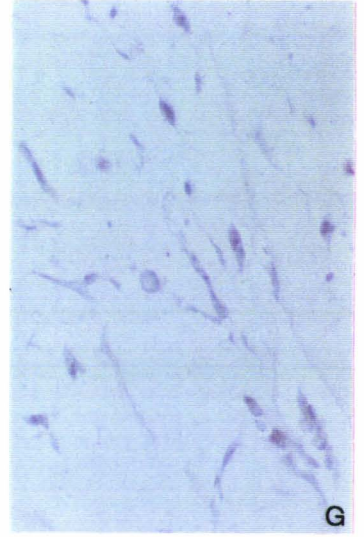
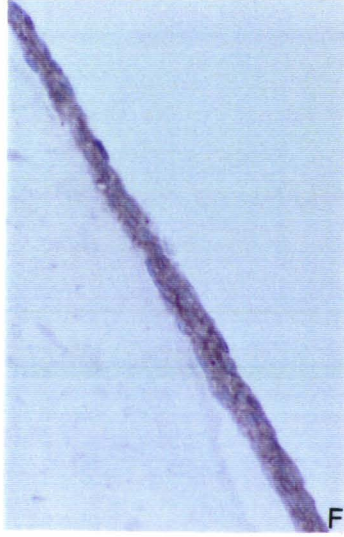
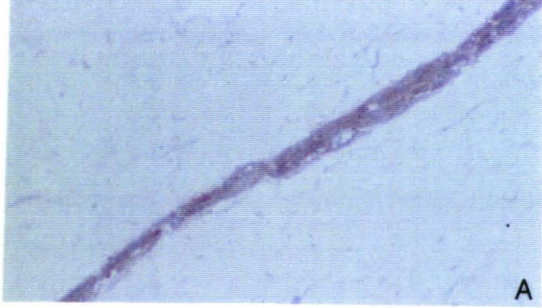
Le troisième élément que nous avons recherché est l'inhibiteur de type 1 de l'uPA. L'immunohistologie réalisée sur nos différentes coupes a permis de mettre en évidence un marquage spécifique sur chacune de nos conditions de culture et pour tous les types cellulaires employés. Ainsi, aussi bien dans les CEMN (pl. 9A-B) que dans les cellules HBL-100 (pl. 9F-G), MCF-7 (pl. 9H-I) et MDA-MB-231 (pl. 9J-K), le PAI-1 est présent au niveau membranaire et cytoplasmique et cette présence ne semble pas être dépendante de la présence ou non de fibroblastes MRC-5 ou de milieu conditionné.

Les études immunohistologiques réalisées sur nos différents modèles de reconstitution mammaire n'ont donc pas permis de mettre en évidence la présence de tous les éléments du système de la plasmine. Seul le PAI-1 a pu être détecté par cette technique. Nous avons poursuivi notre étude en tentant de déterminer ces différents

Planche 9 : immunolocalisation de l'uPA, de l'uPAR et de PAI-1 sur les cultures tridimensionnelles des cellules épithéliales mammaires.

A: cultures témoins CEMN. B, C, D, E : co-cultures CEMN/MRC-5. F: cultures témoins HBL-100. G: co-cultures HBL-100/MRC-5. H: cultures témoins MCF-7. I: co-cultures MCF-7/MRC-5. J: cultures témoins MDA-MB-231. K: co-cultures MDA-MB-231/MRC-5.

A, B, F, G, H, I, J, K: réaction positive avec l'anti-PAI 1. C: témoin PBS. D: absence de marquage avec l'anti-uPA. E: absence de marquage avec l'anti-uPAR.



éléments, en particulier l'uPA et le PAI-1, par des techniques de dosage d'activité enzymatique et de détermination de taux de protéines par ELISA.

II DOSAGE DE L'ACTIVITE uPA PRESENTE DANS LES CULTURES 2 D ET 3 D DE CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES

1 : En cultures bidimensionnelles

Les valeurs d'activité uPA en cultures bidimensionnelles sont regroupées dans le tableau 3 et correspondent à la somme des valeurs \pm écart type de dosages en triplicate sur 2 expériences (lysats et surnageants rassemblés).

En conditions témoins, nous observons que l'activité uPA de base est importante dans les cultures de cellules normales et nettement plus faible dans les cultures de lignées cancéreuses. Par exemple, les cellules MCF-7 présentent une activité uPA diminuée de 93,5% par rapport à celle présente dans les CEMN.

Lorsque l'on cultive les cellules épithéliales mammaires en présence de milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5, on détecte une augmentation significative de 50% de l'activité uPA dans les cultures de CEMN et de cellules HBL-100. Les cellules MCF-7 présentent la plus forte augmentation dans ces conditions (environ 4035%) de sorte que l'activité présente est alors supérieure de 80% à celle déterminée dans les cultures de CEMN. Par contre aucune stimulation de l'activité uPA ne peut être détectée dans les cultures de cellules MDA-MB-231.

2 : En cultures tridimensionnelles

Les valeurs sont regroupées dans le tableau 4 et correspondent à la somme des valeurs \pm écart type de dosages en triplicate sur 2 expériences comprenant 3 gels chacune (lysats et surnageants rassemblés).

En conditions témoins, nous observons également que l'activité uPA de base est importante dans les cultures de cellules normales et nettement plus faible dans les cultures de MDA-MB-231. Les cellules MCF-7 ne présentent pas d'activité uPA détectable.

En présence de milieu conditionné, l'activité uPA est augmentée de manière importante chez les CEMN (plus 250%) et les cellules HBL-100 (plus 140%) et plus faiblement chez la lignée MDA-MB-231 (plus 60%). Les cellules MCF-7 présentent maintenant une activité uPA et celle-ci est supérieure de 30% à celle des CEMN.

tableau 3: mesures de l'activité uPA dans les cultures de cellules épithéliales en 2 D

type cellulaire	ACTIVITE uPA (DO/ μ g ADN)		
	TEMOIN	MC-MRC5	RATIO
CEMN	67.5 \pm 1.12	103.35 \pm 0.49	1.53 *
HBL-100	24.6 \pm 1.68	37.35 \pm 0.91	1.51 *
MCF-7	4,45 \pm 1,1	184,02 \pm 13,76	41,35 *
MDA	7.97 \pm 0.73	8.28 \pm 0.4	1.03

* = P < 5% ; DO = densité optique ; MC-MRC5 = milieu conditionné MRC-5

tableau 4: mesures de l'activité uPA dans les cultures de cellules épithéliales en 3 D

type cellulaire	ACTIVITE uPA (DO/ μ g ADN)		
	TEMOIN	MC-MRC5	RATIO
CEMN	41.11 \pm 3.35	142.95 \pm 6.99	3.47 *
HBL-100	15.48 \pm 0.98	36.8 \pm 1.68	2.37 *
MCF-7	< seuil de détection	191,24 \pm 37,23	
MDA	10.64 \pm 1.13	17.15 \pm 0.35	1.61 *

* = P < 5% ; DO = densité optique ; MC-MRC5 = milieu conditionné MRC-5

III DOSAGE DES NIVEAUX DE PAI-1 PRESENTS DANS LES CULTURES 2 D ET 3 D DE CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES

Ces mesures confirment la présence détectée précédemment par immunolocalisation de PAI-1 dans nos quatre types cellulaires et ce, quel que soit le mode de culture adopté.

1 : En cultures bidimensionnelles

Les valeurs de niveaux de PAI-1 en cultures bidimensionnelles sont regroupées dans le tableau 5 et correspondent à la somme des valeurs \pm écart type de dosages en duplicate sur 2 expériences (lysats et surnageants rassemblés).

En conditions témoins, les niveaux les plus élevés de PAI-1 sont mesurés dans les cultures de cellules HBL-100 et de CEMN. Ces niveaux sont diminués de 50 à 60% dans les cultures de cellules MDA-MB-231 et pratiquement nuls dans les cultures de MCF-7.

Sous l'effet d'une stimulation par le milieu conditionné MRC-5, nous constatons que deux types cellulaires présentent une élévation du taux de PAI-1: 40% dans les cultures de CEMN et environ 2285% dans les cultures de cellules MCF-7. Les cultures de cellules HBL-100 et MDA-MB-231, quant à elles, ne présentent aucune variation significative de leurs niveaux de PAI-1.

2 : En cultures tridimensionnelles

Les valeurs de niveaux de PAI-1 en cultures tridimensionnelles sont regroupées dans le tableau 6 et correspondent à la somme des valeurs \pm écart type de dosages en duplicate sur 2 expériences comprenant 3 gels chacune (lysats et surnageants rassemblés).

En conditions témoins, les cultures de CEMN sont celles qui possèdent les niveaux les plus élevés de PAI-1. Ces taux sont diminués de 46,6% dans les cultures de cellules HBL-100 et de 71% dans les cultures de cellules MDA-MB-231. En 3 D, ce sont également les cultures de cellules MCF-7 qui présentent les taux les plus faibles de PAI-1 (environ 99% plus faibles que dans les CEMN).

Lorsque l'on stimule ces quatre types cellulaires par du milieu conditionné, les niveaux de PAI-1 ne présentent aucune variation sauf dans le cas des cultures de cellules MCF-7 où l'on mesure une augmentation de 2200% du niveau de PAI-1.

tableau 5: mesure des niveaux de PAI-1 dans les cultures de cellules épithéliales en 2 D

type cellulaire	niveau de PAI-1 (ng/ μ g ADN)		
	TEMOIN	MC-MRC5	RATIO
CEMN	11.19 \pm 0.24	15.52 \pm 0.41	1.38 *
HBL-100	13.84 \pm 0.37	13.63 \pm 0.51	0.98
MCF-7	0.013 \pm 0.002	0.31 \pm 0.02	23.85 *
MDA	6.76 \pm 0.27	5.9 \pm 0.33	0.87

* = P < 5% ; DO = densité optique ; MC-MRC5 = milieu conditionné MRC-5

tableau 6: mesure des niveaux de PAI-1 dans les cultures de cellules épithéliales en 3 D

type cellulaire	niveau de PAI-1 (ng/ μ g ADN)		
	TEMOIN	MC-MRC5	RATIO
CEMN	36.47 \pm 2.89	41.55 \pm 1.86	1.13
HBL-100	19.48 \pm 0.07	20.14 \pm 0.63	1.03
MCF-7	0.33 \pm 0.04	7.57 \pm 1.29	22.93 *
MDA	10.59 \pm 0.15	11.7 \pm 1.29	1.10

* = P < 5% ; DO = densité optique ; MC-MRC5 = milieu conditionné MRC5

DISCUSSION

1 : Variations de la balance activité uPA/niveaux de PAI-1

Dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur le système de la plasmine et plus particulièrement sur l'uPA et l'un de ses inhibiteurs, le PAI-1. Ces molécules sont exprimées lors du développement embryonnaire précoce (Marotti et al., 1982), lors de la formation d'organes tels que le système nerveux (Seeds et al., 1996), la peau (Jensen et Lavker, 1996) et dans les mécanismes d'angiogenèse (Ito et al., 1995 b ; Wijnberg et al., 1996 ; Kenagy et al., 1996). Elles semblent également être impliquées dans la cancérisation de nombreux tissus puisque l'on observe une élévation de leurs niveaux dans des tumeurs de l'estomac (Farinati et al., 1996), des carcinomes de pancréas (Cantero et al., 1997) et de prostate (Festuccia et al., 1995 ; Jankun et al., 1997), des cancers de colon (Naitoh et al., 1995), des carcinomes ovariens (Van Der Burg et al., 1996). Dans le cas de la glande mammaire, différents travaux décrivent l'implication de l'uPA lors de la phase d'involution (Ossowski et Reich, 1979 ; Talhouk et al., 1992) alors que son expression est diminuée lors de la lactation (Busso et al., 1989). Dans un précédent travail, nous avons pu montrer que le gène *uPA* était exprimé au niveau des bourgeons mammaires terminaux chez des souris pubertaires (Delannoy-Courdent et al., 1996). En ce qui concerne les tumeurs cancéreuses, plusieurs études ont montré une augmentation des niveaux aussi bien d'uPA que de PAI-1 dans les carcinomes mammaires et ont pu associer de hauts niveaux d'uPA et de PAI-1 à un mauvais pronostic clinique (Yamashita et al., 1992 ; Bouchet et al., 1994 ; Foekens et al., 1994, 1995). Ces données semblent en contradiction avec les dosages que nous avons réalisés puisqu'en conditions témoins, aussi bien en cultures 2 D qu'en cultures 3 D, les niveaux d'activité uPA et de PAI-1 les plus élevés ont été déterminés sur les cellules normales (CEMN). Cependant, dans ce travail, nous avons effectué des dosages d'activité uPA alors que les travaux cités précédemment décrivent des niveaux de protéines uPA. L'activité de la protéine uPA étant régulée par plusieurs inhibiteurs (PAI-1, PAI-2...), il est concevable de penser que des niveaux importants de protéine uPA ne reflètent pas nécessairement des

niveaux élevés d'activité uPA de sorte que l'activité uPA de base de cellules normales peut être supérieure à celle observée dans les cellules cancéreuses.

Lorsque l'on compare les niveaux d'activité uPA et de PAI-1 mesurés dans les cellules cancéreuses en conditions témoins, on observe qu'ils sont plus importants dans les cellules MDA-MB-231 fortement invasives que dans les cellules MCF-7 faiblement invasives. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Holst-Hansen et al. (1996) qui ont montré des niveaux de PAI-1 et d'uPA plus élevés dans les cellules MDA-MB-231 que dans les cellules MCF-7. Les études réalisées par Pourreau-Schneider et al. (1989) sur ces mêmes cellules avaient eux-aussi montré une activité uPA supérieure dans les cellules MDA-MB-231. Ils indiquaient également que cette activité était non modulable dans les cellules MDA-MB-231 (voir également Long et Rose, 1996) alors qu'elle pouvait être augmentée dans les cellules MCF-7 par incubation avec du 17β -estradiol, tout en restant inférieure à l'activité observée dans les cellules MDA-MB-231. Rappelons que nos dosages ont été effectués sur des cellules cultivées en milieu dépourvu de rouge de phénol, produit connu pour son activité oestrogénique. Les faibles niveaux voire l'absence d'activité uPA dans les cellules MCF-7 peuvent être la conséquence de l'utilisation de ce milieu et de l'absence de stimulation oestrogénique.

Plusieurs travaux ont déjà mis en avant l'implication de l'uPA dans les mécanismes de migration cellulaire. Kenagy et al. (1996) ont observé une élévation de l'activité uPA lors de la migration de cellules musculaires lisses et cette migration peut être inhibée par des anticorps anti-uPA ainsi que par l'amiloride qui bloque de manière spécifique l'activité uPA. Ces résultats ont été confirmés par les travaux de Wijnberg et al. (1996) qui, en ajoutant de l'uPA dans le milieu de culture de ces cellules musculaires lisses, augmentent de 30% leur migration.

2 : Mise en évidence d'une corrélation entre des variations de la balance activité uPA/niveaux de PAI-1 et des modifications du comportement des cellules épithéliales

Si l'on observe en parallèle le comportement de nos cellules épithéliales mammaires sous stimulation par le milieu conditionné MRC-5 et les niveaux d'activité uPA et de PAI-1, on note :

- en cultures 2 D:

- pour les CEMN et les cellules MCF-7 :
 - une augmentation à la fois de l'activité uPA et des niveaux de PAI-1
 - pas de modification morphologique
- pour les cellules HBL-100 :
 - une augmentation de l'activité uPA sans variation du niveau de PAI-1
 - une forte dispersion des cellules
- pour les cellules MDA-MB-231 :
 - aucune variation ni de l'activité uPA ni du niveau de PAI-1
 - une augmentation de la dispersion cellulaire

- en cultures 3 D :

- pour les CEMN, les cellules HBL-100 et MDA-MB-231 :
 - une augmentation de l'activité uPA sans variation des niveaux de PAI-1
 - une morphogenèse ou une invasion cellulaire
- pour les cellules MCF-7 :
 - une augmentation à la fois de l'activité uPA et du niveau de PAI-1
 - pas de modification morphologique

Notons que nous mesurons, d'une part, une variation d'activité enzymatique (activité uPA) et, d'autre part, une variation de protéine inhibitrice (PAI-1). Nous ne pouvons donner une valeur chiffrée à la balance activité uPA/niveau de PAI-1 et c'est pourquoi nous ne discuterons nos résultats qu'en "tendance" en introduisant le terme de "potentiel de dégradation matricielle" selon les critères présentés ci-dessous :

- il sera positif lorsque :

- l'activité uPA augmente et le niveau de PAI-1 est stable ou diminue
- l'activité uPA est stable et le niveau de PAI-1 diminue

- il sera stable lorsque :

- l'activité uPA et le niveau de PAI-1 augmentent, sont stables ou diminuent

parallèlement

- il sera négatif lorsque :

- l'activité uPA est stable et le niveau de PAI-1 augmente
- l'activité uPA diminue et le niveau de PAI-1 est stable ou augmente

Le tableau suivant établit les potentiels de dégradation matricielle sur nos différentes cultures.

Tableau 7: effet du milieu conditionné des fibroblastes MRC-5 sur le potentiel de dégradation matricielle des cellules épithéliales mammaires en cultures 2 D et 3 D.

	2 D + MC-MRC5			3 D + MC-MRC5		
	activité uPA	PAI-1	Potentiel	activité uPA	PAI-1	Potentiel
CEMN	↗	↗	stable	↗	=	positif
HBL-100	↗	=	positif	↗	=	positif
MCF-7	↗	↗	stable	↗	↗	stable
MDA	=	=	stable	↗	=	positif

A partir de ce tableau et du tableau 2 (chapitre I), nous pouvons établir clairement une corrélation entre les variations du comportement de nos cellules épithéliales et des variations de leur potentiel de dégradation matricielle :

- la migration, la tubulogenèse et l'invasion cellulaire épithéliales sont associées à un potentiel positif (HBL-100 en 2D, CEMN, HBL-100 et MDA-MB-231 en 3D)
- l'absence de morphogenèse épithéliale est associée à un potentiel stable (cas des MCF-7 en 2D et 3D).

3 : Origine des fluctuations d'activité uPA et des taux de PAI-1

Des phénomènes d'induction d'expression ou de production de diverses protéases dans des expériences de co-cultures ont été relatés par plusieurs auteurs. Lengyel et al. (1995) décrivent l'induction de l'expression de la MMP-9 (collagénase IV de 92 000 Da) dans des cellules de carcinome squameux par une protéine non déterminée de masse moléculaire comprise entre 3 000 et 10 000 Da, produite par des fibroblastes issus de la cavité buccale. De même, la MMP-9 est induite dans plusieurs lignées cancéreuses mammaires co-cultivées en présence de fibroblastes d'embryon de rat mais dans ce cas, la protéine inductrice, non déterminée également, présente une masse moléculaire comprise entre 30 et 100 kDa (Himmelstein et Muschel, 1996). Co-cultivées en présence de plaquettes sanguines, les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 voient leurs capacités invasives augmenter (Belloc et al., 1995). Ces auteurs ont pu montrer que dans les cellules MDA-MB-231, mais pas dans les cellules MCF-7, la production de MMP-9 était fortement augmentée dans ces conditions et qu'ils pouvaient diminuer de 60% l'invasion cellulaire par addition de TIMP-1, inhibiteur de métalloprotéases. Ils ont pu également montrer que dans ces conditions de co-culture, les niveaux d'activité uPA n'étaient quant à eux modifiés dans aucune des lignées épithéliales mammaires. Dans un autre travail, Adam et al. (1994) ont étudié la production de Cathepsine D par des cellules épithéliales cancéreuses mammaires co-cultivées avec différents types de fibroblastes mammaires: cette production est augmentée moyennement dans les cellules MCF-7 co-cultivées avec des fibroblastes mammaires normaux et plus fortement en présence de fibroblastes mammaires cancéreux. Nous avons déjà décrit la tubulogenèse des cellules épithéliales rénales MDCK sous l'effet du milieu conditionné MRC-5, morphogenèse pouvant être inhibée en présence d'inhibiteurs de protéases tels que l'aprotinine (Montesano et al., 1991 a, b). Dans la suite de ces travaux, Pepper et al. (1992 a) ont montré que cette tubulogenèse induite s'accompagnait d'une augmentation de l'expression du gène *uPA* et de l'activité uPA. De manière très intéressante, ils ont également montré que la propriété du milieu conditionné MRC-5 à induire l'uPA était complètement inhibée en pré-incubant ce milieu avec des anticorps neutralisants anti-HGF/SF et pouvait être rétablie en ajoutant

de l'HGF/SF recombinant dans le milieu, signes que l'HGF/SF serait à l'origine de l'activation du gène *uPA*. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'uPA est capable d'activer la forme latente de l'HGF/SF, le pro-HGF (Naldini et al., 1992 ; Mars et al., 1993). On peut ainsi établir un mécanisme d'activation en boucle entre ces deux molécules. Récemment, les travaux de Besser et al. (1997) ont pu confirmer le lien supposé entre HGF/SF et le gène *uPA* en montrant que chez des cellules MDCK transfectées, l'oncogène Trp-MET, forme constitutionnellement active du récepteur C-MET de l'HGF/SF, active le gène *uPA* via une voie de signalisation dépendante de la protéine GRB2. Dans nos modèles de reconstitution mammaire, il est donc concevable que l'HGF/SF présent dans le milieu conditionné MRC-5 puisse être à l'origine de l'augmentation de l'expression du gène *uPA* (Delannoy-Courdent et al., 1996) et de l'activité uPA résultante.

Par ailleurs, il a été montré qu'une stimulation de cellules endothéliales par du FGF-2 résulte en une augmentation de l'activité uPA produite par ces cellules stimulées (Rusnati et al., 1996). Les travaux présentés par El Yazidi et Boilly-Marer (1995) et Renaud et al. (1996) ont montré que les quatre types cellulaires que nous utilisons produisent ce type de facteurs de croissance en 2 D. Pouvons nous envisager une situation de stimulation autocrine d'uPA par les cellules elles-mêmes ? Les travaux de Warburton et al. (1996) ont montré récemment que les cellules myoépithéliales mais pas les cellules épithéliales mammaires étaient capables d'augmenter leur activité uPA sous stimulation par le FGF-2. Nous pouvons replacer un mécanisme de stimulation paracrine par le FGF-2 dans un contexte physiologique *in situ* où les cellules épithéliales qui produisent le FGF-2 stimulent l'activité uPA des cellules myoépithéliales et participent ainsi à la protéolyse matricielle.

Mais qu'en est-il de l'augmentation des niveaux de PAI-1 observée dans certains cas ? Les travaux menés par Wotja et al. (1994) sur une lignée cellulaire d'hépatome humain ont montré que l'HGF/SF était capable d'augmenter l'expression de PAI-1 et ceci pose le délicat problème du rôle de l'HGF/SF en tant que régulateur de l'expression du

gène *uPA* mais aussi de l'un de ses inhibiteurs. Des études réalisées sur des cellules myoépithéliales mammaires ont mis en évidence une augmentation de la synthèse de PAI-1 par le TGF- β 1 (Warburton et al., 1996) et Arnoletti et al. (1995) ont montré que le TGF- β 1 mais aussi la thrombospondine, molécule d'adhérence cellulaire, étaient capables d'augmenter la sécrétion de PAI-1 par les cellules MDA-MB-231. On sait que les cellules épithéliales mammaires produisent du TGF- β 1 (Arrick et al., 1990 ; Jeng et al., 1993). Existe-t-il également un effet du milieu conditionné MRC-5 sur cette production de TGF- β 1 et par conséquent, sur la production de PAI-1 ?

4 : Variations de dégradation matricielle et mécanismes d'adhérence cellulaire

Des variations du potentiel de dégradation matricielle auront pour effets non seulement de déstabiliser l'architecture matricielle mais également de modifier les mécanismes d'adhérence et de jonction cellules/cellules et cellules/matrice extracellulaire.

L'implication de molécules d'adhérence cellulaire dans le développement normal de la glande mammaire a été décrit dans de nombreuses publications. Ces molécules sont de plusieurs types: E et P-cadhérines (Daniel et al., 1995), thrombospondine (Péchoux et al., 1994), intégrine α 2 β 1 (Klinowska et al., 1996 ; Keely et al., 1995). Dans des modèles de reconstitution mammaire *in vitro*, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les sous-unités intégrines α 2, α 3, α 6, β 1 et β 4 ont mis en évidence le rôle de ces sous-unités dans la morphogenèse du branchement des cellules épithéliales (Berdichevsky et al., 1992 ; Stahl et al., 1997). Des perturbations d'adhérence cellulaire sont généralement observées dans les phénomènes de progression tumorale (pour revues, voir Takeichi, 1993 ; Albelda, 1994 ; Miyasaka, 1995 ; Judware et Culp, 1997). Dans les cas de cancérogenèse mammaire, des altérations au niveau de l'expression de ces molécules d'adhérence sont fréquemment observées et concernent aussi bien les intégrines (Zutter et al., 1993 ; Bergstraesser et Weitzman, 1994), la thrombospondine (Bertin et al., 1997) que l'E-cadhérine (Moll et al., 1993 ; Berx et al., 1996 ; Gamallo et al., 1996). Par ailleurs, il existe une corrélation négative entre les niveaux d'expression de molécules d'adhérence et la capacité d'invasion des cellules épithéliales: les cellules MCF-7, hormono-dépendantes

et faiblement invasives expriment fortement la thrombospondine et l'E-cadhérine alors que les cellules MDA-MB-231 hormono-indépendantes et fortement invasives n'expriment que faiblement ou pas ces deux molécules (Sommers et al., 1994 ; Michaud et Poyet, 1994). Lorsque l'on induit des cellules avec du milieu contenant un facteur d'essaimage (par exemple le milieu conditionné MRC-5), les cellules présentant de faibles niveaux d'adhérence (cellules MDA-MB-231) auront *a priori* plus de prédisposition à se mouvoir que les cellules présentant des niveaux d'adhérence importants (cellules MCF-7). Il serait d'un grand intérêt d'étudier l'effet du milieu conditionné sur la régulation de l'expression de ces molécules d'adhérence dans chacun de nos types épithéliaux mammaires et pouvoir ainsi éclaircir les relations qu'il peut y avoir entre:

- sensibilité à une induction mésenchymateuse (niveaux de récepteurs C-MET...)
- régulation de l'expression de protéases et de leurs inhibiteurs (uPA/PAI-1...)
- régulation de l'expression des molécules d'adhérence cellulaire (E-cadhérine, intégrines, thrombospondine...)

Chacune de ces composantes a un rôle individuel dans l'établissement du comportement épithélial et c'est l'interconnection finale de ces trois composantes qui établira le comportement définitif de la cellule épithéliale mammaire étudiée.

Ainsi, nous venons de voir que les cellules épithéliales mammaires jouent un rôle non pas passif mais actif dans l'établissement de leur comportement sous l'action d'une induction mésenchymateuse en modifiant l'expression et la synthèse de protéases matricielles et de leurs inhibiteurs. Dans le dernier chapitre de notre étude, nous allons étudier les interactions inverses, c'est-à-dire le rôle que peuvent avoir ces cellules épithéliales mammaires sur la composante mésenchymateuse. Nous allons observer s'il existe des modifications d'activité uPA et de niveaux de PAI-1 dans les fibroblastes MRC-5 avec, pour conséquence, l'apparition d'une propriété "permissive" du mésenchyme facilitant ainsi sa propre pénétration par les cellules épithéliales.

CHAPITRE III

VARIATIONS DE L'ACTIVITE α PA ET DES TAUX DE PAI-1 DANS LES FIBROBLASTES MRC-5: ROLE DU MESENCHYME SUR LE COMPORTEMENT MIGRATOIRE ET INVASIF DES CELLULES EPITHELIALES

INTRODUCTION

Dans ce troisième chapitre, nous abordons l'étude de la composante mésenchymateuse, représentée dans nos modèles par les fibroblastes MRC-5, sous l'effet d'une stimulation par les cellules épithéliales mammaires. En effet, nous venons de montrer qu'il existe une corrélation entre des variations de niveaux d'activité uPA et de PAI-1 mesurés dans des cultures de cellules épithéliales et la capacité de ces cellules épithéliales à entreprendre une réorganisation morphologique. Cependant, les travaux de Wernert et al. (1994) ont montré que les fibroblastes avaient la capacité d'entreprendre leur propre désorganisation et faciliter ainsi l'invasion du stroma tumoral par les cellules épithéliales. De plus, nous avons pu montrer qu'en cultures bidimensionnelles, du milieu conditionné par l'un ou l'autre des quatre types épithéliaux mammaires que nous utilisons stimule l'expression du gène *uPA* dans les fibroblastes MRC-5 (Delannoy-Courdent et al., 1996).

Pour cette étude, nous avons réalisé des cultures de fibroblastes en 2 D et en 3 D en présence ou non de milieu conditionné par les cellules épithéliales mammaires et pour chacune des conditions, nous avons mesuré l'activité uPA et les niveaux de PAI-1 présents dans les extraits cellulaires des fibroblastes et dans leur surnageant.

MATERIEL ET METHODES

I PREPARATION DU MILIEU CONDITIONNE PAR LES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES HUMAINES

Les cellules épithéliales mammaires sont ensemencées en boîte de culture à raison de 60 000 cellules/ml (12 ml/boîte de 75 cm²). A subconfluence, le milieu de culture est aspiré, les cellules rincées deux fois puis chaque boîte de 75 cm² est remplie avec 12 ml de milieu complet (avec sérum) ou de sevrage (milieu sans sérum contenant 5 µg/ml d'insuline, 30 µg/ml de transferrine et 2 µg/ml de fibronectine), avec ou sans rouge de phénol. Après 48 h d'incubation, les milieux sont récupérés dans des tubes siliconés,

centrifugés à 500 g pendant 10 mn pour éliminer les débris cellulaires et stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

II DOSAGE DE L'ACTIVITE uPA ET DES NIVEAUX DE PAI-1 DANS LES FIBROBLASTES MRC-5

1 : En cultures bidimensionnelles

Les fibroblastes MRC-5 sontensemencés à raison de 50 000 cellules/ml en boîte de Petri de 60 mm (4 ml/boîte) en présence d'un mélange de milieu complet et de milieu complet conditionné ou non par les cellules épithéliales (1/1), renouvelé tous les deux jours. Après 5 jours de culture, les cellules sont rincées pendant 1 h avec du milieu sans sérum puis incubées en présence d'un mélange identique à celui cité précédemment mais ne contenant ni sérum ni rouge de phénol. Après 24 h, le surnageant est récupéré, les cellules sont reprises dans 1,5 ml de tampon d'extraction et l'ensemble est alors dosé (uPA, PAI-1, ADN) selon les techniques décrites précédemment dans le chapitre II.

2 : En cultures tridimensionnelles

Les fibroblastes MRC-5 sont cultivés en gel de collagène (500 000 cellules/ml de gel, 300 µl de gel/puits de 16 mm de diamètre, 500 µl de milieu/puits) en présence d'un mélange de milieu complet sans rouge de phénol et de milieu complet sans rouge de phénol conditionné ou non par les cellules épithéliales (1/1), renouvelé quotidiennement pendant 5 jours. Les cellules sont alors rincées avec du milieu de sevrage sans rouge de phénol pendant 2 h puis incubées en présence du mélange décrit ci-dessus mais sans sérum. Après 24 h d'incubation, les surnageants sont récupérés et congelés à - 20°C jusqu'à utilisation. Les gels sont récupérés et digérés par la collagénase selon le protocole décrit dans le chapitre II. Chaque extrait cellulaire est repris dans 500 µl de tampon d'extraction puis congelé. Surnageants et extraits cellulaires sont alors traités selon les techniques décrites dans le chapitre II pour les cellules épithéliales (uPA, PAI-1, ADN).

RESULTATS

I DOSAGE DE L'ACTIVITE uPA PRESENTE DANS LES CULTURES 2 D et 3 D DE FIBROBLASTES MRC-5

1 : En cultures bidimensionnelles

Les valeurs d'activité uPA en cultures bidimensionnelles sont regroupées dans le tableau 8 et correspondent à la somme des valeurs \pm écart type de dosages en triplicate sur 2 expériences (lysats et surnageants rassemblés).

Sous l'effet d'une stimulation par du milieu conditionné par les cellules HBL-100, MCF-7 ou MDA-MB-231, nous constatons que les cultures de fibroblastes MRC-5 ne présentent aucune variation d'activité uPA. Par contre, sous l'effet du milieu conditionné par les CEMN, on observe une augmentation de l'activité uPA d'environ 350%.

tableau 8: activité uPA présente dans les cultures de MRC-5 en 2 D

condition	activité uPA (DO/ μ g ADN)
témoin	52,93 \pm 10,69
+ MC-CEMN	237,05 \pm 15,61 *
+ MC-HBL 100	70,22 \pm 8,13
+ MC-MCF 7	28,93 \pm 5,64
+ MC-MDA	52,76 \pm 6,71

* = P < 5% ; MC = milieu conditionné ; DO = densité optique

2 : En cultures tridimensionnelles

Les valeurs d'activité uPA en cultures tridimensionnelles sont regroupées dans le tableau 9 et correspondent à la somme des valeurs \pm écart type de dosages en triplicate sur 2 expériences comprenant 2 gels (lysats et surnageants rassemblés).

L'incubation des fibroblastes MRC-5 avec du milieu conditionné par les CEMN ou les cellules MCF-7 n'entraîne aucune variation de l'activité uPA présente dans ces cultures. En présence de milieu conditionné par les cellules HBL-100 et les cellules MDA-MB-231, on observe une augmentation respectivement de 215% et 180% de l'activité uPA.

tableau 9: activité uPA présente dans les cultures de MRC-5 en 3 D

condition	activité uPA (DO/ μ g ADN)
témoin	17,44 \pm 1,16
+ MC-CEMN	16,26 \pm 1,47
+ MC-HBL 100	55 \pm 8,23 *
+ MC-MCF 7	32,41 \pm 7,91
+ MC-MDA	49,36 \pm 8,10 *

* = P < 5% ; MC = milieu conditionné ; DO = densité optique

II DOSAGE DES NIVEAUX DE PAI-1 PRESENTS DANS LES CULTURES 2 D et 3 D DE FIBROBLASTES MRC-5

1 : En cultures bidimensionnelles

Les niveaux de PAI-1 en cultures bidimensionnelles sont regroupés dans le tableau 10 et correspondent à la somme des valeurs \pm écart type de dosages en duplicate sur 2 expériences (lysats et surnageants rassemblés).

Sous l'effet d'une stimulation par l'un ou l'autre des milieux conditionnés par les cellules épithéliales mammaires humaines, nous constatons que les cultures de fibroblastes MRC-5 ne présentent aucune variation significative des niveaux de PAI-1.

tableau 10: niveaux de PAI-1 présents dans les cultures de MRC-5 en 2 D

condition	niveau de PAI-1 (ng/ μ g ADN)
témoin	15.64 \pm 2.35
+ MC-CEMN	10.68 \pm 0.94
+ MC-HBL 100	26.92 \pm 3.27
+ MC-MCF 7	14.26 \pm 2.25
+ MC-MDA	26.12 \pm 3.16

* = P < 5% ; MC = milieu conditionné

2 : En cultures tridimensionnelles

Les niveaux de PAI-1 en cultures tridimensionnelles sont regroupés dans le tableau 11 et correspondent à la somme des valeurs \pm écart type de dosages en duplicate sur 2 expériences comprenant 2 gels (lysats et surnageants rassemblés).

L'incubation des fibroblastes MRC-5 avec du milieu conditionné par les cellules HBL-100, MCF-7 ou MDA-MB-231 n'entraîne aucune variation des niveaux de PAI-1 présents dans ces cultures. Par contre, en présence de milieu conditionné par les CEMN, on observe une diminution de 38% des niveaux de PAI-1 présents dans les cultures de fibroblastes.

tableau 11: niveaux de PAI-1 présents dans les cultures de MRC-5 en 3 D

condition	niveau de PAI-1 (ng/ μ g ADN)
témoin	8.82 \pm 0.32
+ MC-CEMN	5.44 \pm 0.47 *
+ MC-HBL 100	12.93 \pm 1.99
+ MC-MCF 7	6.40 \pm 1.23
+ MC-MDA	13.31 \pm 2.15

* = P < 5% ; MC = milieu conditionné

DISCUSSION

Dans les deux premiers chapitres de ce travail, nous avons exposé des éléments d'interactions épithélio-mésenchymateuses intervenant au cours d'un développement mammaire normal ou cancéreux reconstitué *in vitro* en décrivant une voie de signalisation qui s'établissait du compartiment mésenchymateux vers le compartiment épithélial et qui montrait que les fibroblastes étaient capables (ou non) d'induire un comportement propre aux cellules épithéliales corrélé à des modifications de leurs niveaux de PAI-1 et d'activité uPA. Dans ce chapitre, nous apportons des éléments qui montrent qu'il existe également une voie de signalisation qui s'établit du compartiment épithélial vers le compartiment mésenchymateux.

Sur le plan morphologique, les fibroblastes sont des cellules statiques, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas en mesure de modifier leur phénotype sauf dans de rares cas. Citons par exemple les fibroblastes 3T3-L1 qui, à confluence, se différencie en adipocytes (Green et Meuth, 1974). De plus, cultivés en 3 D, les fibroblastes se répartissent le long des fibres de collagène et deviennent alors difficilement observables. Nous n'avons donc pas étudié le comportement de ces cellules en présence de milieu conditionné par les cellules épithéliales mammaires. Par contre, nous avons pu étudier l'effet de ces différents milieux conditionnés sur les niveaux de PAI-1 et d'activité uPA présents dans les cultures de fibroblastes.

Dans un travail précédent (Delannoy-Courdent et al., 1996), nous avons montré que les milieux conditionnés de nos cellules épithéliales mammaires augmentaient après 24 h d'incubation l'expression du gène *uPA* dans les fibroblastes MRC-5 cultivés en 2 D sur des lames coatées au collagène. Dans ce travail-ci, nous montrons que seule l'activité uPA des fibroblastes stimulés par le milieu conditionné des CEMN était augmentée. Ces résultats ne sont cependant pas contradictoires. En effet, comme nous l'avons déjà dit, nous mesurons une activité uPA et non pas un niveau de protéines. L'augmentation de l'expression du gène *uPA* peut déterminer effectivement une augmentation du niveau de protéines uPA (s'il n'y a pas de régulation post-transcriptionnelle) mais si, en parallèle, nous avons une augmentation des niveaux d'inhibiteurs de l'uPA, il en résulte une

absence de modification d'activité uPA. De plus, pour des raisons techniques liées au protocole d'hybridation *in situ*, les fibroblastes MRC-5 ont été cultivés certes en deux dimensions mais sur des lames en verre qui avaient été traitées au préalable par une solution de collagène, ceci afin de permettre l'adhérence des cellules sur ce type de support. Cette matrice, aussi minime soit-elle, peut avoir des effets sur l'expression génique.

Dans la suite de notre analyse, nous allons observer l'effet du milieu conditionné des cellules épithéliales sur le potentiel de dégradation matricielle (défini selon les critères précédemment décrits dans le chapitre II) présenté par les fibroblastes (tableau 12).

Tableau 12: effet du milieu conditionné des cellules épithéliales mammaires sur le potentiel de dégradation matricielle des fibroblastes MRC-5 en cultures 2 D et 3 D.

	2 D			3 D		
	activité uPA	PAI-1	Potentiel	activité uPA	PAI-1	Potentiel
+ MC-CEMN	↗	=	positif	=	↘	positif
+ MC-HBL-100	=	=	stable	↗	=	positif
+ MC-MCF-7	=	=	stable	=	=	stable
+ MC-MDA	=	=	stable	↗	=	positif

Nous voyons que:

- en 2 D :

- le potentiel est positif en présence de milieu conditionné par les CEMN
- le potentiel est stable en présence de milieu conditionné par les cellules HBL-100, MCF-7 ou MDA-MB-231

- en 3 D :

- le potentiel est positif en présence de milieu conditionné par les CEMN, les cellules HBL-100 ou MDA-MB-231
- le potentiel est stable en présence de milieu conditionné par les cellules MCF-7

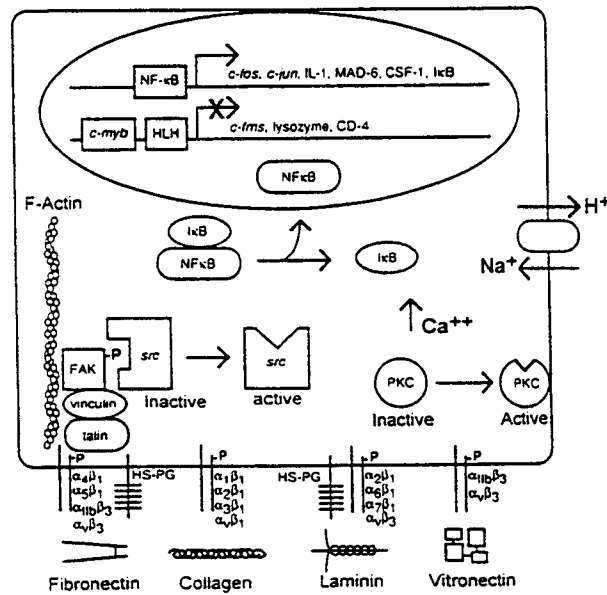


Figure 10 : Relations entre l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire et activation génique (d'après Judware et Culp, 1997). Les cellules s'attachent aux composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène...) par l'intermédiaire de récepteurs membranaires de types HSPG ou intégrines. Cette liaison induit l'aggrégation des intégrines au niveau de points focaux en liaison avec des protéines du cytosquelette (taline, vinculine, F-actin...) ainsi que l'activation de nombreux système de transduction du signal via des protéines FAK (Focal Adhesion Kinase) et des protéines kinase C (PKC). Il apparaîtra également des modifications du pH interne et de la concentration calcique intracellulaire. Sous l'effet de l'activation de PKC, le complexe inactif NF-κB/IκB se dissocie et libère le NF-κB actif. Celui-ci va alors activer la transcription de certains gènes alors que d'autres gènes, au contraire, seront réprimés.

A partir de l'analyse de ces tendances, nous pouvons tirer quelques points essentiels :

Le premier point est l'importance du critère environnemental puisque les fibroblastes, quand ils sont placés en collagène, sont plus sensibles au milieu conditionné que lorsqu'ils sont cultivés sur un support plastique (fond de boîte de culture). La matrice extracellulaire serait donc en mesure de rendre ces cellules plus réceptives aux signaux extérieurs. Ce caractère de réceptivité peut être en rapport avec les liaisons qui s'établissent entre la matrice extracellulaire et l'architecture interne des fibroblastes qui s'organise de manière plus fonctionnelle en présence d'un environnement naturel. Or, il a été montré que le cytosquelette a un rôle dans les mécanismes d'activation génique via ses interactions avec des protéines kinase (Judware et Culp, 1997. figure 10).

Le deuxième point important de cette étude est que certaines de nos cellules épithéliales mammaires sont effectivement capable d'induire des variations des capacités protéolytiques des fibroblastes MRC-5. Ces résultats sont en accord avec de précédents travaux réalisés sur des co-cultures de fibroblastes et de divers types cellulaires et s'inscrivent dans une logique d'augmentation de ces activités de dégradation matricielle. Des lignées cellulaires d'adénocarcinome ovarien humain sont capables d'induire l'expression des gélatinases A et B (MMP-2 et MMP-9 respectivement) dans des fibroblastes murins de peau (Miyagi et al, 1995). De même, Segain et al. (1996) ont décrit l'augmentation de l'expression et de la production de MMP-9 dans divers types de fibroblastes co-cultivés avec des cellules de carcinomes colorectaux primaires. Ils ont également montré que dans certains cas, il fallait qu'il y ait un contact direct entre les deux types cellulaires co-cultivés pour avoir cette induction. Des expériences de co-cultures réalisées à partir de fibroblastes dermiques humains et de diverses cellules épithéliales mammaires ont montré que des cellules normales augmentent uniquement la production d'inhibiteur de métalloprotéase (TIMP-1) par ces fibroblastes alors que les cellules MCF-7 et les cellules BT-20 augmentent non seulement la production de TIMP-1 mais aussi la production de la collagénase intersticielle (MMP-1), de la gélatinase A (MMP-2) et de la stromélysine (MMP-3). Notons que pour les cellules MCF-7, il n'y a pas nécessairement

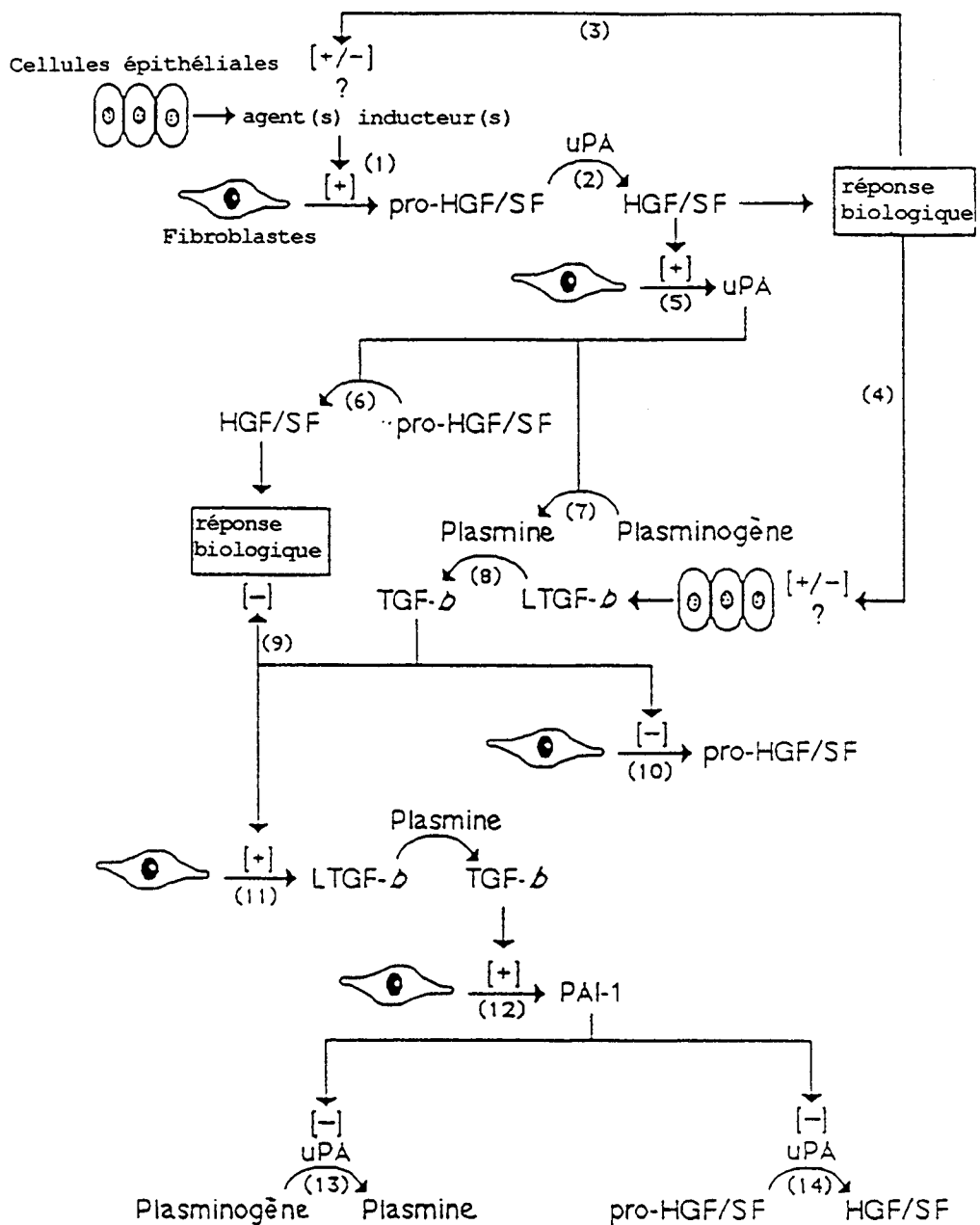


Figure 11 : Régulation de l'HGF, de l'uPA, du PAI-1 et du TGF-β dans des situations d'interactions épithélio-mésenchymateuses (d'après Byers et al., 1994). Les cellules épithéliales expriment un ou des facteurs qui stimulent l'expression de pro-HGF par les fibroblastes (1). Ce pro-HGF est activé par l'uPA (2) et induit une réponse biologique aux cellules épithéliales (motogenèse, morphogenèse...). Il peut en résulter une modification de la production des facteurs stimulateurs épithéliaux (3) ainsi que de la production de TGF-β par les cellules épithéliales (4). Par ailleurs, l'HGF peut induire l'expression de l'uPA (5) et ceci peut avoir comme effets d'augmenter l'activation du pro-HGF (6) et de convertir le plasminogène en plasmine (7). Celle-ci, en plus de son rôle sur la dégradation matricielle, peut activer la forme latente du TGF-β (LTGF-β) (8), ce qui peut avoir comme effets d'inhiber les réponses biologiques induites par l'HGF (9) et d'inhiber la sécrétion de pro-HGF par les fibroblastes (10). Le TGF-β peut également induire sa propre expression par les fibroblastes (11) ainsi que l'expression de PAI-1 (12). Il en résulte alors une inhibition de l'activité uPA d'où une diminution de la conversion du plasminogène en plasmine (13) et une inhibition de l'activation du pro-HGF en HGF (14).

besoin de contacts cellulaires car leur milieu conditionné produit les mêmes variations (Ito et al., 1995 a). Les études de Noël et al. (1993 b), quant à elles, ont montré une élévation de l'activité de la collagénase intersticielle produite par des fibroblastes de peau co-cultivés en présence de cellules MDA-MB-231. Cette activité est stable en présence de cellules HBL-100. Par contre, contrairement aux travaux de Ito et al. (1995 a), cette activité est plus faible en conditions de co-cultures avec les cellules MCF-7.

Le troisième point important de cette étude est que les cellules épithéliales mammaires capables d'induire un potentiel protéolytique positif sur les fibroblastes sont justement celles qui possèdent une capacité de réponse morphologique à une stimulation par ces fibroblastes.

L'ensemble de ces travaux pose le problème du lien entre le niveau du potentiel invasif des cellules épithéliales et la réponse stromale vis à vis de ces cellules épithéliales puisqu'il semble que le "dialogue" qui s'établit entre les deux feuillets dépend de la qualité (normale ou cancéreuse) de chacun des constituants de ces feuillets. Dans notre étude, nous arrivons ainsi à définir une situation complexe et très subtile dans laquelle des fibroblastes vont induire une réponse morphologique à des cellules épithéliales mammaires. Ces cellules présentent alors une capacité protéolytique plus élevée, facilitant leur déplacement propre (régulation des mécanismes d'adhérence cellulaire ?), mais vont également faciliter leur pénétration à l'intérieur du mésenchyme en induisant les fibroblastes à augmenter leur capacité protéolytique et à désorganiser l'architecture matricielle de ce mésenchyme. Une partie de cette situation a été décrite précédemment par Byers et al. (1994) et est présentée dans la figure 11. Son titre ? "les carcinomes mammaires: un désordre collectif"...

CONCLUSION GENERALE

Le développement et la tumorigenèse mammaires font intervenir au sein d'une matrice extracellulaire des mécanismes d'interactions entre l'épithélium et le mésenchyme environnant qui composent cet organe. Le premier but de notre travail a été de mettre au point des modèles *in vitro* de reconstitution mammaire normale ou cancéreuse réunissant ces différents effecteurs.

En cultures bidimensionnelles, sous l'influence de milieu conditionné par les fibroblastes MRC-5 producteurs d'un facteur d'essaimage, l'HGF/SF, certaines lignées épithéliales développent un comportement migratoire, comme cela est le cas pour les cellules HBL-100, ou voient leur caractère migratoire potentialisé (cellules MDA-MB-231). Les cellules MCF-7 ainsi que les cellules normales ne semblent pas morphologiquement sensibles à ce milieu conditionné.

Placées dans un contexte tridimensionnel en gel de collagène et soumises à l'influence des fibroblastes MRC-5 ou de leur milieu conditionné, ces cellules acquièrent la faculté de s'organiser selon des modalités qui sont en accord avec leur statut: les cellules normales présentent une tubulogenèse. Les cellules HBL-100 moins "normales", puisque immortalisées, mais non cancéreuses, présentent une invasion groupée et s'organisent en cordons. Les cellules MDA-MB-231 cancéreuses, hormono-indépendantes et fortement invasives voient leurs capacités invasives augmenter dans ces conditions. Les cellules MCF-7 cancéreuses, hormono-dépendantes et faiblement invasives restent insensibles morphologiquement à l'influence des fibroblastes MRC-5.

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré les variations de l'activité uPA et des niveaux de PAI-1 afin d'observer le potentiel de dégradation matricielle présenté par les cellules épithéliales au cours de ces remaniements morphologiques. Nous avons pu ainsi déterminer une corrélation entre l'apparition ou la potentialisation des capacités migratrices et invasives des cellules épithéliales et une augmentation de leur potentiel protéolytique. De même, nous avons pu corréler une absence de remaniement morphologique avec une augmentation à la fois de l'activité uPA et des niveaux de PAI-1 dont nous considérons la résultante comme étant un potentiel protéolytique inchangé.

Notons cependant que notre étude se limite à deux paramètres d'un système extrêmement complexe où peuvent venir se greffer d'autres intervenants. Il nous paraît par exemple indispensable d'étudier les statuts des récepteurs soit à l'uPA, soit aux facteurs morphogènes, partenaires incontournables des systèmes que nous avons étudiés.

Par ailleurs, nous avons observé l'effet des cellules épithéliales mammaires sur la capacité des fibroblastes MRC-5 à dégrader leur environnement. Nous avons pu observer que les cellules épithéliales mammaires qui étaient sensibles morphologiquement à l'influence de ces fibroblastes étaient capables d'augmenter le potentiel de dégradation matricielle de ces mêmes fibroblastes (c'est ce que nous définissons comme la réaction stromale), phénomène pouvant se traduire par une désorganisation du mésenchyme.

Ces modèles *in vitro* de reconstitution mammaire normale ou cancéreuse nous ont donc permis de montrer que chacun des compartiments mis en présence, épithélium mammaire "envahissant" et mésenchyme inducteur "envahi", jouait un rôle actif dans l'établissement du comportement des cellules épithéliales et que ces modifications pouvaient être corrélées à des modulations des capacités de dégradation matricielle présentées aussi bien par les cellules épithéliales que par les fibroblastes. Dans le but éventuellement d'établir des thérapies visant à limiter la propagation et la métastase tumorales, ces modèles ont été transposés chez la souris par utilisation de lignées épithéliales mammaires murines normales ou cancéreuses et de fibroblastes NIH-3T3 producteurs d'HGF/SF. Ils sont appliqués à l'établissement de protocoles visant à réduire les capacités invasives des cellules épithéliales par modulation de l'expression du gène *ets* qui code pour un facteur de transcription du gène *uPA* (Delannoy-Courdent A., thèse de Doctorat en préparation). C'est ainsi qu'en diminuant, voire en inhibant la transcription du gène *uPA*, on inhibe la migration et l'invasion de collagène par les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses. Ce dernier point confirme l'importance du système uPA/plasmine/PAI-1 que nous avons étudié au cours de notre travail de thèse.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAM L, CREPIN M, LELONG J-C, SPANAKIS E AND ISRAEL L (1994) Selective interactions between mammary epithelial cells and fibroblasts in co-culture. *Int J Cancer* 59, 262-268
- ADNANE J, GAUDRAY P, DIONNE CA, CRUMLEY G, JAYE M, SCHLESSINGER J, JEANTEUR P, BIRNHAUM D AND THEILLET C (1991) *BEK* and *FLG*, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene* 6, 659-663
- AGGELER J, WARD J, MACKENZIE BLACKIE L, BARCELLOS-HOFF MH, STREULI CH AND BISSELL MJ (1991) Cytodifferentiation of mouse mammary epithelial cells cultured on a reconstituted basement membrane reveals striking similarities to development *in vivo*. *J Cell Sci* 99, 407-417
- ALBELDA SM (1994) Role of cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Adhesion Molecules*, 71-88
- ALEXANDER CM AND WERB Z (1989) Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr Opin Cell Biol* 1, 974-982
- ALI S, EDERY M, PELLEGRINI I, LESUEUR L, PALY J, DJIANE J AND KELLY PA (1992) The Nb2 form of prolactin receptor is able to activate a milk protein gene promoter. *Mol Endocrinol* 6, 1242-1248
- ANANDAPPA SY, WINSTANLEY JHR, LEINSTER S, GREEN B, RUDLAND PS AND BARRACLOUGH R (1994) Comparative expression of fibroblast growth factor mRNAs in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 69, 772-776
- ARNOLETTI JP, ALBO D, GRANICK MS, SOLOMON MP, CASTIGLIONI A, ROTHMAN VL AND TUSZYNSKI GP (1995) Thrombospondin and transforming growth factor-beta 1 increase expression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer* 76, 998-1005
- ARRICK BA, KORC M AND DERYNCK R (1990) Differential regulation of expression of three transforming growth factor β species in human breast cancer cell lines by estradiol. *Cancer Res* 50, 299-303
- ARTEAGA CL, TANDON AK, VON HOFF DD AND OSBORNE CK (1988) Transforming growth factor β : potential autocrine growth inhibitor of estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Cancer Res* 48, 3898-3904

- BARCELLOS-HOFF MH, AGGELER J, RAM TG AND BISSELL MJ (1989) Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development* 105, 223-235
- BARRACLOUGH R, FERNIG DG, RUDLAND PS AND SMITH JA (1990) Synthesis of basic fibroblast growth factor upon differentiation of rat mammary epithelial to myoepithelial-like cells in culture. *J Cell Physiol* 144, 333-344
- BELLOC C, LU H, SORIA C, FRDMAN R, LEGRAND Y AND MENASHI S (1995) The effects of platelets on invasiveness and protease production of human mammary tumor cells. *Int J Cancer* 60, 413-417
- BENETT DC (1980) Morphogenesis of branching tubules in cultures of cloned mammary epithelial cells. *Nature* 285, 657-659
- BENSON JR AND BAUM M (1994) Transforming growth factor β isoforms in breast cancer. *Br J Cancer* 70, 1278
- BERDICHEVSKY F, ALFORD D, D'SOUZA B AND TAYLOR-PAPADIMITRIOU J (1994) Branching morphogenesis of human mammary epithelial cells in collagen gels. *J Cell Sci* 107, 3557-3568
- BERDICHEVSKY F, GILBERT C, SHEARER M AND TAYLOR-PAPADIMITRIOU (1992) Collagen-induced rapid morphogenesis of human mammary epithelial cells: the role of the $\alpha 2\beta 1$ integrin. *J Cell Sci* 102, 437-446
- BERGSTRAESSER LM AND WEITZMAN SA (1993) Culture of normal and malignant primary human mammary epithelial cells in a physiological manner simulates *in vivo* growth patterns and allows discrimination of cell type. *Cancer Res* 53, 2644-2654
- BERGSTRAESSER LM AND WEITZMAN SA (1994) Alterations in integrin and basement membrane protein expression by malignant breast cells. *Int J Onc* 4, 915-930
- BERTHON P, PANCINO G, DE CREMOUX P, ROSETO A, GESPACH C AND CALVO F (1992) Characterization of normal breast epithelial cells in primary cultures: differentiation and growth factor receptor studies. *In Vitro Cell Dev Biol* 28a, 716-724
- BERTIN N, CLEZARDIN P, KUBIAK R AND FRAPPART L (1997) Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in normal, benign and neoplastic human breast tissues: correlation with prognostic factors, tumor angiogenesis and fibroblastic desmoplasia. *Cancer Res* 57, 396-399

- BERX G, CLETON-JANSEN A-M, STRUMANE K, DE LEEUW WJF, NOLLET F, VAN ROY F AND CORNELISSE C (1996) E-cadherine is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancer by truncations throughout its extracellular domain. *Oncogene* 13, 1919-1925
- BESSER D, BARDELLI A, DIDICHENKO S, THELEN M, COMOGLIO PM, PONZETTO C AND NAGAMINE Y (1997) Regulation of the urokinase-type plasminogen activator gene by the oncogene Trp-Met involves GRB2. *Oncogene* 14, 705-711
- BEVILACQUA P, GAPARINI G, DAL FIOR S AND CORRADI G (1990) Immunocytochemical determination of epidermal growth factor receptor with monoclonal EGFR1 antibody in primary breast cancer patients. *Oncology* 47, 313-317
- BISSELL M AND HALL G (1987) Form and fonction in the mammary gland: the role of extracellular matrix. *In: The Mammary Gland* (Neville M, Daniel C, eds) Plenum Press, New York, 97-146
- BLEI F, WILSON EL, MIGNATTI P AND RIFKIN DB (1993) Mechanism of action of angiostatic steroids: suppression of plasminogen activator activity via stimulation of plasminogen activator inhibitor synthesis. *J Cell Physiol* 155, 568-578
- BOUCHET C, SPYRATOS F, MARTIN PM, HACENE K, GENTILE A AND OGLOBINE J (1994) Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in breast carcinomas. *Br J Cancer* 69, 398-405
- BRINKMANN V, FOROUTAN H, SACHS M, WEIDNER KM AND BIRCHMEIER W (1995) Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J Cell Biol* 131, 1573-1586
- BROUTY-BOYE D AND RAUX H (1993) Differential influence of stromal fibroblasts from different breast tissues on human breast tumour cell growth in nude mice. *Anticancer Res* 13, 1087-1090
- BROUTY-BOYE D, MAINGUENE C, MAGNIEN V, ISRAEL L AND BEAUPAIN R (1994) Fibroblast-mediated differentiation in human breast carcinoma cells (MCF-7) grown as nodules in vitro. *Int J Cancer* 56, 731-735
- BRUNK CF, JONES KC AND JAMES TW (1979) Assay of nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal Biochem* 92, 497-500

- BUSSO N, HUARTE J, VASSALLI JD, SAPPINO AP AND BELIN D (1989) Plasminogen activators in the mouse mammary gland: decreased expression during lactation. *J Biol Chem* 13, 7455-7457
- BYATT JC, EPPARD PJ, VEENHUIZEN JJ, CURRAN TL, CURRAN DF, MCGRATH MF AND COLLIER RJ (1994) Stimulation of mammosgenesis and lactogenesis by recombinant bovine placental lactogen in steroid-primed dairy heifers. *J Endocrinol* 140, 33-73
- BYERS S, PARK M, SOMMERS C AND SESLAR S (1994) Breast carcinoma: a collective disorder. *Breast Canc Res Treat* 31, 203-215
- CANTERO D, FRIESS H, DEFLORIN J, ZIMMERMANN A, BRÜNDLER M-A, RIESLE E, KORC M AND BÜCHLER MW (1997) Enhanced expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 75, 388-395
- CASTELLANI R, WISCHER DW, WYKES S, SARKAR FH, AND CRISSMAN JD (1994) Interaction of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in breast carcinoma. An immunohistologic study. *Cancer* 73, 344-349
- CHEN WT (1992) Membrane proteases: roles in tissue remodeling and tumor invasion. *Curr Opin Cell Biol* 4, 802-809
- COLEMAN-KRNACIK S AND ROSEN EM (1994) Differential temporal and spatial gene expression of fibroblast growth factor family members during mouse mammary gland development. *Mol Endocrinol* 8, 218-229
- COLEMAN S, SILBERSTEIN GB AND DANIEL CW (1988) Ductal morphogenesis in the mouse mammary gland: evidence supporting a role for epidermal growth factor. *Dev Biol* 127, 304-315
- COWIE AT, HARTMANN PE AND TURVEY A (1969) The maintenance of lactation in the rabbit after hypophysectomy. *J Endocrinol* 43, 651-662
- DANIEL CW, BERGER JJ, STRICKLANG P AND GARCIA R (1984) Similar growth patterns of mouse mammary cells cultivated in collagen matrix *in vivo* and *in vitro*. *Dev Biol* 104, 57-64
- DANIEL CW AND ROBINSON SD (1992) Regulation of mammary growth and function by TGF- β . *Mol Reprod Dev* 32, 145-151
- DANIEL CW AND SILBERSTEIN GB (1987) Postnatal development of the rodent mammary gland. In: *The Mammary Gland* (Neville M, Daniel C, eds) Plenum Press, New York, 03-36

- DANIEL CW, SILBERSTEIN GB, VAN HORN K, STRICKLAND P AND ROBINSON S (1989) TGF β 1-induced inhibition of mouse ductal growth: developmental specificity and characterization. *Dev Biol* 135, 20-30
- DANIEL CW, STRICKLAND P AND FRIEDMANN Y (1995) Expression and functional role of E- and P-cadherins in mouse mammary ductal morphogenesis and growth. *Dev Biol* 169, 511-519
- DARCY KM, BLACK JD, HAHM HA AND IP MM (1991) Mammary organoids from immature virgin rats undergo ductal and alveolar morphogenesis when grown within a reconstituted basement membrane. *Exp Cell Res* 196, 49-65
- DAVID D ET PROPPER A (1964) Sur la culture organotypique de la glande mammaire embryonnaire du lapin. *Comptes rendus des séances de la Société de Biologie* 158/2, 2315-2317
- DELANNOY-COURDENT A, FAUQUETTE W, DONG-LE BOURHIS XF, BOILLY B, VANDENBUNDER B AND DESBIENS X (1996) Expression of *c-ETS-1* and *uPA* genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering. *Int J Dev Biol* 40, 1097-1108
- DELEHEDDE M, DEUDON E, BOILLY B AND HONDERMARCK H (1996) Heparan sulfate proteoglycans play a dual role in regulating fibroblast growth factor-2 mitogenic activity. *Exp Cell Res* 229, 398-406
- DELEHEDDE M, DEUDON E, BOILLY B AND HONDERMARCK H (1997) Production of sulfated proteoglycans by human breast cancer cell lines. Binding to Fibroblast Growth Factor-2. *J Cell Biochem* 64, 605-617
- DIB A, ADELAIDE J, COURJAL F, COURSEAUX A, JACQUEMIER J, GAUDRAY P, THEILLET C, PEBUSQUE MJ AND BIRNBAUM D (1994) Co-amplification in human breast tumors and physical linkage at chromosomal band 12p13, of CCND2 and FGF6 genes. *Int J Oncol* 5, 1375-1378
- DICKSON SR AND WARBURTON MJ (1992) Enhanced synthesis of gelatinase and stromelysin by myoepithelial cells during involution of the rat mammary gland. *J Histochem Cytochem* 40, 697-703
- EDERY M, PANG K, LARSON L, COLOSI T AND NANDI S (1985) Epidermal growth factor receptor levels in mouse mammary glands in various physiological states. *Endocrinology* 117, 405-411

- EL YAZIDI I AND BOILLY-MARER Y (1995) Production of acidic and basic fibroblast growth factor by the hormone-independent breast cancer cell line MDA-MB-231. *Anticancer Res* 15, 1-8
- EMERMAN JT AND PITELKA DR (1977) Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In vitro* 13, 316-328
- FARINATI F, HERSZËNYI L, PLEBANI M, CARRARO P, DE PAOLI M, CARDIN R, ROVERONI G, RUGGE M, NITTI D, GRIGIONI WF, D'ERRICO A AND NACCARATO R (1996) Increased levels of cathepsin B and L, urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type-1 as an early event in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis* 17/12, 2581-2587
- FENTON SE AND SHEFFIELD LG (1993) Prolactin Inhibits epidermal growth factor (EGF) stimulated signaling events in mouse mammary epithelial cells by altering EGF receptor function. *Mol Biol Cell* 4, 773-780.
- FESTUCCIA C, VINCENTINI C, DI PASQUALE AB, ACETO G, ZAZZERONI F, MIANO L AND BOLOGNA M (1995) Plasminogen activator activities in short-term tissue cultures of benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Oncology Res* 3/4, 131-138
- FLAMM SL, WELLSTEIN A, LUPU R, KERN F, LIPPMAN ME AND GELMANN EP (1989) Expression of fibroblast growth factor peptides in normal and malignant human mammary epithelial cells. *Proc Am Soc Clin Oncol* 30, 71 (Abstr. 278)
- FOEKENS JA, BUESSECKER F, PETERS HA, KRAINICK U, VAN PUTTEN WLJ, LOOK MP, KLIJN JGM AND KRAMER MD (1995 a) Plasminogen activator inhibitor-2: Prognostic relevance in 1012 patients with primary breast cancer. *Cancer Res* 55, 1423-1427
- FOEKENS JA, LOOK MP, PETERS HA, VAN PUTTEN WLJ, PORTENGEN H AND KLIJN JGM (1995 b) Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *J Natl Canc Instit* 87, 751-756
- FOEKENS JA, SCHMITT M, VAN PUTTEN WLJ, PETERS HA, KRAMER MD, JÄNICKE F AND KLIJN JGM (1994) Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Onc* 12/8, 1648-1658
- GAMALLO C, PALACIOS J, BENITO N, LIMERES MA, PIZARRO A, SUAREZ A, PASTRANA F, CANO A AND CALERO F (1996) Expression of E-cadherin in

230 infiltrating ductal breast carcinoma: relationship to clinicopathological features.
Int J Oncol 9, 1207-1212

GOMM JJ, SMITH J, RYALL GK, BAILLIE R, TURNBULL L AND COOMBES RC (1991) Localization of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor b1 in the human mammary gland. *Cancer Res* 51, 4685-4692.

GRANT DS, KLEINMAN HK, GOLDBERG ID, BHARGAVA MM, NICKOLOFF BJ, KINSELLA JL, POLVERINI P AND ROSEN EM (1993) Scatter factor induces blood vessels formation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1937-1941

GRASSE P-P (1969) Mammelles. *In: Traité de zoologie* (Masson et Cie, eds) Tome XVI, Fascicule VI, 1-147

GREEN H AND MEUTH (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3, 127-133

HAMADA J, NAGAYASU H, TAKAYAMA M, KAWANO T, HOSOKAWA M AND TAKEICHI N (1995) Enhanced effects of epidermal growth factor on pulmonary metastasis and *in vitro* invasion of rat mammary carcinoma cells. *Cancer Lett* 89, 161-167

HARIGAYA T, YOKOYAMA H, TSUNODA S AND NAGASAWA H (1994) Immunohistochemical localization of transforming growth factor α in mouse mammary glands and mammary tumors. *Acta Histochem Cytochem* 3, 279-282.

HASLAM SZ (1986) Mammary fibroblast influence on normal mouse mammary epithelial cell responses to estrogen *in vitro*. *Cancer Res* 45, 310-316

HASLAM SZ AND NUMMY KA (1992) The ontogeny and cellular distribution of estrogen receptors in normal mouse mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42, 589-595

HASLAM SZ AND SHYAMALA G (1979) Effect of oestradiol on progesterone receptors in normal mammary gland and its relationship to lactation. *Biochem J* 182, 127-131

HASLAM SZ AND SHYAMALA G (1980) Progesterone receptors in normal mammary gland: receptor modulation in relation to differentiation. *J Cell Biol* 86, 730-737

HASLAM SZ AND SHYAMALA G (1981) Relative distribution of estrogen and progesterone receptors among epithelial, adipose and connective tissues of normal mammary gland. *Endocrinology* 108, 825-830

- HEUBERGER B, FITZKA I, WASNER G AND KRATOCHWIL K (1982) Induction of androgen receptor formation by epithelial-mesenchymal interaction in embryonic mouse mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 2957-2961
- HIMELSTEIN BP AND MUSCHEL RJ (1996) Induction of matrix metalloproteinase 9 expression in breast carcinoma cells by a soluble factor from fibroblasts. *Clin Exp Metastasis* 14, 197-208
- HOLST-HANSEN C, JOHANNESSEN B, HOYER-HANSEN G, ROMER J, ELLIS V AND BRUNNER N (1996) Urokinase-type plasminogen activation in three human breast cancer cell lines correlates with their *in vitro* invasiveness. *Clin Exp Metastasis* 14 (3), 297-307
- IMAGAWA W, YANG J, GUZMAN R AND NANDI S (1994) Control of mammary gland development. In: *The Physiology of Reproduction, Second Edition* (Knobil E and Neill J D, eds.) Raven Press, Ltd., New York, 1033-1063
- ITO A, NAKAJIMA S, SASAGURI Y, NAGASE H AND MORI Y (1995 a) Co-culture of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells and human dermal fibroblasts enhances the production of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3 in fibroblasts. *Br J Cancer* 71, 1039-1045
- ITO KI, RYUTO M, USHIRO S, ONO M, SUGENOYA A, KURAOKA A, SHIBATA Y AND KUWANO M (1995 b) Expression of tissue-type plasminogen activator and its inhibitor couples with development of capillary network by human microvascular endothelial cells on matrigel. *J Cell Physiol* 162, 213-224
- JACOBS LS (1977) The role of prolactin in mammogenesis and lactogenesis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology: Comparative Endocrinology of Prolactin* (Dellman HD, Johnson JA and Klachko DM, eds.) Plenum Press, New York, 80, 173-191
- JACQUEMIER J, ADELAIDE J, PARC P, PENAULT-LLORCA F, PLANCHE J, DELAPEYRIERE O AND BIRNBAUM D (1994) Expression of the *FGFR1* gene in human breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 59, 373-378
- JÄNICKE F, THOMSEN C, PACHE L, SCHMITT M AND GRAEFF H (1994) Urokinase (uPA) and PAI-1 as selection criteria for adjuvant chemotherapy in axillary node-negative breast cancer patients. In: *Prospects in diagnosis and treatment of breast cancer* (Schmitt M et al., eds) Elsevier Science B.V., 207-218

- JANKUN J, KECK RW, SKRZYPCZAK-JANKUN E AND SWIERCZ R (1997) Inhibitors of urokinase reduce size of prostate cancer xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 57, 559-563
- JANKUN J, MERRICK HW AND GOLDBLATT PJ (1993) Expression and localization of elements of the plasminogen activation system in benign breast disease and breast cancers. *J Cell Bioch* 53, 135-144
- JENG MH, TEN DIJKE P, IWATA KK AND JORDAN VC (1993) Regulation of the levels of three transforming growth factor beta mRNAs by estrogen and their effects on the proliferation of human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 97, 115-123
- JENSEN PJ AND LAVKER RM (1996) Modulation of the plasminogen activator cascade during enhanced epidermal proliferation in vivo. *Cell Growth Diff* 7, 1793-1804
- JIANG WG, PUNTIS MCA AND HALLETT MB (1994) Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis: implications for treatment. *Br J Surg* 81, 1576-1590
- JUDWARE R AND CULP LA (1997) Extracellular matrix and matrix receptors: alterations during tumor progression. *Encyclopedia of cancer* 1, 660-679
- KEELY PJ, WU JE AND SANTORO SA (1995) The spatial and temporal expression of the $\alpha 2\beta 1$ integrin and its ligands, collagen I, collagen IV and laminin, suggest important roles in mouse mammary morphogenesis. *Differentiation* 59, 1-13
- KENAGY RD, VERGEL S, MATTSSON E, BENDECK M, REIDY MA AND CLOWES AW (1996) The role of plasminogen, plasminogen activators, and matrix metalloproteinases in primate arterial smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 1373-1382
- KEPPLER D, ABRAHAMSON M AND SORDAT B (1994) Proteases and cancer: secretion of cathepsin B and tumour invasion. *Biochemical Society Transaction* 22, 43-68
- KIM ND, OBERLEY TD AND CLIFTON KH (1993) Primary culture of flow cytometry-sorted rat mammary epithelial cell (RMEC) subpopulations in a reconstituted basement membrane, Matrigel. *Exp Cell Res* 209, 6-20
- KLEINBERG DL, RUAN W, CATANESE V, NEWMAN CB AND FELDMAN M (1990) Non-lactogenic effects of growth hormone on growth and insulin-like

growth factor-I messenger ribonucleid acid of rat mammary gland. *Endocrinology* 126, 3274-3276

KLINOWSKA TCM, BROOMHEAD G AND STREULI CH (1996) Requirement for β 1 integrins in the development of mouse mammary gland. *Biochemical Society Transactions* 24, 349S

KNABBE C, LIPPMAN ME, WAKEFIELD LM, FLANDERS KC, KASID A, DERYNCK R AND DICKSON RB (1987) Evidence that transforming growth factor- β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* 48, 417-428

KNABBE C, ZUGMAIER G, DICKSON RB AND LIPPMAN ME (1988) Transforming growth factor β and other growth inhibitory polypeptides in human breast cancer. *Progress in Cancer Research and Therapy* 35, 234-237

KNIGHT CH AND PEAKER M (1982) Development of the mammary gland. *J Reprod Fertil* 65, 521-536

LEE CS AND OKA T (1992) Progesterone regulation of a pregnancy-specific transcription repressor to beta-casein gene promoter in mouse mammary gland. *Endocrinology* 131, 2257-2262

LEFEBVRE MF, GUILLOT C, CREPIN M AND SAEZ S (1995) Influence of tumor derived fibroblasts and 1,25-dihydroxyvitaminin D₃ on growth of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 33, 189-197

LENGYEL E, GUM R, JUAREZ J, CLAYMAN G, SEIKI M, SATO H AND BOYD D (1995) Induction of Mr 92,000 type IV collagenase expression in a squamous cell carcinoma cell line by fibroblasts. *Cancer Res* 55, 963-967

LI X, NAGAYASU H, HAMADA JI, HOSOKAWA M AND TAKEICHI N (1993) Enhancement of tumorigenicity and invasion capacity of rat mammary adenocarcinoma cells by epidermal growth factor and transforming growth factor- β . *Jpn Cancer Res* 84, 1145-1149.

LI Y, BHARGAVA MM, JOSEPH A, JIN L, ROSEN EM AND GOLDBERG ID (1994) Effects of hepatocyte growth factor/scatter factor and other growth factors on motility and morphology of non-tumorigenic and tumor cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 30A, 105-110

LI S AND SHIPLEY GD (1991) Expression of multiple species of basic fibroblast growth factor mRNA and protein in normal and tumor-derived mammary epithelila cells in culture. *Cell Growth Different* 2, 195-202

- LIDEREAU R, CALLAHAN R, DICKSON C, PETERS G, ESCOT C AND ALI IU (1988) Amplification of the int-2 gene in primary human breast tumors. *Oncogene Res* 2, 285-291
- LISCIA DS, MERLO G, CIARDIELLO F, KIM N, SMITH GH, CALLAHAN R AND SALOMON D (1990) Transforming growth factor- α messenger RNA localization in the developing adult rat and human mammary gland by *in situ* hybridization. *Dev Biol* 140, 123-131
- LONG BJ AND ROSE DP (1996) Invasive capacity and regulation of urokinase-type plasminogen activator in estrogen receptor (ER)-negative MDA-MB-231 human breast cancer cells, and a transfectant (S30) stably expressing ER. *Cancer Lett* 99, 209-215
- LUQMANI YA, GRAHAM M AND COOMBES RC (1992) Expression of basic fibroblast growth factor, FGFR-1 and FGFR-2 in normal and malignant human breast and comparison with other normal tissues. *Br J Cancer* 66, 273-280
- MACHOTKA SV, GARETT CT, SCWARTZ AM AND CALLAHAN R (1989) Amplification of the proto-oncogenes *int-2*, *c-erb B-2* and *c-myc* in human breast cancer. *Clinica Chimica Acta* 184, 207-218
- MAKSIMENKO AV (1995) Molecular interactions during fibrinolysis. Search for new plasminogen activators. *Mol Biol (Mosk)* 29, 38-60
- MAROTTI KR, BELIN D AND STRICKLAND S (1982) The production of distinct forms of plasminogen activator by mouse embryonic cells. *Dev Biol* 90, 154-159
- MARS WM, ZARNEGAR R AND MICHALOPOULOS GK (1993) Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 143, 949-958
- MATRISIAN LM AND HOGAN BLM (1990) Growth factor-regulated proteases and extracellular matrix remodeling during mammalian development. *Curr Top Dev Biol* 24, 219-259
- MATSUMOTO K AND NAKAMURA T (1992) Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration and other biological functions. *Crit Rev Oncog* 3, 27-54
- Mc CALLUM J, BARTLETT JMS, THOMPSON AM, KEEN JC, DIXON JM AND MILLER WR (1994) Expression of transforming growth factor beta mRNA isoforms in human breast cancer. *Br J Cancer* 69, 1006-1009

- Mc LESKEY SW, DING IYF, LIPPMAN ME AND KERN FG (1994) MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands. *Cancer Res* 54, 523-530
- MICHAUD M AND POYET P (1994) Control of the expression of thrombospondin 1 in human breast cancer cell lines. *Anticancer Res* 14, 1127-1132
- MIGNATTI P AND RIFKIN DB (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiological Rev* 73, 161-195
- MIYAGI E, YASUMITSU H, HIRAHARA F, NAGASHIMA Y, MINAGUCHI H, MIYASAKI K AND UMEDA M (1995) Marked induction of gelatinases, especially type B, in host fibroblasts by human ovarian cancer cells in athymic mice. *Clin Exp Metastasis* 13, 89-96
- MIYASAKA M (1995) Cancer metastasis and adhesion. *Clinical Orthopaedics* 312, 10-18
- MIZUKAMI Y, NONOMURA A, YAMADA T, KURUMAYA H, HAYASHI M, KOYASAKI N, TANIYA T, NOGUCHI M, NAKAMURA S AND MATSUBARA F (1990) Immunohistochemical demonstration of growth factors, TGF- α , TGF- β , IGF-1 and neu oncogene product in benign and malignant human breast tissues. *Anticancer Res* 10, 1115-1126
- MODJTAHEDI H, STYLES JM AND DEAN CJ (1993) The human EGF receptor as a target for cancer therapy ; six new rat mAbs against the receptor on the breast carcinoma MDA-MB 468. *Br J Cancer* 67, 247-253
- MOLL R, MITZE M, FRIXEN UH AND BIRCHMEIER W (1993) Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Pathol* 143, 1731-1742
- MONTESANO R, MATSUMOTO K, NAKAMURA T AND ORCI L (1991b) Identification of a fibroblast derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 67, 901-908
- MONTESANO R, SCHALLER G AND ORCI L (1991a) Induction of epithelial tubular morphogenesis *in vitro* by fibroblast-derived soluble factors. *Cell* 66, 697-71
- MONTESANO R, VASALLI JD, BAIRD A, GUILLEMIN R AND ORCI L (1986) Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 7297-7301

- NAGY J, CURRY GW, HILLAN KJ, MCKAY IC, MALLON E, PURUSHOTHAM AD AND GEORGE WD (1996) Hepatocyte growth factor/scatter factor expression and c-met in primary breast cancer. *Surg Oncol* 5, 15-21
- NAITOH H, EGUCHI Y, UEYAMA H, KODAMA M AND HATTORI T (1995) Localization of urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1,2 and plasminogen in colon cancer. *Jpn J Cancer Res* 86, 48-56
- NALDINI L, TAMAGNONE L, VIGNA E, SACHS M, HARTMANN G, BIRCHMEIER W, DAIKUHARA Y, TSUBOUCHI H, BLASI F AND COMOGLIO PM (1992) Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *The EMBO Journal* 11, 4825-4833
- NALDINI L, VIGNA E, NARSIMHAM RP, GAUDINO G, ZARNEGAR R, MICHALOPOULOS GK AND COMOGLIO PM (1991) Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6, 501-504
- NIRANJAN B, BULUWELA L, YANT J, PERUSINGHE N, ATHERTON A, PHIPPARD D, DALE T, GUSTERSON B AND KAMALATI T (1995) HGF/SF: a potent cytokine for mammary growth, morphogenesis and development. *Development* 121, 2897-2908
- NOËL A, DE PAUW-GILLET MC, PURNELL G, NUSGENS B, LAPIERE CM AND FOIDART JM (1993 a) Enhancement of tumorigenicity of human breast adenocarcinoma cells in nude mice by matrigel and fibroblasts. *Br J Cancer* 68, 909-915
- NOËL A, MUNAUT C, NUSGENS B, LAPIERE CM AND FOIDART JM (1993 b) Different Mechanisms of extracellular matrix remodeling by fibroblasts in response to human mammary neoplastic cells. *Invasion Metastasis* 13, 72-81
- OKAMOTO S AND OKA T (1984) Evidence for physiological function of epidermal growth factor: pregestational sialoadenectomy decreases milk production and increases offspring mortality during lactation period. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, 6059-6063
- ORMEROD EJ AND RUDLAND PS (1982) Mammary gland morphogenesis *in vitro*: formation of branched tubules in collagen gels by a cloned rat mammary cell line. *Dev Biol* 91, 360-375

- ORR-URTREGER A, BEDFORD MT, BURAKOVA T, ARMAN E, ZIMMER Y, YAYON A, GIVOL D AND LONAI P (1993) Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol* 158, 475-486
- OSSOWSKI L, BIEGEL D AND REICH E (1979) Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. *Cell* 16, 929-940
- PECHOUX C, CLEZARDIN P, DANTE R, SERRE CM, CLERGET M, BERTIN N, LAWLER J, DELMAS PD, VAUZELLE JL AND FRAPPART L (1994) Localization of thrombospondin, CD36 and CD51 during prenatal development of the human mammary gland. *Differentiation* 57, 133-141
- PEPPER MS, MATSUMUTO K, NAKAMURA T, ORCI L AND MONTESANO R (1992 a) Hepatocyte growth factor increases urokinase-type plasminogen activator (u-PA) and u-PA receptor expression in madin-darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 267, 20493-20496
- PEPPER MS, MONTESANO R, ORCI L AND VASSALLI JD (1991) Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in microvascular endothelial cells by a chondrocyte-derived transforming growth factor-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 176, 633-638
- PEPPER MS, SAPPINO AP, MONTESANO R, ORCI L AND VASSALLI JD (1992 b) Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 153, 129-139
- PEPPER MS, SORIANO JV, MENOUD PA, SAPPINO AP, ORCI L AND MONTESANO R (1995) Modulation of hepatocyte growth factor and *c-met* in the rat mammary gland during pregnancy, lactation and involution. *Exp Cell Res* 219, 204-210
- PEPPER MS, VASSALLI JD, MONTESANO R AND ORCI L (1987) Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 105, 2535-2541
- PETERSEN OW, JESSEN LR, HOWLETT AR AND BISSELL MJ (1992) Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 9064-9068

- PEYRAT JP, BONNETERRE J, VENNIN PH, JAMMES H, BEUSCART R, HECQUET B, DIJANE J, LEFEBVRE J AND DEMAILLE A (1990) Insulin-like growth factor 1 receptors (IGF1-R) and IGF1 in human breast tumors. *J Steroid Biochem Molec Biol* 37, 823-827
- PEYRAT JP, HONDERMARCK H, LOUCHEZ MM AND BOILLY B (1991) Demonstration of basic fibroblast growth factor high and low affinity binding sites in human breast cancer cell lines. *Cancer communi* 3, 323-329
- PLAUT K, IKEDA M AND VONDERHAAR BK (1993) Role of growth hormone and insulin-like growth factor-I in mammary development. *Endocrinology* 133, 1843-1848
- PLOW EF, HERREN T, REDLITZ A, MILES LA AND HOOVER-PLOW JL (1995) The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J* 9, 939-945
- POURREAU-SCHNEIDER N, DELORI P, BOUTIERE B, ARNOUX D, GEORGE F, SAMPOL J AND MARTIN PM (1989) Modulation of plasminogen activator systems by matrix components in two breast cancer cell lines: MCF-7 and MDA-MB-231. *J Natl Cancer Inst* 81, 259-266
- PROPPER A (1972) Rôle du mésenchyme dans la différenciation de la glande mammaire chez l'embryon de lapin. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 97/3, 505-512
- PYKE C, GRAEM N, RALFKIAER E, RONNE E, HOYER-HANSEN G, BRÜNNER N AND DANO K (1993) Receptor for urokinase is present in tumor-associated macrophages in ductal breast carcinoma. *Cancer Res* 53, 1911-1915
- RAHIMI R, SAULNIER R, NAKAMURA T, PARK M AND ELLIOTT B (1994) Role of Hepatocyte growth factor in breast cancer: a novel mitogenic factor secreted by adipocytes. *DNA Cell Biol* 13, 1189-1197
- RAY JM AND STETLER-STEVENSON WG (1994) The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumor invasion, metastases and angiogenesis. *Eur. Respir. J* 7, 2062-2072
- RAYNAUD A AND FRILLEY M (1947) Etat de développement des ébauches mammaires et du cordon vaginal chez les foetus mâles et femelles de souris, dont les ébauches des glandes génitales ont été détruites par une irradiation au moyen des rayons X, à l'âge de treize jours. *C R Acad Sci* 225, 1380-1382
- REINARTZ J, BATRLA R, BOUKAMP P, FUSENIG N AND KRAMER MD (1993) Binding and activation of plasminogen at the surface of human keratinocytes. *Exp Cell Res* 208, 197-208

- RENAUD F, EL YAZIDI I, BOILLY-MARER Y, COURTOIS Y AND LAURENT M (1996) Expression and regulation by serum of multiple FGF1 mRNA in normal, transformed and malignant human mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 219, 679-685
- RICHARDS J, PASCO D, YANG J, GUZMAN R AND NANDI S (1983) Comparison of the growth of normal and neoplastic mouse mammary cells on plastic, on collagen gels and in collagen gels. *Exp Cell Res* 146, 1-14
- RILLEMA JA (1994) Development of the mammary gland and lactation. *TEM* 4, 149-154
- ROBINSON SD, SILBERSTEIN GB, ROBERTS AB, FLANDERS KC AND DANIEL CW (1991) Regulated expression and growth inhibitory effects of transforming growth factor- β isoforms in mouse mammary gland development. *Development* 113, 867-878
- ROSEN EM, JOSEPH A, JIN L, ROCKWELL S, ELIAS JA, KNESEL J, WINES J, MCCLELLAN J, KLUGER MJ, GOLBERG ID AND ZITNIK R (1994 a) Regulation of scatter factor production via a soluble inducing factor. *J Cell Biol* 127, 225-234
- ROSEN EM, KNESEL J, GOLDBERG ID, JIN L, BHARGAVA M, JOSEPH A, ZITNIK R, WINES J, KELLEY M AND ROCKWELL S (1994 b) Scatter factor modulates the metastatic phenotype of the EMT6 mouse mammary tumor. *Int J Cancer* 57, 706-714
- RUAN W, NEWMAN CB AND KLEINBERG DL (1992) Intact and amino-terminally shortened forms of insulin-like growth factor I induce mammary gland differentiation and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10872-10876
- RUDLAND PS, PLATT-HIGGINS AM, WILKINSON MC AND FERNIG DG (1993) Immunocytochemical identification of basic fibroblast growth factor in the developing rat mammary gland: variations in location are dependent on glandular structure and differentiation. *J Histochem Cytochem* 41, 887-898
- RUSNATI M, DELL'ERA P, URBINATI C, TANGHETTI E, MASSARDI ML, NAGAMINE Y, MONTI E AND PRESTA M (1996) A distinct basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGF receptor interaction distinguishes urokinase-type plasminogen activator induction from mitogenicity in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 7, 369-381

- RYAN MC, ORR DJA AND HORGAN K (1993) Fibroblast stimulation of breast cancer cell growth in a serum-free system. *Br J Cancer* 67, 1268-1273
- SAKAKURA T (1991) New aspects of stroma-parenchyma relations in mammary gland differentiation. *Int Rev Cytol* 125, 165-202
- SAKAKURA T, NISHIZUKA Y AND DAWE CJ (1976) Mesenchyme-dependent morphogenesis and epithelium-specific cytodifferentiation in mouse mammary gland. *Science* 194, 1439-1441
- SANTOS OFP AND NIGAM SK (1993) HGF-induced tubulogenesis and branching of epithelial cells is modulated by extracellular matrix and TGF- β . *Dev Biol* 160, 298-302
- SASAKI M, NISHIO M, SASAKI T AND ENAMI J (1994) Identification of mouse mammary fibroblast-derived mammary growth factor as hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 772-779
- SATO Y AND RIFKIN DB (1988) Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J Cell Biol* 107, 1199-1205
- SEEDS NW, FRIEDMAN G, HAYDEN S, THEWKE D, HAFFKE S, MCGUIRE P AND KRYSIOSEK A (1996) Plasminogen activators and their interaction with the extracellular matrix in neural development, plasticity and regeneration. *Seminars in the Neurosciences* 8, 405-4112
- SEGAIN JP, HARB J, GREGOIRE M, MEFLAH K AND MENANTEAU J (1996) Induction of fibroblast gelatinase B Expression by direct contact with cell lines derived from primary tumor but not from metastasis. *Cancer Research* 56, 5506-5512
- SESLAR SP, NAKAMURA T AND BYERS SW (1993) Regulation of fibroblast hepatocyte growth factor/scatter factor expression by human breast carcinoma cell lines and peptide growth factors. *Cancer Res* 53, 1233-1238
- SESLAR SP, NAKAMURA T AND BYERS SW (1995) Tumor-stroma interactions and stromal cell density regulate hepatocyte growth factor protein levels: a role for transforming growth factor-beta activation. *Endocrinology* 136, 1945-1953
- SHIBAMOTO S, HAYAKAWA M, HORI T, OKU N, MIYAZAWA K, KITAMURA N AND ITO F (1992) Hepatocyte growth factor and transforming growth factor- β stimulate both cell growth and migration of human gastric adenocarcinoma cells. *Cell Structure and Function* 17, 185-190

- SHYAMALA G AND FERENCZY A (1984) Mammary fat pad may be a potential site for initiation of estrogen action in normal mouse mammary glands. *Endocrinology* 110, 1078-1081
- SILBERSTEIN GB AND DANIEL CW (1987) Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor- β . *Science* 237, 291-293
- SILBERSTEIN GB, FLANDERS KC, ROBERTS AB AND DANIEL CW (1992) Regulation of mammary morphogenesis: evidence for extracellular matrix-mediated inhibition of ductal budding by transforming growth factor-beta 1. *Dev Biol* 152, 354-362
- SILBERSTEIN GB, STRICKLAND P, COLEMAN S AND DANIEL CW (1990) Epithelium-dependent extracellular matrix synthesis in transforming factor- β 1-growth-inhibited mouse mammary gland. *J Cell Biol* 110, 2209-2219
- SNEDEKER SM, BROWN CF AND DI AUGUSTINE RP (1991) Expression and functional properties of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor during mouse mammary gland ductal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 276-280
- SOMMERS CL, BYERS SW, THOMPSON EW, TORRI JA AND GELMANN EP (1994) Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 31, 325-335
- SONNENBERG E, MEYER D, WEIDNER KM AND BIRCHMEIER C (1993) Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and its epithelia during mouse development. *J Cell Biol* 123, 223-235
- SORIANO JV, PEPPER MS, NAKAMURA T, ORCI L AND MONTESANO R (1995) Hepatocyte growth factor stimulates extensive development of branching duct-like structures by cloned mammary gland epithelial cells. *J Cell Sci* 108, 413-430
- STAHL S, WEITZMAN S AND JONES JCR (1997) The role of laminin-5 and its receptors in mammary epithelial cell branching morphogenesis. *J Cell Sci* 110, 55-63
- STETLER-STEVENSON WG, AZNAVOORIAN S AND LIOTTA LA (1993 a) Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9, 541-573

- STETLER-STEVENSON WG, LIOTTA LA AND KLEINER DE (1993 b) Role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 7, 1434-1441
- SUDLOW AW, WILDE CJ AND BURGOYNE RD (1994) Transforming growth factor- β 1 inhibits casein secretion from differentiating mammary-gland explants but not from lactating mammary cells. *Biochem J* 304, 333-336
- SUN L, WU G, WILLSON JKV, ZBOROWSKA E, YANG J, RAJKARUNANAYAKE I, WANG J, GENTRY LE, WANG X AND BRATTAIN MG (1994) Expression of transforming growth factor β type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem* 269, 26449-26455
- SYMPSON CJ, TALHOUK RS, ALEXANDER CM, CHIN JR, CLIFT SM, BISSELL MJ AND WERB Z (1994) Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression. *J Cell Biol* 125, 681-693
- TAJIMA H, MATSUMOTO K AND NAKAMURA T (1992) Regulation of cell growth and motility by hepatocyte growth factor and receptor expression in various cell species. *Exp Cell Res* 202, 423-431
- TAKAHASHI K, SUZUKI K, KAWAHARA S AND ONO T (1989) Growth stimulation of human breast epithelial cells by basic fibroblast growth factor in serum-free medium. *Int J Cancer* 43, 870-874
- TAKEICHI M (1993) Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr opin cell biol* 5, 806-811
- TALHOUK RS, BISSELL MJ AND WERB Z (1992) Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial functions during involution. *J Cell Biol* 118, 1271-1282
- TALHOUK RS, CHIN JR, UNEMORI EN, WERB Z AND BISSELL MJ (1991) Proteinases of the mammary gland: developmental regulation *in vivo* and vectorial secretion in culture. *Development* 112, 439-449
- TALWALKER PK AND MEITES J (1961) Mammary lobulo-alveolar growth induced by anterior pituitary hormones in adreno-ovariectomized and adreno-ovariectomized-hypophysectomized rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 107, 880-883

- THEILLET C, LE ROY X, DE LAPIEYRIERE O, GROSGEORGES J, ADNANE J, RAYNAUD SD, SIMONY-LAFONTAINE J, GOLDFAB M, ESCOT C, BIRNBAUM D AND GAUDRAY P (1989) Amplification of FGF related genes in human tumors: possible involvement of HST in breast carcinomas. *Oncogene* 4, 915-922
- TKACHUK V, STEPANOVA V, LITTLE, PJ AND BOBIK A (1996) Regulation and role of urokinase plasminogen activator in vascular remodelling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23, 759-765
- TOI M, HAMADA Y, NAKAMURA T, MUKAIDA H, SUEHIRO S, WADA T, TOGE T, NIMOTO M AND HATTORI T (1989) Immunocytochemical and biochemical analysis of epidermal growth factor receptor expression in human breast cancer tissues: relationship to estrogen receptor and lymphatic invasion. *Int J Cancer* 43, 220-225
- TSARFATY I, RESAU JH, RULONG S, KEYDAR I, DONNA L, FALETTO DL AND VANDE WOUDE GF (1992) The *met* proto-oncogene receptor and lumen formation. *Science* 257, 1258-1261
- TSUTSUMI Y, NABER SP, DELELLIS RA, WOLFE HJ, MARKS PJ, MCKENZIE SJ AND YIN S (1990) neu oncogene protein and epidermal growth factor receptor are independently expressed in benign and malignant breast tissues. *Human pathology* 21, 750-757
- ULICH TR, YI ES, CARDIFF R, YIN S, BIKHAZI N, BILTZ R, MORRIS CF AND PIERCE GF (1994) Keratinocyte growth factor is a growth factor for mammary epithelium *in vivo*. The mammary epithelium of lactating rats is resistant to the proliferative action of keratinocyte growth factor. *Am J Pathol* 5, 862-868
- VAN DER BURG MEL, HENZEN-LOGMANS SC, BERNS EMJJ, VAN PUTTEN WLJ, KLIJN JGM AND FOEKENS JA (1996) Expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in benign, borderline, malignant primary and metastatic ovarian tumors. *Int J Cancer* 69, 475-479
- VAN ROOZENDAAL KEP, KLIJN JGM, VAN OOIJEN B, CLAASSEN C, EGGERMONT AMM, HENZEN-LOGMANS SC AND FOEKENS JA (1996) Differential regulation of breast tumor cell proliferation by stromal fibroblasts of various breast tissue sources. *Int J Cancer* 65, 120-125
- VONDERHAAR BK (1987) Local effects of EGF, α -TGF and EGF-like growth factors on lobuloalveolar development of the mouse mammary gland *in vivo*. *J Cell Physiol* 132, 581-584

- WALKER RA, DEARING SJ AND GALLGHER B (1994) Relationship of transforming growth factor- β to extracellular matrix and stromal infiltrates in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 69, 1160-1165
- WANG Y, SELDEN AC, MORGAN N, STAMP G AND HODGSON HJF (1994) Hepatocyte growth factor expression in human mammary epithelium. *Am J Pathol* 144, 675-682
- WARBURTON MJ, DUNDAS SR, GUSTERSON BA AND O'HARE M (1996) Regulation of urokinase-type plasminogen activator production by rat mammary myoepithelial cells. *Exp Cell Res* 228, 76-83
- WEIDNER KM, SACHS M AND BIRCHMEIER W (1993) The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation and morphogenetic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol* 121, 145-154
- WERNERT N, GILLES F, FAFEUR V, BOUALI F, RAES MB, PYKE C, DUPRESSOIR T, SEITZ G, VANDENBUNDER B AND STEHELIN D (1994) Stromal expression of c-ETS 1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Research* 54, 5683-5688
- WIJNBERG MJ, NIEUWENBROEK NME, SLOMP J, QUAX PHA AND VERHEIJEN JH (1996) Urokinase and tissue-type plasminogen activator stimulate human vascular smooth muscle cell migration. *Fibrinolysis* 10 suppl 2, 75-78
- WILSON SE, WENG J, CHWANG EL, GOLLAHON L, LEITCH AM AND SHAY JW (1994) Hepatocyte growth factor (HGF), keratinocyte growth factor (KGF), and their receptors in human breast cells and tissues: alternative receptors. *Cell Mol Biol Res* 40, 337-350
- WOLF C, LEFEBVRE O, ROUYER N, CHERNARD MP, BELLOCQ JP, RIO MC, CHAMBON P AND BASSET P (1994) Protéases d'origine stromale et progression tumorale. *M/S* 10, 507-515
- WOTJA J, NAKAMURA T, FABRY A, HUFNAGI P, BECKMANN R, MCGRATH K AND BINDER B (1994) Hepatocyte growth factor stimulates expression of plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue factor in HepG2 cells. *Blood* 84, 151-157
- YAMAGUCHI T, KAWAMOTO K, UCHIDA N, UCHIDA K AND WATANABE S (1992) Three cell lines showing androgen-dependent, independent and suppressed phenotypes, established from a single tumor of androgen dependent shionogi carcinoma 115. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A, 245-254

- YAMAMOTO T, KOMURA H, MORISHIGE K, TADOKORO C, SAKATA M, KURACHI H AND MIYAKE A (1994) Involvement of autocrine mechanism of transforming growth factor- β in the functional differentiation of pregnant mouse mammary gland. *Eur J Endocrinol* 130, 302-307
- YAMASHITA JI, INADA K AND OGAWA M (1992) Plasminogen activators in breast cancer cells (Review). *Int J Oncology* 1, 683-686
- YAMASHITA JI, OGAWA M, YAMASHITA S, NOMURA K, KURAMOTO M, SAISHOJI T AND SHIN S (1994) Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast. *Cancer Res* 54, 1630-1633
- YANG Y, SPITZER E, MEYER D, SACHS M, NIEMANN C, HARTMANN G, WEIDNER KM, BIRCHMEIER C AND BIRCHMEIER W (1995) Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *J Cell Biol* 131/1, 215-226
- YEE D, JACKSON JG, KOZELSKY TW AND FIGUEROA JA (1994) Insulin-like growth factor binding protein 1 expression inhibits insulin-like growth factor I action in MCF-7 breast cancer cells. *Cell Growth Diff* 5, 73-77
- YI ES, BEDOYA AA, LEE H, KIM S, HOUSLEY RM, AUKERMAN SL, TARPLEY JE, STARNES C, YIN S, PIERCE GF AND Ulich TR (1994) Keratinocyte growth factor causes cystic dilation of the mammary glands of mice. Interactions of keratinocyte growth factor, estrogen, and progesterone in vivo. *Am J Pathol* 145, 1015-1022
- ZUTTER MM, KRIGMAN HR AND SANTORO SA (1993) Altered integrin expression in adenocarcinoma of the breast-analysis by in situ hybridization. *Am J Pathol* 142, 1439-1448

