

Université du Québec  
Institut national de la recherche scientifique  
Institut Armand-Frappier  
Laval, Québec

**CONCEPTION D'UN MODÈLE DE CO-CULTURE DE CELLULES  
LUMINALES ÉPITHÉLIALES MCF-12A ET DE CELLULES  
MYOÉPITHÉLIALES HS 578BST REPRÉSENTATIF D'UN ACINUS DE  
LA GLANDE MAMMAIRE *IN VITRO***

**Anne Weber-Ouellette**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
*Maître ès sciences (M.Sc)*  
Avril 2018

**Jury d'évaluation**

|                                                       |                                                                                                        |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Présidente du jury et<br/>examinatrice interne</b> | Dre Cathy Vaillancourt<br>INRS – Institut Armand-Frappier                                              |
| <b>Examinatrice externe</b>                           | Dre Nathalie Perreault<br>Département d'anatomie et<br>biologie cellulaire<br>Université de Sherbrooke |
| <b>Directrice de recherche</b>                        | Dre Isabelle Plante<br>INRS – Institut Armand-Frappier                                                 |





## RÉSUMÉ

La glande mammaire est composée d'un épithélium bicouche ramifié qui consiste en une couche interne de cellules luminales polarisées, bordées par une couche externe de cellules basales, principalement des cellules myoépithéliales. L'épithélium est séparé du stroma de la glande mammaire par une membrane basale. Tout au long du développement de l'épithélium, la prolifération et la différenciation requièrent une étroite régulation entre ces deux couches par l'intermédiaire des jonction intercellulaires. L'étude de ces interactions *in vitro* nécessite la conception d'un modèle tridimensionnel (3D) hétérotypique de la glande mammaire. L'objectif de cette étude était de concevoir un modèle reproductible et physiologiquement pertinent de l'unité fonctionnel, l'acinus bicouche, de glande mammaire *in vitro* 3D. Nos résultats proviennent de la co-culture, pendant quatorze jours, des lignées cellulaires luminales MCF-12A et myoépithéliales Hs 578Bst non-tumorigéniques dans le Matrigel® – un extrait de membrane basale riche en laminine. Différentes conditions de culture ont été essayées, dont le ratio cellulaire, la concentration du Matrigel® et le milieu de culture. Ces acini bicouches ont été caractérisés par microscopie confocale à l'aide de marqueurs épithéliaux et myoépithéliaux et par cryosection. Nos résultats démontrent qu'il est possible de reproduire des acini bicouches *in vitro*. Ces acini *in vitro* permettront de comprendre le rôle des interactions intercellulaires dans le développement normal de la glande mammaire. De plus, ils révéleront comment leur perturbation peut induire un phénotype cancéreux.

*Mots clés : glande mammaire; co-culture; Matrigel; MCF-12A; Hs 578Bst; acinus bicouche; jonctions*

## REMERCIEMENTS

En premier, je souhaite remercier tout d'abord ma directrice de recherche, Dre Isabelle Plante, pour la confiance manifestée envers moi et pour son soutien continu. Tu m'as accueillie dans ton laboratoire en tant que stagiaire et tu m'as motivée à poursuivre des études supérieures en recherche, car tu as cru en mon potentiel dès le début. Je te remercie sincèrement pour l'aide que tu m'as fournie tout au long de mon parcours de maîtrise. Ta disponibilité et ta critique constructive ont contribué à mon progrès personnel, professionnel et à mon désir de tenter de nouveaux défis. Ton écoute et ta complicité avec tous les membres du laboratoire contribuent à l'ambiance positive qui y règne. Je suis très reconnaissante pour tout le temps passé sous ta supervision et je te remercie, simplement, pour tout.

Mon expérience en recherche n'aurait pas été la même n'eut été de ma rencontre avec Elham Dianati, étudiante au doctorat. Dès mon arrivée au laboratoire, tu m'as aidée, conseillée et appuyée. Tes conseils ont contribué à mon autonomie et à ma rigueur en laboratoire. Je n'ai que du respect et de l'admiration pour ton éthique de travail et pour ta personne. Je n'aurais pu demander une meilleure mentore, compétente, motivée à transmettre ses connaissances aux autres.

Je ne veux pas manquer de souligner l'extraordinaire soutien de Martine Caplette, ancienne technicienne de laboratoire. Dès mon arrivée à la maîtrise, ta bonne humeur et ton incroyable gestion du laboratoire ont contribué à y être à l'aise. J'adresse un remerciement spécial à ma stagiaire Alicia Nouvel qui m'a offert une aide grandement appréciée, en fin de maîtrise, dans l'obtention des derniers résultats essentiels. J'aimerais remercier très sincèrement tous les membres de l'équipe du laboratoire, passés et présents, du laboratoire que j'ai eu le grand plaisir de côtoyer: Bélinda Crobeddu, Rita-Audrey Gouessé, Mélanie Busby, Alexandre Petit, Emanuelle Ferraris, Mélanie Lavoie et Élise Kolasa. Vous avez contribué à enrichir mon bagage de connaissances en sciences expérimentales. Grâce à vous, ma maîtrise fut une expérience enrichissante et fortement agréable. Je conserverai longtemps tous ces souvenirs de journées partagées avec vous en laboratoire. J'ai aussi eu le plaisir de bâtir des amitiés solides avec certains d'entre vous. Des amitiés qui, je l'espère, perdureront.

Enfin, il va sans dire que les encouragements de mon conjoint Philip, de mes parents Annette et François, de mon frère et de ma sœur Karl et Marie-Claire et ceux de mes grands-parents, Opa et Mamie, m'ont soutenue tout au long de mon cheminement scolaire. Merci de votre appui inébranlable et de vos nombreux mots réconfortants dans mes moments les plus difficiles.

Merci d'avoir cru en moi, d'avoir souligné mes réussites et de m'avoir incitée à viser les plus hauts sommets avec confiance.

# TABLE DES MATIÈRES

|                                                                                            |             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>LISTE DES FIGURES .....</b>                                                             | <b>VIII</b> |
| <b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>                                                            | <b>X</b>    |
| <b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....</b>                                                       | <b>XI</b>   |
| <b>CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>                                               | <b>1</b>    |
| <b>1.1 La glande mammaire .....</b>                                                        | <b>1</b>    |
| 1.1.1 Système canalo-lobulaire de l'épithélium .....                                       | 1           |
| 1.1.2 Cellules épithéliales luminales.....                                                 | 3           |
| 1.1.3 Cellules myoépithéliales .....                                                       | 4           |
| 1.1.3.1 Contraction .....                                                                  | 5           |
| 1.1.3.2 Induction de la polarité .....                                                     | 5           |
| 1.1.3.3 Régulation de la morphogenèse canalaire .....                                      | 7           |
| 1.1.3.4 Suppresseur de tumeur .....                                                        | 7           |
| 1.1.4 Composition et rôle de la membrane basale .....                                      | 8           |
| 1.1.5 Composition et rôle du stroma et de la matrice extracellulaire .....                 | 8           |
| 1.1.6.1 Réciprocité dynamique entre les cellules et la MEC du stroma et l'épithélium ..... | 9           |
| 1.1.7 Mammogenèse .....                                                                    | 10          |
| 1.1.7.1 Première étape .....                                                               | 11          |
| 1.1.7.2 Deuxième étape .....                                                               | 11          |
| 1.1.7.3 Troisième étape .....                                                              | 11          |
| <b>1.2 Le cancer .....</b>                                                                 | <b>12</b>   |
| 1.2.1 Les trois grandes étapes de la cancérogenèse .....                                   | 13          |
| 1.2.1.1 Initiation .....                                                                   | 13          |
| 1.2.1.2 Promotion .....                                                                    | 14          |
| 1.2.1.3 Progression .....                                                                  | 14          |
| 1.2.2 Cancer du sein .....                                                                 | 15          |
| 1.2.2.1 Statistiques du cancer du sein.....                                                | 15          |
| 1.2.2.2 Sous-types de cancers du sein .....                                                | 16          |
| 1.2.2.3 Stades du cancer du sein .....                                                     | 17          |
| 1.2.2.4 Grades du cancer du sein .....                                                     | 19          |
| 1.2.2.5 Rôle des jonctions dans la glande mammaire et la cancérogenèse .....               | 20          |
| <b>1.3 Les jonctions intercellulaires .....</b>                                            | <b>20</b>   |
| 1.3.1 Jonctions serrées .....                                                              | 20          |
| 1.3.2 Jonctions adhérentes .....                                                           | 22          |
| 1.3.3 Jonctions lacunaires .....                                                           | 24          |
| <b>1.4 Modèles d'études expérimentaux .....</b>                                            | <b>26</b>   |
| 1.4.1 Modèles <i>in vivo</i> .....                                                         | 26          |
| 1.4.2 Modèles <i>in vitro</i> .....                                                        | 26          |
| 1.4.2.1 Modèles <i>in vitro</i> en 2D .....                                                | 27          |
| 1.4.2.2 Modèles <i>in vitro</i> en 3D .....                                                | 27          |
| 1.4.2.3 Comparaison des modèles <i>in vitro</i> 2D et 3D .....                             | 28          |
| <b>1.5 Méthodes de culture des modèles <i>in vitro</i> en 3D .....</b>                     | <b>29</b>   |
| 1.5.1 Méthodes sans matrice .....                                                          | 29          |
| 1.5.1.1 Méthode de suspension forcée .....                                                 | 29          |
| 1.5.1.2 Méthode de la goutte suspendue .....                                               | 30          |
| 1.5.1.3 Approches par agitation.....                                                       | 30          |
| 1.5.2 Méthodes avec matrice .....                                                          | 31          |

|                                                                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.5.2.1 Matrices dérivées de matériaux biologiques .....                                                                                            | 31        |
| 1.5.2.2 Matrices composées de matériaux synthétiques.....                                                                                           | 33        |
| <b>1.6 Propriétés des modèles <i>in vitro</i> en 3D .....</b>                                                                                       | <b>34</b> |
| 1.6.1 Structure et composition cellulaire.....                                                                                                      | 34        |
| 1.6.2 Organisation spatiale des récepteurs et protéines jonctionnelles .....                                                                        | 35        |
| 1.6.3 Expression de fonctions spécifiques au tissu .....                                                                                            | 35        |
| 1.6.4 Morphologie cellulaire et processus cellulaires .....                                                                                         | 35        |
| 1.6.4.1 Prolifération .....                                                                                                                         | 36        |
| 1.6.4.2 Expression génique et réponse cellulaire.....                                                                                               | 36        |
| 1.6.5 Conclusion .....                                                                                                                              | 38        |
| <b>1.7 Modèle <i>in vitro</i> de la glande mammaire humaine normale .....</b>                                                                       | <b>38</b> |
| 1.7.2 Défis des modèles hétérotypiques <i>in vitro</i> en 3D .....                                                                                  | 40        |
| 1.7.2.1 Types cellulaires.....                                                                                                                      | 40        |
| 1.7.2.3 Méthode de culture <i>in vitro</i> en 3D.....                                                                                               | 41        |
| 1.7.2.4 Conditions physicochimiques du microenvironnement de culture.....                                                                           | 42        |
| 1.7.2.5 Rigidité du microenvironnement de culture .....                                                                                             | 45        |
| <b>1.8 Lignées cellulaires utilisées dans cette étude .....</b>                                                                                     | <b>45</b> |
| 1.8.1 Les cellules MCF-12A .....                                                                                                                    | 46        |
| 1.8.2 Les cellules Hs 578Bst .....                                                                                                                  | 46        |
| <b>1.9 Problématique .....</b>                                                                                                                      | <b>46</b> |
| <b>Rationnel et hypothèse de travail .....</b>                                                                                                      | <b>47</b> |
| <b>Objectifs .....</b>                                                                                                                              | <b>47</b> |
| <b>CHAPITRE 2: LUMINAL MCF-12A AND MYOEPITHELIAL-LIKE HS 578BST CELLS<br/>FORM 3D BILAYERED ACINI SIMILAR TO HUMAN BREAST.....</b>                  | <b>48</b> |
| <b>2.1 Présentation des auteurs .....</b>                                                                                                           | <b>48</b> |
| 2.1.1 Auteurs .....                                                                                                                                 | 48        |
| 2.1.2 Contributions des auteurs.....                                                                                                                | 48        |
| <b>2.2 Résumé de l'article .....</b>                                                                                                                | <b>48</b> |
| <b>2.3 Article.....</b>                                                                                                                             | <b>49</b> |
| 2.3.1 Abstract .....                                                                                                                                | 49        |
| 2.3.2 Introduction .....                                                                                                                            | 50        |
| 2.3.3 Results.....                                                                                                                                  | 52        |
| 2.3.3.1 MCF-12A and Hs 578Bst cells showed more differentiated phenotypes than SCp2 and SCg6.....                                                   | 52        |
| 2.3.3.2 MCF-12A and SCp2 cells embedded in Matrigel form spheroid structures.....                                                                   | 52        |
| 2.3.3.3 MCF-12A cells maintained in Hybri-Care culture medium conserved an acini-like structure .....                                               | 53        |
| 2.3.3.4 Dilution of Matrigel to different concentrations impacts spheroid structure and immunolabeling .....                                        | 55        |
| 2.3.3.5 MCF-12A and Hs 578Bst self-organized in spheroids resembling bilayered-like acini .....                                                     | 57        |
| 2.3.4 Discussion .....                                                                                                                              | 58        |
| 2.3.4.1 The important role of myoepithelial cells .....                                                                                             | 59        |
| 2.3.4.2 Luminal and myoepithelial-like commercial cell lines can form bilayered acini, similar to complex 3D structures from primary cultures ..... | 60        |
| 2.3.4.3 Limitations of our model .....                                                                                                              | 61        |
| 2.3.5 Conclusion .....                                                                                                                              | 62        |
| 2.3.6 Materials and methods .....                                                                                                                   | 63        |
| 2.3.6.1 Cell lines .....                                                                                                                            | 63        |
| 2.3.6.2 Western blot analysis .....                                                                                                                 | 63        |
| 2.3.6.3 Three-dimensional embedded cells cultures .....                                                                                             | 64        |

|                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.6.4 Immunolabeling of 3D embedded cell cultures.....  | 65        |
| 2.3.6.5 Cryosections from embedded 3D cultures .....      | 65        |
| 2.3.6.6 Masson's trichrome staining of cryosections ..... | 65        |
| 2.3.6.7 Immunolabeling of cryosections .....              | 66        |
| 2.3.7 Acknowledgments .....                               | 66        |
| 2.3.8 Author contribution .....                           | 66        |
| 2.3.9 Conflict of interest.....                           | 67        |
| 2.3.10 Supplementary figures.....                         | 67        |
| <b>CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>          | <b>72</b> |
| 3.1 Avantages de notre modèle <i>in vitro</i> .....       | 73        |
| 3.2 Limites de notre modèle <i>in vitro</i> .....         | 74        |
| 3.3 Propositions et perspectives.....                     | 78        |
| 3.4 Conclusion .....                                      | 79        |
| <b>CHAPITRE 4 : RÉFÉRENCES .....</b>                      | <b>80</b> |

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre 1 : Revue de littérature

- Figure 1** Illustration de la structure anatomique de la glande mammaire humaine, incluant l'épithélium avec son système canalo-lobulaire bicouche ramifié, et le stroma
- Figure 2** Représentation schématique d'une coupe transversale de l'unité fonctionnelle sécrétrice de la glande mammaire : l'acinus bicouche
- Figure 3** Représentation schématique d'acini de glande mammaire d'un sein non-allaitant (gauche) et ceux d'un sein en lactation (droite)
- Figure 4** Microscopie par double fluorescence à la sialomucine (rouge) et ESA (« epithelial-specific antigen », vert) de cellules épithéliales luminales cultivées en trois dimensions
- Figure 5** Représentation schématique du développement de l'épithélium de la glande mammaire chez la souris
- Figure 6** Représentation schématique des dix propriétés acquises des cellules cancéreuses
- Figure 7** Distribution en pourcentage des nouveaux cas de cancer projetés, selon le sexe, au Canada en 2017
- Figure 8** Distribution en pourcentage du nombre projeté de décès par cancer, selon le sexe, au Canada en 2017
- Figure 9** Résumé schématique des différents sous-types moléculaires de cancer du sein : luminal A, luminal B, HER2e (« HER2+ ») et TNBC (prévalence, récepteurs exprimés, grade histologique, pronostic et réponse aux thérapies médicales)
- Figure 10** Représentation schématique des différents stades de cancer du sein
- Figure 11** Représentation schématique des composantes moléculaires des jonctions serrées entre deux cellules adjacentes
- Figure 12** Représentation schématique des composantes moléculaires des jonctions adhérentes entre deux cellules adjacentes
- Figure 13** Représentation schématique des unités permettant la formation d'une jonction lacunaire, ou plaque jonctionnelle, liant le cytoplasme de deux cellules adjacentes
- Figure 14** Représentation schématique des quatre types de modèles de culture cellulaire *in vitro*

- Figure 15** Représentation schématique des méthodes sans matrice permettant la formation de sphéroïdes
- Figure 16** Formation de sphéroïdes, dotés d'un lumen
- Figure 17** Sphéroïdes similaires aux acini de glande mammaire humaine cultivés en 3D dans une matrice

## **Chapitre 2: Luminal MCF-12A and myoepithelial-like Hs 578Bst cells form 3D bilayered structures resembling human breast acini *in vitro***

- Figure 1** MCF-12A cell embedded in Matrigel gradually form acini-like structures
- Figure 2** Hybri-Care culture medium promotes the formation of more defined acini-like structure compared to DMEM/F12 culture medium
- Figure 3** Presence of a lumen-like cavity in the center of cryosectionned MCF-12A acini
- Figure 4** Matrigel at a concentration of 75% is optimal for 3D culture of MCF-12A cells
- Figure 5** MCF-12A cells co-cultured with Hs578Bst cells produce acini-like structures when embedded in Matrigel
- Figure 6** MCF-12A and Hs 578Bst co-cultured cells form bilayered acini in Matrigel
- Supplementary figure 1** Human luminal epithelial MCF-12A and myoepithelial-like Hs 578Bst cells have more differentiated phenotypes than murine luminal epithelial SCp2 and myoepithelial SCg6 cells
- Supplementary figure 2** Co-cultures SCp2 and SCg6 cells did not form bilayered acini in Matrigel

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **Chapitre 1 : Revue de littérature**

|                  |                                                        |
|------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>Tableau 1</b> | Classification des différents stades du cancer du sein |
|------------------|--------------------------------------------------------|



## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

|                       |                                                                                                               |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ADP</b>            | Adénosine diphosphate                                                                                         |
| <b>AH</b>             | Acide Hyaluronique                                                                                            |
| <b>AMPc</b>           | Adénosine monophosphate cyclique                                                                              |
| <b>ATP</b>            | Adénosine triphosphate                                                                                        |
| <b>bFGF</b>           | Facteur de croissance des fibroblastes basique (basic Fibroblast Growth Factor)                               |
| <b>BLBC</b>           | Cancer du sein de type basal (Basal-Like Breast Cancer)                                                       |
| <b>Cxs</b>            | Connexines                                                                                                    |
| <b>DCIS</b>           | Carcinome canalaire <i>in situ</i> (Ductal Carcinoma <i>in situ</i> )                                         |
| <b>EGF</b>            | Facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor)                                                   |
| <b>EHS</b>            | Engelbreth-Holm-Swarm                                                                                         |
| <b>EMBrI</b>          | Extrait de membrane basale riche en laminine                                                                  |
| <b>EMT</b>            | Transition épithéliale-mésenchymateuse (Epithelial-Mesenchymal Transition)                                    |
| <b>ER</b>             | Récepteur d'œstrogène (Estrogen Receptor)                                                                     |
| <b>FACS</b>           | Tri cellulaire activé par fluorescence (Fluorescence-Activated Cell Sorting)                                  |
| <b>HER2e</b>          | HER2-enriched                                                                                                 |
| <b>IP<sub>3</sub></b> | Inositol triphosphate                                                                                         |
| <b>JA</b>             | Jonction adhérente                                                                                            |
| <b>JAMs</b>           | Molécules d'adhérence jonctionnelle (Junctional Adhesion Molecules)                                           |
| <b>JL</b>             | Jonction lacunaire                                                                                            |
| <b>JS</b>             | Jonction serrée                                                                                               |
| <b>HER2</b>           | Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (Human Epidermal growth factor Receptor 2)            |
| <b>HGF</b>            | Facteur de croissance des hépatocytes (Hepatocyte Growth Factor)                                              |
| <b>IGF-1</b>          | Facteur de croissance semblable à l'insuline-1 (Insuline-like Growth Factor-1)                                |
| <b>MB</b>             | Membrane basale                                                                                               |
| <b>MEC</b>            | Matrice extracellulaire                                                                                       |
| <b>MMP14</b>          | Métalloprotéase matricielle 14 (Matrix MetalloProteinase-14)                                                  |
| <b>MT1-MMP</b>        | Métalloprotéase matricielle transmembranaire de type 1 (Membrane Type-1 Matrix MetalloProteinase)             |
| <b>NGF</b>            | Facteur de croissance des nerfs (Nerve Growth Factor)                                                         |
| <b>PCNA</b>           | Antigène nucléaire de prolifération cellulaire (Proliferating Cell Nuclear Antigen)                           |
| <b>PDGF</b>           | Facteur de croissance dérivé de plaquettes (Platelet-Derived Growth Factor)                                   |
| <b>PEG</b>            | Polyéthylène glycol                                                                                           |
| <b>PLA</b>            | Polycaprolactone                                                                                              |
| <b>PLC</b>            | Cycle de grossesse-lactation (Pregnancy-Lactation Cycle)                                                      |
| <b>PLG</b>            | Poly lactide-coglycolide                                                                                      |
| <b>Poly-HEMA</b>      | Méthacrylate de poly-2-hydroxyéthyl (poly(2-hydroxyethyl methacrylate))                                       |
| <b>PR</b>             | Récepteur de progestérone (Progesterone Receptor)                                                             |
| <b>PRL</b>            | Prolactine                                                                                                    |
| <b>PVA</b>            | Alcool polyvinylique                                                                                          |
| <b>Stat5</b>          | Transducteurs de signal et activateur de transcription 5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) |
| <b>TEBs</b>           | Boutons terminaux (Terminal End Buds)                                                                         |

|                               |                                                                                        |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | Facteur de croissance transformant bêta (Transforming Growth Factor beta)              |
| <b>TGF<math>\beta</math>1</b> | Facteur de croissance de transformation beta 1 (Transforming Growth Factor beta 1)     |
| <b>TNBC</b>                   | Cancer du sein triple négatif (Triple-Negative Breast Cancer)                          |
| <b>VEGF</b>                   | Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor) |
| <b>WAP</b>                    | Protéine acide de lactosérum (Whey Acidic Protein)                                     |
| <b>2D</b>                     | Deux dimensions                                                                        |
| <b>3D</b>                     | Trois dimensions                                                                       |

# CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE

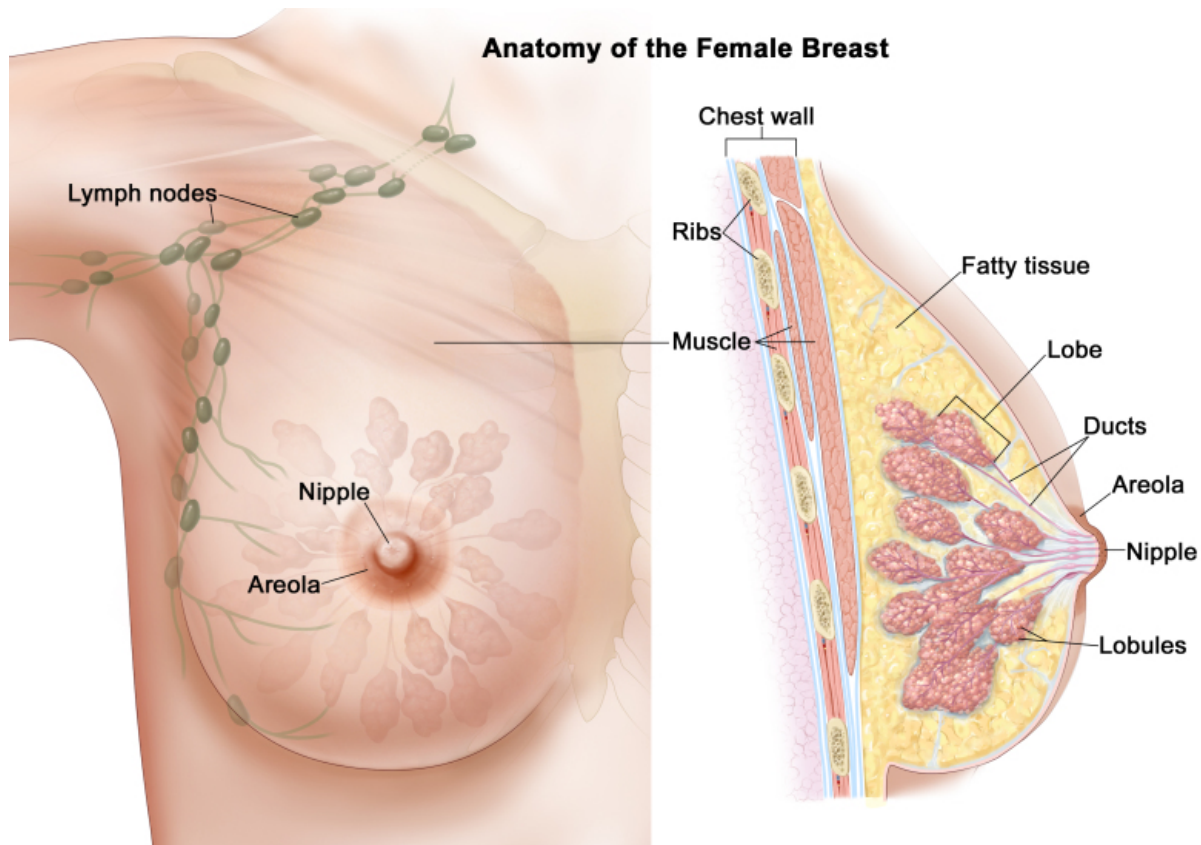
## 1.1 La glande mammaire

Contrairement à la majorité des organes du corps humain, dont le développement complet s'accomplit durant l'embryogenèse, la glande mammaire atteint son état fonctionnellement mature seulement durant le cycle de grossesse-lactation (« pregnancy-lactation cycle », PLC) chez la femme adulte (Hassiotou et Geddes 2013). Aussi, cet organe unique est continuellement remodelé après la puberté sous l'influence cyclique des hormones reproductives (Polyak et Kalluri 2010). La glande mammaire a pour but principal de synthétiser, sécréter et délivrer le lait au nouveau-né lors de la lactation (Medina 1996 ; Tiede et Kang 2011).

La glande mammaire humaine est formée de deux compartiments cellulaires principaux. Le premier, un épithélium dynamique qui subit des cycles de prolifération, de différenciation et d'apoptose en réponse aux signaux environnants et endocriniens. Le deuxième, le stroma complexe qui subit des remodelages de composition tout au long du développement et des PLC de la glande mammaire (Figure 1) (Su et al. 2011 ; D'Cruz et al. 2002).

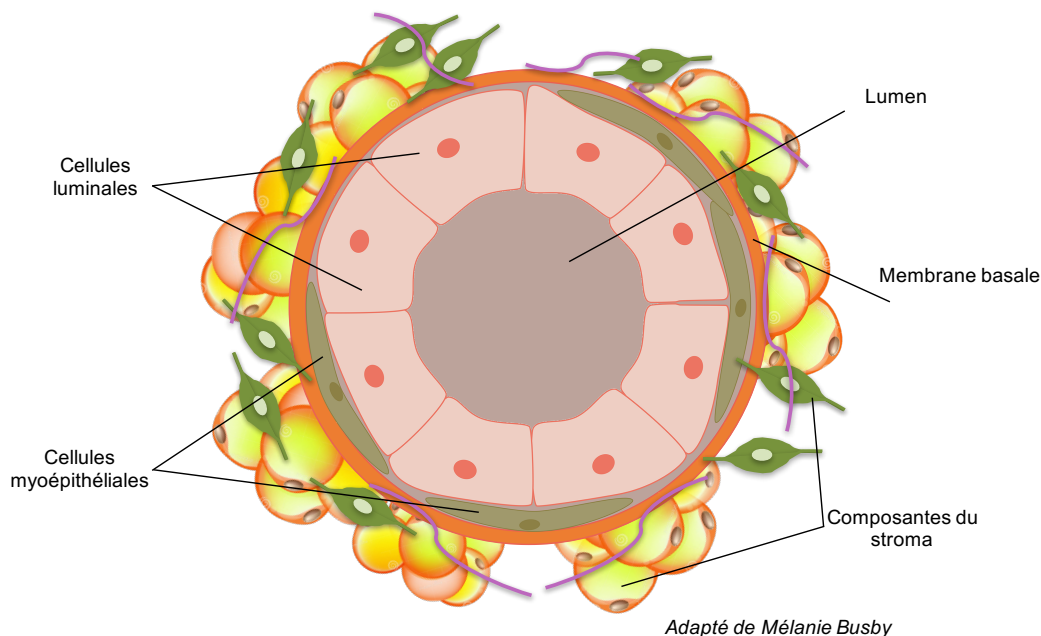
### 1.1.1 Système canalo-lobulaire de l'épithélium

L'épithélium est organisé en système canalo-lobulaire ramifié. Ce système comprend de quinze à vingt lobes reliés par les canaux galactophores qui convergent au mamelon. Chaque lobe se divise en lobules, constitués à leur tour d'acini, ou d'alvéoles (Figure 1) (Harris 2014).



**Figure 1 : Illustration de la structure anatomique de la glande mammaire humaine, incluant l'épithélium avec son système canalo-lobulaire bicouche ramifié, et le stroma.** L'illustration de gauche représente la vue de face externe du sein et l'illustration de droite représente l'épithélium ramifié entouré de stroma. La glande mammaire repose sur la paroi thoracique (« chest wall ») composée de côtes (« ribs ») et de muscles (« muscle »). Le stroma est composé de divers cellules (adipocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules nerveuses, cellules immunitaires) et de composantes acellulaires de la matrice extracellulaire (Silberstein 2001). Le lait est produit dans les lobules (« lobules ») des lobes (« lobe ») qui sont reliés par les canaux galactophores (« ducts ») qui convergent au mamelon (« nipple »). L'aréole (« areola ») du mamelon joue un rôle de lubrification dans ce processus (National Cancer Institute © 2011 Terese Winslow, U.S. Govt. has certain rights)

L'acinus est l'unité fonctionnelle sécrétrice de la glande mammaire (Harris 2014). Les acini et les canaux du système canalo-lobulaire ramifié de l'épithélium ont un lumen central bordé de deux couches de cellules : une couche interne de cellules luminales polarisées et une couche externe de cellules basales, composée majoritairement de cellules myoépithéliales contractiles (Figure 2) (Weigelt et Bissell 2008). Ces dernières affichent des propriétés phénotypiques de cellules de muscles lisses (Hassiotou et Geddes 2013). La couche externe de cellules basales comprend également une petite population de cellules souches mammaires et de cellules progénitrices.

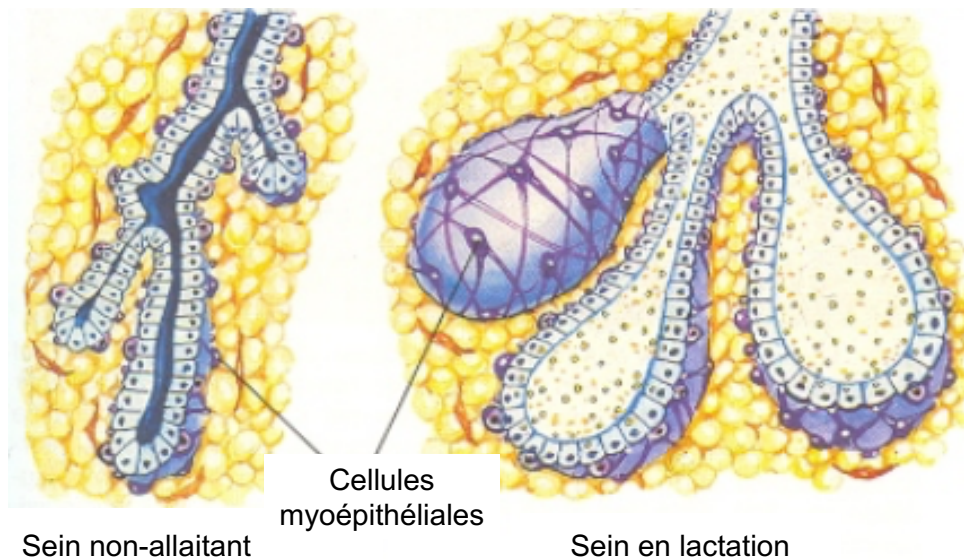


**Figure 2 : Représentation schématique d'une coupe transversale de l'unité fonctionnelle sécrétrice de la glande mammaire : l'acinus bicouche.** La lumière (*lumen*) est délimitée par une couche interne de cellules épithéliales luminales sécrétrices qui est à son tour entourée par une couche discontinue de cellules myoépithéliales. L'épithélium est séparé du stroma par la membrane basale. Le compartiment stromal est composé de différentes cellules comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules immunitaires, les cellules nerveuses, les adipocytes, et de composants acellulaires de la matrice extracellulaire (laminine, fibronectine, collagène, protéoglycane, etc.) (Silberstein 2001) (Figure adaptée de Mélanie Busby (non publiée)).

### 1.1.2 Cellules épithéliales luminales

Les cellules luminales forment la couche interne continue de l'épithélium bicouche de la glande mammaire. Cette couche interne peut être subdivisée en cellules luminales canalaire, qui tapissent la paroi interne du canal, et en cellules luminales alvéolaires, qui sécrètent du lait dans le lumen de l'alvéole – de l'acinus – durant la lactation (Figure 3). Cette sécrétion de lait est régulée par des hormones lactogéniques, comme la progestérone et la prolactine (Macias et Hinck 2012 ; Tiede et Kang 2011).

La surface apicale des cellules luminales est en contact avec le lumen alors que la surface basale est en contact avec la couche de cellules myoépithéliales ou la membrane basale (MB). Le côté apical est chargé de protéines mucines fortement glycosylées, comme la mucine 1, qui empêchent l'adhérence (Muschler et Streuli 2010). Cette architecture cellulaire polarisée est établie par les complexes jonctionnels intercellulaires serrées et adhérentes (Anderson et al. 2007).



**Figure 3 : Représentation schématisée d'acini de glande mammaire d'un sein non-allaitant (gauche) et ceux d'un sein en lactation (droite).** La couche externe discontinue de cellules myoépithéliales s'organise en filet autour de la couche interne continue de cellules épithéliales luminales (*Basic Histology* 2011)

### 1.1.3 Cellules myoépithéliales

Les cellules myoépithéliales composent majoritairement la couche externe de cellules basales de l'épithélium bicouche de la glande mammaire (Emerman et Vogl 1986). Les cellules myoépithéliales canalaire maintiennent une forme de fuseau et s'orientent parallèlement le long de l'axe du canal. Elles forment une couche continue autour des cellules luminales canalaire. En revanche, les cellules myoépithéliales alvéolaires ont une forme stellaire, formant une couche similaire à un filet qui enveloppe, de façon discontinue, les cellules luminales alvéolaires de la couche interne de l'épithélium (Figure 3) (Adriance et al. 2005 ; Emerman et Vogl 1986 ; Sopel 2010).

La structure des cellules myoépithéliales reflète leurs fonctions : (1) la contraction de l'épithélium, (2) l'induction de la polarité des cellules luminales et (3) la régulation de la morphogenèse canalaire (Adriance et al. 2005).

#### 1.1.3.1 Contraction

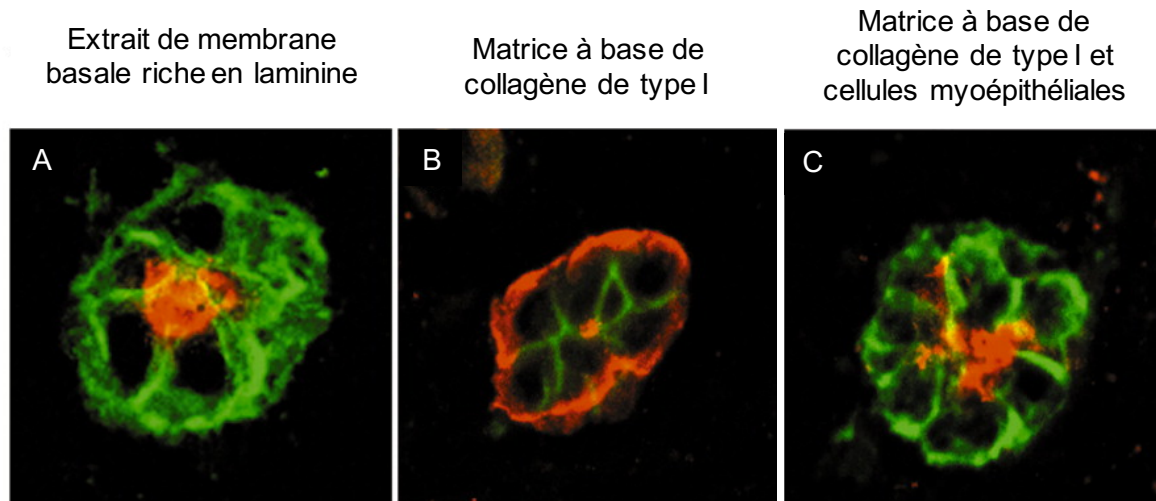
La contraction des cellules myoépithéliales se déroule durant la lactation en réponse à l'ocytocine. Sous l'effet de cette hormone, les cellules myoépithéliales raccourcissent pour diminuer le diamètre du lumen alvéolaire et canalaire pour expulser le lait des acini vers le mamelon (Emerman et Vogl 1986). Les jonctions lacunaires et adhérentes qui relient les cellules myoépithéliales coordonnent ce processus (Monaghan et al. 1996).

#### 1.1.3.2 Induction de la polarité

La polarité des cellules luminales de la couche interne de l'épithélium est induite par les cellules myoépithéliales de la couche externe de l'épithélium durant le développement (Gudjonsson et al. 2002 ; Runswick et al. 2001). Pour explorer les interactions cellulaires qui gouvernent cette induction de polarité, des systèmes de culture cellulaire en trois dimensions (3D) ont été utilisés. Ce type de modèle *in vitro* consiste à cultiver des cellules à l'aide d'une matrice (« with scaffold ») faite de matériaux naturels ou synthétiques, ou de manière dépourvue de matrice (« scaffold-free »), pour qu'elles puissent former des sphéroïdes ou des agrégats tridimensionnels (Edmondson et al. 2014 ; Knight et Przyborski 2015).

Lorsque des cellules primaires épithéliales luminales normales humaines étaient cultivées en 3D dans un extrait de membrane basale riche en laminine (EMBrI), elles formaient des sphéroïdes acinaires avec une bonne polarité, même en absence de cellules myoépithéliales (Figure 4a) (Petersen et al. 1992). Lorsqu'elles étaient cultivées dans une matrice à base de collagène de type I, dépourvu de laminine, elles formaient des structures avec une expression altérée d'intégrines (Howlett et al. 1995), une polarité inversée et une absence de lumen central (Figure 4b) (Gudjonsson et al. 2002). Cependant, lorsque ces mêmes cellules étaient co-cultivées avec des cellules primaires myoépithéliales normales humaines dans cette même matrice à base de collagène de type I, elles présentaient de nouveau une bonne polarité apico-basale (Figure 4c) (Gudjonsson et al. 2002).





**Figure 4 : Microscopie par double fluorescence à la sialomucine (rouge) et ESA (« epithelial-specific antigen », vert) de cellules épithéliales luminales cultivées en trois dimensions.** Les cellules épithéliales luminales ensemencées dans la matrice à base de collagène de type I avaient une polarité inversée et formaient un acinus dont le marqueur apical sialomucine était exprimé au pourtour de la structure plutôt qu'uniquement en son centre (B). À l'opposé, les cellules ensemencées dans l'extrait de membrane basale riche en laminine (EMBrI) maintenaient une polarité normale (A). Par l'addition de cellule myoépithéliales (C), la polarité de l'acinus au marquage inversé a été corrigée (bar, 25  $\mu$ m) (Gudjonsson et al. 2002)

Il a été conclu que cette morphogenèse aberrante (polarité inversée, expression altérée d'intégrines et absence de lumen central) des structures simili-acinaires de cellules luminales ensemencées dans les matrices à base de collagène de type I pouvait être corrigée par l'ajout de cellules myoépithéliales (Gudjonsson et al. 2002). De toutes les molécules produites par les cellules myoépithéliales, la laminine-1 s'est démarquée comme étant le principal médiateur de cette induction de polarisation. La laminine-1 est un hétérotrimère de chaînes  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1 et  $\gamma$ 1, et est une composante majeure de la MB (Ekblom, Lonai et Talts 2003).

Le rôle des interactions entre les cellules et la laminine-1 dans la morphogenèse et le maintien de la polarité a déjà été démontré dans le rein, la glande salivaire et les cellules épithéliales de l'intestin (S. Li et al. 2003 ; Simon-Assmann et al. 1995 ; Sorokin et al. 1992). Ces résultats ont aussi souligné l'importance des interactions cellule-matrice extracellulaire (MEC) dans l'établissement de la polarité apico-basale dans l'épithélium. Ils confirment le rôle essentiel des cellules myoépithéliales productrices de laminine-1 comme source de MB essentielle à ces interactions (Deugnier et al. 1995).



#### *1.1.3.3 Régulation de la morphogenèse canalaire*

Les cellules myoépithéliales régulent également la morphogenèse canalaire de la glande mammaire (Niranjan et al. 1995). L'ancrage à la MB et les interactions avec les cellules luminales favorisent des mécanismes de régulation paracrine. Une coordination adéquate de toutes ces activités est nécessaire pour maintenir une fonction normale de la glande mammaire. La dérégulation de ces interactions et/ou de la fonction des cellules myoépithéliales est une étape clé dans le développement du cancer du sein (Adriaance et al. 2005 ; Ronnov-Jessen, Petersen et Bissell 1996 ; Sternlicht et Barsky 1997 ; Sternlicht et al. 1997).

#### *1.1.3.4 Suppresseur de tumeur*

De nombreuses études suggèrent un quatrième rôle aux cellules myoépithéliales : celui de suppresseurs de tumeur naturels (Lakhani et O'Hare 2001 ; Sternlicht et al. 1997 ; Sternlicht et Barsky 1997). En effet, il a été démontré qu'elles inhibent la prolifération des cellules tumorales du sein en provoquant un arrêt de croissance et une induction de l'apoptose. Aussi, elles interfèrent avec le caractère invasif des cellules tumorales et inhibent l'angiogenèse (Deugnier et al. 2002). Les cellules myoépithéliales des glandes mammaires normales et celles des tumeurs de carcinome canalaire *in situ* (« Ductal Carcinoma In Situ », DCIS) séparent les cellules luminales de l'épithélium des vaisseaux sanguins et du stroma. La barrière ainsi formée doit être franchie lors de l'invasion. Les cellules myoépithéliales pourraient alors fonctionner comme une frontière physique, empêchant la progression de tumeurs non-invasives vers un cancer invasif (Sopel 2010).

Le mécanisme de la dégradation de la MEC et de la MB par des métalloprotéases matricielles (« matrix metalloproteinases », MMPs) joue un rôle lors de l'invasion. Il a été démontré que des cultures primaires de cellules myoépithéliales inhibent l'invasion de lignées cellulaires cancéreuses en régulant à la baisse l'expression de MMPs des cellules tumorales et des fibroblastes (Jones et al. 2003). De plus, en 2010, Pandey, Saidou et Watabe ont démontré les lignées cellulaires et les cultures primaires de cellules myoépithéliales mammaires produisent des niveaux élevés d'inhibiteurs de protéases, tels que l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéases-1 (TIMP-1), la protéase nexine-II, l'anti-trypsine  $\alpha$ -1 (inhibiteur de la sérine protéase) et la maspine (Pandey, Saidou et Watabe 2010). Ces inhibiteurs de protéases bloquent l'activité des enzymes plutôt que d'inhiber la synthèse protéolytique des enzymes (Pandey,

Saidou et Watabe 2010). La maspine est une protéine membre de la famille serpentine des sérines protéases. Elle est produite par les cellules myoépithéliales. Il a été démontré que lorsqu'exprimée dans des cellules tumorales du sein, elle bloque leur croissance, diminue leur potentiel invasif et prévient la dissémination de tumeurs *in vivo* (Deugnier et al. 2002 ; Streuli 2002). Les cellules myoépithéliales produisent également des facteurs anti-angiogéniques, comme la thrombospondine-1 et le récepteur de facteur de croissance des fibroblastes soluble (Deugnier et al. 2002 ; Nguyen et al. 2000 ; Sternlicht et al. 1997).

L'ensemble de ces résultats suggère que les cellules myoépithéliales normales inhibent les fonctions de la cellule tumorale grâce à une suppression concertée de la croissance des cellules tumorales, de l'invasion et de l'angiogenèse.

#### **1.1.4 Composition et rôle de la membrane basale**

L'épithélium bicouche est séparé du stroma environnant par la MB (Weigelt, Ghajar et Bissell 2014 ; Weigelt et Bissell 2008). Cette MB est une forme spécialisée de MEC composée principalement de collagène de type IV et de laminine (Leblond et Inoue 1989), notamment la laminine-1 et laminine-332 (Tzu et Marinkovich 2008). La MB permet également d'ancrer les cellules myoépithéliales par ligature des molécules de surface cellulaire et d'organiser le côté basal du myoépithélium par le biais de la laminine-1 et d'hémidesmosomes (Inman et al. 2015).

#### **1.1.5 Composition et rôle du stroma et de la matrice extracellulaire**

Le stroma est composé de MEC et d'un mélange cellulaire hétérogène : des fibroblastes, des adipocytes, des cellules immunitaires, comme les lymphocytes et les macrophages, des cellules endothéliales et des cellules nerveuses (Polyak et Kalluri 2010 ; Su et al. 2011 ; Weigelt, Ghajar et Bissell 2014 ; Silberstein 2001). La MEC est la composante protéinique du stroma (Kass et al. 2007). Les cellules myoépithéliales et stromales synthétisent les éléments qui sont incorporés dans la MEC et la MB, comme les laminines, les collagènes, la fibronectine et les protéoglycanes (Inman et al. 2015). Les fibroblastes du stroma synthétisent des composantes de la MEC, comme le collagène I, III, IV, V et VI (Lam et al. 2004 ; Zou et al. 2008 ; Prockop 1982 ; Narayanan et Page 1985), la majorité de la protéoglycane décorine (de Lima et al. 2012) et la fibronectine (Inman et al. 2015). Les fibroblastes produisent également des enzymes de remodelage de la MEC, incluant les métalloprotéases matricielles (« matrix metalloproteinases », MMPs), qui, en

plus de remodeler la MEC en dégradant des protéines qui la composent, libèrent des facteurs de croissance et des cytokines qui influencent les fonctions cellulaires et tissulaires de la glande mammaire (Inman et al. 2015 ; Simian et al. 2001 ; Wiseman et Werb 2002). Ainsi, en plus de son rôle de support physique, le stroma interagit de façon « chimique » avec l'épithélium permettant le maintien d'une architecture tissulaire appropriée (Campbell et Watson 2009).

#### *1.1.6.1 Réciprocité dynamique entre les cellules et la MEC du stroma et l'épithélium*

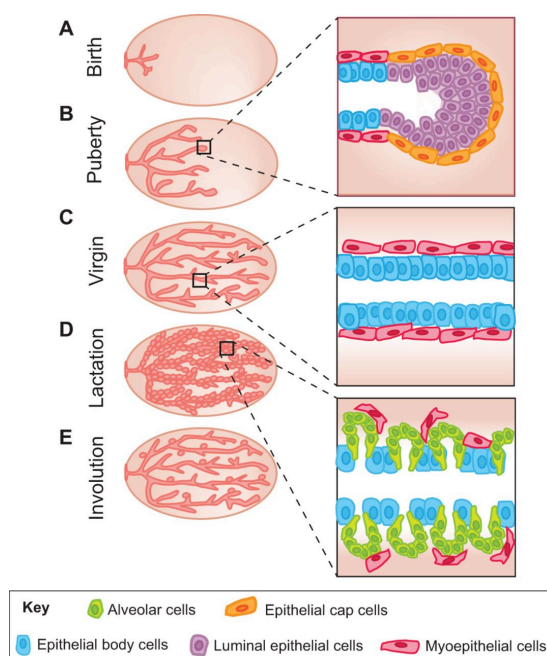
Il existe une réciprocité dynamique entre la MEC, les composantes cellulaires du stroma, et la signalisation vers les cellules épithéliales (Weigelt, Ghajar et Bissell 2014). La MEC fournit des signaux biochimiques par l'intermédiaire des récepteurs transmembranaires (Bissell, Hall et Parry 1982). Ces signaux biochimiques guident l'organisation de la chromatine et du cytosquelette pour réguler la différenciation, la survie, la croissance et la migration cellulaire, toutes nécessaires au maintien de l'intégrité tissulaire de l'épithélium (Weigelt, Ghajar et Bissell 2014 ; Inman et al. 2015 ; Polyak et Kalluri 2010). En réponse aux signaux de la MEC, découlant d'un changement dans sa composition, les intégrines s'assemblent en complexes de signalisation intracellulaires. Ces complexes de signalisation intracellulaires sont connectés à l'actine du cytosquelette. Cette liaison permet d'activer des voies de signalisation de croissance et de survie pour influencer la destinée et la morphologie des cellules (Kass et al. 2007). Par exemple, l'ancrage de l'intégrine à la laminine-1 permet l'activation des voies de signalisation prolactine (PRL) dépendantes de Janus Kinase-2 et de Stat5, et la transcription PRL-dépendante et Stat5-dépendante des protéines du lait (Naylor et al. 2005). Parmi ces récepteurs transmembranaires qui transmettent les signaux biochimiques de la MEC à l'épithélium, on compte : les intégrines (récepteurs du collagène, de la laminine et de la fibronectine), le dystroglycane (récepteur de la laminine-1), la tyrosine kinase du récepteur du domaine discoïdine I (récepteur de collagène) et les syndécans (co-récepteur de protéoglycanes à héparane sulfate, de fibronectine, de laminine, de collagène et de facteurs de croissance) (Fata, Werb et Bissell 2004 ; Kass et al. 2007 ; Vidi, Bissell et Lelievre 2013).

Les différentes cellules du stroma fournissent non seulement un support physique à l'épithélium, mais régulent également la fonction et le développement normal des cellules épithéliales sous-jacentes par le biais des interactions paracrines, physiques et hormonales (Polyak et Kalluri 2010). Par exemple, les fibroblastes du stroma communiquent bidirectionnellement avec l'épithélium au cours de la morphogenèse de la ramification. Ainsi, ils fournissent des instructions sous forme de facteurs de croissances, de protéases et d'autres éléments (Howard et Lu 2014).

Tel qu'expliqué plus haut, les fibroblastes synthétisent plusieurs composantes de la MEC et des enzymes, comme la métalloprotéase matricielle (« matrix metalloproteinase », MMP). Ces enzymes peuvent dégrader la MEC et en modifier la densité ou la composition. À ce titre, les fibroblastes producteurs de MMPs peuvent réguler les cellules de l'épithélium qu'ils enveloppent en modifiant la composition de leur microenvironnement (Luhr et al. 2012). Les adipocytes ont une fonction endocrine dans la glande mammaire : ils réguleraient la croissance épithéliale et la fonction de l'épithélium mammaire, en plus de communiquer avec d'autres cellules de la glande mammaire (Hovey et Aimo 2010). Par exemple, il a été suggéré que les adipocytes régulent l'angiogenèse dans la glande mammaire en sécrétant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (« vascular endothelial growth factor », VEGF) (Hovey et al. 2001).

### 1.1.7 Mammogenèse

Le développement de la glande mammaire, ou la mammogenèse, comprend trois étapes. Ce processus débute durant le développement embryonnaire, se poursuit pendant la puberté et aboutit avec la grossesse et la lactation (Figure 5) (Campbell et Watson 2009). Nos connaissances de ces trois étapes proviennent majoritairement d'études réalisées sur des souris, offrant un aperçu de la biologie du sein humain (Macias et Hinck 2012).



**Figure 5 : Représentation schématique du développement de l'épithélium de la glande mammaire chez la souris.** Structure de l'épithélium à la naissance (« Birth ») (A); élongation des canaux durant la puberté (« Puberty ») (B); canaux matures chez l'adulte (« Virgin ») (C); acini durant la lactation (« Lactation ») (D); involution suite à l'allaitement (« Involution ») (E) (Inman et al. 2015)

#### *1.1.7.1 Première étape*

La première étape se déroule chez l'embryon où les glandes mammaires se développent le long des régions spécialisées de l'ectoderme. Celles-ci qui sont localisées dans deux crêtes mammaires ventrales, appelées lignes de lait (Javed et Lteif 2013). Les cellules de l'ectoderme migrent le long de chaque ligne de lait et s'unissent pour former des régions nommées placodes (Veltmaat et al. 2004). Ces placodes pénètrent le mésenchyme pour former un bourgeon. Celui-ci se ramifie en un arbre mammaire rudimentaire (Watson et Khaled 2008). Dans cet arbre mammaire rudimentaire se développe un lumen central par un processus de cavitation. Ce processus est provoqué par l'apoptose des cellules épithéliales centrales en l'absence d'un contact direct avec la MEC (Boudreau et al. 1995 ; Coucovanis et Martin 1995). Après la naissance, la glande mammaire rudimentaire continue de croître à un rythme proportionnel à celui du corps (Watson et Khaled 2008).

#### *1.1.7.2 Deuxième étape*

La deuxième étape de la mammogenèse débute à la puberté, au moment où les niveaux d'œstrogène commencent à augmenter. À ce moment-là, apparaissent les bourgeons terminaux (« terminal end buds », TEBs), des structures hautement prolifératives situées au bout des canaux (Campbell et Watson 2009). L'œstrogène circulant promeut la prolifération des TEBs provoquant la croissance et la ramification canalaire. À la fin de la puberté, la majorité du stroma a été envahi par les canaux primaires, les TEBs sont moins prolifératifs et ont diminué de taille. Des canaux secondaires latéraux se développent à partir des canaux primaires et envahissent à leur tour le stroma. Avec l'arrivée de la maturité sexuelle et des cycles œstraux, le développement canalaire diminue (Campbell et Watson 2009). Par contre, lors des cycles menstruels, des phases de prolifération auront lieu afin de préparer la glande mammaire à une éventuelle grossesse. En l'absence de fécondation, une phase d'apoptose, appelée involution (Figure 5e), permettra la résorption des structures formées (Andres et Strange 1999).

#### *1.1.7.3 Troisième étape*

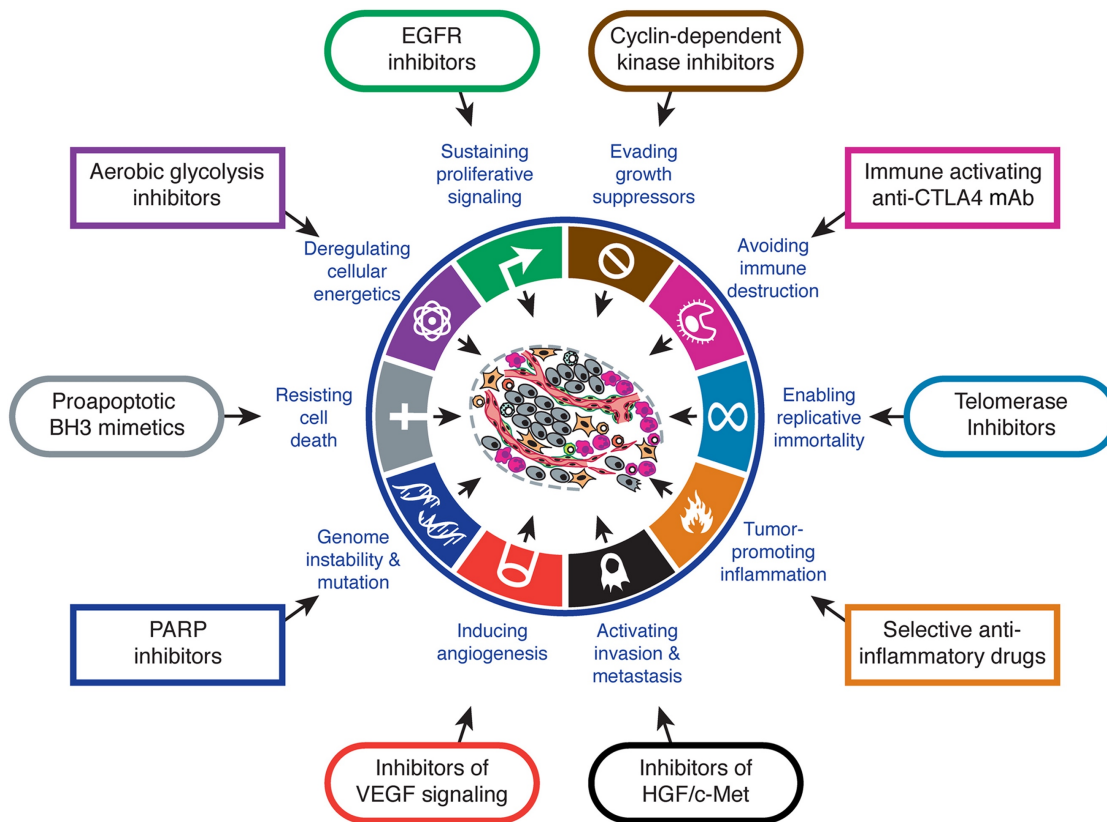
La troisième et dernière étape se déroule au moment de la grossesse accompagnée d'une augmentation significative de progestérone. Cela induit l'élongation et l'embranchement tertiaire des canaux et la formation de structures lobulo-alvéolaires, les acini, pour la production de lait

durant la lactation (Geddes 2007). Suivant l'allaitement, la glande mammaire subit la phase d'involution caractérisée par un processus de remodelage des lobules et des canaux au moyen des protéases et de l'apoptose massive de cellules épithéliales (Macias et Hinck 2012). La glande mammaire revient alors à son phénotype pré-grossesse (K. Hughes et al. 2012). En plus de l'involution post-grossesse, la glande mammaire subit une phase d'involution durant la ménopause (Hassiotou et Geddes 2013). La glande mammaire s'atrophie, mais le volume du sein ne diminue pas toujours, car il est compensé par l'augmentation des tissus graisseux (Macias et Hinck 2012).

## 1.2 Le cancer

Le cancer est une maladie dans laquelle des cellules anormales se divisent de manière incontrôlable et peuvent envahir les tissus avoisinants (*PubMed Health* 2017). Il existe plusieurs théories sur l'origine du cancer. Toutefois, elles partagent deux concepts : le cancer comporte plusieurs stades et met en jeu plusieurs mécanismes (Weinstein 1988).

Cette maladie découle de subversions des voies de régulation de croissance cellulaire normale dans les cellules du tissu. Ces subversions sont causées majoritairement par des mutations génétiques et des modifications épigénétiques dans les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et ceux de réparation de l'ADN (Su et al. 2011). Dix altérations cellulaires gouvernent le développement des tumeurs. Les cellules qui deviennent cancéreuses peuvent : (1) maintenir des voies de signalisation de prolifération, (2) éluder des suppresseurs de croissance, (3) évader le système immunitaire, (4) favoriser l'immortalité répllicative, (5) induire une inflammation protumorale, (6) activer les processus d'invasion et de métastase, (7) induire l'angiogenèse, (8) démontrer une instabilité génomique et des mutations génétiques, (9) combattre la mort cellulaire et/ou (10) remanier le métabolisme des cellules tumorales (Figure 6) (Hanahan et Weinberg 2011). Ces dix propriétés peuvent survenir dans un ordre différent et elles ne sont pas présentes dans toutes les tumeurs (Hanahan et Weinberg 2011).



**Figure 6 : Représentation schématique des dix propriétés acquises des cellules cancéreuses.**  
(Hanahan et Weinberg 2011)

Chacun de ces changements physiologiques – facultés acquises durant le développement de la tumeur – représente une dérogation aux mécanismes de défense contre le cancer présent normalement dans les cellules (Hanahan et Weinberg 2011).

### 1.2.1 Les trois grandes étapes de la cancérogenèse

Il est prouvé que la cancérogenèse est un processus en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression (Pitot et Dragan 1991). Elles reflètent des altérations génétiques entraînant une transformation progressive des cellules humaines normales en cellules hautement malignes (Hanahan et Weinberg 2000). Les trois étapes séquentielles au développement de cancer sont:

#### 1.2.1.1 Initiation

La première étape de la cancérogenèse est l'initiation. Cette étape commence par l'altération d'un gène à la suite d'une mutation spontanée, d'une exposition à un agent cancérogène mutagénique (un génotoxique) ou par l'hérédité (Siddiqui et al. 2015). Ces altérations génétiques sont stables,



héritables et irréversibles, dû à l'incapacité du système de réparation de l'ADN à les réparer (Siddiqui et al. 2015). La cellule devient alors « initiée » : elle n'est pas cancéreuse, mais a le potentiel de le devenir (Buick et Pollak 1984). Cette cellule initiée pourrait se multiplier pour former une tumeur, à moins que les cellules de son environnement inhibent sa prolifération ou que la cellule initiée meurt par apoptose (Trosko et al. 1996).

#### *1.2.1.2 Promotion*

La promotion, deuxième étape de la cancérogenèse, voit les cellules initiées proliférer et s'accumuler pour former une lésion prénéoplasique. Il s'agit d'un processus long et réversible si l'exposition à des agents promoteurs de tumeur est interrompue (Siddiqui et al. 2015). En effet, l'exposition au promoteur de tumeur doit être continue pour enclencher une transformation cellulaire. Une seule exposition passagère n'induit souvent pas de réponse (Pitot et Dragan 1991). Les promoteurs de tumeurs sont des carcinogènes non réactifs de l'ADN allant des composés chimiques aux protéines inflammatoires (Fujiki, Sueoka et Suganuma 2013). Des changements dans l'expression génique induisent une dérégulation dans les voies de signalisation biochimiques associées à une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire aberrante des cellules (Siddiqui et al. 2015).

#### *1.2.1.3 Progression*

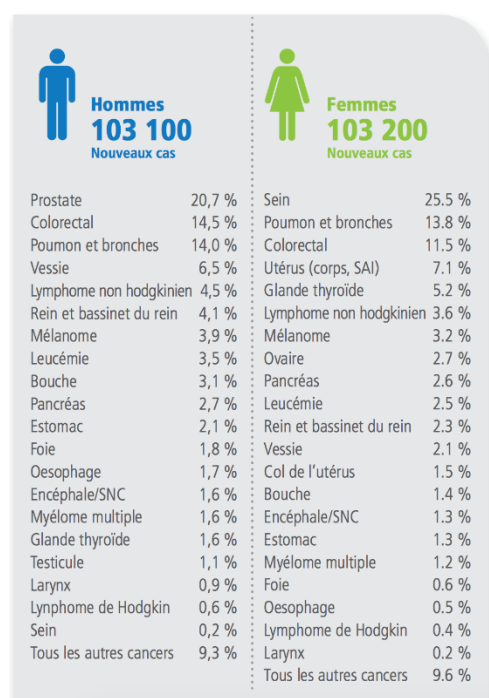
La progression est la troisième et dernière étape de la cancérogenèse. C'est à ce moment qu'on considère les cellules comme étant cancéreuses. Durant ce processus, les cellules acquièrent des changements génétiques et phénotypiques irréversibles. Par exemple, elles acquièrent une croissance complètement autonome provoquant l'augmentation de la grosseur de la tumeur. À cause de cette prolifération active, les cellules tendent à subir davantage de mutations causées par des erreurs de réplication et de réparation (Siddiqui et al. 2015). Ces mutations résultent généralement en des changements au niveau chromosomique suscitant une instabilité caryotypique dans les cellules. Ces transformations génétiques entraînent aussi l'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Pitot et Dragan 1991). Enfin, les cellules peuvent acquérir des changements génétiques ou épigénétiques supplémentaires leur permettant d'envahir les tissus environnant et de métastaser différents organes (Pitot et Dragan 1991).



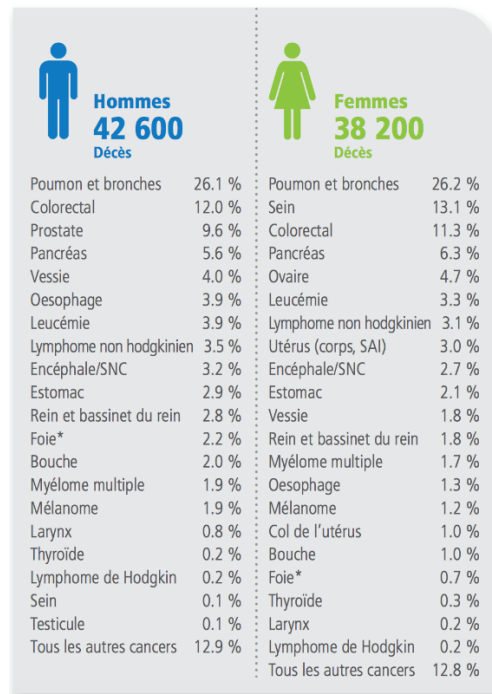
## 1.2.2 Cancer du sein

### 1.2.2.1 Statistiques du cancer du sein

Le cancer du sein est la forme de cancer la plus répandue chez la femme au Canada. Près de 26 300 Canadiennes recevront un diagnostic de cancer du sein en 2017 (*Société canadienne du cancer* 2017). Ce chiffre représente environ 25 % de tous les nouveaux cas de cancer chez la femme au Canada (Figure 7) (*Statistiques canadiennes sur le cancer* 2017). De ces 26 300 Canadiennes, 5000 en mourront (*Société canadienne du cancer* 2017). Voilà pourquoi le cancer du sein s'avère la 2<sup>ème</sup> cause de décès par cancer chez les femmes au pays (Figure 8) (*Société canadienne du cancer* 2017). Cependant, le nombre de décès attribués au cancer du sein a beaucoup diminué au fil des années. Depuis 1986, le nombre de décès a baissé de 44 % grâce aux programmes de mammographies régulières, aux avancées technologiques dans le domaine du dépistage, aux diagnostics plus précoces et aux améliorations apportées aux traitements (*Statistiques canadiennes sur le cancer* 2017). En date de 2017, chez les femmes canadiennes, le taux de survie à cinq ans atteignait de 87 % (*Statistiques canadiennes sur le cancer* 2017).



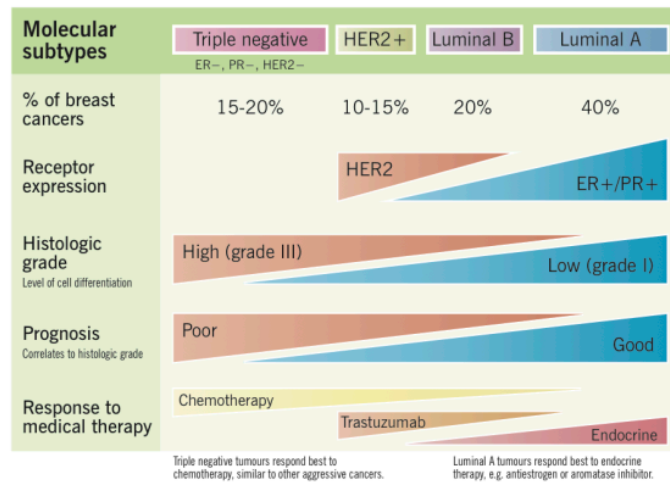
**Figure 7 : Distribution en pourcentage des nouveaux cas de cancer projetés, selon le sexe, au Canada en 2017.** Le pourcentage d'incidence de cancer du sein est le plus élevé de tous les cancers chez les femmes canadiennes (*Statistiques canadiennes sur le cancer* 2017) (SNC : système nerveux central. SAI : sans autre indication)



**Figure 8 : Distribution en pourcentage du nombre projeté de décès par cancer, selon le sexe, au Canada en 2017.** Le cancer du sein occupe la deuxième position par rapport à son pourcentage de mortalité chez les femmes canadiennes. (*Statistiques canadiennes sur le cancer 2017*) (SNC : système nerveux central. SAI : sans autre indication. \* : Le nombre de décès par cancer du foie est sous-estimé; voir l'Annexe II : *Source de données et méthodologie* du document en référence

#### 1.2.2.2 Sous-types de cancers du sein

Le cancer du sein est une maladie hétérogène et est généralement classifiée en quatre sous-types moléculaires distincts : luminal A, luminal B, enrichi en HER2 (« HER2-enriched », ou HER2e) et triple négatif (« Triple negative breast cancer », TNBC) (Figure 9) (Perou et al. 2000). Ces quatre sous-types peuvent être déterminés cliniquement en utilisant l'immunohistochimie. Cette technique permet d'identifier le ou les types de marqueurs exprimés, ou pas, par les cellules de la tumeur (Polyak 2011). Ces marqueurs comprennent le récepteur d'œstrogène (« Estrogen Receptor », ER), le récepteur de progestérone (« Progesterone Receptor », PR) et le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (« Human Epidermal growth factor Receptor 2 », HER2) (Hon et al. 2016). Le sous-type luminal A est positif pour ER et/ou PR, et négatif pour HER2. Le sous-type luminal B est positif pour ER et/ou PR, et positif pour HER2. Le sous-type HER2e est négatif pour ER et PR, mais positif pour HER2. Enfin, le TNBC est négatif pour les trois types de récepteurs et comprend la sous-classe du cancer du sein de type basal (« Basal-Like Breast Cancer », BLBC) (Hon et al. 2016).



**Figure 9 : Résumé schématique des différents sous-types moléculaires de cancer du sein : luminal A, luminal B, HER2e (« HER2+ ») et TNBC (prévalence, récepteurs exprimés, grade histologique, pronostic et réponse aux thérapies médicales) (Wong 2012)**

Les sous-types moléculaires de cancer du sein sont associés à différents pronostic. Les patients ayant des tumeurs de sous-type luminal A ont le meilleur pronostic, alors que ceux ayant un TNBC ou BLBC ont le pire pronostic (Hon et al. 2016). Les options de traitements diffèrent également selon le sous-type moléculaire du cancer du sein du patient. Les sous-types luminal A, luminal B et HER2e sont sensibles aux traitements ciblés, tandis que les patients ayant un TNBC n'ont recours qu'à la chimiothérapie (Barnard, Boeke et Tamimi 2015 ; Hon et al. 2016 ; Parker et al. 2009).

#### 1.2.2.3 Stades du cancer du sein

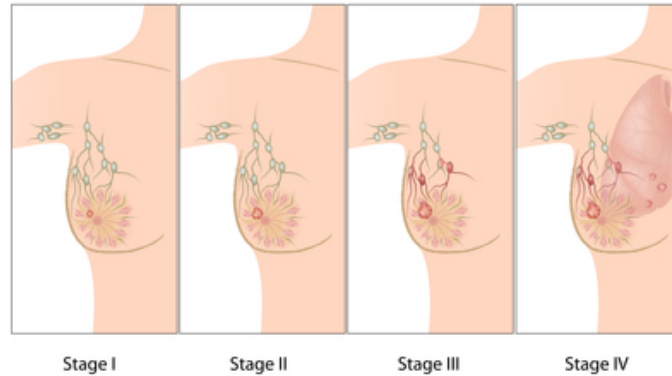
Dans le cancer du sein, la progression linéaire de la tumeur mammaire suppose la transition graduelle des lésions du sein d'un état d'hyperplasie pré maligne à un carcinome non-invasif local, comme un carcinome canalaire *in situ* (« ductal carcinoma *in situ* », DCIS) non-invasif (Wiechmann et Kuerer 2008). Ensuite, le cancer devient un carcinome invasif local qui peut métastaser vers divers organes, tels que les poumons, les os et le foie (Medina 1996 ; Wiechmann et Kuerer 2008). La transition entre le DCIS et les métastases est caractérisé par plusieurs stades sur une échelle de 0 à IV (Figure 10) (Medina 1996). La qualification du stade de cancer se base sur quatre caractéristiques : la grosseur de la tumeur, l'état invasif ou non-invasif du cancer, la présence de cellules cancéreuses dans les nœuds lymphatiques et la présence de cellules cancéreuses dans d'autres organes du corps, au-delà du sein

(Breastcancer.org 2017).

**Tableau 1 : Classification des différents stades du cancer du sein**

| Stades         | Dimension des tumeurs                                        | Localisation du cancer                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Stade 1</b> |                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Stade 1A       | Deux (2) cm ou moins.                                        | Dans le sein.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Stade 1B       | Deux (2) cm ou moins ou aucune tumeur détectée dans le sein. | Dans peu de ganglions lymphatiques (ne mesurent pas plus de deux (2) mm).                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Stade 2</b> |                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Stade 2A       | Deux (2) cm ou moins ou aucune tumeur détectée dans le sein. | Dans le sein, et :<br>Dans un (1) à trois (3) ganglions lymphatiques axillaires, ou ganglions lymphatiques à l'intérieur du thorax, et/ou ganglions mammaires internes.                                                                                                             |
|                | Plus de deux (2) cm et moins de cinq (5) cm.                 | Dans le sein.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Stade 2B       | Plus de deux (2) cm et moins de cinq (5) cm.                 | Dans le sein, et :<br>Dans un (1) à trois (3) ganglions lymphatiques axillaires et/ou ganglions lymphatiques mammaires.                                                                                                                                                             |
|                | Plus de cinq (5) cm.                                         | Dans le sein.                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>Stade 3</b> |                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Stade 3A       | Cinq (5) cm ou moins ou aucune tumeur détectée dans le sein. | Dans le sein, et :<br>Dans quatre (4) à neuf (9) ganglions lymphatiques axillaires, ou; Dans des ganglions lymphatiques mammaires internes.                                                                                                                                         |
|                | Plus de cinq (5) cm.                                         | Dans le sein, et :<br>Dans un (1) à neuf (9) ganglions lymphatiques axillaires ou ganglions lymphatique mammaire interne, ou;<br>Dans un (1) à trois (3) ganglions axillaires et ganglions mammaires internes.                                                                      |
| Stade 3B       |                                                              | Dans le sein, et :<br>Dans les muscles de la paroi thoracique et/ou la peau, ou;<br>Dans un (1) à neuf (9) ganglions lymphatiques axillaires ou des ganglions lymphatiques mammaires internes, ou;<br>Dans un (1) à trois (3) ganglions axillaires et ganglions mammaires internes. |
| Stade 3C       |                                                              | Dans le sein, et :<br>Dans au moins dix (10) ganglions lymphatiques axillaires ou infra-claviculaires, ou;<br>Dans plus de trois (3) ganglions lymphatiques axillaires et ganglions lymphatiques mammaire internes, ou;<br>Aux ganglions lymphatiques sus-claviculaires.            |
| <b>Stade 4</b> |                                                              | Dans le sein, et :<br>À l'extérieur du sein pour aller envahir différents organes du corps, comme la peau, les os, le foie, le cerveau, les poumons et les ganglions lymphatiques distants.                                                                                         |

(Société canadienne du cancer 2017, Breastcancer.org 2017)



**Figure 10 : Représentation schématique des différents stades de cancer du sein.** Du stade I (« Stage I »), au stade II (« Stage II »), puis au stade III (« Stage III ») et enfin au stade IV (« Stage IV ») (*Société canadienne du cancer 2017*)

#### 1.2.2.4 Grades du cancer du sein

Le grade décrit l'apparence de cellules cancéreuses en comparaison à celle de cellules non cancéreuses. Les cellules cancéreuses d'une tumeur d'un cancer du sein peuvent avoir un grade de 1 à 3 (*Société canadienne du cancer 2017*). Dans le cancer du sein de type carcinome canalaire *in situ* (« ductal carcinoma *in situ* », DCIS), le grade histologique de la tumeur se base sur le degré de différenciation des cellules qui composent le tissu tumoral, l'apparence de leurs noyaux et la présence de cellules cancéreuses nécrosées (*Société canadienne du cancer 2017*). Les cellules cancéreuses d'un DCIS de grade 1 ont des petits noyaux de même forme et il n'y a aucune nécrose dans l'échantillon (*Société canadienne du cancer 2017*). Les cellules cancéreuses d'un DCIS de grade 2 ont des petits noyaux de même forme et il y a des petites zones nécrosées dans l'échantillon (*Société canadienne du cancer 2017*). Les cellules cancéreuses d'un DCIS de grade 3 ont des gros noyaux, de forme inégale et l'échantillon a peut-être des zones nécrosées (*Société canadienne du cancer 2017*). Pour établir le grade histologique d'un cancer invasif, il s'agit d'évaluer semi-quantitativement les caractéristiques morphologiques suivantes : le degré de formation de tubules (cellules dans la tumeur ayant des structures tubulaires appelés tubules), le polymorphisme nucléaire et le compte mitotique (Rakha et al. 2010). Les cellules d'un cancer invasif de grade 1 sont bien différenciées et ressemblent beaucoup à des cellules normales. Le risque de propagation de la tumeur est minime (*Société canadienne du cancer 2017*). Les cellules d'un cancer invasif de grade 2 sont modérément différenciées, elles se divisent plus rapidement que la normale et présentent une atypie nucléaire plus prononcée (*Société canadienne du cancer 2017*, *Breastcancer.org 2017*). Enfin, Les cellules

d'un cancer invasif de grade 3 sont des cellules totalement dédifférenciées qui prolifèrent rapidement. Le risque de propagation devient alors élevé (*Breastcancer.org* 2017).

#### 1.2.2.5 Rôle des jonctions dans la glande mammaire et la cancérogenèse

Comme déjà mentionné, l'épithélium de la glande mammaire comprend deux couches cellulaires : une couche interne de cellules épithéliales luminales et une couche externe de cellules basales, surtout composée de cellules myoépithéliales, entourées de la MB (Weigelt et Bissell 2008). Cet épithélium subit des cycles de prolifération, de différenciation et d'apoptose en réponse aux signaux environnants et aux hormones. Ce processus requiert une étroite régulation de ces signaux, en plus des interactions épithéliales-myoépithéliales, et une communication directe entre les cellules adjacentes par le biais de protéines de jonctions (Geddes 2007 ; Hennighausen et Robinson 2005 ; Macias et Hinck 2012 ; McLachlan, Shao et Laird 2007). Une dérégulation dans l'expression de ces protéines de jonctions a été associée au cancer du sein (Knights et al. 2012 ; Morris, Young et Dawson 2008).

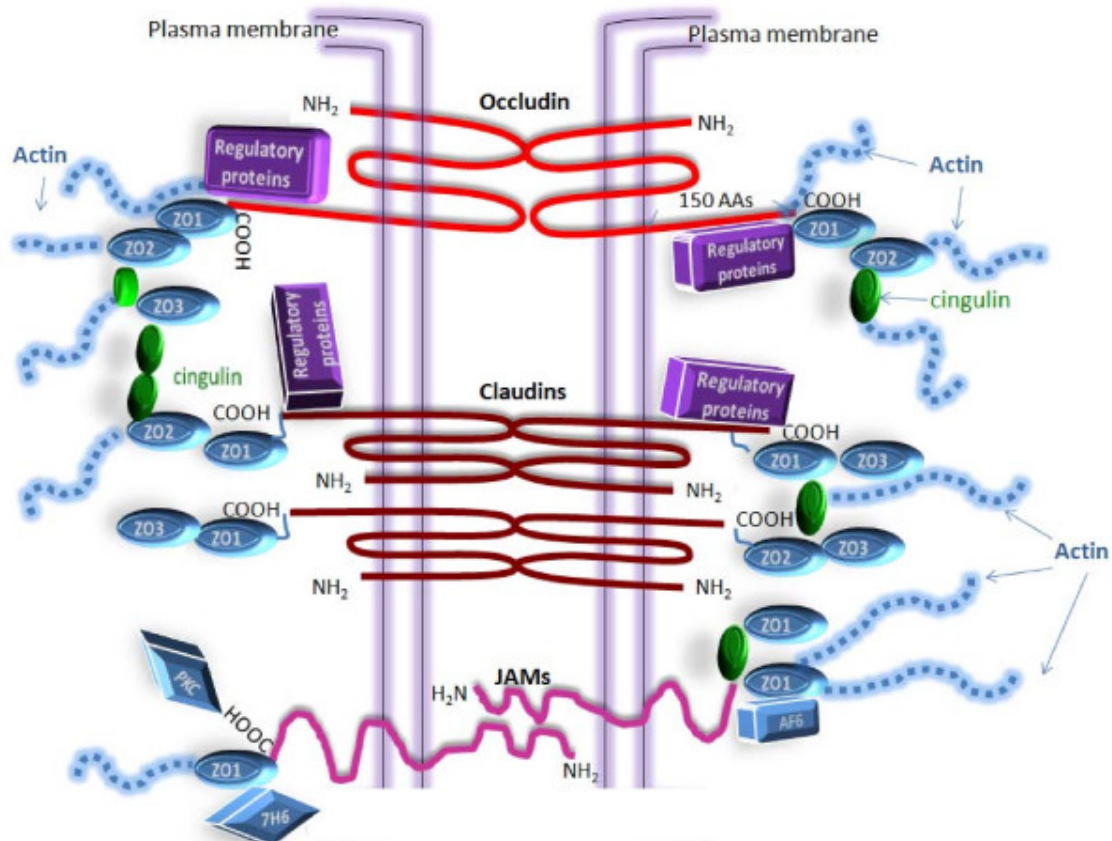
### 1.3 Les jonctions intercellulaires

Dans les tissus épithéliaux de la glande mammaire, les interactions entre cellules sont médiées, entre autres, par des complexes jonctionnels intercellulaires qui comprennent les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions lacunaires (Alberts 2002). Chaque type de jonctions intercellulaires possède une morphologie, une composition et des fonctions distinctes (Farquhar et Palade 1963).

#### 1.3.1 Jonctions serrées

Les jonctions serrées (JS) comptent trois types de protéines transmembranaires : les claudines, l'occludine et les molécules d'adhérence jonctionnelles (« junctional adhesion molecules », JAMs) (Figure 11). Les JS sont ancrées à l'actine du cytosquelette par des protéines adaptatrices, comme la *zonula occludens* (ZO) et la cinguline (Bazzoun, Lelievre et Talhouk 2013 ; Itoh et Bissell 2003 ; Niessen 2007). Les protéines adaptatrices ZO, plus spécifiquement la ZO-1 et la ZO-2, sont importantes pour la liaison des claudines et de l'occludine (Figure 11) (Niessen 2007). Les JS sont les composantes les plus apicales des complexes jonctionnels intercellulaires (Figure 11) (Itoh et Bissell 2003).

Il existe quatre fonctions majeures aux JS (Markov, Aschenbach et Amasheh 2017). D'abord, les JS forment une barrière caractérisée par une perméabilité sélective de molécules entre les cellules. Cette régulation de transport paracellulaire permet de séparer les compartiments de différentes compositions (Tsukita, Furuse et Itoh 2001). Ensuite, les JS établissent une polarité cellulaire en marquant la frontière entre deux zones de la membrane plasmique. Cette frontière prévient le mélange des composants lipidiques et protéiques des domaines apical et basolatéral de la membrane plasmique pour maintenir la polarité cellulaire (Itoh et Bissell 2003 ; Schneeberger et Lynch 1992 ; Spring 1998). Puis, elles ont également une fonction de signalisation. Des molécules de signalisation et du cytosquelette sont recrutées au domaine intercellulaire des JS. Ce recrutement permet une cascade de signalisations résultant en une translocation de protéines vers le noyau pour se lier à des facteurs de transcription, ou pour agir comme facteurs de transcription, et pour réguler l'expression génique (Itoh et Bissell 2003 ; Tsukita, Furuse et Itoh 2001). Enfin, la fonction de stabilisation de JS permet de maintenir l'intégrité de l'épithélium, comme sa structure tridimensionnelle (Stelwagen et Singh 2014). L'intégrité des JS des cellules luminales de l'épithélium mammaire est primordiale pour la sécrétion de lait durant la lactation, entre autres en empêchant le lait de fuir du lumen (Itoh et Bissell 2003).



**Figure 11 : Représentation schématique des composants moléculaires des jonctions serrées entre deux cellules adjacentes.** Celles-ci incluent les protéines transmembranaires (claudines, occludine et JAMs), les protéines d'échafaudage (ZO 1, 2 et 3, et cinguline) et les protéines régulatrices (par exemple, protéine kinase C, tyrosine kinase et phosphatidylinositol triphosphate). Les protéines transmembranaires des jonctions serrées sont liées à l'actine du cytosquelette par les protéines d'échafaudage. (Redzic 2011)

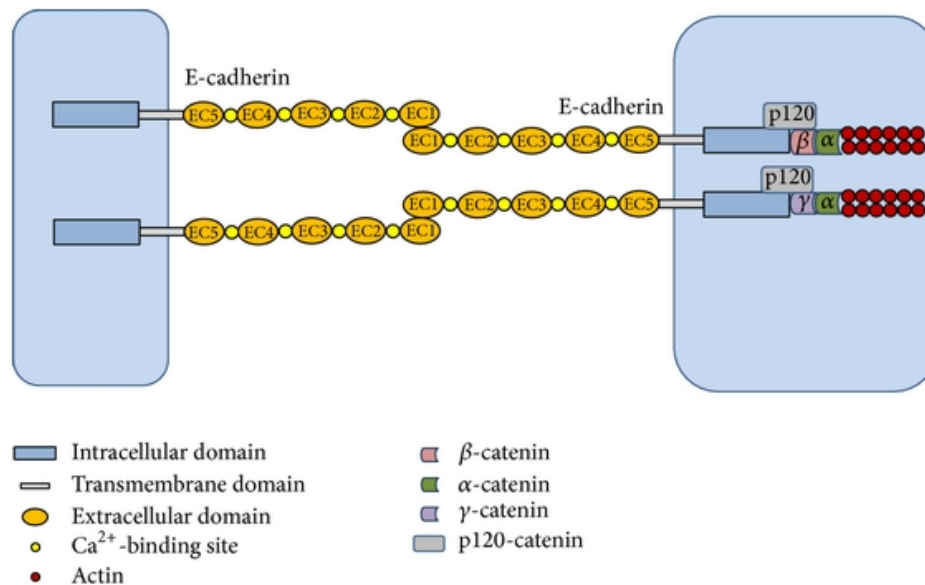
### 1.3.2 Jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes (JA) sont composées d'une famille de protéines transmembranaires, les cadhérines, dont le domaine extracellulaire se lie via des interactions homophiliques avec la cadhérine d'une cellule adjacente (Meng et Takeichi 2009). Le domaine intracellulaire de la cadhérine s'associe à des protéines, les caténines, qui forment un complexe cytoplasmique. Ce complexe est composé d' $\alpha$ -caténine, de  $\beta$ -caténine, d' $\gamma$ -caténine (plakoglobine) et de caténine p120 (Knudsen et Wheelock 2005). Ce complexe cytoplasmique permet de relier les homodimères de cadhérines à des composants du cytosquelette, tels que les filaments d'actine et les microtubules (Figure 12) (Meng et Takeichi 2009). Ces complexes cadhérine-caténines s'organisent pour former un velcro structural qui relie le réseau du cytosquelette de cellules adjacentes (McEwen, Escobar et Gottardi 2012). Dans l'épithélium, les JA forment une ceinture



continue d'adhérence, appelée *zonula adherens*, positionnée autour de chaque cellule (Niessen 2007). La *zonula adherens* d'une cellule coïncide parfaitement à celle d'une cellule adjacente dans un même épithélium. Elle est positionnée immédiatement sous les JS dans les complexes jonctionnels intercellulaires. Ainsi, les JA permettent de maintenir une adhérence entre des cellules adjacentes. Une perturbation de ces associations occasionne un relâchement des contacts cellule-cellule, menant à une désorganisation de l'architecture tissulaire qui a été associée au cancer (Meng et Takeichi 2009). Dans un épithélium tumoral dont les cellules ont subi une transition épithéliale-mésenchymateuse (« Epithelial-mesenchymal transition », EMT), une expression inappropriée de N-cadhérine a été remarquée (Cavallaro, Schaffhauser et Christofori 2002). Cette EMT est une modification du phénotype cellulaire caractérisée par la perte de l'adhérence cellulaire et par une plus grande motilité cellulaire. Cela permet l'invasion des cellules tumorales. La N-cadhérine est reconnue comme étant un marqueur de cette transition (Wu, Sarkissyan et Vадgama 2016). Les JA ont également un rôle à jouer dans la signalisation. Les protéines p120 et  $\beta$ -caténine, lorsqu'elles ne sont pas liées aux JA, peuvent interagir avec des facteurs de transcription nucléaires pour modifier l'expression génique dans une cellule (Knudsen et Wheelock 2005). L'action de  $\beta$ -caténine dans la voie de signalisation de Wnt est bien documentée, ainsi que sa translocation nucléaire lors de l'EMT (McEwen, Escobar et Gottardi 2012).

La E-cadhérine (épithéliale), N-cadhérine (neurale), P-cadhérine (placentaire) et R-cadhérine (rétinale) sont toutes exprimées dans la glande mammaire (Hazan et al. 1997 ; Paredes et al. 2002 ; Radice et al. 2003 ; Sommers 1996). Dans l'épithélium normal de la glande mammaire, la E-cadhérine est exprimée par les cellules épithéliales luminales, alors que les cellules myoépithéliales expriment la P-cadhérine (Daniel, Strickland et Friedmann 1995). Ainsi, la E-cadhérine permet de mailler les cellules épithéliales luminales entre elles, alors que la P-cadhérine fait de même auprès des cellules myoépithéliales entre elles (Knudsen et Wheelock 2005). La N-cadhérine est exprimée dans les cellules mésenchymateuses du stroma de la glande mammaire et la R-cadhérine est présente dans les cellules épithéliales de la glande mammaire (Agiostatridou et al. 2009 ; Andrews, Kim et Hens 2012).

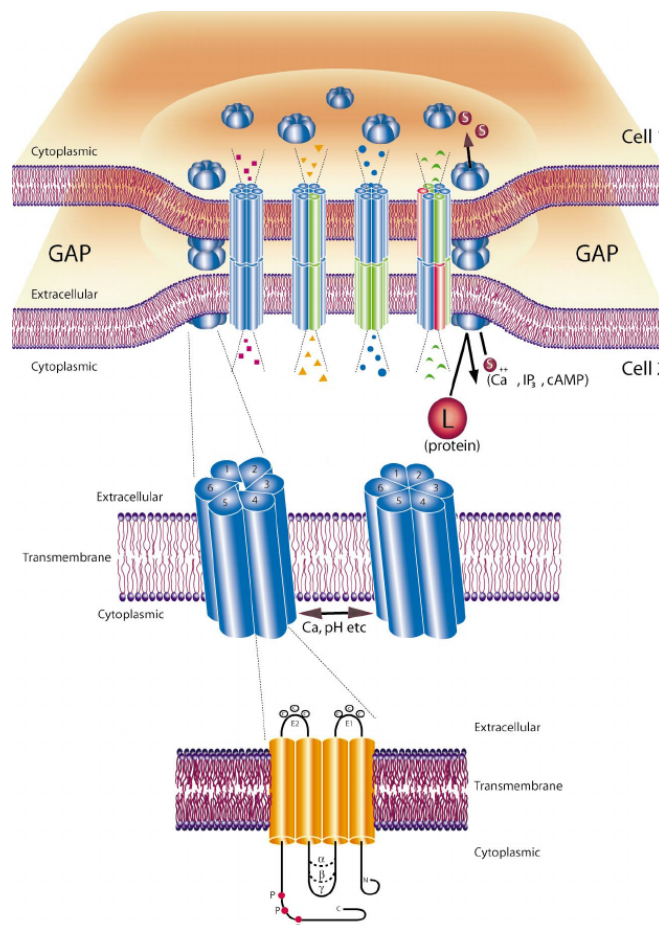


**Figure 12 : Représentation schématique des composants moléculaires des jonctions adhérentes entre deux cellules adjacentes.** Le domaine extracellulaire cadhérine interagit avec l'actine du cytosquelette en passant par les protéines caténines cytoplasmiques : α-caténine, β-caténine, γ-caténine et caténine p120. La conformation de la cadhérine est stabilisée par la liaison d'ions calcium aux motifs extracellulaires de la protéine (X. Liu et Chu 2014)

### 1.3.3 Jonctions lacunaires

Les jonctions lacunaires (JL) sont des jonctions communicantes intercellulaires formées de sous-unités protéiques appelées connexines (Cxs) (Stewart, Simek et Laird 2015). Une connexine est une protéine composée de quatre domaines transmembranaires hélices-α, de deux boucles extracellulaires et d'une boucle intercellulaire. Les extrémités N-terminale et C-terminale sont toutes deux cytoplasmiques (Figure 13) (Baranova et al. 2004). Chez l'humain, il existe 21 membres de la famille des connexines (Laird 2006). Six connexines s'oligomérisent en hexamère pour former un connexon, qui peut s'assembler avec le connexon d'une cellule adjacente. Se forme alors un canal intercellulaire (Laird 2006). Un regroupement compact de quelques-uns ou de centaines de canaux intercellulaires définit une plaque jonctionnelle (ou jonction lacunaire). Cette jonction lacunaire permet l'échange direct de petites molécules entre des cellules adjacentes (Figure 13) (Alexander et Goldberg 2003). Les ions et les seconds messagers, tels que le calcium, l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>), l'adénosine diphosphate (ADP) et l'adénosine triphosphate (ATP) sont des exemples d'importantes molécules transjonctionnelles (Laird 2006). La taille des molécules ne peut généralement pas excéder 1kDa (Alexander et Goldberg 2003 ; Bennett et Verselis 1992 ;

Bukauskas et Verselis 2004). Un connexon peut-être formé d'un seul type de connexines ou de différentes sortes de connexines compatibles, menant à la formation d'un connexon homomérique ou hétéromérique, respectivement (Laird 2006 ; Sohl et Willecke 2004). De plus, le niveau de complexité des types de canaux est amplifié lors de l'assemblage de deux connexons de cellules adjacentes pour former des canaux. Un canal homotypique est formé de l'union de deux mêmes connexons homomériques ou hétéromérique, alors qu'un canal hétérotypique est formé de deux différents connexons homomériques ou hétéromériques (Mese, Richard et White 2007). Les propriétés de perméabilité des canaux sont différentes et dépendent des connexines qui composent ce canal (Goldberg, Valiunas et Brink 2004).



**Figure 13 : Représentation schématique des unités permettant la formation d'une jonction lacunaire, ou plaque jonctionnelle, liant le cytoplasme de deux cellules adjacentes.** Six connexines s'assemblent pour former un connexon. La fonction lacunaire est médiée par une ouverture (connexon de gauche) ou une fermeture (connexon de droite) du canal. Des changements dans le pH et dans la concentration en ion calcium peuvent réguler la fonction lacunaire de la jonction (El-Sabban, Abi-Mosleh et Talhouk 2003)

Les connexines sont exprimées par presque tous les types cellulaires des mammifères, incluant les cellules de glandes mammaires. Seules les Cx26 et Cx43 ont été identifiées dans l'épithélium de glande mammaire humaine (Goodenough, Goliger et Paul 1996). Cx26 est exprimée dans les cellules luminales et Cx43 est exprimée dans les cellules myoépithéliales, bien que quelques études suggèrent que Cx43 est exprimé dans les cellules luminales également (Laird et al. 1999 ; Monaghan et al. 1996). De plus, Cx30 et Cx32 ont été détectées par immunofluorescence dans les cellules luminales de la glande mammaire, tout comme il avait été démontré chez la souris (Teleki et al. 2014).

## **1.4 Modèles d'études expérimentaux**

Plusieurs modèles expérimentaux permettent l'étude des fonctions biologiques, du développement ou des pathologies des tissus. Chacun de ces modèles démontrent des avantages et des inconvénients.

### **1.4.1 Modèles *in vivo***

Pour étudier la glande mammaire, les modèles animaux sont sans aucun doute la référence absolue lorsqu'il s'agit d'études concernant les développements cellulaires et moléculaires. Il en va de même pour les travaux d'analyses et de diagnostics (Campbell et Watson 2009). Ces modèles *in vivo* présentent un système intégral qui inclut les systèmes vasculaire, immunitaire et endocrinien de l'animal (Voelkel 2014), la MEC spécialisée et unique à la glande mammaire (Gattazzo, Urciuolo et Bonaldo 2014), auxquelles d'ajoutent toutes les différentes cellules qui la composent (Edmondson et al. 2014). Toutefois, ces modèles sont coûteux, sont longs à réaliser et nécessitent du personnel et des installations spécialisées (Antoni et al. 2015 ; Holen et al. 2017).

### **1.4.2 Modèles *in vitro***

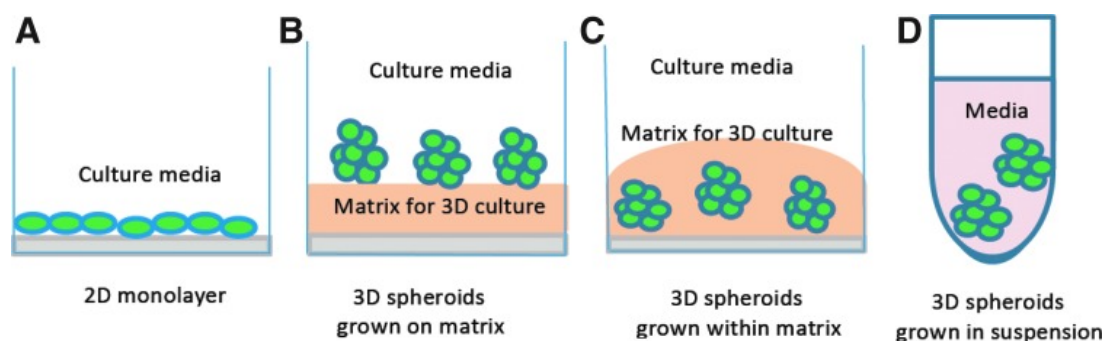
Les essais cellulaires *in vitro* visent plutôt à être un outil simple, rapide et rentable. Elles permettent d'éviter des tests *in vivo* dispendieux et à grande échelle (Campbell et Watson 2009). Les résultats des essais cellulaires *in vitro* sont basés principalement sur les réponses cellulaires des cellules en culture suite à des stimuli externes (Edmondson et al. 2014).

#### 1.4.2.1 Modèles *in vitro* en 2D

À ce jour, la majorité de ces essais cellulaires *in vitro* recourent à la culture en deux dimensions (2D) (Figure 14a). Ce type de culture cellulaire traditionnelle met en jeu la culture de cellules qui adhèrent à des substrats plats et rigides, où elles forment une monocouche. Cette monocouche est composée en grande partie de cellules prolifératives puisque les cellules nécrosées se détachent de la surface et sont retirées du système de culture lors des changements de milieu de culture (Edmondson et al. 2014). Cette disposition en monocouche permet à toutes les cellules en croissance de recevoir, du milieu de culture, une quantité égale de nutriments et de facteurs de croissance (Huang et al. 2013).

#### 1.4.2.2 Modèles *in vitro* en 3D

Dans les dernières années, beaucoup d'efforts ont été consacrés à concevoir une variété de systèmes de culture en 3D. Ces systèmes 3D ont été utilisés pour la recherche visant la découverte de médicaments, pour l'étude de la biologie des cellules cancéreuses et des cellules souches, pour l'étude de la physiologie normale des tissus et pour d'autres analyses cellulaires (Edmondson et al. 2014). Ce type de modèle *in vitro* consiste à cultiver des cellules à l'aide d'une matrice (« with scaffold ») (Figure 14b, 14c, 14d) ou sans matrice (« scaffold-free ») (Figure 14d) afin qu'elles puissent former des sphéroïdes ou des agrégats tridimensionnels.



**Figure 14 : Représentation schématique des quatre types de modèles de culture cellulaire *in vitro*.** La culture traditionnelle en 2D (« 2D monolayer ») contraint les cellules à former une monocouche (A). La culture en 3D peut être déclinée en deux techniques: avec matrice – culture en 3D sur une matrice (« 3D spheroids grown on matrix ») (B) et culture en 3D dans une matrice (« 3D spheroids grown within matrix ») (C) – et sans matrice – culture en 3D en suspension (« 3D spheroids grown in suspension ») (D). (Edmondson et al. 2014)

#### 1.4.2.3 Comparaison des modèles *in vitro* 2D et 3D

Le modèle de culture cellulaire favorisé pour la recherche *in vitro* est celui de la culture en 2D classique. Ce type de modèle présente plusieurs avantages : l'environnement de culture est plus facile à contrôler, il est plus facile d'y observer les cellules, de les mesurer et de les manipuler, contrairement aux cultures en 3D (Shamir et Ewald 2014). De plus, il existe une documentation scientifique étendue à laquelle les résultats obtenus en 2D peuvent être comparées.

Toutefois, dans ce type de culture cellulaire, les composantes de la MEC, la morphologie cellulaire, l'architecture spécifique au tissu, les interactions cellule-cellule et cellule-MEC importantes pour la différenciation, la prolifération et les fonctions cellulaires *in vivo* sont perdues (Mazzoleni, Di Lorenzo et Steimberg 2009). Par exemple, les protéines d'ancrage sont concentrées du côté basal, les interactions cellule-cellule sont limitées au pourtour des cellules (Bokhari et al. 2007), les cellules adoptent une morphologie aplatie ce qui remodèle le cytosquelette et le noyau. Il a été démontré que ces changements modifient l'expression génique et protéique des cellules (Vergani, Grattarola et Nicolini 2004 ; Thomas et al. 2002)

En comparaison, le modèle de culture cellulaire en 3D rétablit les caractéristiques *in vivo* qui étaient perdues en culture 2D. Ce modèle permet d'augmenter les interactions cellule-cellule (Knight et Przyborski 2015). Les récepteurs et les molécules d'adhérence sont uniformément distribués sur l'ensemble de la surface des cellules (Bokhari et al. 2007). Les cellules peuvent s'organiser en structures tridimensionnelles qui rappellent le tissu d'origine. Ces aspects (spatial et physique) des cultures 3D ont un effet sur la traduction du signal de l'extérieur vers l'intérieur des cellules et influencent ultimement l'expression génique et la réponse cellulaire (Edmondson et al. 2014). En effet, il a été démontré que les réponses cellules en culture 3D sont plus semblables à celles observées *in vivo* par rapport aux cellules en culture 2D (Zietarska et al. 2007).

Le modèle de culture 3D imite mieux la situation *in vivo* comparé au modèle classique de culture 2D. Cependant, les systèmes 3D courants n'incluent pas le système vasculaire complexe qui soutient normalement les tissus *in vivo* pour l'oxygénation, l'apport en nutriments et le retrait des déchets cellulaires (Edmondson et al. 2014).

## 1.5 Méthodes de culture des modèles *in vitro* en 3D

### 1.5.1 Méthodes sans matrice

Trois méthodes permettent de générer les sphéroïdes 3D sans matrice (« scaffold-free ») ou en suspension : par la suspension forcée (« forced floating »), par la *goutte suspendue* (« hanging drop ») ou par agitation (Figure 15) (Breslin et O'Driscoll 2013).

#### 1.5.1.1 Méthode de suspension forcée

La méthode de suspension forcée (Figure 15a) consiste à générer des sphéroïdes en évitant que les cellules adhèrent au récipient de culture en modifiant sa surface. Les cellules sont alors contraintes à demeurer en suspension et à former des sphéroïdes (Breslin et O'Driscoll 2013). Par exemple, cette technique a été utilisée pour produire des sphéroïdes de cellules cancéreuses et de cellules normales. Quatre-vingt-seize puits de plaques ont été recouverts avec 0.5% méthacrylate de poly-2-hydroxyéthyl (poly-HEMA), pour prévenir l'adhérence des cellules à la surface des puits de la plaque (Ivascu et Kubbies 2006). Dans cette étude, une suspension cellulaire a été déposée dans chacun des puits et les plaques ont été centrifugées pour encourager les cellules à s'assembler afin de former qu'un seul sphéroïde par puits (Ivascu et Kubbies 2006).

Cette méthode présente certains avantages. Il s'agit d'une méthode simple et reproductible. La grosseur des sphéroïdes formés est réglable en fonction de la concentration cellulaire de l'échantillon déposé dans chaque puits. Les cellules sont libres de produire leur propre MEC plutôt que d'utiliser des matrices prédéfinies (« scaffolds ») (Breslin et O'Driscoll 2013). Cependant, le temps requis pour recouvrir tous les puits des plaques constitue un inconvénient majeur qu'il faut comparer au coût des plaques pré-recouvertes qui peuvent s'avérer très dispendieuses (Breslin et O'Driscoll 2013). Enfin, les cellules ne sont pas libres de former plusieurs sphéroïdes de grosseur naturelle puisqu'un seul sphéroïde est artificiellement formé par puits (Ivascu et Kubbies 2006).

### 1.5.1.2 Méthode de la goutte suspendue

La méthode de *goutte suspendue* (Figure 15b) consiste à déposer une goutte de suspension cellulaire dans les puits sans fond de plaques spécialement conçues à cet effet (« MicroWell MiniTray » ou « 3D Biomatrix »). La goutte d'échantillon de suspension cellulaire devient une goutte suspendue qui est tenue en place par la tension de surface (Breslin et O'Driscoll 2013). Les cellules s'accumulent à la pointe de la goutte, à l'interface liquide-air où elles peuvent proliférer pour former un seul sphéroïde par puit (Breslin et O'Driscoll 2013).

Cette méthode simple et reproductible permet d'obtenir des sphéroïdes compacts où les cellules peuvent suivre leur tendance naturelle à adhérer ensemble et à produire leur propre MEC, plutôt que d'utiliser des matrices prédéfinies (« scaffolds ») (Breslin et O'Driscoll 2013). Un inconvénient potentiel de la méthode de la *goutte suspendue* réside dans le fait que le volume maximal de la goutte se limite à 50µL, incluant le milieu contenant le traitement (Kurosawa 2007). Également, avec cette méthode, il est difficile de changer le milieu de culture sans que l'aspiration du milieu ne perturbe le sphéroïde. L'utilisation de plaques spécialisées peut s'avérer coûteuse (Breslin et O'Driscoll 2013). Aussi, les cellules ne sont pas libres de former plusieurs sphéroïdes de grosseur naturelle puisqu'un seul sphéroïde peut être formé par puits.

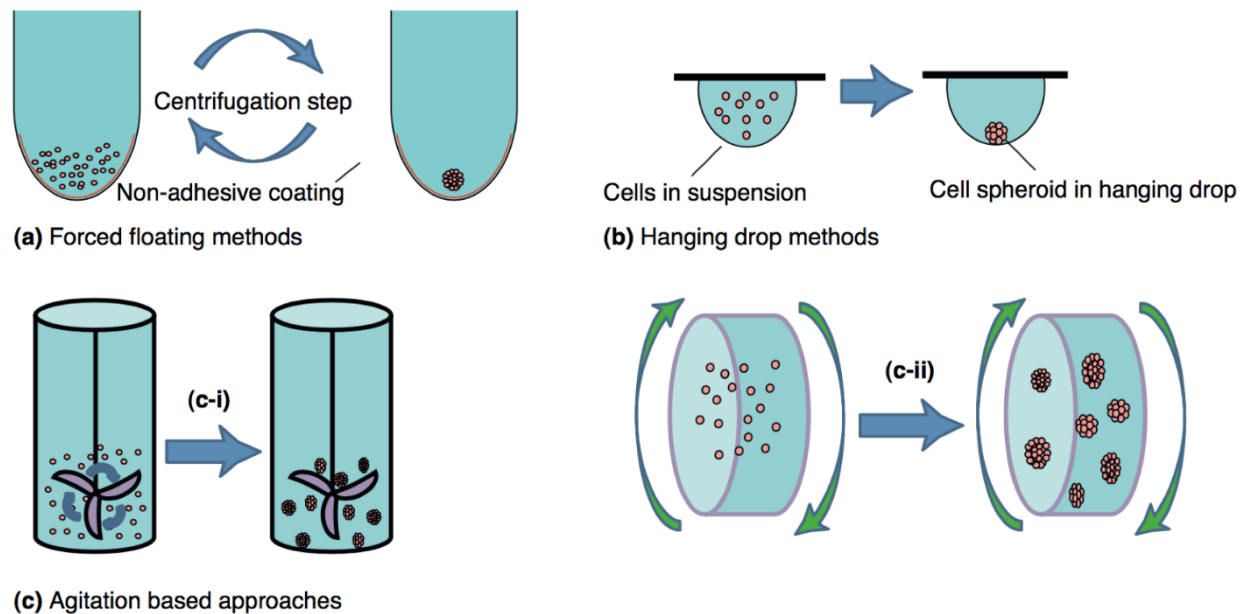
### 1.5.1.3 Approches par agitation

Les approches par agitation peuvent être classifiées en deux catégories: les bioréacteurs à fileur rotatif (« spinner flask bioreactors ») (Figure 15c-i) (Lin et Chang 2008) et les systèmes de culture en rotation (« rotational culture systems ») (Figure 15c-ii) (Goodwin et al. 1993). Toutes les approches par agitation demandent de placer dans un récipient une suspension cellulaire qui est maintenue en mouvement continu et doux : soit à l'aide d'un élément d'agitation (fileur rotatif) (Kim 2005), soit par rotation continue du récipient (Breslin et O'Driscoll 2013). Le mouvement continu des cellules en suspension empêche celles-ci d'adhérer aux parois du récipient et favorise les interactions entre cellules. Cela permet la formation dans la suspension de plusieurs sphéroïdes de différentes grosseurs dans la suspension (Breslin et O'Driscoll 2013).

Cette méthode relativement simple permet une production à grande échelle et de longue durée de cultures 3D. Un autre avantage de cette méthode est la facilité avec laquelle le milieu de culture peut être changé (Barrila et al. 2010 ; Breslin et O'Driscoll 2013). Toutefois, avec



l'utilisation des bioréacteurs à fileur rotatif, la force appliquée sur les cellules en suspension par le remuement du fileur peut porter atteinte à la physiologie cellulaire (Lin et Chang 2008). Aussi, la quantité de milieu de culture nécessaire (environ 100 à 300 mL) aux flasques avec fileur rotatif est beaucoup plus grande que pour les méthodes décrites précédemment (Breslin et O'Driscoll 2013).



**Figure 15 : Représentation schématique des méthodes sans matrice permettant la formation de sphéroïdes.** Ces méthodes incluent la suspension forcée (« forced floating methods ») (a), la *goutte suspendue* (« hanging drop methods ») (b) et l'approche par agitation (« agitation based approaches ») incluant les bioréacteurs à fileur rotatif (« spinner flask bioreactors ») (c-i) et les systèmes de culture en rotation (« rotational culture systems ») (c-ii) (Breslin et O'Driscoll 2013)

### 1.5.2 Méthodes avec matrice

Les cultures en 3D avec une matrice peuvent être générées en déposant des cellules sur une matrice acellulaire (Figure 14b) ou en ensemençant des cellules dans une matrice liquide suivi d'une phase de solidification ou de polymérisation (Figure 14c) (Edmondson et al. 2014). Il existe deux types de matériaux de matrices couramment utilisés : les matrices dérivées de matériaux biologiques et les matrices composées de matériaux synthétiques (Edmondson et al. 2014).

#### 1.5.2.1 Matrices dérivées de matériaux biologiques

Différents types de matrices dérivées de matériaux biologiques sont offertes. Selon une étude, ces types de matrices sont biologiquement pertinentes (Lovitt, Shelper et Avery 2014) et

intrinsèquement biocompatibles et bioactives puisqu'elles sont dérivées de matériaux biologiques (Dawson et al. 2008). En effet, elles sont typiquement composées de protéines et de composantes de la MEC (Tibbitt et Anseth 2009). Par exemple, les matrices d'extraits de membrane basale riche en laminine (EMBrI), commercialement connues sous les noms de Matrigel® Matrix (*Corning Incorporated Life Sciences*), BD Matrigel™ (*BD Biosciences*) ou Cultrex® Basement Membrane Extract (*Trevigen*), sont couramment utilisées (G. Y. Lee et al. 2007). Les EMBrI sont des préparations de membrane basale solubilisées, extraites du sarcome de souris Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). C'est une tumeur riche en protéines de la MEC, comme la laminine, le collagène IV et l'entactine (*Corning Incorporated Life Sciences* 2012-2013).

Pour utiliser ce type de matrice en culture 3D, il est possible d'ensemencer les cellules complètement dans l'EMBrI (Petersen et al. 1992) ou de déposer les cellules sur une mince couche d'EMBrI, puis de les recouvrir d'une solution diluée d'EMBrI (Lelievre et al. 1998). L'EMBrI peut être utilisé pour favoriser l'attachement et la différenciation de cellules dépendantes d'ancrage (Mullen 2004). Par exemple, des neurones, des cellules de Sertoli, des cellules endothéliales vasculaires, des hépatocytes, des cellules de poumons, des cellules de rein et des cellules de glandes, comme la thyroïde, la glande salivaire et la glande mammaire (Wang et Discher 2007).

Il a été démontré que les cellules normales de glande mammaire humaine voient leur différenciation morphologique et fonctionnelle rétablie lorsqu'elles sont cultivées dans l'EMBrI (Weigelt, Ghajar et Bissell 2014). En effet, plusieurs études confirment que des cellules normales forment des sphéroïdes polarisés, semblables à des acini lorsque cultivées dans un EMBrI (Debnath, Muthuswamy et Brugge 2003 ; G. Y. Lee et al. 2007 ; Weigelt et Bissell 2008).

Il est également possible d'utiliser du collagène de type I (Gudjonsson et al. 2002) pour les cultures 3D. Le collagène de type I est une protéine constituée de deux chaînes ( $\alpha 1(I)$  et  $\alpha 2(I)$ ). Ensemble, elles forment une triple hélice. C'est une des composantes protéiques de la MEC (Lodish et al. 2000). Pour des applications en culture 3D, le collagène de type I peut être utilisé comme un gel (le collagène est gélifié préalablement), sur lequel les cellules sont cultivées. Ou, les cellules peuvent être mélangées puis fixées dans le collagène. Ou encore, le collagène peut être utilisé comme un additif au milieu de culture ou même de concert avec d'autres composants de la MB (*Sigma-Aldrich* 2017). Le collagène de type I a été utilisé pour former des structures semblables à des glandes à partir de cellules souches embryonnaires (Chen et al. 2003), pour

former des sphéroïdes d'hépatocytes (Y. J. Wang et al. 2004) et même des structures canalaire de cellules de glande mammaire humaine (Krause et al. 2008).

Le collagène de type I permet l'attachement, la croissance, la différenciation et la migration des cellules (*Sigma-Aldrich* 2017). Un des avantages d'utiliser le collagène de type I tient au fait que cette matrice est dépourvue de facteurs de croissance (*Sigma-Aldrich* 2017). Aussi, c'est un substrat biologiquement défini, peu coûteux à préparer ou à acheter, et il est plus facile de se le procurer (Wang et Discher 2007). Puisque le collagène de type I est une protéine abondante chez les animaux et qu'il est structurellement conservé, les gels de collagène de type I sont bien tolérés pour la culture *in vitro* de cellules animales (Wang et Discher 2007). De plus, l'élasticité d'un gel de collagène de type I peut être modulé (réticulation, changement de pH) (Grant et al. 2009). Enfin, il a été démontré qu'un des avantages de travailler avec le collagène de type I en culture 3D est que les solutions et les molécules peuvent facilement diffuser à travers le collagène. Cela permet de bien marquer les structures cellulairesensemencées, par exemple, pour le marquage à l'immunofluorescence (Wozniak et Keely 2005).

L'acide hyaluronique (AH) est un polysaccharide linéaire d'acide D-glucuronique et N-acétyl-D-glucosamine, en alternance. Tout comme le collagène de type I, l'AH est une composante de la MEC (Chung et Burdick 2009). À ce jour, des matrices à base d'AH ont été développées sous forme d'hydrogels (Mohand-Kaci et al. 2013), d'éponges (Solchaga et al. 1999) et de structures en filet (Brun et al. 1999). Il est possible de modifier des matrices d'acide hyaluronique par l'addition de composantes de la MEC (Sanyal S 2014), comme le collagène (Wang et Spector 2009). Ces matrices à base d'AH sont biocompatibles puisqu'elles peuvent interagir avec les récepteurs de surface pour l'AH des cellules (Chung et Burdick 2009). Ce sont des matrices biologiques qui ont été utilisées pour cultiver en 3D des cellules de prostate (Gurski et al. 2009), des lignées cellulaires métastatiques (David et al. 2008) et des cellules souches neurales (Wang et Spector 2009).

#### *1.5.2.2 Matrices composées de matériaux synthétiques*

Des matrices peuvent aussi être formées de molécules synthétiques comme le polyéthylène glycol (« poly(ethylene glycol) », PEG), l'alcool polyvinylique (« poly(vinyl alcohol) », PVA) et le méthacrylate de poly-2-hydroxyéthyl (poly(2-hydroxyethyl methacrylate)) (Tibbitt et Anseth 2009). Ces matrices composées de matériaux synthétiques sont formées de réseaux de polymères

réticulés maintenus par des liens covalents ou des interactions non-covalentes, comme les interactions ioniques, les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes, les enchevêtrements physiques, ou une combinaison de ceux-ci (Cruz-Acuna et Garcia 2017). La photo-polymérisation et la réaction chimique de réticulation sont les deux méthodes les plus utilisées pour provoquer la réticulation des polymères de matrices composées de matériaux synthétiques (Cruz-Acuna et Garcia 2017).

L'utilisation de matrices synthétiques peut faciliter la reproductibilité des essais cellulaires puisque leur composition est bien définie (Cruz-Acuna et Garcia 2017). Il est possible de moduler leurs propriétés biochimiques et mécaniques pour optimiser les signaux chimiques et biochimiques des cultures cellulaires en 3D (Cruz-Acuna et Garcia 2017). Ces matrices possèdent une teneur en eau élevée, permettant le transport d'oxygène, de nutriments, de déchets et de facteurs solubles essentiels à la fonction des cellules ensemencées (Fang et Eglén 2017). Aussi, plusieurs matrices composées de matériaux synthétiques peuvent être modifiées pour incorporer des ligands d'adhérence cellulaire (Lutolf et Hubbell 2005) et des unités d'acide polylactique ou des séquences peptidiques. Ces dernières peuvent être clivées (Lutolf et al. 2003) afin de biodégrader la matrice dans le but de récupérer les cultures (pertinence pour l'ingénierie tissulaire et médecine régénérative) (Fang et Eglén 2017). Une de ces matrices synthétiques a été utilisée pour cultiver des chondrocytes et il a été démontré que cette matrice a permis de maintenir la viabilité des cellules et le dépôt de MEC (Bryant et Anseth 2002).

## **1.6 Propriétés des modèles *in vitro* en 3D**

### **1.6.1 Structure et composition cellulaire**

Les systèmes de culture cellulaire en 3D sont d'excellents modèles *in vitro* pour promouvoir l'assemblage des cellules en structure rappelant le tissu d'intérêt. Par exemple, les cellules épithéliales normales et les lignées cellulaires non-tumorigéniques de la glande mammaire forment des sphéroïdes ou agrégats, dotés d'un lumen, similaires aux acini de cet organe lorsqu'elles sont cultivées en 3D dans un EMBrl (Barcellos-Hoff et al. 1989 ; Petersen et al. 1992). De plus, les sphéroïdes tridimensionnels sont composés de cellules à différentes phases: proliférative, quiescente, apoptotique, hypoxique et nécrotique (Khaitan et al. 2006 ; Kim 2005). Une telle hétérogénéité cellulaire est comparable à la composition du tissu *in vivo* (Edmondson et al. 2014).

### 1.6.2 Organisation spatiale des récepteurs et protéines jonctionnelles

La formation en sphéroïde ou en agrégat qu'adoptent des cellules cultivées en 3D influence l'organisation spatiale des récepteurs de la MEC et des protéines jonctionnelles de surface (Bokhari et al. 2007). Ils sont répartis sur l'ensemble de la surface des cellules en culture tridimensionnelle, comparativement aux cellules en monocouches. Les cellules peuvent alors recevoir des signaux des cellules adjacentes et de la MEC en établissant des interactions cellule-cellule et cellule-MEC, respectivement (Weigelt et Bissell 2008).

### 1.6.3 Expression de fonctions spécifiques au tissu

La présence ubiquiste de ces interactions en culture tridimensionnelle favorise notamment l'expression de fonctions spécifiques au tissu d'intérêt (Weigelt et Bissell 2008). En effet, en ensemençant les cellules dans un environnement en 3D, plusieurs aspects des fonctions observées *in vivo* peuvent être rétablis en culture *in vitro* (Weigelt et Bissell 2008). Par exemple, il a été démontré que la culture cellulaire en 3D sur de l'EMBrI permet à des cellules épithéliales mammaires de souris de répondre aux hormones lactogéniques, tout comme elles le font *in vivo* (Aggeler et al. 1991 ; Barcellos-Hoff et al. 1989). Ainsi, des cellules épithéliales mammaires de souris produisent et sécrètent des protéines de lait, comme la caséine  $\beta$ , en réponse aux hormones lactogéniques lorsque cultivées en 3D (Aggeler et al. 1991). Il a été démontré que 30 à 40 % des cellules cultivées en 3D sur une matrice à base de collagène de type I et plus de 90 % des cellules cultivées en 3D sur de l'EMBrI produisent de la caséine  $\beta$  (M. L. Li et al. 1987). Comparativement, seulement 2 à 10 % des cellules cultivées en 2D expriment de la caséine  $\beta$  (M. L. Li et al. 1987).

### 1.6.4 Morphologie cellulaire et processus cellulaires

En plus de promouvoir des fonctions spécifiques au tissu d'intérêt, la présence de ces interactions intercellulaires et cellule-MEC favorise une morphologie cellulaire étroitement similaire à leur forme naturelle dans le corps. Cette morphologie similaire à la morphologie *in vivo*, favorise les processus cellulaires qui imitent également plus fidèlement la situation *in vivo* (Gurski et al. 2010). Par exemple, il a été démontré que la morphologie pouvait influencer la prolifération et le profil

d'expression génique et protéique des cellules, ce qui influencera ultimement les réponses cellulaires aux stimuli externes (Birgersdotter, Sandberg et Ernberg 2005 ; Tibbitt et Anseth 2009).

#### 1.6.4.1 Prolifération

Il a été démontré que les cellules épithéliales mammaires cultivées en 2D perdent leur polarité inhérente à leur état *in vivo*. Cela affecte leurs voies de signalisation intracellulaires, incluant celles engagées dans la prolifération (Birgersdotter, Sandberg et Ernberg 2005 ; Roignot, Peng et Mostov 2013). Conséquemment, le taux de prolifération des cultures en 2D différerait de ceux des cultures en 3D. En effet, il a été démontré que des lignées cellulaires, telles que les cellules endométriales cancéreuses EN-1078D, Ishikawa, KLE et RL95-2, affichaient un taux de prolifération réduit lorsque cultivées en 3D dans un EMBrl comparées à celui des lignées cellulaires cultivées en 2D (Fallica et al. 2012 ; Luca et al. 2013 ; Maria et al. 2011). Cette baisse du taux de prolifération avait été quantifiée en fonction de la baisse de l'expression de la protéine PCNA (« proliferating cell nuclear antigen ») et du nombre total de cellules après huit jours en culture (Chitcholtan, Sykes et Evans 2012). De façon similaire, les cellules de la lignée cellulaire épithéliale non-tumorigénique de la glande mammaire humaine démontraient un taux de prolifération plus bas en culture 3D qu'en culture 2D (X. Wang et al. 2010 ; Kenny et al. 2007 ; Petersen et al. 1992). Selon ces observations, il a été proposé que des cellules épithéliales mammaires se développent comme des cellules tumorigéniques lorsque cultivées en 2D, mais qu'elles retournent à leur comportement de croissance normale (taux de prolifération plus bas qu'un taux de prolifération chez les cellules tumorigéniques) lorsque cultivées en 3D dans un environnement comparable à celui *in vivo* (Petersen et al. 1992). Cette inférence ne s'applique qu'à la majorité des cultures tridimensionnelles cultivées à l'aide de matrice (« with scaffold »). Il est également à noter que les taux de prolifération peuvent être plus élevés ou plus bas, en fonction du type cellulaire et du type de culture 3D (avec matrice ou sans matrice) (Chopra, Dinh et Hannigan 1997 ; Torisawa et al. 2005).

#### 1.6.4.2 Expression génique et réponse cellulaire

Les différences de comportement cellulaire observées entre les cultures 2D et 3D proviennent de changements dans l'expression de gènes dans les cellules. Ces changements sont une conséquence de la réaction des cellules à leur microenvironnement : les cellules réagissent différemment en 2D qu'à un environnement 3D plus naturel et comparable à l'environnement *in*

*vivo* (Tibbitt et Anseth 2009). En effet, il a été suggéré que l'environnement extracellulaire influence les cellules et coordonne une cascade de signalisations intracellulaires qui influencent leur destin phénotypique en altérant l'expression des gènes et ultimement celle des protéines (Birgersdotter, Sandberg et Ernberg 2005). (Birgersdotter, Sandberg et Ernberg 2005). En effet, des différences dans les profils d'expression génique entre différents types cellulaires non-tumorigéniques cultivés en 2D versus en 3D ont été démontrées (Birgersdotter, Sandberg et Ernberg 2005). Par exemple, plus de 1700 gènes étaient différentiellement exprimés par des cellules de la lignée cellulaire non-tumorigénique MCF-10A cultivées en 2D en monocouches par rapport à celles cultivées en 3D en sphéroïdes (Yu et al. 2012). Dans cette étude, les gènes identifiés variaient de plus de 1.5 fois avec des changements reproductibles parmi les réplicats biologiques ( $P < 0,05$ ) (Yu et al. 2012). À guise d'exemple, le gène *ECM1* codant pour les protéines de collagène de type 1 de matrice (« matrix proteins collagen 1 ») était exprimé à la hausse de 1,6 fois dans les cultures 3D comparativement aux cultures 2D (Yu et al. 2012). Cela démontre que les MCF-10A étaient plus actives à produire de la MEC lorsqu'elles étaient cultivées en 3D que lorsque cultivées en 2D. Les gènes différentiellement exprimés représentaient de nombreuses voies de signalisation prouvant que les cellules cultivées en 2D et celles en 3D présentent des différences évidentes dans leurs programmes d'expression génique et, ainsi, dans leurs propriétés de voies de signalisation. Voilà pourquoi il est possible d'affirmer que les conditions de culture, dans lesquelles les cellules épithéliales mammaires existent, peuvent significativement influencer l'activation des voies de signalisation (Yu et al. 2012).

Enfin, plusieurs études ont démontré à l'aide de profils métaboliques et de profils de microARN, que l'expression génique des cellules en 3D ressemble davantage à celle des cellules *in vivo* que celle des cellules en 2D (J. Lee, Cuddihy et Kotov 2008 ; Shield et al. 2009 ; Zietarska et al. 2007 ; Smith et al. 2012).

### 1.6.5 Conclusion

Somme toute, les cultures cellulaires en 3D constituent d'excellents modèles *in vitro* pour récapituler :

- La structure et la composition cellulaire semblables à celles du tissu *in vivo*;
- L'organisation spatiale des récepteurs et des protéines jonctionnelles;
- Les réponses cellulaires semblables à celles des cellules du tissu *in vivo*;
- La morphologie cellulaire et les processus cellulaires, similaires à la situation *in vivo* :
  - Prolifération cellulaire
  - Expression génique et protéique
  - Réponses cellulaires
  - etc.

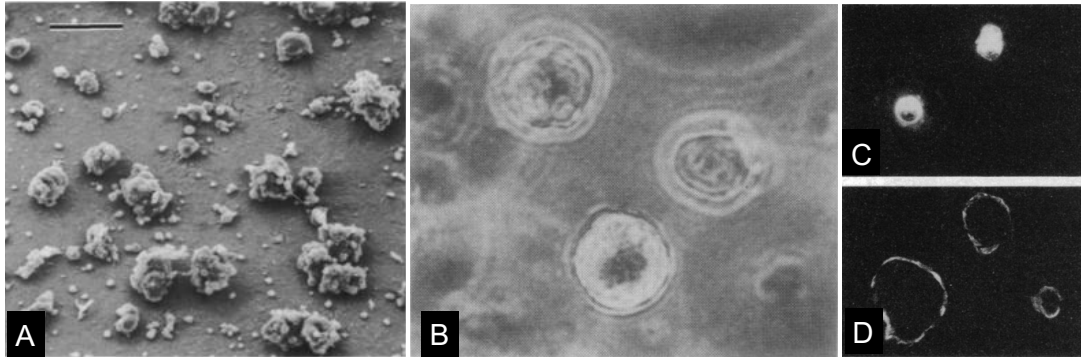
Tout cela, dans un environnement imitant celui *in vivo*.

### 1.7 Modèle *in vitro* de la glande mammaire humaine normale

L'objectif ultime d'un bon modèle consiste à répliquer aussi simplement que possible, d'une manière reproductible et manipulable, le comportement d'un système *in vivo*, tout en étant physiologiquement pertinent (Campbell et Watson 2009). Pour modéliser la glande mammaire humaine *in vitro*, l'acinus bicouche, l'unité fonctionnelle de cet organe, est un bon choix. Ce modèle de glande mammaire permettrait d'étudier à la fois la fonction, la physiologie, les interactions fonctionnelles et la signalisation normale du tissu.

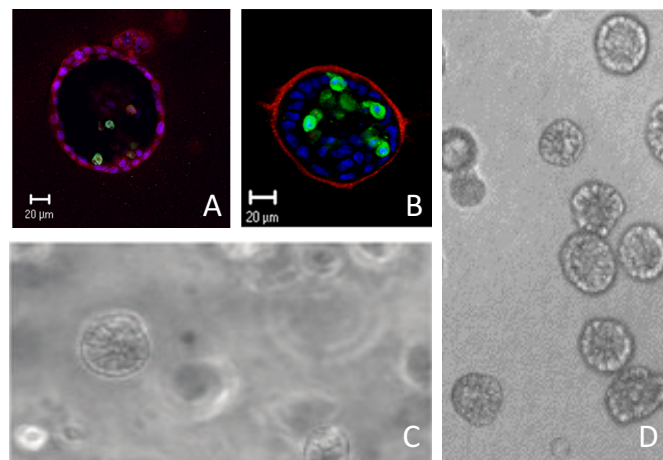
Des systèmes de culture en 3D utilisant des cellules humaines de glande mammaire ont déjà été réalisés, soit à l'aide de cellules primaires épithéliales normales provenant de glande mammaire humaine (Figure 16a) (Barcellos-Hoff et al. 1989), soit au moyen de lignées cellulaires épithéliales non-tumorigéniques (HMT-3522, Figure 16b ou MCF 10A, Figure 16c, 16d et Figure 17a, 17d) (Petersen et al. 1992). Les cellules peuvent être cultivées sur une matrice (Barcellos-Hoff et al. 1989 ; Petersen et al. 1992) ouensemencées dans une matrice (Petersen et al. 1992). Sous ces deux conditions, les cellules formaient des sphéroïdes, dotés d'un lumen, qui rappelaient l'acini de glande mammaire.





**Figure 16 : Formation de sphéroïdes, dotés d'un lumen.** Structures formées à partir de cellules primaires épithéliales normales de glande mammaire humaine (A) et de lignées cellulaires épithéliales non-tumorigéniques de glande mammaire HMT-3522 (B) et MCF 10A (C et D) cultivées en 3D. Microscopie électronique à balayage (A), bar 100µm. Micrographies à contraste de phase (B). Microscopie à double fluorescence pour sialomucine (C) et collagène humain de type IV (D) (Barcellos-Hoff et al. 1989 ; Petersen et al. 1992)

Les lignées cellulaires épithéliales non-tumorigéniques de glande mammaire humaine MCF 10A (Figure 17a, 17d), MCF-12A (Figure 17b) et HMT-3522 S1 (Figure 17c) forment des sphéroïdes polarisés, munis d'un lumen central, similaires aux acini de glande mammaire lorsque cultivées en 3D dans une matrice (G. Y. Lee et al. 2007 ; Debnath, Muthuswamy et Brugge 2003 ; Marchese et Silva 2012). Parfois, ces structures présentaient même un dépôt de composantes de MB (laminine V) et des cellules apoptotiques au lumen central (Marchese et Silva 2012).



**Figure 17 : Sphéroïdes similaires aux acini de glande mammaire humaine cultivés en 3D dans une matrice.** Structures formées de lignées cellulaires épithéliales non-tumorigéniques MCF 10A (A et D), MCF-12A (B) et HMT-3522 S1 (C). Images de microscopie confocale de sphéroïdes colorés par immunofluorescence au moyen d'anticorps contre la laminine V (rouge) et la caspase-3 activée (vert). Contre-coloration des noyaux au To-PRO 3 (bleu) (Marchese et Silva 2012). Micrographies par contraste de phase de sphéroïdes formés de HMT-3522 S1 (C) (G. Y. Lee et al. 2007) ou MCF 10A (D) (Debnath, Muthuswamy et Brugge 2003)

Les systèmes de culture en 3D présentés ci-dessus utilisent des monocultures, c'est-à-dire seulement un type cellulaire. L'avantage d'utiliser des systèmes de culture 3D est de fournir des interactions cellule-cellule et cellule-MEC en monoculture. Cela permet d'étudier les réponses cellulaires dans un environnement qui imite les conditions *in vivo*. De plus, il ouvre la voie à la co-culture de différentes cellules ensemble afin de bien répliquer la complexité histologique de la glande mammaire normale (Campbell et Watson 2009 ; Weigelt, Ghajar et Bissell 2014). De cette façon, plutôt que d'obtenir des sphéroïdes monocouches dotés d'un lumen, il serait possible d'obtenir des sphéroïdes à double couche dotés également d'un lumen, similaires aux acini bicouches de l'épithélium mammaire.

### 1.7.2 Défis des modèles hétérotypiques *in vitro* en 3D

Les défis des cultures hétérotypiques en 3D sont considérables. Il faut d'abord définir le choix des types cellulaires co-cultivés, leurs ratios respectifs en co-culture, la méthode de culture en 3D et les conditions physicochimiques du microenvironnement de culture (Kim, Stein et O'Hare 2004 ; Swamydas et al. 2010).

#### 1.7.2.1 Types cellulaires

La glande mammaire est un tissu complexe, formé de plusieurs types de cellules différents. Une première étape pour former des structures acinaires bicouches, similaires à celles de l'épithélium de la glande mammaire, consiste à introduire des cellules myoépithéliales dans le système de monoculture de cellules luminales épithéliales (Weigelt et Bissell 2008). Un tel modèle d'acinus bicouche en 3D a déjà été réalisé au moyen de cellules primaires luminales et myoépithéliales de glande mammaire humaines (Gudjonsson et al. 2002 ; Runswick et al. 2001). Ce modèle est toutefois difficilement manipulable et reproductible, puisqu'il utilise des cellules primaires. Les cellules primaires qui sont isolées directement des tissus ont une durée de vie limitée à cause du petit nombre de divisions réalisables *in vitro*, ce qui fait entrave aux études à long terme (Vidi, Bissell et Lelievre 2013). En plus d'être généralement difficiles à transfecter (Horibe et al. 2014), elles sont très sensibles et requièrent des milieux de cultures spécialisés contenant des nutriments qui ne sont pas inclus dans les milieux de culture traditionnels. Par exemple, les milieux de culture spécialisés aux cultures primaires sont optimisés pour chaque type cellulaire. Ils contiennent peu ou pas de sérum. Pour compenser, le milieu est additionné de messagers biochimiques comme des facteurs de croissance, des cytokines ou des hormones, et des lipides.

L'addition spécifiques de ces composantes permet de mieux optimiser leur concentration et la composition du milieu de culture. Dans le cas de cultures primaires, l'échantillon peut être contaminé de cellules primaires différentes des cellules primaires d'intérêts (Eibl R et al. 2008). Cette variabilité dans les populations de cellules primaires réduit la reproductibilité expérimentale (Vidi, Bissell et Lelievre 2013).

Un modèle manipulable et reproductible de glande mammaire non-tumorigénique devrait plutôt utiliser des lignées cellulaires de cellules normales. En effet, les lignées cellulaires représentent une population cellulaire pure, ce qui permet d'obtenir un échantillon cohérent et des résultats reproductibles (Kaur et Dufour 2012). Ces types de cellules sont hautement prolifératives et sont plus faciles à cultiver et à transfecter (Eibl et al. 2008).

Le choix du ratio cellulaire avec lequel les cellules serontensemencées dans une culture hétérotypique aura un impact (Weigelt, Ghajar et Bissell 2014). Une analyse au moyen d'un *tri cellulaire activé par fluorescence* (« Fluorescence-activated cell sorting », FACS) a permis de confirmer que les cellules myoépithéliales et lumbinales existent à un ratio 1:1 dans l'épithélium mammaire normal (O'Hare et al. 1991 ; Carter et al. 2017). C'est pourquoi les cellules myoépithéliales et lumbinales devraient êtreensemencées en co-culture à ce ratio pour mieux imiter l'état physiologique et ainsi favoriser la formation d'acini bicouches. Par contre, puisqu'en culture cellulaire, les cellules ont souvent des taux de dédoublement différents (« doubling time »), il peut être nécessaire d'ensemencer les cellules avec un ratio différent afin d'obtenir un ratio 1:1 après quelques jours de culture en 3D.

Enfin, l'optimisation d'un modèle hétérotypique génère le défi supplémentaire de considérer les différents besoins métaboliques et nutritionnels des différents types de cellules en co-culture. En plus du choix de matrice, le type de milieu de culture doit favoriser la croissance et le maintien du phénotype distinctif de chaque type cellulaire (Weigelt et Bissell 2008).

#### 1.7.2.3 Méthode de culture *in vitro* en 3D

Le choix de méthode de culture tridimensionnelle pour obtenir un acinus bicouche *in vitro* est critique. Comme indiqué plus tôt, il existe plusieurs méthodes pour cultiver des cellules de glande mammaire en 3D. Elles peuvent être catégorisées en systèmes avec matrice (« with scaffold ») et sans matrice (« scaffold-free ») (Knight et Przyborski 2015).

Les modèles de culture sans matrice, comme la suspension forcée, la *goutte suspendue* (« *hanging drop method* »), l'approche par agitation avec fileur rotatif ou avec un système de culture en rotation, ont tous été utilisés pour des cultures 3D de cellules de glandes mammaires. Comme déjà signalé, il est difficile de contrôler la grosseur des sphéroïdes formés avec une approche par agitation, ce qui met en question la reproductibilité du modèle (Vantangoli et al. 2015). Aussi, par les méthodes de suspension forcée et de *goutte suspendue*, les cellules sont encouragées à s'assembler artificiellement pour former un seul sphéroïde. Les cellules ne sont pas libres de former de façon autonome et naturelle des structures rappelant les acini des glandes mammaires (Breslin et O'Driscoll 2013). C'est pourquoi la majorité des cellules de glandes mammaires cultivées au moyen de ces systèmes sans matrice sont des cellules tumorigéniques, comme les MCF-7 (Vantangoli et al. 2015), les MDA-MB-231 (Ivascu et Kubbies 2006) ou les T-47D (Ivascu et Kubbies 2006), utilisées pour obtenir des sphéroïdes tumoraux qui répliquent *in vitro* les tumeurs (Vinci et al. 2012).

Les modèles de culture avec matrice (« *with scaffold* ») sont des systèmes de culture de choix utilisés par plusieurs équipes de recherche pour concevoir des cultures tridimensionnelles de la glande mammaire humaine. Effectivement, les lignées cellulaires épithéliales non-tumorigéniques de la glande mammaire humaine MCF 10A (Krause et al. 2008), MCF-12A (Marchese et Silva 2012) et HMT-3522 S1 (G. Y. Lee et al. 2007) ont toutes déjà été cultivées à l'aide de matrices.

#### 1.7.2.4 Conditions physicochimiques du microenvironnement de culture

Plusieurs matrices dérivées de matériaux biologiques et composées de matériaux synthétiques ont été étudiées comme alternatives à la MEC pour des modèles cellulaires 3D. Néanmoins, chaque matrice diffère dans sa capacité à permettre la formation de modèles 3D de la glande mammaire. Le type de microenvironnement dans lequel les cellules sont cultivées en 3D, est un élément critique de tout modèle. Il module la morphologie et le comportement des cellules ensemencées (Carey, Martin et Reinhart-King 2017) (Hongisto et al. 2013). Une matrice idéale pour une co-culture supporterait à la fois les cellules luminales et myoépithéliales, et devrait imiter la MEC *in vivo* de l'épithélium mammaire par la présence des ligands appropriés pour maintenir une fonction épithéliale normale (Campbell et Watson 2009).

Les matrices composées de matériaux synthétiques seraient appropriées pour un modèle 3D *in vitro* de glandes mammaires puisqu'elles ont les avantages d'une composition chimique définie et de propriétés mécaniques modulables (Knight et Przyborski 2015). Ainsi, les matrices synthétiques assurent une reproductibilité du modèle. Toutefois, les matériaux synthétiques qui composent ces matrices peuvent manquer de sites d'adhérence cellulaire que possèdent les protéines de la MEC. Donc, ils peuvent nécessiter alors un revêtement de MEC naturelle pour tenter d'imiter le microenvironnement dans lequel les cellules de la glande mammaire résident naturellement (Knight et Przyborski 2015). Aussi, les conditions physiques extrêmes (ex. : photopolymérisation) et la toxicité de certains solvants nécessaires à la réticulation des matrices synthétiques ne sont pas compatibles avec la viabilité cellulaire (Campbell et Watson 2009).

À la différence, les matrices dérivées de matériaux biologiques fournissent un microenvironnement plus biocompatible et contenant plus de sites d'adhérence cellulaire (Knight et Przyborski 2015).

Dans une étude très récente, il a été démontré qu'une matrice à base de collagène de type I permet la formation de l'architecture en bicouche de l'acinus à partir de cellules primaires myoépithéliales et lumenales normales isolées, alors que l'EMBrI ne le permettait pas (Carter et al. (2017). Ces résultats sont contradictoires avec ceux d'autres études qui démontraient plutôt que le collagène de type I n'était pas favorable à la formation d'un acini bicouche (Carey, Martin et Reinhart-King 2017). En effet, il a été démontré que l'utilisation d'une matrice à base de collagène de type I induit une expression génique mésenchymateuse et un phénotype épithélial invasif MT1-MMP-dépendant contrairement à l'utilisation de l'EMBrI (Carey, Martin et Reinhart-King 2017). La métalloprotéase matricielle transmembranaire de type 1 (« membrane type-1 matrix metalloproteinase », MT1-MMP) est une enzyme protéolytique connue pour être responsable de la dégradation de la MEC et de contribuer au processus d'invasion et de progression du cancer (Jiang et al. 2006). Donc, cette étude conclut qu'il faut éviter d'utiliser le collagène de type I pour la formation d'acini bicouches.

De plus, il existe une différence significative de composition entre la MEC de la MB, directement en contact avec l'épithélium, et celle du tissu stromal (Carey, Martin et Reinhart-King 2017). En effet, alors que la MB épithéliale est un maillage mince et dense composé principalement de laminine et de collagène de type IV (LeBleu, Macdonald et Kalluri 2007), la MEC stromale consiste en un réseau fibrillaire, structuralement hétérogène, dominé par le collagène de type I

(Carey, Martin et Reinhart-King 2017). Puisque la composition de la MB régule le phénotype des cellules épithéliales par l'intermédiaire de signaux par le biais des récepteurs transmembranaires, comme les intégrines (Lu, Weaver et Werb 2012), il n'est pas surprenant d'observer des différences matrice-dépendantes au niveau de l'expression protéique et une réponse phénotypique tributaire (Carey, Martin et Reinhart-King 2017). Ces hypothèses ont été confirmées dans une étude utilisant des cellules de la lignée cellulaire épithéliale non-tumorigénique mammaire humaine MCF 10A cultivées dans un EMBrl ou dans une matrice à base de collagène de type I (Carey, Martin et Reinhart-King 2017). Dans cette étude, les matrices d'EMBrI et de collagène de type I représentaient respectivement la MB et la MEC stromale. Les cellules MCF 10A cultivées dans le collagène de type I démontraient une expression génique de signature plus mésenchymateuse par rapport aux cellules cultivées dans du EMBrl (Carey, Martin et Reinhart-King 2017), puisque des protéines comme la vimentine, la fibronectine, Snail, et la MT1-MMP étaient exprimées. De plus, les cellules MCF 10A cultivées dans l'EMBrI formaient des sphéroïdes acinaires, alors qu'elles formaient graduellement des sphéroïdes invasifs et perdaient leur morphologie ronde pour une morphologie plutôt stellaire et protrusive lors de l'ajout graduel de collagène de type I à l'EMBrI (Carey, Martin et Reinhart-King 2017). Cette étude se prononce également contre l'utilisation de collagène de type I pour la formation d'acini bicouches.

L'effet phénotypique tributaire d'une modulation de l'expression génique matrice-dépendante a été démontré par une étude dans laquelle des cellules de la lignée cellulaire non-tumorigénique de la glande mammaire humaine MCF 10A étaient cultivées dans le collagène ou dans l'EMBrI (Krause et al. 2008). Elles formaient des structures canalaire lorsqu'ensemencées dans le collagène, mais formaient plutôt des structures acinaires lorsqu'ensemencées dans le Matrigel® (Krause et al. 2008). Ces études démontrent que pour favoriser la formation de structures comme l'acini bicouche dans le but de modéliser la glande mammaire *in vitro*, il est préférable d'utiliser une matrice qui avantage la formation des structures acinaires et une expression génique épithéliale plutôt que mésenchymateuse. Ces études favorisaient donc également l'utilisation d'EMBrI plutôt que du collagène de type I.

Ainsi, toutes ces études suggèrent donc qu'il est préférable d'utiliser un EMBrl, comme le Matrigel®. En effet, ce type de matrice fournit un contexte structurel et fonctionnel adéquat pour étudier les événements contribuant au maintien de la morphologie et de la fonction normale de

l'épithélium mammaire. De plus, il permet d'étudier les événements qui provoquent une perturbation des structures et qui mènent potentiellement au cancer du sein.

#### **1.7.2.5 Rigidité du microenvironnement de culture**

Il a été démontré que la différenciation des cellules épithéliales mammaires est dépendante des stimuli mécaniques du microenvironnement cellulaire (Levental et al. 2009 ; Paszek et al. 2005 ; Provenzano et al. 2009), et que la rigidité de la MEC régule l'homéostasie du tissu (Paszek et al. 2005). En effet, il a été démontré qu'une matrice plus rigide entraîne une hausse de la croissance cellulaire et une altération de l'organisation de cellules épithéliales mammaires normales (Paszek et al. 2005).

Il a également été démontré que la rigidité de la MEC favorise l'activation et l'agrégation d'intégrines et des complexes d'adhérence focale (AF) (Wei et al. 2008 ; Friedland, Lee et Boettiger 2009). Les intégrines et les complexes protéiques d'AF en aval sont des mécanosenseurs. Ils détectent, puis font la transduction des signaux mécaniques en signaux biochimiques dans la cellule (Yeh et al. 2017). Dans le cas d'une MEC plus rigide, l'agrégation résultante des complexes d'AF coordonne l'organisation du cytosquelette d'actine de la cellule. La motilité cellulaire, la migration cellulaire et plusieurs fonctions cellulaires sont ainsi affectées (Yeh et al. 2017).

En accord avec ces principes, il a été démontré que le microenvironnement tumoral est plus rigide que le tissu normal (Paszek et Weaver 2004) et qu'à elle seule, la rigidité de la matrice est suffisante pour induire des changements phénotypiques chez les cellules épithéliales (Carey, Martin et Reinhart-King 2017).

Les changements phénotypiques et fonctionnels des cellules en réaction à la rigidité de leur MEC sont fondamentaux à la réponse cellulaire subséquente. C'est pourquoi le choix de rigidité de la matrice est important dans la conception d'un modèle de glande mammaire *in vitro*.

### **1.8 Lignées cellulaires utilisées dans cette étude**

Il existe quelques lignées cellulaires commerciales de cellules épithéliales luminales non-tumorigéniques pouvant être utilisées en 3D. La lignée cellulaire choisie pour cette étude est la MCF-12A. À l'opposé, il n'existe qu'une seule lignée cellulaire de type myoépithéliale offerte commercialement, la lignée cellulaire Hs 578Bst.

### 1.8.1 Les cellules MCF-12A

Les cellules de la lignée MCF-12A sont de type épithélial et dérivent de tissus de la glande mammaire d'une femme souffrant de la maladie fibrokystique du sein (*American Type Culture Collection* 2017). C'est une lignée qui a été immortalisée spontanément. Il a été démontré que les cellules de la lignée MCF-12A adoptent une morphologie d'organoïdes multidimensionnels rappelant des acini de glandes mammaires lorsque cultivées en 3D (Hansen et al. 2009 ; Kenny et al. 2007 ; Marchese et Silva 2012). Il est donc envisageable que ces cellules puissent également former des acini bicouches.

### 1.8.2 Les cellules Hs 578Bst

Les cellules de la lignée Hs 578Bst, non-transformées et immortalisées spontanément, dérivent de tissus normaux, périphériques à un carcinosarcome (Hackett et al. 1977). Ces cellules normales et diploïdes sont adhérentes et démontrent une morphologie fibroblastique en culture (*American Type Culture Collection* 2017). Également, elles possèdent des marqueurs spécifiques des cellules myoépithéliales, comme la vimentine, la p63, la calponine et l' $\alpha$ -actine de muscle lisse (Curschellas, Matter et Regenass 1987 ; Russell et al. 2015).

## 1.9 Problématique

Bien que beaucoup d'efforts ont été consacrés à concevoir une variété de systèmes de culture en 3D pour étudier la physiologie normale de la glande mammaire humaine, la majorité des études ont recours à une seule lignée cellulaire épithéliale luminale ou à des co-cultures de cellules primaires épithéliales luminales et myoépithéliales. Même si l'utilisation d'une monoculture permet d'obtenir un modèle d'acinus de glande mammaire polarisé, il demeure physiologiquement non pertinent puisque les cellules myoépithéliales en sont absentes. De la même manière, l'utilisation de cellules primaires produit un modèle bicouche, mais peu manipulable et peu reproductible. À ce jour, il n'existe toujours pas de modèle d'acinus bicouche de la glande mammaire humaine, utilisant des cellules épithéliales luminales et myoépithéliales, qui soit reproductible, manipulable et physiologiquement pertinent pour étudier la physiologie normale de la glande mammaire humaine.



## Rationnel et hypothèse de travail

D'abord, il est connu qu'il est possible de cultiver ensemble plusieurs types cellulaires ensembles en co-culture, *in vitro*, pour former un modèle hétérotypique d'un tissu, comme l'épithélium mammaire. Ce modèle multicellulaire est plus physiologiquement pertinent considérant la diversité cellulaire de son épithélium bicouche. C'est pourquoi il a été proposé que l'introduction de cellules myoépithéliales dans les systèmes de monoculture cellulaire de cellules épithéliales luminales constitue un premier pas vers la conception d'un modèle hétérotypique d'épithélium mammaire. Cet ajout permettrait de reproduire l'unité fonctionnelle de l'épithélium mammaire : l'acinus bicouche. De plus, il a été démontré que la culture cellulaire en 3D permet aux cellules de s'organiser en structures qui imitent leur architecture *in vivo* (c'est-à-dire, en acini bicouches). Cet arrangement permettrait d'étudier la physiologie normale du tissu et la présence des complexes jonctionnels intercellulaires dans un contexte plus physiologiquement pertinent que dans celui de la culture bidimensionnelle en monocouche. Aussi, il a été démontré que l'utilisation de lignées cellulaires plutôt que des cultures primaires permet de produire un modèle plus reproductible et manipulable. L'hypothèse de ce projet de recherche est donc que des cellules d'une lignée cellulaire épithéliale luminale, non-tumorigénique, humaine, en co-culture 3D avec des cellules d'une lignée cellulaire myoépithéliale, non-tumorigénique, humaine, formeraient des acini bicouches, semblables à ceux trouvés dans l'épithélium mammaire humain.

## Objectifs

L'objectif de cette étude vise à concevoir et à optimiser un modèle de co-culture en 3D de l'unité fonctionnelle de la glande mammaire humaine, l'acinus bicouche, à l'aide de deux lignées cellulaires distinctes, soit la lignée cellulaire épithéliale luminale MCF-12A, qui forme la couche interne de l'acinus, et la lignée cellulaire myoépithéliale Hs 578Bst, qui forme la couche externe de l'acinus. Plus spécifiquement, ce projet a pour but de produire un modèle physiologiquement pertinent, manipulable et reproductible qui sera 1) optimisé pour obtenir un bon rendement d'acini bicouches et dont 2) les acini produits seront caractérisés.

## CHAPITRE 2: LUMINAL MCF-12A AND MYOEPITHELIAL-LIKE HS 578BST CELLS FORM 3D BILAYERED ACINI SIMILAR TO HUMAN BREAST

**Traduction française du titre** : Les cellules luminales MCF-12A et myoépithéliales Hs 578Bst forment des structures bicouches 3D *in vitro* semblables aux acini du sein humain

### 2.1 Présentation des auteurs

#### 2.1.1 Auteurs

**Anne Weber-Ouellette**, étudiante à la maîtrise en sciences expérimentales de la santé, INRS-Institut Armand-Frappier

**Mélanie Busby**, étudiante au doctorat en biologie, INRS-Institut Armand-Frappier

**D<sup>re</sup> Isabelle Plante**, directrice de recherche, INRS-Institut Armand-Frappier

#### 2.1.2 Contributions des auteurs

Toutes les expériences et toutes les optimisations de protocole contribuant à la rédaction de cet article ont été réalisées en majorité par Anne Weber-Ouellette et en partie par Mélanie Busby. Mélanie Busby a réalisé les expériences avec les lignées cellulaires SCp2 et SCg6. Dre Isabelle Plante a supervisé la progression du projet. L'article a été rédigé par Anne Weber-Ouellette, en collaboration avec sa directrice de recherche, Dre Isabelle Plante, et Mélanie Busby.

### 2.2 Résumé de l'article

La glande mammaire est un organe complexe, organisé en épithélium ramifié et supporté par le stroma. L'unité fonctionnelle de l'épithélium mammaire est l'acinus à double couche formé d'une couche interne de cellules luminales entourée d'une couche de cellules basales composées majoritairement de cellules myoépithéliales. Cette recherche vise à concevoir un modèle *in vitro* d'une co-culture tridimensionnelle de l'acinus bicouche. Un modèle qui soit reproductible, manipulable, afin d'étudier les interactions entre les deux couches. Deux différentes combinaisons de cellules ont été cultivées dans le Matrigel: les cellules de souris SCp2 et SCg6, ou les cellules humaines MCF-12A et Hs 578Bst. Le ratio cellulaire et la concentration de Matrigel

ont été optimisés. Les acini obtenus ont été analysés par microscopie confocale en utilisant des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine) et myoépithéliaux ( $\alpha$ -actine de muscle lisse). Les cellules SCp2 et SCg6 formaient des structures tridimensionnelles distinctes, alors que les cellules MCF-12A et Hs 578Bst formaient quelques acini bicouches. Ce modèle *in vitro* d'acini bicouches nous permettra de comprendre le rôle des interactions entre les cellules luminales et myoépithéliales dans le développement normal du sein.

## 2.3 Article

### **Luminal MCF-12A and myoepithelial-like Hs 578Bst cells form bilayered acini similar to human breast**

Anne Weber-Ouellette<sup>1</sup>, Mélanie Busby<sup>1</sup> and Isabelle Plante<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>INRS – Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, H7V 1B7, Canada <sup>2</sup> For correspondence: Isabelle Plante INRS-Institut Armand-Frappier 531 boul. Des Prairies Laval, QC H7V 1B7 isabelle.plante@iaf.inrs.ca

**Running title:** 3D in vitro model of bilayered acini

Submitted to Future Science OA journal.

#### 2.3.1 Abstract

The mammary gland is a complex organ, structured in a ramified epithelium supported by the stroma. The epithelium's functional unit is the bilayered acinus, made of a layer of luminal cells surrounded by a layer of basal cells mainly composed of myoepithelial cells. The aim of this study was to develop a reproducible and manipulable three-dimensional co-culture model of the bilayered acinus *in vitro* to study the interactions between the two layers. Two different combinations of cell lines were co-cultured in Matrigel: SCp2 and SCg6 mice cells, or MCF-12A and Hs 578Bst human cell lines. Cell ratios and Matrigel concentration were optimized. The resulting acini were analysed by confocal microscopy using epithelial (E-cadherin) and myoepithelial ( $\alpha$ -smooth muscle actin) markers. SCp2 and SCg6 cells formed distinct three-dimensional structures, whereas MCF-12A and Hs 578Bst cells formed some bilayered acini. This *in vitro* bilayered acini model will allow us to understand the role of interactions between luminal and myoepithelial cells in the normal breast development.

**KEYWORDS:** Breast/co-culture/Hs 578Bst cells/MCF-12A cells/Matrigel

### 2.3.2 Introduction

The human mammary gland consists of two compartments: the stroma and the epithelium. The mammary epithelium is organized in a ramified lobulo-alveolar system. In humans, 15 to 20 lobes in each breast converge in ducts toward the nipple. Each lobe is itself sub-divided in lobules, and each lobule consists of many acini grouped together (Hassiotou & Geddes, 2013). The acinus is considered to be the functional unit of the mammary gland. The whole ramified lobulo-alveolar system of the epithelium consists of a central lumen bordered by an inner layer of luminal cells surrounded by an outer layer, mainly comprised of myoepithelial cells. The epithelium is separated from the mammary stroma by a basement membrane (Su, Shankar et al., 2011). In the acini, the myoepithelial cells form a basket-like network surrounding the luminal cells (Sopel, 2010).

The stroma surrounding the breast epithelium is comprised of extracellular matrix (ECM), of mesenchymal and immune cells, as well as of blood and lymphatic vessel cells (Weigelt, Ghajar et al., 2014). The basement membrane is a type of specialized ECM mainly composed of type IV collagen and laminin-1 (Leblond & Inoue, 1989). In addition to physically supporting the epithelium, the stroma's components transmit signalling cues to the epithelium including through transmembrane receptors, such as integrins, to the cytoskeleton of the cell, which ultimately impinges on chromatin and nuclear function to maintain tissue integrity (Bissell, Hall et al., 1982). Hence, the environment in which cells grow, or in which cells are cultured *in vitro*, impacts their morphological organization and tissue-specific functions (Weigelt et al., 2014). Traditionally, cultured cells are grown in a two dimensional (2D) monolayer. They adhere and grow on a flat surface, and adopt a flatter and more stretched out phenotype compared to *in vivo*. This abnormal cell morphology alters cellular processes such as cell proliferation, differentiation, apoptosis, as well as gene and protein expression (Tibbitt & Anseth, 2009). Consequently, cells cultured in 2D may not behave as they would in tissues (Huh, Hamilton et al., 2011).

To overcome the limitations of traditional 2D cell culture and to adequately mimic the *in vivo* microenvironment, cells must be cultured in three dimensions (3D). This type of culture allows cells to freely assemble in multidimensional structures, called spheroids, using a scaffold/matrix or in a scaffold-free manner (Edmondson, Broglie et al., 2014). By adopting this *in vivo*-like 3D relationship to each other, cells better can form cell-cell and cell-ECM interactions, establish appropriate cell-signalling pathways to maintain tissue function and mimic the cellular processes

occurring in the human body (Edmondson et al., 2014). This difference between 2D and 3D culture regarding cellular processes and response, through the modulation of gene expression, has been observed several times (Chitcholtan, Asselin et al., 2013; Mabry, Payne et al., 2016; Pineda, Nerem et al., 2013). In fact, distinct patterns in gene expression profiles between tissue samples and cell lines of varying phenotypes demonstrated adaptation of cells to their culture microenvironment (Birgersdotter, Sandberg et al., 2005; Kenny, Lee et al., 2007).

Most 3D cell culture systems mimicking mammary gland acini are monocultures, using only the luminal cells (Debnath, Muthuswamy et al., 2003; Lee, Kenny et al., 2007; Marchese & Silva, 2012). Yet, to thoroughly recapitulate the histological complexity of the normal human mammary gland, luminal cells must crosstalk with EMC or scaffolds, but also with myoepithelial cells (Radisky, Hagios et al., 2001). *In vivo*, myoepithelial cells interact physically and by paracrine signalling with the layer of luminal epithelial cells, and are critical for the proper polarisation of the luminal cells (Gudjonsson, Ronnov-Jessen et al., 2002). Heterotypic models of the human mammary gland have been developed using luminal MCF-10A cells, adipocytes and human fibroblasts in a mixture of laminin-rich basement membrane extract (lrBME) matrix/collagen on porous silk protein scaffold (Wang, Sun et al., 2010). While this model represents progress towards an *in vitro* acinus-like structure composed of multiple cell types, it uses complex matrices and scaffolds, whereby myoepithelial cells are absent. Bilayered acini composed of a mix of purified human luminal and myoepithelial cells isolated from normal mammary glands have also been developed (Gudjonsson et al., 2002). However, because they are formed using primary cultures, they are hardly genetically manipulable. There is thus still a great need for a simplified, optimized, genetically manipulable, reproducible and physiologically relevant model to recapitulate the normal structure of the functional unit of the human mammary gland – the bilayered acinus (Campbell & Watson, 2009).

This study aimed to develop a model representing the breast bilayered acini that can be genetically manipulated and easily reproduced by using cell lines. Here, two combinations of cell lines were tested: 1) the human non-tumorigenic luminal and myoepithelial-like cells MCF-12A and Hs 578Bst; and 2) the murine non-tumorigenic luminal and myoepithelial cells SCp2 and SCg6 (Desprez, Roskelley et al., 1993).

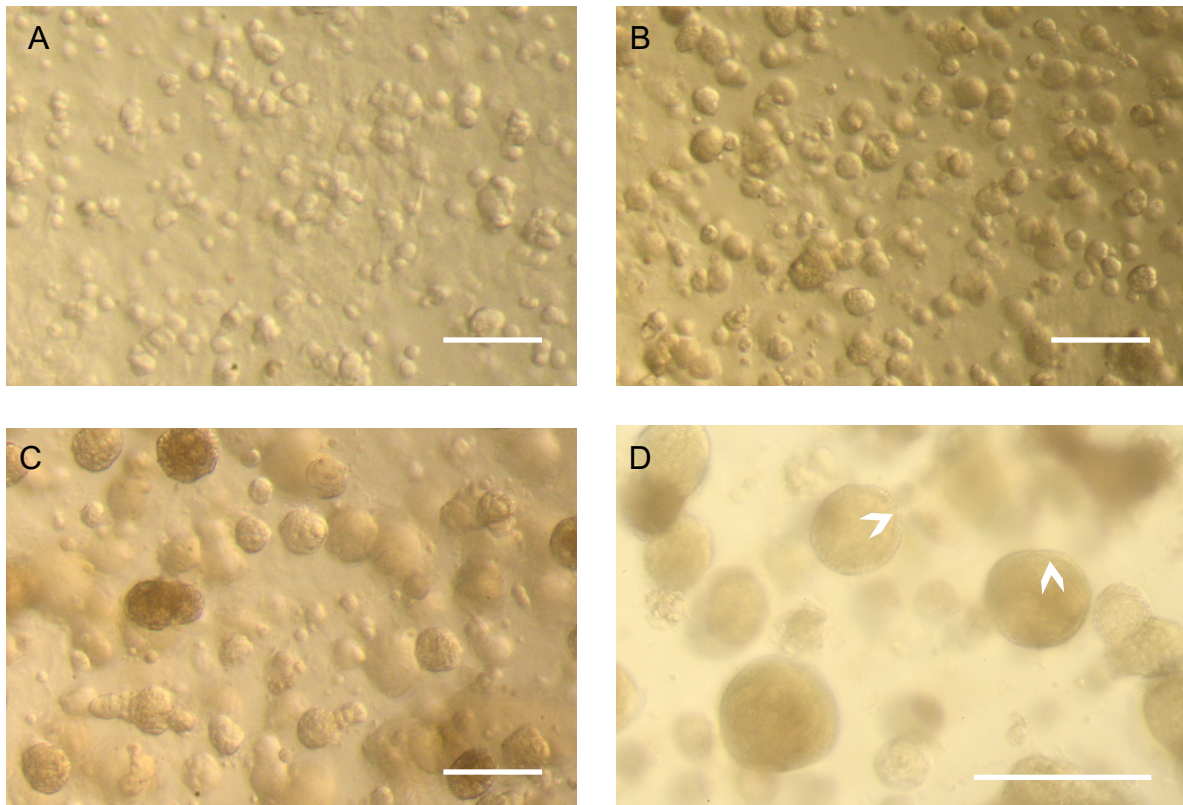
### 2.3.3 Results

#### *2.3.3.1 MCF-12A and Hs 578Bst cells showed more differentiated phenotypes than SCp2 and SCg6*

We first confirmed that the selected cell lines were representative of luminal and myoepithelial cells by evaluating the expression of various markers (Supplementary figure 1). While MCF-12A and Hs 578Bst cells expressed markers typical for luminal and myoepithelial cell types respectively, some markers were present in both SCp2 and SCg6 cells (Supplementary figure 1).

#### *2.3.3.2 MCF-12A and SCp2 cells embedded in Matrigel form spheroid structures*

We then wanted to confirm that human mammary gland luminal MCF-12A and SCp2 cell can form acini-like structures, as reported in the literature (Marchese & Silva, 2012; Talhouk, Mroue et al., 2008). To do so, MCF-12A were embedded in a 3D matrix consisting of cell culture medium and basement membrane extract, commercially known as Matrigel. After 24 hours in culture, cells already formed small clusters of cells (Figure 1A). After 4 days, small and rounded spheroid structures could be observed (Figure 1B). After 10 days, the spheroids were still present, but were much bigger in size, and the cells that constituted each spheroid could be distinguished (Figure 1C). After 14 days in culture, spheroids maintained their size and more defined round structure started to form in some of the spheroids, similar to the acini of the human mammary gland (Figure 1D). Likewise, SCp2 cells could form acini-like structures with a lumen (Supplementary figure 2A and B).



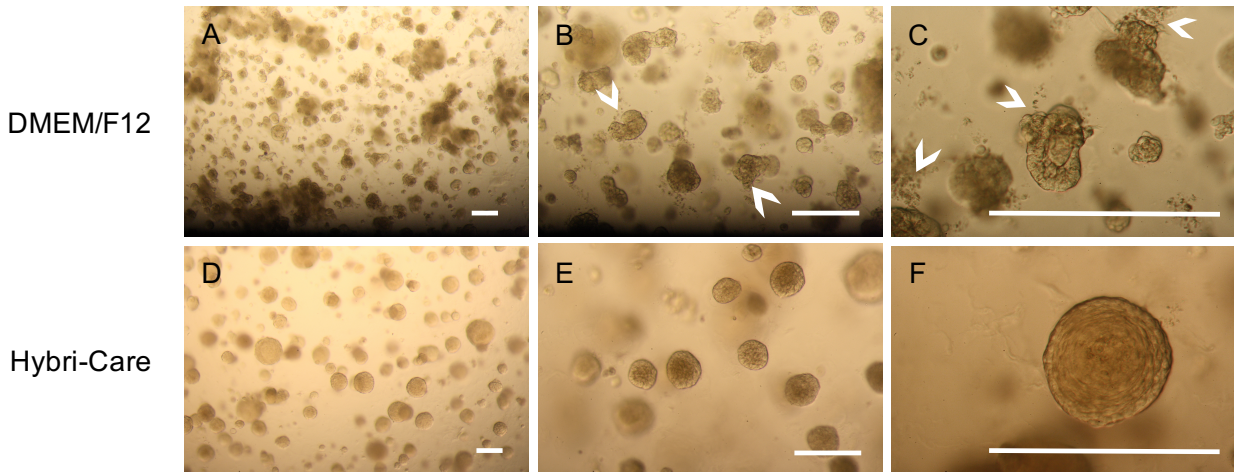
**Figure 1: MCF-12A cell embedded in Matrigel gradually form acini-like structures. (A-D)** Optical microscopy images of MCF-12A. Cells appeared in small clusters after 24h (A). They gradually formed acini-like spheroids after 4 days (B), which grow in size after 10 days (C). 14 days after being embedded in Matrigel, spheroids preserved their size and some of them were more defined, with clear edges (D, arrowheads). Scale bars: 250  $\mu$ m.

#### *2.3.3.3 MCF-12A cells maintained in Hybri-Care culture medium conserved an acini-like structure*

Because Hs 578Bst and MCF-12A cells are typically grown in different media, and because Hs 578Bst cells are more difficult to maintain than MCF-12A cells, we wanted to insure that MCF-12A could still form acini-like structures in Hs 578Bst cells culture media. We thus compared spheroids formed by MCF-12A cells embedded in Matrigel and maintained with either Hybri-Care medium (ATCC<sup>®</sup> 46-X<sup>™</sup>) or phenol red-free DMEM/F12 medium, the media typically used for Hs 578Bst and MCF-12A cells, respectively. While some MCF-12A spheroids showed a defined spherical structure when maintained in DMEM/F12 medium, smaller less defined structures, characterized by a certain looseness in the structure, were also present (Figures 2A-C). These spheroids also displayed what looks like cellular degradation at their edges (Figure 2A-C). Interestingly, when Hybri-Care medium was used to dilute the Matrigel and to maintain embedded



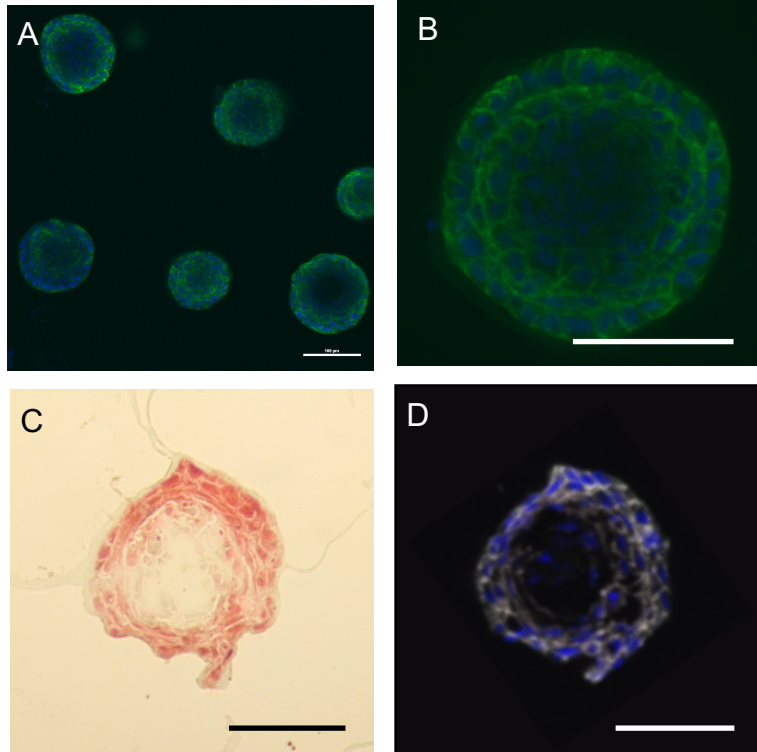
cultures, the cells formed bigger, rounder and more defined acini-like spheroids. These structures were more compact and there was no visual evidence of cellular degradation (Figure 2D-F). These observations suggested that MCF-12A cells can form acini-like structures even more efficiently in Hybri-Care medium. Because SCp2 and SCg6 cells are cultured in the same medium, these optimizations were not necessary.



**Figure 2. Hybri-Care culture medium promotes the formation of more defined acini-like structure compared to DMEM/F12 culture medium.** (A-F) Optical microscopy images of MCF-12A cells embedded in Matrigel after 14 days of culture. When using DMEM/F12 medium to maintain cultures, resulting multicellular structures seem smaller, less defined, and looser (A-C, **arrowheads**) than cells maintained in Hybri-Care medium (D-F). In Hybri-Care medium, acini are bigger, rounder, more defined and more compact. Scale bars: 250  $\mu$ m.

To ensure that these spheroids maintained the lumen characteristic of acini, they were analyzed by confocal microscopy. The acini presented lower cell density at their center, suggesting the gradual apoptotic clearance of cells creating a lumen-like cavity (Figure 3). These results were confirmed by cryosections of MCF-12A acini, either stained using Masson's trichrome staining (Figure 3C) or immunolabeled with  $\beta$ -catenin-specific antibody (Figure 3D). Adherens junctions were formed between luminal cells as demonstrated by the expression of both E-cadherin and  $\beta$ -catenin (Figure 3A, B and D)



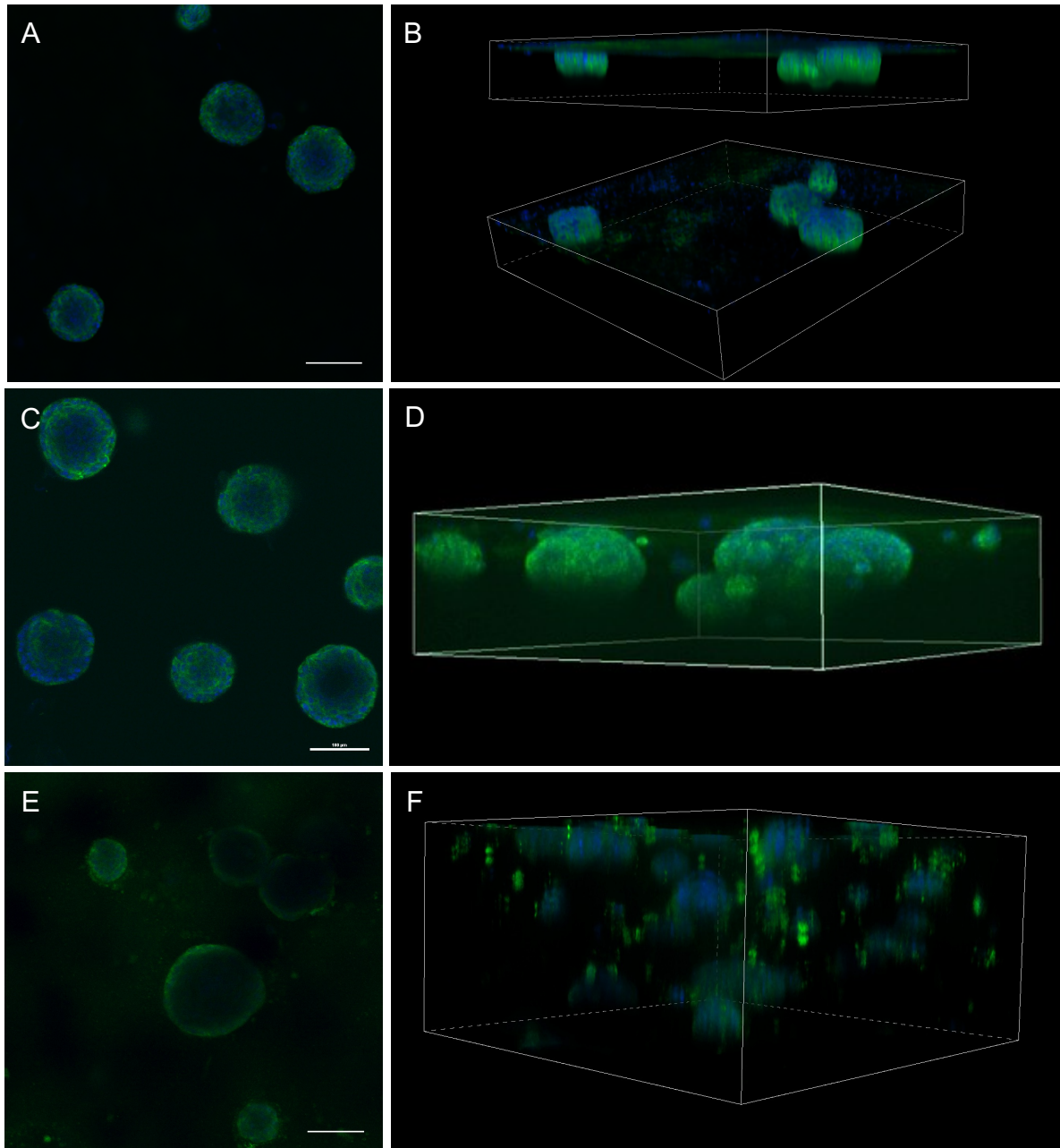


**Figure 3. Presence of a lumen-like cavity in the center of cryosectioned MCF-12A acini.** (A, B) Confocal microscopy images of acini immunolabeled with an E-cadherin (adherens junctions) specific antibody (green). Nuclei are stained with DAPI (blue). (C) Optical microscopy image of an acini cryosection stained with Masson's trichrome staining. (D) Confocal microscopy image of an acini cryosection immunolabelled with a  $\beta$ -catenin (adherens junctions) specific antibody (white). Nuclei are stained with DAPI. Scale bars: 100  $\mu$ m.

#### *2.3.3.4 Dilution of Matrigel to different concentrations impacts spheroid structure and immunolabeling*

To optimize the immunolabeling of the acini-like spheroids, without compromising their 3D structure, we then assessed which Matrigel concentration is most favorable to support round acini formation and to facilitate sufficient antibody penetration in the matrix for decent immunofluorescence imaging. MCF-12A cells were embedded in Matrigel diluted with Hybri-Care medium to achieve concentrations of 50%, 75% and 100% of Matrigel (Figure 4). In wells containing 50% Matrigel, the matrix almost completely liquefied during the immunolabeling procedure, resulting in the loss of many acini during staining procedure. The remaining acini fell to the bottom of the microwell, forming flat structures difficult to properly label with antibodies (Figure 4A and B). On the opposite, in wells containing 100% of Matrigel, the matrix remained rigid in its consistency, resulting in unspecific labeling and smaller acini (Figure 4E and F). Finally, in wells containing a concentration of 75% of Matrigel, the matrix had a soft consistency, but

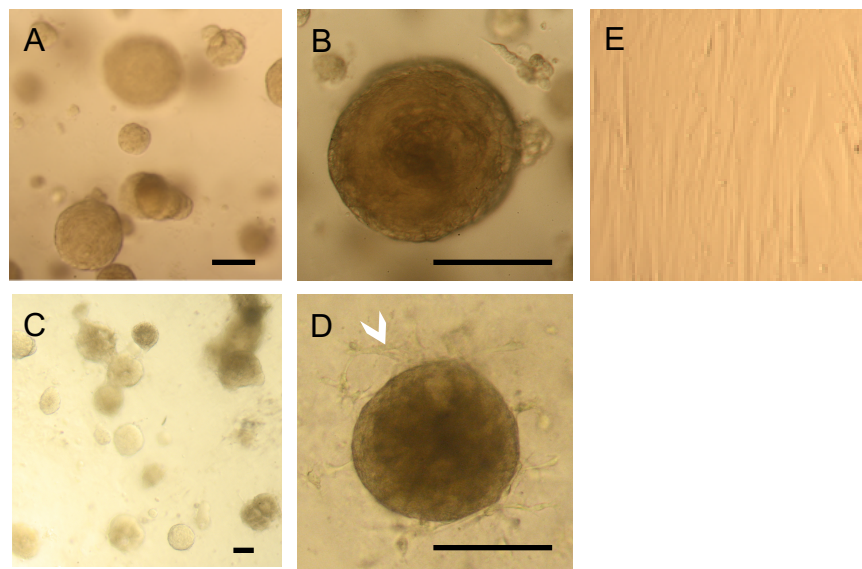
preserved its rigidity through washes, and immunolabeling was specific (Figure 4C and D).



**Figure 4. Matrigel at a concentration of 75% is optimal for 3D culture of MCF-12A cells.** (A, B). Representative single confocal images (A, C, E) or serial Z-stacks (B, D, F) of an MCF-12A cells embedded in 50% (A, B), 75% (C, D) or 100% (E et F) Matrigel and immunolabeled with an E-cadherin antibody (green). Nuclei are marked with DAPI (blue). Scale bars: 100 µm

#### *2.3.3.5 MCF-12A and Hs 578Bst self-organized in spheroids resembling bilayered-like acini*

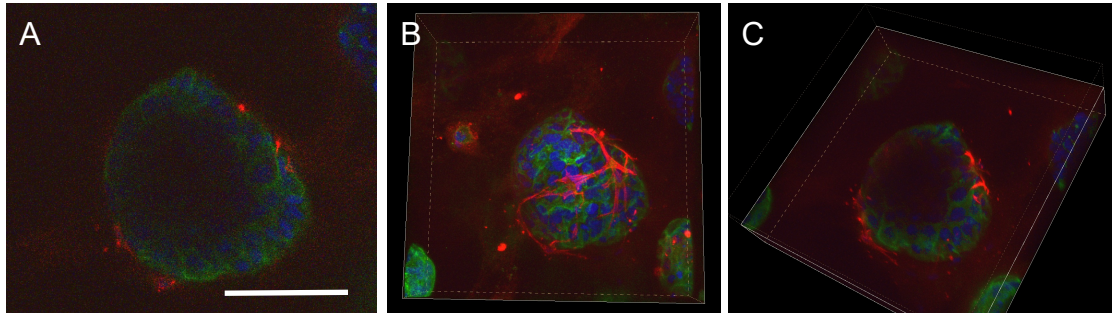
Once culture conditions were optimized for MCF-12A, we co-cultured luminal MCF-12A cells with myoepithelial-like Hs 578Bst cells, as well as SCp2 and SCg6 cells. Similar to when MCF-12A cells were in 3D monoculture (Figure 5A and B), acini-like structures formed when MCF-12A and Hs 578Bst were simultaneously embedded in Matrigel (Figure 5C and D). In the co-culture, however, a second layer of cells seemed to surround some of the acini, suggesting that bilayered acini were formed with both types of cells (Figure 5D, arrowhead). Hs 578Bst cells, when cultured alone, were not able to form spheroids (Figure 5E). On the opposite, SCg6 cells could form spheroids alone or in co-culture with SCp2 (Supplementary figure 2C-E).



**Figure 5. MCF-12A cells co-cultured with Hs578Bst cells produce acini-like structures when embedded in Matrigel.** (A, B) Representative optical microscopy images of MCF-12A cells embedded in Matrigel. (C, D) Optical microscopy images of MCF-12A cells co-cultured with Hs 578Bst cells showing acini-like structures. A second layer of cells seems to be surrounding the first layer in some of the acini (arrowhead), suggesting that myoepithelial cells formed bilayered acini with the luminal cells. (E) Optical microscopy images of Hs 578Bst cells embedded in Matrigel. Scale bars: 100  $\mu$ m. (n=2)

To confirm that these acini were indeed bilayered, we performed immunolabeling using distinct epithelial (E-cadherin) and myoepithelial (smooth muscle actin, SMA) markers. While some spheroids with lumen were present when SCp2 and SCg6 cells were co-cultured in 3D, most structures were undefined spheroids (Supplementary figure 2F). Importantly, none of those structures were bilayered. However, when luminal MCF-12A cells were co-cultured with myoepithelial-like Hs 578Bst cells, bilayered acini were produced (Figure 6). These acini were

composed of an inner layer of luminal cells surrounded by a discontinuous basket-like network of myoepithelial-like cells (Figure 6B). Moreover, the truncated view allowed us to distinguish a lumen in the center of the acini (Figure 6C). From these results, we can conclude that it is possible to create a 3D model of a human bilayered acini *in vitro*, using cell lines.



**Figure 6. MCF-12A and Hs 578Bst co-cultured cells form bilayered acini in Matrigel. (A-C)** Confocal microscopy images of MCF-12A and Hs 578Bst cells forming a 3D bilayered acini when co-cultured in Matrigel. Acini were immunolabeled with an E-cadherin specific antibody (green) and a SMA specific antibody (red). Nuclei are stained with DAPI (blue). Representative single confocal image (**A**), serial Z-stack (**B**) and a truncated view a serial Z-stack (**C**). The myoepithelial-like cells Hs 578Bst have a stellate phenotype, forming a discontinuous basket-like network around the MCF-12A luminal cells. The truncated view suggest the presence of a lumen in the center of the bilayered acini. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$  (n=1)

#### 2.3.4 Discussion

To fully understand the mechanisms that lie behind breast cancer, we first need to understand how a healthy mammary gland functions. Developing a surrogate model of the normal human breast that mimics the architecture and function of the actual organ will help increase our understanding of how breast tissue develops and how specific deregulations, of intercellular junctional complexes for example, influence carcinogenesis. Many techniques have been explored to model and study the human mammary gland *in vitro*. Malignant as well as non-malignant mammary cells have traditionally been studied as monolayer on plastic cell culture dishes, thereby losing their morphological organization and tissue-specific function (Weigelt et al., 2014). Fortunately, progress in tissue engineering and biomaterials have provided researchers with innovative techniques that are now allowing to explore the possibilities of 3D culture, thus bridging the gap between *in vitro* monolayer cell culture models and expensive *in vivo* whole-animal systems (Campbell & Watson, 2009). 3D culture systems promote expression of tissue-specific functions and cellular processes by allowing cells to self-assemble and to receive cues from their neighboring cells and the surrounding extracellular matrix, which cannot be achieved

when cells are plated on plastic cell culture dishes in 2D (Campbell & Watson, 2009; Weigelt & Bissell, 2008). 3D models are particularly useful for the study of protein and gene functions, along with signaling pathways in a physiologically relevant context (Weigelt & Bissell, 2008).

Here we report the production of a relevant 3D heterotypic co-culture model of the functional unit of the mammary gland, the bilayered acinus, consisting of two different cell lines, human myoepithelial-like Hs 578Bst and luminal MCF-12A. These spherical bilayered structures consisted of a lumen surrounded by an inner layer of luminal cells enveloped by a basket-like network of myoepithelial cells, similar to what is typically observed *in vivo*.

#### *2.3.4.1 The important role of myoepithelial cells*

There has been a wide range of 3D culture models, using Matrigel based matrices, developed in an attempt to replicate the epithelium of the human mammary gland *in vitro*. For instance models using non-tumorigenic human mammary luminal cells lines, such as MCF-10A (Debnath et al., 2003), HMT 3522 S1 (Anders, Hansen et al., 2003; Lee et al., 2007) or MCF-12A (Marchese & Silva, 2012) have been reported. When grown in Matrigel, all these cells lines were able to form organized spheroids with a central lumen, similar to breast acini morphology. In opposite, tumorigenic human mammary luminal cells lines form disorganized, proliferative and nonpolar colonies (Kenny et al., 2007; Lee et al., 2007). While these models brought important insights on the structure and the polarization of acini, and the lack of defined structures for breast cancer cells, these models fail to consider the crucial role of myoepithelial cells in the formation of a polarized epithelium *in vivo*.

For many years, myoepithelial cells were mostly ignored in mammary gland studies, as it was thought that their role was limited to transportation and ejection of milk during lactation. We now know that myoepithelial cells are crucial for the proper differentiation and function of the epithelium. Among their functions, they allow paracrine regulation and cross-talk within the epithelium while playing an active role in tissue remodeling and polarization of luminal cells. Such functions are critically dependent on bi-directional communication between myoepithelial and luminal cells (Dickson & Warburton, 1992; Rudolph-Owen & Matrisian, 1998; Talhouk et al., 2008; Warburton, Mitchell et al., 1982). Moreover, a growing body of evidence demonstrates that the tumor microenvironment plays a critical role in cancer progression (Ghajar & Bissell, 2008). Whether cancer cells induce remodeling of the architecture and/or changes in tissue architecture



promote cell tumorigenicity is unclear. It is likely that gene expression is at least in part dictated by the interactions between a cell and the stromal elements, including stromal cells, proteins of the ECM and other soluble factors (Ghajar & Bissell, 2008). As a result, ECM is considered as an active participant, rather than a passive bystander, in cellular differentiation. Conversely, cells contribute to the formation of the epithelial microenvironment by producing components of the basement membrane such as collagen, laminins and fibronectin (Warburton et al., 1982). Because they lie on the epithelial side of the basement membrane, myoepithelial cells are uniquely positioned to accomplish most of the interactions between the epithelium, basement membrane and the ECM. Myoepithelial cells are crucial mediators of ductal elongation and invasion within the stroma, as they secrete proteins and molecules required for the remodeling of the ECM such as maspin, amyloid beta-protein precursor/ protease nexin-II (APP/PNII) and matrix metalloproteinases (MMPs) (Dickson & Warburton, 1992; Rudolph-Owen & Matrisian, 1998; Warburton et al., 1982). As a result, dysregulation of myoepithelial cells functions has been associated with the loss of a polarized epithelium, developmental defects and tumorigenesis (Plante & Laird, 2008; Radisky & Radisky, 2010; Runswick, O'Hare et al., 2001; Streuli, Schmidhauser et al., 1995). Accordingly, myoepithelial cells are often considered natural tumor suppressors due to their ability to build a physical and chemical barrier against uncontrolled growth, tumor cell invasion and angiogenesis (Barsky & Karlin, 2005; Sternlicht, Kedeshian et al., 1997). Therefore, to fully understand both the normal development of mammary gland and breast tumor progression, as well as to study more specifically the direct relationship between luminal and myoepithelial cells of the acinus (Gudjonsson, Adriance et al., 2005), heterotypic models in which human mammary myoepithelial cells are introduced in a human mammary luminal cell culture must be developed.

#### *2.3.4.2 Luminal and myoepithelial-like commercial cell lines can form bilayered acini, similar to complex 3D structures from primary cultures*

A few studies have been published with 3D models composed of more than one cells types. For instance, human luminal MCF-10A cells were co-cultured with primary culture of human mammary fibroblasts (Krause, Maffini et al., 2008). In another study, primary cultures of human luminal and myoepithelial cells were co-cultured (Carter, Gopsill et al., 2017). In an even more complex model, human luminal MCF-10A cells were co-cultured with primary cultures of human mammary fibroblasts and adipose-derived stem cells (Wang et al., 2010). Cells in these co-culture models displayed more differentiated morphological phenotypes and functional activity than in

less complex monocultures (Wang et al., 2010). Likewise, these co-cultures facilitated the study of cellular crosstalk in the breast (Carter et al., 2017). Notably, most of these studies used primary cultures of breast cells. It is believed that primary cells in a 3D mammary gland model enable more physiologically relevant studies such as lineage commitment and plasticity (Campbell, Davidenko et al., 2011), and that normal *in vivo* signaling pathways is more preserved compared to immortalized cell lines (Ip & Darcy, 1996). However, some of the downsides of these models are the increased complexity of working with primary cells, the heterogeneity of the samples and the difficulties to genetically manipulate the cells. On the opposite, commercially available cell lines represent a more homogenous population that can easily be genetically modified to isolate the role of particular proteins or pathways (Kaur & Dufour, 2012; Wang et al., 2010). As such, our model using cell lines represent a more reproducible and manipulable model to study the role of the bi-directional cross-talk between luminal and myoepithelial cells within the mammary epithelium. Moreover, because MCF-12A and Hs 578Bst cell lines are commercially available, researchers around the world will be able to use and even improve this model.

#### *2.3.4.3 Limitations of our model*

Although we successfully obtained bilayered acini, about 50% of the acini formed when we co-cultured luminal and myoepithelial cell were bilayered, while the other 50% was formed of luminal cells only. A possible explanation lies in the use of Matrigel. Indeed, it has been reported that co-culturing isolated myoepithelial and luminal cells in type I collagen based matrix promoted their re-arrangement in bilayered acini, while Matrigel did not (Carter et al., 2017; Gudjonsson et al., 2002). Matrigel is a laminin-rich basement membrane extract. It has been demonstrated that laminin is required for adequate luminal cell polarization in the mammary gland (Gudjonsson et al., 2002), and that myoepithelial cells produce an important amount of this laminin *in vivo* (Deugnier, Moiseyeva et al., 1995). Consequently, in a Matrigel laminin-rich matrix, as laminin is already present, there is no incentive for luminal cells to coalesce with myoepithelial cells in bilayered structures. On the opposite, in a type I collagen based matrix in which no laminin is present, the luminal cells require the laminin produced by myoepithelial cells to promote their assembly into co-units. Yet, we still managed to produce bilayered acini of luminal and myoepithelial cell lines embedded in a Matrigel matrix in our model. Other ECM, such as artificial scaffold or type I collagen based matrix, might help increasing the ratio of bilayered versus luminal cells-only acini. Increasing the myoepithelial to luminal cell ratio in co-culture might also favour the formation of bilayered acini.

The type of cell lines used also seem to have limitations. In the experiment herein, murine luminal cells SCp2 and myoepithelial cells SCg6 did not interact to form bilayered acini when co-cultured in Matrigel. Both cell lines either formed monolayer acini or irregular structures, but did not coalesce (Supplementary figure 2). This might be explained by the fact that SCp2 and SCg6 cells have less differentiated phenotypes. In fact, Western blot analysis showed that both SCp2 and SCg6 expressed luminal marker E-cadherin and myoepithelial marker cytokeratin 14 (Supplementary figure 1). The reason why we chose to co-culture murine luminal-like SCp2 cells and murine myoepithelial-like SCg6 cells stems from the fact that, in the beginning of this study, we struggled to obtain enough human myoepithelial Hs 578Bst cells to co-culture with human luminal MCF-12A cells. We were hoping that murine myoepithelial-like SCg6 cells might proliferate faster than their human counterpart and allow us to eventually test co-culture to develop a cell line based murine co-culture model of the mammary gland acinus. Moreover, they showed a high plasticity when cultured in 2D, suggesting stem-like properties (data not shown). Finally, while MCF-12A and Hs 578Bst cells have more differentiated phenotypes and are considered as non-tumorigenic, they remained transformed cells. Therefore, signaling and protein expression is surely different than those of *in vivo* luminal and myoepithelial cells. Another limitation of our model is that no functional studies have been performed so far on our model, such as detection of secreted milk proteins by the luminal cells in response to lactogenic hormones or myoepithelial contraction following oxytocin exposure. Nevertheless, the fact that they form bilayered acini *in vitro* represents a first step toward more complex, manipulable, reproductive and representative *in vitro* models to mimic the bilayered mammary gland epithelium and study the role of bidirectional communication between the two layers of epithelial cells.

### 2.3.5 Conclusion

To our knowledge, this study is the first to utilize two types of human mammary cell lines cultured together in Matrigel to form bilayered acini, offering significant advantages over previously described models that used monocultures of cell lines or co-culture of primary cells. The critical advantage of our model remains the use of commercially available cell lines that ensure a manipulable, reproducible and physiologically relevant human mammary gland model. Our model will allow the study of the critical role of myoepithelial cells, and of the interactions between myoepithelial and luminal cells in mammary gland development and during breast cancer progression.



### 2.3.6 Materials and methods

#### 2.3.6.1 Cell lines

MCF-12A cells (ATCC<sup>®</sup> CRL-10782) and Hs 578Bst cells (ATCC<sup>®</sup> HTB-125) were purchased at ATCC (ATCC, Manassas, VA). SCp2 and SCg6 cells were a gift from Calvin Roskelley (UBC). MCF-12A cells were maintained in phenol red-free Dulbecco's modified Eagle's medium Ham's F12 (DMEM/F12) culture medium (21041025, ThermoFisher Scientific, Rockford, Illinois, USA) supplemented with 5% (v/v) horse serum (ThermoFisher Scientific, 16050-122), human Epidermal Growth Factor (hEGF) recombinant (20 ng/ml) (PHG0311, Invitrogen, Waltham, MA, USA), hydrocortisone (500 ng/ml) (H0888, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), insulin (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich, C8052), cholera toxin (100 ng/ml) (Invitrogen, 12585014) and propagated according to ATCC guidelines. Hs 578Bst cells were maintained in Hybri-Care medium (ATCC 46-X<sup>TM</sup>) supplemented with 10 % (v/v) activated fetal bovine serum (FBS) (098150, Wisent Bioproducts, Saint-Jean-Baptiste, Quebec, Canada) and mouse Epidermal Growth Factor (Epidermal Growth Factor from murine submaxillary gland, 30ng/mL) (Sigma-Aldrich, E4127) and propagated according to ATCC guidelines. SCp2 and SCg6 cells were grown in DMEM/F12 medium (Sigma-Aldrich, D2906) supplemented with insulin (5 µg/ml) and FBS (5% v/v). Activated fetal bovine serum (FBS) was selected over heat-inactivated fetal bovine serum (HI-FBS) since it was discovered that the former helped human myoepithelial Hs 578Bst cells proliferate with a much quicker doubling time than the later.

#### 23.6.2 Western blot analysis

Cell monolayers were washed twice with PBS before the addition of lysis buffer (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 0.02% sodium azide, 0.1% SDS, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, pH: 8) supplemented with NaF 1.25 M, NaVO<sub>3</sub> 1 M and Halt Protease and phosphatase cocktail inhibitor (Fisher Scientific Canada). Cells were scraped, collected and incubated on ice for 5 min. Cell lysates were centrifuged for 10 min at 2500 rpm at 4°C. The supernatants were aliquoted and stored at -80 °C until further processing. Lysate protein concentrations were measured using a bicinchoninic acid protein assay reagent kit (Thermo Scientific #23227). Protein samples were resolved on stain-free acrylamide gels (TGX Stain-Free FastCast Acrylamide kit, 10%, Bio-Rad, Mississauga, On) and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. Membranes were blocked with TBS-Tween 20 (0.1%) containing 3% bovine serum albumin (BSA) or dry milk,

according to manufacturer instructions, for 1 h and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-E-cadherin (#3195; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-Cytokeratin 18 (#ab52948; Abcam, Cambridge, MA), anti-Cytokeratin 14 (#MS-115-P1ABX; Thermo Scientific, Cheshire, UK), anti- $\alpha$ -Smooth muscle actin (#M0851; Dako, Glostrup, Denmark) and anti-p63 antibody (#sc-8431, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX). Bound primary antibody was detected using HRP-conjugated secondary antibodies (goat-anti-rabbit (#7074) or horse-anti-mouse (#7076); Cell Signaling Technology) followed by visualisation and quantification using a Bio-Rad ChemiDoc MP System (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, On). Chemiluminescent signals were detected using Clarity western ECL substrate (Bio-Rad Laboratories) and analysed using Image Lab software (Bio-Rad Laboratories).

#### *2.3.6.3 Three-dimensional embedded cells cultures*

For 3D cultures, cells were embedded in solubilized basement membrane extract – Matrigel (Corning® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix from Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma) (CB40230C, Corning, NY, USA) at a cell density of 75 000 cells/100  $\mu$ l of Matrigel. When required, Matrigel was diluted to different final concentrations by adding ice cold growth medium. Experiments were carried out in 35mm glass bottom poly-D lysine coated dishes, 14 mm microwell (P35GC-0-10-C, MatTEK Corporation, Ashland, MA, USA). Plates were manually evenly pre-coated on ice with 10  $\mu$ l of Matrigel using the tip of a pipette. Dishes were left in an incubator at 37°C to allow the Matrigel to congeal for 30 minutes. For co-culture experiments, cell suspension from both cell types were counted and the proper number of each cell type mixed in the same tube. The ideal concentration of cells was 70 000 cells total/100  $\mu$ L of matrix (myoepithelial and luminal cells together). Cell suspension containing both cell types were centrifuged at 125G at room temperature for 7 minutes, the supernatant was removed and the tube was gently flicked to detach cells from the bottom of the centrifuge tube. The Matrigel was added directly to the cell pellet, gently mixed and the Matrigel-cells suspension was distributed rapidly in the microwells pre-coated with Matrigel. Dishes were incubated for another 30 minutes at 37 °C to allow Matrigel to congeal, then, the culture medium was added to cover the entire polymerized Matrigel/cell mix. The culture medium was changed every 2-3 days for 14 days. Hydri-Care medium supplemented with 10 % (v/v) activated FBS and mouseEGF (30ng/mL) was the medium favored to obtain the best results.

#### *2.3.6.4 Immunolabeling of 3D embedded cell cultures*

Culture medium was aspirated and embedded cultures were rinsed twice with PBS. Cells were fixed in formaldehyde 4% for 10 minutes and permeabilized in PBS-Triton X-100 (0.5%) for 60 minutes. After being rinsed twice (10 minutes each) with PBS-Glycine (0.1%), cells were incubated in blocking solution (2% BSA dissolved in PBS with 0.1% of Tween 20 and 0.1% of Triton X-100). Primary antibodies were diluted in blocking solution and cells were incubated with primary antibody for 120 minutes at room temperature or overnight at 4°C (E-cadherin (#3195s) 1/200 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA);  $\alpha$ -Smooth-muscle-actin mouse mAb (M0851) 1/300 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Immunolabeling was followed by four washes with washing solution (PBS containing Tween20 (0.1%), BSA (0.1%) and Triton X-100 (0.5%)), for five minutes each. Cells were incubated with the appropriate secondary antibodies for 60 minutes (anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (#4412s), anti-mouse IgG Alexa Fluor 555 (#4409s) both used at 1/1000 (Cell Signaling), or anti-rabbit IgG DyLight 488 (# 35552) used at 1/200 (ThermoFisher Scientific). Secondary antibody labeling was washed three times with washing solution and one time with PBS, for 5 minutes each. Nuclei were stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in PBS. Embedded cultures were mounted with Fluoromount-G (0100-01, SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA). Fluoromount-G was added in enough volume to cover the embedded cultures and fill up the microwell. Coverslip were added and mounted cultures were placed horizontally overnight at 4°C for 8 hours in the dark. Coverslips were sealed 24 hours after mounting with hot glue. Immunofluorescence images were obtained with a Nikon A1R+ confocal microscope (Nikon) and analyzed using NIS-elements software (Nikon).

#### *2.3.6.5 Cryosections from embedded 3D cultures*

Culture medium was removed and embedded cultures were washed twice with PBS, prewarmed at 37 °C. The matrix was detached from the microwell with a spatula, quickly placed on top of a layer of Tissue Freezing Medium (3801481, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) in a cryomold, and then covered with a second layer of Tissue Freezing Medium to fill the cryomold. The resulting block of cryomatrix containing the cells embedded in the matrix were placed at –80°C until use.

#### *2.3.6.6 Masson's trichrome staining of cryosections*

Embedded acini cryosections (8  $\mu$ m) were fixed in Bouin's solution overnight and then rinsed with

water for 5 minutes. Sections were stained sequentially with Weigert's iron hematoxylin for 10 minutes, Biebrich scarlet-acid fuchsin for 15 minutes, phosphomolybdic-phosphotungstic acid for 20 minutes and aniline blue (5 minutes), and washed with water between all coloration steps. Finally, the sections were treated with 1% acetic acid for 5 minutes, dehydrated in an alcohol series, cleared in xylene for 5 minutes and mounted using Permount (SP15100, Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada). Slides were dried for a minimum of 4 hours after.

#### *2.3.6.7 Immunolabeling of cryosections*

Embedded acini cryosections (8  $\mu$ m) were fixed in formaldehyde 4% for 15 minutes and blocked in 3% BSA dissolved in TBS-Tween20 (0.1%). Primary antibodies were diluted in TBS-Tween 0.1%, and sections were incubated with primary antibody for 60 minutes at room temperature. Sections were incubated with  $\beta$ -catenin (L54E2) mouse mAb (#2677s) 1/200 (Cell Signaling). Immunolabeling was followed by three washes with TBS-tween 0.1%. Sections were incubated with the secondary antibody (anti-mouse IgG Fab2 Alexa Fluor 647 (#4410s) used at 1/1000 (Cell Signaling). Nuclei were stained with DAPI in TBS-Tween 0.1%, and slides were mounted with Fluoromount-G (SouthernBiotech, 0100-01). Slides were placed at 4°C for 8 hours in the dark. Immunofluorescence images were obtained with a Nikon A1R+ confocal microscope (Nikon) and analyzed using NIS-elements software (Nikon).

#### **2.3.7 Acknowledgments**

We thank Calvin Roskelley (UBC) for the gift of SCp2 and SCg6 cells and Alicia Novel for her assistance. This work was supported by grant a Natural Sciences and Engineering Research Council grant (NSERC #418233-2012) to IP. IP is a recipient of a Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS) and Quebec Breast Cancer Foundation career award and a Leader Funds from the Canadian Foundation for Innovation. AWO received a scholarship from La foundation Armand-Frappier. MB received scholarships from NSERC and from the Fonds de Recherche du Québec-Nature et technologie (FRQNT).

#### **2.3.8 Author contribution**

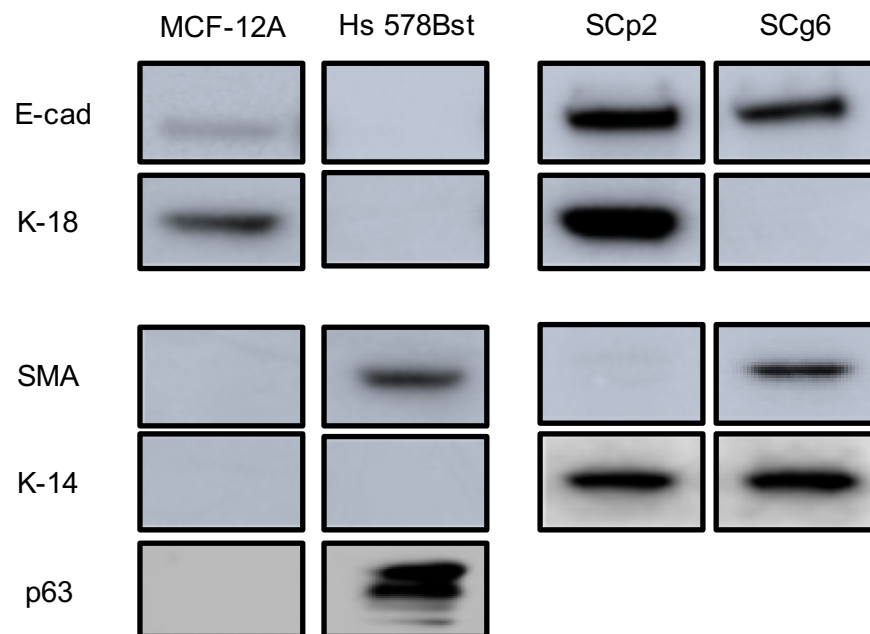
All experiments involving MCF-12A and Hs 578Bst cells were performed by AWO. MB performed the experiments with SCp2 and SCg6 cells. IP supervised the study and the progression of the

project. AWO wrote the manuscript in collaboration with MB and IP.

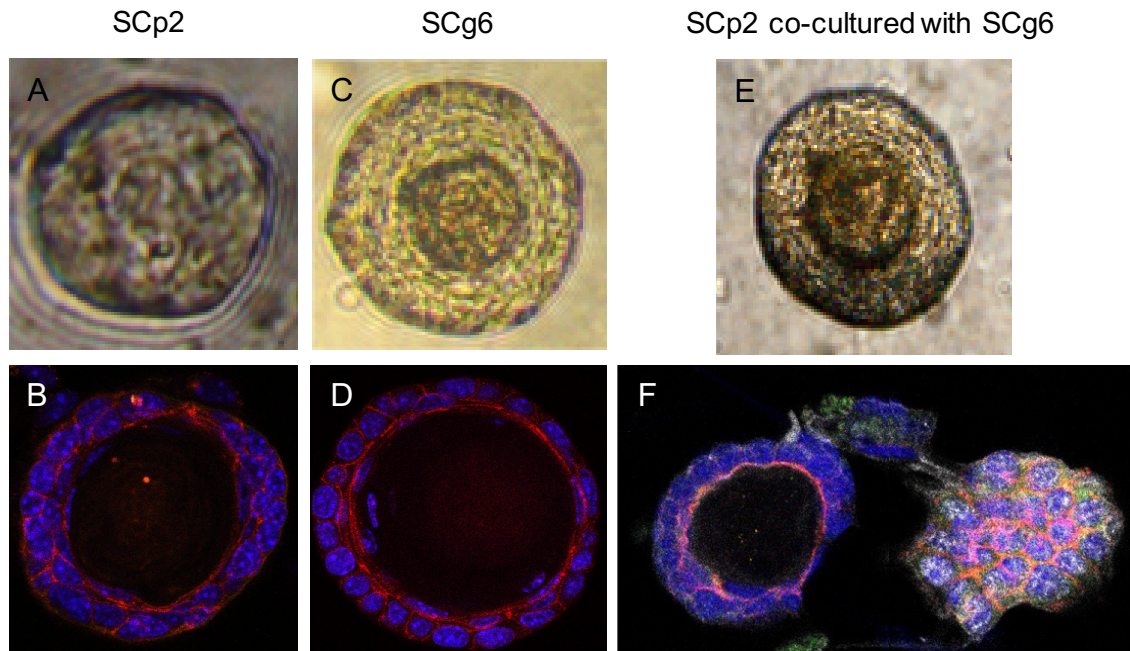
### 2.3.9 Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### 2.3.10 Supplementary figures



**Supplementary figure 1. Human luminal epithelial MCF-12A and myoepithelial-like Hs 578Bst cells have more differentiated phenotypes than murine luminal epithelial SCp2 and myoepithelial SCg6 cells.** MCF-12A, Hs 578Bst, SCp2 and SCg6 cells were cultured in 2D. Western blot analysis were performed using antibodies against E-cadherin (E-cad) and cytokeratin 18 (K-18), as well as SMA, Cytokeratin 14 (K14) and p63, markers of epithelial and myoepithelial cells, respectively. Results showed that in human cells, E-cad and K18 were present only in MCF-12A, whereas in murine cells, E-cad was present in both SCp2 and SCg6. SMA and p63 were expressed only in myoepithelial cells, as expected, while K-14 was present in both SCp2 and SCg6.



**Figure supplementary 2. Co-cultures SCp2 and SCg6 cells did not form bilayered acini in Matrigel.** (A, C, E) Representative single optical microscopy images of SCp2 cells (A), SCg6 cells (B) and SCp2 cells co-cultured with SCg6 cells (E) embedded in Matrigel. (B, D, F) Cells were immunolabeled with E-cadherin (red) and SMA (white). Nuclei are stained with DAPI (blue). SCg6 cells formed spheroids structures with lumen (C, D), similar to SCp2 (A, B). When SCp2 were co-cultured with SCg6 (E, F), some spheroids had a lumen while other did not. SMA was present only on structures without a lumen (F). SCp2 and SCg6 cells did not form bilayered spheroid with a lumen in co-culture.

## References

- Anders M, Hansen R, Ding RX, Rauen KA, Bissell MJ, Korn WM (2003) Disruption of 3D tissue integrity facilitates adenovirus infection by deregulating the coxsackievirus and adenovirus receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1943-8
- Barsky SH, Karlin NJ (2005) Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10: 249-60
- Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I (2005) Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol* 15: 405-12
- Bissell MJ, Hall HG, Parry G (1982) How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* 99: 31-68
- Campbell JJ, Davidenko N, Caffarel MM, Cameron RE, Watson CJ (2011) A multifunctional 3D co-culture system for studies of mammary tissue morphogenesis and stem cell biology. *PLoS One* 6: e25661
- Campbell JJ, Watson CJ (2009) Three-dimensional culture models of mammary gland.

Organogenesis 5: 43-9

Carter EP, Gopsill JA, Gomm JJ, Jones JL, Grose RP (2017) A 3D in vitro model of the human breast duct: a method to unravel myoepithelial-luminal interactions in the progression of breast cancer. *Breast Cancer Res* 19: 50

Chitcholtan K, Asselin E, Parent S, Sykes PH, Evans JJ (2013) Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. *Exp Cell Res* 319: 75-87

Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS (2003) Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 30: 256-68

Desprez P, Roskelley C, Campisi J, Bissell M (1993) Isolation of functional cell lines from a mouse mammary epithelial cell strain: the importance of basement membrane and cell-cell interaction. *Mol Cell Differ* 1: 99-110

Deugnier MA, Moiseyeva EP, Thiery JP, Glukhova M (1995) Myoepithelial cell differentiation in the developing mammary gland: progressive acquisition of smooth muscle phenotype. *Dev Dyn* 204: 107-17

Dickson SR, 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

Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L (2014) Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol* 12: 207-18

Ghajar CM, Bissell MJ (2008) Extracellular matrix control of mammary gland morphogenesis and tumorigenesis: insights from imaging. *Histochem Cell Biol* 130: 1105-18

Gudjonsson T, Adriance MC, Sternlicht MD, Petersen OW, Bissell MJ (2005) Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10: 261-72

Gudjonsson T, Ronnov-Jessen L, Villadsen R, Rank F, Bissell MJ, Petersen OW (2002) Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal

breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J Cell Sci* 115: 39-50

Hassiotou F, Geddes D (2013) Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* 26: 29-48

Huh D, Hamilton GA, Ingber DE (2011) From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol* 21: 745-54

Ip MM, Darcy KM (1996) Three-dimensional mammary primary culture model systems. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1: 91-110

- Kaur G, Dufour JM (2012) Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2: 1-5
- Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, Lorenz K, Lee EH, Barcellos-Hoff MH, Petersen OW, Gray JW, Bissell MJ (2007) The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol* 1: 84-96
- Krause S, Maffini MV, Soto AM, Sonnenschein C (2008) A novel 3D in vitro culture model to study stromal-epithelial interactions in the mammary gland. *Tissue Eng Part C Methods* 14: 261-71
- Leblond CP, Inoue S (1989) Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat* 185: 367-90
- Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ (2007) Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods* 4: 359-65
- Mabry KM, Payne SZ, Anseth KS (2016) Microarray analyses to quantify advantages of 2D and 3D hydrogel culture systems in maintaining the native valvular interstitial cell phenotype. *Biomaterials* 74: 31-41
- Marchese S, Silva E (2012) Disruption of 3D MCF-12A breast cell cultures by estrogens- -an in vitro model for ER-mediated changes indicative of hormonal carcinogenesis. *PLoS One* 7: e45767
- Pineda ET, Nerem RM, Ahsan T (2013) Differentiation patterns of embryonic stem cells in two-versus three-dimensional culture. *Cells Tissues Organs* 197: 399-410
- Plante I, Laird DW (2008) Decreased levels of connexin43 result in impaired development of the mammary gland in a mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Dev Biol* 318: 312-22
- Radisky D, Hagios C, Bissell MJ (2001) Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin Cancer Biol* 11: 87-95
- Radisky ES, Radisky DC (2010) Matrix metalloproteinase-induced epithelial- mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15: 201-12
- Rudolph-Owen LA, Matrisian LM (1998) Matrix metalloproteinases in remodeling of the normal and neoplastic mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3: 177-89
- Runswick SK, O'Hare MJ, Jones L, Streuli CH, Garrod DR (2001) Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. *Nat Cell Biol* 3: 823-30
- Sopel M (2010) The myoepithelial cell: its role in normal mammary glands and breast cancer. *Folia Morphol (Warsz)* 69: 1-14
- Sternlicht MD, Kedeshian P, Shao ZM, Safarians S, Barsky SH (1997) The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clin Cancer Res* 3: 1949-58
- Streuli CH, Schmidhauser C, Bailey N, Yurchenco P, Skubitz AP, Roskelley C, Bissell MJ (1995) Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J Cell Biol* 129: 591-603
- Su Y, Shankar K, Rahal O, Simmen RC (2011) Bidirectional signaling of mammary epithelium and stroma: implications for breast cancer--preventive actions of dietary factors. *J Nutr Biochem*



22: 605-11

Talhouk RS, Mroue R, Mokalled M, Abi-Mosleh L, Nehme R, Ismail A, Khalil A, Zaatari M, El-Sabban ME (2008) Heterocellular interaction enhances recruitment of alpha and beta-catenins and ZO-2 into functional gap-junction complexes and induces gap junction- dependant differentiation of mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 314: 3275-91

Tibbitt MW, Anseth KS (2009) Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* 103: 655-63

Wang X, Sun L, Maffini MV, Soto A, Sonnenschein C, Kaplan DL (2010) A complex 3D human tissue culture system based on mammary stromal cells and silk scaffolds for modeling breast morphogenesis and function. *Biomaterials* 31: 3920-9

Warburton MJ, Mitchell D, Ormerod EJ, Rudland P (1982) Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the resting, pregnant, lactating, and involuting rat mammary gland. *J Histochem Cytochem* 30: 667-76

Weigelt B, Bissell MJ (2008) Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 18: 311-21

Weigelt B, Ghajar CM, Bissell MJ (2014) The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 69-70: 42-51

## CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSION

Ce projet de recherche avait pour but de développer un modèle de culture 3D représentatif de l'acinus bicouche de la glande mammaire. Nos résultats ont démontré que des structures semblables à l'acinus bicouche sont formées lorsque les cellules luminales MCF-12A et myoépithéliales Hs 578Bst sont co-cultivées dans du Matrigel® pendant quatorze jours.

Tout comme d'autres articles publiés précédemment, nous avons réussi à former des structures acinaires possédant un lumen central, rappelant l'acini d'une glande mammaire humaine, en cultivant des lignées cellulaires dans un EMBrl (Krause et al. 2008 ; G. Y. Lee et al. 2007 ; Marchese et Silva 2012 ; Debnath, Muthuswamy et Brugge 2003). Cependant, nous émettons une réserve à l'égard des systèmes 3D de ces articles, car il n'y a pas de véritable structure bicouche dans les acini produits, empêchant ainsi l'étude de la relation intercellulaire entre les cellules luminales et myoépithéliales.

De ce fait, nous avons réussi à reproduire cette structure bicouche de l'acinus à l'aide de deux lignées cellulairesensemencées dans l'EMBrI. En effet, en co-cultivant les cellules luminales épithéliales normales MCF-12A avec les cellules myoépithéliales normales Hs 578Bst en ratio 1:4 dans une matrice de Matrigel® diluée à 75 %, nous avons obtenus des sphéroïdes bicouches semblables à l'unité fonctionnelle de la glande mammaire : l'acinus bicouche.

Toutefois, une étude récente, publiée durant la dernière année de ma maîtrise, suggérait qu'il était préférable de cultiver des cellules myoépithéliales et luminales isolées d'échantillons de réduction mammaire dans une matrice de collagène de type I pour obtenir des systèmes bicouches, plutôt que d'utiliser des lignées cellulaires (Carter et al. 2017). Cependant, l'objectif de cette étude n'était pas de produire des unités fonctionnelles de glande mammaire – d'acini bicouches – mais de produire des canaux de glandes mammaires. Plutôt, les structures bicouches obtenues étaient un mélange de canaux allongés et de sphéroïdes lorsque les deux types de cellules étaient cultivées dans une matrice de collagène de type I. Dans une matrice de Matrigel®, les deux types de cellules formaient des sphéroïdes sans arrangement défini. Les cellules constituant les sphéroïdes exprimaient des marqueurs myoépithéliaux de même que des marqueurs épithéliaux et ne formaient pas de structure bicouche (Carter et al. 2017).

À l’opposé, nos structures étaient toutes des sphéroïdes – en organisation cellulaire propice à nos objectifs d’étude – et lorsqu’elles étaient bicouches, les deux types cellulaires avaient une organisation définie. Aussi, il a été rapporté que des cultures primaires de cellules épithéliales mammaires sont particulièrement résistantes à l’infection lentivirale dans le but d’introduire une construction génétique d’intérêt pour modifier génétiquement les cellules (Hines, Yaswen et Bissell 2015). Carter *et al.* ont également observé la même grande résistance à l’infection lentivirale pour leurs cultures de cellules luminales et myoépithéliales. À la différence, notre modèle utilise des lignées cellulaires qui sont reconnues pour être transfectées plus facilement (Eibl R et al. 2008).

Bien que notre modèle demande davantage de caractérisations et des optimisations, il représente une avancée importante dans l’étude de la relation entre les cellules myoépithéliales et luminales de l’épithélium mammaire dans l’unité fonctionnelle de glande mammaire – l’acinus bicouche. Une meilleure compréhension du « comment les cellules myoépithéliales maintiennent l’état polarisé de cellules luminales sous-jacentes », aussi bien que du « comment la relation entre les cellules luminales et myoépithéliales modifie la progression des tumeurs du sein », est essentielle pour comprendre les mécanismes initiaux du processus de cancérogénèse du sein. Notre modèle permettra d’étudier ces dérégulations de la communication bidirectionnelle entre les deux types cellulaires dans un environnement physiologiquement pertinent. Il ouvre la voie à la manipulation génétique plus aisée de ces deux lignées cellulaires. Il sera possible d’étudier ces dérégulations de communication bidirectionnelle en observant l’effet de l’inhibition de l’expression de protéines de communication intercellulaire sur la structure sphéroïde ou de l’effet de carcinogènes sur la structure bicouche et sur l’expression de protéines de communication intercellulaire.

### **3.1 Avantages de notre modèle *in vitro***

Notre modèle utilise des lignées cellulaires offertes commercialement, les cellules de la lignée cellulaire épithéliale luminale MCF-12A et celles de la lignée cellulaire myoépithéliale Hs 578Bst, plutôt que des cultures primaires de cellules isolées d’une glande mammaire. Par conséquent, notre modèle est plus accessible à d’autres équipes de recherche pour reproduire les résultats que nous avons obtenus. Les lignées de cellules fournissent une population pure de cellules. Cela permet d’avoir un échantillon uniforme et des résultats plus facilement reproductibles d’un essai à l’autre (Kaur et Dufour 2012). Bien qu’il aurait été possible de créer des acini bicouches à l’aide de cultures primaire, ce modèle n’aurait pas été bien reproductible puisqu’il existe de la

variabilité entre les donneurs et les échantillons d'où proviennent les cultures primaires (Primary cell culture, *Sigma-Aldrich* 2017). L'utilisation de lignées cellulaires favorise aussi l'aspect manipulable de notre modèle. En effet, les cellules de lignées cellulaires peuvent être transfectées plus facilement (Eibl R et al. 2008) dans le but de faire des études de manipulation d'expression génique et protéique.

La transfection des deux lignées cellulaires utilisées dans notre modèle – MCF-12A et Hs578Bst – a déjà été réalisée pour manipuler génétiquement ces cellules. Par exemple, la transfection d'une protéine à l'aide d'un lentivirus (Y. Liu et al. 2017) et la transfection de petits ARN interférants (« small interfering RNAs », siRNAs) et de vecteurs de plasmide à l'aide de la Lipofectamine 2000 (Germano et al. 2012) ont été réalisées sur la lignée cellulaire myoépithéliale Hs578Bst. Également, la transfection de la lignée cellulaire MCF-12A a déjà été réalisée à l'aide de méthodes de transfection non-virale (Mishra, Vangara et Palakurthi 2014) et au moyen de méthodes de transfection virale par lentivirus pour introduire des siRNAs et des petits ARN en épingle à cheveux (« small hairpin RNAs », shRNAs) (Chang et al. 2011).

La matrice (Matrigel®) utilisée dans notre modèle est offerte commercialement. Il s'agit d'un autre avantage de notre modèle. Il permettra à d'autres équipes de recherche de l'utiliser pour reproduire notre modèle. Ce faisant, elles feront progresser la science plus rapidement. De plus, le Matrigel® est une matrice biologiquement active. Il optimise l'attachement et la différenciation de cellules dépendantes de l'ancrage, comme les cellules de l'épithélium mammaire (Kleinman et al. 1982 ; Baatout 1997). En effet, l'utilisation d'une matrice biocompatible, qui affiche la complexité protéique de la MEC *in vivo* et qui fournit un contexte structurel, fonctionnel, adéquat aux cellules épithéliales mammaires, contribue aussi à la pertinence physiologique de notre modèle. Enfin, l'utilisation d'une co-culture hétérotypique où les cellules sont cultivées en 3D pour récapituler leur architecture, leurs interactions et leur comportement semblable à leur situation *in vivo*, contribue également à la pertinence physiologique de notre modèle.

### **3.2 Limites de notre modèle *in vitro***

Bien que nous ayons démontré qu'il est possible de créer des acini bicouches *in vitro* à partir de lignées cellulaires, notre modèle comporte tout de même ses limites. D'abord, la matrice utilisée dans notre modèle, le Matrigel®, est extraite d'un sarcome de souris Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) qui produit de la MB (Kleinman et al. 1982). Comme avec tous produits naturels, cela

résulte en une variation de lot en lot de la composition en protéines de MEC, des facteurs de croissances et des propriétés mécaniques du Matrigel® (Weigelt et Bissell 2008). Malgré qu'il soit offert commercialement, les variations en composition du Matrigel® peuvent susciter une contestation quant à la reproductibilité du modèle et des expériences réalisées à l'aide du modèle (Pampaloni, Reynaud et Stelzer 2007). Le Matrigel® réduit en facteurs de croissance présente une alternative disponible pour établir des conditions de culture mieux définies. Dans notre modèle, que le Matrigel® réduit en facteurs de croissance a été utilisé.

L'interaction cellule-MEC est un modulateur important du phénotype cellulaire (Hurst 2003). Il a été suggéré que la signalisation des intégrines par le biais de la MEC est cruciale pour déterminer si des cellules tumorigéniques ou des cellules non-tumorigéniques de glande mammaire présentaient un phénotype normal et organisé ou un phénotype cancéreux et invasif (Weaver et al. 1997). Le Matrigel® facilite cette signalisation des intégrines à travers des récepteurs d'intégrines qui activent des voies de signalisation qui contrôlent la croissance, la survie et la différenciation cellulaire (Yang et al. 2004 ; Kutschka et al. 2006). Puisque le Matrigel® est dérivé naturellement et est d'origine tumorale, cette matrice contient des composantes qui sont moins bien définies (C. S. Hughes, Postovit et Lajoie 2010 ; Gill et West 2014). En effet, le Matrigel® se compose principalement de laminine et de collagène, aussi bien que d'une faible proportion d'entactine (une glycoprotéine de la MB) (C. S. Hughes, Postovit et Lajoie 2010). Il contient également plusieurs facteurs de croissance, notamment le facteur de croissance épidermique (« Epidermal Growth Factor », EGF), le facteur de croissance des fibroblastes basique (« basic Fibroblast Growth Factor », bFGF), le facteur de croissance des nerfs (« Nerve Growth Factor », NGF), le facteur de croissance dérivé de plaquettes (« Platelet-Derived Growth Factor », PDGF), le facteur de croissance semblable à l'insuline-1 (« Insuline-like Growth Factor 1 », IGF-1) et le facteur de croissance transformant bêta (« Transforming Growth Factor beta », TGF- $\beta$ ) (C. S. Hughes, Postovit et Lajoie 2010). De son côté, la MEC de la glande mammaire se compose de protéines matricielles (ex. : collagènes, élastine), de glycoprotéines (ex. : fibronectine), de glycoaminoglycans (ex. : sulfate héparan, acide hyaluronique), des protéoglycans (perlécan, syndécan), des facteurs de croissance (ex. : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (« Vascular Endothelial Growth Factor », VEGF), facteur de croissance des hépatocytes (« Hepatocyte Growth Factor », HGF), PDGF, TGF- $\beta$ ) et d'autres protéines sécrétées (ex. : enzymes protéolytiques et inhibiteurs de protéases) (Langhans 2018).

Des changements dynamiques dans ces différentes composantes régulent la prolifération, la différenciation, la migration, la survie, l'adhérence, l'organisation du cytosquelette et la signalisation des cellules dans la physiologie et le développement normale des cellules de la glande mammaire (Langhans 2018). Pareillement, ces composantes régulent les mêmes fonctions dans plusieurs maladies comme la fibrose, le cancer et les maladies génétiques (Bonnans, Chou et Werb 2014 ; Mouw, Ou et Weaver 2014). Ainsi, il n'est pas surprenant d'observer que la composition et les propriétés physiques de la MEC peuvent influencer le phénotype d'une cellule (Langhans 2018).

En fait, l'activation de voies de signalisation par les composantes du Matrigel® pourrait stimuler certaines cellules à acquérir un état plus primitif ou plus tumorigénique (Vaillant, Lindeman et Visvader 2011). En effet, il a été démontré que le Matrigel® encourage la tumorigenèse de cancers du sein humain et celle des carcinomes épidermoïdes (Henson et al. 2007 ; Mehta et al. 1993). Cela suggère que le Matrigel® a le potentiel de fournir des signaux additionnels de survie et de prolifération aux cellules cancéreuses (Vaillant, Lindeman et Visvader 2011). D'un autre côté, il reste à déterminer le rôle des facteurs de croissance présents dans le Matrigel® dans leur capacité à conférer un environnement plus favorable à l'activité progénitrice des cellules (Vaillant, Lindeman et Visvader 2011). Cependant, une étude proposait plutôt que la présence de NGF dans le Matrigel® pourrait induire un phénotype cellulaire cancéreux des cellules en culture (Adriaenssens et al. 2008). Le NGF n'est pas naturellement présent dans la MEC normale de la glande mammaire. Il a été démontré que le NGF pourrait être ciblé dans le cancer du sein pour inhiber la croissance, la survie et la métastase de cellules tumorigéniques puisqu'une analyse de biopsies a révélé une expression généralisée du NGF dans la majorité des tumeurs du sein humain (Adriaenssens et al. 2008).

En plus de la variation dans la composition du Matrigel®, la propriété mécanique de la matrice est un autre facteur qui varie en fonction du lot (Weigelt et Bissell 2008). Ces variations influencent la reproductibilité du modèle (Pampaloni, Reynaud et Stelzer 2007). En effet, une des propriétés mécaniques de la matrice, sa rigidité, pourrait influencer le phénotype de cellules en culture. Il a été démontré qu'une augmentation de la rigidité de la matrice est corrélée à un phénotype cancéreux des modèles *in vitro* de la glande mammaire non-tumorigénique (Chaudhuri et al. 2014). Les responsables de cette étude, ils ont augmenté la rigidité de la matrice de Matrigel® dans laquelle étaient cultivées des cellules non-tumorigéniques MCF-10A, sans toutefois modifier sa composition. Ils ont alors détecté un phénotype de MCF-10A représentatif de la tumorigenèse.

Ils ont aussi examiné 67 gènes associés au cancer du sein et ont remarqué une expression altérée de quatorze des gènes codant pour les MCF-10A dans cette matrice de Matrigel® plus rigide. Notamment, l'expression de *ESR1*, un gène codant pour le récepteur d'œstrogène alpha (« œstrogen receptor alpha », ERα) jouant un rôle dans l'initiation et la croissance de certains cancers, a quintuplée (Chaudhuri et al. 2014).

Néanmoins, malgré toutes ces études, il a été démontré à plusieurs reprises que des cellules épithéliales de glandes mammaires non-tumorigéniques formaient toujours des sphéroïdes semblables à des acini de glandes mammaires normales lorsque cultivées dans le Matrigel®, alors que des cellules épithéliales de glandes mammaires tumorigéniques formaient des colonies prolifératives, non-polarisées et désorganisées dans le même type de matrice (Bissell 1981 ; Petersen et al. 1992 ; G. Y. Lee et al. 2007 ; Kenny et al. 2007). Ainsi, il est possible de supposer que le Matrigel®, lorsque sa rigidité est semblable à celle de la MEC de la glande mammaire *in vivo*, n'induit pas un phénotype cancéreux de cellules non-tumorigéniques en culture, mais favorise la croissance de cellules déjà tumorigéniques en un phénotype semblable à celui exprimé *in vivo* (Yamamura et al. 1993).

Une autre limite de notre modèle est le rendement d'acini bicouches. C'est-à-dire que le rendement d'acini bicouches dans l'ensemble des sphéroïdes obtenus dans nos cultures était au plus de 50 %. En d'autres mots, près de la moitié des sphéroïdes formés en co-culture de cellules luminales et myoépithéliales était des monocultures formées uniquement de cellules luminales, alors que l'autre moitié était des acini bicouches. Bien que le Matrigel® soit une matrice aux composantes protéiques et à la viscoélasticité semblables à celles de la MEC *in vivo* (Corning Incorporated Life Sciences 2017), c'est une matrice riche en laminine. La laminine est une protéine nécessaire à la polarisation appropriée des cellules luminales dans la glande mammaire (Gudjonsson et al. 2002). Les cellules myoépithéliales sont une source majeure de laminine dans la glande mammaire (Deugnier et al. 1995). Par conséquent, dans une matrice de Matrigel®, les deux types cellulaires, luminales épithéliales et myoépithéliales, n'ont pas d'incitatif à se réunir pour former des acini bicouches (Carter et al. 2017). Pour favoriser la formation de sphéroïdes bicouches, il serait intéressant d'utiliser une matrice complexe comme le Matrigel®, mais dépourvue de laminine-1, pour inciter les cellules luminales épithéliales à s'unir aux cellules myoépithéliales.

Une autre alternative serait d'utiliser des matrices synthétiques ou semi-synthétiques à composition est bien définie et manipulable, pouvant être bioactives avec les cellules en culture. Par exemple, PuraMatrix Peptide Hydrogel (*BD Biosciences*) est une matrice synthétique qui est utilisée pour créer des microenvironnements tridimensionnels dans différentes expériences de culture cellulaire. Pour optimiser la croissance et la différenciation cellulaire, il est nécessaire de déterminer le mélange approprié de cette matrice synthétique et de molécules bioactives. Par exemple, on pourrait y ajouter des facteurs de croissance, des protéines de matrice extracellulaire ou d'autres molécules spécifiques à la MEC de l'épithélium mammaire (*BD Biosciences 2018*).

### 3.3 Propositions et perspectives

Au sein de notre laboratoire, notre modèle d'acinus bicouche *in vitro* permettra d'étudier les éléments essentiels au maintien de la structure et de la fonction normale de l'épithélium mammaire. Notre modèle sera utilisé pour comprendre les interactions cellule-cellule et cellule-MEC essentiels au phénotype normal de la glande mammaire. Nous cherchons aussi à comprendre comment leur dérégulation ou des aberrations génétiques spécifiques influence la carcinogenèse. Pour ce faire, nous devrons préalablement optimiser davantage notre modèle afin d'obtenir des acini bicouches en continu. Ensuite, nous pourrons moduler l'expression de protéines spécifiques et en étudier l'impact sur la formation et la polarisation de l'acinus bicouche. Par exemple, l'étudiante qui poursuivra ce projet à partir de janvier 2018 utilisera des lignées cellulaires modifiées génétiquement par la technique CRSPR afin d'inhiber la Cx43 (Cx43KO), une protéine engagée dans la communication intercellulaire. En utilisant soit des cellules MCF-12A-Cx43KO et des Hs 578Bst, soit des cellules MCF-12A et des cellules Hs 578Bst-Cx43KO, soit des cellules MCF-12A-Cx43KO et des cellules Hs 578Bst-Cx43KO, elle sera en mesure de déterminer l'importance de la communication intercellulaire dans chacune des couches cellulaires, mais également entre les deux couches de cellules. Ce modèle offre donc un éventail de possibilité pour étudier le rôle des protéines jonctionnelles spécifiques dans la formation de l'épithélium mammaire bicouche.

Dans le même ordre d'idées, notre modèle 3D d'acini bicouche permettra de mieux comprendre le rôle des cellules myoépithéliales dans la progression du cancer du sein. En effet, en utilisant soit des cellules luminales cancéreuses et des cellules Hs 578Bst, soit des cellules MCF-12A et des cellules Hs 578Bst génétiquement modifiées, nous pourrons vérifier les propriétés de suppresseurs de tumeurs des cellules myoépithéliales.



Il serait également pertinent de réaliser des études de fonctions pour vérifier si notre modèle représente l'acinus bicouche dans sa fonctionnalité au-delà de sa structure bicouche. Par exemple, des hormones lactogéniques pourraient être ajoutées pour détecter la sécrétion de protéines de lait (caséine  $\beta$  ou de WAP, « Whey Acidic Protein ») par les cellules épithéliales luminales des acini bicouches du modèle ou même des cellules myoépithéliales pourraient être exposées à l'ocytocine afin de vérifier leur contractilité.

Aussi, nous pensons que notre modèle pourrait être utilisé pour évaluer l'effet de toxiques exogènes sur la structure bicouche, sur l'expression protéique et sur l'apparition de phénotype cancéreux de l'épithélium mammaire. Les études toxicologiques sont typiquement réalisées *in vivo* ou *in vitro* dans des cultures 2D. Ces deux modèles ont plusieurs désavantages, tel que discuté auparavant. Les modèles 3D bicouches constituent une solution à mi-chemin entre les deux, étant plus physiologiquement près de l'*in vivo* que les modèles 2D, sans être aussi onéreux.

### 3.4 Conclusion

Il existe un besoin grandissant de passer de cultures cellulaires traditionnelles en 2D aux cultures cellulaires 3D pour favoriser l'utilisation de modèles de cultures *in vitro* qui imitent les fonctions de la glande mammaire *in vivo*. La majorité de fonctions cellulaires essentielles et présentes dans les tissus sont perdues en culture traditionnelle 2D. Cependant, l'utilisation de cultures 3D en tant qu'approche classique pour étudier les cellules qui composent la glande mammaire nécessite l'élaboration de protocoles standardisés (reproductibles, manipulables et physiologiquement pertinents). Nous croyons que notre modèle nous rapproche de cet objectif.

## CHAPITRE 4 : RÉFÉRENCES

- Adriaenssens, E., E. Vanhecke, P. Saule, A. Mougél, A. Page, R. Romon, V. Nurcombe, X. Le Bourhis et H. Hondermarck. 2008. « Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. » *Cancer Res* 68 (2): 346-351. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1183.
- Adriance, M. C., J. L. Inman, O. W. Petersen et M. J. Bissell. 2005. « Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. » *Breast Cancer Res* 7 (5): 190-197. doi: 10.1186/bcr1286.
- Aggeler, J., J. Ward, L. M. Blackie, M. H. Barcellos-Hoff, C. H. Streuli et M. J. Bissell. 1991. « Cytodifferentiation of mouse mammary epithelial cells cultured on a reconstituted basement membrane reveals striking similarities to development in vivo. » *J Cell Sci* 99 (Pt 2): 407-417. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1885677>.
- Agiostratidou, G., M. Li, K. Suyama, I. Badano, R. Keren, S. Chung, A. Anzovino, J. Hulit, B. Qian, B. Bouzahzah, E. Eugenin, O. Loudig, G. R. Phillips, J. Locker et R. B. Hazan. 2009. « Loss of retinal cadherin facilitates mammary tumor progression and metastasis. » *Cancer Res* 69 (12): 5030-5038. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4007.
- Alberts, Bruce. 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th. New York: Garland Science.
- Alexander, D. B. et G. S. Goldberg. 2003. « Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. » *Curr Med Chem* 10 (19): 2045-2058. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871102>.
- Anderson, S. M., M. C. Rudolph, J. L. McManaman et M. C. Neville. 2007. « Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! » *Breast Cancer Res* 9 (1): 204. doi: 10.1186/bcr1653.
- Andres, A. C. et R. Strange. 1999. « Apoptosis in the estrous and menstrual cycles. » *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4 (2): 221-228. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426401>.
- Andrews, J. L., A. C. Kim et J. R. Hens. 2012. « The role and function of cadherins in the mammary gland. » *Breast Cancer Res* 14 (1): 203. doi: 10.1186/bcr3065.
- Antoni, D., H. Burckel, E. Josset et G. Noel. 2015. « Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. » *Int J Mol Sci* 16 (3): 5517-5527. doi: 10.3390/ijms16035517.
- Baatout, S. 1997. « Endothelial differentiation using Matrigel (review). » *Anticancer Res* 17 (1A): 451-455. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9066693>.
- Baranova, A., D. Ivanov, N. Petrash, A. Pestova, M. Skoblov, I. Kelmanson, D. Shagin, S. Nazarenko, E. Geraymovych, O. Litvin, A. Tiunova, T. L. Born, N. Usman, D. Staroverov, S. Lukyanov et Y. Panchin. 2004. « The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. » *Genomics* 83 (4): 706-716. doi: 10.1016/j.ygeno.2003.09.025.
- Barcellos-Hoff, M. H., J. Aggeler, T. G. Ram et M. J. Bissell. 1989. « Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement

- p>membrane. »
- Development*
- 105 (2): 223-235.
- 
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2806122>
- .
- Barnard, M. E., C. E. Boeke et R. M. Tamimi. 2015. « Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. » *Biochim Biophys Acta* 1856 (1): 73-85. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.06.002.
- Barrila, J., A. L. Radtke, A. Crabbe, S. F. Sarker, M. M. Herbst-Kralovetz, C. M. Ott et C. A. Nickerson. 2010. « Organotypic 3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions. » *Nat Rev Microbiol* 8 (11): 791-801. doi: 10.1038/nrmicro2423.
- Bazzoun, D., S. Lelievre et R. Talhouk. 2013. « Polarity proteins as regulators of cell junction complexes: implications for breast cancer. » *Pharmacol Ther* 138 (3): 418-427. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.02.004.
- Bennett, M. V. et V. K. Verselis. 1992. « Biophysics of gap junctions. » *Semin Cell Biol* 3 (1): 29-47. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1320429>.
- Birgersdotter, A., R. Sandberg et I. Ernberg. 2005. « Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. » *Semin Cancer Biol* 15 (5): 405-412. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.06.009.
- Bissell, M. J. 1981. « The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a "normal" cell in culture. » *Int Rev Cytol* 70: 27-100. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7228573>.
- Bissell, M. J., H. G. Hall et G. Parry. 1982. « How does the extracellular matrix direct gene expression? » *J Theor Biol* 99 (1): 31-68. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6892044>.
- Bokhari, M., R. J. Carnachan, N. R. Cameron et S. A. Przyborski. 2007. « Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. » *J Anat* 211 (4): 567-576. doi: 10.1111/j.1469-7580.2007.00778.x.
- Bonnans, C., J. Chou et Z. Werb. 2014. « Remodelling the extracellular matrix in development and disease. » *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 (12): 786-801. doi: 10.1038/nrm3904.
- Boudreau, N., C. J. Simpson, Z. Werb et M. J. Bissell. 1995. « Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. » *Science* 267 (5199): 891-893. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531366>.
- Breslin, S. et L. O'Driscoll. 2013. « Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. » *Drug Discov Today* 18 (5-6): 240-249. doi: 10.1016/j.drudis.2012.10.003.
- Brun, P., G. Abatangelo, M. Radice, V. Zacchi, D. Guidolin, D. Daga Gordini et R. Cortivo. 1999. « Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds. » *J Biomed Mater Res* 46 (3): 337-346. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397990>.

- Bryant, S. J. et K. S. Anseth. 2002. « Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. » *J Biomed Mater Res* 59 (1): 63-72. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745538>.
- Buick, R. N. et M. N. Pollak. 1984. « Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells, and oncogenes. » *Cancer Res* 44 (11): 4909-4918. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6386145>.
- Bukauskas, F. F. et V. K. Verselis. 2004. « Gap junction channel gating. » *Biochim Biophys Acta* 1662 (1-2): 42-60. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.01.008.
- Campbell, J. J. et C. J. Watson. 2009. « Three-dimensional culture models of mammary gland. » *Organogenesis* 5 (2): 43-49. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19794898>.
- Carey, S. P., K. E. Martin et C. A. Reinhart-King. 2017. « Three-dimensional collagen matrix induces a mechanosensitive invasive epithelial phenotype. » *Sci Rep* 7: 42088. doi: 10.1038/srep42088.
- Carter, E. P., J. A. Gopsill, J. J. Gomm, J. L. Jones et R. P. Grose. 2017. « A 3D in vitro model of the human breast duct: a method to unravel myoepithelial-luminal interactions in the progression of breast cancer. » *Breast Cancer Res* 19 (1): 50. doi: 10.1186/s13058-017-0843-4.
- Cavallaro, U., B. Schaffhauser et G. Christofori. 2002. « Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? » *Cancer Lett* 176 (2): 123-128. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11804738>.
- Chang, C. J., C. H. Chao, W. Xia, J. Y. Yang, Y. Xiong, C. W. Li, W. H. Yu, S. K. Rehman, J. L. Hsu, H. H. Lee, M. Liu, C. T. Chen, D. Yu et M. C. Hung. 2011. « p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. » *Nat Cell Biol* 13 (3): 317-323. doi: 10.1038/ncb2173.
- Chaudhuri, O., S. T. Koshy, C. Branco da Cunha, J. W. Shin, C. S. Verbeke, K. H. Allison et D. J. Mooney. 2014. « Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium. » *Nat Mater* 13 (10): 970-978. doi: 10.1038/nmat4009.
- Chen, S. S., R. P. Revoltella, S. Papini, M. Michelini, W. Fitzgerald, J. Zimmerberg et L. Margolis. 2003. « Multilineage differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in three-dimensional culture systems. » *Stem Cells* 21 (3): 281-295. doi: 10.1634/stemcells.21-3-281.
- Chitcholtan, K., P. H. Sykes et J. J. Evans. 2012. « The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. » *J Transl Med* 10: 38. doi: 10.1186/1479-5876-10-38.
- Chopra, V., T. V. Dinh et E. V. Hannigan. 1997. « Three-dimensional endothelial-tumor epithelial cell interactions in human cervical cancers. » *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 33 (6): 432-442. doi: 10.1007/s11626-997-0061-y.

- Chung, C. et J. A. Burdick. 2009. « Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis. » *Tissue Eng Part A* 15 (2): 243-254. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0067.
- Coucouvannis, E. et G. R. Martin. 1995. « Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. » *Cell* 83 (2): 279-287. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7585945>.
- Cruz-Acuna, R. et A. J. Garcia. 2017. « Synthetic hydrogels mimicking basement membrane matrices to promote cell-matrix interactions. » *Matrix Biol* 57-58: 324-333. doi: 10.1016/j.matbio.2016.06.002.
- Curschellas, E., A. Matter et U. Regenass. 1987. « Immunolocalization of cytoskeletal elements in human mammary epithelial cells. » *Eur J Cancer Clin Oncol* 23 (10): 1517-1527. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2445580>.
- D'Cruz, C. M., S. E. Moody, S. R. Master, J. L. Hartman, E. A. Keiper, M. B. Imielinski, J. D. Cox, J. Y. Wang, S. I. Ha, B. A. Keister et L. A. Chodosh. 2002. « Persistent parity-induced changes in growth factors, TGF-beta3, and differentiation in the rodent mammary gland. » *Mol Endocrinol* 16 (9): 2034-2051. doi: 10.1210/me.2002-0073.
- Daniel, C. W., P. Strickland et Y. Friedmann. 1995. « Expression and functional role of E- and P-cadherins in mouse mammary ductal morphogenesis and growth. » *Dev Biol* 169 (2): 511-519. doi: 10.1006/dbio.1995.1165.
- David, L., V. Dulong, D. Le Cerf, L. Cazin, M. Lamacz et J. P. Vannier. 2008. « Hyaluronan hydrogel: an appropriate three-dimensional model for evaluation of anticancer drug sensitivity. » *Acta Biomater* 4 (2): 256-263. doi: 10.1016/j.actbio.2007.08.012.
- Dawson, E., G. Mapili, K. Erickson, S. Taqvi et K. Roy. 2008. « Biomaterials for stem cell differentiation. » *Adv Drug Deliv Rev* 60 (2): 215-228. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.037.
- de Lima, C. R., J. de Arimatea dos Santos Junior, A. C. Nazario et Y. M. Michelacci. 2012. « Changes in glycosaminoglycans and proteoglycans of normal breast and fibroadenoma during the menstrual cycle. » *Biochim Biophys Acta* 1820 (7): 1009-1019. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.04.010.
- Debnath, J., S. K. Muthuswamy et J. S. Brugge. 2003. « Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. » *Methods* 30 (3): 256-268. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798140>.
- Deugnier, M. A., E. P. Moiseyeva, J. P. Thiery et M. Glukhova. 1995. « Myoepithelial cell differentiation in the developing mammary gland: progressive acquisition of smooth muscle phenotype. » *Dev Dyn* 204 (2): 107-117. doi: 10.1002/aja.1002040202.
- Deugnier, M. A., J. Teuliere, M. M. Faraldo, J. P. Thiery et M. A. Glukhova. 2002. « The importance of being a myoepithelial cell. » *Breast Cancer Res* 4 (6): 224-230. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473168>.

- Edmondson, R., J. J. Broglie, A. F. Adcock et L. Yang. 2014. « Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. » *Assay Drug Dev Technol* 12 (4): 207-218. doi: 10.1089/adt.2014.573.
- Eklom, P., P. Lonai et J. F. Talts. 2003. « Expression and biological role of laminin-1. » *Matrix Biol* 22 (1): 35-47. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12714040>.
- El-Sabban, M. E., L. F. Abi-Mosleh et R. S. Talhouk. 2003. « Developmental regulation of gap junctions and their role in mammary epithelial cell differentiation. » *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8 (4): 463-473. doi: 10.1023/B:JOMG.0000017432.04930.76.
- Emerman, J. T. et A. W. Vogl. 1986. « Cell size and shape changes in the myoepithelium of the mammary gland during differentiation. » *Anat Rec* 216 (3): 405-415. doi: 10.1002/ar.1092160310.
- Fallica, B., J. S. Maffei, S. Villa, G. Makin et M. Zaman. 2012. « Alteration of cellular behavior and response to PI3K pathway inhibition by culture in 3D collagen gels. » *PLoS One* 7 (10): e48024. doi: 10.1371/journal.pone.0048024.
- Fang, Y. et R. M. Eglén. 2017. « Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. » *SLAS Discov* 22 (5): 456-472. doi: 10.1177/1087057117696795.
- Farquhar, M. G. et G. E. Palade. 1963. « Junctional complexes in various epithelia. » *J Cell Biol* 17: 375-412. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13944428>.
- Fata, J. E., Z. Werb et M. J. Bissell. 2004. « Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. » *Breast Cancer Res* 6 (1): 1-11. doi: 10.1186/bcr634.
- Friedland, J. C., M. H. Lee et D. Boettiger. 2009. « Mechanically activated integrin switch controls  $\alpha 5 \beta 1$  function. » *Science* 323 (5914): 642-644. doi: 10.1126/science.1168441.
- Fujiki, H., E. Sueoka et M. Suganuma. 2013. « Tumor promoters: from chemicals to inflammatory proteins. » *J Cancer Res Clin Oncol* 139 (10): 1603-1614. doi: 10.1007/s00432-013-1455-8.
- Gattazzo, F., A. Urciuolo et P. Bonaldo. 2014. « Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. » *Biochim Biophys Acta* 1840 (8): 2506-2519. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.010.
- Geddes, D. T. 2007. « Inside the lactating breast: the latest anatomy research. » *J Midwifery Womens Health* 52 (6): 556-563. doi: 10.1016/j.jmwh.2007.05.004.
- Germano, S., S. Kennedy, S. Rani, G. Gleeson, M. Clynes, P. Doolan, S. McDonnell, L. Hughes, J. Crown et L. O'Driscoll. 2012. « MAGE-D4B is a novel marker of poor prognosis and potential therapeutic target involved in breast cancer tumorigenesis. » *Int J Cancer* 130 (9): 1991-2002. doi: 10.1002/ijc.26200.
- Gill, B. J. et J. L. West. 2014. « Modeling the tumor extracellular matrix: Tissue engineering tools repurposed towards new frontiers in cancer biology. » *J Biomech* 47 (9): 1969-1978. doi: 10.1016/j.jbiomech.2013.09.029.



- Goldberg, G. S., V. Valiunas et P. R. Brink. 2004. « Selective permeability of gap junction channels. » *Biochim Biophys Acta* 1662 (1-2): 96-101. doi: 10.1016/j.bbamem.2003.11.022.
- Goodenough, D. A., J. A. Goliger et D. L. Paul. 1996. « Connexins, connexons, and intercellular communication. » *Annu Rev Biochem* 65: 475-502. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002355.
- Goodwin, T. J., T. L. Prewett, D. A. Wolf et G. F. Spaulding. 1993. « Reduced shear stress: a major component in the ability of mammalian tissues to form three-dimensional assemblies in simulated microgravity. » *J Cell Biochem* 51 (3): 301-311. doi: 10.1002/jcb.240510309.
- Grant, C. A., D. J. Brockwell, S. E. Radford et N. H. Thomson. 2009. « Tuning the elastic modulus of hydrated collagen fibrils. » *Biophys J* 97 (11): 2985-2992. doi: 10.1016/j.bpj.2009.09.010.
- Gudjonsson, T., L. Ronnov-Jessen, R. Villadsen, F. Rank, M. J. Bissell et O. W. Petersen. 2002. « Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. » *J Cell Sci* 115 (Pt 1): 39-50. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801722>.
- Gurski, L. A., A. K. Jha, C. Zhang, X. Jia et M. C. Farach-Carson. 2009. « Hyaluronic acid-based hydrogels as 3D matrices for in vitro evaluation of chemotherapeutic drugs using poorly adherent prostate cancer cells. » *Biomaterials* 30 (30): 6076-6085. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.054.
- Hackett, A. J., H. S. Smith, E. L. Springer, R. B. Owens, W. A. Nelson-Rees, J. L. Riggs et M. B. Gardner. 1977. « Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. » *J Natl Cancer Inst* 58 (6): 1795-1806. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/864756>.
- Hanahan, D. et R. A. Weinberg. 2000. « The hallmarks of cancer. » *Cell* 100 (1): 57-70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>.
- . 2011. « Hallmarks of cancer: the next generation. » *Cell* 144 (5): 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hansen, K. C., L. Kiemele, O. Maller, J. O'Brien, A. Shankar, J. Fornetti et P. Schedin. 2009. « An in-solution ultrasonication-assisted digestion method for improved extracellular matrix proteome coverage. » *Mol Cell Proteomics* 8 (7): 1648-1657. doi: 10.1074/mcp.M900039-MCP200.
- Harris, Jay R. 2014. *Diseases of the breast*, Fifth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer.
- Hassiotou, F. et D. Geddes. 2013. « Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. » *Clin Anat* 26 (1): 29-48. doi: 10.1002/ca.22165.

- Hazan, R. B., L. Kang, B. P. Whooley et P. I. Borgen. 1997. « N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. » *Cell Adhes Commun* 4 (6): 399-411. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177902>.
- Hennighausen, L. et G. W. Robinson. 2005. « Information networks in the mammary gland. » *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (9): 715-725. doi: 10.1038/nrm1714.
- Henson, B., F. Li, D. D. Coatney, T. E. Carey, R. S. Mitra, K. L. Kirkwood et N. J. D'Silva. 2007. « An orthotopic floor-of-mouth model for locoregional growth and spread of human squamous cell carcinoma. » *J Oral Pathol Med* 36 (6): 363-370. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00549.x.
- Hines, W. C., P. Yaswen et M. J. Bissell. 2015. « Modelling breast cancer requires identification and correction of a critical cell lineage-dependent transduction bias. » *Nat Commun* 6: 6927. doi: 10.1038/ncomms7927.
- Holen, I., V. Speirs, B. Morrissey et K. Blyth. 2017. « In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions. » *Dis Model Mech* 10 (4): 359-371. doi: 10.1242/dmm.028274.
- Hon, J. D., B. Singh, A. Sahin, G. Du, J. Wang, V. Y. Wang, F. M. Deng, D. Y. Zhang, M. E. Monaco et P. Lee. 2016. « Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. » *Am J Cancer Res* 6 (9): 1864-1872. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27725895>.
- Hongisto, V., S. Jernstrom, V. Fey, J. P. Mpindi, K. Kleivi Sahlberg, O. Kallioniemi et M. Perala. 2013. « High-throughput 3D screening reveals differences in drug sensitivities between culture models of JIMT1 breast cancer cells. » *PLoS One* 8 (10): e77232. doi: 10.1371/journal.pone.0077232.
- Horibe, T., A. Torisawa, R. Akiyoshi, Y. Hatta-Ohashi, H. Suzuki et K. Kawakami. 2014. « Transfection efficiency of normal and cancer cell lines and monitoring of promoter activity by single-cell bioluminescence imaging. » *Luminescence* 29 (1): 96-100. doi: 10.1002/bio.2508.
- Hovey, R. C. et L. Aimo. 2010. « Diverse and active roles for adipocytes during mammary gland growth and function. » *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15 (3): 279-290. doi: 10.1007/s10911-010-9187-8.
- Hovey, R. C., A. S. Goldhar, J. Baffi et B. K. Vonderhaar. 2001. « Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor expression in epithelial and stromal cells during mouse mammary gland development. » *Mol Endocrinol* 15 (5): 819-831. doi: 10.1210/mend.15.5.0635.
- Howard, B. A. et P. Lu. 2014. « Stromal regulation of embryonic and postnatal mammary epithelial development and differentiation. » *Semin Cell Dev Biol* 25-26: 43-51. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.01.004.
- Howlett, A. R., N. Bailey, C. Damsky, O. W. Petersen et M. J. Bissell. 1995. « Cellular growth and survival are mediated by beta 1 integrins in normal human breast epithelium but not in breast carcinoma. » *J Cell Sci* 108 ( Pt 5): 1945-1957. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544798>.



- Huang, H., Y. Ding, X. S. Sun et T. A. Nguyen. 2013. « Peptide hydrogelation and cell encapsulation for 3D culture of MCF-7 breast cancer cells. » *PLoS One* 8 (3): e59482. doi: 10.1371/journal.pone.0059482.
- Hughes, C. S., L. M. Postovit et G. A. Lajoie. 2010. « Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. » *Proteomics* 10 (9): 1886-1890. doi: 10.1002/pmic.200900758.
- Hughes, K., J. A. Wickenden, J. E. Allen et C. J. Watson. 2012. « Conditional deletion of Stat3 in mammary epithelium impairs the acute phase response and modulates immune cell numbers during post-lactational regression. » *J Pathol* 227 (1): 106-117. doi: 10.1002/path.3961.
- Inman, J. L., C. Robertson, J. D. Mott et M. J. Bissell. 2015. « Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. » *Development* 142 (6): 1028-1042. doi: 10.1242/dev.087643.
- Itoh, M. et M. J. Bissell. 2003. « The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. » *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8 (4): 449-462. doi: 10.1023/B:JOMG.0000017431.45314.07.
- Ivascu, A. et M. Kubbies. 2006. « Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. » *J Biomol Screen* 11 (8): 922-932. doi: 10.1177/1087057106292763.
- Javed, A. et A. Lteif. 2013. « Development of the human breast. » *Semin Plast Surg* 27 (1): 5-12. doi: 10.1055/s-0033-1343989.
- Jiang, W. G., G. Davies, T. A. Martin, C. Parr, G. Watkins, M. D. Mason et R. E. Mansel. 2006. « Expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP in human breast cancer and its impact on invasiveness of breast cancer cells. » *Int J Mol Med* 17 (4): 583-590. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16525713>.
- Jones, J. L., J. A. Shaw, J. H. Pringle et R. A. Walker. 2003. « Primary breast myoepithelial cells exert an invasion-suppressor effect on breast cancer cells via paracrine down-regulation of MMP expression in fibroblasts and tumour cells. » *J Pathol* 201 (4): 562-572. doi: 10.1002/path.1483.
- Kass, L., J. T. Erler, M. Dembo et V. M. Weaver. 2007. « Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. » *Int J Biochem Cell Biol* 39 (11): 1987-1994. doi: 10.1016/j.biocel.2007.06.025.
- Kaur, G. et J. M. Dufour. 2012. « Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. » *Spermatogenesis* 2 (1): 1-5. doi: 10.4161/spmg.19885.
- Kenny, P. A., G. Y. Lee, C. A. Myers, R. M. Neve, J. R. Semeiks, P. T. Spellman, K. Lorenz, E. H. Lee, M. H. Barcellos-Hoff, O. W. Petersen, J. W. Gray et M. J. Bissell. 2007. « The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. » *Mol Oncol* 1 (1): 84-96. doi: 10.1016/j.molonc.2007.02.004.

- Khaitan, D., S. Chandna, M. B. Arya et B. S. Dwarakanath. 2006. « Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. » *J Transl Med* 4: 12. doi: 10.1186/1479-5876-4-12.
- Kim, J. B. 2005. « Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. » *Semin Cancer Biol* 15 (5): 365-377. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.05.002.
- Kim, J. B., R. Stein et M. J. O'Hare. 2004. « Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer-- a review. » *Breast Cancer Res Treat* 85 (3): 281-291. doi: 10.1023/B:BREA.0000025418.88785.2b.
- Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, L. A. Liotta, P. G. Robey, K. Tryggvason et G. R. Martin. 1982. « Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. » *Biochemistry* 21 (24): 6188-6193. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6217835>.
- Knight, E. et S. Przyborski. 2015. « Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. » *J Anat* 227 (6): 746-756. doi: 10.1111/joa.12257.
- Knights, A. J., A. P. Funnell, M. Crossley et R. C. Pearson. 2012. « Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread. » *Trends Cancer Res* 8: 61-69. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450077>.
- Knudsen, K. A. et M. J. Wheelock. 2005. « Cadherins and the mammary gland. » *J Cell Biochem* 95 (3): 488-496. doi: 10.1002/jcb.20419.
- Krause, S., M. V. Maffini, A. M. Soto et C. Sonnenschein. 2008. « A novel 3D in vitro culture model to study stromal-epithelial interactions in the mammary gland. » *Tissue Eng Part C Methods* 14 (3): 261-271. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0030.
- Kurosawa, H. 2007. « Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. » *J Biosci Bioeng* 103 (5): 389-398. doi: 10.1263/jbb.103.389.
- Kutschka, I., I. Y. Chen, T. Kofidis, T. Arai, G. von Degenfeld, A. Y. Sheikh, S. L. Hendry, J. Pearl, G. Hoyt, R. Sista, P. C. Yang, H. M. Blau, S. S. Gambhir et R. C. Robbins. 2006. « Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. » *Circulation* 114 (1 Suppl): I167-173. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001297.
- Laird, D. W. 2006. « Life cycle of connexins in health and disease. » *Biochem J* 394 (Pt 3): 527-543. doi: 10.1042/BJ20051922.
- Laird, D. W., P. Fistouris, G. Batist, L. Alpert, H. T. Huynh, G. D. Carystinos et M. A. Alaoui-Jamali. 1999. « Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. » *Cancer Res* 59 (16): 4104-4110. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10463615>.
- Lakhani, S. R. et M. J. O'Hare. 2001. « The mammary myoepithelial cell--Cinderella or ugly sister? » *Breast Cancer Res* 3 (1): 1-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11250738>.

- Lam, S., R. N. van der Geest, N. A. Verhagen, M. R. Daha et C. van Kooten. 2004. « Secretion of collagen type IV by human renal fibroblasts is increased by high glucose via a TGF-beta-independent pathway. » *Nephrol Dial Transplant* 19 (7): 1694-1701. doi: 10.1093/ndt/gfh235.
- Langhans, S. A. 2018. « Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. » *Front Pharmacol* 9: 6. doi: 10.3389/fphar.2018.00006.
- LeBleu, V. S., B. Macdonald et R. Kalluri. 2007. « Structure and function of basement membranes. » *Exp Biol Med (Maywood)* 232 (9): 1121-1129. doi: 10.3181/0703-MR-72.
- Leblond, C. P. et S. Inoue. 1989. « Structure, composition, and assembly of basement membrane. » *Am J Anat* 185 (4): 367-390. doi: 10.1002/aja.1001850403.
- Lee, G. Y., P. A. Kenny, E. H. Lee et M. J. Bissell. 2007. « Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. » *Nat Methods* 4 (4): 359-365. doi: 10.1038/nmeth1015.
- Lee, J., M. J. Cuddihy et N. A. Kotov. 2008. « Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. » *Tissue Eng Part B Rev* 14 (1): 61-86. doi: 10.1089/teb.2007.0150.
- Lelievre, S. A., V. M. Weaver, J. A. Nickerson, C. A. Larabell, A. Bhaumik, O. W. Petersen et M. J. Bissell. 1998. « Tissue phenotype depends on reciprocal interactions between the extracellular matrix and the structural organization of the nucleus. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (25): 14711-14716. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843954>.
- Levental, K. R., H. Yu, L. Kass, J. N. Lakins, M. Egeblad, J. T. Erler, S. F. Fong, K. Csiszar, A. Giaccia, W. Weninger, M. Yamauchi, D. L. Gasser et V. M. Weaver. 2009. « Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. » *Cell* 139 (5): 891-906. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.027.
- Li, M. L., J. Aggeler, D. A. Farson, C. Hatier, J. Hassell et M. J. Bissell. 1987. « Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1): 136-140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3467345>.
- Li, S., D. Edgar, R. Fassler, W. Wadsworth et P. D. Yurchenco. 2003. « The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. » *Dev Cell* 4 (5): 613-624. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12737798>.
- Lin, R. Z. et H. Y. Chang. 2008. « Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. » *Biotechnol J* 3 (9-10): 1172-1184. doi: 10.1002/biot.200700228.
- Liu, X. et K. M. Chu. 2014. « E-cadherin and gastric cancer: cause, consequence, and applications. » *Biomed Res Int* 2014: 637308. doi: 10.1155/2014/637308.
- Liu, Y., C. Yu, Y. Wu, X. Sun, Q. Su, C. You et H. Xin. 2017. « CD44(+) fibroblasts increases breast cancer cell survival and drug resistance via IGF2BP3-CD44-IGF2 signalling. » *J Cell Mol Med* 21 (9): 1979-1988. doi: 10.1111/jcmm.13118.

- Lovitt, C. J., T. B. Shelper et V. M. Avery. 2014. « Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. » *Biology (Basel)* 3 (2): 345-367. doi: 10.3390/biology3020345.
- Lu, P., V. M. Weaver et Z. Werb. 2012. « The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. » *J Cell Biol* 196 (4): 395-406. doi: 10.1083/jcb.201102147.
- Luca, A. C., S. Mersch, R. Deenen, S. Schmidt, I. Messner, K. L. Schafer, S. E. Baldus, W. Huckenbeck, R. P. Piekorz, W. T. Knoefel, A. Krieg et N. H. Stoecklein. 2013. « Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. » *PLoS One* 8 (3): e59689. doi: 10.1371/journal.pone.0059689.
- Luhr, I., A. Friedl, T. Overath, A. Tholey, T. Kunze, F. Hilpert, S. Sebens, N. Arnold, F. Rosel, H. H. Oberg, N. Maass, C. Mundhenke, W. Jonat et M. Bauer. 2012. « Mammary fibroblasts regulate morphogenesis of normal and tumorigenic breast epithelial cells by mechanical and paracrine signals. » *Cancer Lett* 325 (2): 175-188. doi: 10.1016/j.canlet.2012.06.014.
- Lutolf, M. P. et J. A. Hubbell. 2005. « Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. » *Nat Biotechnol* 23 (1): 47-55. doi: 10.1038/nbt1055.
- Lutolf, M. P., J. L. Lauer-Fields, H. G. Schmoekel, A. T. Metters, F. E. Weber, G. B. Fields et J. A. Hubbell. 2003. « Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (9): 5413-5418. doi: 10.1073/pnas.0737381100.
- Macias, H. et L. Hinck. 2012. « Mammary gland development. » *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1 (4): 533-557. doi: 10.1002/wdev.35.
- Marchese, S. et E. Silva. 2012. « Disruption of 3D MCF-12A breast cell cultures by estrogens--an in vitro model for ER-mediated changes indicative of hormonal carcinogenesis. » *PLoS One* 7 (10): e45767. doi: 10.1371/journal.pone.0045767.
- Maria, O. M., O. Maria, Y. Liu, S. V. Komarova et S. D. Tran. 2011. « Matrigel improves functional properties of human submandibular salivary gland cell line. » *Int J Biochem Cell Biol* 43 (4): 622-631. doi: 10.1016/j.biocel.2011.01.001.
- Markov, A. G., J. R. Aschenbach et S. Amasheh. 2017. « The epithelial barrier and beyond: Claudins as amplifiers of physiological organ functions. » *IUBMB Life* 69 (5): 290-296. doi: 10.1002/iub.1622.
- Mazzoleni, G., D. Di Lorenzo et N. Steimberg. 2009. « Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? » *Genes Nutr* 4 (1): 13-22. doi: 10.1007/s12263-008-0107-0.
- McEwen, A. E., D. E. Escobar et C. J. Gottardi. 2012. « Signaling from the adherens junction. » *Subcell Biochem* 60: 171-196. doi: 10.1007/978-94-007-4186-7\_8.
- McLachlan, E., Q. Shao et D. W. Laird. 2007. « Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. » *J Membr Biol* 218 (1-3): 107-121. doi: 10.1007/s00232-007-9052-x.

- Medina, D. 1996. « The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. » *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1 (1): 5-19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10887477>.
- Mehta, R. R., J. M. Graves, G. D. Hart, A. Shilkaitis et T. K. Das Gupta. 1993. « Growth and metastasis of human breast carcinomas with Matrigel in athymic mice. » *Breast Cancer Res Treat* 25 (1): 65-71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8518409>.
- Meng, W. et M. Takeichi. 2009. « Adherens junction: molecular architecture and regulation. » *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (6): a002899. doi: 10.1101/cshperspect.a002899.
- Mese, G., G. Richard et T. W. White. 2007. « Gap junctions: basic structure and function. » *J Invest Dermatol* 127 (11): 2516-2524. doi: 10.1038/sj.jid.5700770.
- Mishra, M. N., K. K. Vangara et S. Palakurthi. 2014. « Transcriptional targeting of human liver carboxylesterase (hCE1m6) and simultaneous expression of anti-BCRP shRNA enhances sensitivity of breast cancer cells to CPT-11. » *Anticancer Res* 34 (11): 6345-6351. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368234>.
- Mohand-Kaci, F., N. Assoul, I. Martelly, E. Allaire et M. Zidi. 2013. « Optimized hyaluronic acid-hydrogel design and culture conditions for preservation of mesenchymal stem cell properties. » *Tissue Eng Part C Methods* 19 (4): 288-298. doi: 10.1089/ten.TEC.2012.0144.
- Monaghan, P., C. Clarke, N. P. Perusinghe, D. W. Moss, X. Y. Chen et W. H. Evans. 1996. « Gap junction distribution and connexin expression in human breast. » *Exp Cell Res* 223 (1): 29-38. doi: 10.1006/excr.1996.0055.
- Morris, M. A., L. S. Young et C. W. Dawson. 2008. « DNA tumour viruses promote tumour cell invasion and metastasis by deregulating the normal processes of cell adhesion and motility. » *Eur J Cell Biol* 87 (8-9): 677-697. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.03.005.
- Mouw, J. K., G. Ou et V. M. Weaver. 2014. « Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. » *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 (12): 771-785. doi: 10.1038/nrm3902.
- Mullen, P. 2004. « The use of Matrigel to facilitate the establishment of human cancer cell lines as xenografts. » *Methods Mol Med* 88: 287-292. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634240>.
- Muschler, J. et C. H. Streuli. 2010. « Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. » *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (10): a003202. doi: 10.1101/cshperspect.a003202.
- Narayanan, A. S. et R. C. Page. 1985. « Synthesis of type V collagen by fibroblasts derived from normal, inflamed and hyperplastic human connective tissues. » *Coll Relat Res* 5 (4): 297-304. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4053560>.
- Naylor, M. J., N. Li, J. Cheung, E. T. Lowe, E. Lambert, R. Marlow, P. Wang, F. Schatzmann, T. Wintermantel, G. Schuetz, A. R. Clarke, U. Mueller, N. E. Hynes et C. H. Streuli. 2005. « Ablation of beta1 integrin in mammary epithelium reveals a key role for integrin in glandular

- morphogenesis and differentiation. » *J Cell Biol* 171 (4): 717-728. doi: 10.1083/jcb.200503144.
- Nguyen, M., M. C. Lee, J. L. Wang, J. S. Tomlinson, Z. M. Shao, M. L. Alpaugh et S. H. Barsky. 2000. « The human myoepithelial cell displays a multifaceted anti-angiogenic phenotype. » *Oncogene* 19 (31): 3449-3459. doi: 10.1038/sj.onc.1203677.
- Niessen, C. M. 2007. « Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. » *J Invest Dermatol* 127 (11): 2525-2532. doi: 10.1038/sj.jid.5700865.
- Niranjan, B., L. Buluwela, J. Yant, N. Perusinghe, A. Atherton, D. Phippard, T. Dale, B. Gusterson et T. Kamalati. 1995. « HGF/SF: a potent cytokine for mammary growth, morphogenesis and development. » *Development* 121 (9): 2897-2908. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7555716>.
- O'Hare, M. J., M. G. Ormerod, P. Monaghan, E. B. Lane et B. A. Gusterson. 1991. « Characterization in vitro of luminal and myoepithelial cells isolated from the human mammary gland by cell sorting. » *Differentiation* 46 (3): 209-221. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1833254>.
- Pampaloni, F., E. G. Reynaud et E. H. Stelzer. 2007. « The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. » *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (10): 839-845. doi: 10.1038/nrm2236.
- Pandey, P. R., J. Saidou et K. Watabe. 2010. « Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. » *Front Biosci (Landmark Ed)* 15: 226-236. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036817>.
- Paredes, J., F. Milanezi, L. Viegas, I. Amendoeira et F. Schmitt. 2002. « P-cadherin expression is associated with high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. » *Virchows Arch* 440 (1): 16-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11942571>.
- Parker, J. S., M. Mullins, M. C. Cheang, S. Leung, D. Voduc, T. Vickery, S. Davies, C. Fauron, X. He, Z. Hu, J. F. Quackenbush, I. J. Stijleman, J. Palazzo, J. S. Marron, A. B. Nobel, E. Mardis, T. O. Nielsen, M. J. Ellis, C. M. Perou et P. S. Bernard. 2009. « Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. » *J Clin Oncol* 27 (8): 1160-1167. doi: 10.1200/JCO.2008.18.1370.
- Paszek, M. J. et V. M. Weaver. 2004. « The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. » *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9 (4): 325-342. doi: 10.1007/s10911-004-1404-x.
- Paszek, M. J., N. Zahir, K. R. Johnson, J. N. Lakins, G. I. Rozenberg, A. Gefen, C. A. Reinhart-King, S. S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D. A. Hammer et V. M. Weaver. 2005. « Tensional homeostasis and the malignant phenotype. » *Cancer Cell* 8 (3): 241-254. doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.010.
- Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown et D. Botstein. 2000. « Molecular portraits of human breast tumours. » *Nature* 406 (6797): 747-752. doi: 10.1038/35021093.



- Petersen, O. W., L. Ronnov-Jessen, A. R. Howlett et M. J. Bissell. 1992. « Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (19): 9064-9068. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384042>.
- Pitot, H. C. et Y. P. Dragan. 1991. « Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. » *FASEB J* 5 (9): 2280-2286. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1860619>.
- Polyak, K. 2011. « Heterogeneity in breast cancer. » *J Clin Invest* 121 (10): 3786-3788. doi: 10.1172/JCI60534.
- Polyak, K. et R. Kalluri. 2010. « The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. » *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (11): a003244. doi: 10.1101/cshperspect.a003244.
- Prockop, D. J. 1982. « How does a skin fibroblast make type I collagen fibers? » *J Invest Dermatol* 79 Suppl 1: 3s-6s. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7086190>.
- Provenzano, P. P., D. R. Inman, K. W. Eliceiri et P. J. Keely. 2009. « Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage. » *Oncogene* 28 (49): 4326-4343. doi: 10.1038/onc.2009.299.
- Radice, G. L., C. L. Sauer, I. Kostetskii, A. Peralta Soler et K. A. Knudsen. 2003. « Inappropriate P-cadherin expression in the mouse mammary epithelium is compatible with normal mammary gland function. » *Differentiation* 71 (6): 361-373. doi: 10.1046/j.1432-0436.2003.7106005.x.
- Rakha, E. A., J. S. Reis-Filho, F. Baehner, D. J. Dabbs, T. Decker, V. Eusebi, S. B. Fox, S. Ichihara, J. Jacquemier, S. R. Lakhani, J. Palacios, A. L. Richardson, S. J. Schnitt, F. C. Schmitt, P. H. Tan, G. M. Tse, S. Badve et I. O. Ellis. 2010. « Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. » *Breast Cancer Res* 12 (4): 207. doi: 10.1186/bcr2607.
- Redzic, Z. 2011. « Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. » *Fluids Barriers CNS* 8 (1): 3. doi: 10.1186/2045-8118-8-3.
- Roignot, J., X. Peng et K. Mostov. 2013. « Polarity in mammalian epithelial morphogenesis. » *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (2). doi: 10.1101/cshperspect.a013789.
- Ronnov-Jessen, L., O. W. Petersen et M. J. Bissell. 1996. « Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. » *Physiol Rev* 76 (1): 69-125. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8592733>.
- Runswick, S. K., M. J. O'Hare, L. Jones, C. H. Streuli et D. R. Garrod. 2001. « Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. » *Nat Cell Biol* 3 (9): 823-830. doi: 10.1038/ncb0901-823.

- Russell, T. D., S. Jindal, S. Agunbiade, D. Gao, M. Troxell, V. F. Borges et P. Schedin. 2015. « Myoepithelial cell differentiation markers in ductal carcinoma in situ progression. » *Am J Pathol* 185 (11): 3076-3089. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.07.004.
- Schneeberger, E. E. et R. D. Lynch. 1992. « Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. » *Am J Physiol* 262 (6 Pt 1): L647-661. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1616050>.
- Shamir, E. R. et A. J. Ewald. 2014. « Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. » *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 (10): 647-664. doi: 10.1038/nrm3873.
- Shield, K., M. L. Ackland, N. Ahmed et G. E. Rice. 2009. « Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. » *Gynecol Oncol* 113 (1): 143-148. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.11.032.
- Siddiqui, I. A., V. Sanna, N. Ahmad, M. Sechi et H. Mukhtar. 2015. « Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. » *Ann N Y Acad Sci* 1348 (1): 20-31. doi: 10.1111/nyas.12811.
- Silberstein, G. B. 2001. « Tumour-stromal interactions. Role of the stroma in mammary development. » *Breast Cancer Res* 3 (4): 218-223. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11434872>.
- Simian, M., Y. Hirai, M. Navre, Z. Werb, A. Lochter et M. J. Bissell. 2001. « The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. » *Development* 128 (16): 3117-3131. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11688561>.
- Simon-Assmann, P., M. Kedinger, A. De Arcangelis, V. Rousseau et P. Simo. 1995. « Extracellular matrix components in intestinal development. » *Experientia* 51 (9-10): 883-900. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7556570>.
- Smith, S. J., M. Wilson, J. H. Ward, C. V. Rahman, A. C. Peet, D. C. Macarthur, F. R. Rose, R. G. Grundy et R. Rahman. 2012. « Recapitulation of tumor heterogeneity and molecular signatures in a 3D brain cancer model with decreased sensitivity to histone deacetylase inhibition. » *PLoS One* 7 (12): e52335. doi: 10.1371/journal.pone.0052335.
- Sohl, G. et K. Willecke. 2004. « Gap junctions and the connexin protein family. » *Cardiovasc Res* 62 (2): 228-232. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.11.013.
- Solchaga, L. A., J. E. Dennis, V. M. Goldberg et A. I. Caplan. 1999. « Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. » *J Orthop Res* 17 (2): 205-213. doi: 10.1002/jor.1100170209.
- Sommers, C. L. 1996. « The role of cadherin-mediated adhesion in breast cancer. » *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1 (2): 219-229. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10887495>.
- Sopel, M. 2010. « The myoepithelial cell: its role in normal mammary glands and breast cancer. » *Folia Morphol (Warsz)* 69 (1): 1-14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20235044>.



- Sorokin, L. M., S. Conzelmann, P. Ekblom, C. Battaglia, M. Aumailley et R. Timpl. 1992. « Monoclonal antibodies against laminin A chain fragment E3 and their effects on binding to cells and proteoglycan and on kidney development. » *Exp Cell Res* 201 (1): 137-144. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1612119>.
- Spring, K. R. 1998. « Routes and mechanism of fluid transport by epithelia. » *Annu Rev Physiol* 60: 105-119. doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.105.
- Stelwagen, K. et K. Singh. 2014. « The role of tight junctions in mammary gland function. » *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 19 (1): 131-138. doi: 10.1007/s10911-013-9309-1.
- Sternlicht, M. D. et S. H. Barsky. 1997. « The myoepithelial defense: a host defense against cancer. » *Med Hypotheses* 48 (1): 37-46. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9049988>.
- Sternlicht, M. D., P. Kedeshian, Z. M. Shao, S. Safarians et S. H. Barsky. 1997. « The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. » *Clin Cancer Res* 3 (11): 1949-1958. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815584>.
- Stewart, M. K., J. Simek et D. W. Laird. 2015. « Insights into the role of connexins in mammary gland morphogenesis and function. » *Reproduction* 149 (6): R279-290. doi: 10.1530/REP-14-0661.
- Streuli, C. H. 2002. « Maspin is a tumour suppressor that inhibits breast cancer tumour metastasis in vivo. » *Breast Cancer Res* 4 (4): 137-140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12100737>.
- Su, Y., K. Shankar, O. Rahal et R. C. Simmen. 2011. « Bidirectional signaling of mammary epithelium and stroma: implications for breast cancer--preventive actions of dietary factors. » *J Nutr Biochem* 22 (7): 605-611. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.09.008.
- Swamydas, M., J. M. Eddy, K. J. Burg et D. Dreau. 2010. « Matrix compositions and the development of breast acini and ducts in 3D cultures. » *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46 (8): 673-684. doi: 10.1007/s11626-010-9323-1.
- Teleki, I., A. M. Szasz, M. E. Maros, B. Gyorffy, J. Kulka, N. Meggyeshazi, G. Kiszner, P. Balla, A. Samu et T. Krenacs. 2014. « Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis. » *PLoS One* 9 (11): e112541. doi: 10.1371/journal.pone.0112541.
- Thomas, C. H., J. H. Collier, C. S. Sfeir et K. E. Healy. 2002. « Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (4): 1972-1977. doi: 10.1073/pnas.032668799.
- Tibbitt, M. W. et K. S. Anseth. 2009. « Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. » *Biotechnol Bioeng* 103 (4): 655-663. doi: 10.1002/bit.22361.
- Tiede, B. et Y. Kang. 2011. « From milk to malignancy: the role of mammary stem cells in development, pregnancy and breast cancer. » *Cell Res* 21 (2): 245-257. doi: 10.1038/cr.2011.11.

- Torisawa, Y. S., H. Shiku, T. Yasukawa, M. Nishizawa et T. Matsue. 2005. « Multi-channel 3-D cell culture device integrated on a silicon chip for anticancer drug sensitivity test. » *Biomaterials* 26 (14): 2165-2172. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.05.028.
- Tsukita, S., M. Furuse et M. Itoh. 2001. « Multifunctional strands in tight junctions. » *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (4): 285-293. doi: 10.1038/35067088.
- Tzu, J. et M. P. Marinkovich. 2008. « Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. » *Int J Biochem Cell Biol* 40 (2): 199-214. doi: 10.1016/j.biocel.2007.07.015.
- Vaillant, F., G. J. Lindeman et J. E. Visvader. 2011. « Jekyll or Hyde: does Matrigel provide a more or less physiological environment in mammary repopulating assays? » *Breast Cancer Res* 13 (3): 108. doi: 10.1186/bcr2851.
- Vantangoli, M. M., S. J. Madnick, S. M. Huse, P. Weston et K. Boekelheide. 2015. « MCF-7 Human Breast Cancer Cells Form Differentiated Microtissues in Scaffold-Free Hydrogels. » *PLoS One* 10 (8): e0135426. doi: 10.1371/journal.pone.0135426.
- Veltmaat, J. M., W. Van Veelen, J. P. Thiery et S. Bellusci. 2004. « Identification of the mammary line in mouse by Wnt10b expression. » *Dev Dyn* 229 (2): 349-356. doi: 10.1002/dvdy.10441.
- Vergani, L., M. Grattarola et C. Nicolini. 2004. « Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape. » *Int J Biochem Cell Biol* 36 (8): 1447-1461. doi: 10.1016/j.biocel.2003.11.015.
- Vidi, P. A., M. J. Bissell et S. A. Lelievre. 2013. « Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why. » *Methods Mol Biol* 945: 193-219. doi: 10.1007/978-1-62703-125-7\_13.
- Vinci, M., S. Gowan, F. Boxall, L. Patterson, M. Zimmermann, W. Court, C. Lomas, M. Mendiola, D. Hardisson et S. A. Eccles. 2012. « Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. » *BMC Biol* 10: 29. doi: 10.1186/1741-7007-10-29.
- Wang, X., L. Sun, M. V. Maffini, A. Soto, C. Sonnenschein et D. L. Kaplan. 2010. « A complex 3D human tissue culture system based on mammary stromal cells and silk scaffolds for modeling breast morphogenesis and function. » *Biomaterials* 31 (14): 3920-3929. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.118.
- Wang, Y. J., H. L. Liu, H. T. Guo, H. W. Wen et J. Liu. 2004. « Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich. » *World J Gastroenterol* 10 (5): 699-702. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14991941>.
- Watson, C. J. et W. T. Khaled. 2008. « Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. » *Development* 135 (6): 995-1003. doi: 10.1242/dev.005439.
- Weaver, V. M., O. W. Petersen, F. Wang, C. A. Larabell, P. Briand, C. Damsky et M. J. Bissell. 1997. « Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional

- culture and in vivo by integrin blocking antibodies. » *J Cell Biol* 137 (1): 231-245. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9105051>.
- Wei, W. C., H. H. Lin, M. R. Shen et M. J. Tang. 2008. « Mechanosensing machinery for cells under low substratum rigidity. » *Am J Physiol Cell Physiol* 295 (6): C1579-1589. doi: 10.1152/ajpcell.00223.2008.
- Weigelt, B. et M. J. Bissell. 2008. « Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. » *Semin Cancer Biol* 18 (5): 311-321. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.03.013.
- Weigelt, B., C. M. Ghajar et M. J. Bissell. 2014. « The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. » *Adv Drug Deliv Rev* 69-70: 42-51. doi: 10.1016/j.addr.2014.01.001.
- Weinstein, I. B. 1988. « The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment--twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture. » *Cancer Res* 48 (15): 4135-4143. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3292040>.
- Wiechmann, L. et H. M. Kuerer. 2008. « The molecular journey from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. » *Cancer* 112 (10): 2130-2142. doi: 10.1002/cncr.23430.
- Wiseman, B. S. et Z. Werb. 2002. « Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. » *Science* 296 (5570): 1046-1049. doi: 10.1126/science.1067431.
- Wozniak, M. A. et P. J. Keely. 2005. « Use of three-dimensional collagen gels to study mechanotransduction in T47D breast epithelial cells. » *Biol Proced Online* 7: 144-161. doi: 10.1251/bpo112.
- Wu, Y., M. Sarkissyan et J. V. Vadgama. 2016. « Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. » *J Clin Med* 5 (2). doi: 10.3390/jcm5020013.
- Yamamura, K., M. C. Kibbey, S. H. Jun et H. K. Kleinman. 1993. « Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis. » *Semin Cancer Biol* 4 (4): 259-265. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8400148>.
- Yang, X. B., R. S. Bhatnagar, S. Li et R. O. Oreffo. 2004. « Biomimetic collagen scaffolds for human bone cell growth and differentiation. » *Tissue Eng* 10 (7-8): 1148-1159. doi: 10.1089/ten.2004.10.1148.
- Yeh, Y. C., J. Y. Ling, W. C. Chen, H. H. Lin et M. J. Tang. 2017. « Mechanotransduction of matrix stiffness in regulation of focal adhesion size and number: reciprocal regulation of caveolin-1 and beta1 integrin. » *Sci Rep* 7 (1): 15008. doi: 10.1038/s41598-017-14932-6.
- Yu, M., G. Lin, N. Arshadi, I. Kalatskaya, B. Xue, S. Haider, F. Nguyen, P. C. Boutros, A. Elson, L. B. Muthuswamy, N. K. Tonks et S. K. Muthuswamy. 2012. « Expression profiling during mammary epithelial cell three-dimensional morphogenesis identifies PTPRO as a novel regulator of morphogenesis and ErbB2-mediated transformation. » *Mol Cell Biol* 32 (19): 3913-3924. doi: 10.1128/MCB.00068-12.

- Zietarska, M., C. M. Maugard, A. Filali-Mouhim, M. Alam-Fahmy, P. N. Tonin, D. M. Provencher et A. M. Mes-Masson. 2007. « Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). » *Mol Carcinog* 46 (10): 872-885. doi: 10.1002/mc.20315.
- Zou, Y., R. Z. Zhang, P. Sabatelli, M. L. Chu et C. G. Bonnemann. 2008. « Muscle interstitial fibroblasts are the main source of collagen VI synthesis in skeletal muscle: implications for congenital muscular dystrophy types Ullrich and Bethlem. » *J Neuropathol Exp Neurol* 67 (2): 144-154. doi: 10.1097/nen.0b013e3181634ef7.