



HAL
open science

Rôle du Transforming Growth Factor- β (TGF β) au cours de la tumorigenèse pancréatique

David Vincent

► **To cite this version:**

David Vincent. Rôle du Transforming Growth Factor- β (TGF β) au cours de la tumorigenèse pancréatique. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10158 . tel-00985271

HAL Id: tel-00985271

<https://theses.hal.science/tel-00985271>

Submitted on 29 Apr 2014

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

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

N° d'ordre 158-2012

Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ECOLE DOCTORALE BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 5 Octobre 2012 par

David VINCENT

TITRE :

Rôle du Transforming Growth Factor- β (TGF β) au cours de la Tumorigenèse Pancréatique

Directeur de thèse : Dr Laurent BARTHOLIN

Laboratoire : Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon,
UMR INSERM 1052 / CNRS 5286

JURY

Dr Pierre CORDELIER (Rapporteur)

Dr Alain MAUVIEL (Rapporteur)

Pr Pierre DUBUS (Examineur)

Dr Juan IOVANNA (Examineur)

Pr Alain PUISIEUX (Examineur)

Dr Laurent BARTHOLIN (Examineur)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Secrétaire Général

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. BERNARD

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

Remerciements

Ca y est, ma thèse est terminée. J'ai beau l'écrire, je ne réalise toujours pas. Et pourtant quand je regarde le calendrier, il a bien du se passer quelque chose... Plus je réfléchis à comment remplir cette partie, plus je me dis que je vais devoir remercier un grand nombre de personnes. Je vais donc essayer dans ces remerciements de rendre à toutes ces personnes un peu de tout ce qu'elles m'ont apporté. Car si j'en suis là aujourd'hui, c'est un peu à cause de vous !

Je remercie tout d'abord le Pr **Alain PUISIEUX**, directeur du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, de m'avoir accueilli au sein de l'Unité INSERM U590, il y a de ça quelques années maintenant. Je pourrais me vanter plus tard d'avoir fait partie de cette unité, un des éléments fondateurs du CRCL. Merci de m'avoir toujours apporté votre soutien.

Je remercie également le Dr **Pierre CORDELIER** et le Dr **Alain MAUVIEL** d'avoir accepté d'examiner mon travail ainsi que les membres du jury, le Pr **Pierre DUBUS** et le Dr **Juan IOVANNA**.

Je remercie ensuite mon directeur de thèse le Dr **Laurent BARTHOLIN**. Il y a énormément à dire sur ce personnage que j'appelle « le Chef ». Je me souviens du premier entretien avec un jeune ex-punk tout en noir, lunettes rondes qui m'expliquait que la confrérie de la recherche pancréatique était en période de recrutement. Etant jeune et naïf, je me suis laissé berné par son discours bien rodé et efficace. ☺ Merci tout d'abord de m'avoir encadré au cours de mon stage de M2 dans l'équipe de Ruth et surtout de m'avoir convaincu de réaliser une thèse. Mon projet professionnel, à cette époque, avait en effet exclu cette orientation. Merci de m'avoir fait confiance en m'encadrant comme il le fallait et en me poussant à toujours aller plus loin (j'ai les yeux qui piquent ! ☺) Ta formation sera très précieuse pour la suite de ma carrière. Merci pour ta disponibilité, ton aide dans la rédaction des mes rapports, de mes présentations et de tes critiques sur la couleur de mes vêtements. Cela m'encourage à en mettre plus. Merci également de m'avoir permis de réaliser un nombre important de congrès nationaux et internationaux, qui m'a permis de tisser un réseau « TGFβ » précieux mais également de rencontrer des personnages tels que S.P, J.M. (seules les initiales sont citées de peur de représailles...) ainsi que les cactus ! De plus, ces congrès m'ont permis de nouer des contacts qui ont abouti à un post-doc aujourd'hui en poche ! D'un point de vue relationnel, nous nous sommes toujours bien entendu, notre penchant pour les blagues douteuses doit y être pour quelque chose ☺ Merci de m'avoir toujours encouragé et remis à ma place quand cela était nécessaire, ta franchise et ton honnêteté font que j'en suis là aujourd'hui. Ce paragraphe clôture cette relation Chef/Thésard mais je sais que dans l'avenir nous aurons de multiples occasions de retravailler ensemble et je m'en réjouis. Un dernier pour finir : MERCI !

Je remercie tout particulièrement la technicienne de l'équipe, **Sylvie MARTEL**, avec qui j'ai eu l'honneur de travailler pendant toute ma thèse. Notre formation commune à l'IUT nous a fait rapidement un point commun pour former les premiers membres de l'équipe BARTHOLIN. Le second point commun était sûrement la même vision du travail qui fait que tu es quelqu'un avec qui on apprécie très rapidement de travailler. Merci également de ta bonne humeur. En 4 ans de thèse, j'ai en effet beaucoup de mal à me rappeler d'un jour où tu étais de mauvaise humeur (sauf quand je te cherchais un peu trop ☺). Je garderai le souvenir des longues heures passées à l'animalerie prendre soins de nos petites bêtes à poil et d'avoir formé l'équipe du futur ex-N+6 ! Merci donc pour tout Sylvie d'un point de vue travail mais avant tout d'un point de vue relationnel qui fait que tu es l'une des personnes que je vais regretter le plus en partant. Pour finir je voudrais dissiper un malentendu sur le qualificatif de « relique ». Voici la définition officielle du Larousse qui résume bien l'idée : « Objet témoin du passé auquel on attache le plus grand prix ».

Je remercie l'ingénieur de l'équipe, **Bastien KANIEWSKI** (écrit correctement ! il n'y a pas d'erratum pour une thèse ! ☺). Si Sylvie est la Rolls-Royce des techniciennes, Bastien est sûrement l'Aston Martin des ingénieurs. C'est avec un charme « jamesbondien » qu'il gère son boulot et veille à ce que tout roule. Combinez-le à Sylvie et vous obtenez le duo technique le plus efficace de tout le CRCL. Merci de ta rigueur Bastien, à côté de toi, même le musée du Louvre paraît en bazar. Je me souviendrai en particulier de nos fameux « Bonjour » le matin désigné sous le terme « MPS » et des nombreuses soirées chez toi, en particulier la soirée crêpes. Je te souhaite bonne chance dans tes prochains projets tentaculaires ☺

Je remercie le Dr **Vanessa ARFI**, post-doc de l'équipe. Nous n'avons pas toujours été d'accord mais la Recherche c'est aussi se confronter à des caractères différents ce qui est très enrichissant. Je te souhaite bonne chance dans tes futurs projets.

Je remercie également le Dr **Johann GOUT**, post-doc de l'équipe. Merci pour tous les conseils que tu as pu me donner et de ton expérience que ce soit à la paillasse ou au cours de la préparation des articles que l'on a pu faire ensemble. C'est toujours un plaisir de travailler avec toi ; c'est exactement comme cela que j'aime travailler : de bonnes discussions scientifiques et une bonne dose de décon'. Le fait d'avoir des références communes (Monty Pythons, Ace Ventura,...) y est sûrement pour quelque chose ☺ De nombreuses parodies et imitations ont été faites et certaines seront, à mon avis, reproduites au cours de mon post-doc déclenchant l'incompréhension de mes futurs collègues. A bientôt dans le Sussex !

Je remercie **Roxane POMMIER**, doctorante communément appelé "Groseille". Officiellement intronisée 2^e thésarde de l'équipe, je suis sûr que tu vas faire des ravages au cours de ta thèse, ton travail de première année étant le parfait reflet de ta perspicacité. Même si tu manques d'assurance, ne doute jamais de tes capacités. Si jamais cela arrivait un jour, envoie-moi un mail je me ferais un plaisir de te mettre une brasse. Selon Jojo et toi, j'emploie souvent le terme « pas convaincu » et bien te concernant je suis convaincu ☺ Tu as ce grain de folie qui fait qu'en dehors de la Recherche – voire même de l'équipe- on te prend pour une

grande malade, c'est ce qui nous caractérise tous, c'est une consigne d'équipe ! Merci pour les pauses que tu m'obligeais à faire, nos discussions enflammées sur des sujets divers comme les Contrôles ou les probabilités et bien d'autres choses. Bon courage pour le reste de ta thèse (tu en auras besoin ☺) et à bientôt !

Je remercie ensuite le Dr **Ulrich VALCOURT** et **Lindsay ALCARAZ**, qui ont rejoint l'équipe il y a maintenant 1 an. Je connaissais déjà Ulrich rencontré au cours de mon monitorat en Bio Cell à l'UCBL. J'avais déjà pu apprécier la rigueur scientifique du personnage associé à un grand sens de l'humour. Merci pour tous tes conseils pour les protocoles, la rédaction des articles ou encore les demandes de bourses de post-doc. C'est toujours un plaisir de discuter avec toi. Le couple des « outside » formé avec Lindsay marche du tonnerre et il ne fait aucun doute quand à la réussite de vos projets. Lindsay, je te remercie également pour le travail que tu as fourni ces derniers mois afin de faire avancer le projet « pancréatite ». Si aujourd'hui le projet est quasi-bouclé, c'est en grande partie grâce à ton travail ainsi qu'à celui de Bastien et Sylvie. Je ne pensais pas honnêtement arriver à finir ce projet avant de partir et c'est chose faite grâce à vous.

Concernant le petit nouveau que j'ai eu plaisir d'encadrer au cours de son M1, **Nicolas CHUVIN**, je te souhaite plein de réussite dans ton projet de thèse réalisé au sein de l'équipe. Ton travail et ton humour se marie parfaitement avec la mentalité de la LB team. Adeptes de madeleine fourrée au lard et trempée dans le Nutella, ce normalien à l'esprit vif ferait douter un zèbre d'avoir des rayures noires sur un fond blanc. J'aime assez l'expression de Jojo à ton sujet : « ce gars est brillant mais il finira en prison ». Bon courage pour la suite !

Je tiens à remercier personnellement le personnel de l'Anapath : **Sophie LEON-GODDARD**, **Amélie COLOMBE** et le Dr **Isabelle TREILLEUX** pour tout l'aide que j'ai reçu au cours de mes différents projets. Le travail que vous fournissez à la recherche est juste phénoménal et, pour ma part, je peux vous dire que vous avez largement contribué à la réussite de ma thèse. Il suffit de voir le nombre de blocs et de lames réalisées, j'ai voulu en faire le compte pour ces remerciements mais j'ai vite abandonné quand j'ai vu la somme de travail qui m'attendait ☺ Merci de votre disponibilité, votre gentillesse et j'espère sincèrement retravailler avec vous dans quelques années. Merci beaucoup !

Je veux également remercier de nombreuses personnes du Centre de Recherche notamment celles qui m'ont connu en tant que bébé-thésard comme Anne-Sophie, Chloé, Vanja, Stéphanie ou encore Michael. Je remercie également toutes les personnes que j'ai pu côtoyer tout au long de ces années et qui m'ont offert leur aide ainsi que leur sourire, je pense à la Caux team notamment Dominique, Cathy, Nathalie, Christine ou encore Isabelle ; à la Ansieau team : Stéphane, Anne-Pierre, Clémence, Baptiste, Jacquemoule, Guillaume ; à la Bernard team : David x2, Mireille, Hélène, Clotilde (que j'ai la chance d'appeler CloClo après une douloureuse expérience ! ☺) et Arnaud (en postdoc dans un coin humide des States) ; et à la Xhang team : Philippe et Doriane (ptit scarabé !). J'en oublie certainement et je demande à ces personnes de ne pas m'en vouloir, je les remercie du fond du cœur.

Je pense également à mes activités extra-recherche comme l'enseignement au cours de mes 3 années de monitorat. Je tiens à remercier **Dominique BAAS**, maître de conférences, pour m'avoir permis de réaliser un monitorat en Biologie Cellulaire à l'Université Lyon 1. Cela a été une expérience formidable et je voudrais te remercier pour cela. Je pense aussi à mes collègues de monitorat : Christophe, Jérémy, Benjamin, Isabelle, Elise, Estelle ou encore Cyrille avec qui j'ai passé de très bons moments, surtout au moment des corrections de copies...

Enfin, je voudrais remercier les personnes sans qui je ne serais pas là du tout, c'est-à-dire **mes parents**. Merci de m'avoir soutenu tout au long de ces années et de m'avoir laissé choisir ma voie. Je fais aujourd'hui un métier pour lequel je suis passionné et c'est à vous que je le dois. En lisant ces remerciements vous constaterez que ma folie n'est pas du tout un état passager mais que malheureusement tout le monde en profite. C'est comme cela, je suis très partageur ☺ Et comme il faut partager, je pense aussi à mes 3 grandes sœurs et à mes bout'chou (mes nièces Léa et Mimie et mon fillot Nathan) qui quand on les voit nous font totalement oublier qu'il faut parfois travailler jusqu'à tard dans la nuit pour finir un projet.

Pour finir, j'adresse mes tendres remerciements à mon Cœur, **Emilie**. La date de notre rencontre coïncide à quelques jours près avec le début de ma thèse mais contrairement à cette dernière, ce projet sera amené à perdurer encore de nombreuses années. Pas besoin de demande de renouvellement, le projet que tu m'as accordé est reconduit automatiquement à chaque anniversaire de notre rencontre ☺ Merci de m'avoir soutenu, de m'avoir supporté dans mes moments de doute et pour simplement avoir été là pour écouter mes histoires de labo et me sortir la tête de mes manips. Merci encore mon Cœur.

Résumé

Le TGF β (*Transforming Growth Factor- β*) est une cytokine ayant de nombreuses fonctions au cours de la vie embryonnaire et de la vie adulte. Au cours de la cancérogenèse, le TGF β a un effet anti-tumoral sur les épithelia sains ou immortalisés, et acquière des propriétés facilitant la progression tumorale des épithelia transformés. Afin d'étudier cette dualité fonctionnelle du TGF β , nous avons choisi comme modèle d'étude l'adénocarcinome du pancréas, une tumeur de très mauvais pronostic, qui représente la cinquième cause de mortalité par cancer dans les pays développés. Les cancers du pancréas, dans leur grande majorité, présentent des mutations activatrices de l'oncogène Kras, sécrètent de grande quantités de TGF β et présentent des mutations inactivatrices au niveau de gènes régulateurs de la voie du TGF β . L'objectif général de mes travaux de thèse était de comprendre le rôle du TGF β au cours des différentes phases de la cancérogenèse pancréatique grâce à l'utilisation de souris génétiquement modifiées. Tout d'abord, nous avons montré que l'activation ciblée de la voie du TGF β dans le pancréas coopérait avec l'oncogène Kras afin d'induire une pancréatite, une inflammation du pancréas favorisant le développement tumoral. Nous avons également démontré le rôle suppresseur de tumeur de TIF1 γ , une protéine dont la fonction est méconnue mais qui a été proposée pour réguler la voie du TGF β . En conclusion, mes travaux ont tout d'abord contribué à une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de l'inflammation du pancréas. Ceci ouvre de nouvelles perspectives de traitement visant à inactiver le programme pro-inflammatoire du TGF β et ainsi d'inhiber l'effet pro-tumoral de la pancréatite. D'autre part, mes travaux ont permis de mettre en évidence une nouvelle voie suppresseur de tumeur dans le pancréas. La caractérisation des programmes anti-tumoraux mis en jeu par TIF1 γ devrait permettre de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Abstract

The TGF β (*Transforming Growth Factor- β*) belongs to a wide family of cytokines involved in numerous functions during embryogenesis and adult life. During tumorigenesis, TGF β is considered as a double-edge-sword preventing tumor initiation in normal or immortalized epithelia but, in contrast, facilitating tumor progression in transformed epithelia. We have studied this dual functionality of TGF β in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC), a devastating disease representing the fifth leading-cause of related-cancer death in industrialized countries. Most of pancreatic cancers present activating Kras oncogene mutations, high expression level of secreted TGF β and inactivating mutations of affecting major mediators of the TGF β signaling. The main objective of my thesis was to understand the role of TGF β during pancreatic tumorigenesis using genetically modified mouse models, then mimicking the human disease. First, we showed that targeted activation of TGF β signaling in the pancreas could cooperate with Kras oncogene to induce pancreatitis, an inflammation of the pancreas described as a tumor-promoting environment. Second, we demonstrated the tumor suppressor role of TIF1 γ , a protein recently involved in the TGF β signaling. In conclusion, this work has contributed to a better understanding of the molecular mechanisms responsible for pancreatitis initiation. Our results open new therapeutics perspectives leading to the inhibition of the TGF β -mediated program of thus inhibiting pro-oncogenic effect of pancreatitis. Moreover, we defined a new tumor suppressor pathway activated in the pancreas. The molecular characterization of programs engaged by TIF1 γ could allow defining new therapeutic strategies.

SOMMAIRE

PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE.....	14
Chapitre 1 TGFβ et Cancer.....	16
I La Voie de signalisation du TGFβ.....	16
I.1 Présentation générale.....	16
I.1.1 La superfamille du TGF β	16
I.1.1a Historique.....	16
I.1.1b Sécrétion et Activation du TGF β	17
I.1.1c Les récepteurs de la superfamille du TGF β	18
I.1.2 La Voie des protéines Smads	19
I.1.2a Structure des protéines Smads	19
I.1.2b Cascade d'Activation des protéines Smads.....	20
I.1.3 Les voies indépendantes des protéines Smads	21
I.1.3a La voie des MAPK	21
I.1.3b La voie des GTPases Rho.....	22
I.1.3c La voie PI3K/Akt.....	23
I.2 Régulation de la voie de signalisation du TGFβ.....	23
I.2.1 Endocytose des récepteurs	23
I.2.2 Phosphorylation.....	24
I.2.3 Ubiquitinylation	25
I.2.4 Rôle de la protéine TIF1 γ dans la voie du TGF β	26
I.2.4a TIF1 γ et la voie du TGF β	26
I.2.4b La famille TRIM et les protéines TIF1	27
II Dualité fonctionnelle du TGFβ au cours de la tumorigenèse	30
II.1 Voie du TGFβ et Oncogènes Ras	30
II.1.1 Oncogènes Ras.....	30
II.1.2 Altérations de la voie du TGF β et de Ras dans les cancers humains.....	31
II.1.2a Activation de la voie Ras.....	31
II.1.2b Altérations de la voie du TGF β	32
II.1.3 Interactions entre la voie de signalisation du TGF β et l'oncogène Ras	32
II.2 Programmes Anti-oncogéniques du TGFβ	33
II.2.1 Contrôle du Cycle Cellulaire	33
II.2.1a Programme Antiprolifératif du TGF β	33
II.2.1b Oncogène Ras et Prolifération cellulaire.....	33
II.2.2 Activation de l'Apoptose.....	34
II.2.2a Programme Pro-apoptotique du TGF β	35
II.2.2b Oncogène Ras et Apoptose	35
II.3 Programmes Pro-oncogéniques du TGFβ	36
II.3.1 Activation de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse	36
II.3.1a Induction de l'EMT par le TGF β	37
II.3.1b Oncogène Ras et EMT.....	37
II.3.2 Remodelage de l'environnement cellulaire.....	38
II.3.2a Plasticité de la matrice extracellulaire.....	38
II.3.2b Mise en place d'un environnement immunotolérant.....	39
II.4 Stratégies et Enjeu thérapeutique	40
II.4.1 Inhibition de la voie du TGF β	40
II.4.2 Enjeu thérapeutique	42

Chapitre 2 L'Adénocarcinome du Pancréas 44

I Le Cancer du Pancréas..... 44

I.1 Etat des lieux	44
I.1.1 Quelques chiffres	44
I.1.2 Facteurs de risque.....	44
I.1.3 Facteurs diagnostiques	46
<i>I.1.3a Les signes cliniques.....</i>	<i>47</i>
<i>I.1.3b Les examens diagnostiques</i>	<i>47</i>
I.1.4 Facteurs pronostiques.....	47
I.2 Anatomie et Histologie	48
I.2.1 Anatomie du pancréas.....	48
I.2.2 Développement du pancréas	49
I.2.3 Les différents types de tumeurs du pancréas	51
I.2.4 La Classification des néoplasies épithéliales pancréatiques	51
<i>I.2.4a Historique.....</i>	<i>51</i>
<i>I.2.4b PanIN (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia)</i>	<i>52</i>
<i>I.2.4c Les lésions kystiques du pancréas</i>	<i>53</i>
I.3 Rôle de Inflammation dans le Cancer du Pancréas	54
I.3.1 Description de la Pancréatite	54
I.3.2 Effets Pro-Oncogéniques de la Pancréatite.....	54

II Caractérisation moléculaire du PDAC 56

II.1 Les altérations génétiques associées à la progression tumorale	56
II.1.1 Activation de l'oncogène Kras	56
II.1.2 Inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs	57
<i>II.1.2a Inactivation de CDKN2A</i>	<i>58</i>
<i>II.1.2b Inactivation de p53 et BRCA2</i>	<i>58</i>
II.1.3 SMAD4 et les Altérations de la voie du TGF β	59
<i>II.1.3a Inactivation de SMAD4 et des récepteurs TβRI et TβRII</i>	<i>59</i>
<i>II.1.3b Activation de la voie du TGFβ dans le PDAC</i>	<i>59</i>
II.2 Stratégies Thérapeutiques	60
II.2.1 Thérapies Conventionnelles	60
<i>II.2.1a Chirurgie</i>	<i>60</i>
<i>II.2.1b Chimiothérapie</i>	<i>60</i>
II.2.2 Thérapies ciblées	62
<i>II.2.2a Inhibition de la voie de l'EGF.....</i>	<i>63</i>
<i>II.2.2b Inhibition de la voie du TGFβ.....</i>	<i>64</i>
II.3 Les Modèles Murins de PDAC.....	65
II.3.1 Historique.....	65
II.3.2 Les modèles de souris génétiquement modifiées.....	66

PARTIE 2 RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	69
Chapitre 1 Activation de la voie du TGFβ au cours de la tumorigenèse pancréatique	70
I – Activation <i>in vivo</i> de la voie du TGFβ.....	71
II – Coopération <i>in vivo</i> de la voie du TGFβ et de l'oncogène Kras ^{G12D}	86
III – Discussion	111
 Chapitre 2 Inactivation de Tif1γ au cours de la tumorigenèse pancréatique	 117
I - Inactivation de Tif1γ dans un modèle murin de cancer du pancréas.....	118
II –Interaction génétique entre TIF1γ et SMAD4 dans le cancer du pancréas	133
III – Discussion	147
 PARTIE 3 CONCLUSIONS ET PERPECTIVES.....	 149
I Coopération entre Kras ^{G12D} et le TGFβ.....	150
II Rôle Suppresseur de tumeur de Tif1γ	153
II.1 Caractérisation des Programmes « Suppresseur de tumeur » de TIF1γ	153
II.2 Rôle de l'Activité E3 ligase de TIF1γ dans la tumorigenèse	154
 ANNEXES	 157
 REFERENCES.....	 183

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ALK	Activin receptor-like Kinase
ActRIB	Activin Receptor type IB
ActRII	Activin Receptor type II
ActRIIB	Activin Receptor type IIB
ADM	Acinar-to-Ductal Metaplasia
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPRIA	Bone Morphogenetic Protein Receptor type IA
BMPRIB	Bone Morphogenetic Protein Receptor type IB
BMPRII	Bone Morphogenetic Protein Receptor type II
CDK	Cyclin-Dependant Kinase
CKI	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
Co-SMAD	Common SMAD
DMBA	Dimethylbenzanthracen
DUB	Deubiquitylases
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFR	EGF Receptor
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal-Transition
GDF	Growth and Differentiation Factor
GTP	Guanosine TriPhosphate
GDP	Guanosine DiPhosphate
HECT	Homologous to E6-AP Carboxy Terminus
Hfn1 β	Hepatocyte Nuclear Factor 1 β
Hras	Harvey-ras
IPMN	Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm
I-Smads	Inhibitory SMAD
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
Kras	Kirsten-ras
LAP	Latency Associated Protein
LTBP	Latent TGF β Binding Protein
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase

MCN	Mucinous Cystic Neoplasm
MH1	Mad Homology 1
MH2	Mad Homology 2
MISRII	Mullerian Inhibitory Sequence Receptor type II
Mist1	Muscle, Intestine and Stomach expression 1
MMP	Matrix Metalloproteinase
Ngn3	Neurogenin 3
Nras	Neuroblastoma-ras
OIS	Oncogene-Induced Senescence
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PDAC	Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma
Pdx1	Pancreatic duodenal homobox 1
Ptf1a/p48	Pancreas-specific transcription factor 1a subunit/p48
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PP	Polypeptide Pancréatique
Ras	Rat sarcoma
RING	Really Interesting New Gene
R-SMAD	Receptor-associated SMAD
SBE	SMAD-Binding Element
Shc	Scr homology domain-containing-transforming protein C
Shh	Sonic hedgehog
SMAD	Sma- and Mad-related protein
SXS	Serine-X-Serine
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TGF	Transforming Growth Factor
TGF α	Transforming Growth Factors alpha
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TIF1 γ	Transcriptional Intermediary Factor 1 gamma
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TRIM	TRi-partite-containing Motif
TSP1	Trombospondine-1
T β RI	TGF β Receptor type I
T β RI ^{CA}	constitutively activated TGF β Receptor type I
T β RII	TGF β Receptor type II
5-FU	5-Fluorouracile

« Le plus court chemin d'un point à un autre est la ligne droite,
à condition que les deux points soient bien l'un en face de l'autre »

Pierre DAC

PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE

Chapitre 1 TGF β et Cancer

I La Voie de signalisation du TGF β

I.1 Présentation générale

I.1.1 La superfamille du TGF β

I.1.1a Historique

La signification de l'acronyme TGF β (Transforming Growth Factor β) remonte à la fin des années 70. En 1978, des facteurs sécrétés par des cellules cancéreuses et capables de transformer les cellules saines avoisinantes, ont été mis en évidence (de Larco and Todaro, 1978) ce qui valut à ces facteurs l'appellation de Transforming Growth Factors (TGF). Historiquement, les TGF ont donc été identifiés comme des facteurs oncogéniques. Par la suite, deux types de TGF ont été décrits (Roberts et al., 1983) : le TGF α , capable de rentrer en compétition avec l'EGF pour la fixation à ses récepteurs (Marquardt et al., 1984); et le TGF β , aux capacités antiprolifératives (Holley et al., 1983).

Les membres de la famille du TGF β forment aujourd'hui une superfamille de polypeptides sécrétés, codés par plus de 30 gènes chez les Vertébrés. Cette famille regroupe des membres présentant entre eux une homologie de séquence en acides aminés pouvant atteindre 90% suggérant une origine ancestrale commune des gènes codant ces facteurs (Schmierer and Hill, 2007). Chez l'Homme, 33 membres ont été identifiés à ce jour, les principaux représentants étant les TGF β , les BMP (Bone Morphogenetic Proteins), les GDF (Growth and Differentiation Factors), les Activines et Nodal. Les membres de cette famille régulent de nombreux processus cellulaires, tels que la prolifération, l'adhérence, la migration, l'apoptose et la différenciation. Ces différents effets sont néanmoins dépendants du type et du contexte cellulaire. Par exemple, le TGF β inhibe la prolifération de la plupart des types cellulaires mais stimule celle des cellules mésenchymateuses (Yang and Moses, 2008). D'autre part, alors que Nodal inhibe la différenciation cellulaire, en particulier celle des cellules souches, les BMP stimulent ce processus (Watabe and Miyazono, 2009). Etant donné les effets cellulaires pléiotropes de ces ligands, la superfamille du TGF β est également très impliquée

dans les pathologies humaines telles que les maladies autoimmunes, les maladies cardiovasculaires et les cancers.

Chez les mammifères, trois isoformes du TGF β (TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3) ont été décrites, toutes codées par des gènes différents. Ces trois isoformes partagent les mêmes récepteurs cellulaires, présentent une homologie en acides aminés de plus de 70% entre eux. Le profil d'expression de ces différentes isoformes est néanmoins différent. En effet, alors que des souris TGF β 1-/- meurent de pathologies inflammatoires multiples quelques jours après leur naissance (Shull et al. 1992), les souris TGF β 2-/- et TGF β 3-/- atteignent l'âge adulte avec néanmoins de nombreux défauts développementaux, notamment au niveau du squelette (Sanford et al., 1997; Proetzel et al., 1995). L'isoforme TGF β 1, dénommée TGF β dans ce manuscrit, est l'isoforme la plus étudiée et dont l'expression est retrouvée dans un grand nombre de types cellulaires tels que les cellules épithéliales, endothéliales, hématopoïétiques et mésenchymateuses.

1.1.1b Sécrétion et Activation du TGF β

Les membres de la superfamille du TGF β sont sécrétés à partir d'une préproprotéine associée en dimères par des ponts disulfures. Le clivage de cette forme par des protéases de la famille des convertases permet de libérer la forme mature de la protéine. Dans le cas du TGF β , la forme mature sécrétée n'est pas biologiquement active. En effet, cet homodimère de 25 kDa est associé à la fois avec le LAP (Latency Associated Protein) et le LTBP (Latent TGF β Binding Protein) formant ainsi un complexe latent (ten Dijke and Arthur, 2007). Afin qu'il puisse interagir avec ses récepteurs, le TGF β doit être dissocié de ce complexe. La matrice extracellulaire joue un rôle prépondérant dans l'activation du TGF β . Par exemple, il a été démontré que la trombospondine-1 (TSP1) ainsi que l'intégrine α v β 6 régulaient l'activation du TGF β en induisant un changement de conformation des complexes latents (Buscemi et al., 2011). De plus, la dégradation de cette matrice, par des enzymes protéolytiques comme l'élastase ou la plasmine, va dissocier ce complexe permettant la libération de TGF β au voisinage des cellules (Annes, 2003; Chaudhry et al., 2007).

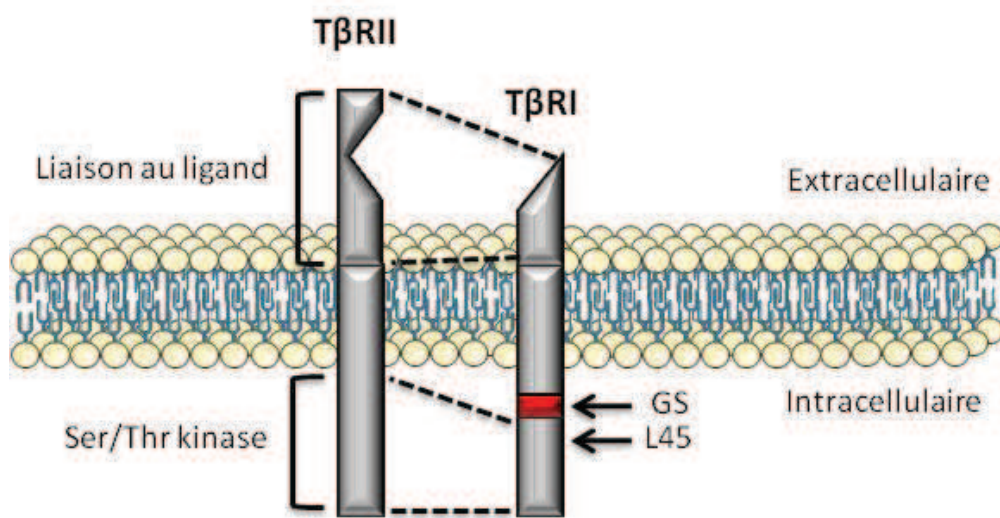


Figure 1 Structure des récepteurs du TGFβ. (Adapté d'après Lebrin et al., 2005)

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

1.1.1c Les récepteurs de la superfamille du TGF β

L'activation de la voie de signalisation des membres de la famille TGF β est dépendante de l'interaction du ligand avec un complexe de récepteurs membranaires à activité sérine/thréonine kinase. Ce complexe est composé de récepteurs de type I combinés à des récepteurs de type II. Les récepteurs de type I et II sont des glycoprotéines transmembranaires de 55 kDa et 70 kDa, respectivement. Ces récepteurs, présentant entre eux une forte homologie structurale, sont composés d'un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un seul domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité sérine/thréonine kinase (**Figure 1**).

On distingue cinq **récepteurs de type II** : T β RII, ActRII, ActRIIB, BMPRII et MISRII (le récepteur du MIS, Mullerian Inhibitory Sequence). Suite à la fixation du ligand, le récepteur de type II change de conformation et autophosphoryle son domaine kinase. Ce dernier peut alors activer un récepteur de type I. Grâce à sa forte affinité pour le TGF β , une forme soluble du récepteur T β RII a été développée afin de titrer le TGF β dans le milieu extracellulaire et d'étudier l'inhibition de la voie de transduction du TGF β dans différents modèles (Schniewind et al., 2007; Penafuerte et al., 2011).

Sept **récepteurs de type I** ou ALK (Activin receptor-Like Kinase) ont été décrits à ce jour : ALK1, ALK2, ALK3 (BMPRIA), ALK4 (ActRIB), ALK5 (T β RI), ALK6 (BMPRIIB) et ALK7. Les récepteurs de type I se différencient des récepteurs de type II par la présence d'une région intracellulaire de 30 acides aminés précédant immédiatement le domaine kinase : le domaine GS (riche en Gly/Ser/Thr, de séquence TTSGSGSG), cible du domaine kinase du récepteur T β RII. La phosphorylation du domaine GS induit un changement de conformation et une activation du domaine kinase du récepteur de type I. Ce domaine est responsable de l'activation d'effecteurs intracellulaires, les protéines SMADs (Sma- and Mad-related protein). Les SMADs activées sont dépendantes du récepteur de type I engagé. Par exemple, alors que T β RI active les SMADs 2 et 3, ALK1 active les SMADs 1, 5 et 8. La fonction des récepteurs de type I ne semble pas être restreinte à la transduction du signal à la membrane cellulaire. En effet, il a été montré par exemple que T β RI pouvait être clivé et transloqué dans le noyau afin de réguler directement l'activation de gènes cibles (Mu et al., 2011b; Chandra et al., 2012).

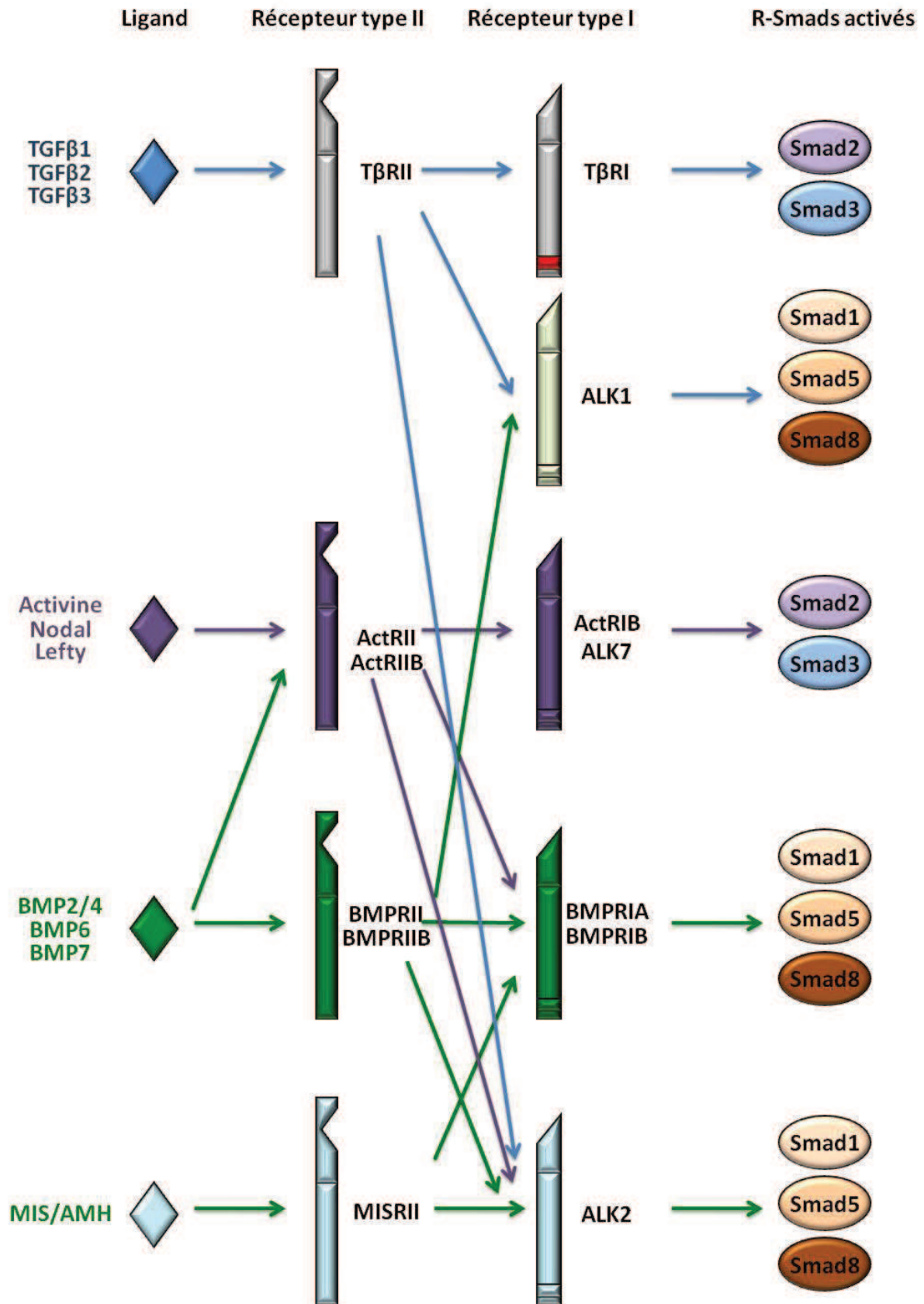


Figure 2 Variabilité des interactions entre les ligands, les récepteurs de type I et les récepteurs de type II. Les R-SMADs activés sont spécifiques de la combinaison ligand/récepteur type I/récepteur type II. (Adapté d'après Feng and Derynck, 2005)

Une troisième classe de récepteurs a été décrite : **les récepteurs de type III**. Ces récepteurs parmi lesquelles on retrouve l'Endogline et le Bêtaglycan, ont été décrits à l'origine comme des récepteurs « accessoires ». Ces récepteurs jouent un rôle important dans la présentation et la régulation de la bio-disponibilité de TGF β activé au niveau des récepteurs de type I et II (Gatza et al., 2010).

Les sept récepteurs de type I et les cinq récepteurs de type II sont à la base de la signalisation des 33 ligands décrits dans la superfamille du TGF β . Chaque ligand de cette famille interagit avec des combinaisons spécifiques de récepteurs de type I/II afin d'activer différentes protéines SMADs. D'une manière générale, alors que le TGF β , les Activines et Nodal induisent l'activation des SMADs 2 et 3, les BMP et les GDF activent les SMADs 1, 5 et 8 (**Figure 2**).

Le TGF β , via l'interaction avec le complexe T β RI/T β RII, phosphoryle les protéines Smad2 et 3 dans la grande majorité des types cellulaires. Cependant, il a été montré que le TGF β pouvait interagir avec un complexe ALK1/T β RII, et induire la phosphorylation des protéines SMADs 1, 5 et 8 dans des cellules endothéliales (Goumans et al., 2003) et dans des lignées cellulaires mammaires immortalisées (Daly et al., 2008).

I.1.2 La Voie des protéines SMADs

Le TGF β est capable d'induire des réponses cellulaires pléiotropes, grâce à sa capacité d'activer différentes voies de signalisations. La voie canonique du TGF β implique l'activation d'effecteurs cellulaires spécifiques, les protéines SMADs.

I.1.2a Structure des protéines SMADs

Les protéines SMADs sont des molécules spécialisées dans la transduction du signal en réponse aux membres de la famille du TGF β . On distingue 3 sous-groupes de protéines SMADs : les R-SMADs (Receptor-associated SMADs, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 et SMAD8), une SMAD « commune » (Co-SMAD, SMAD4 chez les vertébrés) et les SMADs inhibitrices (les I-Smads, Smad6 et Smad7). D'un point de vue structural, les R-SMADs et la Co-SMAD, SMAD4, possèdent deux domaines protéiques conservés, les domaines MH1 et MH2 (Mad Homology 1 et 2), localisés respectivement en N-terminal et en C-terminal de la séquence polypeptidique. Ces deux domaines sont reliés entre eux par une

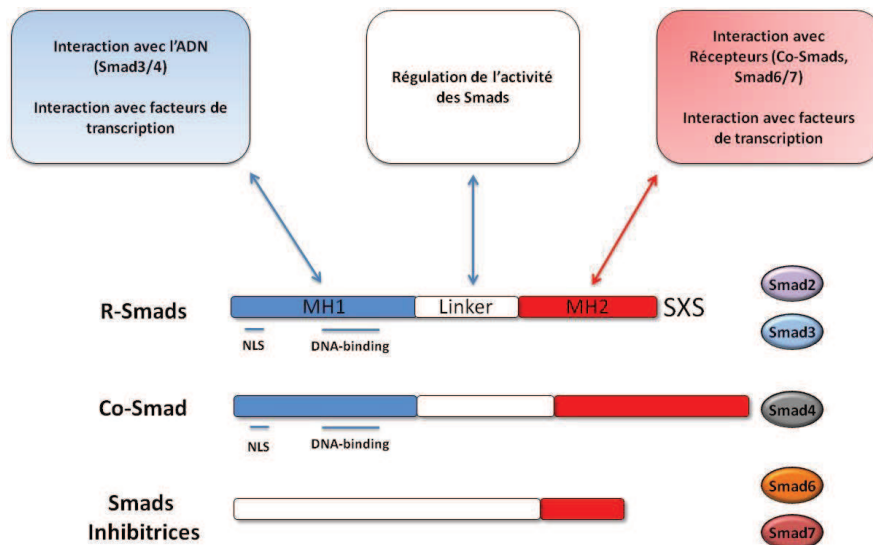


Figure 3 Structure des Protéines Smads. NLS (Nuclear Localisation Signal) : signal de localisation nucléaire ; DNA-Binding : séquence d'interaction avec l'ADN. (Adapté d'après Derynck and Zhang, 2003)

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

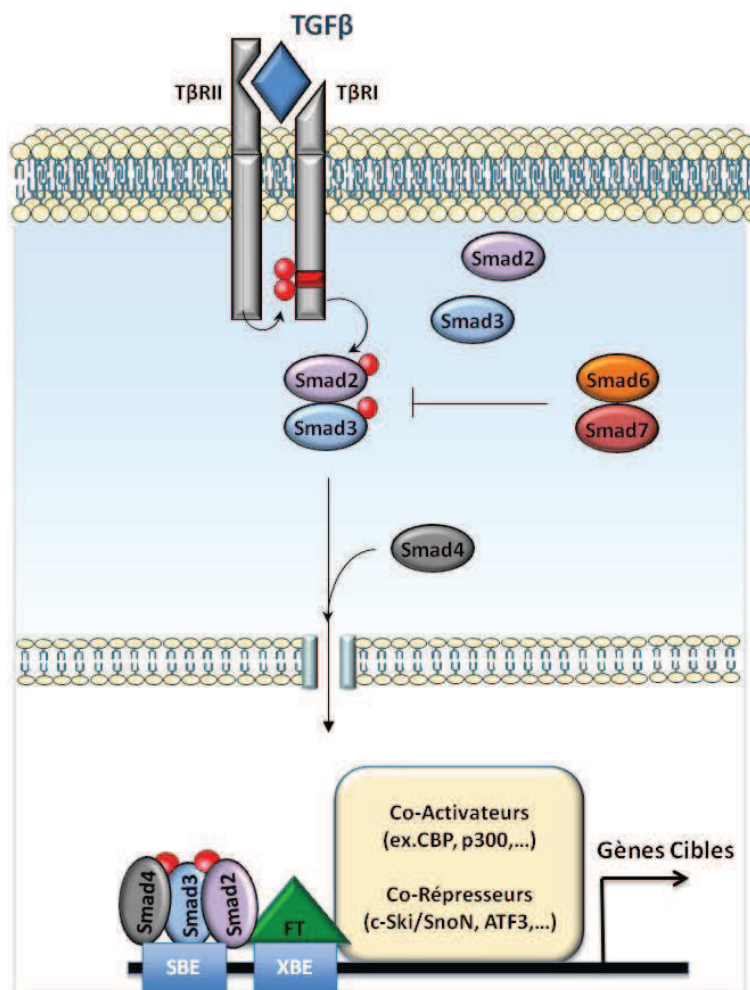


Figure 4 Voie de signalisation des Protéines SMADs. SBE (Smad-Binding Element) : séquence nucléotidique d'interaction avec les protéines Smads ; XBE (X-Binding Element) : séquence nucléotidique d'interaction avec des facteurs de transcription. (adapté d'après Ikushima and Miyazono, 2010).

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

région riche en proline, la région « linker ». Les R-SMADs possèdent également un motif C-terminal SXS (Sérine-X-Sérine), cible de la phosphorylation du domaine kinase du récepteur de type I. Les SMADs inhibitrices SMAD6 et SMAD7 possèdent également un domaine MH2 leur permettant d'interagir avec les autres SMADs mais sont dépourvues de domaine MH1 (**Figure 3**). L'expression de ces SMADs inhibitrices est rapidement induite suite à l'activation de la voie de signalisation du TGF β et permettent d'inhiber l'interaction entre les R-SMADs et les récepteurs, assurant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif.

1.1.2b Cascade d'Activation des protéines SMADs

Comme évoqué précédemment, les R-SMADs activées sont spécifiques des récepteurs de type I engagés en amont : alors que SMAD2 et 3 sont les cibles des récepteurs T β RI et ActRIB, les SMAD1, SMAD5 et SMAD8 sont les substrats des récepteurs du BMPRIA, BMPRIB, ALK-1 et ALK-2. Cette spécificité semble être dépendante de la séquence d'un domaine appelé L45 situé dans le domaine kinase des récepteurs de type I : un remplacement de la séquence L45 de T β RI par celle de BMPRIB induit l'activation spécifique de la voie des BMP, l'expérience inverse conduisant à l'activation de la voie du TGF β (Chen et al., 1998).

La séquence d'activation de la voie canonique du TGF β est la suivante : suite à l'activation du domaine GS de T β RI par T β RII, le domaine MH2 des R-SMADs (SMAD2 et SMAD3), interagit avec le domaine L45 de T β RI induisant la phosphorylation du domaine SXS. Les protéines SMAD2 et SMAD3 changent alors de conformation, se dissocient de T β RI et interagissent avec SMAD4 *via* leur domaine MH2 (Feng and Derynck, 2005).

Le complexe trimérique SMAD2/SMAD3/SMAD4 (SMAD2/3/4) ainsi formé, s'accumule dans le noyau. De nombreux partenaires protéiques peuvent alors interagir avec ce complexe le recrutant au niveau d'éléments régulateurs des gènes cibles. Le domaine MH1 des protéines SMADs 3 et 4 permet d'interagir directement avec l'ADN au niveau de séquence consensus CAGAC, appelé SBE (SMAD-Binding Element). Ce même domaine MH1 en association avec MH2 est également impliqué dans l'interaction des SMADs avec des co-facteurs de transcription. Enfin, la partie C-terminale des SMADs permet le recrutement de co-activateurs (CBP, p300,...) ou de co-répresseurs de transcription (Ski, SnoN, C-Myc, TGIF,..). Plus de 50 facteurs de transcription ont été décrits comme pouvant interagir avec le complexe SMAD2/3/4 régulant ainsi l'expression de plus de 300 gènes cibles (Ross and Hill, 2008; Ikushima and Miyazono, 2010a) (**Figure 4**).

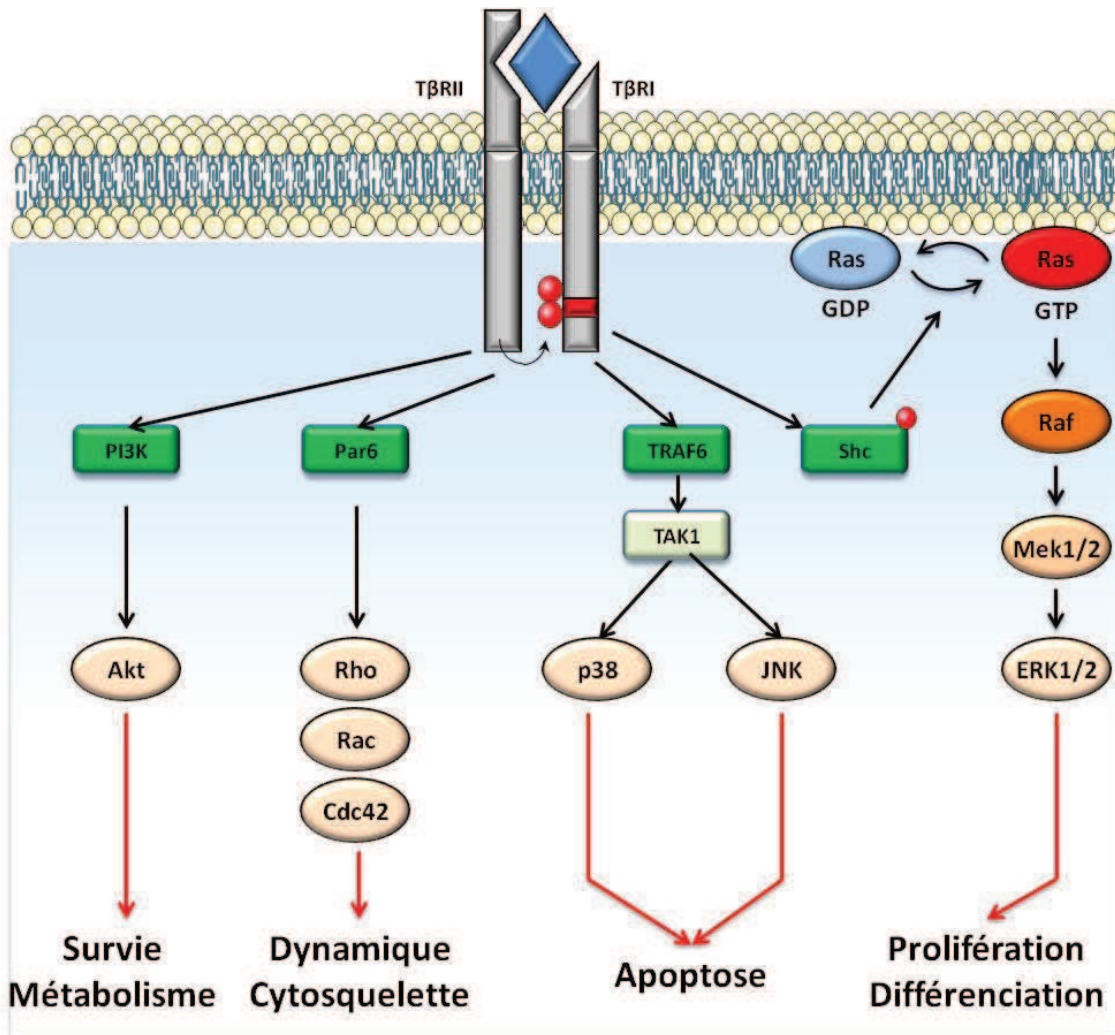


Figure 5 Voies de signalisation du TGFβ indépendantes des protéines Smads. Le TGFβ peut activer différentes voies de signalisation par l'intermédiaire de protéines adaptatrices (■).

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

I.1.3 Les voies indépendantes des protéines SMADs

La diversité des effets cellulaires du TGF β peut également s'expliquer par le fait que le TGF β peut activer des voies indépendantes des protéines Smads telles que les voies des MAPK, des GTPases Rho et PI3K/Akt (Zhang, 2009; Gui et al., 2012). Ces voies permettent de contrôler de très nombreux programmes cellulaires comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la transition épithélio-mésenchymateuse. Le paragraphe suivant a pour but de décrire ces différentes voies et d'exposer les mécanismes moléculaires permettant au TGF β d'activer ces voies. Ces mécanismes sont encore mal connus mais semblent néanmoins faire intervenir deux modes d'interactions: un mode direct, impliquant une interaction physique entre les récepteurs du TGF β et les effecteurs de la voie de signalisation concernée, et un mode indirect *via* des protéines adaptatrices (**Figure 5**).

I.1.3a La voie des MAPK

Le fait que le TGF β puisse activer la voie MAPK est connu depuis de nombreuses années. En effet, l'induction rapide de l'expression de la protéine Ras par le TGF β a été observée dès 1992 dans l'intestin de rat (Mulder and Morris, 1992). Les protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase) peuvent être classées en quatre groupes : les kinases extracellulaires ERK1/ERK2 (Extracellular signal-Regulated Kinase), les kinases de « stress » JNK1/JNK2/JNK3 (c-Jun N-terminal Kinase), les p38 MAPK (α , β , γ et δ) et ERK5 (alias BMK1, Big MAPK1). **Les voies de signalisation induites par ces MAPK sont généralement impliquées dans la prolifération et la différenciation** (Chapnick et al., 2011). La voie de signalisation de chacune des MAPK consiste à la phosphorylation séquentielle de différentes kinases aboutissant à la phosphorylation dans le noyau, de facteurs de transcription et de kinases spécifiques.

Il a été montré que le TGF β pouvait activer les voies ERK, p38MAPK et JNK dans de nombreuses lignées cellulaires *via* des voies dépendantes ou indépendantes des protéines SMADs (Zhang, 2009; Mao et al., 2011). La kinase ERK5 peut également être activée par le TGF β mais sa fonction reste méconnue (Browne et al., 2008). Les récepteurs du TGF β jouent un rôle prépondérant dans l'activation de la voie ERK. En effet, il a été montré que le récepteur T β RII, décrit précédemment, pouvait être phosphorylé par la kinase Src, permettant au récepteur de recruter des adaptateurs de la voie Ras, Shc (Scr homology domain-

containing-transforming protein C) et Grb2 (Growth factor receptor binding protein 2) et d'activer la voie ERK/MAPK (Gallagher and Schiemann, 2007). Le récepteur T β RI, après transphosphorylation par T β RII, peut également activer ERK1/2 *via* la phosphorylation de ShcA (Lee et al., 2007b).

D'autre part, il a été démontré que la kinase TAK1 était indispensable à l'activation des voies p38 et JNK par le TGF β (Yamaguchi et al., 1995; Shim et al., 2005). Le récepteur T β RI permet *via* l'E3 ligase TRAF6, le recrutement et l'activation de TAK1 (Sorrentino et al., 2008). La voie de signalisation TRAF6/TAK1/p38MAPK permet de réguler de nombreuses réponses cellulaires au TGF β . Par exemple, il a été montré que l'inactivation de cette voie inhibait la capacité du TGF β à induire l'apoptose (Edlund et al., 2003; Sorrentino et al., 2008) ou la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Yamashita et al., 2008).

1.1.3b La voie des GTPases Rho

Les GTPases de la famille Rho, qui constituent un sous-groupe de la superfamille Ras, sont impliquées dans **la dynamique du cytosquelette d'actine, le transport vésiculaire et le contrôle du cycle cellulaire.**

Les trois membres les plus étudiés de cette famille sont Rho1, Rac et Cdc42 tous pouvant être activés directement par le TGF β (Zhang, 2009). En 2005, Par6, une protéine régulatrice de la polarité cellulaire et des jonctions cellule/cellule, a été identifiée comme un nouveau substrat du domaine kinase de T β RII (Ozdamar et al., 2005). L'axe T β RII/Par6/Rho joue un rôle prépondérant dans la dissociation des jonctions cellule/cellule participant ainsi activement à la mise en place de la transition épithélio-mésenchymateuse. En effet, la protéine Par6, en coopération avec Smurf1, induit la dissociation d'un complexe essentiel au maintien des jonctions serrées, le complexe Cdc42/Rac1 (Viloria-Petit et al., 2009). Enfin, de part leur appartenance à la superfamille Ras, une forte interaction des GTPases Rho avec les membres des autres voies SMADs-indépendantes est observable. Ainsi, Rac et Cdc42 peuvent activer les voies JNK et p38MAPK en interagissant directement avec leur kinase spécifique (Mu et al., 2011a).

I.1.3c La voie PI3K/Akt

La voie PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) constitue une grande famille de sérine/thréonine kinases jouant un rôle essentiel dans **la prolifération, le métabolisme et la survie cellulaire**. La protéine Akt est le principal médiateur des effets de la PI3K en régulant de nombreuses cibles telles que GSK3 β , LKB1, NF-KB et mTOR.

Le TGF β peut activer la voie de la PI3K comme le démontre la phosphorylation d'Akt dans de nombreux types cellulaires traités au TGF β (Wilkes et al., 2005; Lamouille and Derynck, 2007). La relation entre ces deux voies semble être directe et dépendante de l'association entre le récepteur T β RII et la sous-unité régulatrice de PI3K, p85. Cette dernière semble pouvoir également interagir avec T β RI sous condition que la voie du TGF β soit activée (Yi et al., 2005). La voie PI3K/Akt est une autre voie SMAD-indépendante impliquée dans l'EMT induite par le TGF β . La voie PI3K permet à la fois la réorganisation du cytosquelette d'actine et la stimulation de la migration *via* les effecteurs cellulaires Akt et mTOR (Lamouille and Derynck, 2007).

I.2 Régulation de la voie de signalisation du TGF β

Le TGF β régule de très nombreux processus cellulaires en activant différentes voies de signalisation. En conséquence, l'activité de ces voies doit être régulée afin de maintenir des réponses cellulaires au TGF β adaptées au contexte cellulaire. Les paragraphes suivants décriront les deux principaux niveaux de régulation : les récepteurs du TGF β et les protéines SMADs. Ces régulations dépendent de nombreux partenaires des récepteurs et des protéines SMADs (Moustakas and Heldin, 2009). Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'un d'entre eux, la protéine TIF1 γ , faisant l'objet d'une partie de mes travaux de thèse.

I.2.1 Endocytose des récepteurs

Un des mécanismes principaux de régulation des récepteurs est l'endocytose (Moustakas and Heldin, 2009). L'internalisation des récepteurs par endocytose permet d'augmenter la proximité entre les récepteurs activés et leurs effecteurs cytoplasmiques. En effet, l'internalisation du complexe activé T β RI/T β RII dans des vésicules recouvertes de

clathrines permet le recrutement de SARA (SMAD anchor for receptor activation) qui facilite le recrutement de SMAD2 et SMAD3 au niveau du récepteur T β RI (Di Guglielmo et al., 2003; Runyan et al., 2009). En réduisant le nombre de récepteurs disponibles à la surface de la cellule, l'endocytose peut également avoir un effet inhibiteur sur les voies de signalisation. L'internalisation du complexe activé T β RI/T β RII par la voie des cavéoles permet d'inhiber la voie de signalisation du TGF β . La cavéoline-1, composant des cavéoles, peut interagir avec le récepteur T β RI, induisant sa dégradation *via* le complexe SMAD7-Smurf2 (Di Guglielmo et al., 2003). Ces mécanismes d'internalisation sont régulés par de nombreuses protéines. Par exemple, alors que Dab2 facilite le recyclage des récepteurs à la membrane (Penheiter et al., 2010), Dpr2 permet l'adressage des récepteurs internalisés vers le protéasome pour assurer leur dégradation (Su et al., 2007).

I.2.2 Phosphorylation

Les récepteurs du TGF β sont des récepteurs à activité sérine/tyrosine permettant la phosphorylation des protéines SMADs. L'activité et la stabilité des récepteurs du TGF β ainsi que les protéines SMADs sont régulées par de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'ubiquitinylation, la sumoylation, l'acétylation et la poly(ADP)-ribosylation (Moustakas and Heldin, 2009).

De nombreuses phosphatases permettent de réguler l'activité des récepteurs du TGF β : il a été démontré que PP1c (sous-unité catalytique de la Protein Phosphatase 1) pouvait être recrutée au niveau de T β RI par la protéine inhibitrice SMAD7, pour induire la déphosphorylation de ce récepteur (Shi et al., 2004). D'autre part, la phosphatase PP2A pourrait soit inhiber, soit stabiliser l'activation des récepteurs : alors que la sous-unité B α stabilise les récepteurs du TGF β en inhibant leur dégradation, la sous-unité B δ inhibe l'activité kinase de T β RI par un mécanisme encore inconnu (Batut et al., 2008). Des phosphatases spécifiques de T β RII n'ont pas encore été identifiées à ce jour.

La phosphorylation de la séquence SXS des protéines SMAD2 et SMAD3 par le récepteur T β RI est un évènement central dans l'activation de la voie du TGF β (voir I.1.2b). Des phosphatases permettent de réguler l'état d'activation des SMADs. Par exemple, il a été montré que la dissociation du complexe SMAD2/3/4 ainsi que l'export nucléaire des SMADs nécessitent l'action de phosphatases (Inman et al., 2002a; Lin et al., 2007). La phosphatase

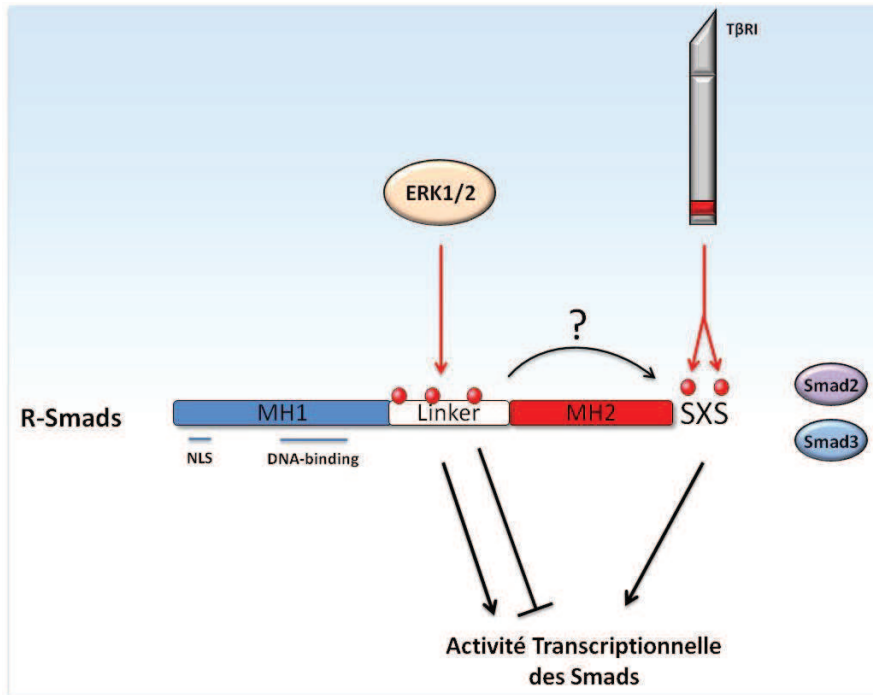


Figure 6 Régulation de la Phosphorylation des Protéines Smads 2 et 3. Alors que la séquence SXS des protéines Smad2 et Smad3 est spécifiquement phosphorylée par le domaine kinase de TβRI, les kinases ERK peuvent phosphoryler la région «linker». L'influence de la phosphorylation de cette dernière région sur l'activité transcriptionnelle des R-SMADs est encore controversée. Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

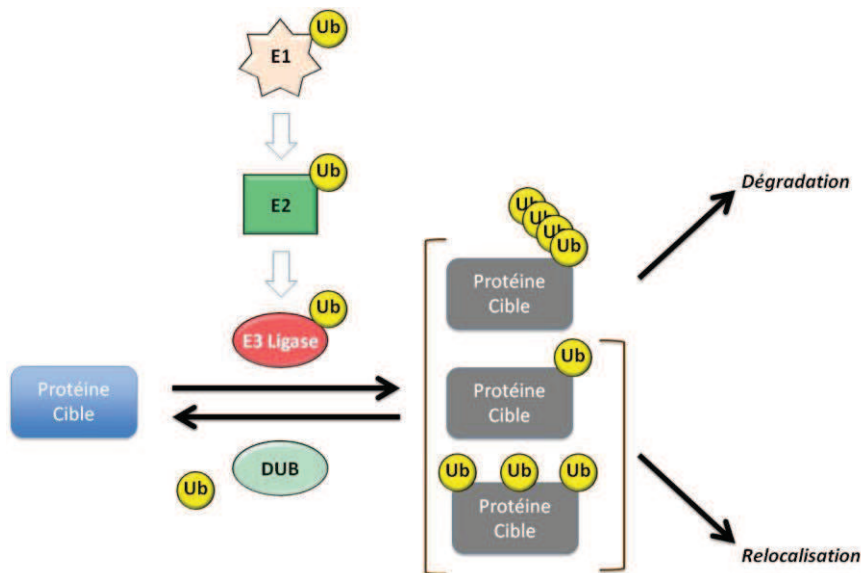


Figure 7 Dégradation ou Relocalisation de protéines cibles par Ubiquitinylation. L'ubiquitinylation de protéines cibles (Ub), repose sur l'action d'ubiquitine ligases (E1, E2 puis E3). Alors que la poly-ubiquitinylation est généralement associée à l'adressage au protéasome et à la dégradation de la protéine cible, la mono-ubiquitinylation et la multi-ubiquitinylation induisent une relocalisation cellulaire. Illustration réalisée grâce à Servier

nucléaire PPM1A joue un rôle primordial à la fois dans la déphosphorylation de SMAD2/3 (Lin et al., 2006) mais également dans l'interaction de ces SMADs avec le facteur d'export nucléaire RanBP3 (Dai et al., 2009). Des phosphorylations peuvent également affecter des acides aminés situés au niveau de la région « linker », située entre les domaines MH1 et MH2, des protéines SMADs. De manière intéressante, ces phosphorylations interviennent par le biais de kinases normalement activées par la voie des MAPK. Il a été montré que la phosphorylation du domaine « linker » de SMAD2 ou SMAD3 par des protéines de la famille ERK pouvait inhiber (Kretzschmar et al., 1999) ou activer (Hayashida and Schnaper, 2003; Li et al., 2009) leur activité transcriptionnelle (**Figure 6**). L'influence de la phosphorylation du domaine « linker » sur la phosphorylation du domaine SXS des protéines SMADs reste cependant méconnue. Nous avons décrit précédemment que le TGF β pouvait activer les kinases ERK. Ainsi le TGF β pourrait, en fonction de la balance des voies activées (SMADs-dépendantes *versus* SMADs-indépendantes) réguler positivement ou négativement l'activité transcriptionnelle des SMADs.

I.2.3 Ubiquitylation

L'ubiquitylation est un mécanisme de modification post-traductionnelle rencontrée chez cellules eucaryotes régulant l'expression, l'activité ou encore la localisation intracellulaire des protéines (Schaefer et al. 2012). Cette modification repose sur la liaison spécifique de molécule d'ubiquitine au niveau des protéines cibles par des enzymes spécialisées, les ubiquitines ligases, intervenant de manière séquentielle (Hatakeyama, 2011) (**Figure 7**). Les **E3 ligases**, responsables de la reconnaissance spécifique du substrat, jouent un rôle essentiel dans ce processus.

On distingue deux grandes classes d'E3 ubiquitine ligases, celles contenant un domaine HECT (Homologous to E6-AP Carboxy Terminus) et celles contenant un domaine RING (Really Interesting New Gene). Cette dernière classe représente la très grande majorité des E3 ubiquitine ligases. La différence entre ces deux classes réside essentiellement dans leur séquence d'interaction avec les protéines E2 et le substrat (Budhidarmo et al., 2012). On distingue trois types d'ubiquitylation : la poly-ubiquitylation, la mono-ubiquitylation et la multi-ubiquitylation. Le processus de poly-ubiquitylation est classiquement associé à l'adressage au protéasome et à la dégradation des protéines cibles. Cette voie de dégradation

est dépendante de la formation d'une chaîne d'ubiquitine où chaque protéine d'ubiquitine est liée à la suivante, le plus souvent, via la lysine 48. D'autres fonctions de la voie de l'ubiquitine ont été proposées. Par exemple, la mono-ubiquitinylation et la multi-ubiquitinylation, ne sont pas associées à la dégradation des protéines cibles mais à la régulation de leur localisation cellulaire (Haglund and Dikic, 2005). Enfin, l'ubiquitinylation est un système réversible *via* l'action d'enzymes spécialisées dans la dégradation des résidus d'ubiquitine au niveau des protéines cibles, les déubiquitinyases (DUB) (**Figure 7**).

Les mécanismes d'ubiquitinylation jouent un rôle particulièrement important dans la voie du TGF β . En effet, de nombreuses E3 ligases ont été impliquées dans la régulation de l'activité des récepteurs et/ou des protéines SMADs comme SMURF1, SMURF2, NEDD4-2 et WWP1 (Inoue and Imamura, 2008; Dupont et al., 2012; De Boeck and Ten Dijke, 2012). De manière intéressante, ces E3 ligases peuvent soit inhiber, soit activer la voie du TGF β . Il a par exemple été montré que SMURF2, NEDD4-2 et WWP1 induisaient la dégradation des protéines SMADs inhibant ainsi la voie du TGF β (Lin et al., 2000; Kuratomi et al., 2005). Inversement, l'interaction entre SMAD2 et l'E3 ligase ARKADIA ou SMURF2 induirait la dégradation de SMAD7 (Koinuma et al., 2003), ainsi que celle de SnoN (Levy et al., 2007) et de c-Ski (Nagano et al., 2007), deux co-répresseurs de la voie du TGF β , maintenant ainsi la voie du TGF β active. Enfin, de nombreuses DUB régulant la voie du TGF β ont été identifiées récemment telles que FAM/USP9X (Dupont et al., 2009), USP15 (Eichhorn et al., 2012) ou encore USP4 (Zhang et al., 2012).

1.2.4 Rôle de la protéine TIF1 γ dans la voie du TGF β

Nous allons maintenant nous intéresser au rôle d'une E3 Ligase impliquée récemment dans la voie du TGF β , la protéine TRIM33 (TRi-partite-containing Motif 33) ou TIF1 γ (Transcriptional Intermediary Factor 1 γ).

1.2.4a TIF1 γ et la voie du TGF β

Depuis 2005, le rôle de TIF1 γ dans la voie du TGF β est très controversé, TIF1 γ pouvant agir comme un régulateur négatif (Dupont et al., 2005) ou positif (He et al., 2006) de la voie du TGF β . A la vue de la littérature, il semble que ces rôles opposés de TIF1 γ soient

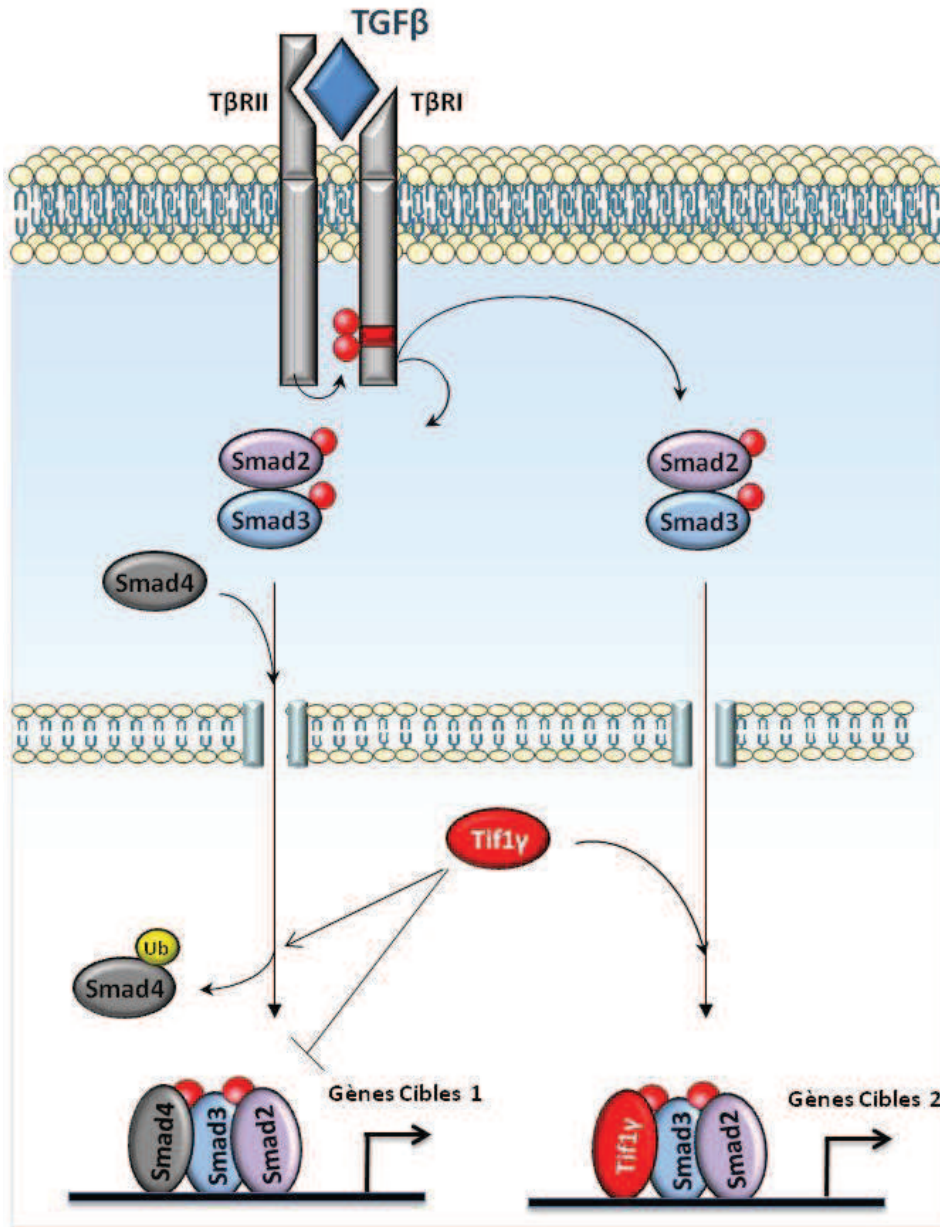


Figure 8 Mode d'action de la protéine Tif1γ dans la voie du TGFβ.

Le groupe de Stéfano Picollo a proposé que TIF1γ inhibait la voie du TGFβ en induisant l'ubiquitinylation de SMAD4 (Dupont et al., 2005). Le groupe de Joan Massagué, lui, a proposé que TIF1γ interagissait avec les SMAD2 et 3 pour activer des gènes cibles du TGFβ indépendamment de SMAD4 (He et al., 2006).

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

associés à deux fonctions biologiques totalement différentes. Un point commun peut être néanmoins dégagé des ces premières études contradictoires: TIF1 γ est capable d'interagir *via* sa région « Middle » avec le domaine MH2 des protéines SMAD2 ou SMAD4 (Dupont et al., 2005; He et al., 2006). A partir de cette observation commune, le groupe de Stéfano Piccolo a décidé d'étudier l'interaction entre TIF1 γ et SMAD4 alors que le groupe de Joan Massague s'est intéressé à l'interaction entre TIF1 γ et SMAD2. TIF1 γ est apparu tout d'abord comme une E3 ubiquitine ligase capable de polyubiquitinyler SMAD4, d'induire sa dégradation et de réprimer les réponses cellulaires au TGF β dépendantes de SMAD4 (Dupont et al., 2005). Ainsi, TIF1 γ , *via* son activité ubiquitine ligase, apparaissait comme un inhibiteur de la voie du TGF β . Le groupe de Joan Massague s'est intéressé à l'interaction entre TIF1 γ et SMAD2 (He et al., 2006). De façon intéressante, TIF1 γ est capable d'interagir spécifiquement avec les formes actives des protéines SMAD2 et de SMAD3. Cette même étude, qui a contesté l'ubiquitinylation de SMAD4 observée par le groupe de Stéfano Piccolo, a néanmoins déterminé que TIF1 γ pouvait entrer en compétition avec SMAD4 pour interagir avec les protéines SMAD2 et 3. Cette compétition aurait pour conséquence, non pas d'inhiber la voie du TGF β , mais de réguler des effets biologiques différents de la voie du TGF β . En effet, il a été montré que le complexe TIF1 γ /SMAD2/SMAD3 stimulait la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques alors que le complexe SMAD2/SMAD3/SMAD4 inhibait la prolifération de ces mêmes progéniteurs (He et al., 2006). Ainsi, TIF1 γ et SMAD4 pourrait agir de concert afin d'activer différents programmes de la voie du TGF β , en particulier au cours des processus de différenciation cellulaire.

En conclusion, la protéine TIF1 γ semble avoir deux activités biochimiques distinctes. La première activité est celle d'une E3 ligase, capable d'inhiber les programmes biologiques dépendants de SMAD4. La deuxième activité est de nature transcriptionnelle, où TIF1 γ pourrait interagir directement avec SMAD2 et SMAD3 afin de réguler des programmes biologiques distincts de ceux normalement activés par le complexe SMAD2/3/4 (**Figure 8**).

1.2.4b La famille TRIM et les protéines TIF1

La protéine TIF1 γ appartient à une grande famille de protéines, les protéines TRIM (TRIPartite-containing Motif). Cette famille qui compte plus de 70 membres est caractérisée par la présence en C-terminal d'un domaine **RBCC** composé d'un motif **RING** (Really

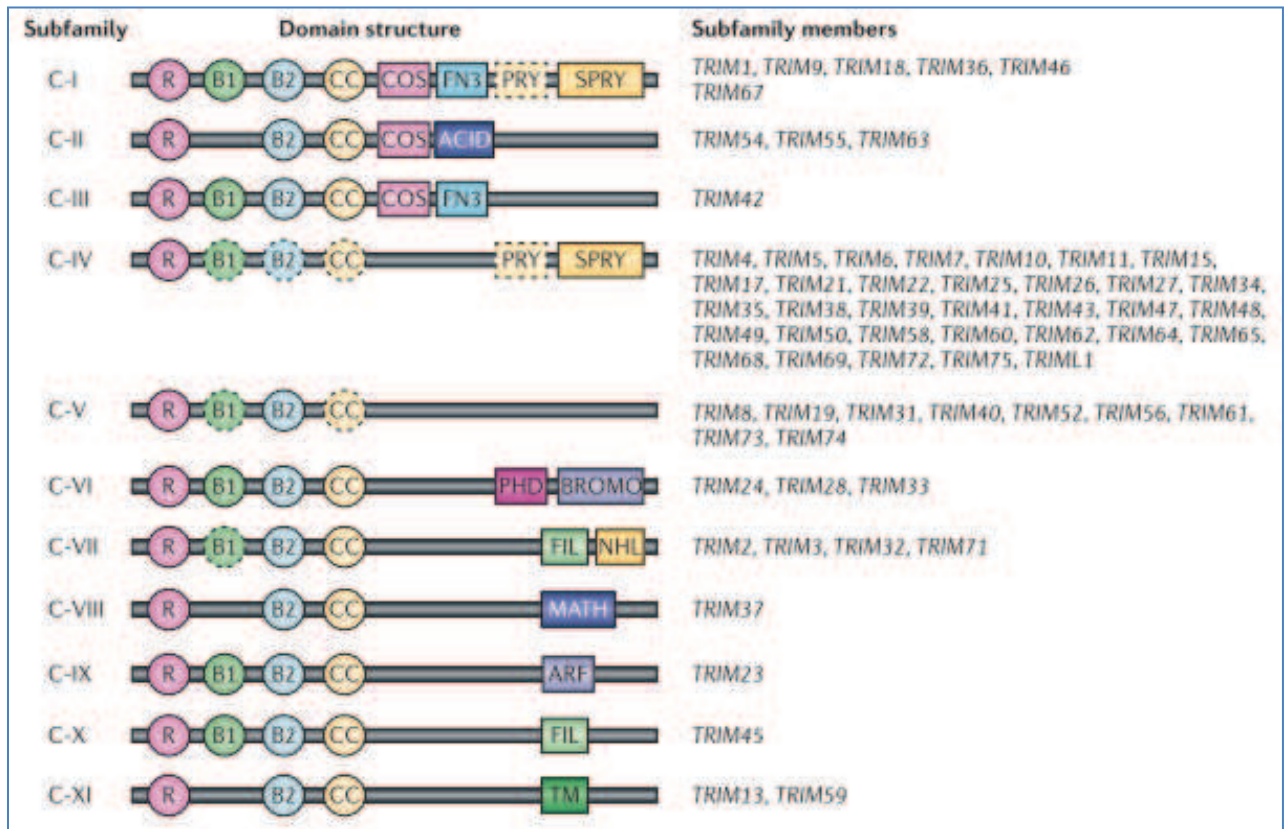


Figure 9 Structure des Protéines TRIM. La classification structurale des protéines TRIM (TRIPartite Motif) chez l'homme est indiquée (C-I à C-XI). La grande majorité des protéines TRIM contiennent un domaine RING (Really Interesting New Gene) (R), un ou deux domaines B-Box (B1, B2), un domaine Coiled-Coil (CC). Les autres domaines présents en partie C-terminale sont spécifiques de chaque sous-famille. ACID, acid-rich region; ARF, Adp-Ribosylation Factor family domain; BROMO, bromodomain; COS, Cos-box; FIL, Domaine "Filamin-type I G"; FN3, Répétition "Fibronectine de type III"; MATH, Domaine "Meprine and TRAF-Homology"; NHL, domaine "Ncl1, Ht2A and Lin41"; PHD, Plant HomeoDomain; PRY, domaine PRY; SPRY, domaine SPRY; TM, région transmembranaire. (d'après Hatakeyama, 2011)

Interesting New Gene), un ou plusieurs motifs en doigts de zinc appelés **B-Box** et un motif **Coil-Coiled**. La partie N-terminale des protéines est beaucoup plus variable et doit être considérée en fonction de la sous-famille étudiée (**Figure 9**).

La présence d'un domaine RING dans la séquence protéique des membres de la famille TRIM permet de définir ces protéines comme des **E3 ligases potentielles**. En effet, de nombreux membres de cette famille ont démontré une activité d'E3 Ligase, interagissant avec des E2 ligases et des substrats spécifiques. La famille des protéines TRIM est impliquée dans de très nombreux processus cellulaires comme la transcription, la traduction ou encore la régulation du cycle cellulaire (Hatakeyama, 2011). Ceci explique que l'altération de la fonction de nombreux membres de cette famille est associée à des défauts de développement embryonnaire, au développement tumoral ou encore aux infections virales. Parmi les membres les plus étudiés, il est possible de distinguer TRIM5, une protéine capable de reconnaître les composants de la capside du VIH et d'activer un programme cellulaire antiviral (Grütter and Luban, 2012). Un autre membre remarquable est la protéine TRIM19 appelée également PML (Promyelocytic Leukemia Protein), un élément essentiel à la formation et à la fonction de structures nucléaires particulières appelées les corps PML (Ascoli and Maul, 1991). Ces structures sont impliquées dans la transcription, la réparation de l'ADN et la réplication virale (Lallemand-Breitenbach and de Thé, 2010).

TIF1 γ /TRIM33 appartient à une sous-famille des protéines TRIM, les protéines TIF1 (Transcriptional Intermediary Factors). Ce groupe de facteurs de transcription est composé de quatre membres (TIF1 α /TRIM24, TIF1 β /TRIM28, TIF1 δ /TRIM66 et TIF1 γ /TRIM33) partageant entre eux une séquence TSS (TIF1 Signature Sequence) commune à toutes les protéines TIF1 et indispensable à leur activité de répresseur transcriptionnel (Venturini et al., 1999). De plus, ces protéines partagent un domaine putatif d'interaction avec la chromatine composé d'un domaine PHD associé à un bromodomaine (**Figure 10**).

TIF1 α , qui fut le premier membre TIF1 à être identifié, est capable d'interagir avec de nombreux récepteurs nucléaires comme les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR), à la vitamine D3, aux oestrogènes et à la progestérone (Le Douarin et al., 1995). Ce facteur joue un rôle important dans les processus de cancérogenèse. En effet, il a été démontré que TIF1 α était un suppresseur de tumeur dans le foie en inhibant la fonction des récepteurs RAR (Khetchoumian et al., 2007). Cependant, d'autres études suggèrent que TIF1 α faciliterait la

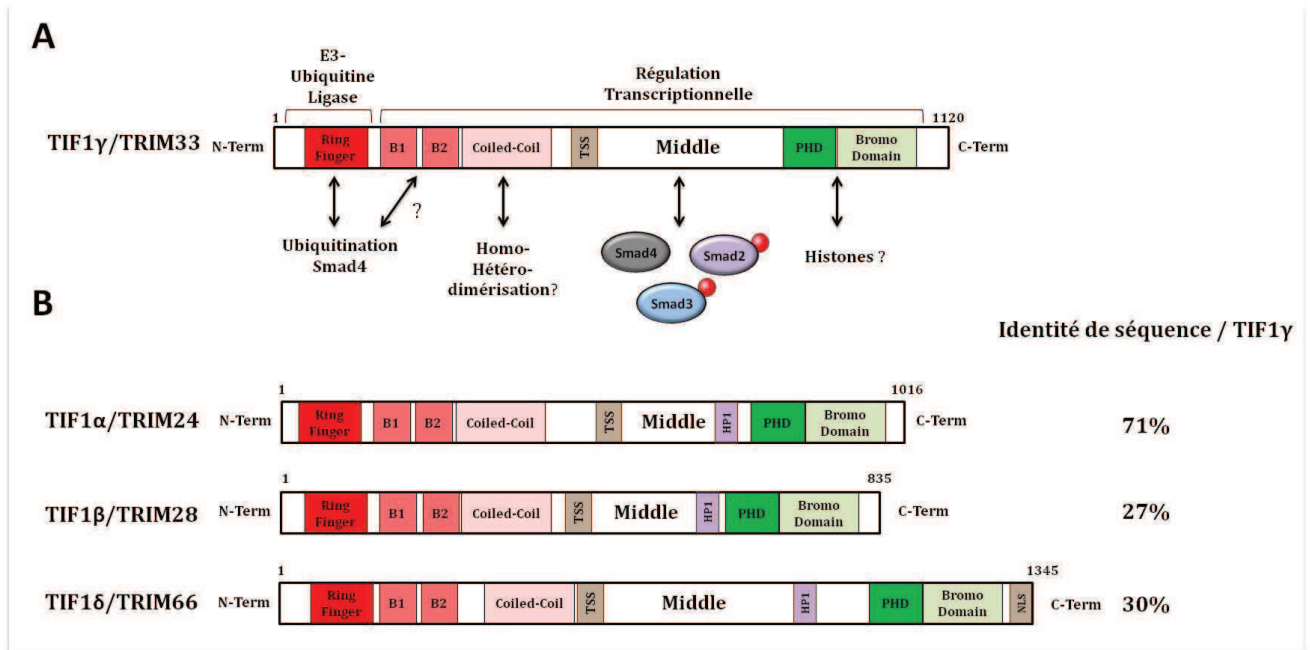


Figure 10 Structure des Protéines TIF1. Les protéines TIF1 (TIF1 γ , TIF1 α , TIF1 β et TIF1 δ) sont composées d'un domaine RBCC (RING, B-Box, Coiled-Coil), d'un domaine TSS (TIF1 signature sequence), d'un domaine PHD (Plant Homeodomain) et d'un Bromodomaine. **A-** Rôle des différents domaines de la protéine TIF1 γ . **B-** Structure des autres protéines TIF1 et similitude de séquence avec TIF1 γ . (adapté d'après Iyengar and Farnham, 2011).

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

tumorigenèse en facilitant la dégradation de p53 *via* son activité ubiquitine ligase (Allton et al., 2009) ou encore *via* son interaction avec la chromatine, facilitant la réponse aux oestrogènes dans le cancer du sein (Tsai et al., 2010).

Les facteurs **TIF1 β** et **TIF1 δ** ont également été décrits pour interagir avec la chromatine *via* leur domaine d'interaction avec HP1 (Heterochromatin Protein 1) (Le Douarin et al., 1996; Khetchoumian et al., 2004). Ce domaine HP1 ainsi que le motif RBCC, permettent à TIF1 β d'interagir avec le domaine de répression transcriptionnel KRAB afin de réguler la transcription et la réparation de l'ADN (Hu et al., 2012). D'un point de vue pathologique, l'expression de TIF1 β a été associée à un mauvais pronostic dans les cancers gastrointestinaux (Yokoe et al., 2010).

Enfin le dernier membre de la famille TIF1 est la protéine **TIF1 γ** . Ce facteur de transcription de 155 kDa est exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme (Venturini et al., 1999; He et al., 2006). TIF1 γ joue tout d'abord un rôle essentiel au cours de l'embryogenèse. Ce rôle a été tout d'abord démontré chez le xénope (Dupont et al., 2005) puis a été confirmé chez la souris (Morsut et al., 2010). Deux modèles distincts de souris génétiquement modifiées ont observé une léthalité embryonnaire des souris présentant une inactivation du gène codant pour TIF1 γ (Kim and Kaartinen, 2008) (Morsut et al., 2010). Chez l'adulte, TIF1 γ participe à la lutte contre les infections virales (Forrester et al., 2011; Vink et al., 2012) et apparait comme un facteur essentiel dans la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques (He et al., 2006; Kusy et al., 2011; Ransom et al., 2004; Bai et al., 2010). Comme de nombreux membres de la famille TRIM et TIF1, le facteur TIF1 γ semble impliqué dans la tumorigenèse. Tout d'abord la séquence codante de TIF1 γ est localisée au niveau du chromosome 1p13 chez l'homme, un point chaud de recombinaison. Une fusion de ce locus avec l'oncogène RET a notamment été décrit dans des cancers infantiles de la thyroïde (Klugbauer and Rabes, 1999). De plus, il a été montré que l'expression sérique d'un auto-anticorps dirigé contre TIF1 γ était corrélée à l'apparition de cancer chez des patients atteints de myopathies inflammatoires (Targoff et al., 2006). Cependant, le rôle de TIF1 γ dans la tumorigenèse reste inconnu.

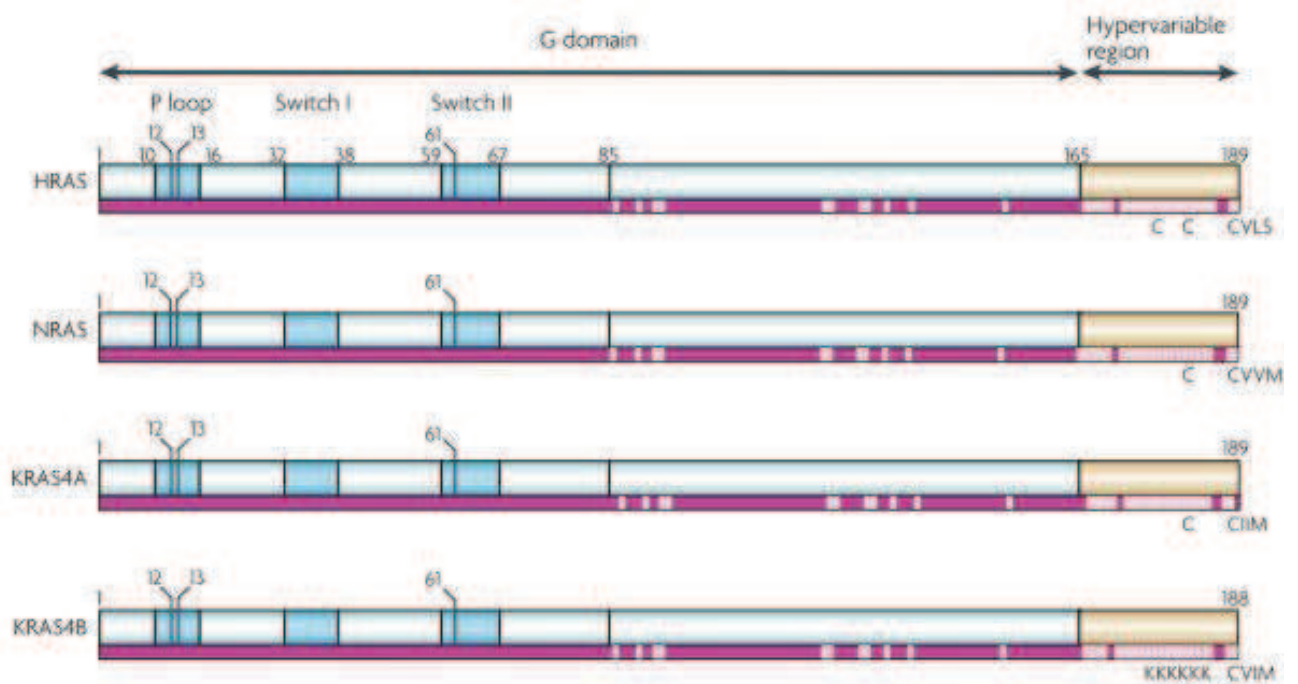


Figure 11 Structure des Protéines Ras. La partie N-terminale (codon 1-165) des protéines Ras est un domaine conservé de fixation du GDP/GTP (G domain, domaine protéine G). La partie C-terminale (165-188/189) est une région hypervariable (Hypervariable region). Ce domaine contient des résidus cibles de modifications post-traductionnelles propres à chaque protéine Ras. Toutes les protéines Ras sont modifiées (par farnésylation et palmitoylation) au niveau du motif C-terminal CAAX permettant leur adressage à la membrane plasmique nécessaire à leur activité. La forme prédominante de la protéine Kras, Kras4B (communément appelée Kras), contient un signal supplémentaire constitué d'une succession de résidus lysine (K) permettant un ancrage plus efficace de la protéine Kras à la membrane. (adapté d'après Schubbert et al., 2007)

II Dualité fonctionnelle du TGF β au cours de la tumorigenèse

Le TGF β a été identifié à l'origine comme un facteur oncogénique, stimulant la prolifération et la transformation des cellules (de Larco and Todaro, 1978; Leof et al., 1986). Le concept de « dualité fonctionnelle » apparaît dès 1980, où il a été montré que le TGF β exerçait un effet anti-prolifératif sur les cellules épithéliales (Holley et al., 1980). Cet effet fut par la suite observé dans nombreux autres types cellulaires comme les cellules hématopoïétiques, nerveuses et endothéliales (Massagué, 1990). Nous savons aujourd'hui que le TGF β régule de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la sénescence, l'apoptose ou encore la transition épithélio-mésenchymateuse.

Au cours de la progression tumorale, certaines fonctions du TGF β sont inhibées (programme anti-prolifératif et programme pro-apoptotique) alors que d'autres fonctions sont détournées au profit de la croissance et de l'adaptation de la cellule tumorale à son environnement (Transition Epithélio-Mésenchymateuse, immunosuppression, angiogenèse et remodelage de la matrice extracellulaire) (Ikushima and Miyazono, 2010b). Dans le cancer du pancréas, de nombreuses voies de signalisation sont altérées comme les voies Ras/MAPK, TGF β , Wnt/ β Catenine, Notch et Sonic/Hedgehog (Jones et al., 2008). Afin de mieux comprendre les effets du TGF β au cours de la tumorigenèse, cette partie se focalisera essentiellement sur l'interaction de la voie du TGF β avec une voie activée dans la quasi-totalité des cancers du pancréas, la voie oncogénique Ras. Comme nous allons le voir, la relation entre ces deux voies de signalisation reflète la complexité de la dualité fonctionnelle du TGF β .

II.1 Voie du TGF β et Oncogènes Ras

II.1.1 Oncogènes Ras

L'identification des gènes codant les protéines Ras, remonte à la fin des années 70 avec l'étude des propriétés transformantes des rétrovirus Harvey et Kirsten responsables de l'induction de sarcomes chez le rat. Des homologues cellulaires des gènes *Ras* (pour « Rat sarcoma virus ») ont été identifiés dès 1981 chez le rat (DeFeo et al., 1981) puis en 1982 chez la souris (Ellis et al., 1982) et chez l'homme (Chang et al., 1982). Les séquences cellulaires homologues à celles présentes dans les virus de Harvey et de Kirsten ont été dénommées respectivement **Hras** et **Kras**. Le troisième membre de la famille Ras, **Nras**, a été cloné en

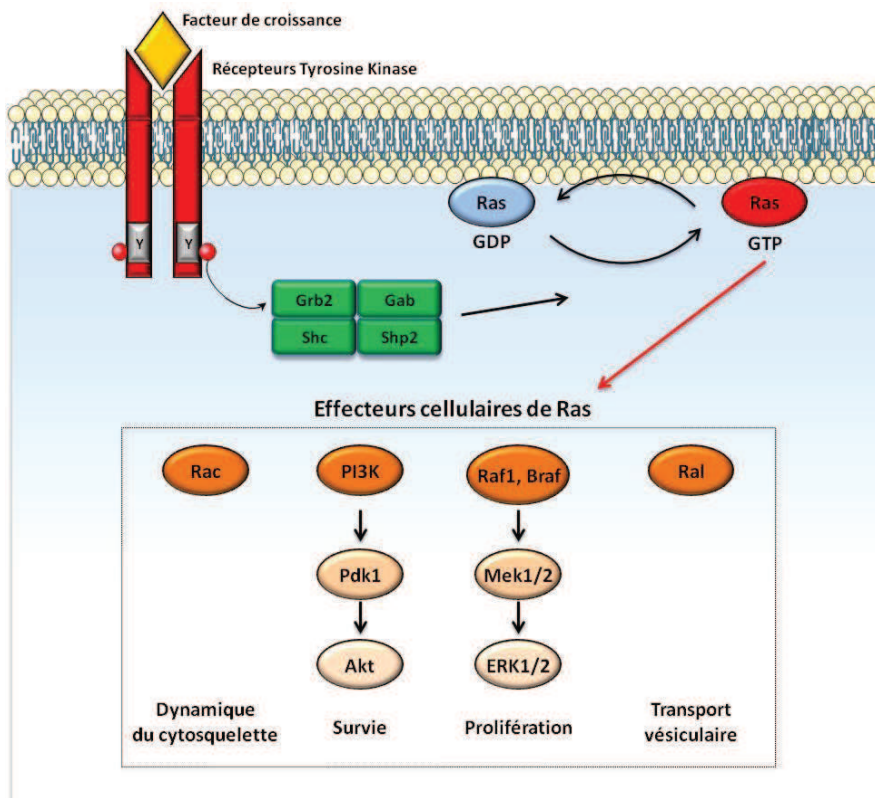


Figure 12 Voie de signalisation des Protéines Ras. (adapté d'après Schubert et al., 2007)

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

Tissue	K-Ras (%)	N-Ras (%)	H-Ras (%)
Biliary tract	32	1	0
Bone	1	0	2
Breast	5	1	1
CNS	1	2	0
Cervix	8	1	9
Endometrium	14	0	1
GI tract (site indeterminate)	19	0	0
Haematopoietic and Lymphoid tissue	5	12	0
Kidney	1	0	0
Large intestine	32	3	0
Liver	7	4	0
Lung	17	1	0
Melanoma	1	17	1
Oesophagus	4	0	0
Ovary	15	4	0
Pancreas	60	2	0
Prostate	8	1	6
Salivary gland	4	0	16
Skin ^a	2	19	5
Small intestine	20	25	0
Soft tissue	12	6	7
Stomach	6	2	4
Testis	5	4	0
Thyroid	3	7	4
Urinary tract	4	3	12

Figure 13 Mutations des Protéines Ras dans les cancers humains. (d'après Karreth and Tuveson, 2009)

1983 à partir de cellules cancéreuses dérivées de neuroblastome (Shimizu et al., 1983). Chez les mammifères, les trois gènes *Ras* codent quatre GTPases de 21 kDa chacune : Hras, Nras, Kras4A et Kras4B (les deux protéines K-Ras4A et 4B sont issues d'un épissage alternatif) (**Figure 11**).

Les GTPases Ras appartiennent à la superfamille des petites protéines G, jouant un rôle primordial dans la réponse cellulaire aux facteurs de croissance. La fixation de ces facteurs sur leurs récepteurs spécifiques à activité tyrosine kinase, induit le recrutement de protéines adaptatrices qui vont catalyser l'échange GDP/GTP au niveau des protéines Ras. La forme active de Ras (Ras-GTP) permet l'activation de différents effecteurs cellulaires. Enfin, l'hydrolyse du Ras-GTP en Ras-GDP, catalysée par des GTPases, permet de mettre fin à la transduction du signal. Plus de vingt protéines effectrices ont été décrites pour interagir avec la forme active de Ras (Ras-GTP) parmi lesquelles il est possible de distinguer Raf1, les kinases PI3K, les petites GTPases Ral ou encore Rac. **Ces différents effecteurs sont à la base de l'activation de différents programmes cellulaires comme la prolifération, la survie cellulaire, le transport vésiculaire ou encore la réorganisation du cytosquelette (Figure 12).**

II.1.2 Altérations de la voie du TGF β et de Ras dans les cancers humains

II.1.2a Activation de la voie Ras

Les gènes codant les protéines Ras sont fréquemment retrouvés mutés dans les tumeurs humaines (**Figure 13**). Il semble exister une association entre l'oncogène Ras muté et le type de cancer : alors que des mutations de Kras4B (plus communément appelé Kras) sont préférentiellement retrouvées dans les cancers pancréatiques et colorectaux, des mutations de Hras sont associées au cancer de la vessie, et des mutations de Nras sont associées aux leucémies et aux mélanomes. Cette association peut s'expliquer, en partie, par la différence d'expression des différentes protéines Ras au cours de l'embryogenèse (Koera et al., 1997; Esteban et al., 2001) mais également par le type de mutation retrouvé au niveau de ces oncogènes. De façon intéressante, la majorité de ces mutations affectent le codon 12 des protéines Hras (de type G12V) et Kras (de type G12D) alors que le codon 61 est préférentiellement affecté dans le cas de la protéine Nras (de type Q61R). D'un point de vue

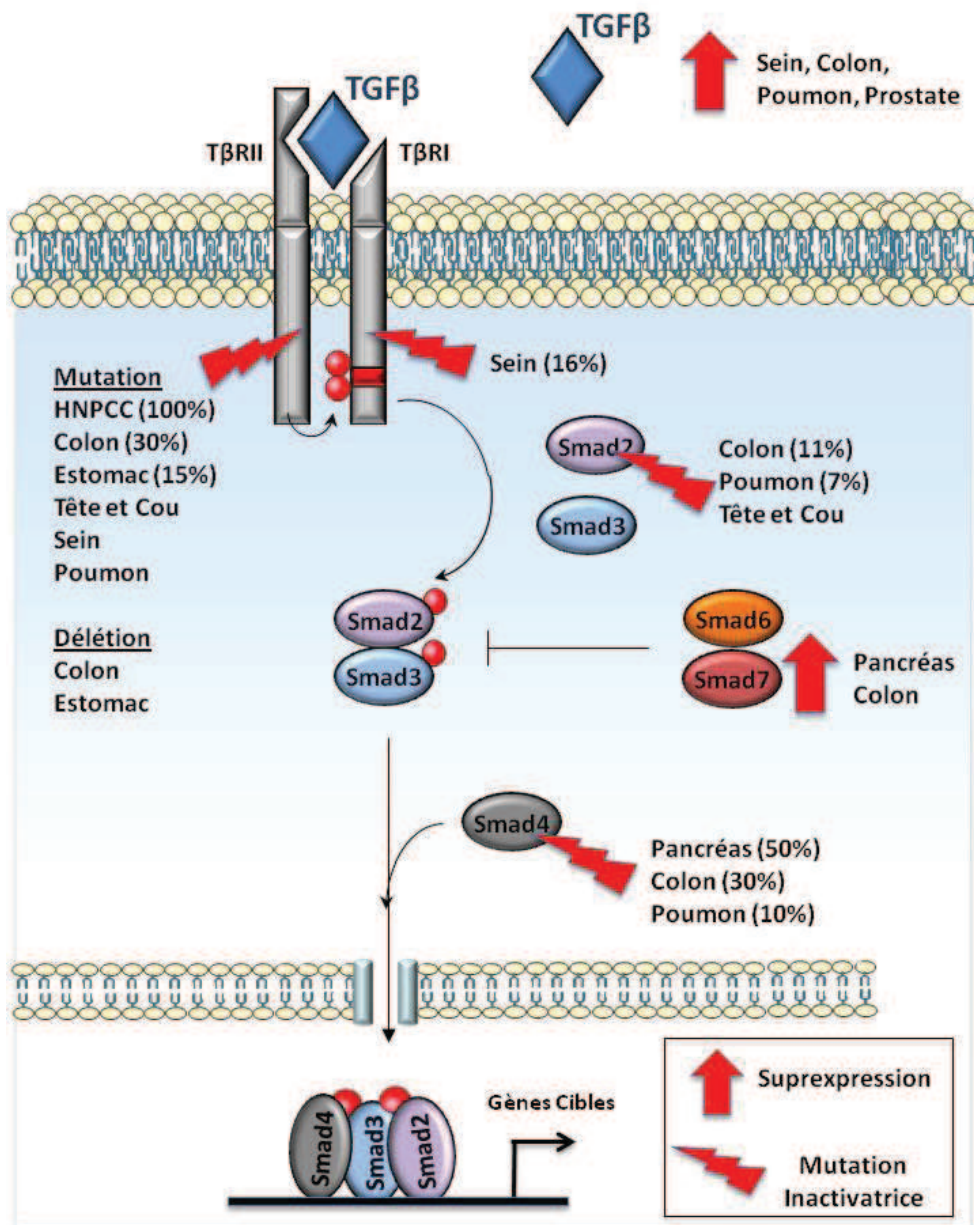


Figure 14 Mutations de la voie de signalisation du TGFβ dans les cancers humains. (adapté d'après Glick, 2004) Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

moléculaire, la mutation d'un de ces résidus compromet fortement l'hydrolyse du Ras-GTP, maintenant ainsi actives les voies de signalisation dépendantes de Ras (Pylayeva-gupta et al., 2011).

II.1.2b Altérations de la voie du TGFβ

La voie du TGFβ est également fréquemment retrouvée mutée dans les cancers humains (**Figure 14**). Ces mutations peuvent affecter différents composants de la voie du TGFβ (récepteurs, SMADs, inhibiteurs). Ces mutations sont observées dans de nombreux cancers tels que les cancers gastro-intestinaux, ovariens et mammaires (Xu and Pasche, 2007; Levy and Hill, 2006; Pardali and Moustakas, 2007). Nous pouvons remarquer que la perte de fonction de la voie du TGFβ –suite à l'inactivation des récepteurs- n'est pas un événement prépondérant (16% des cancers mammaires et <5% des cancers gastro-intestinaux). Ceci suggère que certaines fonctions de la voie du TGFβ confèrent un avantage sélectif aux cellules cancéreuses. Les mutations les plus fréquentes de la voie du TGFβ concernent les protéines SMADs, en particulier SMAD4, dont le locus est inactivé dans plus de la moitié des cancers pancréatiques. Ceci s'explique en partie par le rôle essentiel des protéines SMADs dans les programmes suppresseurs de tumeur du TGFβ.

Le TGFβ est également à la base de l'activation de voies indépendantes des protéines SMADs (MAPK, Rho, PI3K/Akt). Ces programmes ne sont pas spécifiques de la voie du TGFβ et peuvent être activés notamment par les acteurs de la voie Ras. Après avoir décrit les relations moléculaires entre la voie du TGFβ et la voie Ras, nous allons nous focaliser sur les relations fonctionnelles entre ces deux voies, dans différents programmes aux effets anti- et pro-oncogéniques.

II.1.3 Interactions entre la voie de signalisation du TGFβ et l'oncogène Ras

Au niveau cellulaire, la voie du TGFβ est interconnectée avec la voie Ras (**Figure 15**). Cette signalisation croisée va induire différents effets cellulaires selon les voies activées par le TGFβ (voies des SMADs et voies SMADs-indépendantes) et par l'oncogène Ras. Ainsi, la relation entre ces voies peut être de nature antagoniste ou complémentaire. Nous

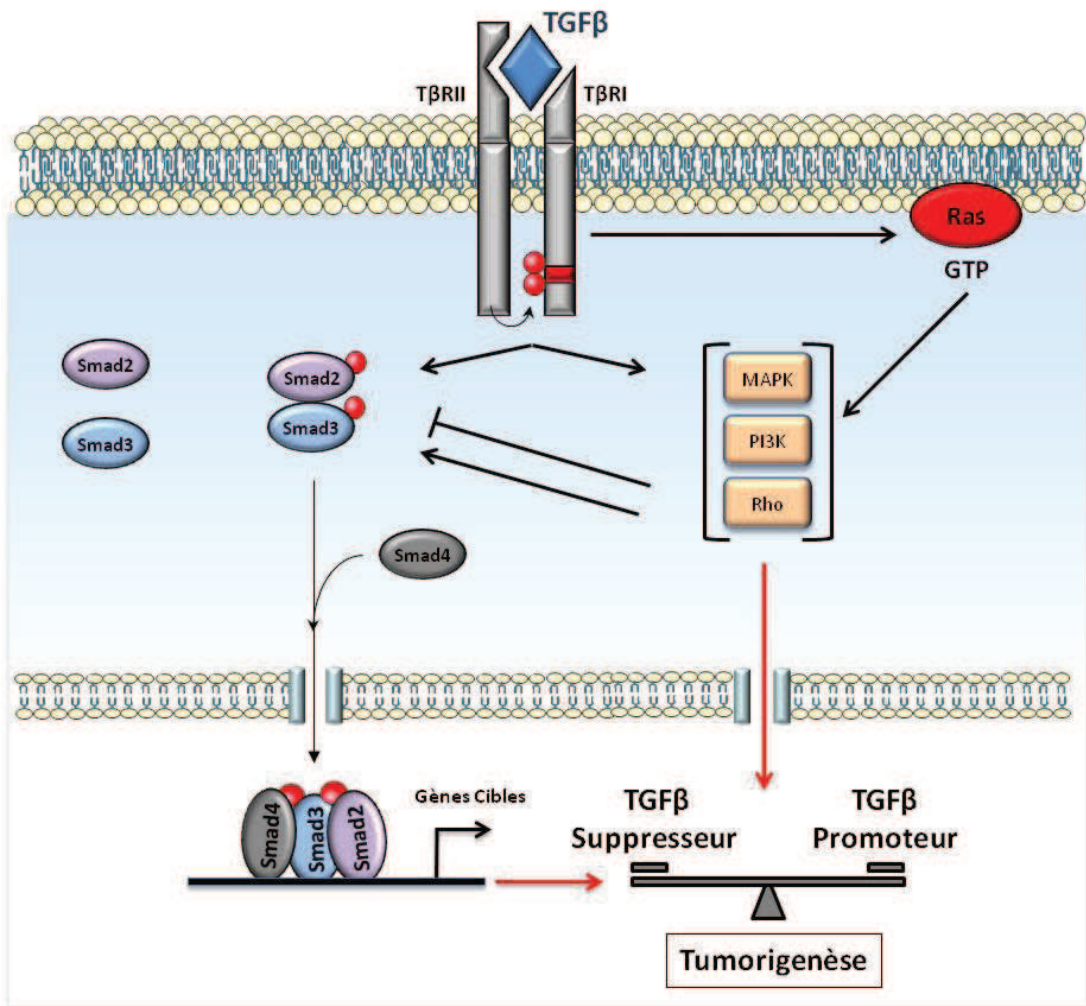


Figure 15 Interaction entre la voie du TGFβ et la voie de l'oncogène Ras.

L'activation des voies Smads indépendantes (MAPK, PI3K et Rho) est commune à la voie du TGFβ et à la voie Ras. Ces mêmes voies peuvent activer ou inhiber l'activité des protéines Smads. Par conséquent, l'effet du TGFβ au cours de la tumorigenèse va dépendre de l'intégration cellulaire de ces différentes voies de signalisation. Illustration réalisée grâce à Servier

Medical Art

allons décrire plusieurs programmes mis en place au cours de la tumorigenèse où ces deux voies peuvent agir de manière antagoniste (prolifération, apoptose) ou complémentaire (sénescence, EMT, remodelage de l'environnement cellulaire).

II.2 Programmes Anti-oncogéniques du TGF β

II.2.1 Contrôle du Cycle Cellulaire

II.2.1a Programme Antiprolifératif du TGF β

Le TGF β est capable d'induire un arrêt de la prolifération dans la plupart des types cellulaires. Les résultats obtenus sur différents tissus épithéliaux (épiderme, épithélium mammaire et pulmonaire) ont permis de définir précisément le programme cytotatique activé par le TGF β . Ce dernier est capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire spécifiquement en phase G1 *via* l'inhibition des protéines régulatrices du cycle cellulaire, les CDK (Kinases dépendantes des cyclines). Pour cela, le TGF β induit rapidement, *via* les protéines SMADs, l'expression d'inhibiteurs de CDK, telles que CDKN1A (p21^{CIP1}), CDKN2B (p15^{INK4B}) (Gomis et al., 2006). Alors que les inhibiteurs de la famille INK4 ciblent spécifiquement le domaine kinase des CDK4 et CDK6, les inhibiteurs de la famille CIP/KIP inhibe l'activité enzymatique de CDK2 en interagissant avec son domaine kinase. Par exemple, la protéine CDKN1B (p27^{Kip1}) permet d'inhiber la formation du complexe CDK2/cycline E suite à la fixation de p15^{INK4B} sur CDK4/6 (Reynisdottir et al., 1995). Le TGF β réprime également, en activant la voie des SMADs, l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et dans l'inhibition de la différenciation tels que c-MYC, ID1, ID2 and ID3 (**Figure 16**). L'échappement à l'effet antiprolifératif est une caractéristique quasi-universelle des tumeurs épithéliales. Ceci explique que des mutations inactivatrices des gènes codant les protéines SMADs soient fréquemment retrouvées dans les tumeurs.

II.2.1b Oncogène Ras et Prolifération cellulaire

Un des programmes majeurs activés par la voie Ras est la stimulation de la prolifération cellulaire en facilitant l'entrée des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. **La voie Ras et la voie du TGF β ont donc des effets opposés sur la prolifération cellulaire**

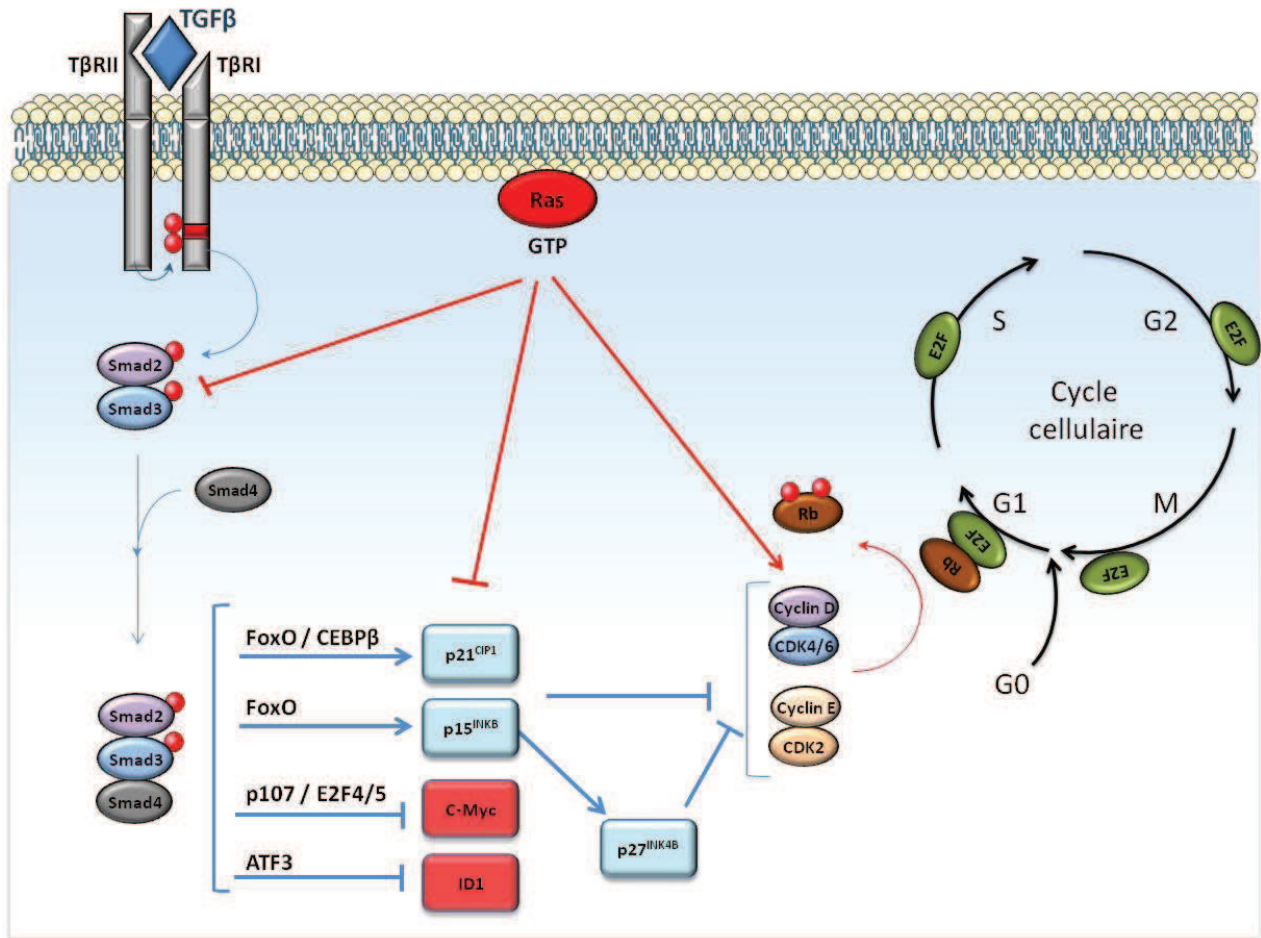


Figure 16 Programme Cytostatique du TGF β et Oncogène Ras. Au niveau moléculaire, en phase G1 précoce, les facteurs de croissance –activant entre autres la protéine Ras- induisent l’expression de la cycline D. Celle-ci s’associe alors avec les CDK (Cyclin Dependant Kinase) 4 et 6 et phosphoryle le complexe Rb (Retiniblastinoma)/E2F et engendre sa dissociation. E2F, ainsi activé, peut induire l’expression de la cycline E qui forme un complexe CDK2. Les complexes cyclines E / CDK2 et cyclin D / CDK4/6 permettent alors la progression du cycle cellulaire en phase G1/S. L’activation de la voie du TGF β permet de bloquer cette phase du cycle cellulaire en activant l’expression des CKIs (CDK-Inhibitors), $p15^{INKB}$ et $p21^{CIP1}$, et en réprimant celles des gènes *C-Myc* et *ID1*. Les co-facteurs de transcription (FoxO, CEBP β , p107, E2F4/5, ATF3) permettant aux protéines Smads d’activer ou de réprimer l’expression de ces gènes sont indiqués. Les mutations activatrices de l’oncogène Ras permettent de maintenir le cycle cellulaire actif notamment en réprimant le programme cytostatique du TGF β .

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

(**Figure 16**). En effet, la protéine Ras induit, *via* les voies Raf1/ERK et PI3K/Akt, l'expression de cycline nécessaire à l'entrée en phase G1 du cycle cellulaire (Cycline D1), et la répression d'inhibiteur de cycline comme p21^{CIP1} dont l'expression est dépendante la voie du TGFβ (Schubbert et al., 2007). De plus, les kinases ERK ainsi que les CDK peuvent inhiber l'activité des SMADs en phosphorylant leur domaine « linker » (Kretzschmar et al., 1999; Matsuura et al., 2004).

L'activation forcée du cycle cellulaire, comme dans le cas d'une activation oncogénique de Ras, induit un stress répliatif source de dommages à l'ADN. Dans le cas où les réponses aux dommages à l'ADN sont fonctionnelles, l'activation oncogénique de la protéine Ras induit un arrêt irréversible du cycle cellulaire appelé **sénescence** induite par un stress oncogénique ou OIS (Oncogene-Induced Senescence). La voie du TGFβ permet à la fois la mise en place de cet OIS (Cipriano et al., 2011) mais également son maintien. En effet, il a récemment été démontré que la perte de fonction de la voie du TGFβ participait activement à l'échappement à la sénescence de cellules exprimant Ras par la diminution de l'expression de p21^{CIP1} et de l'activité transcriptionnelle de p53 (Lin et al., 2012). **En conclusion, en l'absence d'autres altérations, la voie du TGFβ et la voie Ras peuvent engager un programme commun visant à activer la senescence.** Ce mécanisme anti-tumoral maintient cependant une pression de sélection permettant l'émergence de cellules présentant une inactivation préférentielle des gènes clés de l'OIS et de la réparation à l'ADN, comme p53 et p14^{ARF}. Ces cellules, qui présentent un défaut de réparation de l'ADN, peuvent alors accumuler d'autres mutations participant à la transformation de la cellule.

II.2.2 Activation de l'Apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée où les principaux effecteurs sont des enzymes intracellulaires de la famille des caspases. Ces protéases sont responsables des différents changements qui interviennent lors de l'apoptose comme la fragmentation de l'ADN, la dissociation de l'enveloppe nucléaire et la formation des corps apoptotiques (**Figure 17**).

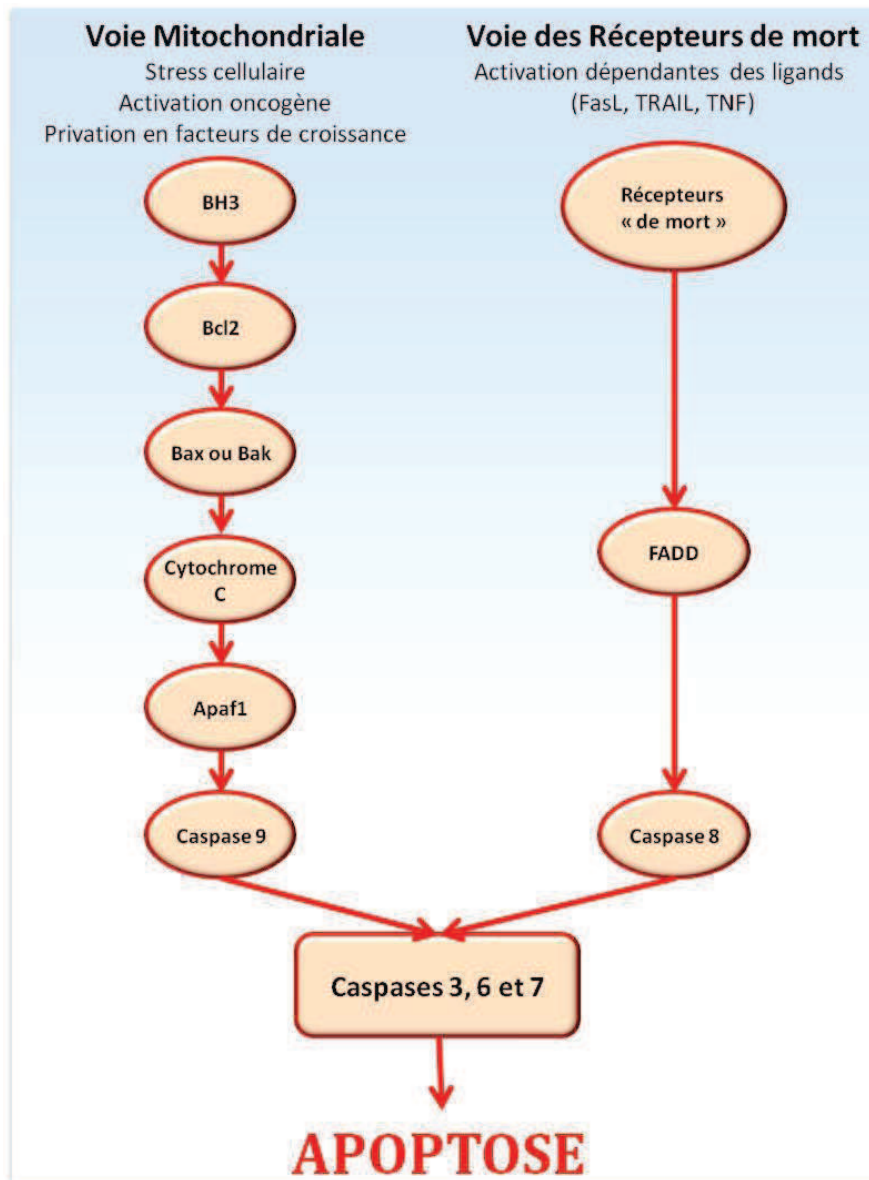


Figure 17 Les voies de signalisation de l'Apoptose. La voie mitochondriale ou la voie des récepteurs de mort peuvent être activées suite à différents stimuli d'origine intra- ou extra-cellulaire, respectivement. Ces différentes voies aboutissent à l'activation des effecteurs cellulaires de l'apoptose, les caspases. Ces enzymes protéolytiques sont responsables des différents changements cellulaires observés au cours de l'apoptose (fragmentation de l'ADN, dissociation de l'enveloppe nucléaire et formation des corps apoptotiques). (adapté d'après Croce, 2008)

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

II.2.2a Programme Pro-apoptotique du TGFβ

Le rôle pro-apoptotique du TGFβ, essentiel pendant l'embryogenèse et la régulation du système immunitaire, a été démontré dans de nombreux types cellulaires tels que les lymphocytes B, les hépatocytes et les cellules épithéliales de la prostate et du poumon (Sánchez-Capelo, 2005). Les protéines **SMADs** sont des médiateurs de l'effet proapoptotique du TGFβ. En effet, il a été montré que la protéine SMAD3 permettait à la fois l'accumulation de membres pro-apoptotiques tels que Bim (Ramesh et al., 2009) et la dégradation de membres antiapoptotiques comme Bcl-2 (Yang et al., 2006). De plus, la délétion spécifique de la protéine inhibitrice SMAD7 dans des cellules hépatiques ou cardiaques induit une forte augmentation de l'apoptose associée à une activation de la voie du TGFβ (Chen et al., 2009; Zhu et al., 2011b). Cependant, il semble que SMAD7 puisse être également nécessaire au TGFβ afin d'induire l'apoptose comme cela a été montré dans des cellules cancéreuses de la prostate (Edlund et al., 2003). Les voies **indépendantes des SMADs** participent également à l'effet proapoptotique du TGFβ. Par exemple, le complexe TAK1/TRAF6 est un complexe essentiel à l'apoptose induite par le TGFβ *via* l'activation des voies p38 et JNK (Sorrentino et al., 2008; Yamashita et al., 2008; Várady et al., 2011). Enfin il a également été décrit que le TGFβ pouvait coopérer avec Daxx, une protéine associée au récepteur Fas, activant ainsi la voie JNK et l'apoptose (Perlman et al., 2001; Ramesh et al., 2009).

II.2.2b Oncogène Ras et Apoptose

De façon intéressante, l'oncogène Ras peut se comporter comme un facteur pro-apoptotique ou anti-apoptotique. Une étude récente a notamment démontré qu'une forme sauvage de Kras pouvait antagoniser l'effet pro-apoptotique d'une forme mutante de Kras (Matallanas et al., 2011). **De manière similaire à ce qui est observé pour le TGFβ, les voies JNK et p38MAPK activées par Ras, peuvent induire l'apoptose** (Kennedy et al., 2003; Wolfman et al., 2002; Cellurale et al., 2011). Les protéines Ras peuvent également engager des effecteurs spécifiques tels que les protéines RASSF (Ras-Association Domain Family) dont l'expression est fréquemment diminuée dans les tumeurs humaines (Richter et al., 2009). Un membre de cette famille, RASSF2, permet d'induire l'apoptose par l'intermédiaire du suppresseur de tumeur Par4 (Donninger et al., 2010; Shrestha-Bhattarai and Rangnekar, 2010).

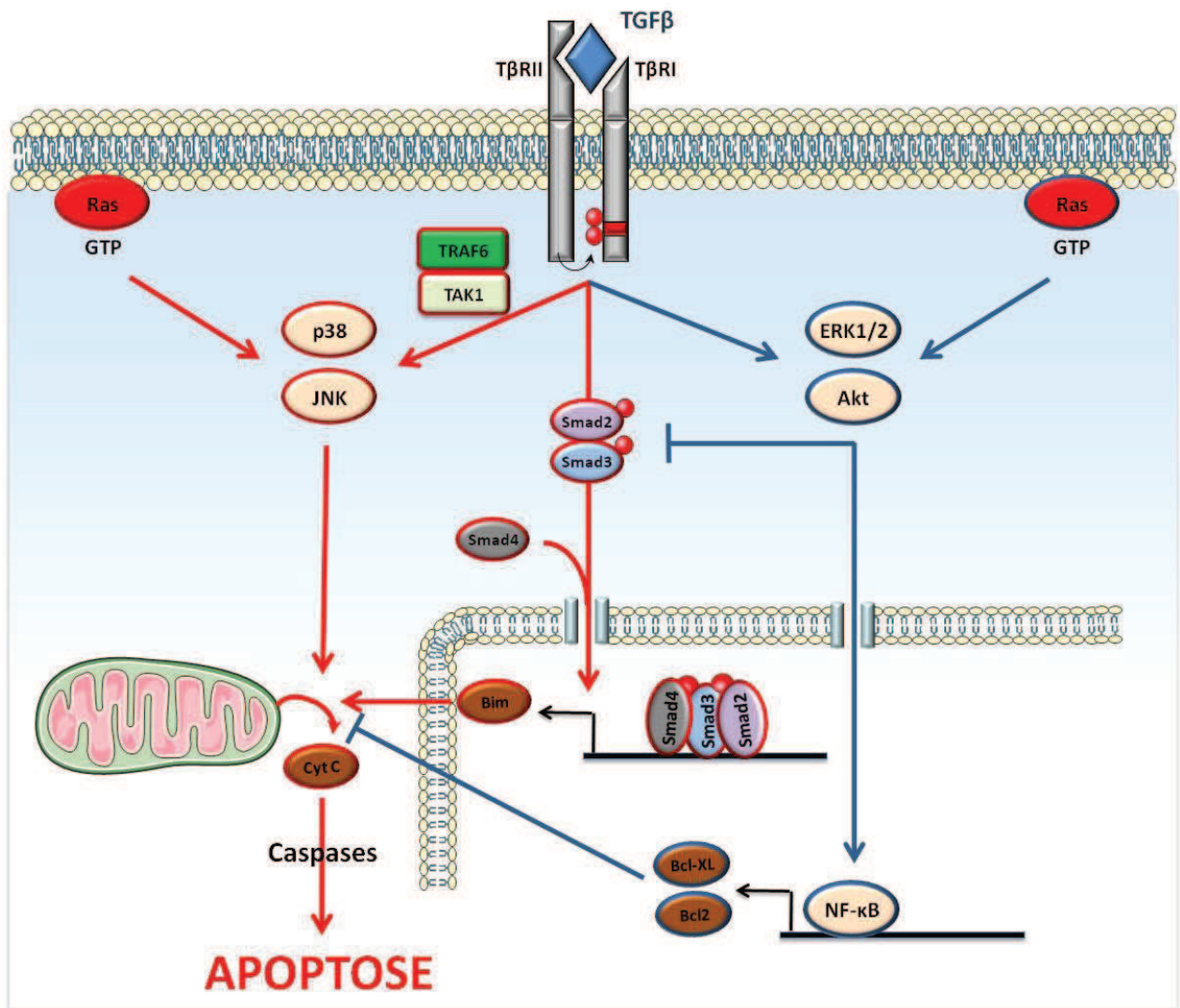


Figure 18 Programme pro-apoptotique du TGFβ et Oncogène Ras. Le programme pro-apoptotique du TGFβ implique principalement la voie mitochondriale suite à l'activation des voies SMADs, TRAF6/TAK1/p38 et TRAF6/TAK1/JNK. Les voies ERK et PI3K/Akt sont des voies de survie cellulaire pouvant être activées à la fois par l'oncogène Ras et la voie du TGFβ. Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

Cependant, afin d'échapper à l'apoptose, les cellules tumorales activeraient préférentiellement **les voies Raf/ERK et PI3K/Akt**. Par exemple, les kinases ERK peuvent être activées afin d'inhiber l'expression du facteur pro-apoptotique Par4 (Pruitt et al., 2005; Ahmed et al., 2008). D'autre part, une étude récente a démontré que Shp2, une protéine de survie, inhibait l'apoptose en activant la voie ERK1/2 (Wang et al., 2012). La voie classiquement associée à l'effet anti-apoptotique des oncogènes Ras est la voie PI3K/Akt. Il a été montré que l'effecteur Akt permettait l'inhibition des protéines SMADs (Conery et al., 2004; Band et al., 2009) mais également, l'inhibition des membres pro-apoptotiques de la famille BCL2, Bad et Bax ; l'inhibition de p53 *via* la phosphorylation de son ubiquitine ligase Mdm2 ou encore la transcription de facteurs anti-apoptotiques par la voie NF-KB (Duronio, 2008; Shih et al., 2010).

Ainsi un fort taux d'expression d'Akt et/ou d'activation de la voie ERK dans les cellules exprimant Ras, participe activement à l'échappement à l'effet pro-apoptotique du TGFβ (Figure 18).

II.3 Programmes Pro-oncogéniques du TGFβ

Les altérations permettant d'échapper aux effets protecteurs du TGFβ vont faciliter en parallèle la mise place des programmes oncogéniques. Dans ce paragraphe, nous allons nous intéresser aux programmes biologiques du TGFβ qui sont détournés pour faciliter la tumorigenèse. Ces programmes vont affecter à la fois les cellules cancéreuses (transition épithélio-mésenchymateuse) mais également le micro-environnement cellulaire (remodelage de la matrice extracellulaire et immunosuppression).

II.3.1 Activation de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse

Les cellules épithéliales se caractérisent par leur capacité à former des tissus très organisés et hautement différenciés. Ces mêmes cellules présentent une forte cohésion intercellulaire assurée par de nombreuses jonctions adhérentes. Au contraire, les cellules mésenchymateuses sont des cellules motiles, non jointives et caractérisées par un degré d'organisation et de différenciation moindre. Lors du développement embryonnaire, des cellules épithéliales peuvent acquérir des caractéristiques de cellules mésenchymateuses. Ce

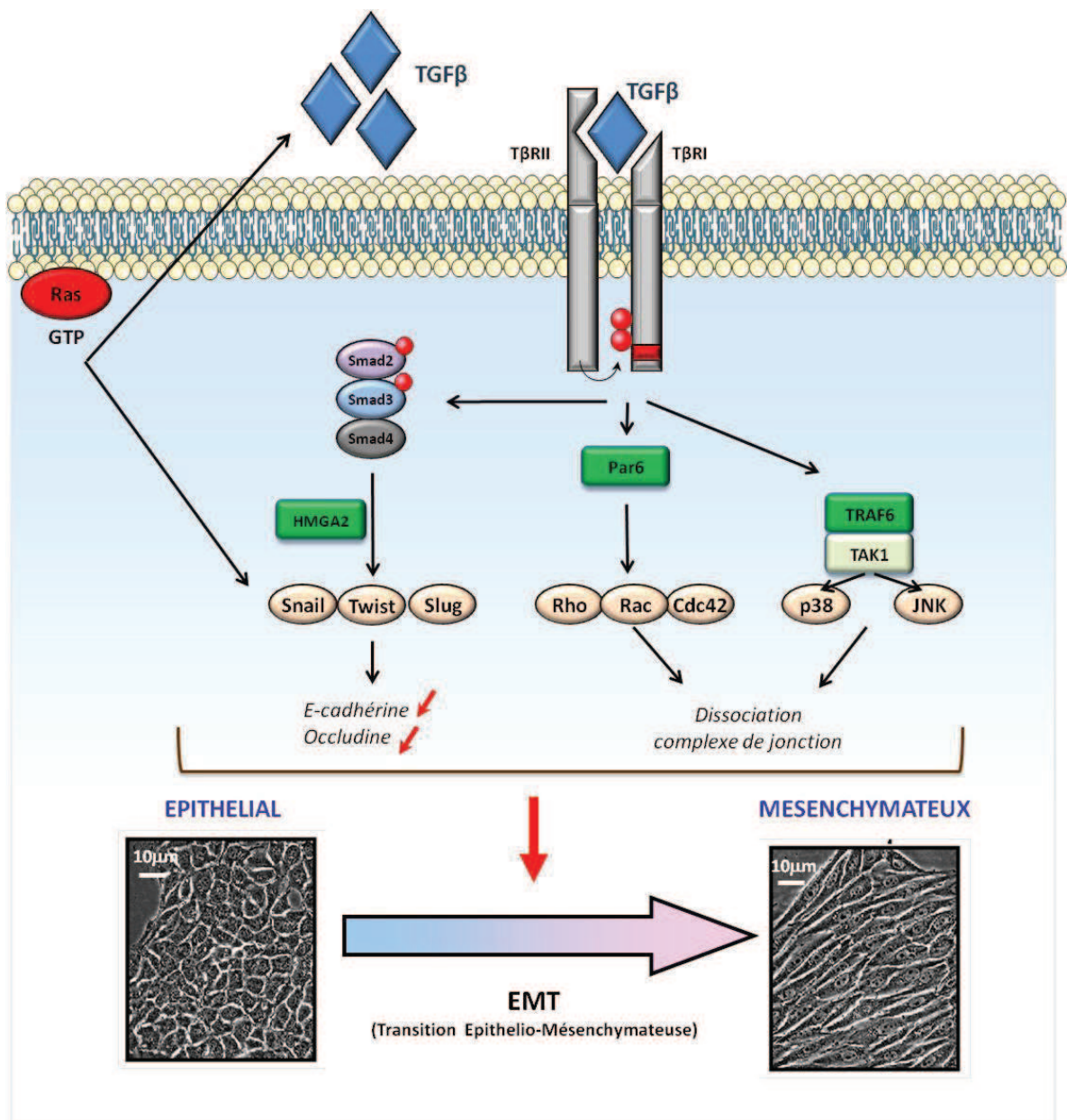


Figure 19 Activation de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT) par le TGFβ. En présence de TGFβ, les cellules épithéliales peuvent perdre leurs caractéristiques épithéliales et acquérir des caractéristiques mésenchymateuses. Alors que la voie des protéines Smads active l'expression des facteurs de transcription Snail, Twist et Snail, l'axe TRAF6/TAK1 et Par6/Rho participent à la dissociation des complexes de jonction. L'oncogène Ras facilite l'EMT en favorisant l'expression de TGFβ, et en activant l'expression de Snail. Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

processus appelé **transition épithélio-mésenchymateuse** (EMT, Epithelial-to-Mesenchymal Transition) contribue à la génération de différents tissus et organes. Cependant, ce processus embryonnaire peut être réactivé chez l'adulte lors de la progression tumorale (Thiery et al., 2009).

II.3.1a Induction de l'EMT par le TGF β

Le TGF β est un inducteur majeur de l'EMT dans des conditions physiologiques et pathologiques. Le TGF β régule en effet de nombreux programmes cellulaires nécessaires à l'EMT comme la réorganisation du cytosquelette, la régulation des jonctions cellulaires ou encore l'acquisition de propriétés migratoires et invasives (Pardali and Moustakas, 2007). **La voie des protéines SMADs** participe activement à la mise en place de l'EMT. En effet, l'activation des complexes SMADs est un pré-requis nécessaire à l'induction de l'EMT (Valcourt et al., 2005). Par exemple, l'inactivation de SMAD4 (Deckers et al., 2006) ou de SMAD3 (Roberts et al., 2006) compromet fortement l'EMT induite par le TGF β . La voie des protéines SMADs permet, entre autres, d'induire l'expression de SNAIL, SLUG et TWIST *via* HMGA2 (Thuault et al., 2006). Enfin, la protéine SNAIL1 en s'associant avec les SMADs, forme un complexe répresseur des gènes codant pour la Cadhérine-E et l'Occludine, 2 protéines des jonctions cellulaires (Vincent et al., 2009b). D'autre part, et **indépendamment des protéines SMADs**, l'activation des protéines Par6 (Ozdamar et al., 2005) et du complexe TRAF6-TAK1 (Yamashita et al., 2008; Sorrentino et al., 2008) par les récepteurs au TGF β , stimule la dissociation des complexes de jonctions (**Figure 19**).

II.3.1b Oncogène Ras et EMT

De nombreuses voies de signalisation coopèrent afin d'induire l'EMT tels que les voies Wnt/ β Catenine, EGF, FGF et les voies TGF β /BMP (Thiery et al., 2009). Bien que la coopération moléculaire entre ces différentes voies reste méconnue, **la voie Ras semble agir de manière synergique avec la voie du TGF β** afin d'induire les différents programmes nécessaires à la mise en place de l'EMT. L'activation de la voie Ras/MAPK permet de faciliter l'EMT induite par le TGF β , notamment en stabilisant la production autocrine de TGF β (Janda et al., 2002) et en stimulant l'expression de facteurs activés au cours de l'EMT comme Snail (Horiguchi et al., 2009), PAI-1 ou Wnt5a (Kanies et al., 2008) (**Figure 19**).

De plus, il semble que l'induction de l'EMT par la voie du TGF β et la voie Ras participe à l'échappement aux systèmes de sauvegarde cellulaire. Il a été démontré, par exemple, que l'induction de Twist au cours de l'EMT permettait aux cellules cancéreuses d'échapper à la sénescence (Ansieau et al., 2008; Tran et al., 2012) et à l'apoptose (Puisieux et al., 2006). Ces données suggèrent qu'au cours de l'EMT, le TGF β ne pourrait induire ni l'apoptose ni la sénescence. Il a également été proposé récemment que l'activation de la voie PI3K/Akt au cours de l'EMT puisse participer à l'échappement à l'apoptose (Leight et al., 2012). Enfin, il a été montré que les cytokines associées à l'EMT, telles que le TGF β , facilitait l'acquisition de propriétés de cellules souches par les cellules cancéreuses (Morel et al., 2008; Mani et al., 2008; Morel et al., 2012).

II.3.2 Remodelage de l'environnement cellulaire

II.3.2a Plasticité de la matrice extracellulaire

Au cours de la progression tumorale, il est observé un remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) facilitant ainsi la migration et l'invasion des cellules tumorales, et la dissémination métastatique (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). En effet, la composition de la MEC peut influencer la prolifération et la différenciation en activant de nombreuses voies de signalisation dans les cellules normales et cancéreuses.

Le TGF β est un puissant inducteur de la formation de la matrice extracellulaire (MEC). Historiquement, ce rôle a été découvert en 1986 : l'injection sous cutanée de TGF β à des souris avait induit une forte production de MEC (Roberts et al., 1986). Le TGF β est capable i) d'augmenter l'expression d'un grand nombre de composants de la MEC tels que la fibronectine, les ténascines et les collagènes, ii) d'induire l'expression d'inhibiteurs de protéases (ex.PAI-1, Plasminogen Activator Inhibitor 1) et d'inhibiteurs de métalloprotéinases de la MEC (TIMPs). Le TGF β participe également au remodelage de la MEC. Ce remodelage est assuré par des enzymes protéolytiques, appelées métalloprotéinases (MMP), capable de dégrader les composants de la MEC. Les cellules tumorales utilisent ces propriétés du TGF β afin de remodeler l'environnement tumoral. Il a notamment été démontré que l'activation de la voie du TGF β dans les fibroblastes du stroma tumoral permettait d'augmenter la production de collagène par ces fibroblastes favorisant ainsi la progression tumorale (Hwang et al., 2008; Krantz et al., 2011).

Il semble exister une forte coopération entre la voie du TGF β et la voie Ras dans le remodelage de MEC au cours de la progression tumorale. Il a été démontré, par exemple, que le TGF β est capable, en coopération avec les intégrines $\alpha 3\beta 1$, de stimuler la production de MMP9 dans des kératinocytes immortalisés. Cette induction est d'autant plus forte si l'oncogène Ras est activé (Lamar et al., 2008). D'autres études ont démontré que le TGF β , en coopération avec les voies MAPK, p38 et ERK, facilitait l'invasion de cellules cancéreuses mammaires en stimulant l'expression de MMP et TIMP (Stuelten et al., 2005; Safina et al., 2007; Gomes et al., 2012).

II.3.2b Mise en place d'un environnement immunotolérant

Le système immunitaire est un des acteurs clés de la réponse anti-tumorale de l'organisme. Au cours de la tumorigenèse, les cellules tumorales vont acquérir de nouveaux antigènes stimulant ainsi les réponses immunitaires anti-tumorales. Les acteurs de la réponse innée (cellules NK, granulocytes neutrophiles et macrophages) et de la réponse adaptative (lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺) permettent alors l'élimination des cellules tumorales (Pardoll, 2003). Afin d'échapper à cette immunosurveillance, les cellules tumorales ont mis en place des stratégies permettant de limiter l'activation du système immunitaire. Une de ces stratégies est la sécrétion de TGF β dans le microenvironnement tumoral.

Le TGF β est une cytokine majeure dans la régulation du système immunitaire. Le TGF β est capable d'inhiber la prolifération, l'activité et/ou la différenciation d'un grand nombre de cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes (T et B), les macrophages, les cellules dendritiques et les granulocytes (Li et al., 2006). Ainsi, le TGF β , sécrété par les cellules tumorales et/ou les cellules du stroma tumoral (fibroblastes, macrophages,...) facilite la mise en place d'un environnement immunotolérant au sein du site tumoral.

Le rôle immunosuppresseur (pro-tumoral) du TGF β affecte notamment les lymphocytes T : l'inactivation de la voie du TGF β dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ permet l'élimination, *via* les lymphocytes T, de cellules de mélanome (Gorelik and Flavell, 2001) et de tumeur de la prostate (Zhang et al., 2005) chez la souris. D'autres études soulignent l'importance des TReg (lymphocytes T Régulateurs) cours de la progression tumorale. La présence de cette population, dont la différenciation dépend en grande partie du TGF β , est associée au développement tumoral de nombreuses tumeurs comme les mélanomes (Niu et

al., 2011) et les hépatocarcinomes (Zhu et al., 2011a). De façon intéressante, les cellules tumorales peuvent acquérir les mêmes propriétés immunosuppressives que les lymphocytes T régulateurs (Hinz et al., 2007) (Niu et al., 2011).

La voie Ras participe indirectement à l'effet immunosuppresseur du TGF β . En effet, l'activation de la voie Ras est fréquemment associée à la sécrétion de TGF β par les tumeurs. Le blocage de la voie Ras/ERK et Ras/Akt permet en effet de diminuer la sécrétion de TGF β par les cellules tumorales (Tsubaki et al., 2011). Il a également été montré dans des cellules cancéreuses rénales que l'activation de la voie Nras favorisait la production de TGF β (Dockrell et al., 2009).

II.4 Stratégies et Enjeu thérapeutique

La survie des patients est en grande partie corrélée négativement à la survenue de métastases. Ces dernières se forment à distance de la tumeur primaire et peuvent se développer dans des organes vitaux tels que le foie, les poumons ou encore le cerveau. Le développement de métastases complique alors la stratégie thérapeutique ciblée à l'origine sur l'organe où la tumeur primaire est apparue. L'inhibition du phénomène métastatique est donc apparue comme une stratégie thérapeutique prometteuse.

Comme nous venons de le voir, le TGF β est impliqué dans de nombreux programmes visant à faciliter la mise en place des métastases comme le remodelage de la matrice extracellulaire, l'immunosuppression ou encore l'EMT. Ces éléments, associés à la sécrétion croissante de TGF β au cours de la progression tumorale, ont permis de définir le TGF β comme une cible thérapeutique intéressante. La première partie s'intéressera donc aux stratégies thérapeutiques visant à inactiver la voie du TGF β dans les cancers. La deuxième partie exposera les futurs enjeux thérapeutiques.

II.4.1 Inhibition de la voie du TGF β

Des essais cliniques visant à inactiver la voie du TGF β sont actuellement en cours (**Figure 20A**) (Smith et al., 2012). Les approches les plus utilisées sont les suivantes : i) l'inhibition de l'activité du TGF β extracellulaire notamment grâce à des anticorps bloquants,

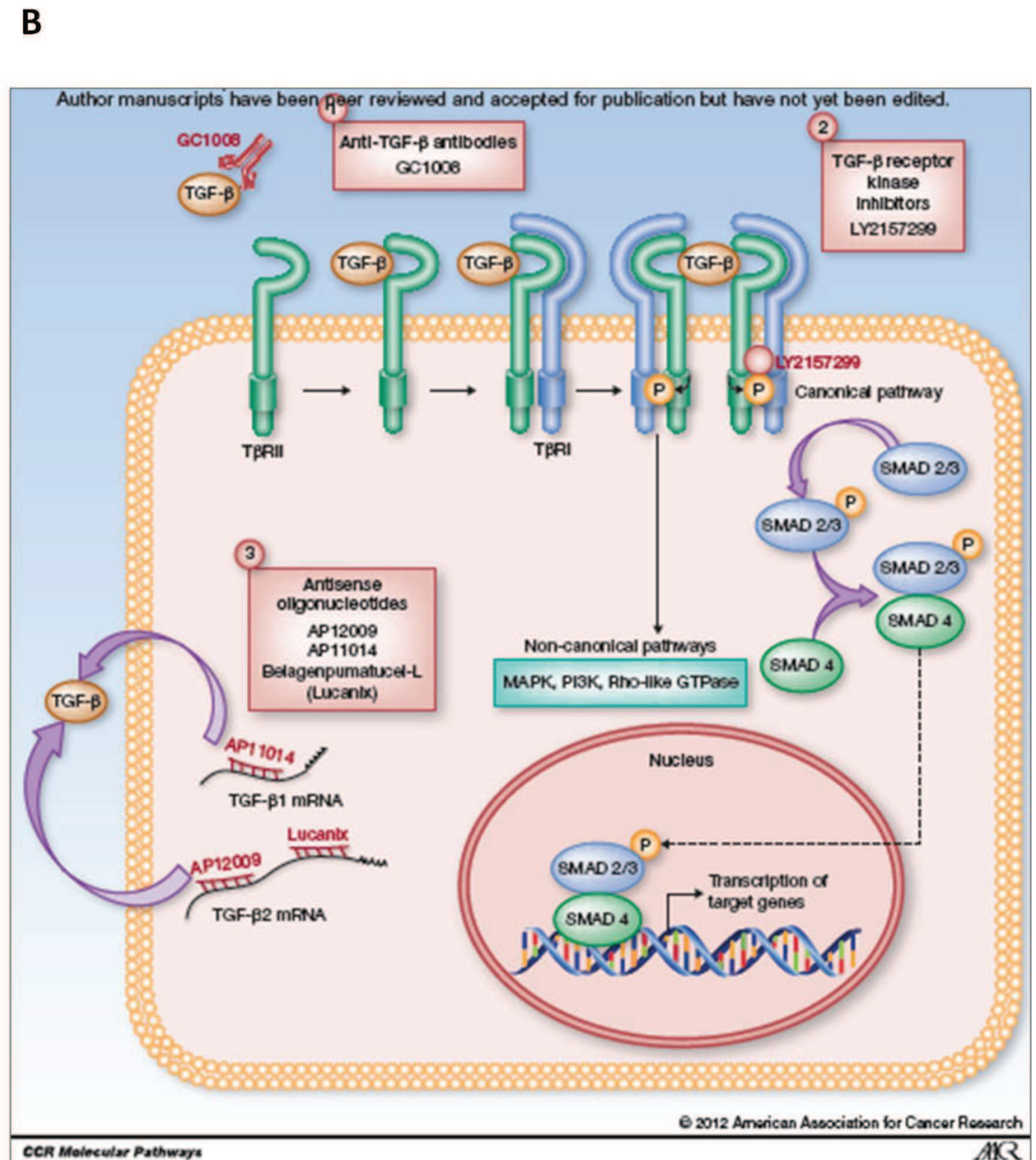
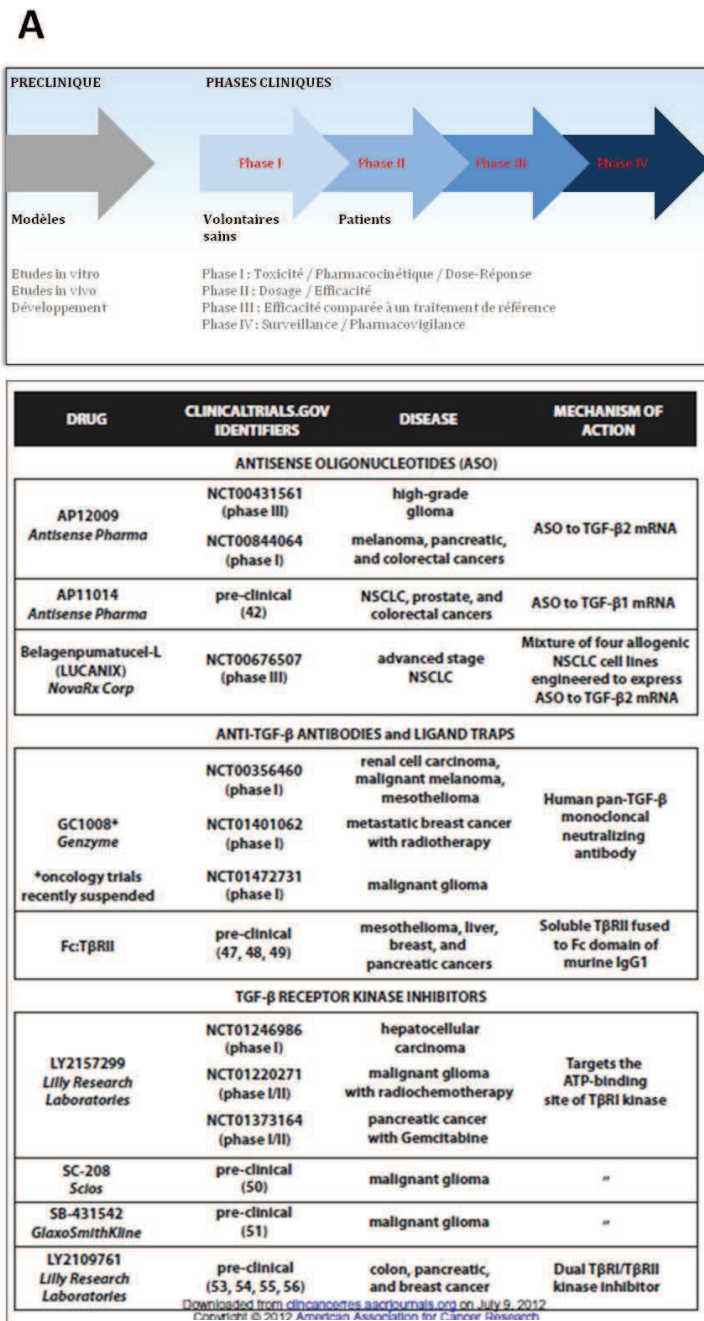


Figure 20 Essais Cliniques impliquant des Inhibiteurs de la voie du TGF β . A- Récapitulatif des phases de développement d'un médicament et des inhibiteurs de la voie du TGF β inclus dans des essais cliniques. B- Mode d'action des inhibiteurs de la voie du TGF β . (d'après Smith et al., 2012)

i) l'inhibition de l'activité kinase des récepteurs au TGF β et, iii) l'inhibition de la synthèse de TGF β par l'utilisation d'ARNm antisens spécifique (**Figure 20B**).

De part les effets pléiotropes du TGF β , une toxicité de ces inhibiteurs pouvait être attendue. Cependant, il semble que ces inhibiteurs soient bien tolérés. En effet, il a été montré que des souris exprimant de façon constitutive un récepteur soluble contenant la partie extracellulaire du récepteur T β RII (SRF2), ne développaient pas de pathologie particulière y compris après 10 mois de surveillance (Yang et al., 2002). Cette observation a été confirmée chez l'Homme où peu d'effets secondaires ont été rapportés pour d'autres inhibiteurs du TGF β (Hau et al., 2007; Nemunaitis et al., 2009).

L'effet de ces inhibiteurs sur la survenue des métastases a tout d'abord été démontré chez l'animal. Il a été montré, par exemple, que l'expression d'un récepteur soluble SRF2 diminuait significativement l'incidence des métastases hépatiques dans un modèle murin de cancer du sein (Yang et al., 2002). Une autre étude préclinique a démontré qu'un inhibiteur du domaine kinase du récepteur T β RI, le SD-208, pouvait ralentir le développement et la progression des métastases osseuses dans le mélanome (Mohammad et al., 2011). Ces 2 molécules n'ont pas encore été incluses dans des essais cliniques chez l'homme. Deux autres molécules sont actuellement en essai clinique de phase III. Tout d'abord, il a été montré que l'inhibition, par une stratégie antisens, de l'ARNm du TGF β 2, l'AP12009, diminuait la prolifération de lignées cellulaires cancéreuses dérivées de gliomes, d'adénocarcinomes pancréatiques et de mélanomes, cancers surexprimant cette isoforme du TGF β (Schlingensiepen et al., 2006). D'autres essais cliniques de phase II ont démontré que l'AP12009 prolongeait la survie de patients atteints de gliomes (Schlingensiepen et al., 2006; Hau et al., 2007). Un essai de phase III est actuellement en cours chez des patients atteints de glioblastome (NCT00761280, clinicaltrial.gov). Une autre molécule antisens, le LucanixTM, ciblant toutes les isoformes du TGF β , a démontré une efficacité chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) (Nemunaitis et al., 2009) et est actuellement incluse dans un essai clinique de phase III chez des patients atteints de cette même pathologie (NCT00676507, clinicaltrial.gov).

II.4.2 Enjeu thérapeutique

Compte-tenu des résultats des essais cliniques, l'inhibition de la voie du TGF β apparaît comme une stratégie prometteuse. Cependant, comme nous l'avons décrit précédemment, le TGF β est également à la base de programmes suppresseurs de tumeur. L'inhibition de la voie du TGF β pourrait donc inhiber l'apparition de métastases mais également permettre à d'autres lésions moins avancées, de progresser.

Cette hypothèse est notamment confortée par les modèles murins de cancer du sein. Une étude de Siegel et collaborateurs a notamment montré que l'expression d'un récepteur T β RI constitutivement activé (T β RI^{CA}) dans ces tumeurs ralentissait la croissance tumorale au site primaire mais accélérail le développement des métastases. La même étude a montré que chez les souris surexprimant une forme dominante-négative du récepteur T β RII, le caractère métastatique était moindre mais les tumeurs primaires apparaissaient plus rapidement (Siegel et al., 2003). Il a été décrit à ce jour 3 cas de patients ayant présenté des complications suite au traitement avec la molécule « anti-TGF β ». Par exemple, l'injection de l'inhibiteur AP12009 chez des patients atteints de gliome, a été associée au développement d'un œdème cérébral chez 2 patients (Hau et al., 2007). D'autre part, le traitement de patients atteints de mélanome avec un anticorps monoclonal anti-TGF β , le GC1008, a été associé chez un patient au développement d'un carcinome à cellule squameuse. Ce patient présentait néanmoins une prédisposition aux cancers de la peau (Hau et al., 2009). Il n'est cependant pas possible de déterminer si ces complications sont liées à une toxicité de la molécule ou à un effet de l'inhibition de la voie du TGF β chez ces patients. Les résultats des essais cliniques réalisés avec des molécules visant à bloquer les effets du TGF β devraient permettre de confirmer ou non ces observations.

L'enjeu des futures stratégies thérapeutiques sera 1) de définir des groupes de patients particulièrement sensibles à ces thérapies et/ou 2) d'écarter d'autres groupes pour qui ces thérapies peuvent être délétères. Pour cela, il apparaît nécessaire d'identifier des marqueurs prédictifs de la réponse à ces traitements.

Un de ces marqueurs pourrait être le statut d'expression de SMAD4, un acteur central des programmes suppresseurs de tumeurs du TGF β . Dans le cancer du pancréas, les patients ayant perdu l'expression de SMAD4 (50% des cas) développent plus de métastases que les autres patients (Iacobuzio-Donahue et al., 2009a). Il a été également montré récemment que

la perte de SMAD4 augmentait la sensibilité des cellules cancéreuses pancréatiques aux chimiothérapies (Cui et al., 2012). De la même façon, il serait particulièrement intéressant de tester si la perte de SMAD4 améliore la sensibilité des patients aux thérapies anti-TGF β .

D'autres approches, plus globales, ont essayé de définir une signature moléculaire qui serait associée à l'activité « TGF β » de la tumeur. Ce type de profil a notamment été réalisé par le groupe de Joan Massagué sur la réponse de cellules épithéliales au TGF β . Cette signature, basée sur l'expression de 153 gènes, permet de classer des cellules selon leur niveau d'activation de la voie du TGF β . Dans cette même étude, des tumeurs mammaires ont été classées en fonction de l'expression de ces 153 gènes. Il a été alors possible d'identifier un sous-groupe de tumeur du sein (négative pour le récepteur à l'œstrogène) où l'activité TGF β est associée à la survenue de métastases pulmonaires (Padua et al., 2008). Enfin, une autre étude a analysé le profil transcriptionnel de tumeurs du col de l'utérus, et a révélé qu'une activation de la voie du TGF β était associée à l'absence de métastases ganglionnaires (Noordhuis et al., 2011). En conclusion, la définition de signatures moléculaires spécifiques du TGF β , propre à chaque type de cancer, devrait permettre de sélectionner des groupes de patients pour lesquelles les traitements anti-TGF β seront efficaces.

Après cette introduction du rôle de la voie du TGF β dans le cancer, nous allons nous intéresser plus particulièrement à un cancer très agressif : l'adénocarcinome du pancréas. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement efficace contre cette pathologie. De nombreux espoirs se portent sur la caractérisation moléculaire des gènes participant à l'initiation et la progression tumorale. Comme nous allons le voir, la voie du TGF β est systématiquement altérée dans ce type de cancer, ce qui en fait un candidat potentiellement intéressant.

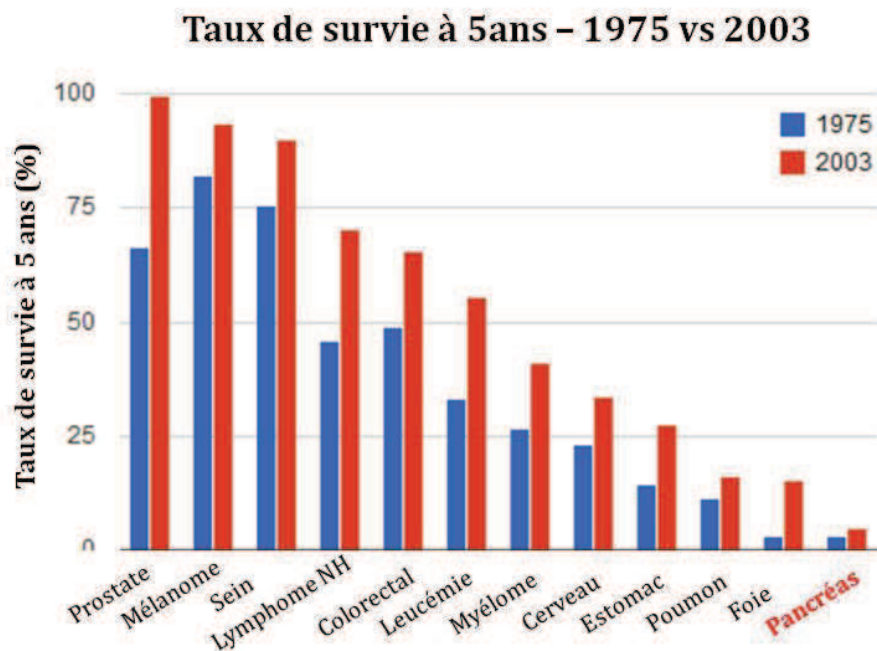


Figure 21 Evolution du taux de survie à cinq ans de différents cancers entre 1975 et 2003. (adapté d'après <http://seer.cancer.gov/>)

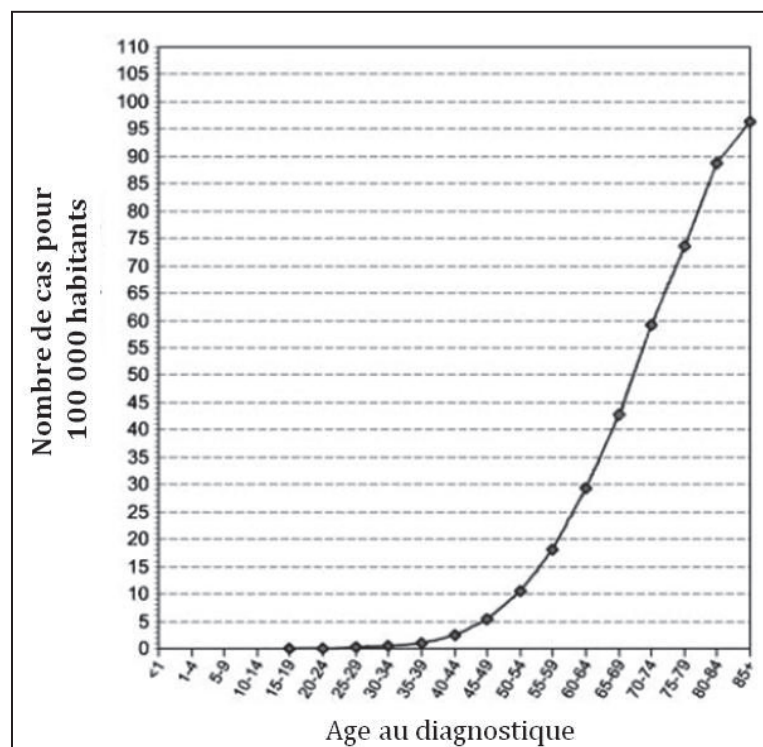


Figure 22 Incidence du nombre de cas de cancer du pancréas en fonction de l'âge du patient. (adapté d'après Olson and Kurtz, 2012)

Chapitre 2 L'Adénocarcinome du Pancréas

I Le Cancer du Pancréas

I.1 Etat des lieux

I.1.1 Quelques chiffres

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer est la première cause de décès dans le monde avec 7,6 millions de décès en 2008 (représentant 13% des décès dans le monde). Parmi les formes les plus fréquentes, on retrouve les cancers du poumon, de l'estomac, du foie, du sein et colorectaux. Selon les estimations de l'OMS, le nombre de décès par cancer devrait augmenter pour atteindre 13.1 millions de décès en 2030.

Avec près de 280 000 nouveaux cas par an dans le monde (dont plus de 7000 pour la France métropolitaine), le cancer du pancréas est la 5ème cause de mortalité par cancer dans les pays développés, bien qu'il ne représente que 2% de tous les cancers (globocan.iarc.fr). Ceci peut s'expliquer par un taux de survie à 5 ans, après le diagnostic, de seulement 6%, ce qui le place parmi les cancers les plus agressifs (Siegel et al., 2012) (**Figure 21**). Le cancer du pancréas concerne principalement les personnes de plus de 65 ans (80% des cas). Avec le vieillissement global de la population mondiale, l'incidence de ce cancer va inexorablement augmenter au cours des prochaines décennies. Le cancer du pancréas constitue un réel problème de santé publique. Pour comparaison on dénombrait en 2011, en France, autant de décès dus au cancer du pancréas que dus aux accidents de la route (3970 tués). Enfin, selon l'AACR, (American Association for Cancer Research) le cancer du pancréas pourrait représenter la première cause de mortalité par cancer dans 20 ou 30 ans.

I.1.2 Facteurs de risque

Selon les données Globocan 2008 (globocan.iarc.fr), la probabilité qu'une personne développe un cancer au cours de sa vie est de 18%, et celle de développer un cancer pancréatique est de 0,44% (Globocan 2008). Ce risque est fortement lié à l'âge du patient. **L'âge** apparaît comme le premier facteur de risque du cancer du pancréas avec un nombre de cas augmentant drastiquement dès 60 ans (**Figure 22**). Le genre du patient n'apparaît pas

Syndrômes	Gène	Risque Relatif	Risque cumulé à 70 ans	Autres Cancers ?
-	-	1	0,5%	-
Cancer du Sein	BRCA2	3x - 10x	1,5%	Sein, Ovaires et Prostate
	BRCA1	2x	1%	Sein, Ovaires et Prostate
FAMMM	CDKN2A/INK4A (p16 ^{INK4})	20x	10%	Mélanome
Cancer du Pancréas Familial (3 apparentés 1 ^{er} degré)	inconnu	32x	16%	inconnu
Pancréatite Chronique héréditaire	PRSS1	50x	25%	non
Peutz-Jeghers	LKB1/STK11	132x	66%	Gastrointestinaux, Colon, Sein,...
HNPCC (Lynch)	bMLH1, bMSH2, autres	9x	4,5%	Colon, Endometre, Estomac, Rein,...

Table 1 Syndromes d'origine génétique prédisposant au Cancer du Pancréas. FAMM (Familial Atypical Multiple Mole-Melanoma), HNPCC (Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer). (adapté d'après Maitra and Hruban, 2008)

comme un facteur prépondérant de prédisposition (ratio homme/femme de 1,1 :1). Parmi les comportements à risque, le **tabagisme**, augmentant de deux fois le risque de développer un cancer pancréatique (Bosetti et al., 2011) ainsi que l'**alcoolisme** (Tramacere et al., 2010). Ce dernier représente la première cause de pancréatite chronique, une inflammation du pancréas, reconnue comme un facteur prédisposant au cancer du pancréas (Whitcomb, 2004) (Lowenfels et al., 1993). Parmi les autres facteurs de risque, l'obésité, le diabète de type II et l'exposition à certains produits chimiques comme les pesticides (Olson and Kurtz, 2012) sont également retrouvés. Enfin, bien que débattu pendant de nombreuses années, le risque lié à la consommation de café a été définitivement écarté (Turati et al., 2012).

D'autres facteurs, d'origine **génétique**, augmentent le risque de développer un cancer pancréatique (**Table 1**).

On estime qu'environ 5 à 10% des cancers pancréatiques présentent une **histoire familiale**. La présence d'un apparenté de premier degré (père, mère, frère, sœur) ayant développé un cancer du pancréas double le risque, par rapport à la population générale, de développer ce type de cancer. Ce risque augmente drastiquement avec l'augmentation du nombre d'apparentés affectés. Bien que les bases génétiques à l'origine de ces formes familiales soient encore méconnues, près d'un tiers des formes familiales, affectant au moins deux apparentés, serait imputables à des mutations germinales de *BRCA2* (Klein, 2004).

Parmi les syndromes prédisposant au cancer du pancréas, le **syndrome de Peutz-Jeghers** est associé à des mutations du gène codant la kinase LKB1/STK11. Cette kinase, à activité sérine/thréonine, est impliquée dans la régulation de la réponse cellulaire au stress et dans le maintien de la polarité cellulaire (Katajisto et al., 2007). Les patients atteints du syndrome de Peutz-Jeghers peuvent développer de nombreux cancers (plus de 54 types différents ont été décrits) dont la majorité concerne le tractus gastrointestinal. Le risque de ces patients de développer un cancer du pancréas est **132 fois** supérieur à celui de la population générale (Giardiello et al., 2000; Lim et al., 2004).

Les personnes atteintes de **formes héréditaires de pancréatite chronique** représentent également une population à risque. Ces patients présentent des mutations au niveau du gène PRSS1 codant le trypsinogène cationique, un précurseur inactif d'une enzyme protéolytique produite par les cellules pancréatiques, la trypsine. Une mutation dans le gène codant cette protéine entraîne son auto-activation, la digestion du tissu pancréatique et l'établissement

d'une inflammation du pancréas (pancréatite) (Archer et al., 2006). Ces individus développent des épisodes chroniques d'inflammation du pancréas augmentant de **50 fois** leur risque de développer un cancer du pancréas par rapport à la population générale (Rosendahl et al., 2007).

D'autre part, le **syndrome FAMMM** (Familial Atypical Multiple Mole-Melanoma) a pour origine une délétion du gène *CDKN2A/INK4A* codant l'inhibiteur de CDK, p16^{INK4A}. Ce syndrome représente 20% des formes familiales de mélanome. Les patients atteints de ce syndrome ont un risque **20 fois** plus élevé de développer un cancer pancréatique (Bartsch et al., 2002).

Le **syndrome de Lynch** ou syndrome HNPCC (Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer) prédispose à de multiples cancers du tractus digestif, en particulier du colon et du rectum. Des mutations au niveau de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (*hMLH1*, *hMSH2*, *hPMS1*, *hPMS2* et *hMSH6/GTBP*) sont à l'origine de ce syndrome. Le risque relatif de développer un cancer du pancréas est **9 fois** supérieur pour les patients atteints de HNPCC comparé à la population générale (Kastrinos et al., 2009).

Enfin, plus de la moitié des **formes familiales de cancer du sein et des ovaires** ont pour origine des mutations germinales des gènes BRCA1 et BRCA2. Les protéines BRCA1 et BRCA2 sont des acteurs très importants de la réparation de l'ADN. Des mutations de BRCA2, et non BRCA1, semblent augmenter de plus de **3 fois** le risque de développer un cancer pancréatique (Levy-Lahad and Friedman, 2007).

I.1.3 Facteurs diagnostiques

Les patients atteints de cancer du pancréas présentent un taux de survie à 5 ans d'environ 6%. Un des facteurs contribuant à ce fort taux de mortalité est la détection très tardive de la maladie : au moment du diagnostic, 40% des patients ont déjà développé des lésions localement avancées s'étendant aux organes adjacents (estomac, rate) et 40% présentent des lésions métastatiques (foie, poumon, péritoine,...) progressant rapidement. Ce diagnostic très tardif est associé, à la fois, à l'absence de signes cliniques clairement évocateurs, et à un manque de tests diagnostiques permettant de détecter précocement la maladie.

1.1.3a Les signes cliniques

Les signes cliniques d'un cancer du pancréas sont **peu évocateurs**. Les symptômes les plus fréquents sont des douleurs abdominales, dorsales (dues à la compression des nerfs rachidiens), une perte de poids, une fatigue et/ou une perte d'appétit. Les patients peuvent également présenter une compression des voies biliaires (ictère ou jaunisse) ou digestive (occlusion intestinale) ou encore une douleur au niveau du plexus solaire (réseau de nerfs situé entre le sternum et le nombril). La recherche d'une tumeur peut également faire suite à l'apparition ou à l'aggravation d'un diabète. Des perturbations hépatiques et/ou glycémiques peuvent être associées à un développement tumoral mais sont peu spécifiques. Enfin, au niveau biologique, aucun marqueur spécifique n'a été mis en évidence.

1.1.3b Les examens diagnostiques

Parmi les examens amenant au diagnostic, **l'échographie** est souvent celui de première intention. Cependant, les petites tumeurs sont difficilement détectables par cette technique. Un autre examen de référence est le **scanner** ou tomographie. Cette technique, basée sur les rayons X, reconstitue une image anatomique de haute résolution permettant de détecter des tumeurs pancréatiques dont le diamètre est supérieur à 1,5 cm. Couplée à la TEP (Tomographie par Emission de Positons, PET en anglais), le scanner (ou **PET-Scan**), permet également d'évaluer si les organes adjacents ou distants sont atteints. Une image de plus haute résolution peut être obtenue par **IRM** (imagerie par résonance magnétique) afin de repérer des lésions métastatiques de petites tailles. Ces examens d'imagerie peuvent être complétés par des techniques plus invasives comme la **biopsie à l'aiguille fine sous échographie** qui permet de prélever, à l'intérieur de la masse suspecte, quelques millions de cellules par aspiration. Une analyse histopathologique de ces cellules (morphologie, expression de marqueurs tumoraux), permet alors de poser ou de confirmer le diagnostic final dans 80% des cas.

I.1.4 Facteurs pronostiques

Plusieurs éléments permettent de prédire la manière dont la tumeur va évoluer et d'adapter le traitement thérapeutique. Le premier facteur pronostic est le **caractère opérable**

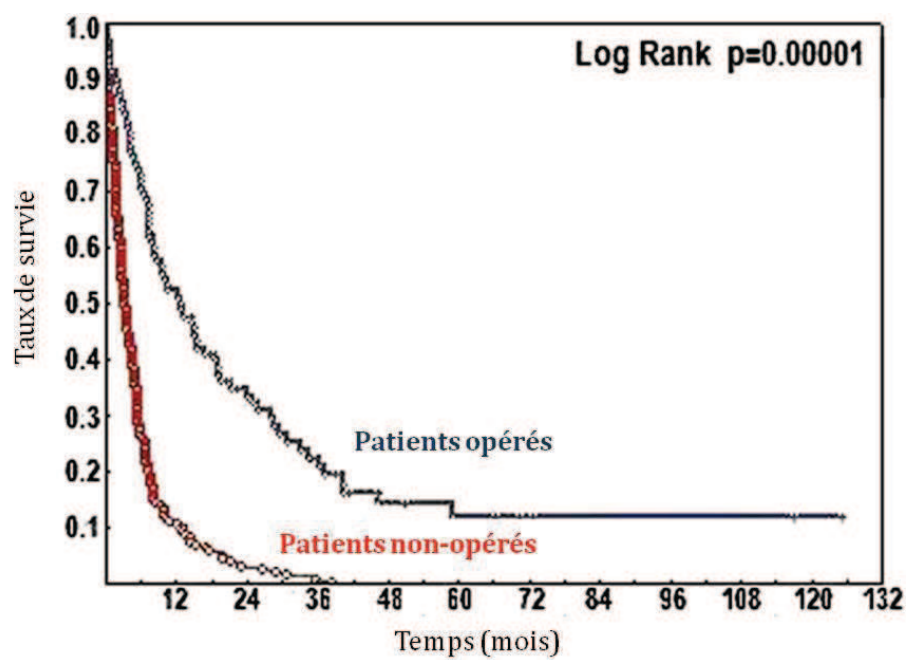


Figure 23 Courbes de survie de patients atteints de PDAC et ayant subi ou non une résection chirurgicale. (adapté d'après Hoem and Viste, 2012)

des tumeurs. Dans plus de 80% des cas, le geste chirurgical reste écarté, les patients présentant déjà des lésions localement avancées ou métastatiques. La résection des formes locales (20% des patients) permet d'augmenter le taux de survie à 5 ans, de 6% à plus de 20% (**Figure 23**) (Hoem and Viste, 2012).

Environ 80% des patients diagnostiqués pour un cancer du pancréas sont âgés de plus de 65 ans. Cependant ni l'âge, ni le genre ne semblent avoir un impact sur la survie des patients (Garcea et al., 2008). D'autres facteurs pronostiques sont **liés à la tumeur** elle-même. Par exemple, un meilleur pronostic est associé aux tumeurs dont la taille est inférieure à 2 cm. De plus l'état de différenciation de la tumeur entrerait également en jeu : les tumeurs dédifférenciées (c.a.d ayant perdu leurs caractéristiques épithéliales) sont associées à un plus mauvais pronostic que les tumeurs différenciées (Garcea et al., 2008; Lim et al., 2003). Concernant la localisation de la tumeur, la disparité des études et des méthodes utilisées ne permet pas, pour l'instant, de considérer ce paramètre comme un facteur pronostique (Neuzillet et al., 2011).

I.2 Anatomie et Histologie

I.2.1 Anatomie du Pancréas

Le pancréas est un organe situé profondément au niveau de l'abdomen, en arrière de l'estomac. Cette glande, d'environ 15 cm de long chez l'homme, peut être divisée en trois régions anatomiques, la tête, le corps et la queue, s'étendant de la rate jusqu'au duodénum. Le pancréas est un organe glandulaire double, participant à deux processus physiologiques majeurs : la digestion et le métabolisme du glucose. Ces fonctions sont assurées par 2 unités fonctionnelles distinctes, le pancréas exocrine et le pancréas endocrine (**Figure 24**).

Le pancréas exocrine, qui représente en volume plus de 90% de l'organe, est composé de deux types cellulaires : les cellules acineuses et les cellules canalaire. Les **cellules acineuses** sont des cellules épithéliales organisées en acinus. Ces cellules sont spécialisées dans l'élaboration des enzymes pancréatiques (chymotrypsine, élastase,...) qui seront sécrétées dans la lumière de l'acinus. L'ensemble des acini forme des « grappes » sécrétant les enzymes pancréatiques dans les canaux collecteurs exocrines. Ces canaux sont composés d'une monocouche de cellules épithéliales, les **cellules canalaire**. Ces cellules ont

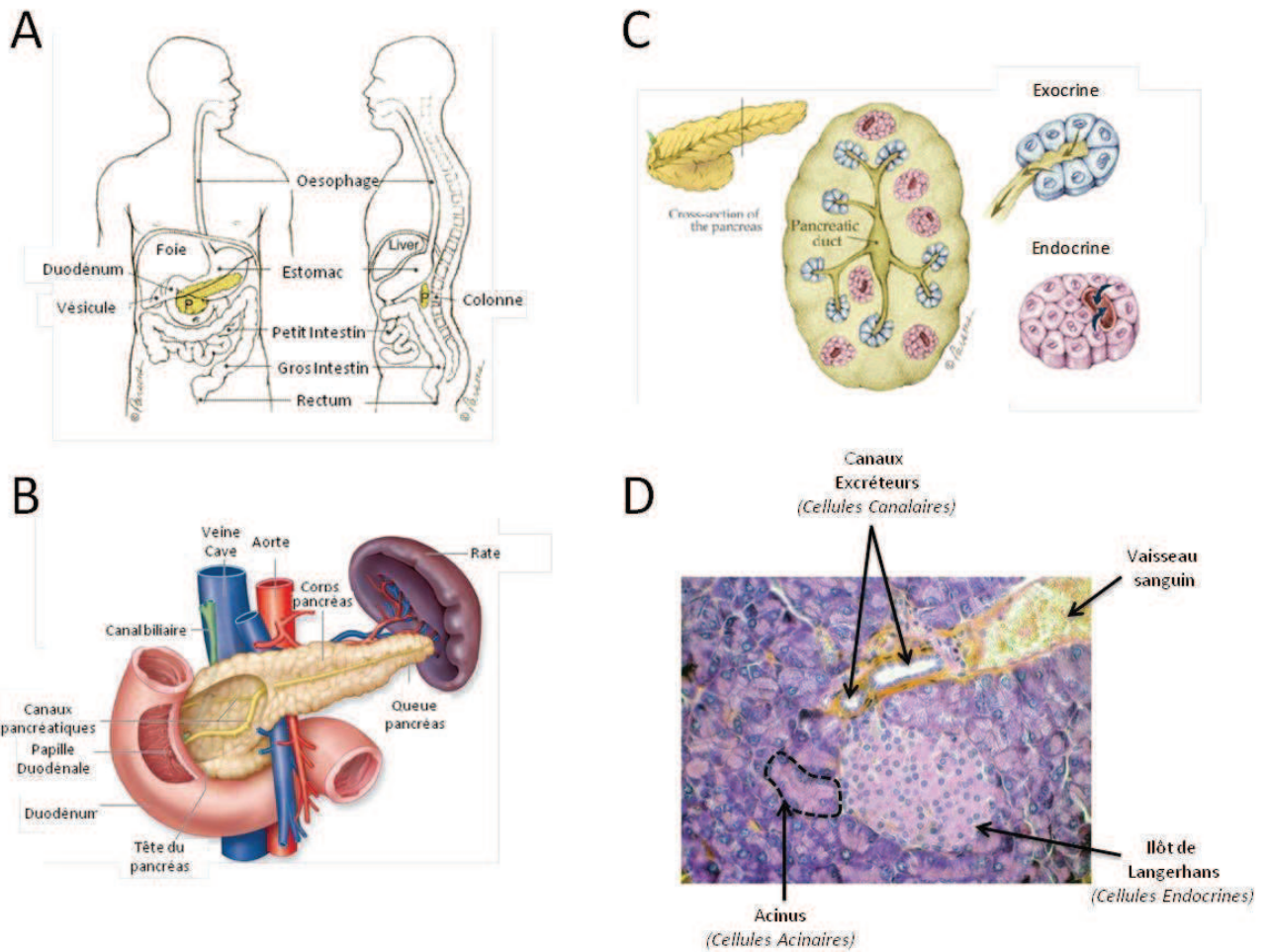


Figure 24 Le pancréas, une glande mixte participant à la digestion et au métabolisme glucidique. A) Localisation anatomique du pancréas (d'après <http://www.path.jhu.edu/pancreas>). B) Anatomie du pancréas et des organes adjacents (d'après <http://academic.kellogg.cc.mi.us>). C) Représentation schématique des deux unités fonctionnelles distinctes composant le pancréas : une partie exocrine (sécrétion des enzymes pancréatiques dans le duodénum) et une partie endocrine (sécrétion des hormones de l'homéostasie glucidique dans les vaisseaux sanguins) (d'après <http://pathology.jhu.edu/pancreas>). D) Coupe histologique d'un pancréas de souris (coloration HPS), Grossissement x100.

pour fonction de collecter et faciliter le transport des enzymes au travers des différents canaux exocrines. Les enzymes sont alors collectées au niveau du canal pancréatique principal ou canal de Wirsung, qui se déverse ensuite dans le canal cholédoque (venant du foie et de la vésicule biliaire) pour s'aboucher, *via* l'ampoule de Vater, au niveau du duodénum.

Le pancréas endocrine est composé d'un ensemble de cellules regroupées au sein de structures spécialisées, les îlots de Langerhans. Ces îlots, dispersés au sein du pancréas exocrine, sont constitués de 4 types cellulaires impliqués dans la sécrétion d'hormones dans la circulation sanguine. Les cellules α et β régulent le métabolisme du glucose grâce à la production de glucagon et d'insuline respectivement. Le polypeptide pancréatique (PPY) et la somatostatine produits par les cellules PP et les cellules δ modulent les propriétés sécrétoires des autres types cellulaires présents dans le pancréas.

I.2.2 Développement du pancréas

La morphogenèse du pancréas ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués sont très conservés chez les Vertébrés. Les études d'invalidation génique chez la souris ont permis de mieux comprendre le programme génétique mis en place lors du développement du pancréas (Jørgensen et al., 2007). Par conséquent, l'essentiel de ce paragraphe se focalisera sur le développement du pancréas chez la souris.

La morphogenèse du pancréas peut être résumée en trois grandes étapes. La première étape implique le développement de bourgeons issus de l'endoderme et contenant des progéniteurs pancréatiques multipotents. La deuxième étape est une phase de différenciation où vont être générées les cellules progénitrices des lignages endocrine(s) et exocrine(s). Enfin, la troisième étape est la migration finale des cellules endocrines jusqu'à leur rassemblement en îlot, pour former les structures décrites par Langerhans.

La différenciation des progéniteurs pancréatiques multipotents met en jeu un ensemble de facteurs de transcription intervenant de manière séquentielle (**Figure 25**). Les facteurs de transcription **Pdx1** (Pancreatic duodenal homobox 1) et **Ptf1a/p48** (Pancreas-specific transcription factor 1a subunit/p48) sont deux protéines essentielles à la morphogenèse du pancréas. Le facteur Pdx1 est exprimé consécutivement à la répression de la voie Sonic

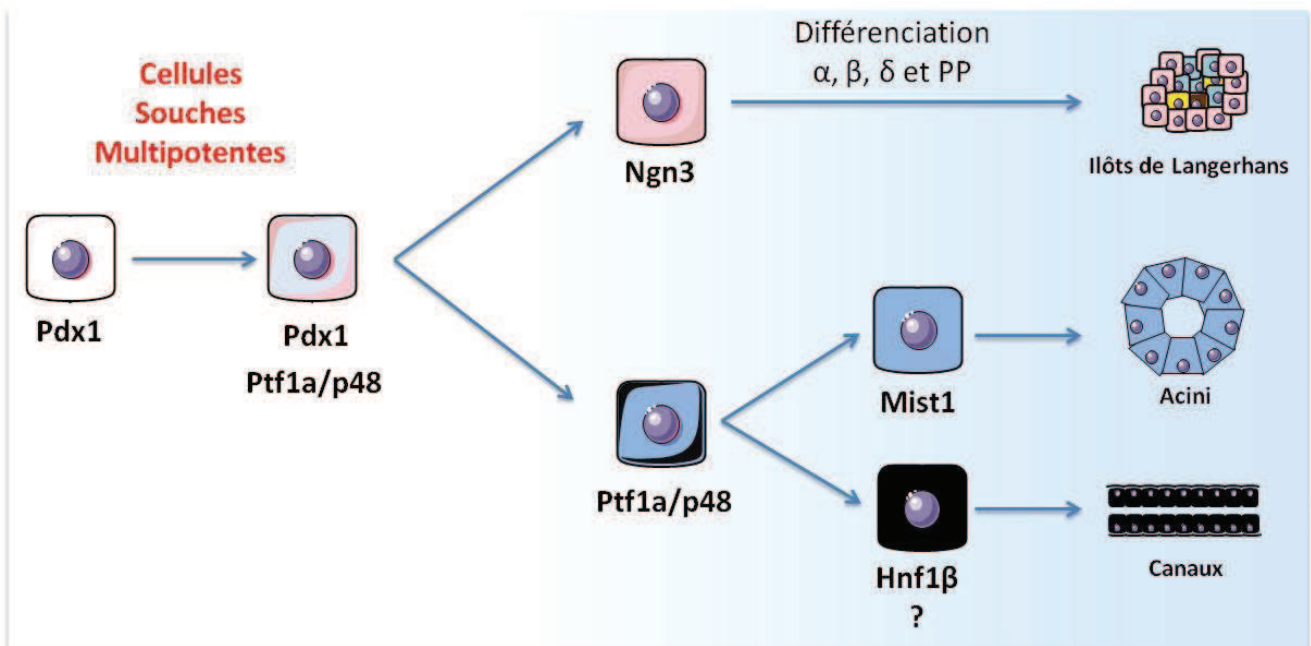


Figure 25 Représentation Schématique de la Différenciation des Populations Pancréatiques au cours de l'Embryogenèse. (modifié d'après Hruban et al., 2006) Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

hedgehog (Shh) au niveau de l'endoderme par des signaux provenant du mésoderme adjacent. L'activation de ce facteur est essentielle à la formation du pancréas comme le démontre l'agénèse complète de pancréas observée à la fois chez l'Homme et la souris, présentant des mutations homozygotes de Pdx1 (Stoffers et al., 1997; Jonsson et al., 1994). Pdx1 est exprimé à la fois dans les cellules progénitrices pancréatiques mais également dans le duodénum, le canal biliaire et la partie postérieure de l'estomac. Le facteur de transcription Ptf1a ou p48, est exprimé dans les mêmes progéniteurs multipotents que Pdx1, mais également dans le cerveau (Obata et al., 2001). Bien que la délétion de Ptf1a entraîne également une agénèse du pancréas, la génération des premiers bourgeons n'est pas affectée (Kawaguchi et al., 2002). Ceci suggère que l'expression de Ptf1a n'est pas nécessaire à la formation du premier pool de progéniteurs. **Les cellules exprimant Pdx1 et Ptf1a représentent donc une population de cellules souches multipotentes à partir desquelles vont être générés les lignages endocrines et exocrines.** Chez l'adulte, l'expression des facteurs Pdx1 et Ptf1a est maintenue dans les cellules β et acineuses respectivement (Jonsson et al., 1994; Rose et al., 2001).

Au cours de la différenciation, différents facteurs de transcription participent à l'établissement du **lignage exocrine** parmi lesquels Ptf1a, dont l'expression est maintenue, mais également Mist1 (Muscle, Intestine and Stomach expression 1) et Hfn1 β (Hepatocyte Nuclear Factor 1 β). **Mist1** est un facteur de transcription impliqué dans l'établissement du lignage des cellules acineuses (Lemerrier et al., 1997). Le gène codant Mist1 est exprimé au niveau des cellules acineuses du pancréas mais également au niveau des glandes salivaires et des cellules sécrétrices présentes dans l'estomac et la prostate (Pin et al., 2001). Des données récentes démontrent que l'expression de Mist1 permet à la fois une maturation complète des cellules acineuses et le maintien de leur fonction chez l'adulte (Direnzo et al., 2012). Les facteurs de transcription contrôlant le développement du lignage canalaire sont méconnus. L'expression du facteur de transcription **Hfn1 β** (également appelé Tcf2) semble être restreinte aux progéniteurs exocrines (Solar et al., 2009), et son inactivation chez la souris entraîne des défauts sévères du développement du pancréas (Haumaitre et al., 2005). Bien que son expression soit maintenue dans les cellules canalaire adultes, sa fonction reste inconnue.

Enfin, un facteur essentiel dans la **différenciation des cellules endocrines** est la protéine **Ngn3** (Neurogénine 3). Celle-ci est exprimée spécifiquement dans les progéniteurs

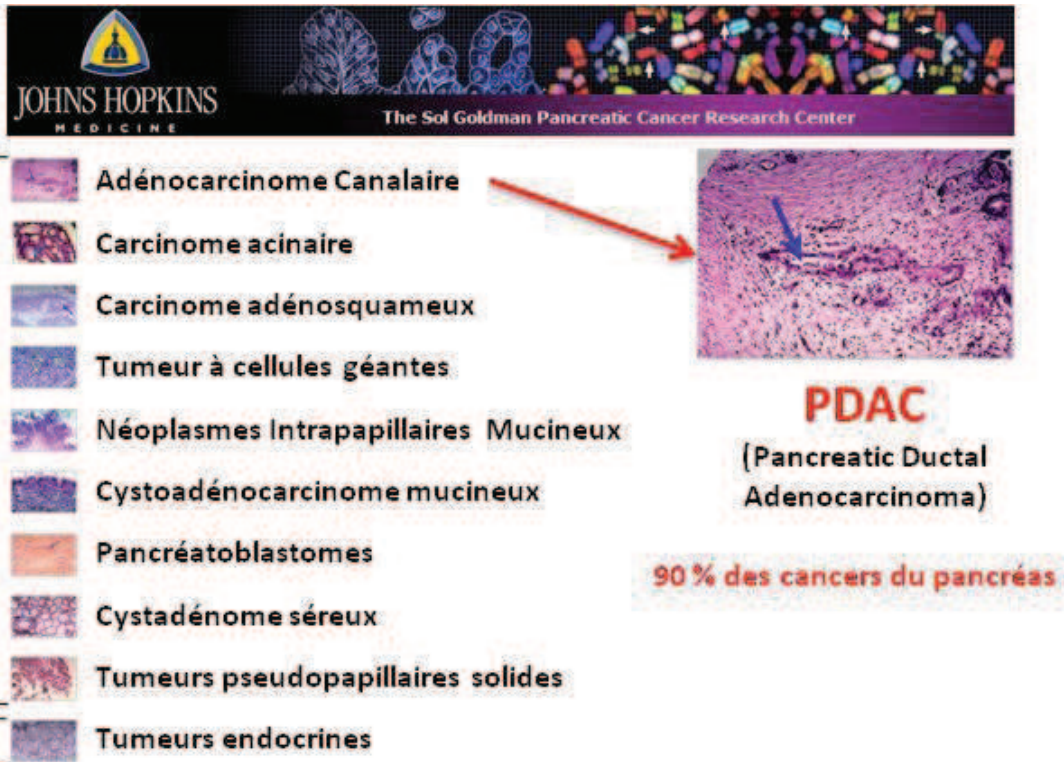


Figure 26 Les différents types de tumeurs pancréatiques. L'adénocarcinome intracanalair représente la grande majorité des cancers du pancréas. Il se développe à partir des cellules épithéliales des canaux pancréatiques. (adapté d'après <http://www.path.jhu.edu/pancreas>)

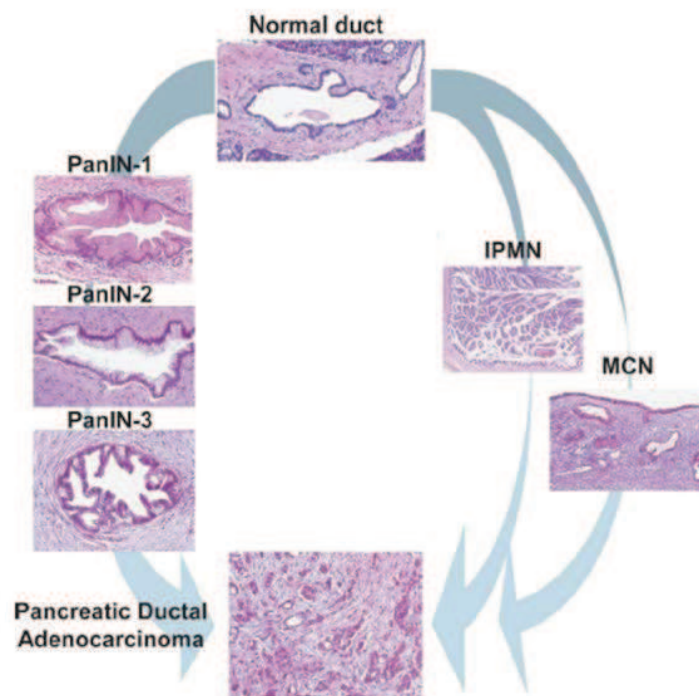


Figure 27 Néoplasies Epithéliales du pancréas et PDAC.

(d'après Hezel et al., 2006)

pancréatiques endocrines (Gu et al., 2002), expliquant l'absence complète de compartiment endocrine dans les souris déficientes en Ngn3 (Gradwohl et al., 2000). Les progéniteurs Ngn3-positifs sont capables de se différencier en cellules α , β , δ et PP (Rukstalis and Habener, 2009). De façon intéressante, le compartiment canalaire semble conserver une certaine plasticité chez l'adulte, permettant la régénération de cellules endocrines suite à un stress pancréatique : une étude a démontré que des cellules endocrines pouvaient être générées, lors d'un stress pancréatique, grâce à l'activation de Ngn3 dans les cellules canalaire (Xu et al., 2008). Cette plasticité semble également concerner les cellules acineuses : une publication dans *Nature* a démontré que l'expression, entre autres, des facteurs de transcription Ngn3 et Pdx1 permettait la différenciation des cellules exocrines adultes en cellules endocrines de type cellule β (Zhou et al., 2008).

En conclusion, les cellules épithéliales du pancréas sont issues de la différenciation, de progéniteurs communs au cours de l'embryogenèse. Chez l'adulte, il semble exister une certaine plasticité entre les différents types cellulaires du pancréas.

I.2.3 Les différents types de tumeurs du pancréas

Différents types de tumeurs peuvent se développer au niveau du pancréas (**Figure 26**). La grande majorité de ces tumeurs (plus de 90%) sont des tumeurs de type exocrine. L'adénocarcinome canalaire du pancréas ou PDAC (Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma) se caractérise par la présence de cellules tumorales ayant une différenciation canalaire, et représente la grande majorité des tumeurs exocrines. Par conséquent le PDAC est communément désigné sous le terme « cancer du pancréas ».

I.2.4 La Classification des néoplasies épithéliales pancréatiques

I.2.4a Historique

L'examen d'échantillons de tumeurs a rapidement suggéré que le PDAC se développait à partir de lésions épithéliales précancéreuses ayant une différenciation épithéliale canalaire. Des lésions pancréatiques de différents grades sont décrites depuis plus de 50 ans (Sommers et al., 1954) mais, jusqu'en 1999, aucune nomenclature n'avait été mise en place pour décrire ses lésions. Un premier consortium eu lieu en 1999 à Park City (UT,

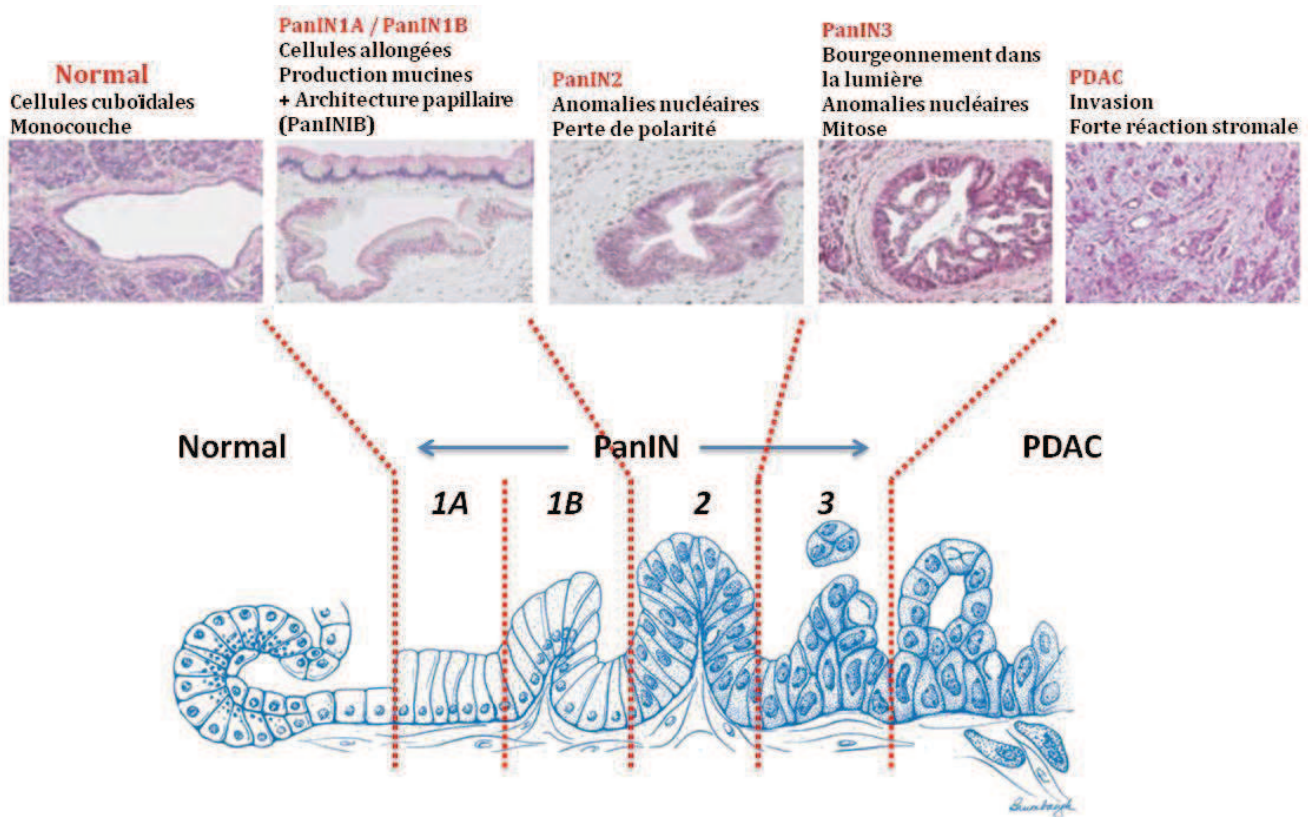


Figure 28 **Modèle de progression des lésions PanIN.** Les cellules du canal exocrine, initialement de morphologie cuboïdale et ne formant qu'une seule couche, vont s'allonger suite à une production importante de mucus (stade PanIN1A). Ce changement de forme des cellules peut éventuellement déformer le canal existant et former des papilles (stade PanIN1B). Au cours de la tumorigenèse, la prolifération des cellules entraîne la formation de papilles. De plus le noyau des cellules s'élargit et n'est plus localisé au pôle baso-latéral (stade PanIN2). Dans les derniers stades, il y a une perte totale de la polarité cellulaire et de nombreuses anomalies nucléaires sont observées (macronoyaux, mitoses anormales,...). Enfin, les lésions sont formées de plusieurs couches de cellules (épithélium pluristratifié) mais la lame basale reste, elle, intacte (stade PanIN3 ou carcinome *in situ*). La rupture de la lame basale permet de définir la lésion canalaire en adénocarcinome invasif (PDAC). (Adapté d'après Bardeesy and DePinho, 2002; Vincent et al., 2011)

USA) regroupant 8 pathologistes : Ralph Hruban, N. Volkan Adsay, Jorge Albores-Saavedra, Carolyn Compton, David Klimstra, Günter Klöppel, Daniel Longnecker et G. Johan A. Offerhaus. Suite à ce consortium, les participants ont défini une nouvelle classification des lésions épithéliales pancréatiques, basée sur la terminologie « PanIN » (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia ou Néoplasie IntraEpithéliales Pancréatique) préalablement proposée par Klimstra et Longnecker (Klimstra and Longnecker, 1994). En 2001 puis en 2004, ce consortium de pathologistes publia une définition des lésions pancréatiques en incluant, l'ensemble de lésions potentiellement précurseurs du PDAC (Hruban et al., 2004) (Hruban et al., 2001).

Trois types de lésions précancéreuses pancréatiques sont décrites : les néoplasies intraépithéliales pancréatiques **PanIN** (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia), les lésions intrapapillaires mucineuses **IPMN** (Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm) et les lésions kystiques mucineuses **MCN** (Mucinous Cystic Neoplasm) (**Figure 27**) Ces lésions partagent la propriété de se développer dans les canaux exocrines mais présentent cependant un potentiel malin différent.

1.2.4b PanIN (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia)

Les PanIN représentent le type de lésions le plus fréquent et le mieux défini. On estime que plus de **90% des PDAC sont associés à des lésions de type PanIN** (Recavarren et al., 2011). Ces lésions se développent à partir des canaux exocrines, dont la taille ne dépasse pas 5 mm de diamètre, rendant leur détection impossible par les techniques d'imagerie. Il est possible de distinguer différents sous-groupes de PanIN au cours de la progression tumorale : les PanIN1A, PanIN1B, PanIN2 et PanIN3. Chaque sous-groupe est défini en fonction de leurs caractéristiques histologiques en prenant compte les critères suivants : la forme des cellules composant l'épithélium exocrine, la forme et la position du noyau, le contenu en mucines et la présence de figures histologiques anormales (Hruban et al., 2004) (**Figure 28**).

Alors que des PanIN de bas grade (PanIN1A, PanIN1B) sont fréquemment retrouvées à partir de 50 ans chez le sujet sain (>70%) (Andea et al. 2003), des PanIN de haut grade (PanIN3), dénommées carcinome *in situ*, sont associées majoritairement à des carcinomes invasifs (PDAC) (Sipos et al., 2009).

1.2.4c Les lésions kystiques du pancréas

Les lésions kystiques du pancréas sont considérées comme des lésions bénignes qui sont pour la plupart asymptomatiques. Cependant, la caractérisation histologique des tumeurs pancréatiques a révélé que certaines lésions kystiques, comme les IPMN et les MCN, pouvaient évoluer en PDAC (Matthaei et al., 2011).

Les lésions intrapapillaires mucineuses ou **IPMN** sont moins fréquentes que les PanIN (5-10% des lésions précancéreuses). Les canaux touchés par les IPMN concernent des canaux exocrines dont la taille est supérieure ou égale à 5 mm, facilitant leur détection par les techniques d'imagerie lorsque la taille de la lésion est suffisamment importante (>2cm). Les IPMN sont des lésions sécrétant beaucoup de mucus et présentant des projections papillaires formées de cellules épithéliales canalaire. Comme pour les PanIN, les IPMN sont classées selon leurs caractéristiques cytologiques et architecturales (IPMN de bas grade à haut grade). Un tiers de ces lésions est suspecté de pouvoir évoluer en PDAC. Cependant, le taux de guérison suite à une résection d'IPMN est relativement élevé. En effet, le taux de survie à 5 ans est supérieur à 50%, pouvant atteindre 90% si les IPMN sont détectées à un stade précoce.

Les lésions kystiques mucineuses ou **MCN** définissent le type de lésions précancéreuses le moins fréquent (3%). Contrairement aux IPMN, les lésions MCN sont encapsulées et semblent ne pas communiquer avec le système canalaire. Ces lésions sont composées d'un épithélium riche en mucus associé à un stroma de type ovarien (c'est-à-dire composé de cellules exprimant les récepteurs à la progestérone et aux oestrogènes). Ce dernier critère est suffisant pour poser le diagnostic de MCN. Ces lésions sont également classées selon leurs caractéristiques cytologiques et architecturales (MCN de bas grade à haut grade). Les MCN se développent préférentiellement chez les sujets féminins (ratio 9:1) et un tiers de ces lésions pourraient évoluer en carcinoma invasive. La résection de lésions MCN invasives est également associée à un taux de survie à 5 ans élevé, de plus de 60%.

I.3 Rôle de Inflammation dans le Cancer du Pancréas

Le microenvironnement tumoral est un élément important, favorisant à la fois l'initiation, la transformation et la dissémination métastatique. Il est aujourd'hui admis que l'inflammation tient une part importante dans la progression des cancers (Hanahan and Weinberg, 2011). Concernant le PDAC, l'inflammation du pancréas ou pancréatite, est l'environnement pro-tumoral le plus documenté.

I.3.1 Description de la pancréatite

La pancréatite est une inflammation du pancréas consécutive à la destruction massive du parenchyme pancréatique et à une importante infiltration immunitaire. La pancréatite aiguë est consécutive à un stress des cellules acineuses pouvant déboucher sur l'autoactivation des enzymes pancréatiques. Ces enzymes, normalement activées dans le duodénum, entraînent alors l'autodigestion du pancréas et le relargage de nombreuses cytokines pro- et anti-inflammatoires responsables du recrutement des cellules immunitaires. Si ce stress est maintenu, le tissu endommagé est progressivement remplacé par des protéines fibreuses (collagène et fibronectine), le nombre de cellules inflammatoires diminue et la pancréatite devient alors chronique.

De nombreux arguments suggèrent que la pancréatite est un terrain favorable au développement tumoral. **Premièrement**, les patients atteints de pancréatites chroniques présentent un risque 50 fois plus élevé, que la population générale, de développer un cancer du pancréas (cf. Chapitre 2, I.1.2). **Deuxièmement**, des lésions précancéreuses de type PanIN sont fréquemment observées au cours des épisodes de pancréatite (Sipos et al., 2009). **Troisièmement**, de nombreux modèles murins ont démontré que l'induction chimique d'une pancréatite permettait d'accélérer la progression des lésions précancéreuses pancréatiques (Guerra et al., 2007, 2011; Carrière et al., 2009).

I.3.2 Effets Pro-Oncogéniques de la Pancréatite

Au niveau cellulaire, l'inflammation pourrait faciliter l'initiation et la progression du PDAC *via* plusieurs mécanismes. Le groupe de Mariano Barbacid a proposé que l'inflammation pouvait inhiber la sénescence induite suite à l'activation d'un oncogène (OIS)

dans les stades précoces (PanIN1) favorisant ainsi le développement de PDAC (Guerra et al., 2011). Il a également été montré que l'inflammation était nécessaire au développement des lésions PanIN, en soutenant à la fois la prolifération (Lesina et al., 2011; Corcoran et al., 2011) et l'invasion des cellules cancéreuses *via* la voie Stat3 (Fukuda et al., 2011). L'induction de Stat3 dans les cellules cancéreuses semble être dépendante de la sécrétion de l'IL-6 par les macrophages présents dans l'infiltrat inflammatoire du tissu pancréatique (Lesina et al., 2011). Enfin, la pancréatite pourrait favoriser le développement de métaplasies acino-canaliaires ou ADM (Acinar-to-Ductal Metaplasia) (Corcoran et al., 2011; Fukuda et al., 2011). Des ADM sont systématiquement retrouvées au niveau des pancréas atteints de pancréatite, et sont constituées de cellules acineuses se transdifférenciant en cellules ayant des propriétés canaliaires. Il a été démontré que ces cellules, exprimant des marqueurs embryonnaires comme Pdx1 et Hes1, étaient nécessaires à la régénération du pancréas mais semblaient précéder la formation des lésions PanIN (Guerra et al., 2007; Carrière et al., 2011).

Même si l'aspect promoteur de tumeur de la pancréatite n'est plus à démontrer, **l'origine même de la pancréatite reste méconnue**. La grande majorité des publications étudiant le rôle de l'inflammation dans le pancréas, est basée sur l'injection de céruléine (Guerra et al., 2007, 2011; Fukuda et al., 2011; Carrière et al., 2009, 2011). Ce composé chimique est un analogue de la cholécystokinine, une hormone peptidique activant la sécrétion des enzymes pancréatiques. L'injection répétée de fortes doses de céruléine est utilisée depuis plus de 30 ans pour induire des pancréatites chez les rongeurs (Lampel and Kern, 1977) par un mécanisme dépendant de la voie NF-kappaB/Rel (Steinle et al., 1999). De façon intéressante, certaines études ont démontré que l'inactivation de la voie du TGF β –*via* l'inactivation ciblée du récepteur T β RII ou la surexpression de Smad7- compromettrait fortement l'induction de la pancréatite par la céruléine (Wildi et al., 2007; He et al., 2009). De plus, comme cela a été observé dans les PDAC, les épisodes de pancréatite sont systématiquement associés à une forte sécrétion de TGF β (Adrych et al., 2011). Il semble donc exister une étroite relation entre le TGF β , la pancréatite et la progression tumorale du PDAC. Une des études présentées dans ce manuscrit adressera spécifiquement cette question grâce à un modèle murin original.

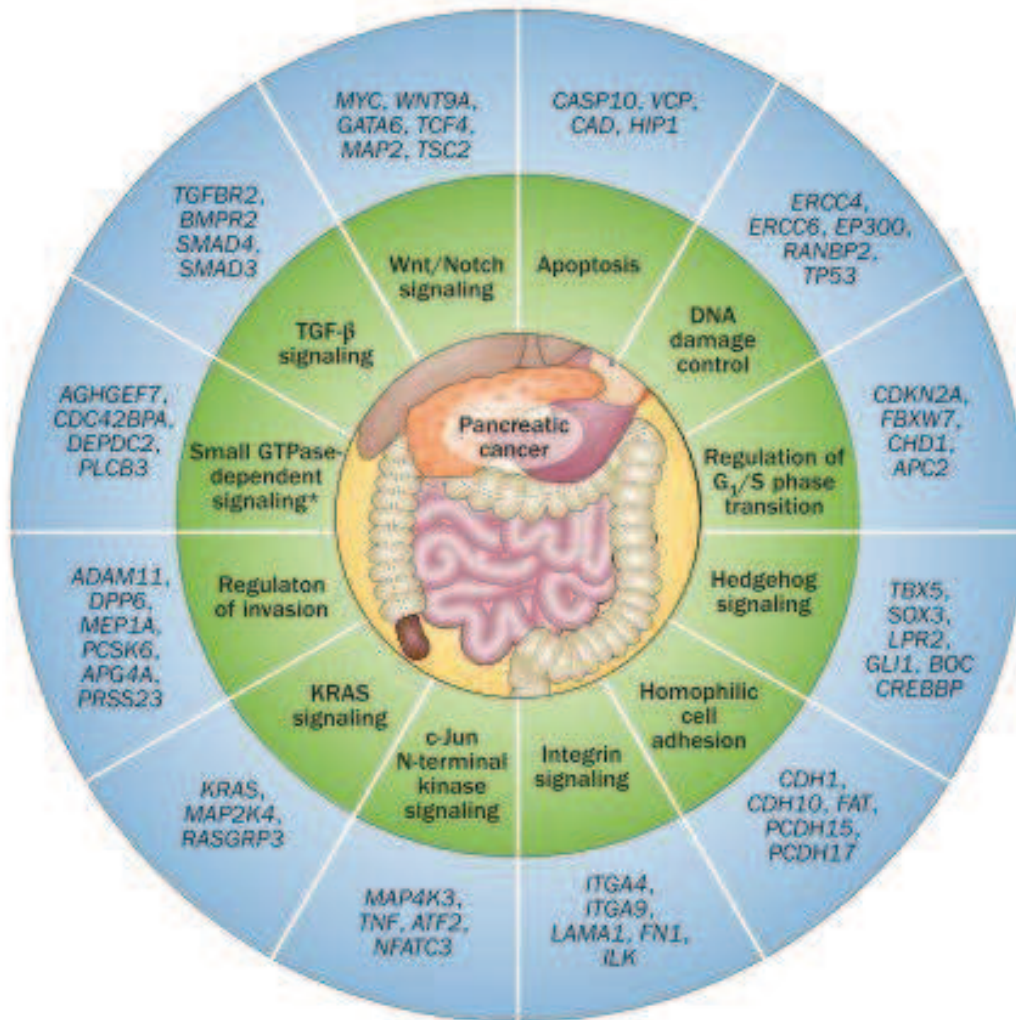


Figure 29 Représentation schématique des Voies de signalisation altérées dans les PDAC. (d'après Samuel and Hudson, 2012)

II Caractérisation moléculaire du PDAC

II.1 Les altérations génétiques associées à la progression tumorale

Les progrès des techniques de séquençage ont permis de mieux définir les voies de signalisation altérées dans les PDAC. Par exemple, en 2008, le séquençage global de plus de 24 tumeurs du pancréas a été réalisé (Jones et al., 2008). Cette analyse impliquant près de 21 000 gènes a permis d'avoir une vue globale des altérations génétiques retrouvées dans le cancer du pancréas (**Figure 29**). En moyenne, une tumeur pancréatique présenterait près de 63 altérations génétiques différentes dont la majorité impliquerait des mutations ponctuelles. Ces altérations affectent différents programmes cellulaires comme l'apoptose, la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire, l'adhésion cellulaire, l'invasion et les voies de signalisation des Ras/MAPK, du TGF β , de Wnt/ β -Caténine, de Notch et de Sonic Hedgehog.

A l'image de ce qui est observé dans les cancers colorectaux (Kinzler and Vogelstein, 1996), chaque stade de la progression tumorale du PDAC est associé à des altérations génétiques récurrentes. En effet, alors que des mutations activatrices d'oncogènes (ex. KRAS, ERBB2 ou EGFR) sont observées dans les lésions de bas grade, des mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs (ex. CDKN2A, SMAD4, BRCA2 ou TP53) sont observées dans les lésions plus avancées (**Figure 30**). Ce modèle est basé essentiellement sur les altérations génétiques décrites dans le modèle de progression PanIN/PDAC. Ce modèle est en effet le plus étudié et le mieux caractérisé d'un point de vue génétique.

II.1.1 Activation de l'oncogène Kras

Les stades précoces du PDAC sont associés à l'activation d'oncogènes tels que les gènes codant ERBB2, EGFR et KRAS. Des mutations activatrices de KRAS sont, de loin, le type de mutation le plus fréquemment retrouvé dans les PDAC (>95%). Historiquement, les mutations de l'oncogène KRAS furent les premières altérations génétiques décrites dans les cancers du pancréas. En 1988, l'étude d'une série de 22 tumeurs du pancréas a révélé que 21 d'entre elles présentaient des mutations au niveau du codon 12 du gène codant l'oncogène Kras (Almoguera et al., 1988). Ces résultats furent confirmés la même année sur une autre série de 30 tumeurs (Smit et al., 1988) suggérant fortement que l'activation de l'oncogène

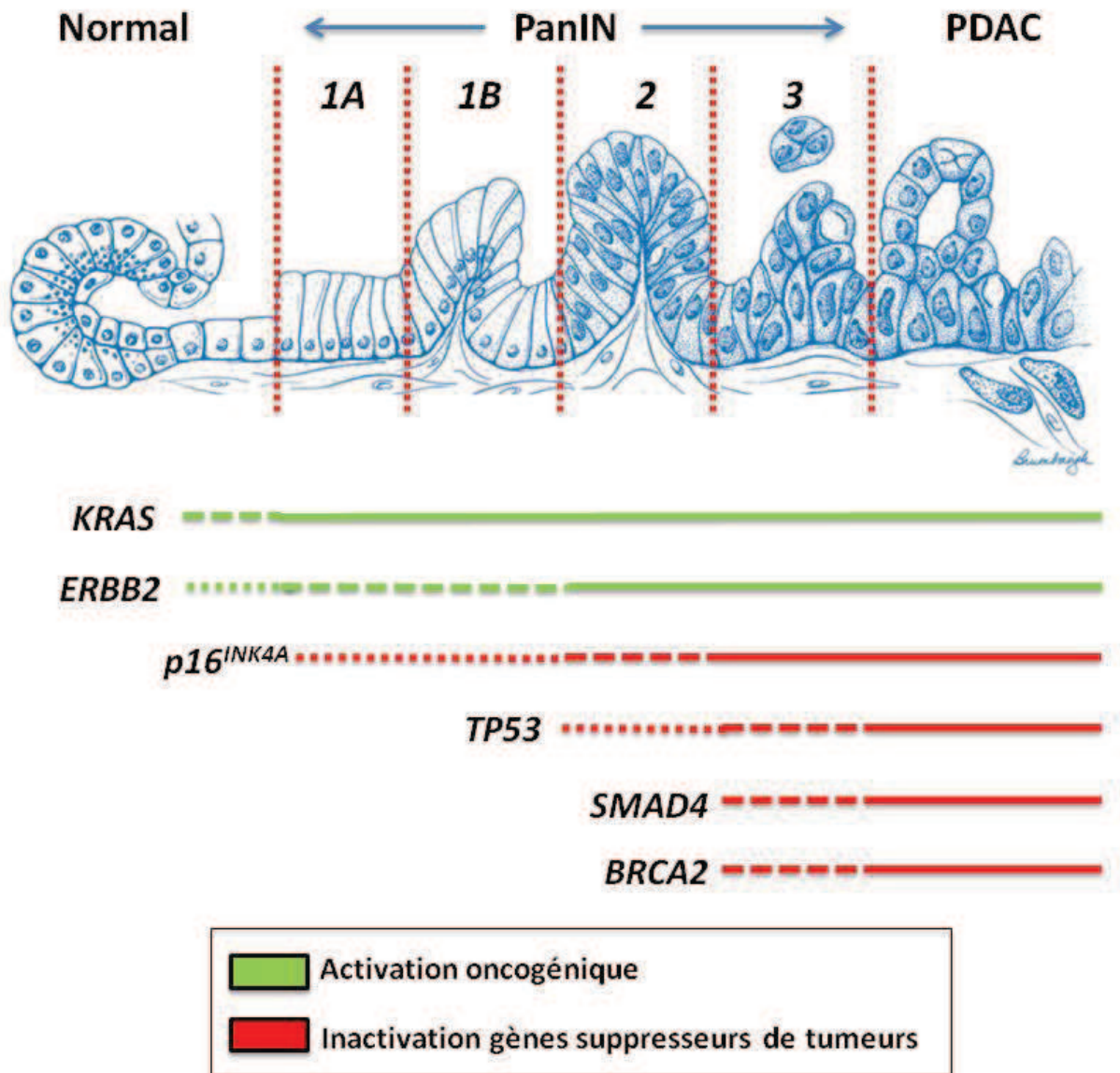


Figure 30 Altérations Génétiques associées à la progression tumorale de l'Adénocarcinome du Pancréas. L'adénocarcinome du pancréas (PDAC) se développe à partir de lésions dysplasiques des canaux exocrines de grade croissant (PanINs). Ces lésions sont associées à des activations oncogéniques (KRAS, ERBB2) dans les stades précoces puis à des mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs (p16^{INK4A}, TP53, SMAD4, BRCA2) dans les stades plus avancés. (adapté d'après Bardeesy and DePinho, 2002).

KRAS pouvait être à la base de la progression tumorale du PDAC. Quelques années plus tard, les mêmes mutations activatrices de KRAS ont été retrouvées à la fois dans les tumeurs mais également dans les lésions précancéreuses (Caldas et al., 1994; Hruban et al., 1993). Après la mise en place de la nomenclature « PanIN » définissant les stades pré-néoplasiques du PDAC (voir I.2.4 Classification des néoplasies épithéliales pancréatiques), la fréquence des mutations KRAS au niveau des différents stades PanIN a été établie. Ainsi des mutations KRAS sont retrouvées dans 36% des lésions PanIN1A, 44% des PanIN1B, 87% des PanIN2/3 et >95% des PDAC (Maitra et al., 2005). L'avènement des modèles de souris génétiquement modifiées a permis de valider le rôle prépondérant de KRAS dans la tumorigenèse pancréatique : le groupe de David Tuveson a démontré en 2003 que des souris exprimant, spécifiquement dans leur pancréas, une forme mutante de l'oncogène KRAS (KRAS^{G12D}), pouvaient développer un PDAC suite à la progression de lésions précancéreuses de type PanIN (Hingorani et al., 2003). **L'ensemble de ces données place l'activation de Kras comme l'élément initiateur du PDAC.**

Les récepteurs à l'EGF tels que EGFR et ERBB2, sont fréquemment surexprimés dès les stades précoces de PanIN (>90%). Ces surexpressions ne semblent cependant pas être associées à des amplifications ou à des mutations de ces récepteurs (Lee et al., 2007a). Il a été montré que des mutations activatrices de KRAS étaient capables d'induire l'expression de l'EGFR dans des cellules pancréatiques (Zhao et al., 2010). Ces éléments suggèrent que les surexpressions de l'EGFR et d'ERBB2 sont des événements secondaires, pouvant être consécutifs à l'activation de l'oncogène KRAS.

II.1.2 Inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs

Au cours de la progression tumorale, l'activation de l'oncogène KRAS va favoriser l'émergence de nouvelles altérations génétiques. Ces altérations permettent à la tumeur d'échapper aux programmes cellulaires limitant sa progression comme la sénescence, l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire ou encore les mécanismes de réparation de l'ADN.

II.1.2a Inactivation de CDKN2A

Des mutations inactivatrices du gène *CDKN2A/INK4A* codant la protéine **p16^{INK4A}**, un inhibiteur de CDK, sont observées dans la quasi-totalité des PDAC (>95%). A la différence des autres gènes suppresseurs de tumeur qui sont inactivés à un stade tardif (PanIN2/3), le gène *CDKN2A/INK4A* est inactivé dès le stade PanIN1. Le locus *CDKN2A* code cependant une autre protéine, **p14^{ARF}** (p19^{ARF} chez la souris). Bien qu'aucune mutation spécifique de p14^{ARF} n'ait été identifiée dans les PDAC, la délétion du locus *CDKN2A* (délétion combinée p14^{ARF}/ p16^{INK4A}) est décrite dans 40% des PDAC (Hustinx et al., 2005). Le rôle du locus *CDKN2A* dans la progression a été validé *in vivo* où l'inactivation ciblée dans le pancréas du locus *CDKN2A*, accélérerait le développement de PDAC chez des souris présentant une activation de l'oncogène Kras^{G12D} (Aguirre et al., 2003). D'un point de vue fonctionnel, la protéine p16^{INK4A} est un inhibiteur du cycle cellulaire et participe à l'induction de la sénescence suite à un stress oncogénique (OIS). La protéine p14^{ARF} est un inhibiteur de Mdm2, une E3 ubiquitine ligase spécifique de p53. Ainsi, le rôle de p14^{ARF} dans le PDAC est en partie lié à l'activité de p53, un autre gène suppresseur de tumeur dans le pancréas. Enfin, il a également été montré que p14^{ARF} pouvait inhiber la prolifération cellulaire par des voies indépendantes de p53 (Lowe and Sherr, 2003).

II.1.2b Inactivation de p53 et BRCA2

Le gène codant **TP53** (Tumor Protein 53 ou p53) est inactivé dans 50% à 75% des PDAC. La perte d'expression de TP53 n'est cependant détectée qu'à partir des stades PanIN3 attestant qu'il s'agit d'un évènement tardif. Des études *in vivo* ont démontré que la perte de fonction de TP53 facilitait la progression des lésions PanIN en PDAC (Hingorani et al., 2005; Bardeesy et al., 2006a). Le facteur de transcription p53 est impliqué dans de nombreux processus comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la réparation de l'ADN ou encore le métabolisme cellulaire. Un autre acteur essentiel de la réparation de l'ADN est la protéine **BRCA2**, dont le gène est inactivé dans 5% des PDAC.

Ces différentes mutations ont été décrites dans les formes sporadiques du cancer du pancréas (80%). Cependant, il est important de noter que certains de ces gènes, comme *CDKN2A/INK4A* et *BRCA2*, ont été précédemment associés à des syndromes prédisposant au PDAC (I.1.2 Facteurs de risque).

II.1.3 SMAD4 et les Altérations de la voie du TGFβ

II.1.3a Inactivation de SMAD4 et des récepteurs TβRI et TβRII

La voie du TGFβ est particulièrement importante dans la progression du PDAC. Tout d'abord, le gène codant la protéine **SMAD4** (originellement appelé DPC4 pour *Deleted in Pancreatic Carcinoma 4*) est inactivé dans plus de 50% des PDAC. La perte d'expression de *SMAD4* est associée le plus souvent à une délétion du locus 18q21.1, contenant *SMAD4* et à une perte d'hétérozygotie. Comme cela a été décrit pour *TP53*, l'inactivation de *SMAD4* est un phénomène tardif, détectée à partir du stade PanIN3 où ce gène est délété dans 28% des PDAC (Maitra et al., 2003). Comme décrit dans le chapitre 1, SMAD4 est un acteur central de la voie de signalisation du TGFβ et est à la base du programme anti-prolifératif et pro-apoptotique du TGFβ. Des mutations pour les gènes codant les récepteurs **TβRI** et **TβRII** sont retrouvées dans respectivement 1% et 4% des PDAC (Goggins et al., 1998). Cependant, aucune étude ne rapporte de mutation de ces gènes dans des stades plus précoces suggérant que la perte des récepteurs est un évènement rare et tardif.

Au vu de ces données, **la perte de fonction de la voie du TGFβ serait associée à une progression des tumeurs vers des stades de plus haut grade**. Cette hypothèse a été validée par différentes études *in vivo* chez la souris : l'inactivation de *TβRII* (Ijichi et al., 2006) ou de *Smad4* (Bardeesy et al., 2006b; Izeradjene et al., 2007; Kojima et al., 2007) est capable d'accélérer la progression des lésions pancréatiques induites par l'oncogène *Kras*^{G12D}.

II.1.3b Activation de la voie du TGFβ dans le PDAC

Une sécrétion croissante de TGFβ est observée au cours de la progression tumorale du PDAC. Cette sécrétion est, de plus, associée à l'augmentation de l'invasion tumorale et du nombre de métastases (Friess et al., 1993; Levy and Hill, 2006). Initialement sécrété afin de prévenir la progression tumorale, le TGFβ pourrait faciliter la mise en place de programmes oncogéniques « indirects » comme le remodelage de la matrice extracellulaire et l'immunosuppression.

L'inactivation de *SMAD4* associée à la sécrétion importante de TGFβ dans le microenvironnement pourrait permettre la mise en place de programmes oncogéniques dans les cellules tumorales. L'activation de ces programmes est, en partie, dépendante de la

mobilisation de voies indépendantes des protéines SMADs coopérant de manière synergique avec les oncogènes Ras (Chapitre 1 II.3 « Programmes Pro-oncogéniques du TGF β »). De plus, il a été montré que les fonctions pro-métastatiques du TGF β dans le PDAC nécessitaient l'activation de la voie des SMADs par le récepteur T β RI (Schniewind et al., 2007). De façon intéressante, des mutations SMAD2 ou de SMAD3 sont très rares dans les cancers pancréatiques suggérant que des effets oncogéniques peuvent être activés *via* SMAD2 et SMAD3, y compris en l'absence de SMAD4. En effet, il a été proposé que SMAD2 et SMAD3, puissent s'associer à IKK α (Descargues et al., 2008) ou TIF1 γ (He et al., 2006) afin de réguler différents effets de la voie du TGF β . **Ainsi le TGF β apparaît comme un facteur promoteur de tumeur dans les stades avancés de la tumorigenèse du PDAC.**

II.2 Stratégies Thérapeutiques

II.2.1 Thérapies Conventionnelles

II.2.1a Chirurgie

Après l'établissement du diagnostic, un geste chirurgical est écarté dans 80 à 85% des cas et cela, à cause de la présence de métastases hépatiques ou encore d'un envahissement du péritoine ou des organes adjacents (Wray et al., 2005). Pour les 15 à 20% des patients où la chirurgie est possible, le geste chirurgical consiste à enlever la partie tumorale et à « connecter » la partie saine du pancréas au duodénum. En cas de résection complète de la tumeur, les patients opérés voient leur taux survie à 5 ans augmenter de 5% à 20% (Riall et al., 2006). Cependant, la chirurgie est très lourde, nécessitant 3 à 4h d'opération, et est sujette à de nombreuses complications comme les fistules pancréatiques. Cette communication anormale entre 2 cavités entraîne une fuite de sécrétions pancréatiques à partir de canaux exocrines endommagés, et représente la complication la plus fréquente (15% des chirurgies) (Oneil Machado, 2012).

II.2.1b Chimiothérapie

D'autres stratégies ont été mises en place afin de diminuer le taux de rechute élevé des patients opérés et de pouvoir proposer aux patients non opérables au moment du diagnostic

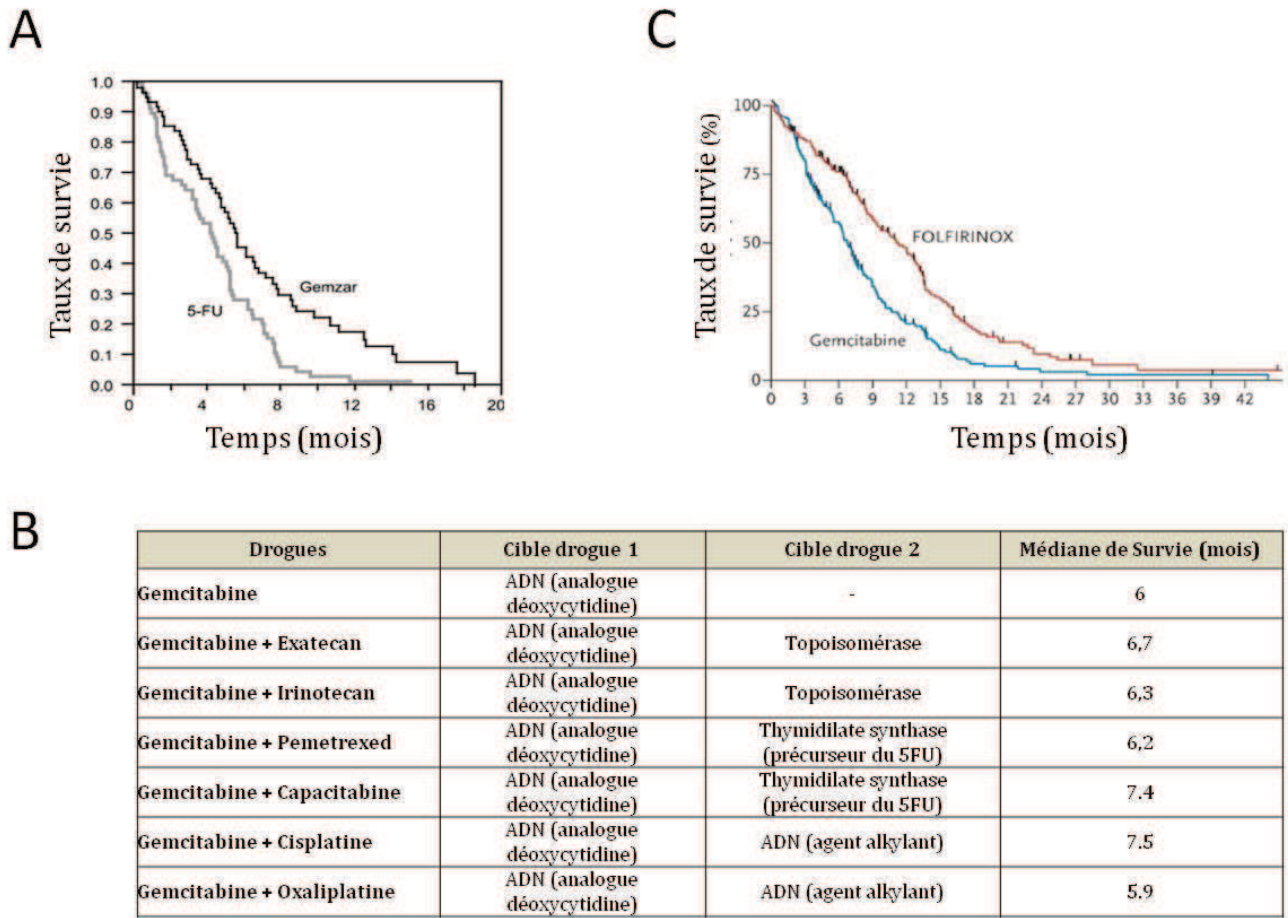


Figure 31 Efficacité des Chimiothérapies dans le traitement du cancer du pancréas. A- Survie de patients atteints de PDAC traités soit avec le 5-Fluorouracile soit avec la Gemcitabine (Gemzar®) (d'après <http://dailymed.nlm.nih.gov>). B- Récapitulatif des différentes combinaisons chimiothérapeutiques impliquant la Gemcitabine (adapté d'après Cartwright et al., 2008). C- Survie de patients atteints de PDAC et traités soit avec la Gemcitabine soit avec le Folfirinox® (d'après Conroy et al., 2011).

(80% des patients), une solution thérapeutique. Ce paragraphe se focalisera uniquement sur les stratégies thérapeutiques basées sur la chimiothérapie.

Pour la chimiothérapie du cancer du pancréas, la première substance utilisée fut le **5-Fluorouracile ou 5-FU** dans les années 80 (Kaiser and Ellenberg, 1985). Le 5-FU est un inhibiteur de la thymidylate synthase, une enzyme responsable de la production de thymidine (une des bases de l'ADN) dans la cellule. Le 5-FU interfère alors avec la réplication de l'ADN, induisant ainsi l'apoptose de la cellule. Le 5-FU fut la substance de référence dans les traitements palliatifs du cancer du pancréas pendant une vingtaine d'années, n'améliorant cependant la médiane de survie que de quelques semaines (4,4 mois *versus* 4 mois) (Fesinmeyer et al., 2005). La combinaison de 5-FU avec d'autres drogues comme la doxorubicine, la mitomycine, la cyclophosphamide, le méthotrexate ou la vincristine n'a pas apporté d'amélioration comparée au 5-FU seul (Oster et al., 1986; Cullinan et al., 1990).

L'utilisation de la **Gemcitabine** fut une avancée importante dans la mise au point des traitements chimiothérapeutiques des cancers pancréatiques. La Gemcitabine, ou difluorodéoxycytidine, est un analogue d'une des bases de l'ADN, la déoxycytidine. Au cours de la phase de réplication de l'ADN, la Gemcitabine est métabolisée et s'incorpore dans l'ADN à la place de la déoxycytidine. La synthèse d'ADN est alors bloquée, induisant l'apoptose de la cellule tumorale. Une des premières études en 1997 démontre une légère amélioration de la médiane de survie avec la Gemcitabine comparée au 5-FU (5,65 mois *versus* 4,41 mois) (**Figure 31A**). Cependant, l'effet le plus notable de la Gemcitabine est une amélioration de l'état général du patient avec une diminution significative de la douleur et donc de l'analgésie, et/ou une diminution de la perte de poids (Burris et al., 1997). A défaut d'apporter un effet majeur sur la survie du patient, la Gemcitabine est beaucoup mieux tolérée et améliore le quotidien/la qualité de vie des malades.

Etant donné l'efficacité limitée de la Gemcitabine seule, **différentes combinaisons** avec d'autres substances ont été testées. Tout d'abord, la combinaison Gemcitabine/5-FU n'a pas montré de différence significative avec la Gemcitabine seule en termes de médiane de survie ou de toxicité (Berlin, 2002). Jusque récemment, l'association de la Gemcitabine avec toutes les autres substances testées n'a pas apporté pas d'amélioration dans la survie des patients : la médiane de survie, dans les tests cliniques les plus optimistes, n'est augmentée que de quelques mois, voire quelques semaines (**Figure 31B**) (Cartwright et al., 2008; Trouilloud et al., 2011)

Deux nouveaux traitements des tumeurs pancréatiques métastatiques ont été développés récemment. Tout d'abord, des patients traités avec une association de Paclitaxel (Taxol®, un inhibiteur de la mitose) et la Gemcitabine ont présenté une médiane de survie de 12,2 mois (Von Hoff et al., 2011). La seconde étude est basée sur l'utilisation d'une combinaison de 5-FU, d'irinotécan, d'oxaliplatine et de leucovorine : le **Folfirinox**. Comparé à la Gemcitabine seule, les patients traités au Folfirinox présentent une meilleure médiane de survie (11,1 mois *versus* 6,8 mois), un meilleur taux de réponse au traitement (31% *versus* 9,4%) et une amélioration de la qualité de vie (Conroy et al., 2011) (**Figure 31C**). Le Folfirinox donc représente une option intéressante pour le traitement des cancers pancréatiques métastatiques. Selon le site clinicaltrials.gov, dix-neuf essais cliniques impliquant l'utilisation du Folfirinox sont actuellement en cours.

L'efficacité limitée des chimiothérapies peut s'expliquer, en partie, par la très bonne résistance des cellules cancéreuses à ces substances. Cette résistance est associée aux nombreuses altérations génétiques présentes dans les PDAC (cf.II Caractérisation moléculaire du PDAC). Un nouveau champ de recherche est donc en cours de développement, celui des thérapies ciblées.

II.2.2 Thérapies ciblées

Le but de ces thérapies est de cibler spécifiquement les voies de signalisation altérées dans les tumeurs. Cette stratégie a déjà fait ses preuves dans le cancer du sein par exemple : des patients présentant une amplification de l'oncogène HER2 sont particulièrement sensibles au Trastuzumab (Herceptin®), un inhibiteur spécifique de cet oncogène (Esteva et al., 2010). D'autre part, un inhibiteur spécifique de l'oncogène BRAF, le Vémurafenib (Zelboraf®), a été approuvé en 2011 par la *Food and Drug Administration* pour le traitement des mélanomes métastatiques des patients porteurs d'une mutation V600E de BRAF (Flaherty et al., 2011). Les paragraphes suivants se focaliseront sur les stratégies thérapeutiques basées sur des voies systématiquement altérées dans le PDAC : la voie de l'EGF et la voie du TGFβ.

Drogues	Cible drogue 1	Cible drogue 2	Médiane de Survie (mois)
Gemcitabine	ADN (analogue déoxycytidine)		6
Gemcitabine + Cetuximab	ADN (analogue déoxycytidine)	EGFR (anticorps neutralisant)	6,3
Gemcitabine + Erlotinib	ADN (analogue déoxycytidine)	EGFR (inhibiteur domaine kinase)	6,24
Gemcitabine + Bevacizumab	ADN (analogue déoxycytidine)	VEGF (anticorps neutralisant)	5,8
Gemcitabine + Erlotinib + Bevacizumab	ADN (analogue déoxycytidine)	EGFR + VEGF	7,1

Table 2 Efficacité des Thérapies ciblées basées sur l'inactivation du récepteur à l'EGF dans le Cancer du Pancréas. (adapté d'après Trouilloud et al., 2011)

II.2.2a Inhibition de la voie de l'EGF

La voie de l'EGF a été l'une des premières cibles des thérapies ciblées du PDAC. En effet cette voie est non seulement activée dans la quasi-totalité des PDAC, *via* la surexpression des récepteurs à l'EGF, EGFR et ERBB2 (cf.I.1.1), mais est de plus associée à la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie des cellules cancéreuses pancréatiques (Bowers et al., 2001; Pino et al., 2006). De nombreux essais se sont focalisés sur l'inhibition du récepteur à l'EGF (EGFR) avec des drogues telles que le Cetuximab (Erbix®) ou encore l'Erlotinib (Tarceva®). Leur association avec la Gemcitabine n'a cependant eu aucun effet sur la médiane de survie des patients atteints de PDAC (**Table 2**). Une étude, publiée très récemment, a confirmé que l'inhibition de l'EGFR n'avait qu'un impact limité sur le développement *in vivo* de PDAC chez l'animal (Navas et al., 2012).

Le problème majeur de cette stratégie est qu'elle est basée uniquement sur le blocage du récepteur à l'EGF alors que 95% des patients présentent des mutations activatrices au niveau de l'effecteur intracellulaire KRAS. Le fait que des inhibiteurs des EGFR soient efficaces sur le cancer du sein peut s'expliquer par la faible proportion de mutations affectant KRAS (5%) (Karnoub and Weinberg, 2008). De plus, le rôle de l'EGFR au cours de la tumorigenèse pancréatique semble être restreint à l'initiation tumorale (Navas et al., 2012; Ardito et al., 2012).

La protéine Kras mutée est rapidement apparue comme une cible potentielle. Cependant à l'heure actuelle et après 30 ans de recherche, aucun inhibiteur spécifique de la forme mutée de la protéine Kras n'a pu être trouvé. Devant l'échec de cette approche, les études se sont focalisées sur d'autres cibles comme la liaison de Kras à la membrane, l'ARNm codant Kras ou encore les voies de signalisation activées par cet oncogène (Baines, 2011; Neel et al., 2011). En effet, l'activité de cet oncogène est notamment dépendante de sa liaison à la membrane plasmique grâce aux farnésyltransférases. La combinaison du Tipifarnib (Zarnestra®, un inhibiteur des farnésyltransférases) avec la Gemcitabine ne donne cependant pas de meilleurs résultats que la Gemcitabine seule (Van Cutsem et al., 2004). Le mode d'action de ces drogues n'est cependant pas compatible. En effet, les inhibiteurs des farnésyltransférases inhibent le cycle cellulaire alors que la Gemcitabine, un analogue de la déoxycytidine, nécessite que le cycle cellulaire soit actif afin de s'intégrer à l'ADN.

D'autres thérapies visant à bloquer spécifiquement l'ARNm codant KRAS ont donné des résultats plutôt encourageants chez l'animal (Réjiba et al., 2007) mais n'ont pas encore été testées chez l'homme. Une stratégie vaccinale est également en cours de développement. Dans une étude datant de 2004, cinq patients ne présentant plus de signes évident de PDAC après chirurgie, ont été vaccinés avec un peptide KRAS contenant la mutation de KRAS détectée chez chaque patient. Les patients ayant répondu au vaccin (3/5) n'ont présenté aucune progression de leur maladie avec une survie globale augmentée (Toubaji et al., 2008). Dans une étude à plus long terme, 22 patients ont été suivis après une résection chirurgicale suivie d'une vaccination avec des peptides KRAS. Les patients répondant à la vaccination (85%) ont présenté un meilleur taux de survie à 5 ans (29% *versus* 22%). De façon intéressante, 4 patients étaient toujours en vie 10 ans après la vaccination et 3 d'entre eux présentaient même une mémoire immunitaire (Wedén et al., 2011).

II.2.2b Inhibition de la voie du TGF β

Des thérapies anti-TGF β sont actuellement en cours de développement. Il a été montré qu'une forme soluble de T β RII ou des inhibiteurs chimiques de T β RI et T β RII diminuaient la croissance tumorale et le nombre de métastases de cellules tumorales pancréatiques humaines implantées chez la souris (Rowland-goldsmith et al., 2002; Medicherla et al., 2007; Melisi et al., 2008). De plus, l'inhibition de ces récepteurs améliorerait la capacité de la Gemcitabine à induire une apoptose des cellules cancéreuses pancréatiques (Kim et al., 2012). D'autres approches donnent également des résultats prometteurs : une protéine chimérique T β RII-IL-2 serait capable non seulement de séquestrer le TGF β activé mais également d'induire une réponse immunitaire *via* l'IL-2. Il a été montré que cette protéine de fusion induisait une réponse immunitaire anti-tumorale chez la souris, associée à une diminution de la croissance tumorale (Penafuerte et al., 2011). Enfin, un oligonucléotide antisens de TGF β 2 (Jaschinski et al., 2011) est actuellement en essai clinique de phase II.

La perte de l'expression de *SMAD4*, relativement tardive au cours de la progression du PDAC, semble jouer un rôle primordial dans le phénomène métastatique et donc sur la survie des patients. En effet, le maintien de l'expression de ce gène est associé à une meilleure survie des patients ayant subi une chirurgie (Tascilar et al., 2001; Blackford et al., 2009). D'autre part, les patients ayant perdu l'expression de ce gène développent plus de métastases

que les patients où le gène est intact (Iacobuzio-Donahue et al., 2009b). *SMAD4* apparaît donc comme un gène suppresseur de tumeur inhibant le développement des métastases. Il serait ainsi possible d'adapter le traitement des patients en fonction du statut de *SMAD4* : un traitement local serait privilégié pour les patients *SMAD4*-positifs alors qu'un traitement systémique serait plus adapté aux patients *SMAD4*-négatifs.

II.3 Les Modèles Murins de PDAC

Des modèles *in vivo* récapitulant la progression tumorale du PDAC ne sont disponibles que depuis 2003 avec le développement de souris génétiquement modifiées. Ces modèles sont une aide précieuse à la fois dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires à la base de cette pathologie, mais également dans la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

II.3.1 Historique

Historiquement, les premiers modèles *in vivo* de cancer du pancréas furent développés dans les années 70 chez le rat, avec l'injection de composés chimiques carcinogènes comme le DMBA (Diméthylbenzanthracène) (Dissin et al., 1975) et l'azasérine (Lilja et al., 1977). Cependant l'injection de cette dernière induit des carcinomes acineux alors que la très grande majorité des tumeurs pancréatiques humaines sont des adénocarcinomes canaux. De plus, l'injection de ces produits par la voie intrapéritonéale induit des tumeurs dans d'autres organes que le pancréas, comme le foie ou encore le rein. Afin de limiter cet effet, Rivera et collaborateurs ont mis au point un modèle, basé sur l'injection de DMBA directement dans le canal pancréatique principal, qui permet le développement de PDAC chez le rat (Rivera et al., 1997). Ce modèle reste aujourd'hui la référence dans les modèles de PDAC chez le rat (Wang et al., 2011), mais reste en marge en comparaison des modèles murins aujourd'hui disponibles.

On recense près de 25 lignées cellulaires différentes isolées à partir de tumeur pancréatiques humaines. Ces lignées, qui pour la plupart ont été caractérisées d'un point de vue génétique

(Moore et al., 2001; Sipos et al., 2003; Monti et al., 2004), ont été massivement utilisées dans des expériences de greffes chez la souris afin d'étudier les propriétés des tumeurs pancréatiques en particulier en réponse à des traitements anti-cancéreux. Le type de greffe le plus utilisé encore aujourd'hui, est l'injection en sous-cutanée de lignées cellulaires pancréatiques humaines chez des souris immunodéficientes (xénogreffe hétérotopique). Ce type d'approche a néanmoins de nombreuses limitations : cette stratégie ne permet ni d'étudier les phases précoces de la transformation tumorale ni d'étudier l'interaction des cellules cancéreuses avec le stroma tumoral et les cellules immunitaires. Concernant l'étude du caractère métastatique des lignées tumorales, l'injection intra-pancréatique de lignées cellulaires humaines chez des souris immunodéficientes (xénogreffe orthotopique) est privilégiée à la xénogreffe hétérotopique sous-cutanée (Loukopoulos et al., 2004).

II.3.2 Les modèles de souris génétiquement modifiées

La caractérisation moléculaire des tumeurs pancréatiques humaines a permis de définir des cibles à activer ou à inactiver chez la souris afin de reproduire les lésions pancréatiques observées chez l'homme. On peut distinguer trois approches distinctes, pouvant être combinées, afin d'introduire ces mutations dans le génome de la souris : i) l'expression de mutation constitutive (mutation exprimée dans l'organisme entier ou dans un organe spécifique), ii) l'expression conditionnelle (le système Cre-Lox va permettre l'expression de mutation uniquement dans les cellules exprimant la recombinaise Cre) et iii) l'expression inductible. En ce qui concerne les systèmes inductibles, l'expression des mutations est dépendante de l'injection d'une drogue. Le système CreER-Lox permet l'expression d'une protéine Cre fusionnée au domaine de liaison au ligand du récepteur à l'œstrogène (ER). L'ajout de Tamoxifène (agoniste du récepteur aux oestrogènes) permet la translocation de la fusion Cre-ER dans le noyau permettant ainsi l'expression inductible des mutations dépendantes de la Cre. Concernant, le système TetON/TetOFF, l'expression du transgène est dépendante de la présence (TetON) ou de l'absence (TetOFF) de stimulation des cellules à la doxycycline (tétracycline synthétique).

Les approches constitutives ont démontré d'importantes limitations. Tout d'abord, la grande majorité des mutations observés dans les PDAC, lorsque celles-ci sont exprimés dans l'organisme entier, induisent soit une létalité embryonnaire soit un développement de tumeurs

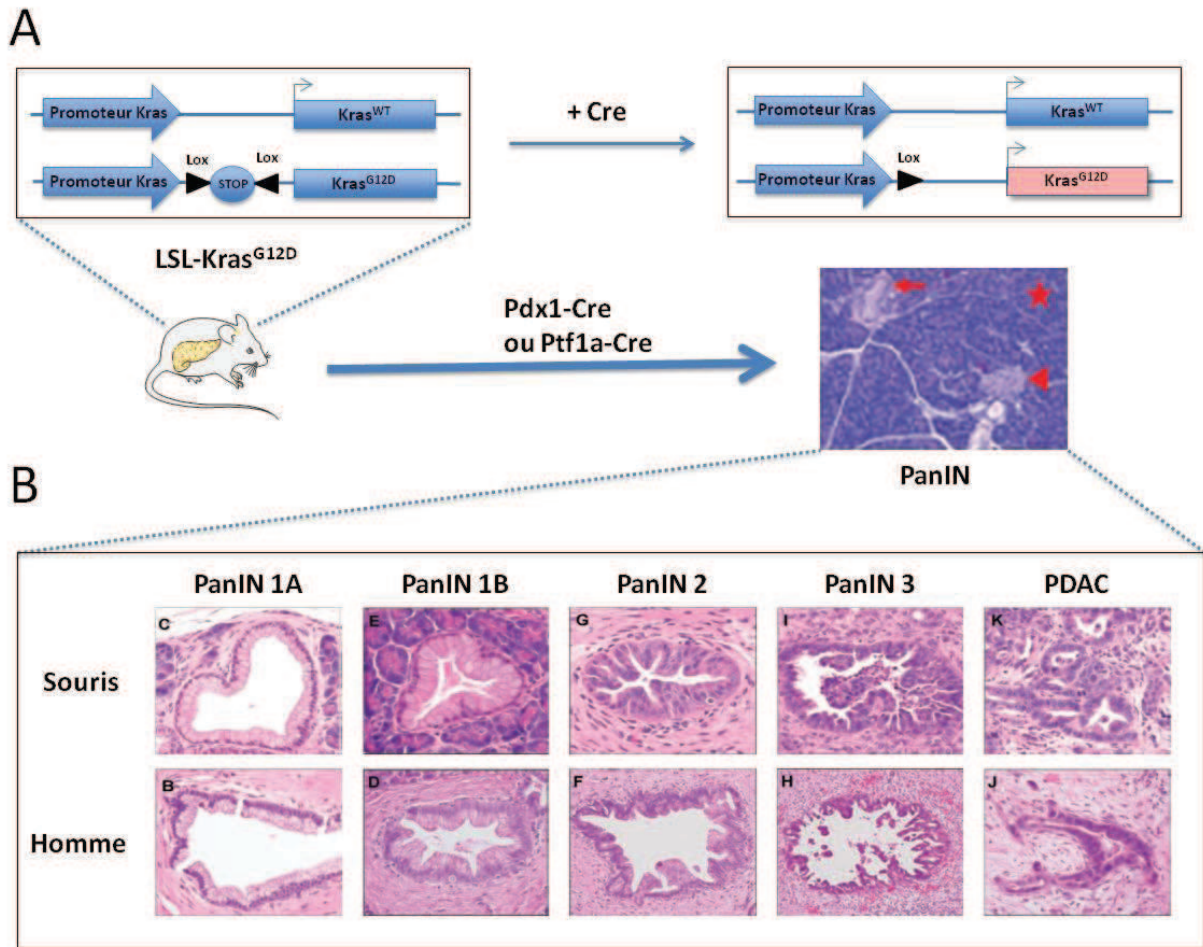


Figure 32 Expression Ciblée d'une forme mutante de Kras dans le pancréas de souris.

A- L'allèle LSL-Kras^{G12D} permet l'expression, après excision du STOP de transcription (STOP) par la Cre recombinase, d'une forme mutante de Kras (Kras^{G12D}). (adapté d'après Pérez-Mancera, 2012). **B-** Des souris exprimant Kras^{G12D}, spécifiquement dans les cellules épithéliales du pancréas (Pdx1-Cre ; Kras^{G12D}), développent des lésions PanIN ressemblant à celles observées chez l'homme. Ces lésions peuvent évoluer en PDAC dans environ 10% des cas. (adapté d'après Olive and Tuveson, 2006)

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

dans d'autres organes que le pancréas (Tuveson et al., 2004). Les études se sont alors concentrées sur l'expression de mutations spécifiquement dans le pancréas grâce à l'utilisation de différents promoteurs. Le choix de ce promoteur est à faire en fonction de la population pancréatique visée. On distingue notamment i) les promoteurs permettant d'exprimer les mutations dans toutes les cellules du pancréas (Pdx1, Ptf1a/p48), ii) les promoteurs spécifiques des cellules acineuses (Elastase, Mist1 et Nestine), iii) les promoteurs spécifiques des cellules canalaire (CK19, CK5) et enfin vi) les promoteurs spécifiques des cellules endocrines α (Glu) ou β (Rip) (Hruban et al., 2006; Ding et al., 2010).

De nombreux modèles ont été développés à partir de 2 lignées murines exprimant la Cre dans toutes les cellules épithéliales du pancréas : Pdx1-Cre (Gu et al., 2002) et Ptf1a/p48-Cre (Kawaguchi et al., 2002). Ces 2 lignées peuvent potentiellement permettre l'expression d'allèles « floxés » (c'est à dire dont l'expression est dépendante de la présence de site Lox) dans toutes les cellules épithéliales du pancréas. Les modèles murins de PDAC ont pris un tournant décisif avec la création d'un allèle permettant l'expression conditionnelle d'une version mutée de Kras (mutation identique à celle observée dans les PDAC humains), l'allèle Lox-Stop-Lox-Kras^{G12D} (LSL-Kras^{G12D}) (Jackson et al., 2001). Cet allèle, dont l'expression est inductible par la Cre recombinase, a été placé au niveau du locus endogène de Kras. Ainsi, sous l'action de la Cre recombinase, le signal d'arrêt de transcription (Lox-Stop-Lox) est excisé, permettant l'expression de l'oncogène Kras^{G12D} sous le contrôle du promoteur endogène. L'expression de cet oncogène, spécifiquement dans les cellules pancréatiques grâce aux lignées Pdx1-Cre ou Ptf1a-Cre, induit, dans 100% des animaux, le développement progressif de lésions précancéreuses de type PanIN pouvant évoluer dans 10% des cas en PDAC (Hingorani et al., 2003) (**Figure 32A**). Le spectre des lésions développées chez ces souris mime la progression des lésions observées chez l'homme (**Figure 32B**).

Comme cela a été exposé précédemment, au cours de la progression tumorale, l'activation oncogénique de Kras, est associée à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs comme p16^{INK4A}/p14^{ARF}, TP53 ou encore SMAD4. De nombreux modèles ont alors été générés en utilisant comme base commune, l'expression conditionnelle d'une forme mutante de Kras (Kras^{G12D} ou Kras^{G12V}) (Morris et al., 2010). Parmi ceux-ci, les modèles couplant l'activation oncogénique de Kras^{G12D} avec l'inactivation du locus p16^{INK4A}/p14^{ARF} (p16^{INK4A}/p19^{ARF} chez la souris) (Aguirre et al., 2003) ou l'expression d'une forme dominante-négative de p53 (p53^{R172H}) (Hingorani et al., 2005) ont permis le développement des lésions cancéreuses

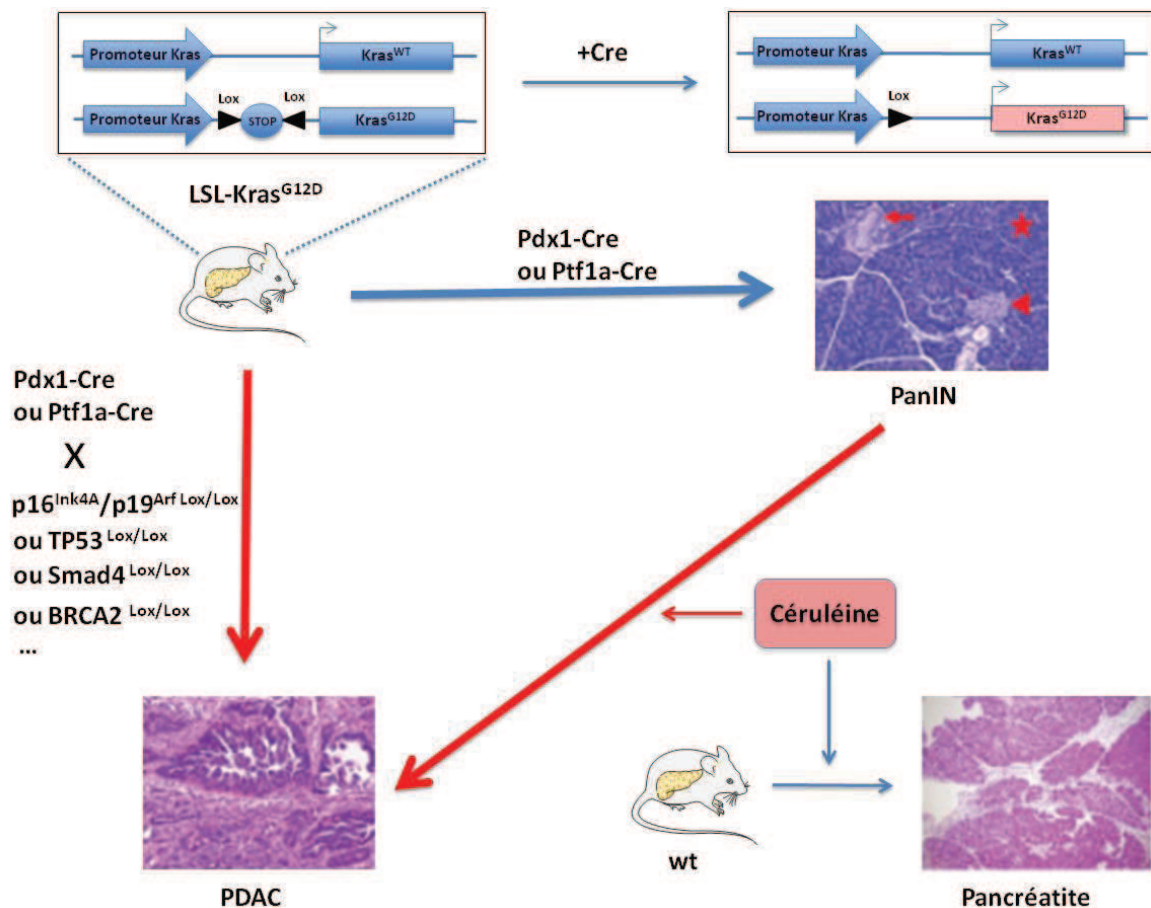


Figure 33 Modélisation de la Progression Tumorale du PDAC chez la souris.

L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur ($p16^{Ink4}/p19^{Arf}$, $TP53$, $Smad4$ ou $Brca2$, ect...) spécifiquement dans le pancréas, accélère la progression des lésions induites par l'oncogène $Kras^{G12D}$. L'inflammation du pancréas permet également d'accélérer le développement des PDAC. (adapté d'après Pérez-Mancera et al., 2012)

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

métastatiques et ce, en quelques semaines. Enfin, il a également été montré que l'induction d'une pancréatite par la céruléine, accélérât l'apparition des PDAC chez des souris génétiquement modifiées exprimant l'oncogène Kras (Guerra et al., 2007, 2011; Carrière et al., 2009) (**Figure 33**).

PARTIE 2 RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre 1 Activation de la voie du TGF β au cours de la tumorigenèse pancréatique

Article 1

Bartholin, L., F.S. Cyprian, **D.F. Vincent**, C.N. Garcia, S. Martel, B. Horvat, C. Berthet, S. Goddard-Leon, I. Treilleux, R. Rimokh, and J.C. Marie. Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor beta signaling through the T β RI/ALK5 receptor. *Genesis* (2008)

Article 2

Vincent, D.F., B. Kaniewski, S.E. Powers, C. Havenar-daughton, J.C. Marie, D. Wotton, and L. Bartholin. Rapid Strategy to Detect the Recombined Allele in LSL-T β RI^{CA} Transgenic Mice. *Genesis* (2010)

Article 3

Vincent, D.F., L. Alcaraz, J. Gout, V. Arfi, R.M. Pommier, B. Kaniewski, S. Martel, S. Goddard-Léon, A. Colombe, G. Fourel, I. Treilleux, U. Valcourt, P. Dubus, and L. Bartholin. Transforming Growth Factor β Cooperates with Activated KRAS to Induce Pancreatitis in Mice. *In preparation*

I – Activation *in vivo* de la voie du TGF β

Article 1

Bartholin, L., F.S. Cyprian, D.F. Vincent, C.N. Garcia, S. Martel, B. Horvat, C. Berthet, S. Goddard-Leon, I. Treilleux, R. Rimokh, and J.C. Marie. Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor beta signaling through the T β RI/ALK5 receptor. *Genesis* (2008)

Introduction

La voie de signalisation du TGF β intervient dans de très nombreux processus physiologiques comme l'embryogénèse, la régulation du système immunitaire ou encore la cicatrisation. Par conséquent, la perturbation de la voie du TGF β est associée à des pathologies très différentes comme la fibrose, les maladies autoimmunes et le cancer. De nombreux modèles murins ont permis d'étudier le rôle du TGF β *in vivo* en inactivant, dans différents compartiments cellulaires, les gènes codant le TGF β , les récepteurs ou encore les protéines SMADs. Cependant, aucun modèle ne permettait de déterminer le rôle de l'activation de la voie du TGF β . Le premier objectif de ma thèse fut alors de développer un modèle murin permettant d'étudier *in vivo* l'activation de la voie du TGF β .

Résultats

Le modèle que nous avons développé repose sur l'expression d'un récepteur de type I au TGF β (T β RI/ALK5) constitutivement activé. L'activation constitutive du récepteur T β RI (appelé T β RI^{CA}) est rendue possible par l'introduction de trois mutations au niveau du domaine GS du récepteur, responsable de la transduction du signal aux effecteurs cellulaires. La fonctionnalité de cette construction a tout d'abord été validée *in vitro*. Pour cela, nous avons montré que l'expression de T β RI^{CA} mimait l'activation de la voie du TGF β (phosphorylation des Smads et activation de gènes cibles). Afin d'étudier les effets de l'activation de la voie du TGF β *in vivo*, nous avons généré une construction où l'expression

du transgène $T\beta RI^{CA}$ était dépendante de l'action de la Cre recombinase. Ce transgène a ensuite été intégré au niveau du locus HPRT, situé sur le chromosome X, pour générer un nouveau modèle murin, le modèle LSL- $T\beta RI^{CA}$ (LSL : Lox-STOP-Lox). Grâce à l'utilisation de souris exprimant la Cre recombinase dans le compartiment lymphocytaire (CD4-Cre), nous avons contrôlé que l'expression du transgène $T\beta RI^{CA}$ induisait une activation ciblée de la voie du TGF β spécifiquement dans les lymphocytes (CD4-Cre ; LSL- $T\beta RI^{CA/+}$). Cette activation n'affecte pas le développement des lymphocytes mais inhibe leur activation. Nous avons également montré que l'expression du transgène $T\beta RI^{CA}$ dans les lymphocytes permettait d'inhiber le développement d'une pathologie autoimmune induite par la perte du récepteur T βRII dans ces mêmes cellules (souris CD4-Cre ; T $\beta RII^{lox/lox}$; LSL- $T\beta RI^{CA/+}$).

Conclusion

Ces résultats démontrent que nous avons réussi à générer un modèle murin permettant d'activer *in vivo* la voie du TGF β . Ce modèle nous a notamment permis d'étudier certains aspects de la biologie des lymphocytes T.

TECHNOLOGY REPORT

Generation of Mice with Conditionally Activated Transforming Growth Factor Beta Signaling Through the T β RI/ALK5 Receptor

Laurent Bartholin,^{1,2,3,4*} Farhan S. Cyprian,^{2,5,6} David Vincent,^{1,2,3,4} Céline N. Garcia,^{2,5,6} Sylvie Martel,^{3,4} Branka Horvat,^{2,5,6} Cyril Berthet,⁷ Sophie Goddard-Léon,³ Isabelle Treilleux,³ Ruth Rimokh,^{1,2,3} and Julien C. Marie^{2,5,6}

¹INSERM, U590, IFR62, Lyon, France

²Univ Lyon 1, Lyon, France

³Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁴INSERM “Avenir” Group, Lyon, France

⁵INSERM, U758, IFR128, Lyon, France

⁶ENS-Lyon, Lyon, France

⁷Center for Cancer Research, NIH, Frederick, Maryland

Received 13 July 2006; Accepted 24 July 2006

Summary: We generated a transgenic mouse strain (LSL-T β RI^{CA}) containing a latent constitutively active TGF β type I receptor (T β RI/ALK5) by using a knock-in strategy into the X chromosome-linked hypoxanthine phosphoribosyl-transferase (*Hprt*) locus. Transgene expression, under the control of the ubiquitous CAG (human cytomegalovirus enhancer and chicken β -actin) promoter, is repressed by a floxed transcriptional “Stop” (LSL, Lox-Stop-Lox). In the presence of cre-recombinase, the “Stop” is excised to allow T β RI^{CA} transgene expression. We showed that restricted expression of T β RI^{CA} in T lymphocytes efficiently activates TGF β signaling and rescues the T-cell autoimmune disorders of TGF β RII conditional knockouts. Unexpectedly, our study reveals that TGF β signaling upregulation controls T-cell activation but does not impair their development or their peripheral homeostasis. In addition to the information provided on TGF β effects on T-cell biology, LSL-T β RI^{CA} mouse constitutes an attractive tool to address the effect of TGF β signaling upregulation in any cell type expressing the cre-recombinase. *genesis* 46:724–731, 2008. Published 2008 Wiley-Liss, Inc.[†]

Key words: TGF β ; receptor; lymphocyte; transgenesis; mouse; Smad

Transforming growth factor beta (TGF β) is a cytokine belonging to a large family that includes the TGF β s, bone morphogenic proteins, and activins. The three isoforms of TGF β (TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3) are secreted at different levels by most cell types, and they serve as positive and negative regulators of differentiation and proliferative programs (Letterio and Roberts, 1998). TGF β plays a crucial role in physiological processes during embryonic development, immune response, cell growth control, and wound healing. Ani-

mals deficient in either TGF β 2 or TGF β 3, die during embryogenesis. In contrast, a proportion of TGF β 1^{null} embryos survives until birth, and those which are born, rapidly demonstrate tissue damages, autoimmune diseases, and immune system disorders, culminating in their death by 3 weeks of age (Kulkarni *et al.*, 1993; Shull *et al.*, 1992). All three TGF β isoforms signal through a common heterodimeric serine/threonine kinase receptor (Massague *et al.*, 1992) composed of two subunits, T β RII and T β RI (also termed activin receptor-like kinase 5, ALK5). Upon binding to its receptors, TGF β induces the kinase activity of the intracellular domain of the T β RII subunit, which in turn phosphorylates the GS (Gly/Ser/Thr-rich) box of the T β RI subunit. After another round of catalytic phosphorylation, the latter facilitates Smad-dependent regulation of gene transcription and activates several other signaling pathways (Derynck and Zhang, 2003). T β RI phosphorylation on its GS box is essential for signaling because signal transduction is abolished by replacing serine/threonine residues with nonphosphorylatable amino acids (Wrana *et al.*, 1994). Reciprocally, substitution of threonine 204 with aspartic

Ruth Rimokh and Julien C. Marie contributed equally to this work.

* Correspondence to: Laurent Bartholin, INSERM, U590, INSERM “Avenir” group, Oncogénèse et progression tumorale, Centre Léon Bérard, 28 rue Laënnec, 69373 Lyon Cedex 08, France.

E-mail: bartholi@lyon.fnclcc.fr

[†]This article is a US Government work and, as such, is in the public domain in the United States of America.

Contract grant sponsor: INSERM “Avenir Program” (L.B.), ARC 3891 (L.B.), INCA (L.B., R.R. and J.C.M.) and Ligue comité du Rhône (L.B. and J.C.M.), ANR-06-JC (J.C.M.), ARC 3989 (J.C.M.). E.S.C. is a MRT fellow.

Published online 26 September 2008 in

Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/dvg.20425

acid causes the autophosphorylation of T β RI in the absence of TGF β and T β RII (Wieser *et al.*, 1995).

TGF β 's effects are very finely tuned, depending on both its local concentration and the cellular differentiation state. Perturbation of TGF β signaling results in a wide range of pathological affections such as fibrosis, teratogenesis, carcinogenesis, and immune system diseases. In the immune system, deprivation of TGF β signaling selectively in T cells is associated with life-threatening autoimmune syndromes, affecting both lymphocyte homeostasis and activation (Li *et al.*, 2006; Marie *et al.*, 2006; Rubtsov and Rudensky, 2007). The broad expression of TGF β receptors on numerous cell types makes difficult to decipher the results obtained by injection of recombinant TGF β (Rubtsov and Rudensky, 2007).

In the absence of a suitable mouse model, the effects of TGF β signaling upregulation on T-cell biology remain elusive. To address the precise role of TGF β signaling upregulation in the T-cell compartment, we have generated transgenic mice bearing a conditionally expressed, constitutively active form of the T β RI receptor (LSL-T β RI^{CA} mouse strain). Transgene expression repressed by a floxed transcriptional "Stop" (LSL, Lox-Stop-Lox) can be activated in the presence of cre-recombinase after excision of the "Stop" signal. By breeding the LSL-T β RI^{CA} transgenic animals with CD4-cre mice, in which the expression of cre-recombinase is limited to $\alpha\beta$ T lymphocytes, we restricted T β RI^{CA} expression to $\alpha\beta$ T cells. In the resulting animals, we analyzed the effect of upregulation of TGF β signaling from early thymic differentiation to mature T-cell differentiation. We demonstrated that restricted TGF β signaling upregulation in T cells blocks their activation without, surprisingly, affecting their development, maturation, homeostasis, and peripheral steady-state activation.

To definitively assess the role of TGF β signaling activation on the T-cell compartment, we generated transgenic mice with a conditionally expressed, constitutively active form of TGF β type I receptor (T β RI^{CA}) due to three missense mutations in the GS domain: T204D that constitutively activates the T β RI kinase (Wieser *et al.*, 1995) and L193A/P194A that prevent binding of the T β RI inhibitor, FKBP12 (Charng *et al.*, 1996). T β RI^{CA} is HA-tagged at the C-terminus end to facilitate further detection. We first verified in vitro that transient expression of T β RI^{CA} could efficiently mimic TGF β signaling activation as previously described by others (Wieser *et al.*, 1995). To validate the expression and the functionality of T β RI^{CA} in mammalian cells in vitro, HepG2 cells were transiently transfected with a T β RI^{CA} expression vector. Western blot analysis using an anti-HA antibody confirmed the cellular expression of the T β RI^{CA}-HA fusion protein at the expected size (Fig. 1a). At the functional level, luciferase assays showed that T β RI^{CA} was sufficient to activate the expression of a luciferase reporter gene (CAGA-Luc) under the control of Smad binding elements (SBE) (Fig 1b). Because the activation of TGF β signaling leads to the activation of numerous genes, we analyzed the expression of several

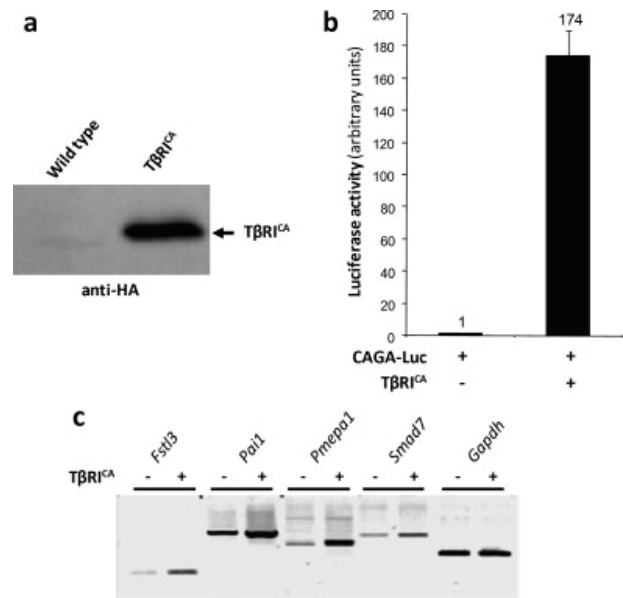


FIG. 1. In vitro expression of T β RI^{CA} mimics TGF β activation. In (a), (b), and (c), HepG2 cells were transiently transfected with a T β RI^{CA} expressing vector. (a) Western blot analysis using an anti-HA antibody confirmed the cellular expression of the T β RI^{CA}-HA fusion protein at the expected size. (b) Luciferase assay showed that T β RI^{CA} was sufficient to activate the expression of a luciferase reporter gene (CAGA-Luc) under the control of Smad Binding Elements (SBE). (c) RT-PCR analysis revealed that T β RI^{CA} was able to activate the expression of several TGF β endogenous target genes such as *Fstl3*, *Pai1*, *Pmepa1*, and *Smad7*.

of them. RT-PCR analysis revealed that T β RI^{CA} was able to activate the expression of several TGF β endogenous target genes such as *Fstl3* (*Follistatin-like 3*), *Pai1* (*Plasminogen activator inhibitor 1*), *Pmepa1* (*Prostate transmembrane protein, androgen induced 1*), *Smad7* (Fig. 1c). In all, this first set of experiments confirms that T β RI^{CA} expression can mimic TGF β treatment in vitro.

Next, we used a knock-in strategy into the X chromosome-linked hypoxanthine phosphoribosyl-transferase (*Hprt*) locus to generate transgenic mice containing a latent T β RI^{CA} transgene. It is important to emphasize that the resulting transgenic animals harbor a functional *Hprt* gene. This strategy does not generate *Hprt* knock-out mice because *Hprt* function initially impaired in the ES cells we used is restored by the knock-in, allowing positive selection of recombined ES cells on HAT (hypoxanthine aminopterin thymidine) selective medium (see material and methods section for details). Transgene expression, under the control of the composite constitutive CAG (human cytomegalovirus enhancer and chicken β -actin) promoter, is repressed by a floxed-transcriptional Stop (LSL, Lox-Stop-Lox). In the presence of cre-recombinase enzyme, the "Stop" signal is excised to allow transgene expression; hence, this system allows cell-specific expression of T β RI^{CA} restricted to cre-expressing cells (Fig. 2). After ES cell electroporation, three ES cell clones were isolated and 220 blastocysts

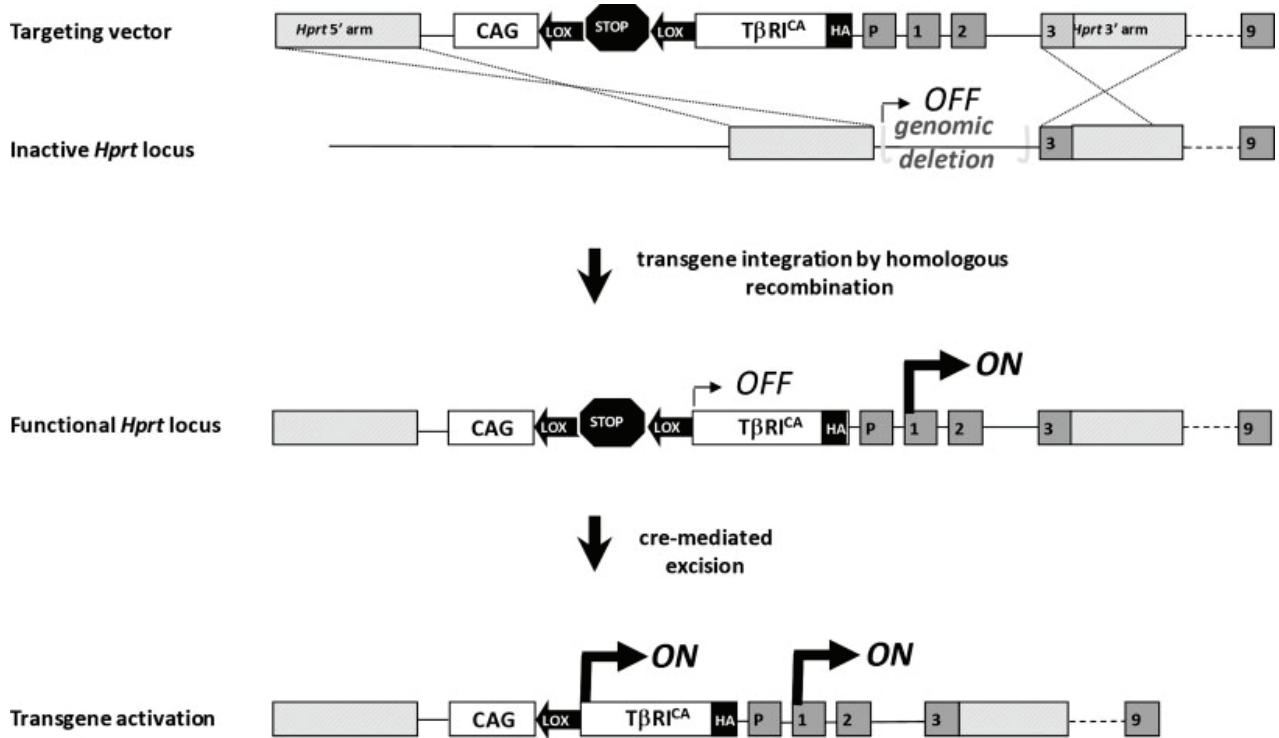


FIG. 2. Transgenesis strategy to generate LSL- $T\beta RI^{CA}$ mouse strain. Site-directed $T\beta RI^{CA}$ transgene integration by homologous recombination into the mutated *Hprt* locus of PBES cells and cre-mediated excision of the transcriptional “Stop” allowing $T\beta RI^{CA}$ expression are represented. Numbered gray boxes, *Hprt* exons; P, *Hprt* promoter; CAG, composite constitutive CAG (human cytomegalovirus enhancer and chicken β -actin) promoter; LSL, floxed-transcriptional Stop; hatched boxes, *Hprt* homology arms allowing homologous recombination and insertion of one single copy of the transgene at the *Hprt* locus; HA, hemagglutinin tag epitope.

were then injected with ES cells from two clones and reimplanted in 15 female mice. We obtained 18 male chimeras (F0, 10–100% chimeric). To check germline transmission of the $T\beta RI^{CA}$ transgene and generate heterozygous F1 animals, we bred chimeric males with pure C57Bl/6J females (Fig. 3). As predicted by X-linked allele transmission, only F1 females were positive for the transgene (LSL- $T\beta RI^{CA lox/+}$). Breeding between F1 heterozygous females and chimeric males allowed us to generate F2 hemizygous males (LSL- $T\beta RI^{CA lox/0}$, bearing 1 single copy of the transgene on the unique X chromosome) and F2 homozygous females (LSL- $T\beta RI^{CA lox/lox}$, bearing 2 copies of the transgene, one on each X chromosome) used in all the following experiments. Because LSL- $T\beta RI^{CA lox/0}$ hemizygous males and LSL- $T\beta RI^{CA lox/lox}$ homozygous females were phenotypically undistinguishable, we will indifferently name them LSL- $T\beta RI^{CA}$ in the rest of the article.

To selectively express $T\beta RI^{CA}$ in T cells, LSL- $T\beta RI^{CA}$ mice were bred with mice bearing the cre-recombinase under the control of a CD4 promoter (CD4-cre mouse strain) allowing a restricted expression of the Cre protein in T lymphocytes (Lee *et al.*, 2001). RT-PCR showed that $T\beta RI^{CA}$ mRNA was highly expressed in T lymphocytes from CD4-cre; LSL- $T\beta RI^{CA}$ mice, whereas the transgene expression was barely detectable in T lymphocytes

from a control LSL- $T\beta RI^{CA}$ littermate lacking the CD4-cre allele, attesting that transgene expression is efficiently regulated by the cre-recombinase (Fig. 4a). Q-PCR experiments revealed that $T\beta RI^{CA}$ transgene activation (about 70-fold increase) was efficiently restricted to the T-cell compartment in CD4-cre; LSL- $T\beta RI^{CA}$ mice (Fig. 4b). In agreement with these observations, western-blot analysis revealed that $T\beta RI^{CA}$ protein was expressed in purified T lymphocytes from CD4-cre; LSL- $T\beta RI^{CA}$ mice and was not detectable in T cells from a LSL- $T\beta RI^{CA}$ control littermate (Fig. 4c). $T\beta RI^{CA}$ expression is associated with a significant increased phosphorylation of Smad2 protein, demonstrating the capability of $T\beta RI^{CA}$ to constitutively turn on TGF β signaling pathway in T cells in vivo (Fig. 4c).

In CD4-Cre; $T\beta RI^{lox/lox}$ mice, the deprivation of $T\beta RI$ in T cells leads to the early onset of an aggressive autoimmune disease with multiple tissue lesions similar to that of observed in animals deficient in TGF $\beta 1$ (Li *et al.*, 2006; Marie *et al.*, 2006). This life-threatening disease is due to an overactivation of T lymphocytes. It was then tempting to evaluate whether constitutively active type I receptor could bypass lack of type II receptor signal as type I receptor acts downstream type II receptor. To test this hypothesis and then validate the functionality of the $T\beta RI^{CA}$ transgene in vivo, we generated CD4-

cre; TβRII^{lox/lox}; LSL-TβRI^{CA} mice. Although CD4-cre; TβRII^{lox/lox} mice die by 3 weeks of age from a rampant wasting autoimmune disease, CD4-cre; LSL-TβRI^{CA}; TβRII^{lox/lox} mice appeared to be healthy and reached adulthood without any autoimmune clinical signs. We monitored activation markers such as CD69, CD44, and

CD62L (Fig. 5a). Interestingly, CD69 and CD44 upregulation as well as CD62L downregulation observed in T cells from CD4-cre; TβRII^{lox/lox} mice were not observed in T cells from CD4-cre; TβRII^{lox/lox}; LSL-TβRI^{CA} mice. Liver is a commonly severely affected organ in CD4-cre; TβRII^{lox/lox} mice (Marie *et al.*, 2006). We then decided to compare by histology, immune disease progression in both CD4-cre; TβRII^{lox/lox} and CD4-cre; TβRII^{lox/lox}; LSL-TβRI^{CA} mice (Fig. 5b). The portal tracts (“stars” on Fig. 5b) from CD4-cre; TβRII^{lox/lox} mice were enlarged and contained congestive vessels, a hallmark of inflammatory processes. In these mice, the portal tracts were infiltrated by numerous mononuclear cells recognized as lymphocytes (Fig. 5b1, 5b3). In contrast, in the portal tracts from CD4-cre; TβRII^{lox/lox}; LSL-TβRI^{CA} mice, lymphocytes were rarely detected (Fig. 5b2, 5b4). All these observations demonstrate that TβRI^{CA} expression can efficiently rescue the early onset autoimmune disorder observed in CD4-cre; TβRII^{lox/lox} mice, validating the in vivo functionality of the TβRI^{CA} transgene in the T-cell compartment.

Because the CD4-cre transgene is efficiently expressed at the double positive stage of thymocyte development (Marie *et al.*, 2006), both CD4⁺ and CD8⁺ T cells from CD4-cre; LSL-TβRI^{CA} mice are expected to express LSL-TβRI^{CA}. Thus, we investigated the effect of the activation TGFβ signaling on thymocyte development. Thymus cellularity and the size of double negative (DN), double positive (DP) as well as both CD4 and CD8 single positive (SP) thymocyte subsets were indistinguishable between mutant and wild-type mice (Fig. 6a). Absolute numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from either CD4-cre; LSL-TβRI^{CA} mice or their control littermates were also the same (data not shown). Expression of thymocyte maturation makers, CD24, CD69, Qa-2, on SP

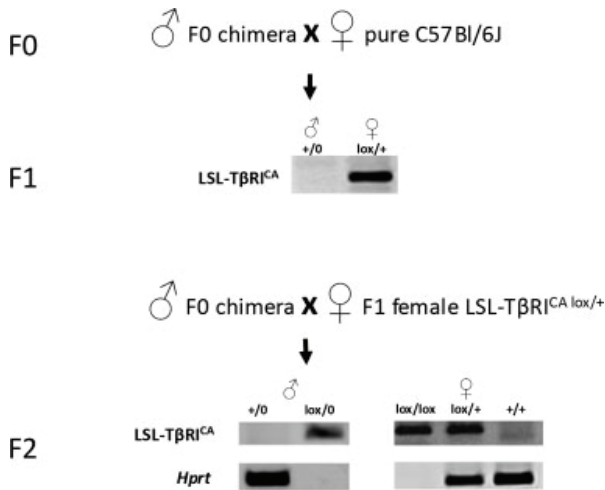


FIG. 3. Breeding strategy to generate LSL-TβRI^{CA} animals. We generated heterozygous F1 females (LSL-TβRI^{CA} lox/+) to validate germline transmission of the transgene from a F0 chimera male x C57Bl/6J female breeding. Next, we generated hemizygotes F2 males (LSL-TβRI^{CA} lox/0) and homozygous F2 females (LSL-TβRI^{CA} lox/lox) from a F0 chimera male x F2 LSL-TβRI^{CA} lox/+ heterozygous female breeding. PCR on genomic DNA were performed using a first set of primers detecting the presence of the TβRI^{CA} transgene and a second set of primers detecting the wild-type *Hprt* locus. Noteworthy that when TβRI^{CA} transgene is inserted, *Hprt* locus is disrupted and is no longer detected with the second set of primers.

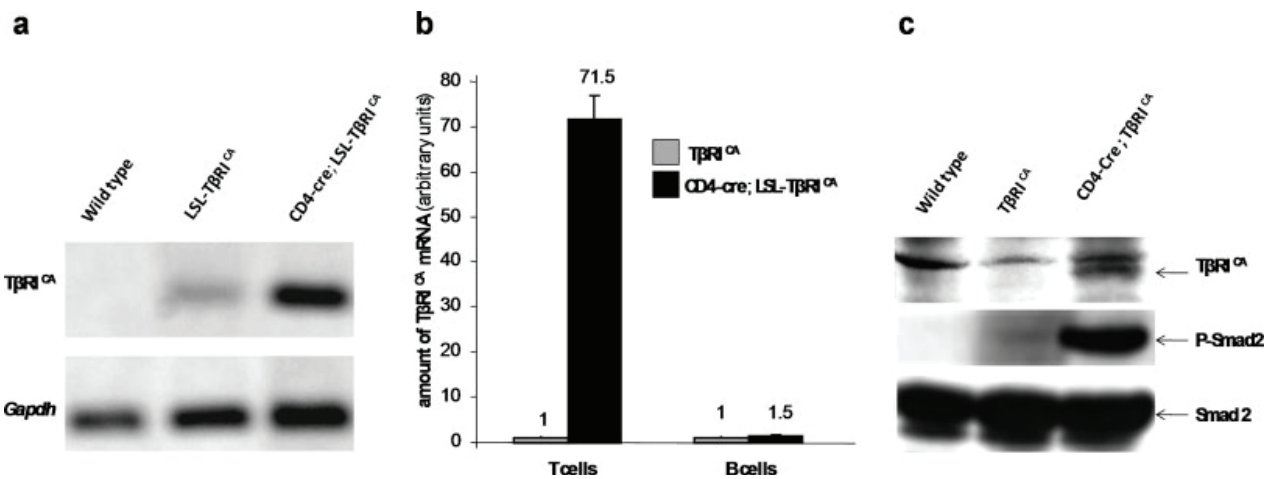


FIG. 4. Targeted expression of TβRI^{CA} transgene in T lymphocytes. (a) Detection of TβRI^{CA} mRNA by semi-quantitative RT-PCR performed on total RNA from purified T cells from wild-type, LSL-TβRI^{CA} or CD4-cre; LSL-TβRI^{CA} mice. (b) Detection of TβRI^{CA} mRNA by quantitative RT-PCR performed on total RNA from either purified T cells or purified B cells from CD4-cre; LSL-TβRI^{CA} mice. (c) Detection of LSL-TβRI^{CA}-HA fusion protein, endogenous Smad2 and phospho-Smad2 by western-blot analysis performed T cells lysates from wild-type, LSL-TβRI^{CA} and CD4-cre; LSL-TβRI^{CA} mice.

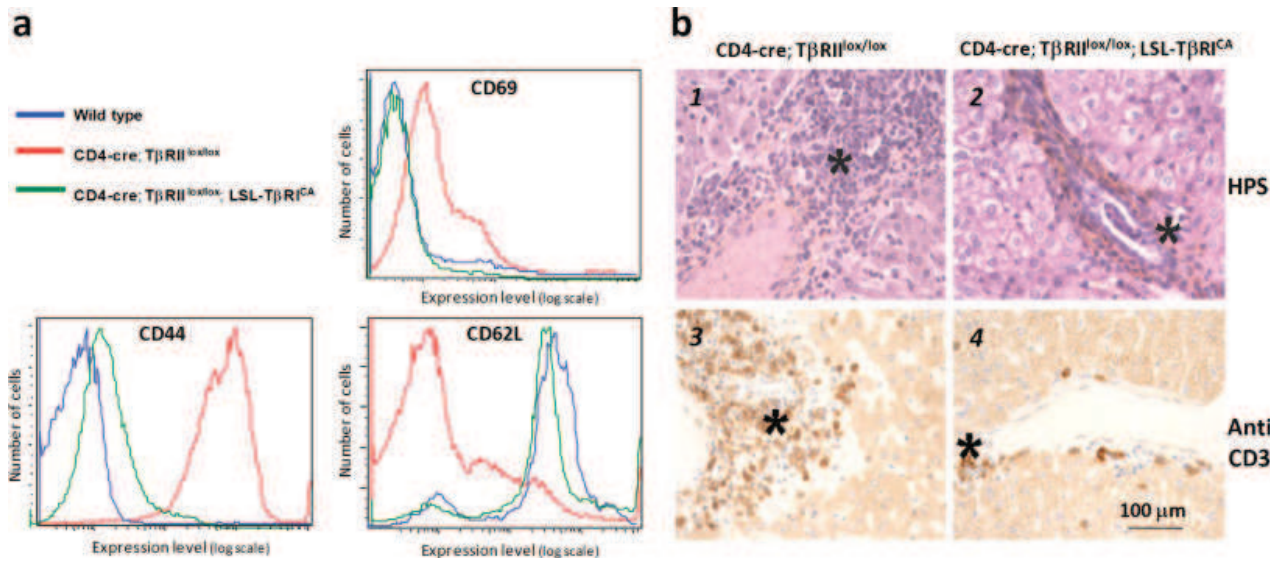


FIG. 5. TβRI^{CA} expression prevents T-cell activation and autoimmune syndromes classically observed in CD4-cre; TβRI^{lox/lox} mice. (a) T-cell activation markers analysis on splenic CD3 positive cells isolated from 17 day old CD4-cre; TβRI^{lox/lox} (TβRI^{null}), CD4-cre; TβRI^{lox/lox}; LSL-TβRI^{CA} or wild-type mice by flow cytometric analysis. (b) HPS (Hematoxylin Phloxine Saffron) (b1, b2) and CD3 immunostainings (b3, b4) of portal tracts in liver tissue sections from either CD4-cre; TβRI^{lox/lox} (b1, b3) mice or from CD4-cre; LSL-TβRI^{CA}; TβRI^{lox/lox} mice (b2, b4). Stars indicate portal tracts.

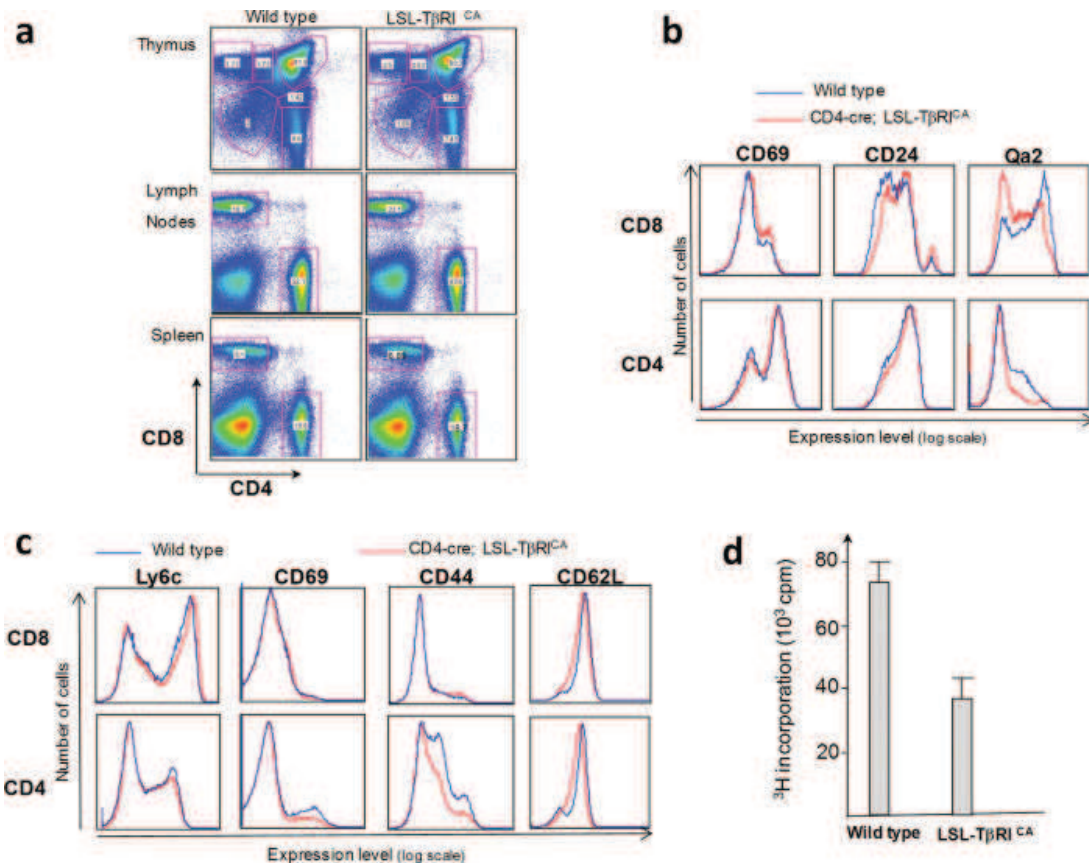


FIG. 6. TβRI^{CA} expression in T lymphocytes regulates their activation but does not impair their development or steady-state activation. (a) Flow cytometric analysis of CD4 and CD8 expression on thymocytes, lymph nodes and splenocytes from 4-week-old CD4-cre; LSL-TβRI^{CA} mice or wild-type littermates. (b) Flow cytometric analysis of expression of thymocyte maturation makers expressed by CD4 or CD8 single positive cells isolated from 4-week-old mice. (c) Flow cytometric analysis of expression of activation makers expressed by CD4 or CD8 T cells isolated from lymph nodes from 4-week-old mice. (d) Proliferation capacity of 72h activated CD4 T cells analyzed by measurement of ³H thymidine incorporation for 18 h.

thymocytes was similar to that of control littermates (Fig. 6b). After the analysis of development and maturation of T cell, we examined whether the upregulation of TGF β signaling could affect peripheral T lymphocyte homeostasis and steady-state activation in both spleen and lymph nodes. Interestingly, activation markers such as CD44, CD62L, and CD69 on T cells from CD4-cre; LSL-T β RI^{CA} mice were not significantly different from that observed in T cells from wild-type animals (Fig. 6c). However, T β RI^{CA} highly repressed TCR activated T lymphocytes activation based in a proliferation assay (Fig. 6d). Thus, the upregulation of TGF β signaling does not affect steady-state activation and homeostasis of peripheral T cells but efficiently control T-cell activation due to TCR engagement.

During the last two decades, many roles of TGF β signaling activation on T-cell biology have been taken for granted from in vitro observations in spite of the absence of in vivo validation due to the lack of a suitable mouse model.

Here, we have created an original conditional transgenic mouse strain expressing a constitutively active T β RI. These mice allowed us to demonstrate for the first time, that in vivo upregulation of TGF β controls T-cell activation after their TCR engagement, without impairing development, maturation homeostasis, and steady-state activation. These observations on thymic development and maturation, along with our previous work showing that deprivation of TGF β signaling does not affect development and maturation of DP thymocytes (Marie *et al.*, 2006) clearly demonstrate that these two processes are independent of TGF β . Moreover, results on peripheral homeostasis and steady-state activation are in total agreement with the fact that tissues expressing high levels of TGF β , such as the ocular chamber of eye or testis, are characterized as highly antigen tolerogenic tissues while T lymphocytes proportions seems to be not affected in these organs (Rubtsov and Rudensky, 2007).

We now can propose a comprehensive model explaining the role of TGF β in T cells in vivo: Endogenous TGF β signaling in T lymphocytes is at a high enough level in the organism to control T cell steady-state activation preventing T-cell autoreactivity that would cause auto-immune diseases. When T cells receive a TCR activation signal from infectious agents or cancer cells, endogenous TGF β signaling is no longer sufficient to repress T-cell activation, allowing then a physiological immune response. When TGF β expression is upregulated in pathological processes such as in cancer, high TGF β levels in the tumor microenvironment will efficiently participate to the escape of tumor immune surveillance and will promote tumor growth.

In addition to information provided on TGF β effects on T-cell biology, our cre-inducible LSL-T β RI^{CA} transgenic mice provide an attractive tool that can be used to address the ambiguous role of TGF β in many biological functions ranging from cancer development to organ and tissue differentiation. Indeed, the studies that previ-

ously addressed the role of TGF β activation in biological processes such as heart development (Charng *et al.*, 1998) or tumorigenesis (Siegel *et al.*, 2003) used T β RI constitutively active mutants under the control of organ-specific promoters. These strategies prevented the use of the created transgenic animals to study the role of TGF β signaling activation in other organs or cell types. In contrast, the conditional LSL-T β RI^{CA} transgenic mouse strain that we have created allows to activate TGF β signaling in virtually any cell-type after breeding with a mouse strain expressing the cre-recombinase in a specific cell type thereby opening a large area of investigations.

MATERIALS AND METHODS

Mice

CD4-cre; T β RII^{lox/lox} mice were generated as previously described (Marie *et al.*, 2006). Transgenic LSL-T β RI^{CA} mice were generated as described in Figure 2. The "composite" CAG promoter (Niwa *et al.*, 1991) and the Lox-Stop-Lox "cassette" (Sauer, 1993) were positioned upstream of the fusion T β RI^{CA}-HA fusion gene within the Gateway pENTR1A plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA). Using the Gateway in vitro recombinase system, the CAG-LSL-T β RI^{CA}-HA cassette was then inserted into a *Hprt* gene targeted vector (Denarier *et al.*, 2005) containing homologous arms to what is present in the genome of the BPES cells so that it can recombine by homologous recombination. The targeted vector also contains *Hprt* regions deleted in the BPES line, e.g., promoter, exon1, and exon2. After electroporation into *Hprt*-deficient BPES cells (Bronson *et al.*, 1996; Farhadi *et al.*, 2003), homologous recombination simultaneously restores the deleted *Hprt* locus in BPES cells and inserts a single copy of the transgene construct into the *Hprt* 5' flanking region. Clones undergoing homologous recombination were isolated by virtue of their resistance to HAT selection. Only BPES cells expressing both hypoxanthine phosphoribosyl transferase (*Hprt*) and thymidine kinase (*Tk*) can survive in HAT medium. Aminopterin (a drug that acts as a folate metabolism inhibitor by inhibiting dihydrofolate reductase) inhibits de novo synthesis of nucleosides, which is absolutely required for DNA synthesis and cell division to proceed. The other components (hypoxanthine and thymidine) provide cells expressing the *Hprt* and *Tk* enzymes with the raw material to evade the blockage (the "salvage pathway"). *Hprt* and *Tk* supply them from hypoxanthine and thymidine, which are intermediates in DNA synthesis—a purine derivative and a deoxynucleoside, respectively. ES cell clones produced were used to generate chimeric mice via blastocyst microinjection according to standard procedures. All mice were maintained in a specific pathogen-free animal facility at the "Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris" and the "Centre Léon Bérard" (Lyon, France) and handled in the accordance with the institutional guidelines.

DNA and RNA Analyses

Genomic DNA was isolated and purified from tail biopsy by HotShot (Truett *et al.*, 2000). Total RNA was extracted from purified thymocytes by RNeasy mini kit purification (Qiagen, Hilden, Germany). The cDNA was used as template with RT Kit Super script II (Invitrogen). Semi-quantitative PCR was performed with Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). Real-time quantitative PCR (iTaq SYBR Green super mix Biorad, Hercules, CA) was performed using an AB Prism PCR-Q V2 thermocycler (annealing temperature, 55°C). All of the real-time values were averaged and compared using the cycle threshold (CT) method, where the amount of target RNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$) was normalized to the endogenous β -actin reference (ΔCT). The amount of target in LSL-T β RI^{CA} ES cells was set as the calibrator at 1.0. The values represent the standard errors of a representative experiment performed in duplicate.

Primers

Genotyping

T β RI^{CA} 5'-ttgtgaacagaagtaagg-3'; 5'-agaagaacaatcaagggtcc-3'
Hprt 5'-gagggagaaaaatgcgagtg-3'; 5'-ctccggaaagcagtgagtaag-3'

Semi quantitative RT-PCR

T β RI^{CA} 5'-ttgtgaacagaagtaaggc-3'; 5'-agcataatcaggaaatcatcat-3'
Fstl3 5'-gcaattcacgtcacctacatctcctcg-3'; 5'-gcggatccacgaagttctctctcttc-3'
Pai1 5'-catggggccatggaacaagg-3'; 5'-cttctgaggtcgactcag-3'
Pmepa1 5'-cttctgaggtcgactcag-3'; 5'-ctatccatcaggtcactgtcg-3'
Smad7 5'-ccttagccgactctgcaacta-3'; 5'-tgcataaactcgtggtcattgg-3'
Gapdh 5'-cggagtcaacggatttggtctat-3'; 5'-agcctctccatggtggtgaagac-3'

Quantitative RT-PCR

actin "RT PCR primer set for mouse β -actin (Superarray PPM 02945A; Frederick, MD)"

T β RI^{CA} 5'-ttgtgaacagaagtaaggc-3'; 5'-agcataatcaggaaatcatcat-3'

Cell Culture, Transient Transfections, and Reporter Assays

Culture and transfection conditions of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 were described previously (Bartholin *et al.*, 2001). T β RI^{CA} cDNA and CAGA-Luc reporter plasmid were, respectively, obtained from Dr. Schneider (Chang *et al.*, 1996) and Dr. Gauthier (Dennler *et al.*, 1998). For in vitro T-cell stimulation, purified CD4⁺ were cultured for 96 h in 24 well plates coated with 10 μ g/ml of anti-CD3 (2C11) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and 5 μ g/ml of anti-CD28 (eBioscience, San Diego, CA) in RPMI 1640 supplemented with 5% FCS, 200 mM l-glutamine, 10 mM HEPES, and 100 U/ml of penicillin/streptomycin (all from Invitrogen).

Western blot analysis on HepG2 transfected with pCMV-T β RI^{CA} and primary lymphocytes was performed as previously described (Bartholin *et al.*, 2001). We used anti-HA antibody (Clone Y-11, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-phospho-Smad2 (#3101, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and anti-Smad2 (#51-1300, Invitrogen) and peroxidase-labeled anti-rabbit secondary antibody (#P0448, Dako) antibodies.

Western Blot

Western blot analysis on HepG2 transfected with pCMV-T β RI^{CA} and primary lymphocytes was performed as previously described (Bartholin *et al.*, 2001). We used anti-HA antibody (Clone Y-11, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-phospho-Smad2 (#3101, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and anti-Smad2 (#51-1300, Invitrogen) and peroxidase-labeled anti-rabbit secondary antibody (#P0448, Dako) antibodies.

Histology and Immunohistochemistry

Histology and immunohistochemistry on liver were performed as previously described (Treilleux *et al.*, 2004) except that antigen retrieval was done at 9.9 pH. Anti-CD3 antibody (Clone M-20, Santa Cruz Biotechnology) was diluted at 1/200.

Cell Isolation and Flow Cytometric Analysis

B and T lymphocytes were purified with an AutoMACS Pro magnetic cell sorter and magnetic beads (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) as previously described (Marie *et al.*, 2005). Flow cytometry analyses were carried out with a FACS Canto (BD Biosciences) and analyzed using Flow Jo software. Anti-mouse CD4 (L3T4), CD44 (IM7), CD62L (MEL-14), CD69 (H1.2F3), Qa-2 were purchased from BD Biosciences.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Wotton, T. Guise, R. Buckland, P. Fournier, N. Bardeesy and members from our laboratories for critical reading and editing the manuscript. We specially thank H. Friedman and A. Peterson for providing helpful informations about the transgenesis strategy. We are also deeply grateful to people from the Nucleis Corporation (Lyon, France) and the University Transgenesis Facility ("ALECS", Lyon, France) for their valuable expertise to generate the LSL-T β RI^{CA} mice. The expert assistance of S. Guignes, and mouse technicians of the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris and the Centre Léon Bérard (Lyon, France), were highly appreciated. We also thank, S. Karlson, and C.B. Wilson for providing T β RII^{lox/lox} and CD4-cre mice respectively as well as M. Schneider for providing T β RI^{AD} constitutively active type I TGF β receptor mutant cDNA (T β RI^{CA}). F.S.C is a MRT fellow.

LITERATURE CITED

Bartholin L, Maguer-Satta V, Hayette S, Martel S, Gadoux M, Bertrand S, Corbo L, Lamadon C, Morera AM, Magaud JP, Rimokh R. 2001. FLRG, an activin-binding protein, is a new target of TGF β tran-

- scription activation through Smad proteins. *Oncogene* 20:5409-5419.
- Bronson SK, Plaehn EG, Kluckman KD, Hagaman JR, Maeda N, Smithies O. 1996. Single-copy transgenic mice with chosen-site integration. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9067-9072.
- Charng MJ, Frenkel PA, Lin Q, Yamada M, Schwartz RJ, Olson EN, Overbeek P, Schneider MD. 1998. A constitutive mutation of ALK5 disrupts cardiac looping and morphogenesis in mice *Dev Biol* 199:72-79. [Erratum appears in *Dev Biol* 1998;202:315, Note: Yumada M (corrected to Yamada M)].
- Charng MJ, Kinnunen P, Hawker J, Brand T, Schneider MD. 1996. FKBP-12 recognition is dispensable for signal generation by type I transforming growth factor- β receptors. *J Biol Chem* 271:22941-22944.
- Denarier E, Forghani R, Farhadi HF, Dib S, Dionne N, Friedman HC, Lepage P, Hudson TJ, Drouin R, Peterson A. 2005. Functional organization of a Schwann cell enhancer. *J Neurosci* 25:11210-11217.
- Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. 1998. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 17:3091-3100.
- Derynck R, Zhang YE. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 425:577-584.
- Farhadi HF, Lepage P, Forghani R, Friedman HC, Orfali W, Jasmin L, Miller W, Hudson TJ, Peterson AC. 2003. A combinatorial network of evolutionarily conserved myelin basic protein regulatory sequences confers distinct glial-specific phenotypes. *J Neurosci* 23:10214-10223.
- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. 1993. Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:770-774.
- Lee PP, Fitzpatrick DR, Beard C, Jessup HK, Lehar S, Makar KW, Perez-Melgosa M, Sweetser MT, Schlissel MS, Nguyen S, Cherry SR, Tsai JH, Tucker SM, Weaver WM, Kelso A, Jaenisch R, Wilson CB. 2001. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15:763-774.
- Letterio JJ, Roberts AB. 1998. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu Rev Immunol* 16:137-161.
- Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. 2006. Transforming growth factor- β controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25:455-471.
- Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. 2005. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201:1061-1067.
- Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. 2006. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor- β receptor. *Immunity* 25:441-454.
- Massague J, Andres J, Attisano L, Cheifetz S, Lopez-Casillas F, Ohtsuki M, Wrana JL. 1992. TGF- β receptors. *Mol Reprod Dev* 32:99-104.
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193-199.
- Rubtsov YP, Rudensky AY. 2007. TGF β signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol* 7:443-453.
- Sauer B. 1993. Manipulation of transgenes by site-specific recombination: Use of Cre recombinase. *Methods Enzymol* 225:890-900.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Doetschman T. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699.
- Siegel PM, Shu W, Cardiff RD, Muller WJ, Massague J. 2003. Transforming growth factor β signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8430-8435.
- Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, Bremond A, Goddard S, Pin JJ, Barthelemy-Dubois C, Lebecque S. 2004. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10:7466-7474.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. 2000. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* 29:52-54.
- Wieser R, Wrana JL, Massague J. 1995. GS domain mutations that constitutively activate T β R-I, the downstream signaling component in the TGF- β receptor complex. *EMBO J* 14:2199-2208.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. 1994. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370:341-347.

Article 2

Vincent, D.F., B. Kaniewski, S.E. Powers, C. Havenar-daughton, J.C. Marie, D. Wotton, and L. Bartholin. Rapid Strategy to Detect the Recombined Allele in LSL-T β RI^{CA} Transgenic Mice. *Genesis* (2010)

Introduction

Nous avons démontré dans le premier article (Bartholin et al., 2008) que la lignée murine LSL-T β RI^{CA} était fonctionnelle et permettait d'activer la voie du TGF β dans le compartiment lymphocytaire. Afin d'élargir le champ d'application de ce modèle, nous avons mis au point un système de PCR permettant d'attester de la recombinaison et donc, indirectement, de l'expression du transgène LSL-T β RI^{CA} dans différents compartiments *in vivo*.

Résultats

Nous avons tout d'abord mis au point une stratégie de génotypage permettant de détecter, à partir d'ADN génomique, la recombinaison du transgène LSL-T β RI^{CA}. Grâce à l'utilisation de différentes Cre recombinases, nous avons visualisé la recombinaison du transgène LSL-T β RI^{CA} dans différents organes et compartiments cellulaires tels que le pancréas (Pdx1-Cre), le foie (Alb-Cre), les lymphocytes (CD4-Cre) ou encore l'épiblaste embryonnaire (Sox2-Cre).

Conclusion

Ces résultats démontrent que l'allèle T β RI^{CA}, permet d'étudier l'activation de la voie du TGF β potentiellement dans n'importe quel type cellulaire. Il "suffit" pour cela de disposer d'une lignée murine exprimant la Cre recombinase dans le compartiment d'intérêt.

TECHNOLOGY REPORT

A Rapid Strategy to Detect the Recombined Allele in LSL-T β RI^{CA} Transgenic Mice

David F. Vincent,^{1,2,3,4} Bastien Kaniewski,^{1,3,4} Shannon E. Powers,^{5,6} Colin Havenar-Daughton,^{1,2,4,7} Julien C. Marie,^{1,2,4,7} David Wotton,^{5,6} and Laurent Bartholin^{1,2,3,4*}

¹INSERM, U590, Lyon, F-69008, France

²University of Lyon, Lyon, F-69003, France

³INSERM Avenir Team, “TGF β in Pancreatic and Gastrointestinal Cancers” Lab, Lyon, F-69008, France

⁴Centre Léon Bérard, Lyon, F-69008, France

⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Virginia, Charlottesville, Virginia

⁶Center for Cell Signaling, University of Virginia, Charlottesville, Virginia

⁷INSERM Atip/Avenir team, “TGF β in Immune Evasion” Lab, Lyon, F-69008, France

Received 6 July 2010; Accepted 8 July 2010

Summary: We have previously generated a transgenic mouse strain (LSL-T β RI^{CA}) containing a Cre-inducible constitutively active TGF β type I receptor (Bartholin *et al.*, 2008, *Genesis* 46: 724–731). Transgene expression depends on the excision of a floxed-transcriptional STOP (LSL, Lox-STOP-Lox) located upstream the T β RI^{CA} coding sequence. To evaluate the correct excision of the STOP signal in the presence of Cre-recombinase, we developed a rapid screening based on an original PCR genotyping strategy. More precisely, we designed a set of primers flanking the LSL containing region. The size of the amplified products will differ according to recombination status of the LSL-T β RI^{CA} allele. Indeed, the size of the STOP containing PCR product is 1.93 kb, but is reduced to 0.35 kb when the STOP signal is removed after Cre-mediated recombination. We validated excision in several compartments, including pancreas, liver, T lymphocytes, and embryos using different Cre expressing transgenic mouse strains. This represents a simple and efficient way of monitoring the tissue specific recombination of the LSL-T β RI^{CA} allele. *genesis* 48:559–562, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Key words: TGF β ; LSL; PCR; loxP; CRE recombinase

The Cre/LoxP site-specific recombination system of bacteriophage P1 is a powerful system that is widely used in genetic engineering to target mutations to a specific cell types. We have previously generated a transgenic mouse strain (LSL-T β RI^{CA}) containing a latent constitutively active TGF β type I receptor by using a knock-in strategy into the X chromosome-linked hypoxanthine phosphoribosyl-transferase (Hprt) (Bartholin *et al.*, 2008) (Fig. 1). Transgene expression, under the control of the composite constitutive CAG (human cytomegalovirus enhancer and chicken β -actin) promoter, is prevented by a floxed-transcriptional STOP (LSL, Lox-STOP-Lox). In the presence of Cre recombinase, the “STOP” signal is excised to

allow transgene expression. LSL-T β RI^{CA} mice represent a unique and powerful tool to specifically activate TGF β signaling in a cell autonomous manner through the conditional activation of the TGF β type I receptor. In our previous studies, we targeted the activation of LSL-T β RI^{CA} transgene in T lymphocytes (Bartholin *et al.*, 2008; Doisne *et al.*, 2009). Transgene expression was verified by RT-qPCR and western blot. Transgene functionality was validated by monitoring Smad2/3 phosphorylation, Smad4 nuclear accumulation, and activation of TGF β target genes, such as PAI-1 or JunB (Bartholin *et al.*, 2008; Doisne *et al.*, 2009). However, we did not investigate in those studies the genomic rearrangement occurring at the LSL-T β RI^{CA} locus induced by Cre recombinase. This rearrangement, consisting of the excision of the STOP signal, is the first irreversible *in vivo* step for transgene expression. The possibility to monitor this genomic recombination represents a convenient, reliable, and very sensitive strategy to validate Cre-mediated recombination in the compartment of interest. We generated females with the three following genotypes: wild type (+/+), no T β RI^{CA}, heterozygous (lox/+), one T β RI^{CA} allele, and homozygous (lox/lox, two T β RI^{CA} alleles). Genotyping PCR experiments were performed on

David F. Vincent and Bastien Kaniewski contributed equally to this work.

Abbreviations: EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HBSS, Hank's Buffered Salt Solution; Hprt, hypoxanthine phosphoribosyl-transferase, LSL, Lox-STOP-Lox, TBE, Tris Borate EDTA.

* Correspondence to: Laurent Bartholin, INSERM, U590, Lyon, F-69008, France. E-mail: laurent.bartholin@inserm.fr

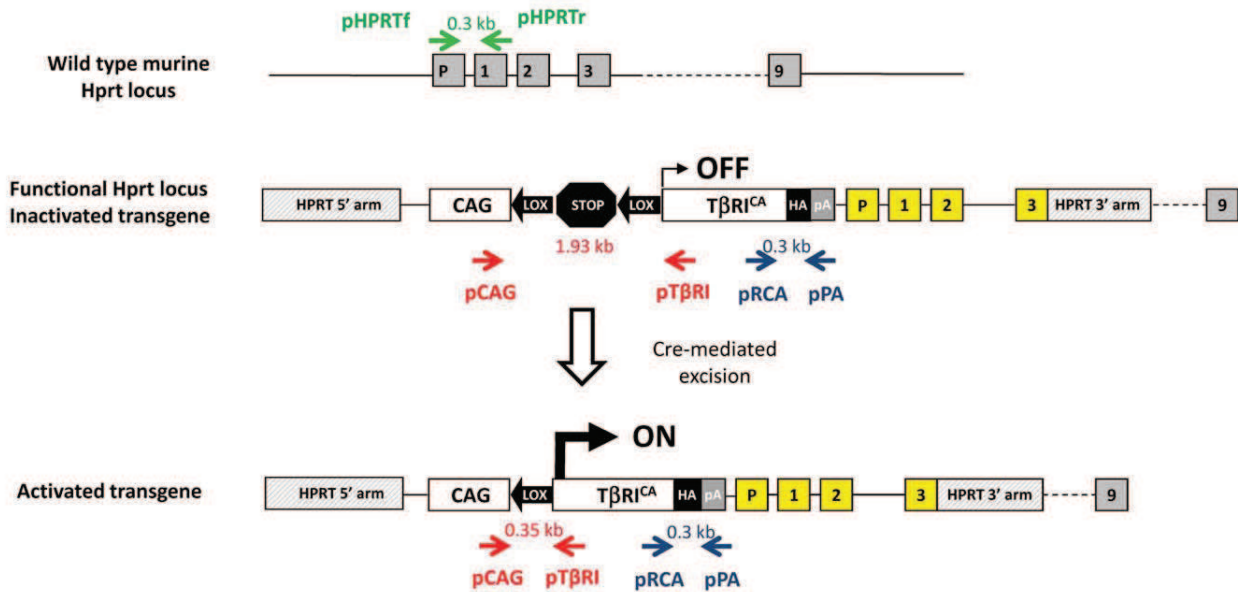
Contract grant sponsor: NIH, Contract grant number: RO1 HD52707, Contract grant sponsors: ARC, INSERM Avenir and INSERM Atip/Avenir, INCA, Ligue Contre le Cancer, ANR

Published online 19 July 2010 in

Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/dvg.20653

A



B

pCAG : 5'- ctctagagcctctgctaacc -3' 1.93 kb
pTβRI : 5'- gacagcaacggaattcgatc -3'
pHPRTf : 5'- gagggagaaaaatgaggagtg -3' 0.3 kb
pHPRTTr : 5'- ctccggaagcagtgaggtaag 3'
pRCA : 5'- ttgtgaacagaagttaagc -3' 0.3 kb
pPA : 5'- agaaagaacaatcaagggtcc -3'

FIG. 1. LSL-TβRI^{CA} transgene at the Hprt locus. (a) Site-directed TβRI^{CA} transgene integration by homologous recombination into the Hprt locus and Cre-mediated excision of the transcriptional “STOP” allowing TβRI^{CA} expression are represented. Specific sets of primers allowing genotyping are shown and the expected size of amplified bands is also represented. Numbered gray boxes, mouse Hprt exons; Numbered yellow boxes, human Hprt exons; P, Hprt promoter; CAG, composite constitutive CAG (human cytomegalovirus enhancer and chicken β-actin) promoter; LSL, floxed-transcriptional STOP; hatched boxes, Hprt homology arms allowing homologous recombination and insertion of one single copy of the transgene at the Hprt locus; pA, polyadenylation signal; HA, hemagglutinin tag epitope. (b) Sequence of primers used for PCR genotyping (size of corresponding amplified fragments is shown on the right).

genomic DNA extracted from different organs samples using the three set of primers. We previously reported (Bartholin *et al.*, 2008; Doisne *et al.*, 2009) a primer set specifically designed to detect the presence of the TβRI^{CA} transgene. The forward primer (pRCA) is located in the 3' end of the TβRI^{CA} coding sequence and the reverse primer (pPA) is located in the polyadenylation signal (Fig. 1). As expected, these primers amplify a band of 0.3 kb only in homozygous and heterozygous mutant animals (Fig. 2a). Once the transgene is inserted, the Hprt locus is disrupted then providing a convenient way to discriminate homozygous (lox/lox) and heterozygous (lox/+) mutant animals. Indeed, contrary to homozygous (lox/lox) females, heterozygous (lox/+) females still have a wild type Hprt allele that we can detect using a second set of primers (Bartholin *et al.*, 2008; Doisne *et al.*, 2009). The forward primer (pHPRTf) is located in the mouse Hprt endogenous promoter and the reverse

primer (pHPRTTr) is located in the mouse Hprt Exon 1, which is replaced by human Exon 1 when the TβRI^{CA} transgene is inserted (Fig. 1). pHPRTTr primer specifically recognizes a nucleotide sequence that is not conserved between mouse and human Hprt genes to permit the detection of the murine wild type Hprt allele. As expected, this second set of primers amplifies a band of 0.3 kb only in wild type (+/+) and heterozygous (lox/+) individuals (no band in homozygous mutants) (Fig. 2a). To discriminate non-recombined (STOP signal is present) and recombined (STOP signal is excised) TβRI^{CA} alleles, we set up a PCR-based genotyping strategy, enabling rapid screening for the STOP signal excision that occurs in the presence of Cre recombinase. We designed a third set of primers flanking the LSL containing region (Fig. 1). The forward primer (pCAG) is located in the 3' end of the CAG promoter and the reverse primer (pTβRI) is located in the 5' end of

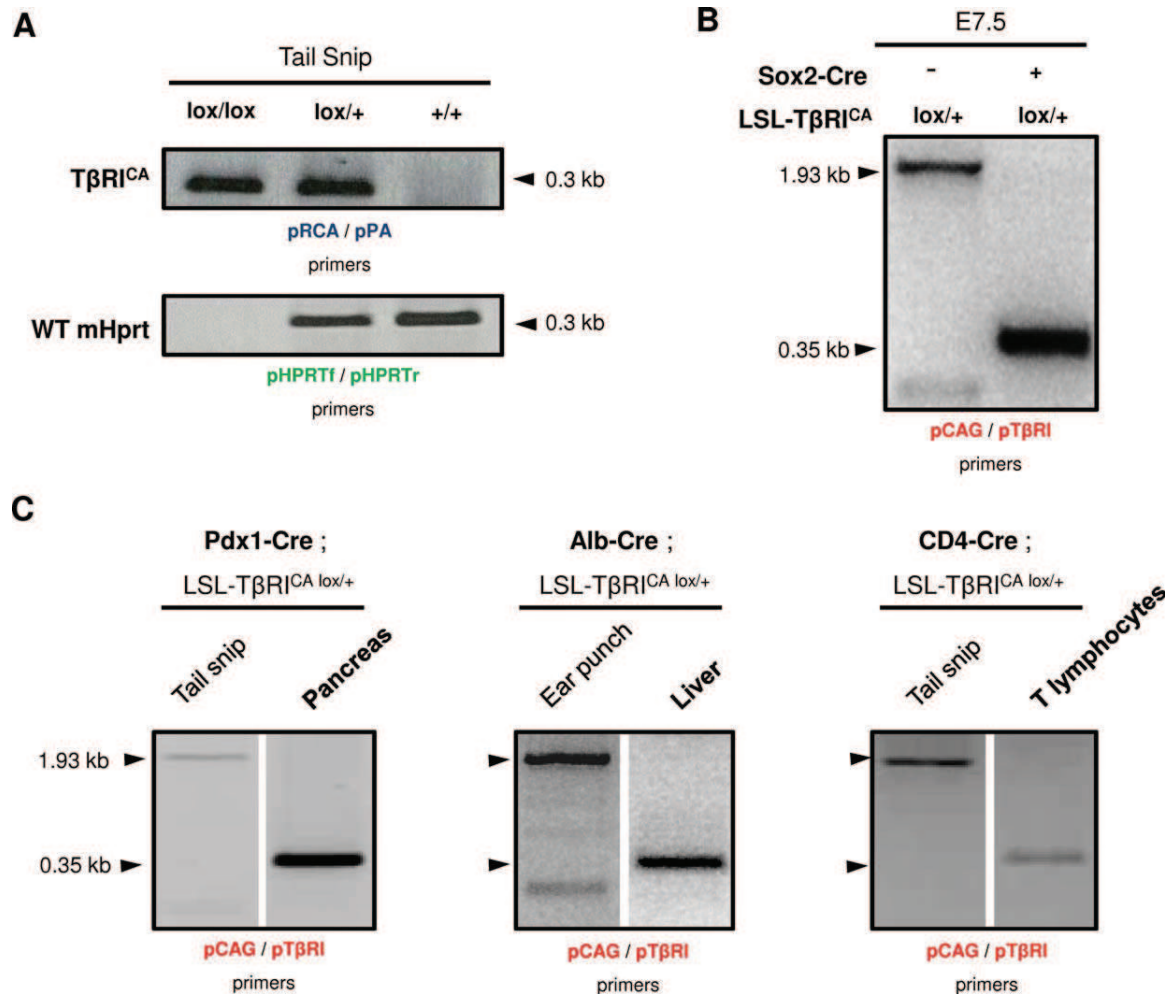


FIG. 2. The presence, the copy number, and the recombination status of LSL-TβRI^{CA} transgene is evaluated by PCR on genomic DNA using three different sets of primers. **(a)** PCR performed on tail snips from LSL-TβRI^{CA} lox/lox, LSL-TβRI^{CA} lox/+ and LSL-TβRI^{CA} +/+ females. pRCA/pPA primers confirmed the presence of the transgene in LSL-TβRI^{CA} lox/lox and LSL-TβRI^{CA} lox/+ individuals. pHPRTf/pHPRTr primers confirmed the absence of wild type mouse Hprt gene (WT Hprt) in LSL-TβRI^{CA} lox/lox individual. **(b)** PCR performed on E7.5 embryos with LSL-TβRI^{CA} lox/+ with or without the Sox2-Cre transgene to explore the excision of the floxed STOP signal located upstream the TβRI^{CA} coding sequence. Correct excision of the STOP signal is monitored by the presence of a 0.35 kb recombined band present only in Sox2-Cre; LSL-TβRI^{CA} lox/+ individuals. **(c)** PCR performed on specific organs to validate that STOP excision could be targeted in a specific cellular compartment inside the same individual. Excision was analyzed in pancreas, liver, and T lymphocytes using tissue specific Cre recombinases (Pdx1-Cre for pancreas, Alb-Cre for liver and CD4-Cre for T lymphocytes). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

the TβRI^{CA} coding sequence. The expected size of the amplified fragment is 1.93 kb if the STOP signal is present (non recombined mutant allele). The expected size of the amplified fragment drops to 0.35 kb when the STOP signal is removed after Cre-mediated recombination (recombined mutant allele). To visualize this recombination *in vivo*, we bred epiblast specific Sox2-Cre (Hayashi *et al.*, 2002) heterozygous mice with LSL-TβRI^{CA} lox/+ mice. Whole embryos were removed at E7.5 and genotyped using the pCAG/pTβRI primer set. As expected, PCR performed with Sox2-Cre; LSL-TβRI^{CA} lox/+ embryos detected a 0.35 kb band, validating the correct excision of the STOP signal (Fig. 2b). In the absence of Sox2-Cre allele, a 1.93 kb band characterizing the non-

recombined LSL-TβRI^{CA} lox/+ allele is observed. This result demonstrates that the pCAG/pTβRI primer set we designed here allows visualizing LSL-TβRI^{CA} recombination occurring *in vivo* in a whole embryo expressing the Cre recombinase. We next attempted to determine whether organ-specific *in vivo* recombination could be detected. To that end, we tested specific recombination in three different compartments: pancreas, liver, and T lymphocytes. LSL-TβRI^{CA} mice were crossed with Pdx1-Cre mice, which express the Cre recombinase during early embryogenesis in pancreatic cells from all lineages (endocrine, acinar, centroacinar, and ductal cells) (Gu *et al.*, 2002). LSL-TβRI^{CA} mice were also crossed with Alb-Cre mice (Postic *et al.*, 1999) (expression of Cre recombinase in the liver under

the control of the albumin promoter) and CD4-Cre mice (Lee *et al.*, 2001) (expression of Cre recombinase in T lymphocytes under the CD4 promoter). Recombination in the progeny obtained from these crosses and bearing both Cre and LSL-T β RI^{CA} transgenes was then analyzed by PCR (Fig. 2c). As expected, the 0.35 kb recombined band was observed only in organs that express Cre recombinase, e.g. in the pancreas of Pdx1-Cre; LSL-T β RI^{CA}, in the liver of Alb-Cre; LSL-T β RI^{CA}, and in the T lymphocytes of CD4-Cre; LSL-T β RI^{CA}. In each case PCR performed from tails snips or ear punches revealed the presence of the 1.93 kb band attesting to the presence of the non-recombined allele. This represents a simple and efficient way of monitoring the recombination status of the LSL-T β RI^{CA} allele.

MATERIALS AND METHODS

Mice

We generated LSL-T β RI^{CA} transgenic animals (Bartholin *et al.*, 2008) by inserting at the Hprt locus of the Lox-STOP-Lox cassette positioned upstream of constitutively active TGF β type I mutant receptor because of three missense mutations: T204D that constitutively activates the T β RI kinase (Wieser *et al.*, 1995) and L193A/P194A that prevent binding of the T β RI inhibitor, FKBP12 (Chang *et al.*, 1998). Pdx1-Cre (pancreas) (Gu *et al.*, 2002), CD4-Cre (T lymphocytes) (Lee *et al.*, 2001), Alb-Cre (liver) (Postic *et al.*, 1999), and Sox2-Cre (embryos) (Hayashi *et al.*, 2002). Mouse strains were previously described and published by others. All animals were handled in accordance with either institutional or regional guidelines.

Samples Preparation

DNA was isolated and purified from different tissues according to the standard "HotShot" DNA extraction (alkaline lysis at 95°C for 30 min before acidic neutralization) protocol (Truett *et al.*, 2000). More precisely, for mouse pancreas preparation, pancreas was diced with a scalpel and incubated in collagenase IA 200 U/ml (Sigma), Hepes 10 mM (Invitrogen), and soybean trypsin inhibitor 0.25 mg/ml (Sigma) in HBSS (Invitrogen). T lymphocytes were purified with an AutoMACS Pro magnetic cell sorter and magnetic beads (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) using an anti-mouse CD4 (L3T4, BD Biosciences), as previously described (Marie *et al.*, 2006). Embryos were dissected out at E7.5 without yolk-sac liver samples, were prepared from very small piece of liver, and did not undergo further treatment before "HotShot" DNA extraction procedure.

PCR

To visualize recombined LSL-T β RI^{CA} allele (pCAG/pT β RI primer set), PCR was carried out using 2 μ l of DNA prepared by "HotShot" procedure in a final volume of 25 μ l. The reaction mixture was made up of 0.2 μ M of

each primers, 0.01 U/ μ l Platinum Taq DNA polymerase, 0.2 mM dNTP, and 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen). The samples were initially heated at 94°C for 5 min followed by 35 cycles, each consisting of 30 second at 94°C, 1 min 30 s at 58°C, and 2 min 30 s at 72°C, and a final extension at 72°C for 5 min in an Biometra thermocycler. As we previously described (Bartholin *et al.*, 2008), the presence (pRCA/pPA primer set) of the LSL-T β RI^{CA} allele and mouse wild type Hprt allele (pHPRTf and pHPRT_r) annealing temperature was set up at 60°C. PCR products were migrated on 2% agarose gel in TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA), stained by ethidium bromide (Euromedex), and evaluated under UV light.

ACKNOWLEDGMENTS

DFV is a MENRT doctoral fellow. The funding groups had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

LITERATURE CITED

- Bartholin L, Cyprian FS, Vincent D, Garcia CN, Martel S, Horvat B, Berthet C, Goddard-Leon S, Treilleux I, Rimokh R, Marie JC. 2008. Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor β signaling through the T β RI/ALK5 receptor. *Genesis* 46:724-731
- Chang MJ, Frenkel PA, Lin Q, Yamada M, Schwartz RJ, Olson EN, Overbeek P, Schneider MD. 1998. A constitutive mutation of ALK5 disrupts cardiac looping and morphogenesis in mice. [Erratum appears in *Dev Biol* 1998 Oct 15;202(2):315. Note: Yumada M (corrected to Yamada M)]. *Dev Biol* 199:72-79.
- Doisne JM, Bartholin L, Yan KP, Garcia CN, Duarte N, Le Luduec JB, Vincent D, Cyprian F, Horvat B, Martel S, Rimokh R, Losson R, Benlagha K, Marie JC. 2009. iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *J Exp Med* 206:1365-1378.
- Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129:2447-2457.
- Hayashi S, Lewis P, Pevny L, McMahon AP. 2002. Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain. *Mech Dev* 119 (Suppl 1):S97-S101.
- Lee PP, Fitzpatrick DR, Beard C, Jessup HK, Lehar S, Makar KW, Perez-Melgosa M, Sweetser MT, Schlissel MS, Nguyen S, Cherry SR, Tsai JH, Tucker SM, Weaver WM, Kelso A, Jaenisch R, Wilson CB. 2001. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15:763-774.
- Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. 2006. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor- β receptor. *Immunity* 25:441-454.
- Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, Shelton KD, Lindner J, Cherrington AD, Magnuson MA. 1999. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J Biol Chem* 274:305-315.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. 2000. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* 29:52.
- Wieser R, Wrana JL, Massague J. 1995. GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF- β receptor complex. *Embo J* 14:2199-2208.

II – Coopération *in vivo* de la voie du TGFβ et de l'oncogène Kras^{G12D}

Article 3

Vincent, D.F., L. Alcaraz, J. Gout, V. Arfi, R.M. Pommier, B. Kaniewski, S. Martel, S. Goddard-Léon, A. Colombe, G. Fourel, I. Treilleux, U. Valcourt, P. Dubus, and L. Bartholin. Transforming Growth Factor β Cooperates with Activated KRAS to Induce Pancreatitis in Mice. *En préparation*

Introduction

Il est aujourd'hui reconnu que l'inflammation tient une part importante dans le développement des cancers (Hanahan and Weinberg, 2011). Des patients atteints de pancréatite chronique, par exemple, présentent un risque accru de développer un PDAC. Il a de plus été démontré *in vivo* que l'inflammation du pancréas facilitait l'initiation et la progression tumorale (Guerra et al., 2007; Carrière et al., 2009). Cependant, les mécanismes moléculaires contrôlant l'initiation de la pancréatite restent encore méconnus. Plusieurs arguments suggèrent que la voie Ras et la voie du TGFβ sont impliquées dans ce processus. Il a été en effet démontré que les voies MAPK étaient requises pour l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les cellules acineuses (Samuel et al., 2006b; Williard et al., 2010) et que l'inhibition de la voie ERK inhibait *in vivo* le développement de pancréatites induites par la céruléine (Mazzon et al., 2012). De façon intéressante, un effet similaire a été observé suite à l'inhibition de la voie du TGFβ (Wildi et al., 2007; He et al., 2009). L'objectif de cette étude a donc été de déterminer *in vivo* le rôle de l'activation combinée de la voie du TGFβ et de l'oncogène Kras^{G12D} dans le pancréas.

Résultat

Nous avons généré des souris exprimant spécifiquement l'allèle TβRI^{CA} dans le pancréas (Pdx1-Cre ; LSL-TβRI^{CA}) (CR). Ces animaux sont viables et ne présentent pas de phénotype particulier. Nous avons validé par Western-Blot et RT-qPCR que la voie du TGFβ

pouvait être spécifiquement activée dans les cellules épithéliales pancréatiques. Les animaux exprimant l'oncogène Kras seul dans le pancréas (Pdx1-Cre ; Kras^{G12D}) (CK) développent des lésions précancéreuses à partir de 8 semaines. Grâce à ce modèle, nous avons montré que l'activation couplée de l'oncogène Kras^{G12D} et de la voie du TGFβ *in vivo* dans les cellules pancréatiques (Pdx1-Cre ; Kras^{G12D} ; LSL-TβRI^{CA}) (CKR) induisait, chez les souris femelles, une destruction du parenchyme pancréatique, une infiltration immunitaire et un développement précoce de lésions précancéreuses dès 3 semaines. Les mâles CKR ont présenté un phénotype similaire mais sont morts peu après leur naissance. Des études *in vitro* nous ont permis de montrer que l'activation de la voie du TGFβ dans des cellules acineuses de pancréas exprimant l'oncogène Kras^{G12D}, induisait leur mort cellulaire associée à une activation des voies proinflammatoires. Ceci a été confirmé *in vivo* où la proportion de cellules apoptotiques et l'expression de marqueurs proinflammatoires sont plus importantes dans le pancréas des souris CKR comparées au souris CK.

Conclusion

Cette étude montre que l'activation de la voie du TGFβ dans les cellules pancréatiques coopère avec l'oncogène Kras^{G12D} pour induire une pancréatite, une inflammation du pancréas facilitant la progression tumorale. Ce phénotype résulterait de la mort des cellules acinaires associée à la sécrétion de cytokines proinflammatoires, induites par la coopération entre la voie du TGFβ et l'oncogène Kras^{G12D}.

Transforming Growth Factor β Cooperates with KRAS^{G12D} to Induce Pancreatitis in Mice

David F. Vincent^{1,2,3,4,5}, Lindsay Alcaraz^{1,2,3,4,5}, Johann Gout^{1,2,3,4,5}, Vanessa Arfi^{1,2,3,4,5}, Roxane M. Pommier^{1,2,3,4,5}, Bastien Kaniewski^{1,2,3,4,5}, Sylvie Martel^{1,2,3,4,5}, Sophie Goddard-Léon⁵, Amélie Colombe⁵, Geneviève Fourel^{1,2,3,4,5}, Isabelle Treilleux^{1,2,3,4,5}, Ulrich Valcourt^{1,2,3,4,5}, Pierre Dubus⁶, Laurent Bartholin^{1,2,3,4,5,‡}

¹ Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

² CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

³ Université de Lyon, F-69000 Lyon, France

⁴ Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France

⁵ Centre Léon Bérard, F-69000 Lyon, France

⁶ EA 2406, Univ. Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France

[‡] Corresponding author: laurent.bartholin@lyon.unicancer.fr

RUNNING TITLE: TGF β signaling and Pancreatitis

Introduction

Acute pancreatitis is an inflammatory disease characterized by the destruction of the pancreatic acinar tissue, colonization by immune infiltrates and the early onset of precancerous lesions. In some cases, when the stress is sustained and/or the lesions are too severe, the chronic pancreatitis will develop, eventually causing pancreatic insufficiency or failure as a result of the replacement of pancreatic parenchyma by fat tissue or fibrotic tissue. At the end of the spectrum, pancreatitis will evolve towards pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). The functional relationship between inflammation and tumoral transformation has been extensively described (Hanahan and Weinberg, 2011). However, little is known about the initiating cellular and molecular events causing pancreatitis. Pancreatitis may result from i) the inappropriate activation of chymotrypsine, ii) the activation of an internal stress, and, iii) the secretion of inflammation cytokines by the epithelial pancreatic cells (Rosendahl et al., 2007). Both environmental conditions and genetic events seem to be very important. Examples of environment (Tobacco, fat diet...) and familial predisposition (PRSS1, etc...) are believed to be of high importance for pancreatitis (Rosendahl et al., 2007; Klein, 2004). Sporadic Kras activating mutations and resulting constitutively active MAPK are also important. For instance, inhibition of the MAPK pathway compromises the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice (Mazzon et al., 2012). High level of RAS activity in the pancreatic acinar compartment of transgenic mice induces inflammation and pancreatitis (Ji et al., 2009). In turn, inflammation, induced by chemical treatments such as that using cerulein, may facilitate Kras^{G12D}-induced PanINs formation and their eventual progression towards more aggressive lesions (De La O and Murtaugh, 2009; Guerra et al., 2007; Carrière et al., 2009). Endogenous level of activated Kras is however not sufficient to induce pancreatitis, other factors being required. Among the factors found highly expressed during pancreatitis, TGF β is found in patient serum and is correlated with severity of pancreatitis (Yasuda, 2008; Adrych et al., 2011). TGF β signals through a heterodimeric receptor composed of two subunits, the type I and type II TGF β receptors (respectively T β RI and T β RII). Upon binding to its receptors, TGF β allows T β RII to transphosphorylate T β RI which, in turn, activates the canonical SMAD pathway and other signaling pathways (MAPK, RhoA or PI3K/AKT) (Derynck and Zhang, 2003). The diversity of the intracellular cascades regulated by TGF β also contributes crucially to the oncogenic action of TGF β , exerted through different mechanisms such as inhibition of the immune

response, matrix remodeling, angiogenesis, and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (Massagué, 2008; Ikushima and Miyazono, 2010b; Thiery et al., 2009). Several murine models demonstrated that pancreatic inflammation needs an active TGF β signaling. Indeed, it has been shown that inhibition of TGF β signaling in transgenic mice expressing a dominant negative type II TGF β receptor (Nagashio et al., 2004; Yoo et al., 2005; Wildi et al., 2007) or the SMAD7 inhibitory SMAD (He et al., 2009) blocked cerulein-induced pancreatitis.

The precise role of TGF β activation as well as its possible interaction with Kras activation in pancreatic epithelial cells, remain elusive. In this study, we explored the combined effect of these two pathways involved in pancreatitis by generating an original mouse model. We have determined both *in vitro* and *in vivo* that TGF β could promote apoptosis and inflammation of Kras-expressing acinar cells. We show that simultaneous pancreas-specific expression of *KRAS^{G12D}* and *T β RI^{CA}* results in pancreatic parenchyma destruction, massive immune infiltrates, and early onset of precancerous ductal lesions, this phenotype being reminiscent of human pancreatitis.

Results

Conditional expression of a constitutively activated type I TGF β receptor in the pancreas of transgenic mice

To examine the effect of TGF β gain-of-function alone and in combination with *KRAS^{G12D}*, we analyzed the offspring (34 litters representing 219 progenies viable at weaning) of crosses between [*LSL-T β RI^{CA/+}*] females (**R[♀]**) and [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}*] males (**CK[♂]**) (Table S1, summarized in **Figure 1A**). We first focused on mice displaying pancreatic expression of *T β RI^{CA}*, in the absence of *KRAS^{G12D}*. The observed proportion of [*Pdx1-Cre; LSL-T β RI^{CA/+}*] females (**CR[♀]**, n=14) and [*Pdx1-Cre; LSL-T β RI^{CA/0}*] males (**CR[♂]**, n=8) does not differ significantly from those expected and there was no measurable impact on overall survival. The presence of the floxed transcriptional STOP in the pancreatic genome of the **R** mice was attested by the presence of a 1.93-kb polymerase chain reaction (PCR) fragment (**Figure 1B, lane R**). In contrast, excision of the floxed transcriptional STOP from the pancreatic genome of **CR** mice was attested by the presence of a 0.35-kb PCR fragment (**Figure 1B, lane CR**). No band was observed with genomic DNA prepared from pancreases of control mice lacking

the *LSL-TβRI^{CA}* transgene (**Figure 1B, lane WT**). We next assessed both the expression and the activity of the conditionally activated *LSL-TβRI^{CA}* transgene. TβRI^{CA} tagged with hemagglutinin epitope (HA) at the C-terminus was used to facilitate further detection with an anti-HA antibody. Western blotting revealed marked accumulation of TβRI^{CA}, correlating with an increased level of phospho-Smad2 (P-Smad2) protein in the pancreases of **CR** versus **R** mice (**Figure 1C**). A minor leak of TβRI^{CA} protein expression was observed in **R** mice, resulting in a negligible P-Smad2 increase. A reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) carried out with a set of previously described primers (Bartholin et al., 2008) specifically detecting the mutant *TβRI^{CA}* (the forward primer hybridizing in the *TβRI^{CA}* coding sequence of the transgene, and the reverse primer hybridizing in the HA coding sequence) revealed a 37-fold enrichment in *TβRI^{CA}* mRNA in pancreases of **CR** mice as compared to **R** mice (**Figure 1D**). As expected, no amplicon was detected in pancreases from WT mice, which do not bear the transgene. The increased *TβRI^{CA}* mRNA level was found to correlate with up regulation of the well-known TGFβ target genes *Pai-1* (x 3.5) and *JunB* (x 6.7) (**Figure 1D**). Altogether, our results indicate that TGFβ signaling is efficiently activated in the pancreas of mice expressing the *TβRI^{CA}* transgene (**CR** mice). This activation is not sufficient, however, to significantly compromise pancreatic development and the function of the organ under normal conditions, since **CR** mice (3 weeks < age < 1 year, n=22, **Table S2**) showed unaltered survival and no histological anomalies (data not shown). We next focused on the effect of combining TGFβ signaling activation with the development of *KRAS^{G12D}*-induced precancerous PanIN lesions. We investigated [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-TβRI^{CA/+}*] females (**CKR[♀]**) and [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-TβRI^{CA/0}*] males (**CKR[♂]**) obtained from the **R[♀]** x **CK[♂]** crosses (**Figure 1A** and **Table S1**). Strikingly, only one **CKR[♂]** mouse (with a runt phenotype) was present at weaning, whereas all the other expected populations, including **CKR[♀]** (n=18), were present in proportions that did not differ significantly from the expected ones. We speculated that the quasi-absence of **CKR[♂]** (n=1; Chi-square test, *p*=0.00056) might be due to massive embryonic or perinatal death of these males. To determine if the **CKR[♂]** are present at the end of the pregnancy or if a proportion is lost earlier during the embryonic development, we set up new **R[♀]** x **CK[♂]** crosses. Pregnant females (**R[♀]**; n=7) were euthanized at 19.5 days post-coitum (dpc) and embryos were collected (n=49) (**Figure 1A** and **Table S1**). **CKR** male embryos (**CKR[♂]**; n=5) were

obtained, indicating that newborns with this genotype die shortly after birth, before the age of weaning at 21 days.

Activation of TGF β signaling in a *KRAS*^{G12D} background results in pancreatic parenchyma destruction, immune infiltrate, and early onset of premalignant ductal lesions

We performed a systematic histological examination of pancreases resected from **CKR**[♀] mice euthanized at different ages (n=18, 30 days < age < 386 days) (**Table S2**). The pancreatic parenchyma is mainly composed of acinar cells, which represent the bulk of the organ mass. Strikingly, the parenchyma appeared markedly reduced in all the **CKR**[♀] mice as early as 30-40 days of age, and this reduction of acinar tissue was found to increase with age (**Figure 2A**). In **CR**[♀] mice (expressing only *T β RI*^{CA} in their pancreases, data not shown) and **CK**[♀] mice (expressing only *KRAS*^{G12D}, **Figure 2A**) the parenchyma appeared unaffected at 30-40 days of age. The pancreatic disorganization observed in **CKR**[♀] mice was associated with the presence of abundant immune infiltrates. To characterize these infiltrates, we detected macrophages (F4/80), neutrophils (MPO), and lymphocytes (CD3) by immunohistochemistry experiments. Our results (**Figure 2B**) led us to conclude that the infiltrating leukocyte population consisted predominantly of macrophages and neutrophils. Another notable feature of the pancreatic phenotype of **CKR**[♀] mice was the presence of epithelial lesions. These lesions appeared positive for the marker cytokeratin 19 (CK19), attesting their ductal differentiation (**Figure 2C**). Careful pathological examination revealed the presence of acinar-to-ductal metaplasia (ADM) and pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) (**Figure S1A, B, C**). The lesions were found to increase in severity with age (**Figure 2A**). Remarkably, they could occasionally evolve to PDAC, as attested by the well-developed PDAC observed in one **CKR**[♀] mice euthanized at 343 days of age (**Figure S1D**). It is noteworthy that 19.5-dpc **CKR**[♂] embryos showed a comparable phenotype, arising much earlier: histological analyses (**Figure S2**) revealed a massively reduced number of mature acinar cells, suggesting that the death of **CKR**[♂] individuals shortly after birth is most likely due to pancreatic failure. This early appearance of the phenotype in **CKR**[♂] mice is compatible with the mosaic hypothesis of X-linked transgene (see discussion). Histological analysis of the only male having survived to age 383 days revealed severe atrophy of the acinar structures, most lobules being replaced by mature adipocytes. Why this male survived

so long is unclear, but this may be due a sporadic genetic or epigenetic event having led to weakened functionality of the transgene (**Figure S3**).

Altogether, the phenotype observed in **CKR**[♀] mice (massive reduction of the acinar compartment, immune infiltrates, and ductal metaplasia/dysplasia) is reminiscent of severe acute pancreatitis. Pancreatitis has long been recognized as a risk factor for pancreatic carcinogenesis (Rosendahl et al., 2007). Although we demonstrate the early emergence of premalignant lesions in **CKR**[♀] mice, our study falls short of demonstrating that pancreatitis facilitates progression toward aggressive tumors (PDAC), as previously described in other mouse models (Guerra et al., 2007; Carrière et al., 2009; Fukuda et al., 2011; Lesina et al., 2011). The shorter lifespan of **CKR** mice (**CKR**[♂] mice die just after birth and **CKR**[♀] mice had to be euthanized because of degradation of their general health) prevents to obtain an aging cohort that would have enabled us to address this specific question.

TGFβ compromises the growth and the viability of AR42J-KRAS^{G12D} epithelial cells

To explore more precisely the cellular and molecular mechanisms responsible for the massive reduction in pancreatic acinar cell number observed in **CKR** mice, we performed *in vitro* assays on AR42J pancreatic acinar cells infected with either a wild-type (WT) retroviral vector or a KRAS^{G12D} retroviral vector (AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} cells). That KRAS^{G12D} was present and functional was ascertained by visualizing a significant increase in the level of active GTP-bound RAS protein in AR42J-KRAS^{G12D} cells, as compared to AR42J-WT cells (**Figure 3A**). To evaluate their sensitivity to TGFβ, we treated the cells for one hour with TGFβ. As expected, western blotting performed on AR42J-WT cells revealed an accumulation of P-Smad2 (phosphorylated Smad2) after TGFβ treatment. Strikingly, AR42J-KRAS^{G12D} cells treated with TGFβ showed a much higher increase in P-Smad2 after TGFβ treatment and when these cells are cultured in the presence of the U0126 ERK inhibitor, which can effectively block the constitutive phosphorylation of ERK observed in AR42J-KRAS^{G12D} cells treated or not with TGFβ is no longer efficient to potentiate the accumulation of P-Smad2 in response to TGFβ (**Figure 3B**). This observation indicates that potentiation of the TGFβ response in AR42J-KRAS^{G12D} is tightly dependent on the ERK activation, most likely resulting from constitutive KRAS activity. It is worth noting that the levels of total Smad2 did not differ significantly between the two cell populations (**Figure 3B**).

Together, these results indicate that KRAS^{G12D} activation strongly potentiates Smad-dependent TGF β signaling. To further explore this potentiation, we investigated the capacity of KRAS^{G12D} to modulate the well-known tumor-suppressive effects of TGF β , *i.e.* cytostasis and/or apoptosis (Heldin et al., 2009). To assess the proliferative behavior of AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} cells, we used a fluorimetric growth indicator based on detection of metabolic activity. TGF β treatment was found to affect the AR42J-WT cell growth only slightly, and not until 72 hours after the start of treatment (**Figure 3C, top panel**). In contrast, 24 hours of TGF β treatment was sufficient to compromise severely the growth rate of AR42J-KRAS^{G12D} cells (**Figure 3C, bottom panel**). U0126 is able to restore, at least partially, the growth of TGF β -treated AR42J-KRAS^{G12D} cells indicating that activation of the ERK pathway is crucial to confer TGF β its capacity to compromise the cell growth (**Figure 3C**). Finally, we carefully examined the cells by phase-contrast microscopy. The AR42J-KRAS^{G12D} cell population treated with TGF β for 48 hours showed a much lower cell density than any of the other populations examined, with weakly refractive adherent cells and numerous floating cells (**Figure 3D, red stars**).

KRAS^{G12D} potentiates TGF β -induced cell death in pancreatic acinar cells

Our previous observations suggest massive cell death when TGF β signaling and KRAS^{G12D} oncogene are simultaneously activated, and may explain the poor growth rate of TGF β -treated AR42J-KRAS^{G12D} cells. We next investigated whether the cellular mechanism by which TGF β and KRAS^{G12D} cooperate to compromise cell growth. To gain insight into the cooperative molecular mechanisms, we cultured AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} cells for 24 hours in the presence and absence of TGF β and assessed whether apoptosis might contribute to the decreased number of TGF β -treated AR42J-KRAS^{G12D} cells. To that end, we performed terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) experiments (**Figure 4A**). TGF β treatment does not significantly increase the number of apoptotic cells in the AR42J-WT population, as compared to 3-fold in the AR42J-KRAS^{G12D} population. AR42J cells become sensitive to TGF β -induced apoptosis when KRAS^{G12D} is present. Interestingly, we observed that the SMAD inhibitor SB431542 (Inman et al., 2002b) efficiently compromises the phosphorylation of Smad2 (**Figure S4**) and is able to decrease the number of TUNEL-positive AR42J-KRAS^{G12D} cells (**Figure 4A**). Then the apoptosis induced by TGF β in a Kras^{G12D} background requires intact Smad signaling pathways. These results were confirmed by a caspase 3 activity assay. Indeed, we observed that TGF β induces

an increased caspase 3 activity only in AR42J-KRAS^{G12D} cells, this activation being blocked in the presence of the SB431542 inhibitor (**Figure 4B**). Finally, we determined that both apoptosis and necrosis, evaluated by PI/Annexin V staining, were involved in acinar cell death of TGFβ-treated AR42J-KRAS^{G12D} (**Figure 4C**).

TGFβ induces the expression of inflammation markers in AR42J-KRAS^{G12D} epithelial cells

We have determined that TGFβ induces cell death in Kras^{G12D}-expressing acinar cells. Acinar cell death is considered as a hallmark of human pancreatitis ((Gukovskaya and Gukovsky, 2011; Booth et al., 2011) as well as the expression of proinflammatory cytokine secretion by the acinar cell compartment (Yasuda et al., 1999; Lee et al., 2003). To attest the activation of proinflammatory pathway activation, expression of NF-KB and IL-6 expression was assessed by Western Blot in AR42J model following TGFβ treatment. We observed that TGFβ treatment both increased p50-NF-KB subunit and IL6 expression only in Kras-expressing AR42J attesting that co-activation of TGFβ signaling and Kras oncogene promotes inflammation (**Figure 4D**).

Increased cell death and expression of inflammation markers in the pancreas of [Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-TβRI^{CA}] mice

To investigate whether co-activation of TGFβ and KRAS signaling also cooperate *in vivo* to stimulate cell death and inflammation, we performed first TUNEL assays on histological sections prepared from pancreases of 8-week-old **CK** and **CKR[♀]** mice (**Figure 5A**). Sections obtained from **CKR[♀]** mice showed a significantly higher proportion of apoptotic cells (3.5%) than sections obtained from **CK** mice (0.8%). Finally we have attested by immunohistochemistry that the pancreas of CKR[♀] mice is highly positive for CD31 and IL1R1, two pro-inflammatory chemokines (**Figure 5B**).

Discussion

In this work, we addressed for the first time the effect of combined activation of TGF β and the MAPK, two pathways involved in pancreatitis initiation and pancreatitis development. To that end, we generated conditional transgenic mice expressing a constitutively active type I TGF β receptor (T β RI^{CA}) and a constitutively active Kras (Kras^{G12D}) under the control of the Pdx1-Cre transgene. We report that simultaneous expression of both transgenes in the mouse pancreas result in rapid pancreatic parenchyma destruction associated with severe inflammation and the early onset of premalignant ductal lesions, a phenotype reminiscent to human acute pancreatitis.

The data obtained in the study from the careful analysis of the progenies (n=268 progenies) obtained from litters (n=41 litters) resulting from crosses between [*LSL-T β RI^{CA/+}*] females (R[♀]) and [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}*] males (CKR[♂]). Note that CKR[♀] present the first signs of pancreatitis 3 weeks of age whereas CKR[♂] individuals die shortly after birth. The more severe phenotype observed in males is imputable to the location of the T β RICA transgene at the X chromosome. The *LSL-T β RI^{CA}* allele being located at the *Hprt* locus on the X chromosome (Bartholin et al., 2008), most of the pancreatic cells express the transgene in males. Conversely, in females, only half of them do, on average, because of the X chromosome inactivation mosaic. This early appearance of the phenotype in CKR[♂] mice is compatible with the mosaic hypothesis envisaged above and with observations on other mouse strains bearing a transgene at an X-linked locus (Hadjantonakis et al., 2001). For the first time, we show a cooperative effect of both activated KRAS and TGF β signaling pathways to induce pancreatitis. All these results demonstrate that the [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-T β RI^{CA}*] mice (CKR) represent a convenient and original model to study the precise role of TGF β in pancreatitis in the adult. It is important to underline that this model allow collecting unbiased results, which reflect cell autonomous effects in the pancreatic epithelial compartment. The conditional transgene activation strategy we developed, circumvent possible indirect effects observed in the other available models. Indeed, the other models do not allow to formally discriminating between epithelial cell-autonomous effects from effects on other cellular compartments (immune compartment, mesenchymal compartment...) as a direct consequence of the systemic administration of cerulein.

Concomitantly, we observed that TGF β treatment of Kras^{G12D}-expressing AR42J pancreatic acinar cell line resulted in increased cell death as a result of increased SMAD signaling. Interestingly, acinar cell death is considered as a hallmark of human pancreatitis (Gukovskaya and Gukovsky, 2011; Booth et al., 2011) as well as the activation of pro-inflammatory pathways (Yasuda et al., 1999; Lee et al., 2003). We provide in this work, several evidences supporting this hypothesis. Indeed, *in vitro* experiments in AR42J cells revealed that TGF β signaling strongly cooperates with KRAS^{G12D} to activate the expression of the pro-inflammatory NF κ B pathway, as well as inflammation cytokines such as IL6. However, the molecular mechanism explaining the activation of proinflammatory pathways in our model remains to be determined. Altogether, these observations suggested that the acinar destruction and induced pancreatitis observed *in vivo* in transgenic mice may result from cell death and expression of inflammation markers by the epithelial pancreatic cells. We further comforted this hypothesis showing that the pancreas of mice co-expressing T β RI^{CA} and Kras^{G12D} display expression of chemotaxis (CD31) and inflammatory markers (IL1R) as well as an increased *in vivo* apoptosis. To support our data, IL6 (Yu et al., 2006, 2009) and NF κ B (Yoo et al., 2005; Steinle et al., 1999; Guerra et al., 2007) expression, have been reported by others to be activated in cerulein-induced pancreatitis.

Human epidemiological data have suggested for long a time that pancreatitis constituted a fertile soil for pancreatic cancer development in (Lowenfels et al., 1993; Whitcomb, 2004). The functional link between pancreatitis and pancreatic cancer was further experimentally demonstrated by showing that mice expressing an activated KRAS mutant in their pancreas are more sensitive to cerulein-induced pancreatitis and present a high propensity to develop pancreatic cancers (Guerra et al., 2007; Carrière et al., 2009) via the activation of the NF κ B pathway. Independent studies using mouse models have permitted to identify other inflammation cascades crucial in the pancreatitis-PDAC axis such as the IL6-JAK/STAT (Fukuda et al., 2011; Lesina et al., 2011; Corcoran et al., 2011) and the CXCL1/CXCR2 (Ijichi et al., 2011). Interestingly, these pathways that can be interconnected, have also been demonstrated to be activated by KRAS: IL6-JAK/STAT (Ancrile et al., 2007), NF κ B (Ling et al., 2012), CXCL1/CXCR2 (Matsuo et al., 2009). Inhibition of the inflammation pathway in these models results in a decreased tumorigenesis, confirming that inflammation is a key player in tumorigenesis. For instance, inhibition of the inflammatory IKK2/ β /NF- κ B pathway completely prevents the onset of KRAS-induced pancreatic tumors in a genetically engineered mouse model (Ling et al., 2012). Because of the severity of the phenotype, our

mouse model does not permit to effectively explore whether the pancreatitis predispose mice to pancreatic cancer as described in other models even if mice develop high grade lesions at a very young age, and that a survival has develop a PDAC. However, our model gives really precious information about the early events of pancreatitis. Notably, we report that pancreatitis developed in **CKR** mice presents the hallmark of the inflammation pathways that will further support tumor progression. More interesting, we observed a very early onset of PanIN lesions and inflammatory markers in a context of both activated $Kras^{G12D}$ and TGF β signaling. It will be particularly interesting to evaluate, in our model, the effect on inflammatory pathways inhibition on early PanIN precancerous lesions development.

The present study brings new insight in the mechanisms responsible of pancreatitis initiation and a new level of complexity in the intricate relations between the TGF β -SMAD and MAPK pathways. Our results can be integrated in the original model we propose below (**Figure 6**). In the model we propose to explain the noxious effect of TGF β signaling in a $KRAS^{G12D}$ background: expression of $KRAS^{G12D}$ exacerbates the TGF β -induced tumor-suppressive mechanisms such as cytostatic/pro-apoptotic effects with the ultimate goal to eliminate $KRAS^{G12D}$ -positive cells, which present a risk of transformation. In parallel, both signaling induces inflammation pathways. Increased cell death combined to inflammation will lead to the complete disorganization of pancreatic architecture, resulting in severe acute pancreatitis associated with early onset of precancerous lesions. Most of the animals will die from pancreatic insufficiency and survivors will eventually develop PDAC.

Material and Methods

Statistical mouse population analysis

Statistical analyses were performed using Chi-square test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Mouse strains and handling

LSL-T β RI^{CA} (Bartholin et al., 2008; Vincent et al., 2010), *LSL-KRAS^{G12D}* (Jackson et al., 2001) and *Pdx1-Cre* (Gu et al., 2002) alleles were described previously. Mice were housed and bred in the specific pathogen free animal facility “AniCan” at the CRCL, Lyon, France. The experiments were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws.

Histology and immunohistochemistry

Histology experiments were performed as previously described before (Vincent et al., 2009a). Primary antibodies used were: anti-CK19 (Developmental Studies Hybridoma Bank), anti-F4/80 (Acris Antibodies), anti-CD3 (Santa Cruz BT) and anti-MPO (Dako), anti-CD31 (Abcam) and IL1R1 (Abcam).

Cell culture and infection

The rat pancreatic acinar cell line AR42J (ATCC) is cultured in DMEM supplemented with fetal calf serum (Lonza) and penicillin/streptomycin (Gibco). AR42J were infected with murine retroviral particles containing wild-type (pZip-Neo) or KRAS^{G12D}-expressing vectors (pZIP-Neo-KRAS^{G12D}, kindly provided by J. Caramel, CRCL, Lyon, France) and further cultured in the presence of geneticin (PAA).

Cell viability assay

AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} were seeded in triplicate and treated with TGFβ for 72 h (10 ng/mL, Peprotech). Cell viability was evaluated at different time points (0 h, 24 h, 48 h or 72 h). Cells were incubated with Uptiblu (Interchim) and the fluorimetric test was performed according to the manufacturer guidelines. For ERK signaling inhibition, AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} were treated for indicated time (0 h, 24 h, 48 h or 72 h) with U0126 (10 ug/mL, Sigma).

Western blotting

Western blottings were performed as previously described (Bartholin et al. 2008). We used anti-HA (Santa Cruz BT) to detect TβRI^{CA} protein, which is fused to a HA tag; anti-phospho-Smad2 (Cell Signaling); anti-Smad2 (Invitrogen); anti-Ras (Santa Cruz); anti-phospho-Erk1/2 (Cell Signaling); anti-Erk1/2 (Cell Signaling); anti-p50NF-KB (TebuBio); anti-IL6 (Abcam); anti-Actin (Invitrogen) primary antibodies and peroxydase-labeled anti-rabbit and anti-mouse (Dako) secondary antibodies.

DNA and RNA analysis

Genotyping PCR and quantitative RT-qPCR were performed as described before (Bartholin et al., 2008; Vincent et al., 2010).

RAS activity assay

GTP-bound RAS (activated RAS) was measured in cell lysates incubated with beads coated with RAF1-RBD (Upstate).

Cell Death Assay

For TUNEL assay, formaldehyde-fixed AR42J cells or tissue sections were permeabilized with PBS-Triton 0.2% and incubated with biotinylated dUTP and terminal deoxyribonucleotidyl transferase (Roche). Fragmented DNA was detected using Cy3-streptavidin (Jackson Immunoresearch) and nucleus was counterstained with DAPI (Sigma). For Annexin V assay, AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} were seeded in duplicate and treated with TGFβ for 48 h (10 ng/mL, Peprotech). Cells were harvested in PBS and incubated with Annexin V-FITC and propidium iodide (BD Pharmingen) according to manufacturer's instructions and analyzed by flow cytometer (FACS Calibur). For Caspase 3 activation, AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} were seeded in triplicate and treated with TGFβ for 12 h (10 ng/mL, Peprotech). The caspase-3 activity assay was performed using Caspase 3/ CPP32 Fluorimetric Assay Kit, according to manufacturer's instructions (Gentaur Biovision). For Smads signaling inhibition, AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} were treated for indicated time with SB431542 (10 μg/mL, Sigma).

Acknowledgements

We thank the Centre Léon Bérard pathogen-free animal facility lateforme "AniCan", and each of its members for technical assistance and animal care. This work was supported by the "Avenir" program from INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). DFV was supported by a fellowship from the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (ARC); RMP by fellowship from the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" of France (MESR); LA, VA and JG by a fellowship from the "Ligue Nationale Contre le Cancer"; This work was also supported (BK) by the "PANSTRESS" grant [#2010-203] from INCa (Institut National du Cancer). SM has a permanent position of senior technician at the Centre Léon Bérard. We thank M. Castets for the critical reading of the manuscript.

	Genotype	P21		E19.5	
		♀	♂	♀	♂
		R[♀]	WT	14	13
X	CK	15	13	6	1
	CR	14	8	1	2
CK[♂]	CKR	18	1	3	5
p value		n.s.	0.00056	n.s.	n.s.

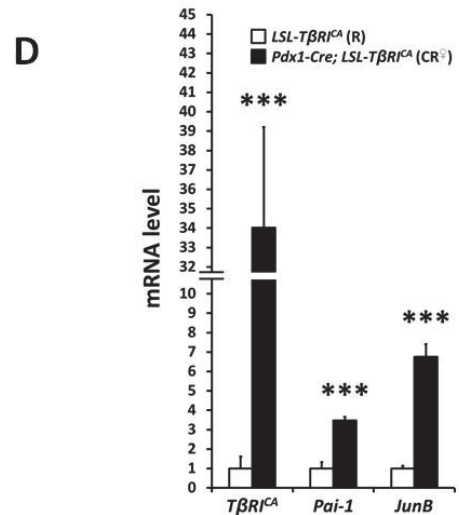
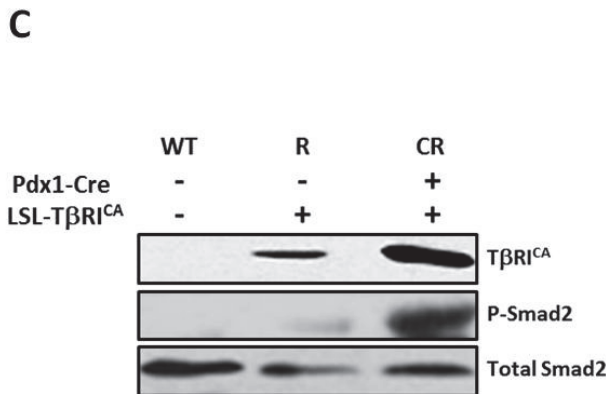
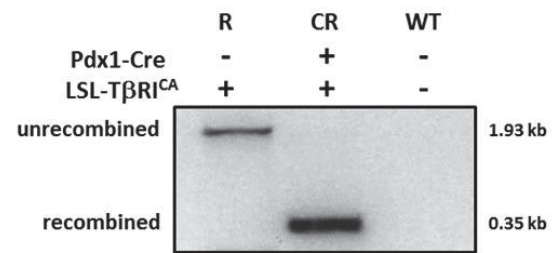


Figure 1 Conditional expression of a constitutively activated TGFβ type I receptor (LSL-TβRI^{CA}) in the pancreas of transgenic mice. (A) Offspring analysis resulting from breeding [LSL-TβRI^{CA/+}] females (R[♀]) with [Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}] males (CK[♂]). Numbers for wild-type (WT), [Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}] (CK), [Pdx1-Cre; LSL-TβRI^{CA}] (CR) and [Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-TβRI^{CA}] (CKR) progenies at P21 (post-natal day 21) and E19.5 (embryonic day 19.5) are presented. Numbers corresponding to progenies with other genotypes are presented in supplemental Table 1. Number of P21 CKR[♂] males was found significantly different from P21 males of others genotypes (Exact Fisher Test) based on expected percentages (6.25% males/genotype). (B) Pdx1-Cre transgene is used to specifically drive Cre recombinase expression in the pancreatic epithelial compartment. Efficient recombination of the TβRI^{CA} transgene is attested by the presence of a 0.35-kb PCR fragment amplified from genomic DNA extracted from a [Pdx1-Cre; LSL-TβRI^{CA}] (CR) pancreas. In the absence of Cre recombinase, the presence of the unrecombined TβRI^{CA} allele in [LSL-TβRI^{CA}] (R) mice results in 1.93-kb PCR fragment. As a negative control, no PCR fragment is observed in wild-type (WT) pancreas. (C) Pancreatic protein expression of TβRI^{CA}, Total Smad2 and P-Smad2 (phospho-Smad2) is assessed by Western Blotting performed on whole pancreas protein extracts prepared from wild type (WT), [LSL-TβRI^{CA}] (R) and [Pdx1-Cre; LSL-TβRI^{CA}] (CR) mice. (D) Pancreatic mRNA expression level of TβRI^{CA} and TGFβ target genes (*Pai-1* and *Jun-B*) is assessed by RT-qPCR performed on RNA prepared from [LSL-TβRI^{CA}] (R) and [Pdx1-Cre; LSL-TβRI^{CA}] (CR) pancreases. Data are represented as values ± standard deviations (SD) from a representative experiment performed in triplicates (***) p<0.001). LSL, Lox-STOP-Lox.

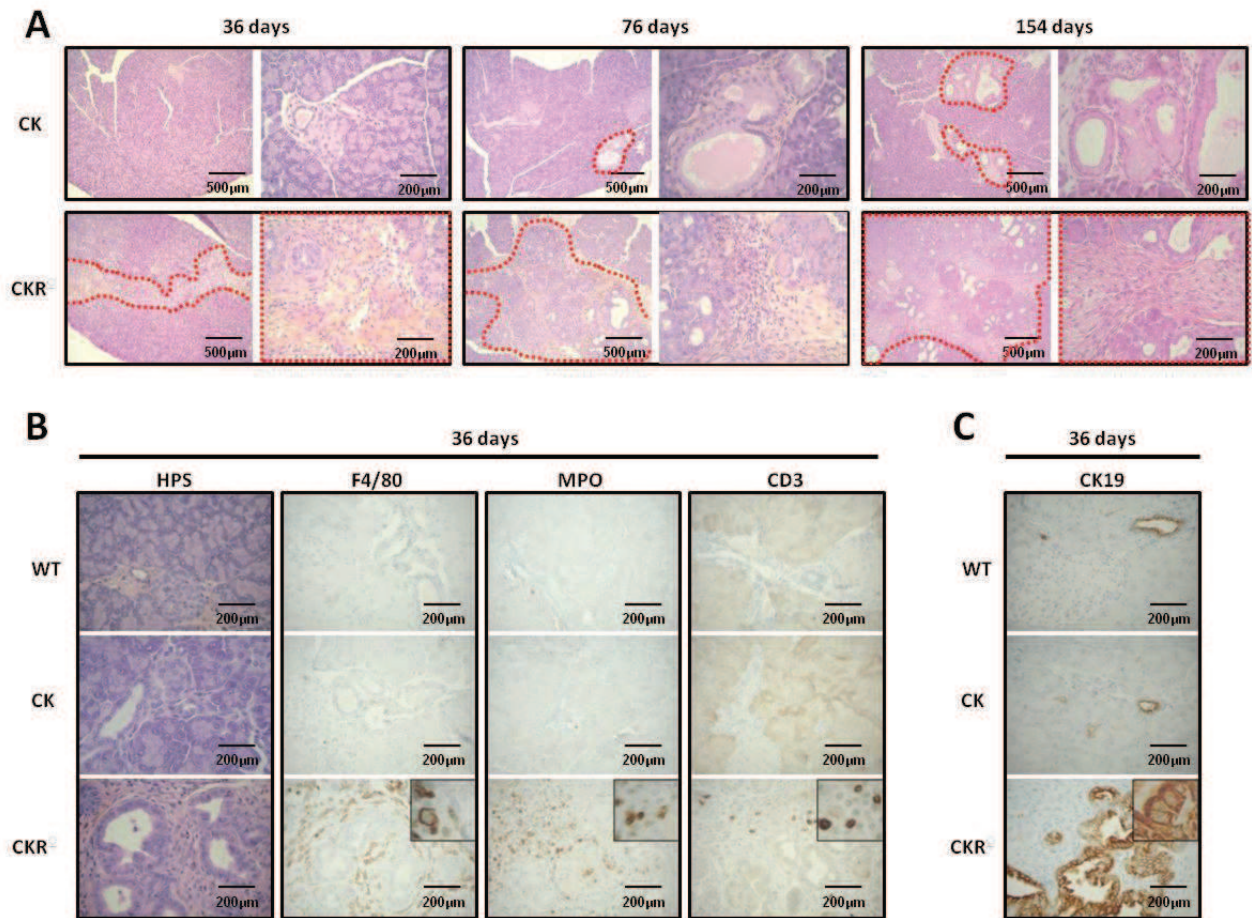


Figure 2 TGF β signaling activation in a KRAS^{G12D} background results in pancreatic parenchyma destruction, severe inflammation and early onset of precancerous lesions. **(A)** Acinar parenchyma destruction was evaluated on HPS (Hematoxylin-Phloxine-Saffron)-stained sections. The space wedged in red-dotted lines delimitates the area occupied by pancreatic lesions. **(B)** Pancreatic inflammation was evaluated by immune detection of F4/80 (macrophages), MPO (neutrophils) and CD3 (lymphocytes). **(C)** Precancerous epithelial lesions were underlined by immune detection of CK19 ductal markers. In A, B and C, experiments were performed on wild type (WT), [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}*] (CK) and [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-T β RI^{CA}*] (CKR⁺) pancreatic sections derived from mice euthanized at the indicated ages (36, 76 and/or 154 days).

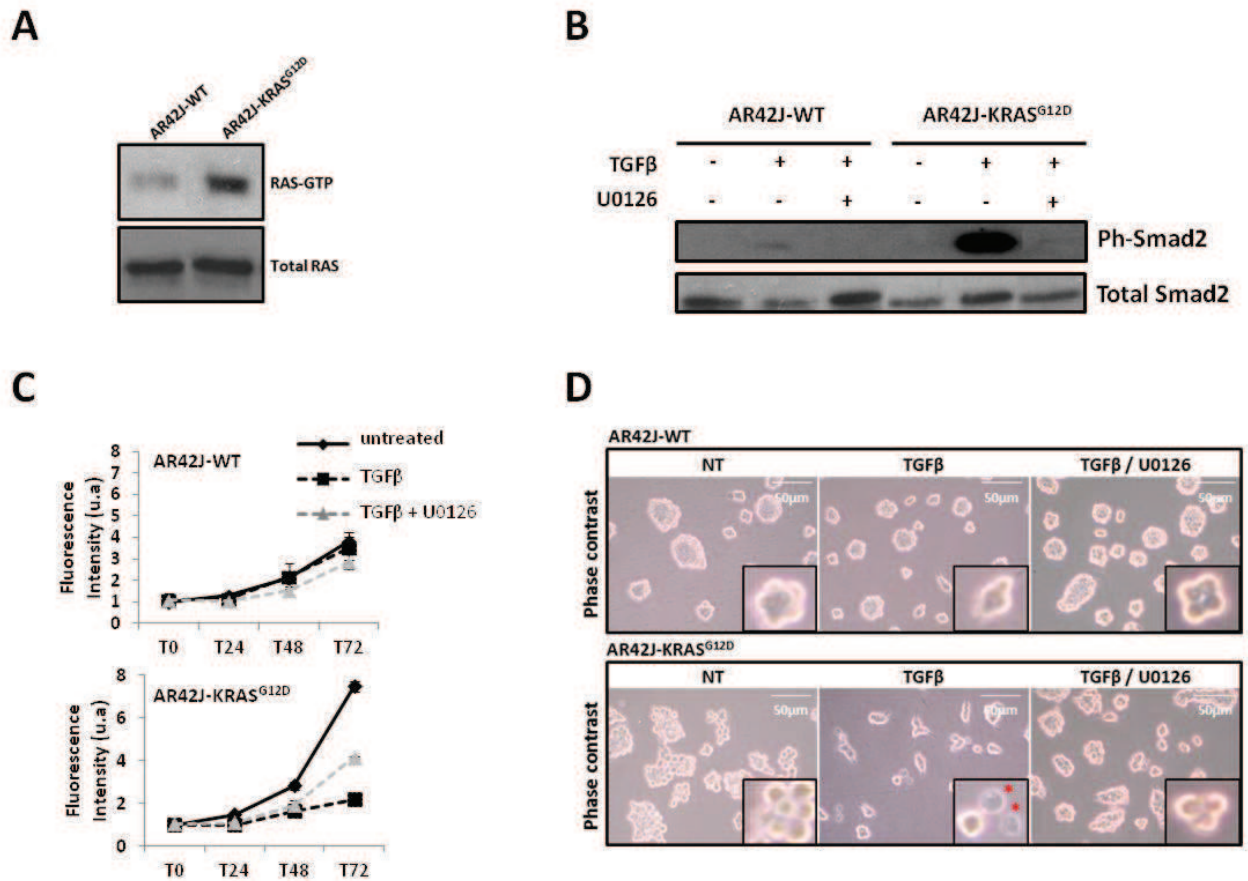


Figure 3 TGFβ compromises growth and viability of AR42J-KRAS^{G12D} epithelial cells. **(A)** The expression of GTP-bound Ras and total Ras proteins were evaluated by Western-Blotting performed on whole protein extracts prepared from AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} cells. **(B)** The expression of Phospho-Smad2 (P-Smad2) and total Smad2 proteins was evaluated by Western-Blotting performed on whole protein extracts prepared from AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} cells treated or not with TGFβ for 1 h in the presence or not of the U0126 ERK signaling inhibitor. **(C)** Cell growth of AR42J-WT (top panel) and AR42J-KRAS^{G12D} (bottom panel), treated or not with TGFβ for 72h, was evaluated by a fluorimetric growth indicator based on detection of metabolic activity (Uptiblu) in the presence or not of the U0126 ERK signaling inhibitor. Data are represented as values ± standard deviations (SD) from a representative experiment performed in triplicates and repeated three times. **(D)** Morphological aspect (phase contrast microscopy) of AR42J-WT (top panels) and AR42J-KRAS^{G12D} (bottom panels) cells treated or not for 48 h with TGFβ alone or in combination with the U0126 ERK signaling inhibitor.

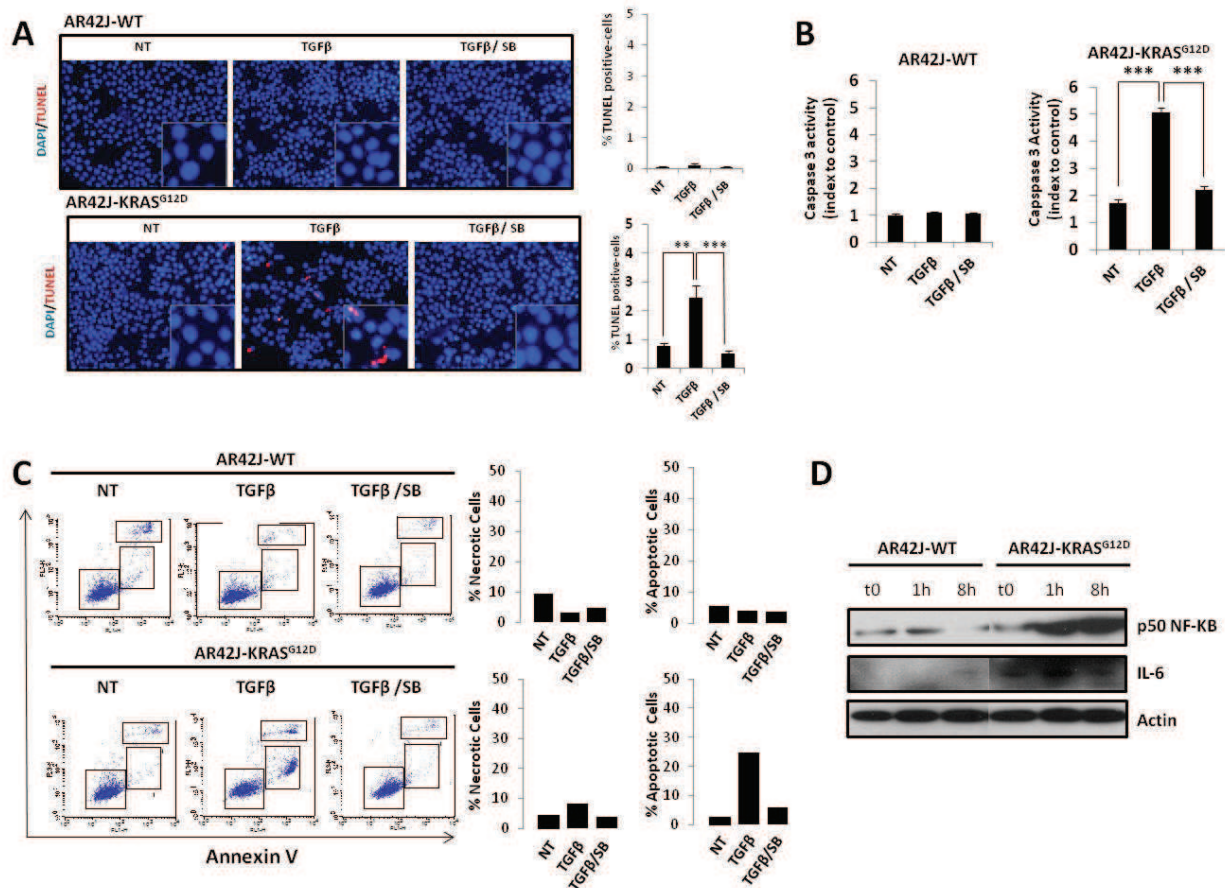


Figure 4 KRAS^{G12D} potentiates TGFβ-induced cell death and inflammation in AR42J cells. **(A)** Evaluation of the apoptotic index by TUNEL assay in AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} cells after 24 h of TGFβ treatment, alone or in combination with the SB431542 SMAD signaling inhibitor. Adjoined graphs show the percentage of TUNEL-positive cells counted in each condition (>1000 counted cells per condition). Error bars representing the SD (Standard Deviation) of four randomly chosen microscopic fields. **(B)** Caspase-3 activity was evaluated in AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} cells after 12 h of TGFβ treatment, alone or in combination with the SB431542 SMAD signaling inhibitor. **(C)** Annexin V/PI staining realized in non-permeabilized AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} cells after 48 h of TGFβ treatment. Adjoined graphs show the percentage of apoptotic cells (Annexin V positive/PI negative) and necrotic cells (Annexin V positive/PI negative) in each condition. **(D)** The expression of NF-KB (p50 NF-KB) and IL6 was evaluated by Western-Blotting performed on whole protein extracts prepared from AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} cells treated or not with TGFβ for 1 h and 8h. Actin was used as a loading control.

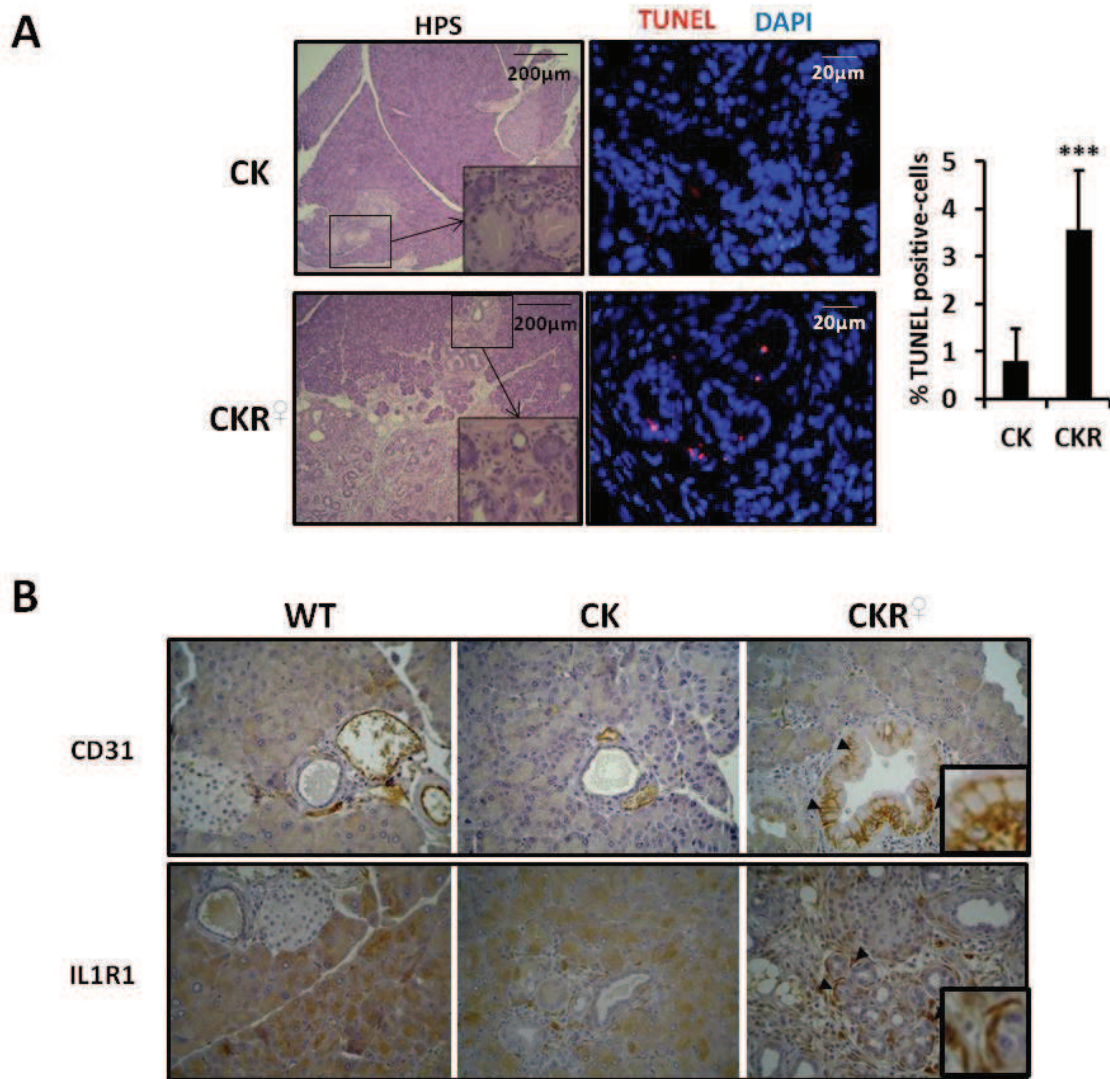


Figure 5 $KRAS^{G12D}$ potentiates $TGF\beta$ -induced cell death and inflammation *in vivo* in the mouse pancreas. **A)** The percentage of apoptotic cells in the pancreas of 8 week-old [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}*] (CK) and [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-T β RI^{CA}*] (CKR[♀]) mice was evaluated by the TUNEL method (>1000 TUNEL-positive cells counted per pancreas), error bars representing the SD (Standard Deviation) of four randomly chosen microscopic fields for each condition (at least 2 mice/group). Nuclei are stained with DAPI. HPS staining (Hematoxylin-Phloxine-Saffron) are also shown. **B) Inflammatory markers expression** was evaluated by immune detection of CD31 (PECAM1) and IL1R1 (IL1 Receptor 1) Experiments were performed on wild type (WT), [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}*] (CK) and [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-T β RI^{CA}*] (CKR[♀]) pancreatic sections derived from mice euthanized at 30 days of age.

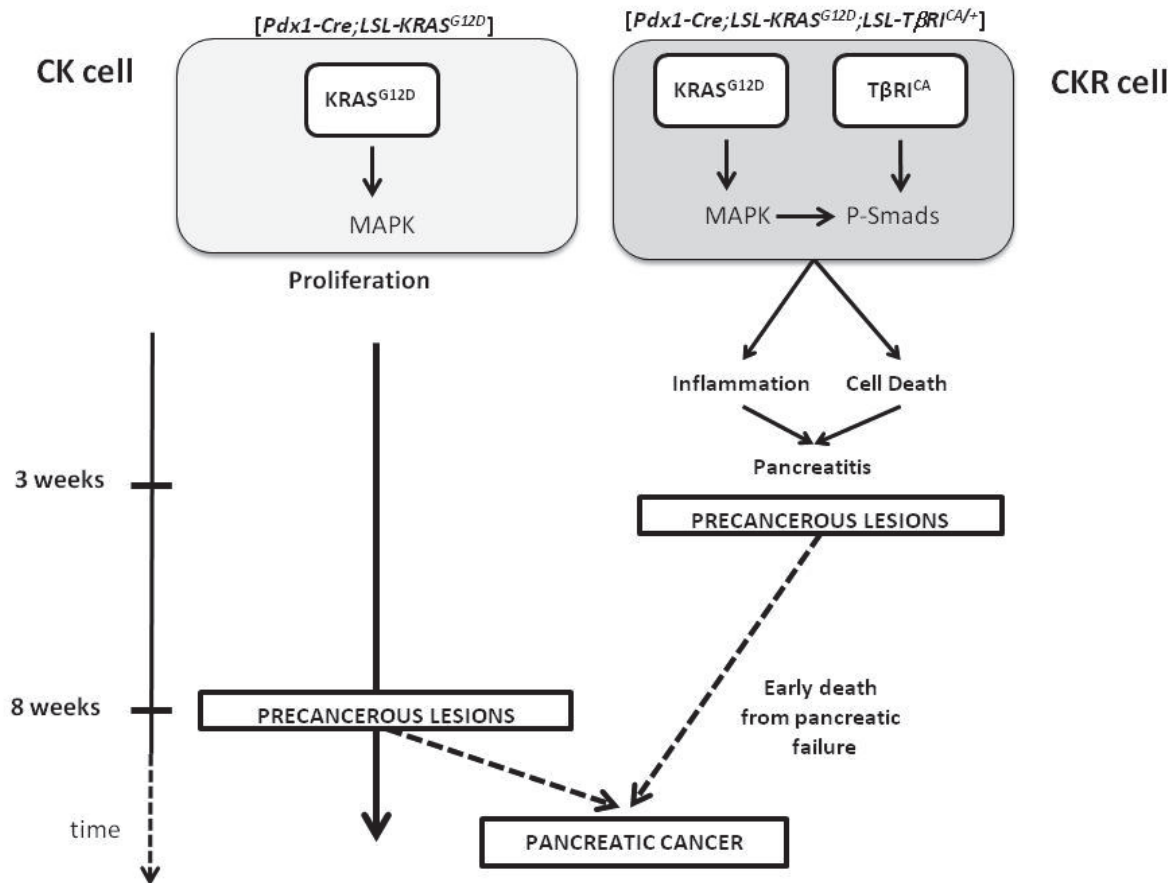


Figure 6 Model explaining the cooperation between TGF β signaling and KRAS^{G12D} to induce pancreatitis and accelerated pancreatic tumorigenesis. Expression of oncogenic KRAS^{G12D} in the pancreas leads to development of precancerous lesions from 8 weeks in mice. Our model shows that KRAS^{G12D} cooperates with TGF β signaling activation to promote pancreatitis, accelerating precancerous lesions development. CKR, [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-T β RI^{CA/+}*]; CK, [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}*]

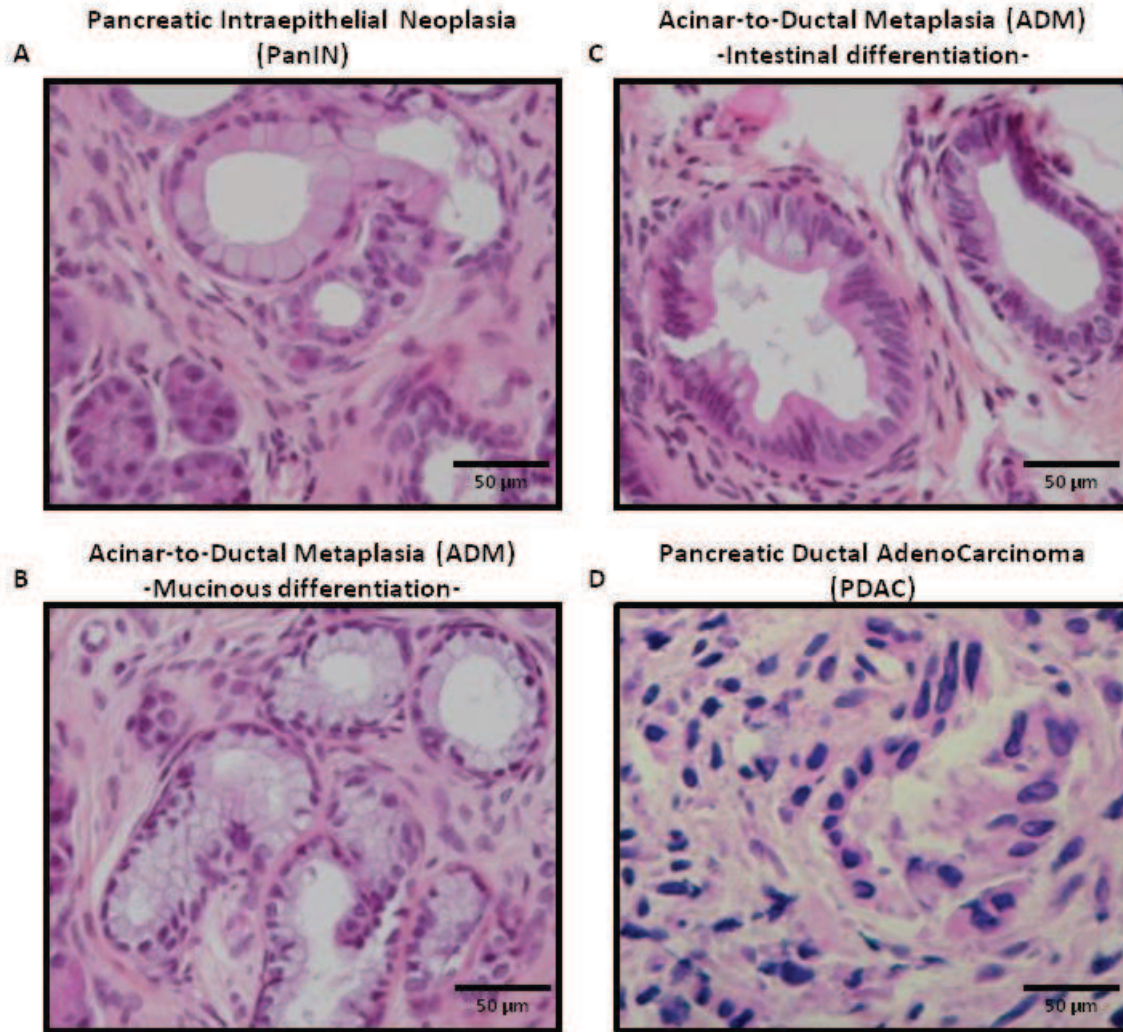


Figure S1 Ductal lesions observed in the pancreas of [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-TβRI^{CA}*] females (CKR^{\ominus}). (A) Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) observed in a 160-day-old CKR^{\ominus} mouse. (B) Acinar-to-ductal Metaplasia (ADM) with mucinous differentiation, observed in a 160 day-old CKR^{\ominus} mouse. (C) Acinar-to-ductal Metaplasia (ADM) with intestinal differentiation, observed in a 160-day-old CKR^{\ominus} mouse. (D) Pancreatic Ductal Adeno Carcinoma (PDAC) observed in a 343-day-old CKR^{\ominus} mouse. All sections were stained with HPS (Hematoxylin-Phloxin-Saffron).

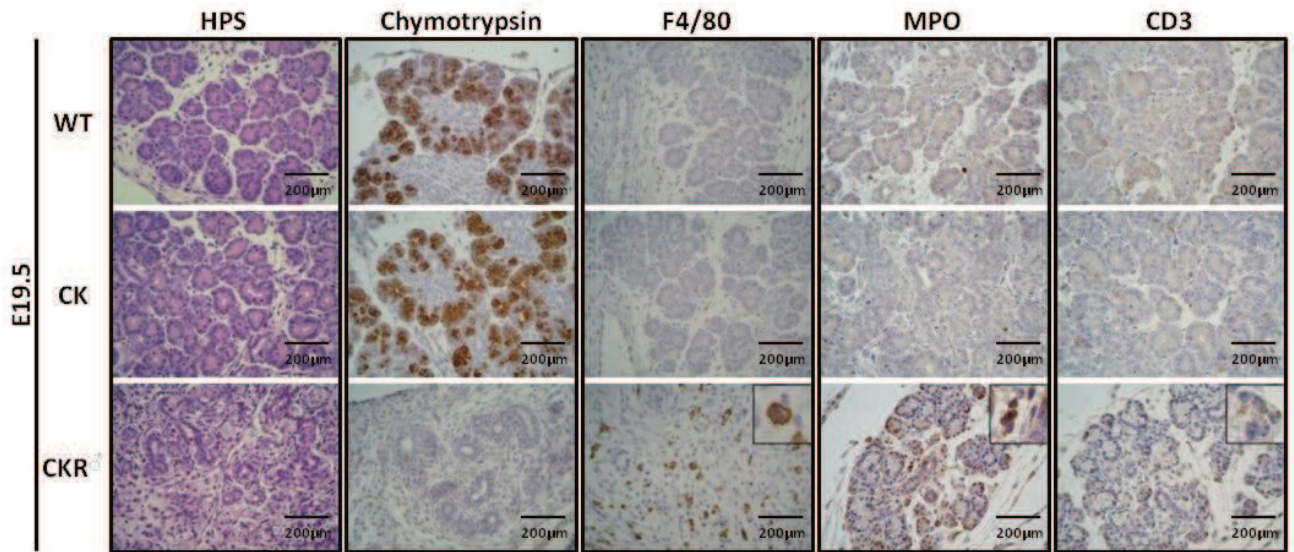


Figure S2 Severely compromised tissue architecture observed in the pancreas of [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-TβRI^{CA/0}*] (CKR[♂]) E19.5 male embryos. Pancreas sections from E19.5 dpc wild-type (WT), [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}*] (CK) and [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-TβRI^{CA}*] (CKR[♂]) embryos counterstained with HPS (Hematoxylin-Phloxine-Saffron), F4/80 (macrophages marker), MPO (neutrophils marker) and CD3 (lymphocytes marker) were revealed by immunohistochemistry.

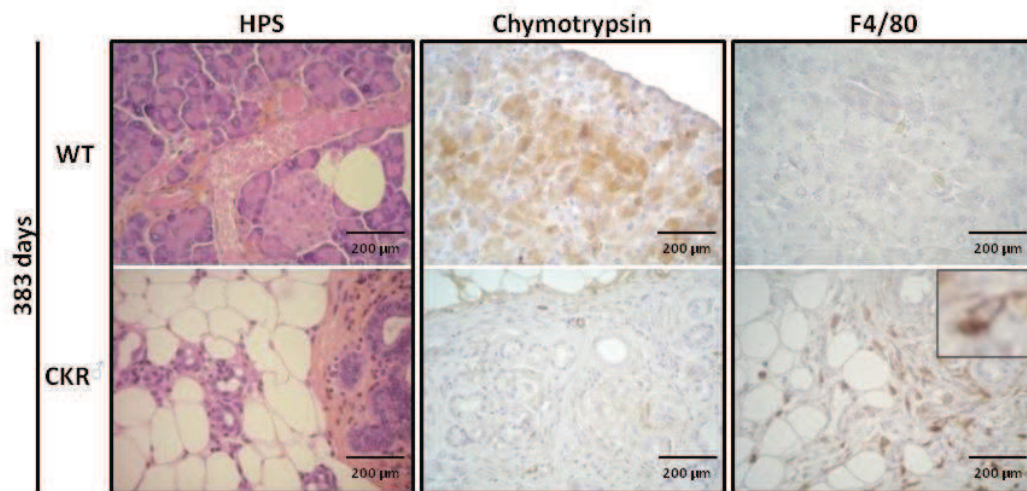


Figure S3 Histology of the [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-TβRI^{CA}*] surviving male (CKR[♂]). Pancreas sections from the only [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-TβRI^{CA}*] male (CKR[♂]) still alive after birth and sacrificed at 383-day-old were counterstained with HPS (Hematoxylin-Phloxine-Saffron). Chymotrypsin (acinar cells marker, AbD Serotec) and F4/80 (macrophages marker), were revealed by IHC. Pancreas from a wild type (WT) littermate was used as a control.

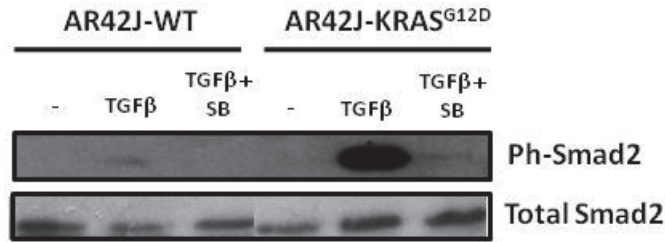


Figure S4 Functional validation of the SB431542 SMAD signaling inhibitor. Amount of the activated phospho-Smad2 (P-Smad2) and Total Smad2 by western-Blotting performed on whole protein extracts prepared from AR42J-WT and AR42J-KRAS^{G12D} cells treated or not with TGFβ for 1 h alone or in combination with the SB431542 SMAD signaling inhibitor (SB).

	Stage	Total	Litters	Average # of pups per litter	Genotypes								Fisher's exact test		
					<i>Pdx1-Cre</i> <i>LSL-KRAS^{G12D}</i> <i>LSL-TβRI^{CA}</i>	-	+	-	+	-	+	-		+	
R [♀] [<i>LSL-TβRI^{CA/+}</i>] females	P21	n=219	34	6.4	♀ n=120	14	16	14	15	15	14	14	18	p=10 ⁻³	
					♂ n=99	13	16	15	13	14	8	19	1		0.46%
CK [♂] [<i>Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}</i>] males	E19.5	n=49	7	7.0	♀ n=27	5	7	0	6	1	1	4	3	n.s.	
					♂ n=22	2	3	4	1	2	2	3	5		10.20%
						WT	C	K	CK	R	CR	KR	CKR	Nomenclature for the 8 expected genotypes	

Table S1 Offspring analyze of crosses between [*LSL-TβRI^{CA/+}*] females (R[♀]) and [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}*] males (CK[♂]). 34 litters were obtained, representing 219 progenies viable at weaning. 8 different genotypes are expected from such a breeding, each of them representing then 12.5% of the offspring. The *LSL-TβRI^{CA}* allele is borne by the mother so that the expected sex-ratio for each genotype is equal to 1. Thereby, taking into account the sex of the progenies, the proportion of each population represents then 6.25% of the offspring. The number of progenies of each genotype is shown, with the percentage below. Stage at which embryos or mice were analyzed (E19.5; Embryonic day 19.5, P21; post-natal day 21). Number of P21 CKR[♂] males was found significantly different from P21 males of others genotypes (Exact Fisher Test) based on expected percentage (6.25% males/genotype).

	CK	CR	CKR ⁺
19-100 days		21	
	29		
	30		30
	30		30
		31	
	36		36
	36		
		37	
	50		50
	58	58	58
			58
			58
	59		
	66		
	68		
	69	69	
		76	
84			
91			
		93	
94			
101-200 days		106	
		108	
	133		132
	137		
			154
		151	
	159	159	
			162
			166
	180		
	188		
194			
204	204		
207			
210			
220	219		
		242	
	262		
	262		
306			
		343	
347			
352			
	354		
356			
	361	359	
375			
	379		
		386	
413			
	449		
	461		
	464		
	472		
	507		
TOTAL	28	22	18

Table S2 Presentation of CK [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}*], CR [*Pdx1-Cre; LSL-TβRI^{CA}*] and CKR [*Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}; LSL-TβRI^{CA}*] mice generated and euthanized at the indicated ages. Numbers indicated the age at which euthanasia was performed.

Adrych, K., M. Smoczynski, M. Stojek, T. Sledzinski, J. Korczynska, E. Goyke, and J. Swierczynski. 2011. Coordinated increase in serum platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor- β 1 in patients with chronic pancreatitis. *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*. 11:434–40.

Ancrile, B., K.-H. Lim, and C.M. Counter. 2007. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes & development*. 21:1714–9.

Bartholin, L., F.S. Cyprian, D.F. Vincent, C.N. Garcia, S. Martel, B. Horvat, C. Berthet, S. Goddard-Leon, I. Treilleux, R. Rimokh, and J.C. Marie. 2008. Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor beta signaling through the TbetaRI/ALK5 receptor. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*. 46:724–31.

Booth, D.M., J. a Murphy, R. Mukherjee, M. Awais, J.P. Neoptolemos, O.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin, O.H. Petersen, R. Sutton, and D.N. Criddle. 2011. Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*. 140:2116–25.

Carrière, C., A.L. Young, J.R. Gunn, D.S. Longnecker, and M. Korc. 2009. Acute pancreatitis markedly accelerates pancreatic cancer progression in mice expressing oncogenic Kras. *Biochemical and biophysical research communications*. 382:561–5.

Corcoran, R.B., G. Contino, V. Deshpande, A. Tzatsos, C. Conrad, C.H. Benes, D.E. Levy, J. Settleman, J. a Engelman, and N. Bardeesy. 2011. STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer research*. 71:5020–9.

Derynck, R., and Y.E. Zhang. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 425:577–84.

Fukuda, A., S.C. Wang, J.P. Morris, A.E. Folias, A. Liou, G.E. Kim, S. Akira, K.M. Boucher, M. a Firpo, S.J. Mulvihill, and M. Hebrok. 2011. Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. *Cancer cell*. 19:441–55.

Gu, G., J. Dubauskaite, and D. a Melton. 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development (Cambridge, England)*. 129:2447–57.

Guerra, C., A.J. Schuhmacher, M. Cañamero, P.J. Grippo, L. Verdaguer, L. Pérez-Gallego, P. Dubus, E.P. Sandgren, and M. Barbacid. 2007. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer cell*. 11:291–302.

- Gukovskaya, A.S., and I. Gukovsky. 2011. Which way to die: the regulation of acinar cell death in pancreatitis by mitochondria, calcium, and reactive oxygen species. *Gastroenterology*. 140:1876–80.
- Hadjantonakis, A.K., L.L. Cox, P.P. Tam, and A. Nagy. 2001. An X-linked GFP transgene reveals unexpected paternal X-chromosome activity in trophoblastic giant cells of the mouse placenta. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*. 29:133–40.
- Hanahan, D., and R. a Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646–74.
- He, J., X. Sun, K.-Q. Qian, X. Liu, Z. Wang, and Y. Chen. 2009. Protection of cerulein-induced pancreatic fibrosis by pancreas-specific expression of Smad7. *Biochimica et biophysica acta*. 1792:56–60.
- Heldin, C.-H., M. Landström, and A. Moustakas. 2009. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Current opinion in cell biology*. 21:166–76.
- Ijichi, H., A. Chytil, A.E. Gorska, M.E. Aakre, B. Bierie, M. Tada, D. Mohri, K. Miyabayashi, Y. Asaoka, S. Maeda, T. Ikenoue, K. Tateishi, C.V.E. Wright, K. Koike, M. Omata, and H.L. Moses. 2011. Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. 121.
- Ikushima, H., and K. Miyazono. 2010. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nature reviews. Cancer*. 10:415–24.
- Inman, G.J., F.J. Nicolás, J.F. Callahan, J.D. Harling, L.M. Gaster, A.D. Reith, N.J. Laping, and C.S. Hill. 2002. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology*. 62:65–74.
- Jackson, E.L., N. Willis, K. Mercer, R.T. Bronson, D. Crowley, R. Montoya, T. Jacks, and D. a Tuveson. 2001. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes & development*. 15:3243–8.
- Ji, B., L. Tsou, H. Wang, S. Gaiser, D.Z. Chang, J. Daniluk, Y. Bi, T. Grote, D.S. Longnecker, and C.D. Logsdon. 2009. Ras activity levels control the development of pancreatic diseases. *Gastroenterology*. 137:1072–82, 1082.e1–6.
- Klein, a. P. 2004. Prospective Risk of Pancreatic Cancer in Familial Pancreatic Cancer Kindreds. *Cancer Research*. 64:2634–2638.

De La O, J.-P., and L.C. Murtaugh. 2009. Notch and Kras in pancreatic cancer: at the crossroads of mutation, differentiation and signaling. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 8:1860–4.

Lee, J., J. Seo, H. Kim, J.B. Chung, and K.H. Kim. 2003. Signal transduction of cerulein-induced cytokine expression and apoptosis in pancreatic acinar cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1010:104–8.

Lesina, M., M.U. Kurkowski, K. Ludes, S. Rose-John, M. Treiber, G. Klöppel, A. Yoshimura, W. Reindl, B. Sipos, S. Akira, R.M. Schmid, and H. Algül. 2011. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer cell*. 19:456–69.

Ling, J., Y. Kang, R. Zhao, Q. Xia, D.-F. Lee, Z. Chang, J. Li, B. Peng, J.B. Fleming, H. Wang, J. Liu, I.R. Lemischka, M.-C. Hung, and P.J. Chiao. 2012. KrasG12D-induced IKK2/ β /NF- κ B activation by IL-1 α and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell*. 21:105–20.

Lowenfels, A.B., P. Maisonneuve, G. Cavallini, R.W. Ammann, P.G. Lankisch, J.R. Andersen, E.P. Dimagno, A. Andrén-Sandberg, and L. Domellöf. 1993. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *The New England journal of medicine*. 328:1433–7.

Massagué, J. 2008. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 134:215–30.

Matsuo, Y., P.M. Campbell, R. a Brekken, B. Sung, M.M. Ouellette, J.B. Fleming, B.B. Aggarwal, C.J. Der, and S. Guha. 2009. K-Ras promotes angiogenesis mediated by immortalized human pancreatic epithelial cells through mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Molecular cancer research : MCR*. 7:799–808.

Mazzon, E., D. Impellizzeri, R. Di Paola, I. Paterniti, E. Esposito, A. Cappellani, P. Bramanti, and S. Cuzzocrea. 2012. Effects of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway Inhibition on the Development of Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Mice. *Pancreas*. 00:1–11.

Nagashio, Y., H. Ueno, M. Imamura, H. Asaumi, S. Watanabe, T. Yamaguchi, M. Taguchi, M. Tashiro, and M. Otsuki. 2004. Inhibition of transforming growth factor beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 84:1610–8.

Rosendahl, J., H. Bödeker, J. Mössner, and N. Teich. 2007. Hereditary chronic pancreatitis. *Orphanet journal of rare diseases*. 2:1.

Steinle, A.U., H. Weidenbach, M. Wagner, G. Adler, and R.M. Schmid. 1999. NF-B/Rel Activation in Cerulein Pancreatitis. *Gastroenterology*. 420–430.

Thiery, J.P., H. Acloque, R.Y.J. Huang, and M.A. Nieto. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139:871–90.

Vincent, D.F., B. Kaniewski, S.E. Powers, C. Havenar-daughton, J.C. Marie, D. Wotton, and L. Bartholin. 2010. Rapid Strategy to Detect the Recombined Allele in LSL-TbRI CA Transgenic Mice. *Genesis*. 562:559–562.

Vincent, D.F., K.-P. Yan, I. Treilleux, F. Gay, V. Arfi, B. Kaniewsky, J.C. Marie, F. Lepinasse, S. Martel, S. Goddard-Leon, J.L. Iovanna, P. Dubus, S. Garcia, A. Puisieux, R. Rimokh, N. Bardeesy, J.-Y. Scoazec, R. Losson, and L. Bartholin. 2009. Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS genetics*. 5:e1000575.

Whitcomb, D.C. 2004. Inflammation and Cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 287:G315–9.

Wildi, S., J. Kleeff, J. Mayerle, A. Zimmermann, E.P. Böttinger, L. Wakefield, M.W. Büchler, H. Friess, and M. Korc. 2007. Suppression of transforming growth factor beta signalling aborts caerulein induced pancreatitis and eliminates restricted stimulation at high caerulein concentrations. *Gut*. 56:685–92.

Yasuda, H., K. Kataoka, H. Ichimura, M. Mitsuyoshi, T. Iida, M. Kita, and J. Imanishi. 1999. Cytokine expression and induction of acinar cell apoptosis after pancreatic duct ligation in mice. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 19:637–44.

Yasuda, M. 2008. Fractalkine and TGF-β1 levels reflect the severity of chronic pancreatitis in humans. *World Journal of Gastroenterology*. 14:6488.

Yoo, B.M., M. Yeo, T.Y. Oh, J.H. Choi, W.W. Kim, J.H. Kim, S.W. Cho, S.J. Kim, and K. Hahm. 2005. Amelioration of pancreatic fibrosis in mice with defective TGF-beta signaling. *Pancreas*. 30:e71–9.

Yu, J.H., K.H. Kim, and H. Kim. 2006. Suppression of IL-1beta expression by the Jak 2 inhibitor AG490 in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Biochemical pharmacology*. 72:1555–62.

Yu, J.H., J.W. Lim, and H. Kim. 2009. Altered gene expression in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells: pathologic mechanism of acute pancreatitis. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 13:409–16.

III – Discussion

Nous avons généré un modèle murin permettant d'activer la voie du TGF β dans potentiellement n'importe quel type cellulaire. L'activation de la voie du TGF β a déjà été abordée *in vivo*. Il a été montré, par exemple, que l'expression d'un récepteur T β RI constitutivement activé inhibait la morphogénèse cardiaque (Charng et al., 1998) ou encore facilitait la survenue de métastases dans un modèle de tumorigénèse mammaire (Siegel et al., 2003). Dans ces études, l'expression du récepteur T β RI constitutivement actif est dépendante d'un promoteur spécifique du tissu (cœur ou sein) restreignant l'utilisation du transgène au tissu étudié. Cette limitation est levée par le modèle LSL-T β RI^{CA}, qui permet ainsi d'étudier, de manière beaucoup plus large, l'effet de l'activation de la voie du TGF β dans de nombreux processus biologiques. En effet, plus de 10 MTA (Material Transfer Agreement) ont été signés à ce jour illustrant l'intérêt de la communauté scientifique pour ce nouvel outil. Nous avons montré que ce transgène pouvait être activé dans différents compartiments cellulaires comme les cellules hépatiques, les lymphocytes, les cellules embryonnaires ou encore les cellules pancréatiques (Vincent et al., 2010). Grâce à cet allèle, nous avons pu examiner le rôle de l'activation de la voie du TGF β i) au cours de la tumorigénèse pancréatique (Vincent *et al.* soumis) et ii) au cours de la différenciation d'une population lymphoïde particulière, les iNKT (invariant Natural Killer). Cette dernière étude, réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Julien MARIE (CRCL, Lyon), a établi que l'expression ciblée de T β RI^{CA} dans le compartiment lymphocytaire (CD4-Cre) inhibait la différenciation des progéniteurs iNKT (Doisne et al., 2009) (Annexe 1).

Il est important de rappeler que l'expression du transgène T β RI^{CA} diffère entre les animaux mâles et femelles. En effet, l'allèle LSL-T β RI^{CA} est inséré au locus HPRT sur le chromosome X. Ainsi, les mâles hémizygotés Pdx1-Cre ; LSL-T β RI^{CA/0} expriment ce transgène dans l'ensemble des cellules pancréatiques. Quant aux femelles hétérozygotés Pdx1-Cre ; LSL-T β RI^{CA/+}, elles n'expriment ce transgène que dans la moitié des cellules pancréatiques du fait de l'inactivation aléatoire d'un chromosome X dans chaque cellule. Cet effet mosaïque est classiquement observé chez des animaux exprimant un transgène lié à l'X (Hadjantonakis et al., 2001). Le mosaïcisme des femelles CKR permet d'expliquer que ces dernières développent une pancréatite alors que les mâles CKR meurent après leur naissance (Vincent *et al.* en préparation). Ceci permet de mimer *in vivo* un « effet dose » de l'activation de la voie du TGF β dans un compartiment donné.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de l'activation de la voie du TGF β dans le pancréas. Différentes observations suggèrent en effet d'une implication des voies TGF β et Kras dans la pancréatite, une inflammation du pancréas prédisposant au PDAC. Nous avons ainsi démontré que le TGF β , en coopération avec l'oncogène Kras^{G12D}, facilitait le développement précoce de PanIN notamment en induisant une inflammation. Etant donné la sévérité du phénotype, nous n'avons pas pu déterminer si la pancréatite développée dans modèle Kras^{G12D}/T β RI^{CA} prédisposait au développement de PDAC. Le rôle promoteur de tumeur de l'inflammation dans l'initiation du PDAC est cependant largement documenté (Guerra et al., 2007, 2011; Lesina et al., 2011). L'originalité de notre étude est de placer le TGF β à l'origine de l'inflammation. Son rôle avait été suggéré il y a quelques années mais aucune preuve directe n'avait été apporté jusque là. Il avait été montré que l'inactivation de la voie du TGF β , *via* l'inactivation de T β RII (Wildi et al., 2007) ou la surexpression de Smad7 (He et al., 2009), inhibait la capacité de la céruléine à induire une pancréatite. Au niveau cellulaire, nous avons montré *in vitro* que le TGF β induisait la mort cellulaire de cellules acineuses pancréatiques exprimant Kras^{G12D}. La mort des cellules acineuses est un phénomène cellulaire fréquemment observé au cours des pancréatites humaines (Gukovskaya and Gukovsky, 2011; Booth et al., 2011). D'autres processus cellulaires interviennent également dans le développement de la pancréatite, comme la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (Yasuda et al., 1999; Lee et al., 2003). Notre modèle permet donc de mimer la pathologie humaine. En effet, nos résultats suggèrent que le TGF β pourrait coopérer avec Kras^{G12D} pour activer la voie NF-KB et stimuler la sécrétion de cytokines proinflammatoires. Les mécanismes moléculaires responsables de cette sécrétion restent encore à être déterminés.

Chapitre 2 Inactivation de *Tif1 γ* au cours de la tumorigenèse pancréatique

Article 4

Vincent, D.F., K.-P. Yan, I. Treilleux, F. Gay, V. Arfi, B. Kaniewsky, J.C. Marie, F. Lepinasse, S. Martel, S. Goddard-Leon, J.L. Iovanna, P. Dubus, S. Garcia, A. Puisieux, R. Rimokh, N. Bardeesy, J.-Y. Scoazec, R. Losson, and L. Bartholin. 2009. Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genetics* (2009)

Article 5

Vincent, D.F., J. Gout, N. Chuvin, V. Arfi, R.M. Pommier, P. Bertolino, N. Jonckheere, D. Ripoche, B. Kaniewski, S. Martel, J.-B. Langlois, S. Goddard-Léon, A. Colombe, M. Janier, I. Van Seuning, R. Losson, U. Valcourt, I. Treilleux, P. Dubus, N. Bardeesy, and L. Bartholin. 2012. Tif1 γ Suppresses Murine Pancreatic Tumoral Transformation by a Smad4-Independent Pathway. *American Journal of Pathology* (2012)

I - Inactivation de Tif1 γ dans un modèle murin de cancer du pancréas

Article 4

Vincent, D.F., K.-P. Yan, I. Treilleux, F. Gay, V. Arfi, B. Kaniewsky, J.C. Marie, F. Lepinasse, S. Martel, S. Goddard-Leon, J.L. Iovanna, P. Dubus, S. Garcia, A. Puisieux, R. Rimokh, N. Bardeesy, J.-Y. Scoazec, R. Losson, and L. Bartholin. 2009. Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. PLoS Genetics (2009)

Introduction

Des mutations ponctuelles activatrices de Kras sont observées dans la quasi-totalité des PDAC. Dans plus de 50% des cas, ces mutations sont associées à une délétion du locus 18q21.1, contenant le gène codant SMAD4 (DPC4, Deleted in Pancreatic Adenocarcinoma Locus 4), protéine classiquement associée à l'effet antiprolifératif du TGF β . La protéine Tif1 γ (Transcriptional Intermediary Factor 1 γ) a récemment été décrite comme un nouvel acteur de la voie du TGF β . Ce facteur pourrait en effet interagir avec les protéines SMADs (Dupont et al., 2005; He et al., 2006). Afin d'étudier le rôle de Tif1 γ *in vivo*, nous avons utilisé un nouveau modèle murin développé par l'équipe du Dr Régine LOSSON (IGBMC, Illkirch) permettant l'inactivation conditionnelle de Tif1 γ (Tif1 $\gamma^{\text{lox/lox}}$).

Résultats

Grâce à la lignée Pdx1-Cre, la délétion spécifique de Tif1 γ a pu être ciblée dans le pancréas. L'analyse phénotypique des animaux Pdx1-Cre; Tif1 $\gamma^{\text{lox/lox}}$ n'a révélé aucune lésion pancréatique. Afin de déterminer le rôle de Tif1 γ dans la tumorigenèse pancréatique *in vivo*, l'inactivation Tif1 γ a été réalisée dans le modèle de prédisposition au PDAC, Pdx1-Cre; Kras^{G12D}. Les animaux Pdx1-Cre; Kras^{G12D}; Tif1 $\gamma^{\text{lox/lox}}$ (**KTT**) ont développé de manière précoce des lésions précancéreuses de type kystique (IPMN). D'autre part, l'analyse de

tumeurs humaines a révélé que l'expression de *TIF1 γ* était perdue à la fois dans les lésions précancéreuses (PanIN, IPMN) et dans les PDAC.

Conclusion

Cette étude a démontré que l'expression de *TIF1 γ* était fortement diminuée dans les tumeurs pancréatiques humaines et que l'inactivation de *Tif1 γ* coopérait avec l'oncogène *Kras^{G12D}* pour induire le développement de lésions kystiques pancréatiques chez la souris. L'ensemble de ces résultats suggère que *TIF1 γ* pourrait être un nouveau gène suppresseur de tumeur.

Inactivation of TIF1 γ Cooperates with Kras^{G12D} to Induce Cystic Tumors of the Pancreas

David F. Vincent^{1,2,3,5,9}, Kai-Ping Yan^{4,9*}, Isabelle Treilleux⁵, Fabien Gay⁶, Vanessa Arfi^{1,2,3,5}, Bastien Kaniewsky^{1,2,3,5}, Julien C. Marie⁷, Florian Lepinasse^{2,6,8}, Sylvie Martel^{1,3,5}, Sophie Goddard-Leon⁵, Juan L. Iovanna⁹, Pierre Dubus¹⁰, Stéphane Garcia⁹, Alain Puisieux^{1,2,5}, Ruth Rimokh^{1,2}, Nabeel Bardeesy¹¹, Jean-Yves Scoazec^{2,6,8}, Régine Losson⁴, Laurent Bartholin^{1,2,3,5*}

1 INSERM, U590, IFR62, Lyon, France, **2** Univ Lyon, Lyon, France, **3** INSERM "Avenir" group, Lyon, France, **4** IGBMC, Strasbourg, Illkirch-Cedex, France, **5** Centre Léon Bérard, Lyon, France, **6** INSERM, U865, Faculté Laennec, Lyon, France, **7** INSERM, U758, Lyon, France, **8** Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France, **9** INSERM, U624, Marseille, France, **10** EA 2406, Univ Bordeaux, France, **11** Massachusetts General Hospital Cancer Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States of America

Abstract

Inactivation of the Transforming Growth Factor Beta (TGF β) tumor suppressor pathway contributes to the progression of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) since it is inactivated in virtually all cases of this malignancy. Genetic lesions inactivating this pathway contribute to pancreatic tumor progression in mouse models. Transcriptional Intermediary Factor 1 gamma (TIF1 γ) has recently been proposed to be involved in TGF β signaling, functioning as either a positive or negative regulator of the pathway. Here, we addressed the role of TIF1 γ in pancreatic carcinogenesis. Using conditional *Tif1 γ* knockout mice (*Tif1 γ ^{lox/lox}*), we selectively abrogated *Tif1 γ* expression in the pancreas of *Pdx1-Cre;Tif1 γ ^{lox/lox}* mice. We also generated *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Tif1 γ ^{lox/lox}* mice to address the effect of *Tif1 γ* loss-of-function in precancerous lesions induced by oncogenic *Kras^{G12D}*. Finally, we analyzed *TIF1 γ* expression in human pancreatic tumors. In our mouse model, we showed that *Tif1 γ* was dispensable for normal pancreatic development but cooperated with *Kras* activation to induce pancreatic tumors reminiscent of human Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms (IPMNs). Interestingly, these cystic lesions resemble those observed in *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Smad4^{lox/lox}* mice described by others. However, distinctive characteristics, such as the systematic presence of endocrine pseudo-islets within the papillary projections, suggest that SMAD4 and TIF1 γ don't have strictly redundant functions. Finally, we report that TIF1 γ expression is markedly down-regulated in human pancreatic tumors by quantitative RT-PCR and immunohistochemistry supporting the relevance of these findings to human malignancy. This study suggests that TIF1 γ is critical for tumor suppression in the pancreas, brings new insight into the genetics of pancreatic cancer, and constitutes a promising model to decipher the respective roles of SMAD4 and TIF1 γ in the multifaceted functions of TGF β in carcinogenesis and development.

Citation: Vincent DF, Yan K-P, Treilleux I, Gay F, Arfi V, et al. (2009) Inactivation of TIF1 γ Cooperates with Kras^{G12D} to Induce Cystic Tumors of the Pancreas. *PLoS Genet* 5(7): e1000575. doi:10.1371/journal.pgen.1000575

Editor: Bruce E. Clurman, Fred Hutchinson Cancer Research Center, United States of America

Received: March 16, 2009; **Accepted:** June 24, 2009; **Published:** July 24, 2009

Copyright: © 2009 Vincent et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from ARC 3891 (LB), INSERM "Avenir" program (LB), INCA "libre" (RR/LB, JYS, and JCM), INCA "plateforme" (LB and JCM), and Ligue Contre le Cancer (LB). DFV is a MENRT doctoral fellow. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bartholi@lyon.fnclcc.fr

* Current address: The Wistar Institute, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC), characterized by a ductal cell-type differentiation pattern, is the most common type of pancreatic cancer, accounting for more than 85% of pancreatic neoplasms. PDAC is the fourth leading cause of cancer-related mortality and carries an overall 5-year-survival rate of less than 5% [1]. The poor outcome of these patients is due to late diagnosis and resistance to current therapies. PDAC appears to arise from precursor lesions known as Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanINs) or from two types of cystic tumors: Mucinous Cystic Neoplasms (MCNs) and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms (IPMNs) [2]. Mucinous cystic neoplasms are cysts lined by mucin-producing epithelial cells usually associated with an

ovarian-type of stroma. These cysts do not communicate with the larger pancreatic ducts. IPMNs form intraductal papillary projections replacing the normal duct epithelium, secrete mucin, and communicate with ducts. IPMNs are currently classified according to their pattern of apparent histological differentiation into three main subtypes: intestinal (with the neoplastic epithelium resembling the intestinal epithelium), the most frequent, pancreatobiliary and gastric [3].

Recurrent genetic alterations have been identified in human PDAC [4,5]. Sporadic cases, which represent the vast majority of PDAC, are associated with activation of the *KRAS* oncogene (>90% of cases) and inactivation of the *INK4A/ARF* (>80% of cases), *TP53* (>50% of cases) and *SMAD4/DPC4* (>50% of cases) tumor suppressors. Inherited pancreatic cancers represent approx-

Author Summary

Inactivation of the TGF β tumor suppressor pathway contributes to the progression of Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma (PDAC), a devastating malignancy. Transcriptional Intermediary Factor 1 γ (TIF1 γ) has recently been proposed to be involved in TGF β signaling, a pathway inactivated in virtually all cases of this malignancy. To address the role of TIF1 γ in pancreatic carcinogenesis, we used conditional *Tif1 γ* knockout mice. In a genetic background expressing a constitutively active mutation of *KRAS* oncogene (*Kras*^{G12D}) recurrently found in patients with PDAC, *Tif1 γ* inactivation induces pancreatic precancerous lesions resembling those observed in the absence of *Smad4*, a key player involved TGF β signal transduction. This observation strengthens the notion that TIF1 γ plays an active role in TGF β signaling. Interestingly, we also found that TIF1 γ expression was markedly down-regulated in human pancreatic tumors supporting the relevance of our findings to human malignancy. Characterization of new players involved in the outbreak of early pancreatic lesions that will eventually evolve into invasive pancreatic cancer is crucial to detect the disease earlier and eventually develop new therapeutic drugs.

imately 5–10% of all pancreatic cancers. In a high proportion of familial pancreatic cancers, the genetic alterations causing the disease are still unknown. However, several germinal mutations associated with complex familial syndromes have been shown to significantly increase the risk of developing pancreatic cancer (*BRCA2*, *INK4A*, *STK11/LKB1*, *PRSS1*, *hMLH1* and *hMSH2*) [1,6].

In the last five years, a series of genetically engineered mouse models of PDAC have been developed based on these signature gene mutations [7]. For instance, expression of a constitutively active *Kras* mutant protein (*Kras*^{G12D} or *Kras*^{G12V}) induces PanINs that eventually progress towards PDAC [8,9,10]. *Kras* activated mutants act in concert with inactivation of the p53 [11], *Ink4A/Arf* [12,13], and *TBR1* [14] tumor suppressors to accelerate development of PDAC. These models and others [15–19] support the concept that progression towards invasive PDAC involves emergence from different precancerous lesions (PanINs, MCNs and IPMNs) depending on the associated genetic alterations.

The TGF β pathway appears to be of particular importance to PDAC tumor suppression, since it is inactivated in virtually all cases of this malignancy [20], and since genetic lesions inactivating the pathway—inactivation of *Smad4* or *TBR1* and over-expression of inhibitory *Smad7*—contribute to pancreatic tumor progression in mouse models [14,21–24]. Transforming growth factor beta (TGF β) is a secreted polypeptide belonging to a wide family of cytokines and growth factors including TGF β s, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) and activins [25,26]. Upon binding to its receptors, TGF β triggers phosphorylation of the SMAD2 and SMAD3 transcription factors. Phosphorylated SMAD2 and SMAD3 then interact with SMAD4. The SMAD2/3/4 complex accumulates within the nucleus, binds to DNA and activates the transcription of target genes leading to proliferative arrest or apoptosis of epithelial cells.

Transcriptional Intermediary Factor 1 gamma (also named TIF1 γ /TRIM33/RFG7/PTC7/Ectodermin) [27,28] appears to contribute to TGF β signaling, although its precise functional role is not clear. Some data point toward TIF1 γ as a negative regulator of the pathway through its capacity to mono-ubiquitinate SMAD4 and limit SMAD4 nuclear accumulation [29,30,31]. In contrast,

other studies have suggested that TIF1 γ plays an important positive role in transducing TGF β signaling through its interaction with SMAD2 and SMAD3 [32].

Here we wished to determine whether TIF1 γ contributes to tumorigenesis consistent with a function within the TGF β signaling pathway. We have focused on pancreatic exocrine tumors based on the prominent role played by TGF β signaling in these malignancies. Using a conditional mouse strain, we show for the first time that *Tif1 γ* is an important gene whose loss of function cooperates with *Kras*^{G12D} activation to induce cystic pancreatic tumors resembling human IPMNs. We also report that *TIF1 γ* expression is down-regulated in human PDAC and some types of precursor lesions, supporting the relevance of our mouse model to human malignancy.

Results/Discussion

To selectively abrogate *Tif1 γ* expression in the pancreas, we crossed conditional *Tif1 γ* knockout mice [33] with *Pdx1-Cre* mice [34]. *Pdx1* is a gene expressed in the common progenitor to all pancreatic lineages during early embryogenesis, hence *Pdx1-Cre* transgenic mice exhibit recombination of floxed alleles in pancreatic cells from all lineages (endocrine, acinar, centroacinar and ductal cells) [35]. *Pdx1-Cre;Tif1 γ ^{lox/lox}* animals were born at expected ratios and showed normal lifespan without obvious developmental or physiological alterations. Live imaging techniques (Positron Emission Tomography, PET and Magnetic Resonance Imaging, MRI), histological techniques (immunodetection of insulin, glucagon, PYY, chymotrypsin, F4/80, CD3, MPO), metabolic tests (glucose tolerance) did not reveal any significant differences between wild-type and *Pdx1-Cre;Tif1 γ ^{lox/lox}* littermates (n>20, between 3 weeks and 2 years of age) (data not shown). As expected, immunohistochemistry experiments showed that Tif1 γ was expressed in the nuclei of pancreatic cells in wild-type mice and that this staining was lost in the *Pdx1-Cre;Tif1 γ ^{lox/lox}* pancreas (Figure S1). In all, these observations show that *Tif1 γ* is dispensable for normal pancreatic development and function in the mouse.

Activating *KRAS* mutations occur early in human PDAC pathogenesis and give rise to slowly progressing PanINs in mouse models [8,10,12]. We then asked whether *Tif1 γ* inactivation could modify the phenotype or latency of the pancreatic lesions induced by *Kras*^{G12D}. To that end, we generated *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D}; *Tif1 γ ^{lox/lox}* mice (n = 12, Table S1). All animals looked healthy at the time they were euthanized (the oldest animal was sacrificed at the age of 189 days). Since pancreatic lesions are often asymptomatic, we decided to explore *in vivo* the pancreas of these mutant mice (n = 4) by PET and MRI imaging techniques. *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D}; *Ink4A/Arf*^{lox/lox} mice, which exhibit rapid PDAC progression, were also employed in these studies. Strikingly, MRI imaging performed on *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D}; *Tif1 γ ^{lox/lox}* animals revealed an hypertrophic pancreas with multifocal cystic lesions exhibiting T2 hypersignals visible as early as 7 weeks after birth (T2 weighted scans allow detection of cysts as they are sensitive to water content) (Figure 1B). Such lesions were absent in the pancreas of wild-type and *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D} animals (Figure 1A) and were clearly different from those observed in *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D}; *Ink4A/Arf*^{lox/lox} mice, which harbor solid tumors exhibiting a T1 isosignals (T1 weighed scans allow detection of solid tumors) (Figure 1C). PET imaging did not show significant increased metabolic activity in the abdomen of wild-type (Figure 1D) and *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D}; *Tif1 γ ^{lox/lox}* mice (Figure 1E) whereas *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D}; *Ink4A/Arf*^{lox/lox} mice had abdominal lesions with readily detectable metabolic activity

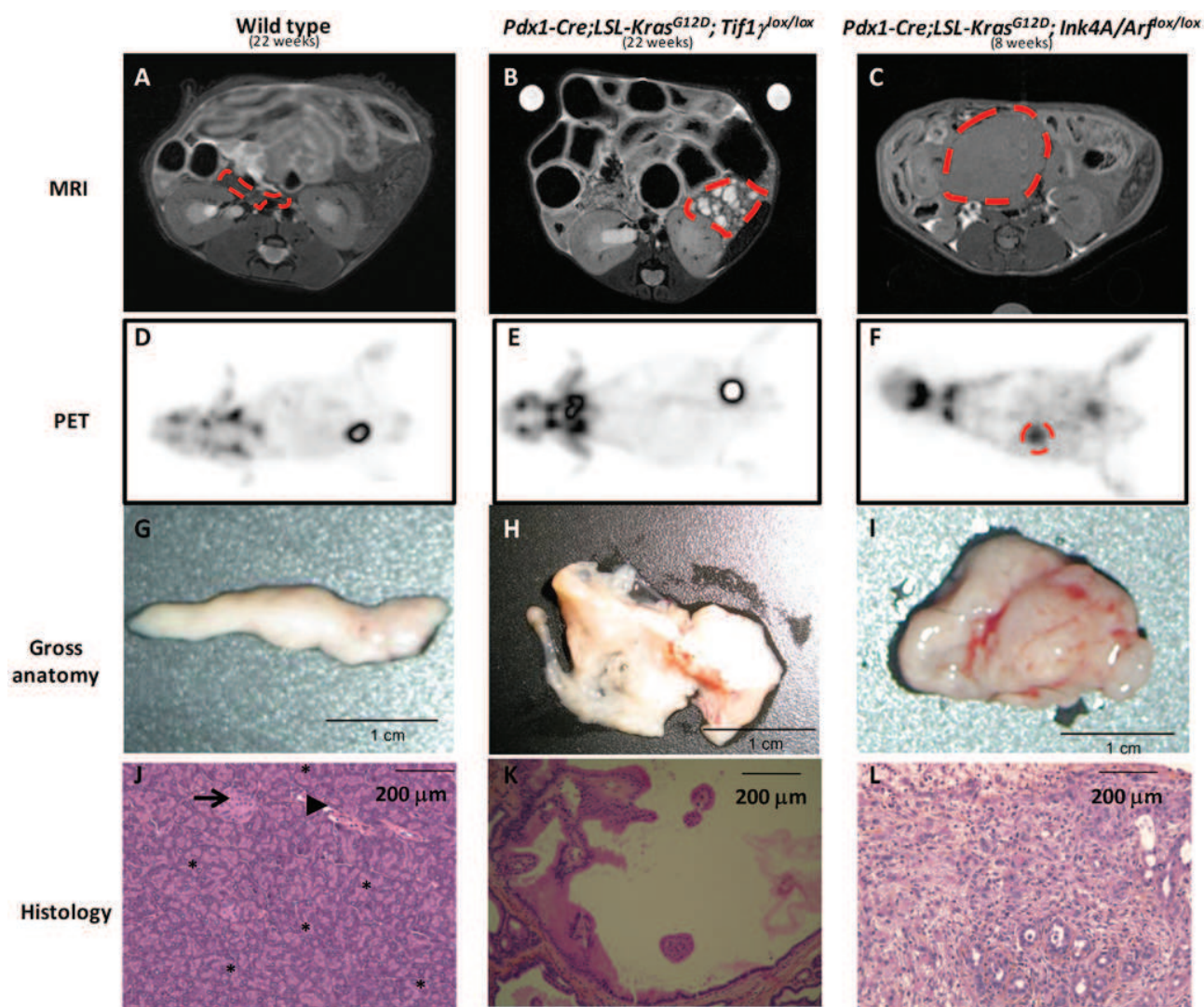


Figure 1. Homozygous deletion of *Tif1 γ* cooperates with activated *Kras*^{G12D} mutation to induce cystic tumors of the pancreas. Magnetic Resonance Imaging (MRI) (A–C). Positron Emission Tomography (PET) (D–F). Gross anatomy of the pancreas after dissection (G–I). Hematoxylin Phloxine Saffron (HPS) staining of pancreas sections (J–L). Acinar tissue (stars), scattered endocrine islets (arrow) and exocrine ducts (arrowhead). When notified, pancreas is circled in red dashed lines. *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} used in this experiment was 154 days old and representative of the 4 mice we analyzed at the age of 18–27 weeks. doi:10.1371/journal.pgen.1000575.g001

(Figure 1F). Macroscopic analysis of the *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} pancreas confirmed the presence of numerous cysts affecting the entire organ without macroscopic evidence of invasive carcinoma (Figure 1H and Figure S2) whereas the pancreas of *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D};*Ink4A/Arf*^{lox/lox} mice was invaded by a firm and homogeneous mass (Figure 1I) and the pancreas from wild-type or *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D} animals had a normal macroscopic appearance (Figure 1G). The size of these cysts observed in the pancreas from *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} was variable and most of them contained papillary projections (Figure 1K). These lesions clearly contrast with the invasive tumors of ductal morphology identified as PDAC in the pancreas of *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D};*Ink4A/Arf*^{lox/lox} (Figure 1L). The histological analysis of the 12 *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} animals (Table S1) revealed the presence of cystic lesions in 100% of these mice, such cysts being never observed in *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D} or wild type control animals. Quantitative analysis revealed that the area

occupied by the abnormal pancreas exceeded 50% by the age 6 weeks in 6/7 *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} mice whereas it represented less than 20% in 6/6 *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D} mice (Table S1). Collectively these data demonstrate that inactivation of *Tif1 γ* actively cooperates with activated *Kras*^{G12D} to induce cystic tumors of the pancreas.

To carefully compare the pancreatic lesions observed in *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} with the *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D} controls, we performed a sequential histological analysis of pancreas from animals (n = 12) euthanized at different ages (Table S1). Contrary to wild-type mice (Figure 2A–2D), *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D} mice gradually developed focal PanINs by the age of about 10 weeks (Figure 2E–2H). Strikingly, in *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} pancreas, PanINs, signs of acute inflammation as well as enlarged and dilated ductal structure resembling budding cysts were observed as early as 3 weeks of age (Figure 2I and Figure S3). At later time points, inflammatory tissue and PanINs were mainly

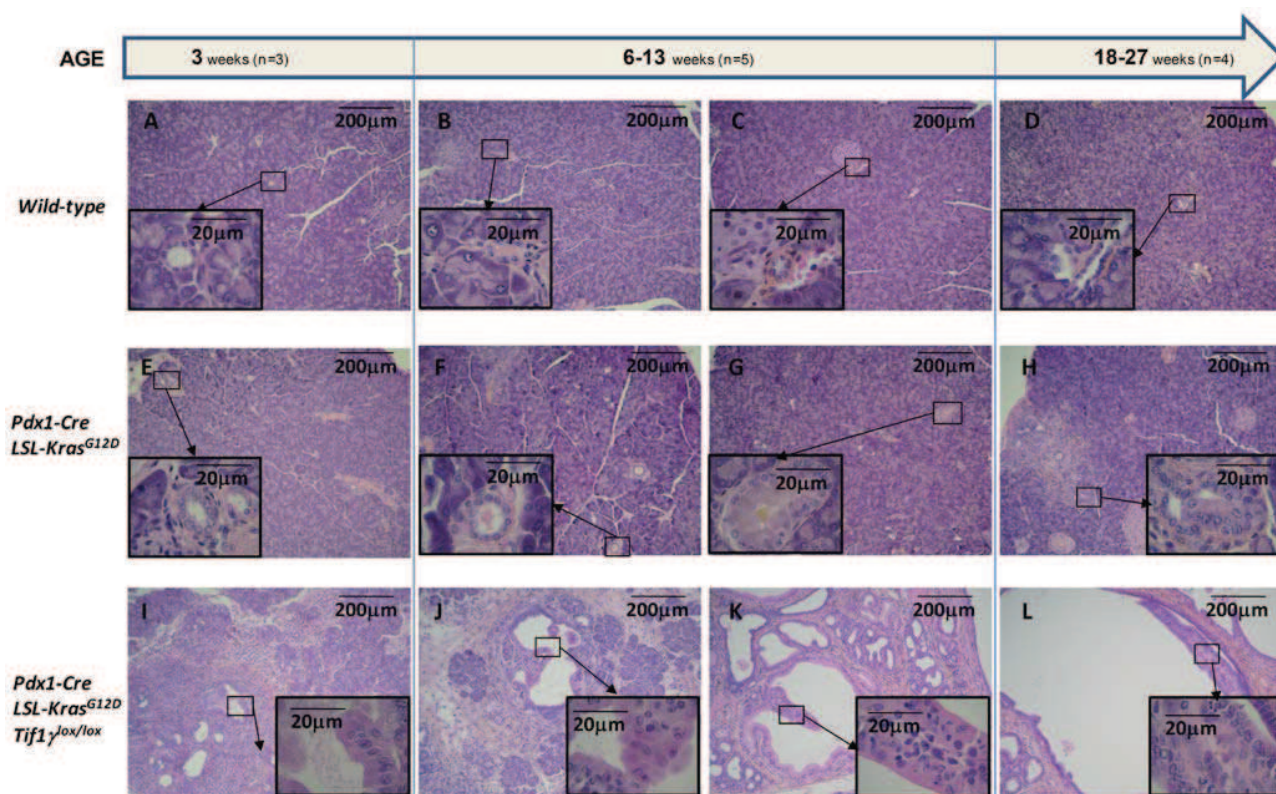


Figure 2. Inactivation of *Tif1 γ* accelerates activated *Kras*^{G12D}-mediated pancreatic neoplasia. Sections of wild-type (A–D), *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D} (E–H) and *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} (I–L) pancreas from mice at different ages were stained with HPS. Number of mice: 3 weeks, n = 3; 6–13 weeks, n = 5; 18–27 weeks, n = 4. Inset pictures: Higher magnification. doi:10.1371/journal.pgen.1000575.g002

replaced with cystic lesions becoming more numerous and of larger size (Figure 2J–2L). Microscopic examination revealed that the lining of the cystic structures characteristically found in the pancreas from *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} mice was formed by epithelial cells with a cuboidal or cylindrical morphology. These cells formed numerous thick papillary projections in the cyst lumen. The axis of these projections usually contained masses of small monomorphic cells with an endocrine morphology (Insets in Figure 2I–2L).

We performed immunohistochemical studies to characterize the evolving pancreatic lesions in these mice. We observed staining for chymotrypsin and insulin, which decreased with age, indicating a replacement of exocrine and endocrine components, together with abnormal ductal structures in *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} mice (Figure 3). There was a notable disappearance of well-organized endocrine islets with age coinciding with the accumulation of endocrine cells within the papillary projections bulging within the lumen of the cysts.

To more precisely identify the nature of these lesions, several lineage markers were explored by immunohistochemistry. We first verified that *Tif1 γ* expression was lost in pancreatic ducts from *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} mice (Figure 4E) compared to normal observed ducts in wild-type mice (Figure 4A). In the normal pancreas, cytokeratin 19 (CK19) is specifically expressed by ductal cells lining the secretory ducts (Figure 4B). We verified that most of the epithelial cells lining the cystic lesions observed in *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} mice were positive for CK19 (Figure 4F); this is consistent with a ductal phenotype for these cells. However, in contrast to the cells lining the normal

secretory ducts (Figure 4C), many cells lining the cysts were mucin-secreting and stained for Alcian blue (Figure 4G). The cells with an endocrine appearance present within the intra-cystic papillary projections were CK19 and Alcian blue negative. There was no evidence of ovarian-type stroma or of invasive or microinvasive carcinoma, even on serial sections, suggesting that these cystic tumors resemble human IPMNs. In all, the cystic lesions observed in *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} mice show distinctive characteristics, including the presence of intra-epithelial endocrine pseudo-islets, suggestive of a mixed, endocrine-exocrine, lesion [7].

TIF1 γ has recently been proposed to be involved in TGF β signaling [29,32]. The resemblance between the cystic lesions (either IPMNs [21,23] or MCNs [22]) observed in *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D};*Smad4*^{lox/lox} mice, and the cystic lesions we observed in the *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} mice, reinforces an active role of TIF1 γ in TGF β signaling. However, we cannot rule out the possibility that TIF1 γ could also be involved in other signaling pathways. Interestingly, we observed that *Smad4* expression was almost undetectable in epithelial cells lining the papillary projections observed in *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} mice whereas it was detectable in epithelial cells lining the cysts (Figure 4H) or in normal ducts (Figure 4D). IPMNs observed in *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D};*Tif1 γ* ^{lox/lox} mice always contain a significant endocrine component, a rare event in IPMNs observed in *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D};*Smad4*^{lox/lox} mice [21,23]. This observation suggests that TIF1 γ and SMAD4 could differentially regulate endocrine versus exocrine differentiation in a context of an activated KRAS oncogenic protein.

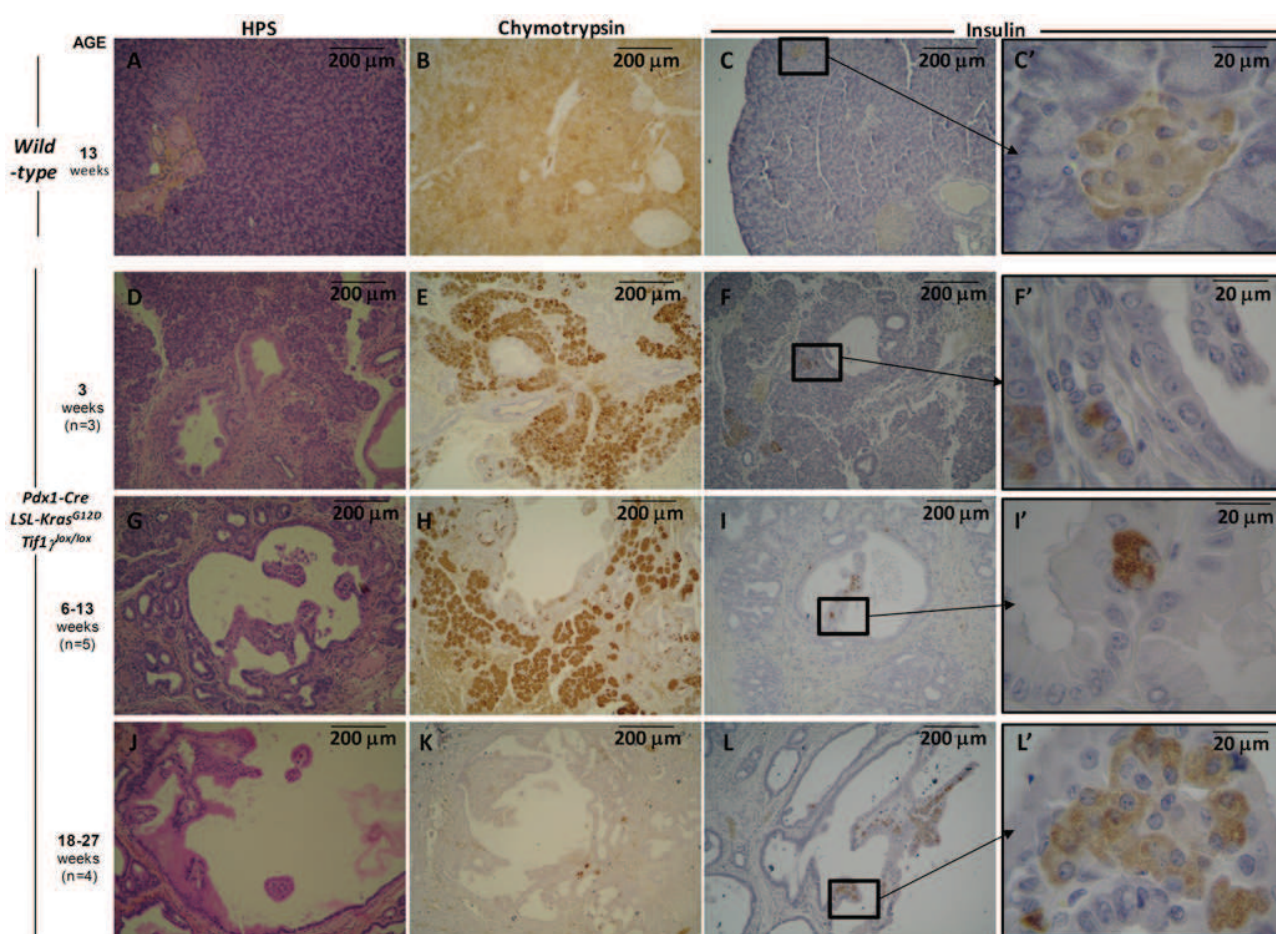


Figure 3. Endocrine and exocrine compartments destruction in the pancreas of *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Tif1^{lox/lox}* mice. Wild-type (A–C') and *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Tif1^{lox/lox}* (D–L') pancreas sections were stained with HPS (A,D,G,J), immuno-revealed either with an anti-chymotrypsin antibody (B,E,H,K) or an anti-insulin antibody (C,F,I,L and C',F',I',L' that represent the boxed region in C,F,I,L at a higher magnification). For *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Tif1^{lox/lox}* mice, analysis were performed at different ages. Number of mice: 3 weeks, n=3; 6–13 weeks, n=5; 18–27 weeks, n=4. Boxes: Higher magnification. The pictures show one representative mouse for each group.
doi:10.1371/journal.pgen.1000575.g003

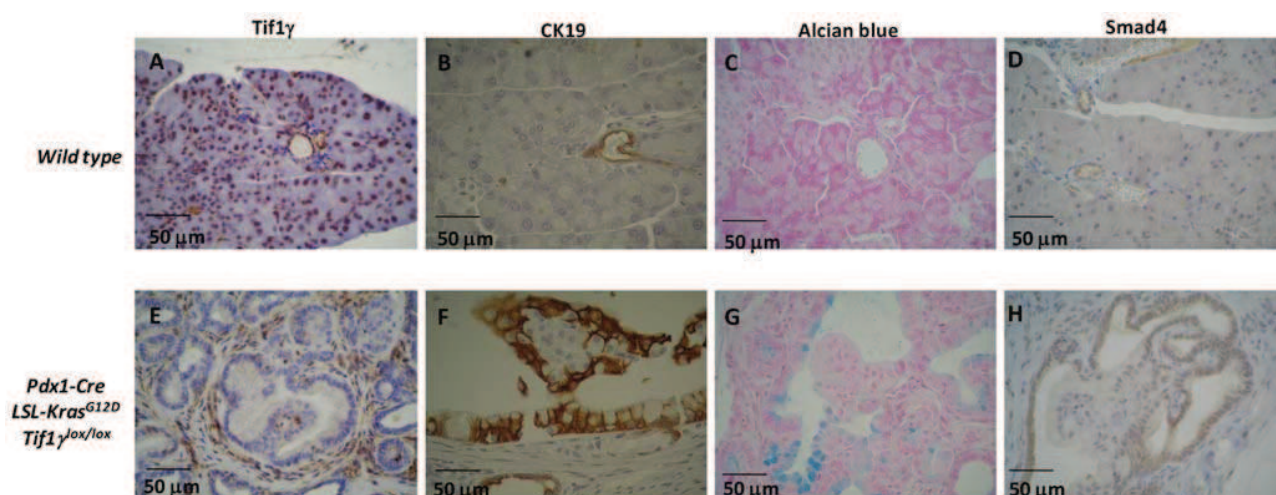


Figure 4. Immunophenotyping of pancreas cysts observed in *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Tif1^{lox/lox}* mice. Wild-type (A–D) and *Pdx1-Cre;Tif1^{lox/lox}; LSL-Kras^{G12D}* (E–H) pancreas sections were stained to detect glandular cells (CK19), mucus-secreting cells (Alcian Blue), Tif1 γ and Smad4. The pictures show one representative mouse at the age of 22 weeks.
doi:10.1371/journal.pgen.1000575.g004

Based on the prominent cooperation noted between *Kras* activation and *Tif1 γ* inactivation in promoting cystic pancreatic tumors in our mouse model, we speculated that *TIF1 γ* expression may be down-regulated in human pancreatic tumors. To test this hypothesis, we analyzed by quantitative RT-PCR the expression level of *TIF1 γ* and *SMAD4* mRNA in 20 PDAC and 16 peritumoral tissues coming from surgical specimens removed for therapeutic purposes (peritumoral tissues were not available for 4 of these patients). The cellularity of the samples used for molecular analysis was verified histologically. Our results show that *TIF1 γ* expression is significantly decreased in the tumors as compared to peritumoral tissues ($P=0.0054$) (Figure 5A). We also compared *TIF1 γ* expression levels in each individual tumor along with the peritumoral tissue from the same patient ($n=16$). Our results show that *TIF1 γ* expression is significantly down-regulated in most patients and is not up-regulated in any patient (Figure 5B). We next examined TIF1 γ protein pattern of expression by immunohistochemistry in human pancreatic cancers and their precursors. In peritumoral tissues from PDAC, TIF1 γ was detected in the majority of the nuclei of acinar, ductal and endocrine cells (Figure 5C). Centroacinar cells are more difficult to identify in routinely stained sections; however, since no epithelial cell population devoid of TIF1 γ expression has been detected in the normal pancreas, it can be assumed that they also express TIF1 γ . In PDAC (16 cases), TIF1 γ nuclear expression level was significantly decreased as compared to the peritumoral tissue. In 8 cases, TIF1 γ expression was heterogeneous, with large numbers of negative cells coexisting with scattered positive cells (Figure 5D). In 2 cases, TIF1 γ was even undetectable (Figure 5E). In IPMNs (samples from 10 patients, all with the intestinal subtype according to current classifications [3]), almost all neoplastic cells in areas of low grade dysplasia (present in the 10 cases) displayed a weak nuclear positivity whereas in areas of high grade dysplasia (present in the 10 cases), more than 50% of cells were negative for TIF1 γ ; this was especially the case along the papillary projections (Figure 5F). In PanINs (samples from 15 patients, with grade 1 in 12, grade 2 in 10 and grade 3 in 8), the expression of TIF1 γ was usually retained in grade 1 and 2 lesions (data not shown), but was undetectable in a variable proportion of cells in grade 3 lesions (Figure 5G). In MCNs (8 cases), TIF1 γ protein was strongly expressed by all neoplastic cells, even in areas of high grade dysplasia and in foci of microinvasive carcinoma (Figure 5H). We showed in the same set of tumors that *SMAD4* expression was also down-regulated in high-grade PanINs, IPMNs and PDAC, while remained highly expressed in MCNs (Figure S4).

None of the *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Tif1 γ ^{lox/lox}* mice ($n=4$) sacrificed after the age of 13 weeks showed an aggressive cancer developed from IPMNs. This observation is consistent with epidemiological data in humans showing that IPMNs only rarely give rise to aggressive tumors [3]. Interestingly, IPMNs were reported in *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Smad4^{lox/lox}* mice but no PDAC was found by the age of 13 weeks ($n=8$) [21]. Another group observed in *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Smad4^{lox/lox}* a significant proportion of PDAC between 23 and 33 weeks [23]. This suggests that the minimal latency period to see the onset of aggressive tumors may have not been reached in our study or the number of animals studied is too low. We have been in the process of “aging” a cohort of *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Tif1 γ ^{lox/lox}* mice to address this specific point even if we cannot rule out the possibility that these animals die before developing aggressive tumors because of pancreatic failure due to growing cysts. The molecular mechanism supporting the cooperation between activated *Kras^{G12D}* mutation and *Tif1 γ* inactivation to induce the formation of IPMNs is still unknown. TAK1 (TGF β Associated Kinase 1), which has recently

been proposed to explain R-Ras and TGF β cooperation in breast tumors, is an interesting candidate [36].

The relationship between TIF1 γ and SMAD4 and their respective role in TGF β signaling have been a subject of extensive investigation and debate in the last few years [37]. Indeed, published data support distinct models whereby TIF1 γ could function as either a negative regulator of TGF β signaling [29,30] or a complementary agonist of TGF β signaling [32]. In the “antagonist model”, TIF1 γ negative function relies on its ability to mono-ubiquitinate and relocate SMAD4 into the cytoplasm. In the “agonist model”, TIF1 γ competes with SMAD4 for binding to SMAD2 and 3 and form TIF1 γ -SMAD2/3 complexes regulating SMAD4-independent TGF β responses. One can envision that these models, both supported by compelling biochemical and *in vivo* evidence, are not mutually exclusive and that one of them may be predominant depending on the cellular context. The experimental evidence we present here suggest that TIF1 γ works with SMAD4 as a complementary agonist molecule during pancreatic tumorigenesis. In the presence of activated *Kras*, *Tif1 γ* loss-of-function induces cystic lesions resembling those observed in the absence of *Smad4* suggesting that both molecules act in concert to prevent tumor progression. Even if this hypothesis needs further demonstration, it is strengthened by the observation that TIF1 γ expression is decreased in human pancreatic tumors and our observation that loss of *Tif1 γ* does not significantly impair *Smad4* expression level or *Smad4* target genes expression (data not shown). The existence of a joint effort between TIF1 γ and SMAD4 to maintain TGF β -mediated tissue homeostasis has been proposed before. Indeed, during erythroid differentiation, TIF1 γ mediates the differentiation response while SMAD4 mediates the antiproliferative response [32]. In a recent work, we showed that *Tif1 γ* controlled iNKT (invariant Natural Killer T) cell expansion whereas *Smad4* maintained their maturation state [33]. A recent comprehensive genetic analysis of >20,000 transcripts in 24 pancreatic cancers failed to identify point mutations, amplifications, deletion or translocations in the *TIF1 γ* gene [20]. The present study strongly spurs us toward looking for *TIF1 γ* genetic alterations in a larger set of pancreatic tumors. Besides, chromosomal breakpoints chromosome on 1p13.1 containing *TIF1 γ* gene have been reported in acute megakaryocytic leukemias [38], osteochondromas [39], bronchial large cell carcinomas [40] and childhood papillary thyroid carcinomas [41]. Interestingly, we recently demonstrated that abrogation of the closely related *Tif1 α* gene in mice caused hepatocellular carcinoma [42]. These observations reinforce the idea according to which TIF1 γ loss of function could play an active protective role during tumorigenesis. TIF1 γ overexpression has been suggested by others to facilitate tumorigenesis in other organs by inhibiting SMAD4-mediated growth inhibition and motility in response to TGF β [29,30]. This observation may reflect an active role of TIF1 γ during tumor progression depending on the organ and involving a anti-SMAD4 mechanisms (“antagonist” model).

In conclusion, we demonstrated in a mouse model that inactivation of *Tif1 γ* cooperates with activated *Kras^{G12D}* to induce cystic pancreatic tumors. Characterization of new players involved in the outbreak of early pancreatic lesions that will eventually evolve into invasive pancreatic cancer is crucial to detect the disease earlier and eventually develop new therapeutic drugs. Further work to decipher the respective roles of SMAD4 and TIF1 γ in PDAC as well as the functional cooperation between KRAS and TIF1 γ could bring new insight into the etiology of pancreatic cancer, and generate a better understanding of the multifaceted role of TGF β in carcinogenesis and development.

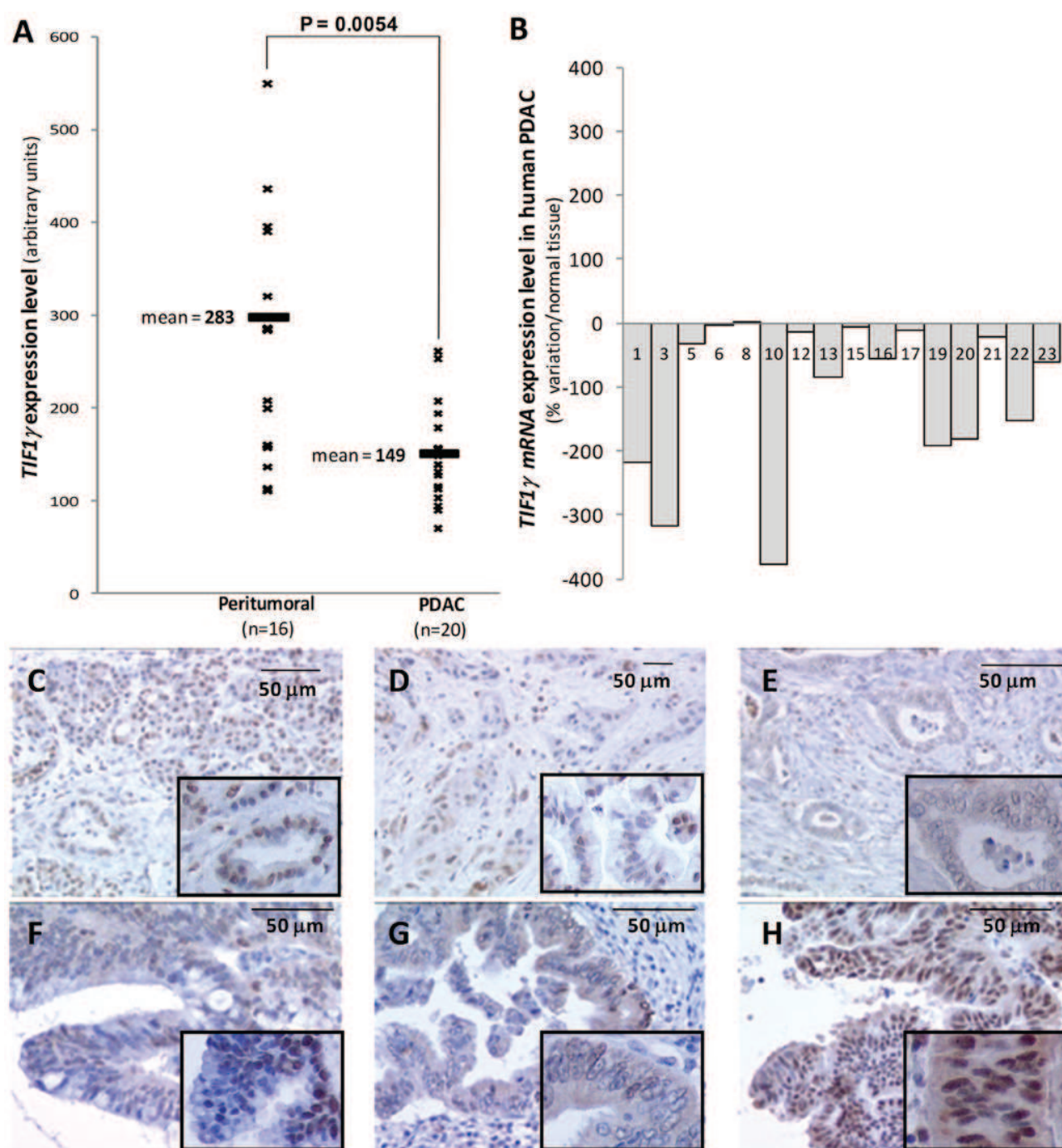


Figure 5. *TIF1 γ* expression in human pancreatic neoplasia. The expression of *TIF1 γ* from 20 human PDAC and 16 peritumoral tissues was determined by quantitative RT-PCR (A). The average expression (\pm sd) is plotted for each group (B). The significance (P value) for the difference between peritumoral and tumoral groups, determined by a Student's T test, is shown above the graphs. The expression of *TIF1 γ* protein was evaluated by immunohistochemistry in different pancreatic lesions: PDAC (n patients=20) (peritumoral (C) and tumoral tissues (D, E), IPMN (n patients=10) of high grade dysplasia (F), high-grade PanINs (n patients=8) (G) and MCN (n patients=15) (H). Inset pictures: higher magnification. doi:10.1371/journal.pgen.1000575.g005

Materials and Methods

Mice

Tif1 γ ^{lox/lox} [32] mice harboring floxed exons 2–4 were generated by K.Y. and R.L. will be described elsewhere. Briefly, using a genomic clone that contains a portion of the *Tif1 γ* gene, we

generated a targeting vector in which a *PGK-Neo* selection cassette flanked by two *loxP* sites was introduced into intron 1 and a third *loxP* site inserted into intron 4. This targeting vector was designed with the expectation that upon homologous recombination and subsequent Cre recombinase-mediated excision, exons 2, 3 and 4 along with the *PGK-Neo* cassette would be deleted, thereby causing

a frameshift mutation with a premature termination codon in exon 5. The putative product of this deleted gene corresponds to a truncated protein lacking part of the RING finger-B box-coiled coil (RBCC) motif and the entire C-terminal region of the TIF1 γ protein, which contains the conserved PHD finger/bromodomain unit.

Ink4A/Arf^{lox/lox} [12], *LSL-Kras^{G12D}* [8,43–45] and *Pdx1-Cre* [34] mouse strains done by others were previously described. Mice were maintained in a specific pathogen-free animal facility at the “Centre Léon Bérard” (Lyon, France) and handled in compliance with the institutional guidelines. All procedures were approved by an ethic committee under regulatory of governmental authority (CREEA).

Histology

Histology experiments were performed as previously described [46]. Primary antibody used were : TIF1 γ (1/800; Euromedex), Chymotrypsin (1/1000; AbD Serotec), Insulin (1/1000; Dako), CK19 (1/10; Trauma III - Developmental Studies Hybridoma Bank - University of Iowa), SMAD4 (1/100; Santa Cruz). Alcian blue staining was performed as previously described [47].

Human samples

Cryopreserved tumoral and peritumoral tissue samples were obtained from an institutional tissue bank, the Tumorothèque des Hospices Civils de Lyon (Centre de Ressources Biologiques, Hospices Civils de Lyon). In accordance with French ethical rules, samples were from patients having given their informed consent or from deceased patients. Prior to molecular analysis, the quality and cellularity of tissue samples was verified histologically; tumor tissues were selected in order to contain a significant amount of neoplastic cells; peritumoral tissues were constantly altered by reactive fibrotic changes associated with a loss in acinar tissue and a massive ductular proliferation.

RNA analysis

Liquid nitrogen frozen human tumors were blended using a Pro200 homogenizer (Pro Scientific Inc.) in a 5 M guanidine solution. Total RNA was further purified by RNeasy mini kit (Qiagen). The cDNA was used as template with RT Kit SuperScript II (Invitrogen). quantitative RT-PCR was performed as previously described [48].

Live imaging

For MRI and PET experiments, mice were anesthetized using 3% isoflurane inhalation (TEM Segal, Lormont, France) and maintained in 1.5% isoflurane atmosphere during experiments.

For PET experiments, the mice were catheterized in the caudal vein (24 gauge), injected with 250 μ Ci of 300 μ L of radioactive 18-Fluorodéoxyglucose (FDG). After 90 minutes to allow FDG fixation, images were acquired during 15 minutes (constant 2% isoflurane atmosphere) using the “TEP clearPET” (Raytest, Inc.). MRI acquisitions were made with a BioSpec-7T system (Bruker, Ettlingen, Germany) using a 32 mm inner-diameter emission/reception volume coil (Rapid Biomedical, Würzburg, Germany). T1/T2-weighted contrast sequences synchronized to respiration were acquired for each mouse. A RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) sequence (TR/TE 3500/38.1 ms) with fat saturation was used. Geometric parameters were: a series of 18, 750 μ m thick sections, 33 mm field of view, and 256 \times 256 pixel matrix. Voxel size was therefore 129 \times 129 \times 750 μ m³.

Supporting Information

Figure S1 Loss of nuclear Tif1 γ protein expression in the pancreas of *Pdx1-Cre; Tif1 γ ^{lox/lox}* mice. Immunohistochemistry showed that Tif1 γ was expressed in the nuclei of pancreatic cells in wild-type mice and that this staining was lost in a *Pdx1-Cre;TIF1 γ ^{lox/lox}* pancreas.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000575.s001 (2.25 MB TIF)

Figure S2 Image of a polycystic pancreas from a 154-day-old *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Tif1 γ ^{lox/lox}* mouse. Pancreas is circled in black. Note the presence of numerous translucent cysts (arrowhead).

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000575.s002 (2.96 MB TIF)

Figure S3 Presence of inflammatory cells in the pancreas associated with the cystic structures. Immunohistochemistry revealed the presence of different populations of leucocytes infiltrating the pancreas of a 20-day-old *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Tif1 γ ^{lox/lox}* mouse (D–F) compared to a wild-type littermate (A–C). MPO (A,D), F4/80 (B,E), and CD3 (C,F) were respectively used as specific markers for neutrophils, macrophages and lymphocytes.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000575.s003 (2.71 MB TIF)

Figure S4 *SMAD4* expression in human pancreatic neoplasia. Quantitative RT-PCR to detect *SMAD4* expression from the 16 PDAC for which peritumoral tissue was available (A). For each patient represented by an individual bar, *SMAD4* expression is represented as a percentage of variation relative to mRNA expression in the peritumoral tissue from the same patient (B). *SMAD4* protein expression pattern was also assessed by immunohistochemistry. In the normal pancreas (C), *SMAD4* is strongly detected in endocrine islets, a faint labeling is visible in acinar cells and ductal cells. In adenocarcinomas (n patients = 20), no labeling for *SMAD4* was detected whereas adjacent residual endocrine cells are positive (D). In another example of adenocarcinoma, *SMAD4* is faintly but readily detectable in neoplastic cells; the labeling is both cytoplasmic and nuclear (E). In IPMN grade 3, *SMAD4* expression is heterogeneous; most cells are negative, while a few scattered cells retain a faint expression, usually nuclear (F). In PanIN grade 3, *SMAD4* expression is either undetectable, as exemplified in the largest figure (note the persistent expression in adjacent residual endocrine cells (arrow)), or heterogeneous, as shown in the inset (G). In MCN, *SMAD4* expression is usually strong, in low grade (large figure) as well as in high grade (inset) lesions (H).

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000575.s004 (3.34 MB TIF)

Table S1 Measurement of the area occupied by the normal pancreatic tissue.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000575.s005 (0.06 MB DOC)

Acknowledgments

We thank G. Gouysse, J.B. Langlois, S. Martin, M. Janier, P. Meeus, and M. Peix for their expert assistance. We are deeply grateful to D. Wotton for advice, helpful discussions, and proofreading of the manuscript. We thank T. Jacks/R. DePinho, D. Tuveson, and D. Melton for providing *Ink4A/Arf^{lox/lox}*, *LSL-Kras^{G12D}*, and *Pdx1-Cre* mouse strains.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DFV SM LB. Performed the experiments: DFV KPY IT FG VA BK FL SM SGL SG JYS RL LB. Analyzed the data: DFV IT VA BK JCM SM JLI PD SG AP RR NB JYS RL LB. Contributed reagents/materials/analysis tools: DFV KPY IT VA JCM NB JYS RL LB. Wrote the paper: RL LB.

References

- Maitra A, Hruban RH (2008) Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* 3: 157–188.
- Maitra A, Fukushima N, Takaori K, Hruban RH (2005) Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol* 12: 81–91.
- Furukawa T, Kloppel G, Volkan Adsay N, Albores-Saavedra J, Fukushima N, et al. (2005) Classification of types of intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: a consensus study. *Virchows Arch* 447: 794–799.
- Koorstra JB, Hustinx SR, Offerhaus GJ, Maitra A (2008) Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatol* 8: 110–125.
- Bardeesy N, DePinho RA (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer* 2: 897–909.
- Shi C, Hruban RH, Klein AP (2009) Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 133: 365–374.
- Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Anver MR, Biankin AV, et al. (2006) Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res* 66: 95–106.
- Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, et al. (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4: 437–450.
- Guerra C, Schuhmacher AJ, Canamero M, Grippo PJ, Verdagner L, et al. (2007) Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 11: 291–302.
- Grippo PJ, Nowlin PS, Demeure MJ, Longnecker DS, Sandgren EP (2003) Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant Kras in transgenic mice. *Cancer Research* 63: 2016–2019.
- Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, et al. (2005) Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7: 469–483.
- Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, et al. (2003) Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development* 17: 3112–3126.
- Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, Cheng KH, Lopez LV, et al. (2006) Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5947–5952.
- Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Fujitani Y, et al. (2006) Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev* 20: 3147–3160.
- Hezel AF, Gurumurthy S, Granot Z, Swisa A, Chu GC, et al. (2008) Pancreatic LKB1 deletion leads to acinar polarity defects and cystic neoplasms. *Mol Cell Biol* 28: 2414–2425.
- Siveke JT, Einwachter H, Sipos B, Lubeseder-Martellato C, Kloppel G, et al. (2007) Concomitant pancreatic activation of Kras(G12D) and Tgfa results in cystic papillary neoplasms reminiscent of human IPMN. *Cancer Cell* 12: 266–279.
- De La OJ-P, Emerson LL, Goodman JL, Froebe SC, Illum BE, et al. (2008) Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18907–18912. Epub 12008 Nov 18921.
- Nolan-Stevaux O, Lau J, Truitt ML, Chu GC, Hebrok M, et al. (2009) GLI1 is regulated through Smoothed-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes Dev* 23: 24–36.
- Shi G, Zhu L, Sun Y, Bettencourt R, Damsz B, et al. (2009) Loss of the Acinar-Restricted Transcription Factor Mist1 Accelerates Kras-Induced Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Gastroenterology* 136(4): 1368–1378.
- Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, et al. (2008) Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321: 1801–1806.
- Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, et al. (2006) Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev* 20: 3130–3146.
- Izeradjene K, Combs C, Best M, Gopinathan A, Wagner A, et al. (2007) Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Cell* 11: 229–243.
- Kojima K, Vickers SM, Adsay NV, Jhala NC, Kim HG, et al. (2007) Inactivation of Smad4 accelerates Kras(G12D)-mediated pancreatic neoplasia. *Cancer Res* 67: 8121–8130.
- Kuang C, Xiao Y, Liu X, Stringfield TM, Zhang S, et al. (2006) In vivo disruption of TGF-beta signaling by Smad7 leads to premalignant ductal lesions in the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1858–1863.
- Ross S, Hill CS (2008) How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 383–408.
- Massague J, Gomis RR (2006) The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* 580: 2811–2820.
- Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, et al. (1999) TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* 18: 1209–1217.
- Yan KP, Dolle P, Mark M, Lerouge T, Wendling O, et al. (2004) Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of the mouse transcriptional intermediary factor 1 gamma gene. *Gene* 334: 3–13.
- Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, et al. (2005) Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 121: 87–99.
- Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, et al. (2009) Germ-layer specification and control of cell growth by TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* 136: 123–135.
- Levy L, Howell M, Das D, Harkin S, Episkopou V, et al. (2007) Arkadia activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation. *Mol Cell Biol* 27: 6068–6083.
- He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, et al. (2006) Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell* 125: 929–941.
- Doisne JM, Bartholin L, Yan KP, Garcia CN, Duarte N, et al. (2009) iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *J Exp Med* 206: 1365–1378.
- Gu G, Dubauskaite J, Melton DA (2002) Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129: 2447–2457.
- Jorgensen MC, Ahnfelt-Ronne J, Hald J, Madsen OD, Serup P, et al. (2007) An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev* 28: 685–705.
- Erdogan M, Pozzi A, Bhowmick N, Moses HL, Zent R (2008) Transforming growth factor-beta (TGF-beta) and TGF-beta-associated kinase 1 are required for R-Ras-mediated transformation of mammary epithelial cells. *Cancer Res* 68: 6224–6231.
- Heldin CH, Moustakas A (2006) A new twist in Smad signaling. *Dev Cell* 10: 685–686.
- Ng YY, Fan JM, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Yang WC, et al. (1999) Glomerular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in the evolution of glomerular crescent formation. *Nephrol Dial Transplant* 14: 2860–2872.
- Sawyer JR, Thomas EL, Lukacs JL, Swanson CM, Ding Y, et al. (2002) Recurring breakpoints of 1p13 approximately p22 in osteochondroma. *Cancer Genet Cytogenet* 138: 102–106.
- Johansson M, Dietrich C, Mandahl N, Hambræus G, Johansson L, et al. (1994) Karyotypic characterization of bronchial large cell carcinomas. *Int J Cancer* 57: 463–467.
- Klugbauer S, Rabes HM (1999) The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 18: 4388–4393.
- Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Mark M, Herquel B, et al. (2007) Loss of Trim24 (Tif1alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nat Genet* 39: 1500–1506.
- Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, et al. (2001) Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes & Development* 15: 3243–3248.
- Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, et al. (2001) Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. [see comment]. *Nature* 410: 1111–1116.
- Tuveson DA, Shaw AT, Willis NA, Silver DP, Jackson EL, et al. (2004) Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* 5: 375–387.
- Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vernere N, Ray-Coquard I, Bachelot T, et al. (2004) Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10: 7466–7474.
- Albores-Saavedra J, Weimersheimer-Sandoval M, Chable-Montero F, Montante-Montes de Oca D, Hruban RH, et al. (2008) The foamy variant of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Ann Diagn Pathol* 12: 252–259.
- Bartholin L, Cyprian FS, Vincent D, Garcia CN, Martel S, et al. (2008) Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor beta signaling through the TbetaRI/ALK5 receptor. *Genesis* 46(12): 724–731.

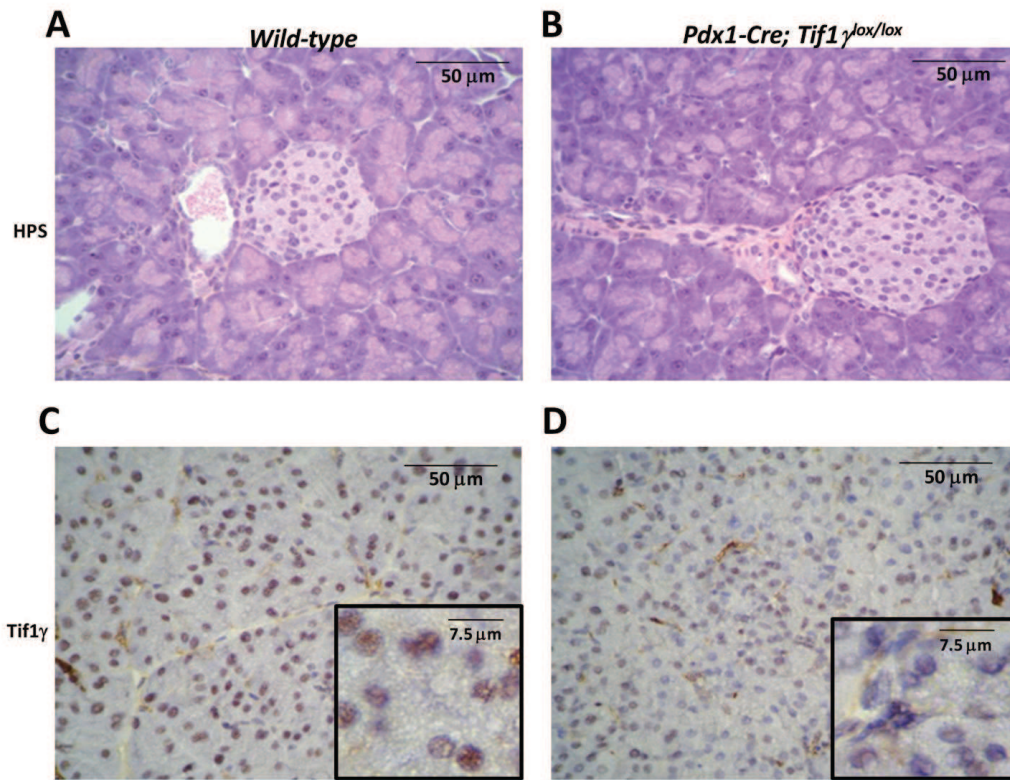


Figure S1

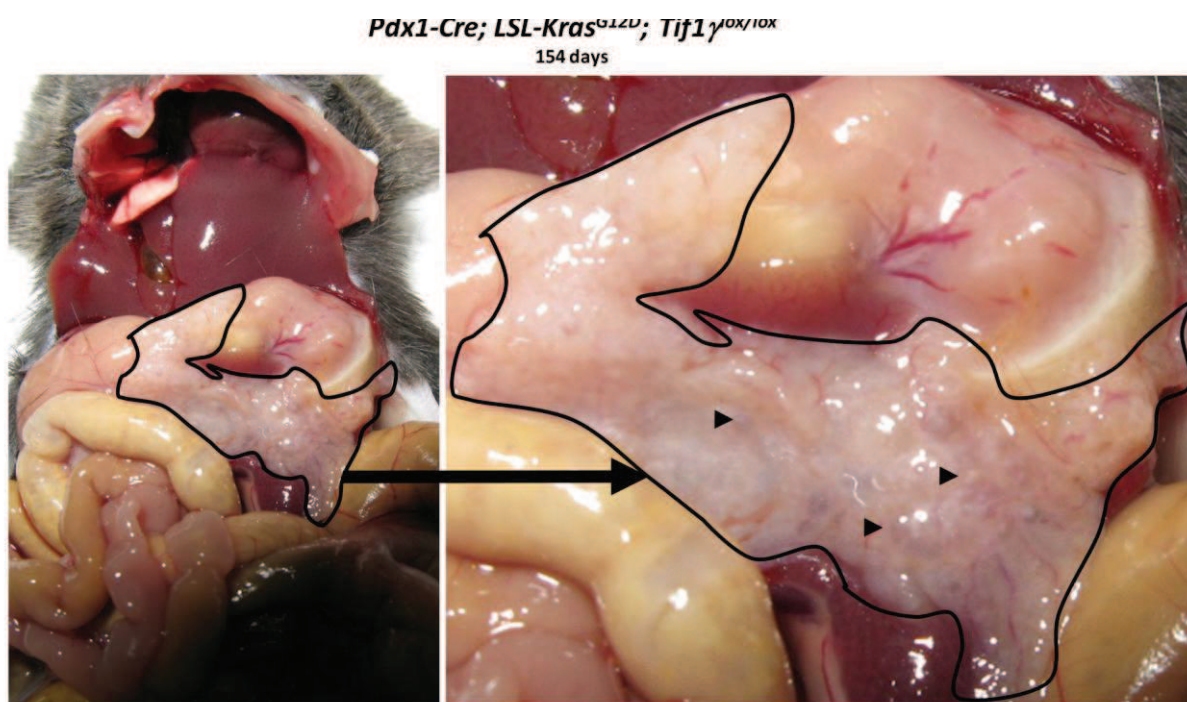


Figure S2

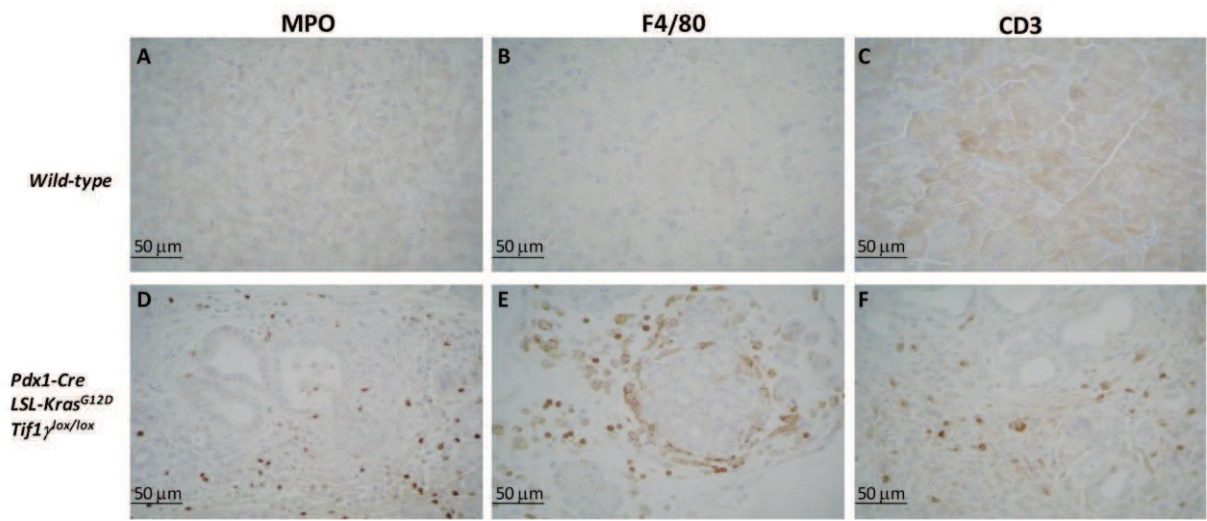


Figure S3

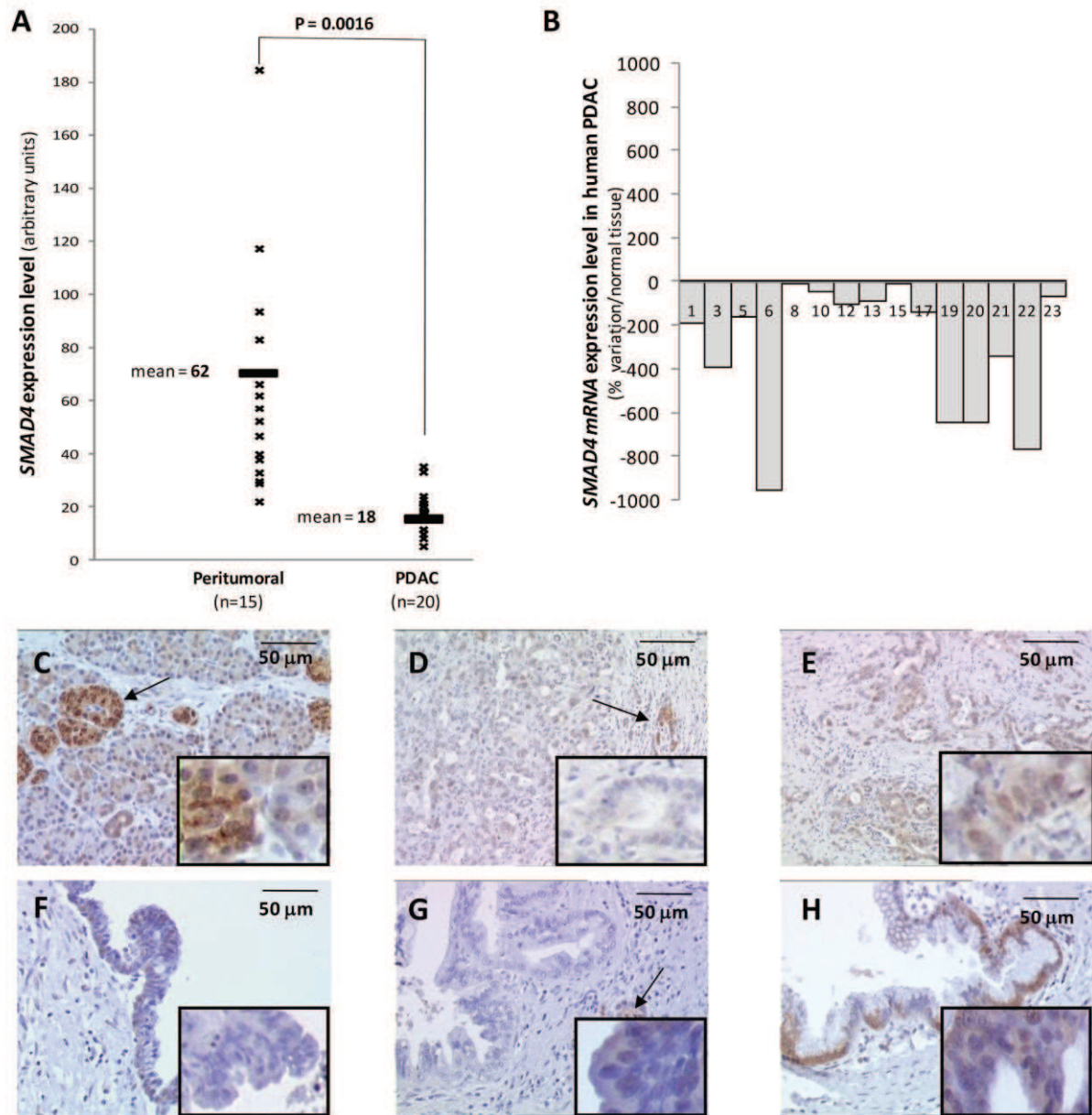


Figure S4

Table S1. Measurement of the area occupied by the normal pancreatic tissue

GENOTYPE	ID	Age (weeks)	Age (days)	Measured area (mm ²)	Percentage of normal pancreatic tissue
Pdx1-Cre ; LSL-Kras^{G12D} ; Tif1^{lox/lox}	#1		19	42	91 %
	#2	3	20	96	96 %
	#3		20	115	94 %
	#4		41	194	34 %
	#5		41	106	58 %
	#6	6-13	65	UND	UND
	#7		65	UND	UND
	#8		90	150	2 %
	#9		129	150	2 %
	#10	18-27	131	64	19 %
	#11		154	99	<1 %
	#12		189	91	44 %
Pdx1-Cre ; LSL-Kras^{G12D}	#13	4	30	59	>99 %
	#14		44	84	>99 %
	#15	6-13	68	45	>99 %
	#16		80	87	>99 %
	#17		125	83	99 %
	#18	18-27	159	81	91 %
	#19	51	356	53	83 %

Mice (ID, identity) from indicated genotypes were euthanized at different ages and their pancreas were analyzed by histology. We quantified the area occupied by the normal pancreatic tissue by excluding the regions devoid of acini as a consequence of the lesions (PanINs, IPMNs, area with massive inflammatory infiltrates). Normal pancreas is represented as a percentage of the whole measured pancreatic tissue. Measurements were done on several pictures taken from 2 non-contiguous pancreas sections. Quantification was done with AxioVision software. UND, undetermined.

II –Interaction génétique entre TIF1 γ et SMAD4 dans le cancer du pancréas

Article 5

Vincent, D.F., J. Gout, N. Chuvin, V. Arfi, R.M. Pommier, P. Bertolino, N. Jonckheere, D. Ripoche, B. Kaniewski, S. Martel, J.-B. Langlois, S. Goddard-Léon, A. Colombe, M. Janier, I. Van Seuning, R. Losson, U. Valcourt, I. Treilleux, P. Dubus, N. Bardeesy, and L. Bartholin. 2012. Tif1 γ Suppresses Murine Pancreatic Tumoral Transformation by a Smad4-Independent Pathway. American Journal of Pathology (2012)

Introduction

L'étude précédente a démontré que l'inactivation de Tif1 γ chez la souris coopérait avec l'oncogène Kras^{G12D} pour induire le développement précoce de lésions kystiques appelées IPMN (Vincent et al., 2009a). Chez l'Homme, les IPMN peuvent évoluer vers des PDAC. L'objectif de cette étude était donc double. Le premier objectif était d'évaluer si les souris Pdx1-Cre; Kras^{G12D}; Tif1 γ ^{lox/lox} (KTT), développant des IPMN, présentaient une prédisposition à développer des cancers invasifs. Pour cela, une cohorte « vieillissante » d'animaux KTT a été surveillée par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique). Le deuxième objectif était d'explorer si le développement des lésions observées en absence de Tif1 γ dépendait de Smad4. Afin de répondre à ce point, des animaux présentant une double inactivation de Tif1 γ et de Smad4 ont été générés (Pdx1-Cre; Kras^{G12D}; Tif1 γ ^{lox/lox}, Smad4^{lox/lox} (KSSTT)).

Résultat

Nous avons tout d'abord montré que les animaux KTT développaient des PDAC après l'âge de 250 jours. Cette observation conforte le rôle suppresseur de tumeur de TIF1 γ et suggère que les IPMN ont évolué vers des stades invasifs ce qui semble mimer la pathologie humaine. Ensuite, l'analyse des souris KSSTT a démontré que l'inactivation combinée de

Tif1 γ et *Smad4* accélèrent le développement de PDAC détectables dès l'âge de 25 jours. Bien que ces tumeurs se développent plus rapidement, elles présentent un aspect bien différencié, caractère généralement associé à une moindre agressivité. En effet, des marquages immunohistochimiques ont révélé que les tumeurs KSSTT étaient positives pour la Cadhérine-E (marqueur épithélial) et négative pour la Vimentine (marqueur mésenchymateux). De façon intéressante les tumeurs se développant chez les souris KTT avaient un aspect peu différencié se caractérisant notamment par une forte expression de la Vimentine et une délocalisation de la Cadhérine-E.

Conclusion

Nos travaux constituent la première démonstration *in vivo* que *Tif1 γ* peut inhiber l'initiation tumorale induite par l'oncogène *Kras*^{G12D}. Ceci suggère que les IPMN, développés dans le modèle KTT, pourraient être à l'origine de tumeurs invasives. Nous avons également montré que l'effet suppresseur de tumeur de *Tif1 γ* au cours de l'initiation tumorale était indépendant de *Smad4*.

Short Communication

Tif1 γ Suppresses Murine Pancreatic Tumoral Transformation by a Smad4-Independent Pathway

David F. Vincent,^{*†‡§¶} Johann Gout,^{*†‡§¶}
Nicolas Chuvin,^{*†‡§¶||} Vanessa Arfi,^{*†‡§¶}
Roxane M. Pommier,^{*†‡§¶} Philippe Bertolino,^{*†‡§¶}
Nicolas Jonckheere,^{**} Doriane Ripoche,^{*†‡§¶}
Bastien Kaniewski,^{*†‡§¶} Sylvie Martel,^{*†‡§¶}
Jean-Baptiste Langlois,^{††} Sophie Goddard-Léon,[¶]
Amélie Colombe,[¶] Marc Janier,^{‡§¶‡§§}
Isabelle Van Seuningén,^{**} Régine Losson,^{¶||}
Ulrich Valcourt,^{*†‡§¶} Isabelle Treilleux,^{*†‡§¶}
Pierre Dubus,^{|||} Nabeel Bardeesy,^{***} and
Laurent Bartholin^{*†‡§¶}

From INSERM U1052* and CNRS UMR5286,[†] Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Lyon, France; the University of Lyon,[‡] Lyon, France; the University of Lyon 1,[§] Lyon, France; the Léon Bérard Center,[¶] Lyon, France; Ecole Normale Supérieure de Lyon,^{||} Lyon, France; INSERM UMR837,^{**} Jean-Pierre Aubert Research Center, Lille, France; CERMEP,^{††} Imagerie du Vivant, Bron, France; the Nuclear Medicine Service,^{‡‡} Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils Lyon, Lyon, France; the Laboratory of Physical Chemistry of Luminescent Materials,^{§§} Villeurbanne, France; Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC),^{¶¶} Strasbourg, Illkirch, France; EA 2406,^{|||} University of Bordeaux, Bordeaux, France; and the Massachusetts General Hospital Cancer Center,^{***} Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

Transcriptional intermediary factor 1 γ (TIF1 γ ; alias, TRIM33/RFG7/PTC7/ectodermin) belongs to an evolutionarily conserved family of nuclear factors that have been implicated in stem cell pluripotency, embryonic development, and tumor suppression. TIF1 γ expression is markedly down-regulated in human pancreatic tumors, and Pdx1-driven Tif1 γ inactivation cooperates with the *Kras*^{G12D} oncogene in the mouse pancreas to induce intraductal papillary mucinous neoplasms. In this study, we report that aged *Pdx1-Cre*; *LSL-Kras*^{G12D}; *Tif1 γ* ^{lox/lox} mice develop pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs), an aggressive and always fatal neoplasm, demonstrating a Tif1 γ tumor-suppressive function in the development of pancreatic carcinogenesis. Deletion of *SMAD4/DPC4* (deleted in pancreatic car-

cinoma locus 4) occurs in approximately 50% of human cases of PDAC. We, therefore, assessed the genetic relationship between Tif1 γ and Smad4 signaling in pancreatic tumors and found that *Pdx1-Cre*; *LSL-Kras*^{G12D}; *Smad4*^{lox/lox}; *Tif1 γ* ^{lox/lox} (alias, *KSSTT*) mutant mice exhibit accelerated tumor progression. Consequently, Tif1 γ tumor-suppressor effects during progression from a premalignant to a malignant state in our mouse model of pancreatic cancer are independent of Smad4. These findings establish, for the first time to our knowledge, that Tif1 γ and Smad4 both regulate an intraductal papillary mucinous neoplasm-to-PDAC sequence through distinct tumor-suppressor programs. (*Am J Pathol* 2012, 180:2214–2221; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.02.006>)

Transcriptional intermediary factor 1 γ (TIF1 γ ; alias, TRIM33/RFG7/PTC7/ectodermin) belongs to an evolutionarily conserved family of nuclear factors that have been implicated in stem cell pluripotency, embryonic development, and tumor suppression.¹ These proteins are characterized by the presence of a RING domain with E3 ubiquitin-ligase activity and multiple chromatin interaction domains, including B-boxes, coiled-coil domains, plant homeo domains, and bromodomains, suggesting functions in both protein degradation and modulation of

Supported by INSERM (Avenir program), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of France (D.F.V., R.M.P., and D.R.) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (D.F.V.), fellowships from the Ligue Nationale Contre le Cancer (J.G., V.A., and N.J.), and a grant from the NIH (R01 CA133557-01 to N.B.).

Accepted for publication February 7, 2012.

D.F.V. and J.G. contributed equally to this work.

The author R.L. is deceased.

This article is dedicated to the memory of our dear colleague, Régine Losson, who discovered the TIF1 family and passed away 2 years ago after a courageous fight against cancer.

Supplemental material for this article can be found at <http://ajp.amjpathol.org> or at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.02.006>.

Address reprint requests to Laurent Bartholin, Ph.D., Centre Léon Bérard, 28 Rue Laennec, Lyon, France. E-mail: laurent.bartholin@lyon.unicancer.fr.

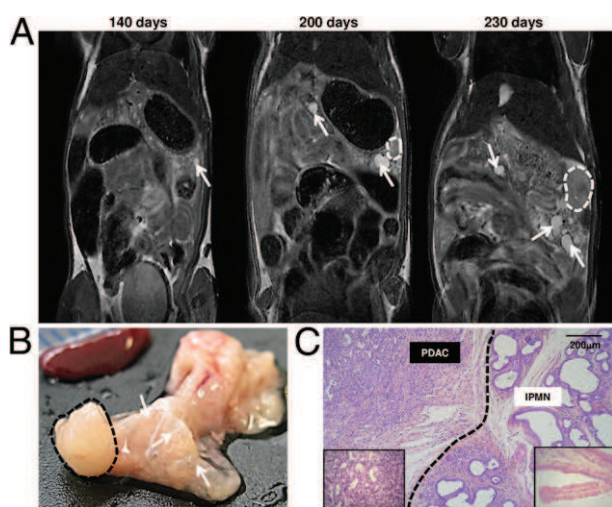


Figure 1. *Tif1* γ deficiency cooperates with *Kras*^{G12D} to drive an IPMN-PDAC sequence. **A:** Longitudinal magnetic resonance imaging study (from 140 to 230 days) of a KTT mouse. Cystic lesions (hypersignal, **arrow**) and a firm mass (isosignal, **dotted line**) are indicated. **B:** Macroscopic analysis of the KTT pancreas after dissection at 230 days. **Dotted line**, PDAC; **arrows**, IPMN lesions. **C:** Histological section of the KTT pancreas stained with hematoxylin-phloxin-saffron. The **dotted line** separates PDAC from the IPMN environment.

transcription. TIF1 γ interacts with transforming growth factor β (TGF- β) signaling SMAD transcription factors.²⁻⁵ Overall, the potential role of TIF1 γ in the TGF- β -SMAD signaling pathway is of high significance given the importance of this pathway in tumor suppression. TGF- β is a secreted polypeptide belonging to a wide family of cytokines and growth factors, including TGF- β s, bone morphogenetic proteins, and activins. TGF- β signaling involves two serine-threonine kinase receptors, type I and II TGF- β receptors. After binding to its receptors, TGF- β induces the phosphorylation of the type I TGF- β receptor, whose serine-threonine enzymatic activity is activated to allow the phosphorylation of receptor-regulated SMAD2 and SMAD3 (R-SMADs). Phosphorylated R-SMADs then interact with SMAD4. The R-SMADs-SMAD4 complex accumulates within the nucleus, binds to DNA, and activates the transcription of target genes. TGF- β also activates noncanonical pathways that are independent of SMAD proteins.

Pancreatic cancer is a particularly relevant context for exploring the interplay of TIF1 γ and TGF- β -SMAD function because this malignancy is characterized by a high rate of inactivating genetic alterations in the TGF- β -SMAD4 pathway. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an aggressive neoplasm; it is always fatal and is the fifth most common cause of death by cancer in the Western world. The median age of patients diagnosed as having PDAC is 65 to 70 years. PDAC, which affects the exocrine pancreas, accounts for >80% of pancreatic cancers. PDAC arises from precursor lesions with ductal differentiated features. The precursors of the disease are divided into three groups: pancreatic intraepithelial neoplasm, intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN), and mucinous cystic neoplasm. Both human patients and mouse models with these types of lesions have an increased risk of developing a PDAC.

We previously developed a genetically engineered mouse model and showed that targeted pancreatic conditional inactivation of *Tif1* γ cooperated with activated *Kras* to induce IPMNs.⁶ Indeed, *Pdx1-Cre; LSL-Kras*^{G12D}; *Tif1* γ ^{lox/lox} mice (KTT) develop IPMNs with a short latency and a full penetrance ($n = 12$; age range, 19 to 189 days). However, none of these KTT mice presented obvious signs of malignant transformation reminiscent of PDAC.

In the present study, we explored the susceptibility of KTT aging mice (aged >200 days) to develop PDAC. We also investigated the impact of *Smad4* deletion, which occurs in approximately 50% of human PDACs, in the IPMN-PDAC sequence resulting from combined *Kras* activation and *Tif1* γ deficiency in the murine pancreas.

Materials and Methods

Mice

Tif1 γ ^{lox/lox},⁷ *LSL-Kras*^{G12D},⁸ *Smad4*^{lox/lox},⁹ and *Pdx1-Cre*¹⁰ alleles, provided by other groups, were previously described. Mice were maintained in a specific pathogen-free animal facility at the AniCan Platform, Centre Léon Bérard (Lyon, France), and handled in compliance with the institutional guidelines. All procedures were approved by an ethics committee under governmental regulatory authority (Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4).

Histological Data

Histological experiments were performed as previously described.⁶ The primary antibodies used are: mouse monoclonal antibodies against *Tif1* γ (1:500; Euromedex, Souffelweyersheim, France), Mucin-5ac (clone 45M1, 1:100; Thermo Scientific, Illkirch, France), chymotrypsin (1:1000; AbD Serotec, Colmar, France), E-cadherin (1:700; BD Biosciences, Le Pont-De-Claix, France), and proliferating cell nuclear antigen (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); rat monoclonal antibodies against cytokeratin-19 (1:50; Troma-III-s; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA) and F4/80 (1:100; Acris Antibodies, Herford, Germany); goat polyclonal antibodies against vimentin (1:100; Santa Cruz Biotechnology); and guinea pig polyclonal antibodies against α -smooth muscle actin (α -SMA, 1:100; DakoCytomation, Trappes, France). For immunofluorescence, histological section cells were incubated with rabbit polyclonal anti-Glut2 antibody (1:100; Millipore, Molsheim, France) and, finally, with secondary-labeled antibody (goat anti-rabbit-IgG Alexa Fluor 488 nm, 1:200; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Alcian blue staining was performed in acidic pH conditions.

Magnetic Resonance Imaging

The magnetic resonance imaging experiments were performed as previously described.⁶

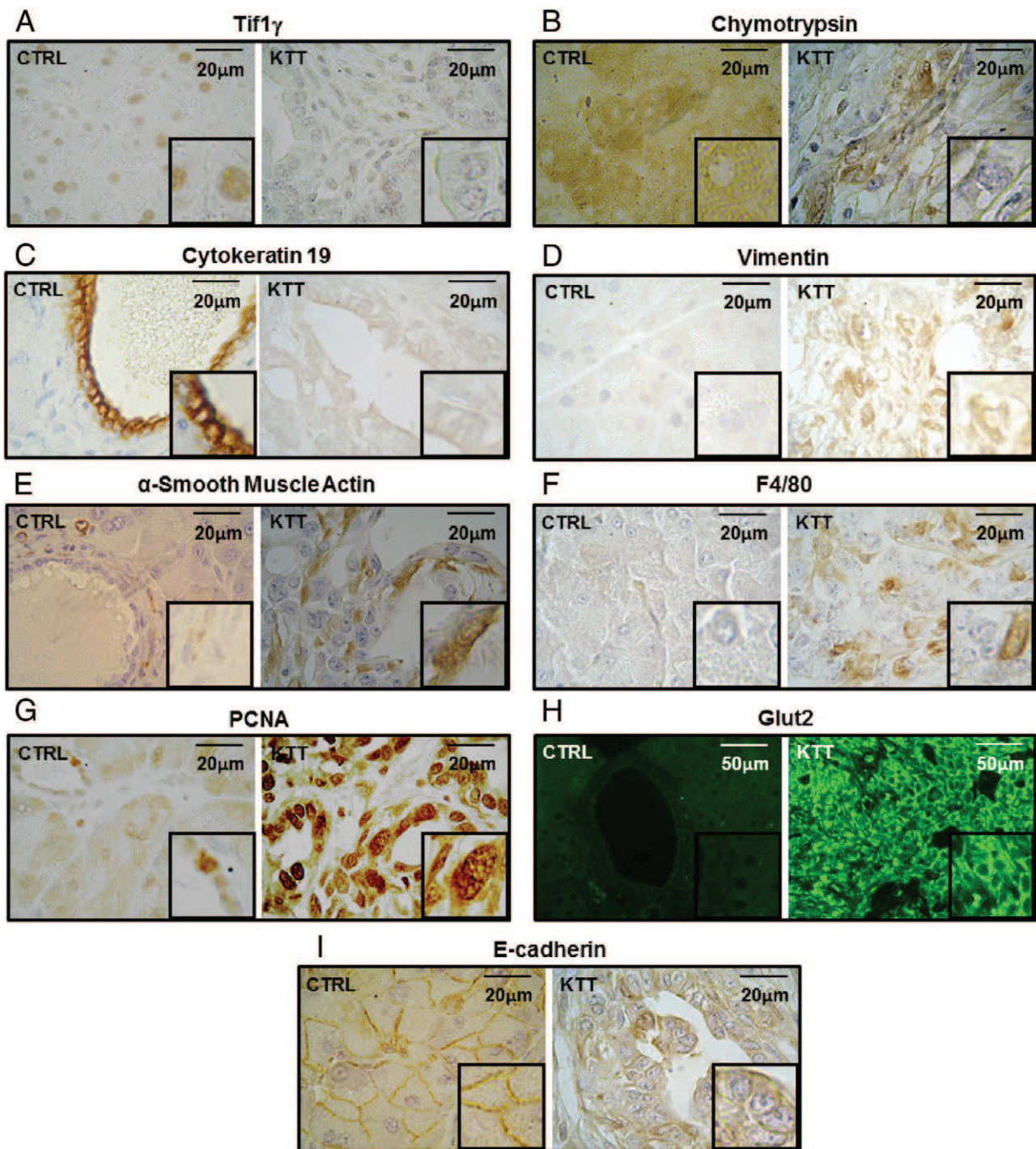


Figure 2. Histological characterization of KTT pancreatic tumors. IHC analysis reveals a complete loss of Tif1 γ expression in the epithelial compartment (A). KTT tumors exhibit an altered differentiation status both in the acinar (chymotrypsin, B) and ductal (cytokeratin-19, C) compartments. Markers of activated fibroblasts and/or myofibroblasts [vimentin (D) and α -SMA (E)] can be detected in the stroma of KTT tumors. Interestingly, some vimentin-positive, but α -SMA-negative, cells were seen lining the lumen, suggesting that some tumor cells express the vimentin marker. Tumor-associated macrophages are also seen in KTT tumors (F4/80, F). Proliferative index [proliferating cell nuclear antigen (PCNA), G] and metabolic activity (Glut2, H) markers are both highly overexpressed in KTT tumors. These PDACs present a dedifferentiated phenotype, generally associated with disorganization of E-cadherin (I) from membrane toward the inside cellular compartment. CTRL, control.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the Fisher exact test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

We generated aging KTT mice that were euthanized between the age of 200 days and 1 year ($n = 3$). As described later, two of three of these mice presented with

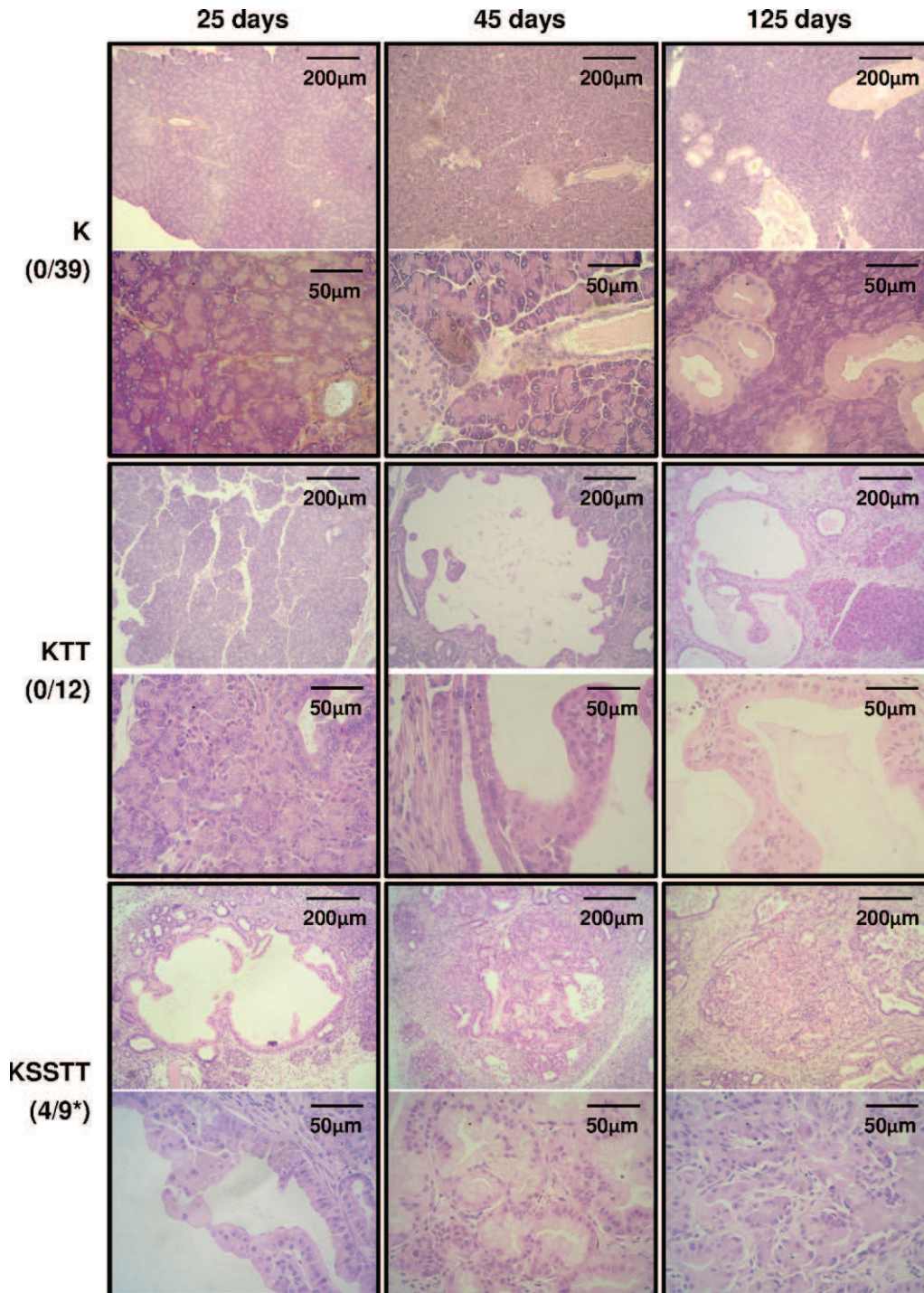


Figure 3. Deletion of *Smad4* in KTT mice accelerates PDAC development. Histological sections of K, KTT, and KSSTT mutant mouse pancreas were stained with hematoxylin-phloxinsaffron from 25 to 125 days. For each panel pair, low (**upper**) and high (**lower**) magnifications are shown. For each genotype, the number of mice developing PDACs before the age of 200 days is represented as a fraction number (in parentheses). The *P* value was determined by the exact Fisher test. **P* < 0.05.

PDAC, whereas none of the *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}* (K; *n* = 9) or *Pdx1-Cre; Tif1 γ ^{lox/lox}* (TT; *n* = 6) control mice developed PDAC during this time frame (see Supplemental Table S1 at <http://ajp.amjpathol.org>). The longitudinal analysis of one KTT mouse by magnetic resonance imaging showed gradual growth of cystic lesions (hyper-signal), with the onset at 200 days of age of a firm and solid mass (isosignal) that developed into the tail of the

pancreas (Figure 1A). Thirty days later (at the age of 230 days), the size of this solid lump had dramatically increased, prompting us to euthanize the animal. Macroscopic analysis of the pancreas from this animal confirmed the presence of multifocal cystic lesions (smooth texture), colonizing the entire organ, and the presence of a voluminous and firm tumor (tough texture), which had invaded the tail of the pancreas (Figure 1B). Microscopic

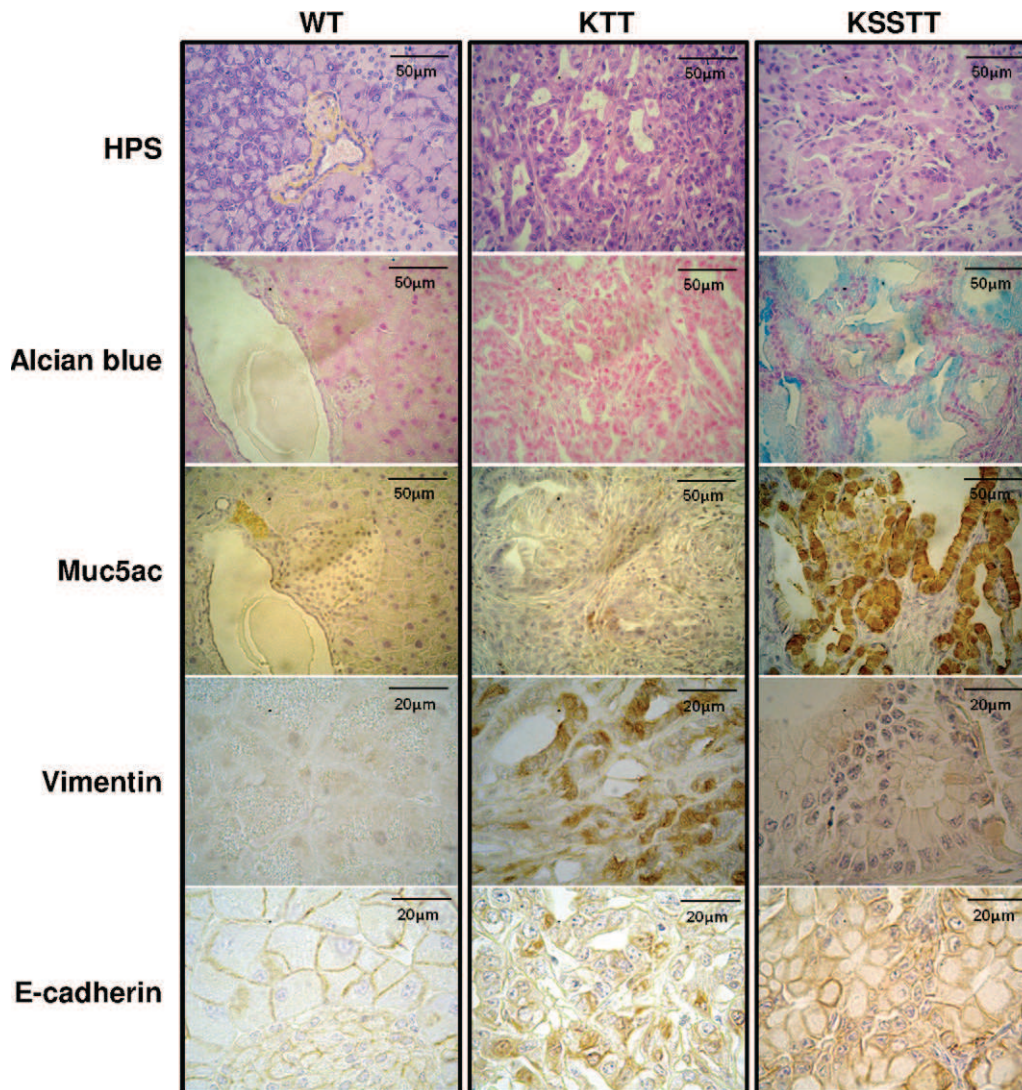


Figure 4. KTT and KSSTT pancreatic tumors display different histological features. Histological sections of 365-day-old control [wild type (WT)], 231-day-old KTT, and 126-day-old KSSTT pancreas samples stained with hematoxylin-phloxinsaffron or Alcian blue (mucin specific) or subjected to IHC for Mucin-5ac (Muc5ac), vimentin, or E-cadherin.

analysis of the pancreatic nodule that developed in this KTT mouse revealed a poorly differentiated carcinoma (Figure 1C), found adjacent to epithelial cysts reminiscent to human IPMNs. We observed focal destruction of the pancreatic parenchyma by a malignant epithelial proliferation made of irregular glands and cellular cords. Tumor cells are irregular in size and shape, with abundant basophilic cytoplasm and irregular nuclei. Mitotic features are common. The tumoral stroma presents with multiple inflammatory cells but only a low level of collagen between tumor cells. Histological analysis of the two other KTT mice sacrificed at the ages of 256 and 342 days revealed the presence of a small focus with PDAC and the presence of multiple large high-grade IPMNs with some papillary protrusions (data not shown). Altogether, these data indicate that KTT mice develop IPMNs with short latency and revealed that these tumors have high malignant potential.

To carefully characterize the pathological features of PDAC arising in KTT mice, we performed immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence experiments, which allowed us to underline the hallmarks of PDAC (Figure 2). In accordance with the expression pattern of the *Pdx1-Cre* transgene (in all pancreatic epithelial lineages¹⁰), we observed a complete loss of Tif1 γ expression in the epithelial compartment of KTT tumors, whereas residual expression could be detected in the microenvironment surrounding the cancer cells (mesenchymal cells and immune infiltrates) (Figure 2A). KTT tumors have lost their acinar differentiation (chymotrypsin negative) (Figure 2B). Cytokeratin 19, a marker that is normally only expressed at the membrane of the cells lining the duct in wild-type pancreas, presents a faint, but diffuse, cytoplasmic localization in KTT tumors, attesting to the altered ductal differentiation of these tumors (Figure 2C). We next explored the tumor-associated stroma.

Indeed, it is well documented that PDAC is characterized by an abundant stroma (desmoplastic stroma), the epithelial cancer cells eventually representing <10% of the tumor. Positive staining for vimentin (Figure 2D) and α -SMA (Figure 2E) confirmed the presence of a fibroblastic/myofibroblastic stromal compartment in KTT tumors. Interestingly, some vimentin-positive cells (but α -SMA negative) were seen lining the lumen, suggesting that some tumoral cells express the vimentin marker. We also detected tumor-associated macrophages (F4/80-positive cells) in KTT tumors (Figure 2F). To assess the proliferative index and the metabolic status of KTT tumors, we examined the expression of proliferating cell nuclear antigen (Figure 2G) and glut2 (Figure 2H) markers, which are both highly expressed in KTT tumors. The poorly differentiated state is generally associated with disorganization of E-cadherin, a membrane protein ensuring the maintenance of proper cell-cell contact. IHC against E-cadherin in KTT PDACs revealed a severe disorganization of the epithelial architecture, with a clear delocalization of E-cadherin from the membrane to the intracellular compartment (Figure 2I).

SMAD4 (alias, *DPC4*, deleted in pancreatic carcinoma, locus 4) is involved in TGF- β signaling and is a major tumor suppressor deleted in approximately 50% of PDACs. TIF1 γ has been implicated as a modulator of TGF- β signaling, potentially either augmenting or compromising SMAD protein function. To examine the genetic interactions between *Tif1 γ* and *Smad4*, we generated conditional null mice for both *Smad4* and *Tif1 γ* in a *Kras*-driven mouse model of pancreatic cancer. We observed that *Pdx1-Cre; Smad4^{lox/lox}; Tif1 γ ^{lox/lox}* (SSTT; $n = 18$) double-null mice do not develop pancreatic lesions (all ages, $n = 18$; aged >125 days, $n = 8$) (see Supplemental Table S1 at <http://ajp.amjpathol.org>). We next generated *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Smad4^{lox/lox}; Tif1 γ ^{lox/lox}* mice harboring pancreatic inactivation for both *Smad4* and *Tif1 γ* in a *Kras^{G12D}* background (KSSTT; $n = 9$) (see Supplemental Table S1 at <http://ajp.amjpathol.org>). Interestingly, the two KSSTT mice that we euthanized at the age of 25 days presented high-grade IPMN lesions. Moreover, 44% (4/9) of KSSTT mice that we euthanized before the age of 200 days had developed a PDAC (Figure 3). More important, PDAC developing as soon as the age of 46 days has never been reported in K or KTT mice. Thus, double-null homozygous inactivation of *Tif1 γ* and *Smad4*, in a *Kras^{G12D}* background, induces the formation of PDACs at a higher frequency and a shorter latency than any other combined mutations. We have also generated *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Smad4^{lox/+}; Tif1 γ ^{lox/lox}* mice (KSTT; $n = 7$) harboring *Tif1 γ* homozygous inactivation and a *Smad4* heterozygous inactivation. Interestingly, >50% (4/7) of the KSTT mice develop PDACs in an intermediary time frame to what is observed in KTT and KSSTT mice (see Supplemental Table S1 at <http://ajp.amjpathol.org>).

Histological analysis of these tumors revealed that KSSTT tumors retained more differentiated features compared with KTT tumors. Indeed, KSSTT showed strong Alcian blue staining and Mucin-5ac immunoreactivity, attesting a well-differentiated mucinous phenotype. In addition, KSSTT tu-

mors retained a clear epithelial differentiation, as attested by an intact E-cadherin intercellular network and the absence of vimentin expression (Figure 4).

Discussion

By using the *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Tif1 γ ^{lox/lox}* mouse model, we previously reported that the inactivation of *Tif1 γ* could cooperate with the *Kras^{G12D}* oncogene to induce IPMNs with full penetrance by the age of 189 days.⁶ Herein, we extended this study by demonstrating, in aging KTT mice (aged >200 days), that homozygous inactivation of *Tif1 γ* significantly potentiates the capacity of *Kras^{G12D}* to induce PDACs, supporting the potency of IPMNs to evolve toward aggressive lesions, as observed in humans. This observation reinforces the existence of a tumor-suppressive pathway, orchestrated by *Tif1 γ* , to prevent malignant transformation of premalignant lesions induced by activated *Kras*. However, no direct communication between the tumor itself and a pre-existing IPMN was proved by the pathological examination. Whether PDACs directly arise from existing precancerous cystic lesions remains an open question in the field.

The mechanism by which TIF1 γ exerts its tumor-suppressive effect remains elusive. TGF- β signaling is classically considered as tumor suppressive, via its anti-proliferative and pro-apoptotic functions, to prevent normal or premalignant cells to evolve toward a malignant state. This is well illustrated by the high rate of inactivating genetic alterations in the TGF- β -SMAD4 pathway¹¹ and by mouse models showing that *Smad4*-homozygous inactivation, in combination with activated *Kras*,¹²⁻¹⁴ causes the development of cystic lesions with a higher potential to progress toward PDAC, compared with mice expressing activated *Kras* alone (*Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}*).¹⁵ To address the genetic relationship between *Tif1 γ* and *Smad4* in pancreatic tumors, we generated KSSTT double-null homozygous mutant mice. We observed a pronounced genetic interaction between *Smad4* and *Tif1 γ* inactivation, demonstrating that both molecules act in separate pathways to suppress a premalignant-to-malignant *Kras*-driven pancreatic tumor. It is, however, possible that the capacity of *Tif1 γ* to constrain the premalignant-to-malignant progression depends on the modulation of TGF- β signaling arms independent of SMAD4. This could involve R-SMADs or noncanonical TGF- β pathways. Indeed, it has been proposed in other cell systems that TIF1 γ /R-SMAD complexes could positively mediate TGF- β functions,^{3,16,17} through the regulation of expression of a different set of genes by R-SMAD-TIF1 γ and R-SMAD-SMAD4 complexes.¹⁸ This hypothesis is consistent with the phenotype observed in *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; T β R11^{lox/lox}* mice,¹⁹ in which canonical and noncanonical TGF- β pathways are abrogated, with a phenotype resembling the one observed in KSSTT mice. Finally, TIF1 γ could prevent the premalignant-to-malignant progression through mechanisms totally unrelated to TGF- β signaling. Indeed, it may result from the modulation of gen-

eral programs affecting broader genomic functions. For instance, TIF1 γ and related family member TIF1 α were involved in chromatin remodeling²⁰ and transcription elongation,^{17,21} and TIF1 β was involved in DNA repair.²²

Once the malignant transformation has occurred by bypassing its anti-proliferative and pro-apoptotic effects, TGF- β acquires oncogenic properties and eventually facilitates tumor progression. Even if our results clearly argue for a role of Tif1 γ to constrain the transition between a premalignant and a malignant state through a mechanism independent of Smad4 activity, we cannot exclude that Smad4 function may facilitate tumor aggressiveness after the premalignant state is overrun and the premalignant state is achieved (in malignant tumors that retained a functional Smad4). In such cases, Smad4 may facilitate local invasion and metastatic dissemination by inducing epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). This may reflect the capacity of TIF1 γ to constrain invasiveness programs, such as EMT, as recently demonstrated *in vitro* in human mammary epithelial cells.¹⁸ Consistent with this, the *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox/lox}; Smad4^{lox/lox}* mice¹² develop well-differentiated PDAC, with attenuated invasive properties, compared with the poorly differentiated tumors observed in *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox/lox}* mice. In our study, even if PDACs developing in KSS1T mice arise with a shorter latency and a higher penetrance compared with KTT mice, they present a well-differentiated phenotype compared with the poorly differentiated phenotype of the PDACs we observed in KTT mice. This suggests a tumor-suppressive role of Tif1 γ to limit the aggressiveness of Smad4-positive cancer cells by compromising their capacity to undergo EMT. It may result in a lower capacity to generate metastases. The molecular mechanism occurring *in vivo* may rely on the capacity of TIF1 γ to mono-ubiquitinate SMAD4 and limit SMAD4 nuclear accumulation, as demonstrated in other systems.^{2,4}

In conclusion, we demonstrate, in this study, that *Tif1 γ* inactivation cooperates with activated *Kras* to potentiate the premalignant-to-malignant transition to promote the onset of poorly differentiated tumors. We also evidence that the tumor-suppressive role of Tif1 γ during the premalignant-to-malignant progression is independent of Smad4 activity. Finally, we noticed that the absence of Smad4 could redirect Tif1 γ -negative pancreatic tumors toward a well-differentiated phenotype, consistent with an effect of Tif1 γ to inhibit Smad4-dependent EMT. Then, Tif1 γ exerts tumor-suppressive functions independently of Smad4 in the premalignant-to-malignant transition but may also exert tumor-suppressive functions dependent on Smad4 later on during tumor progression.

Acknowledgments

We thank the specific pathogen-free animal facility at AniCan Plateform, Centre Léon Bérard and each of its members for technical assistance and animal care and Dr. David Wotton for helpful discussion.

References

1. Hatakeyama S: TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer* 2011, 11:792–804
2. Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M, Piccolo S: Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 2005, 121:87–99
3. He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massague J: Hematopoiesis controlled by distinct TIF1 γ and Smad4 branches of the TGF β pathway. *Cell* 2006, 125:929–941
4. Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, Adorno M, Martello G, Stinchfield MJ, Soligo S, Morsut L, Inui M, Moro S, Modena N, Argenton F, Newfeld SJ, Piccolo S: FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGF β signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* 2009, 136:123–135
5. Xi Q, Wang Z, Zaromytidou AI, Zhang XH, Chow-Tsang LF, Liu JX, Kim H, Barlas A, Manova-Todorova K, Kaartinen V, Studer L, Mark W, Patel DJ, Massague J: A poised chromatin platform for TGF- β access to master regulators. *Cell* 2011, 147:1511–1524
6. Vincent DF, Yan KP, Treilleux I, Gay F, Arfi V, Kaniewski B, Marie JC, Lepinasse F, Martel S, Goddard-Leon S, Iovanna JL, Dubus P, Garcia S, Puisieux A, Rimokh R, Bardeesy N, Scaozec JY, Losson R, Bartholin L: Inactivation of TIF1 γ cooperates with *Kras* to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet* 2009, 5:e1000575
7. Morsut L, Yan KP, Enzo E, Aragona M, Soligo SM, Wendling O, Mark M, Khetchoumian K, Bressan G, Chambon P, Dupont S, Losson R, Piccolo S: Negative control of Smad activity by ectodermin/Tif1 γ patterns the mammalian embryo. *Development* 2010, 137:2571–2578
8. Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, Jacks T, Tuveson DA: Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic *K-ras*. *Genes Dev* 2001, 15:3243–3248
9. Yang X, Li C, Herrera PL, Deng CX: Generation of Smad4/Dpc4 conditional knockout mice. *Genesis* 2002, 32:80–81
10. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA: Direct evidence for the pancreatic lineage: nGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 2002, 129:2447–2457
11. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA: Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2006, 20:1218–1249
12. Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, Hezel AF, Horner J, Lauwers GY, Hanahan D, Depinho RA: Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev* 2006, 20:3130–3146
13. Kojima K, Vickers SM, Adsay NV, Jhala NC, Kim HG, Schoeb TR, Grizzle WE, Klug CA: Inactivation of Smad4 accelerates *Kras*(G12D)-mediated pancreatic neoplasia. *Cancer Res* 2007, 67:8121–8130
14. Izeradjene K, Combs C, Best M, Gopinathan A, Wagner A, Grady WM, Deng CX, Hruban RH, Adsay NV, Tuveson DA, Hingorani SR: *Kras*(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Cell* 2007, 11:229–243
15. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA: Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003, 4:437–450
16. Doisne JM, Bartholin L, Yan KP, Garcia CN, Duarte N, Le Ludeuc JB, Vincent D, Cyprian F, Horvat B, Martel S, Rimokh R, Losson R, Benlagha K, Marie JC: iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF- β signaling. *J Exp Med* 2009, 206:1365–1378
17. Bai X, Kim J, Yang Z, Jurynech MJ, Akie TE, Lee J, LeBlanc J, Sessa A, Jiang H, DiBiase A: TIF1 γ controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell* 2010, 142:133–143
18. Hesling C, Fattet L, Teyre G, Jury D, Gonzalo P, Lopez J, Vanbelle C, Morel AP, Gillet G, Mikaelian I, Rimokh R: Antagonistic regulation of EMT by TIF1 γ and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep* 2011, 12:665–672
19. Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Fujitani Y, Fujitani S, Wright CV, Moses HL: Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in

- mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev* 2006, 20:3147–3160
20. Agricola E, Randall RA, Gaarenstroom T, Dupont S, Hill CS: Recruitment of TIF1 γ to chromatin via its PHD finger-bromodomain activates its ubiquitin ligase and transcriptional repressor activities. *Mol Cell* 2011, 43:85–96
21. Tsai WW, Wang Z, Yiu TT, Akdemir KC, Xia W, Winter S, Tsai CY, Shi X, Schwarzer D, Plunkett W, Aronow B, Gozani O, Fischle W, Hung MC, Patel DJ, Barton MC: TRIM24 links a non-canonical histone signature to breast cancer. *Nature* 2010, 468:927–932
22. Kepkay R, Attwood KM, Ziv Y, Shiloh Y, Delleire G: KAP1 depletion increases PML nuclear body number in concert with ultrastructural changes in chromatin. *Cell Cycle* 2011, 10:308–322

Résultats Complémentaires

Tif1 γ , un inhibiteur de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse

« Tif1 γ inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition »

Introduction

The acquisition of a mesenchymal phenotype developed in KTT mice (Pdx1-Cre; Kras^{G12D}; Tif1 γ ^{lox/lox}) (Vincent et al., 2009a) suggests that Tif1 γ may have a direct role in the regulation of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT). Moreover, the apparent restoration of epithelial differentiation upon concurrent Tif1 γ and Smad4 inactivation (Pdx1-Cre; Kras^{G12D}; Tif1 γ ^{lox/lox}, Smad4^{lox/lox}) (Vincent et al., 2012) imply that EMT associated with Tif1 γ loss may requires the presence of intact Smad4 signaling. To test this hypothesis *in vitro*, we explored the role of Tif1 γ in EMT induced by TGF β in the mouse NMuMG cell line.

Materials and Methods

Materials. Dulbecco's Modified Eagle's Medium, fetal calf serum, penicillin, streptomycin were purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Oligonucleotides for quantitative RT-PCR were prepared by Eurogentec (Seraing, Belgium). SiRNA Duplex Oligoribonucleotide against Tif1 γ or Smad4 were purchased from Invitrogen.

Cell culture and transfection. The murine mammary epithelial NMuMG cell line (American Type Culture Collection) was maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and containing penicillin (100 U/mL), streptomycin (0,1 g/L) and insulin (10 μ g/mL) at 37°C under 5% CO₂. The day before transfection, NMuMG cells were plated on 24-well dishes at 100,000 cells per well, in complete DMEM. SiRNA transient transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. SiRNA Duplex Oligoribonucleotides were used at a final concentration of 20 nM. Degenerated siRNA (siScramble) was used as a control.

RNA analysis. Total RNA was further purified using RNeasy mini kit from Qiagen (Courtaboeuf, France). First-strand cDNAs were prepared using 250 ng of total RNA and

SuperScriptII Reverse Transcriptase kit (Invitrogen). Real-time quantitative PCR was performed as previously described (Bartholin et al., 2008).

Genes		Sequences (5'→3')	Refseq Accession #
<i>Hprt1</i>	Sense	SuperArray PPH01018B (SA Biosciences)	NM_000194
	Antisense		
<i>Slug</i>	Sense	AAAATTCATGTGATGGATGCAGTAA	NM_011415.2
	Antisense	CAGCTCATCCAACACTACACAAGTCA	
<i>Smad4</i>	Sense	SuperArray PPM04411A (SA Biosciences)	NM_008540
	Antisense		
<i>Snail</i>	Sense	CCACTGCAACCGTGCTTTT	NM_011427.2
	Antisense	TCTTCACATCCGAGTGGGTTT	
<i>Tif1γ</i>	Sense	GAGTCTGTTGGAACATCTGGTCAGCG	NM_053170.2
	Antisense	GGCCTGTGATATCATTCTGCTGCTGT	
<i>Zeb1</i>	Sense	CCGCGGCGCAATAACGTTACA	NM_011546.2
	Antisense	TACTGTCTGGTCTGCTGGCAGT	

Table 1 Primers used for quantitative RT-PCR analyses.

Actin direct fluorescence and E-cadherin immunofluorescence staining. NMuMG cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% (v/v) Triton X-100. Cells were incubated with phalloidin-TRITC from Sigma-Aldrich (1 μg/mL), then incubated with mouse monoclonal anti-E-cadherin antibodies (1/500, BD Biosciences), and finally with secondary labeled antibody (goat anti-mouse-IgG Alexa Fluor 488 nm, 1/200, Invitrogen). Nuclei were stained with DAPI.

Results

As expected, treatment of NMuMG cells with TGFβ caused the loss of membrane-associated E-cadherin and the onset of actin stress fibers (Figure 1A). Tif1γ knockdown (Figure 1B) was able to induce an EMT in NMuMG cells. In addition, Tif1γ down-regulation enhanced the TGFβ-induced EMT phenotype. To that extend, the capacity of Tif1γ depletion to cause spontaneous EMT was completely blocked in the presence of the TGFβ Smad2/3-signaling inhibitor SB431542. Thus, Tif1γ is an efficient inhibitor of the TGFβ-induced EMT program. As expected, Smad4 knockdown significantly compromised the degree of EMT provoked by TGFβ in NMuMG cells (Figure 1A). Correspondingly, Smad4 knockdown (Figure 1B) also partially reversed the cellular (Figure 1A) and molecular (Figure 1C) changes associated with EMT induced by Tif1γ down-regulation (in the absence or presence of TGFβ).

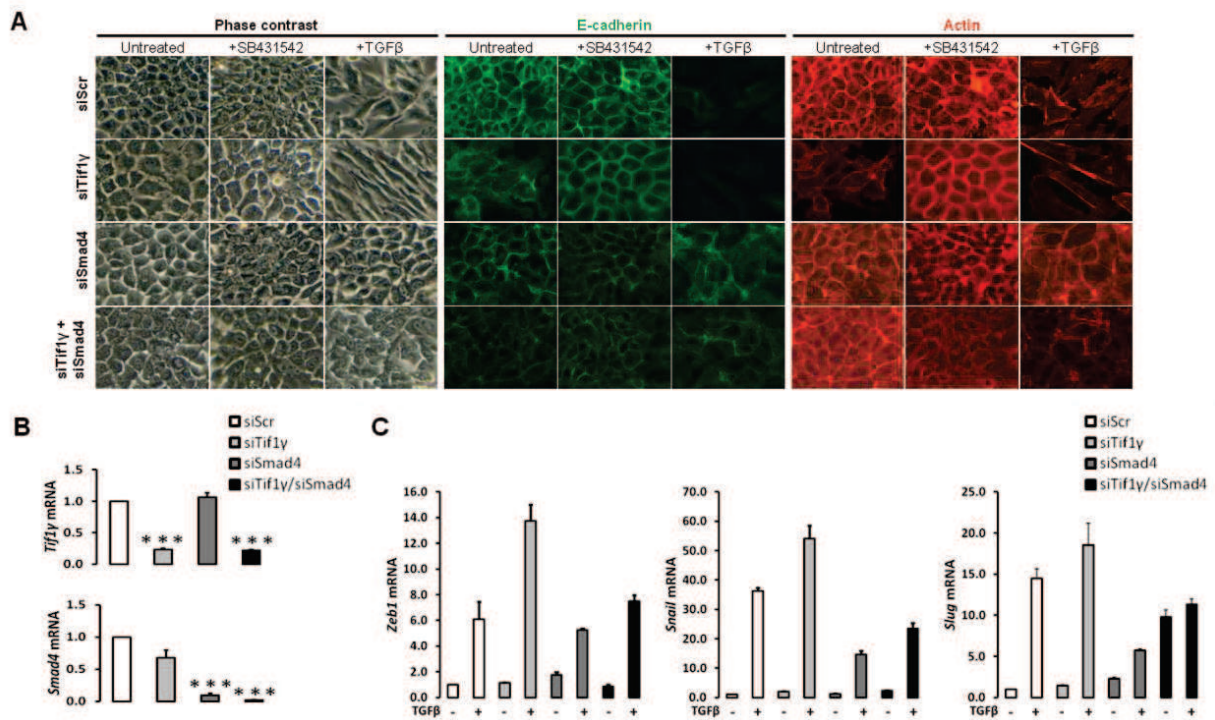


Figure 1 *Tif1γ* knockdown potentiates TGFβ-induced EMT. (A) NMuMG cells transiently transfected with control (siScr) or specific siRNA targeting *Tif1γ*, *Smad4* or both (siTif1γ+siSmad4), were treated or not with TGFβ (5 ng/mL) or SB431542 (10 mM) for 36 hours, and observed using phase-contrast or fluorescence microscopy (E-cadherin and actin staining). (B) Quantitative RT-PCR analyses for the expression of *Tif1γ* and *Smad4* in NMuMG cells transiently transfected with siScramble (siScr) or specific siRNA targeting *Tif1γ*, *Smad4* or both (siTif1γ/siSmad4). All values were normalized to the amount of *Hprt1* mRNA and expressed relative to the value obtained for the untreated siScramble (siScr) condition (set as 1). Data are represented as values ± standard deviations (SD) from a representative experiment repeated at least three times. *** $P < 0.001$. (C) Quantitative RT-PCR analyses for the expression of EMT inducers (*Zeb1*, *Snail* and *Slug*) in NMuMG cells, transiently transfected as in (B), treated or not with TGFβ (5 ng/mL) for 36 hours. All values were normalized to the amount of *Hprt1* mRNA and expressed relative to the value obtained for untreated siScramble control (siScr -TGFβ). Data are represented as means ± standard deviations (SD) from a representative experiment repeated at least three times.

Conclusion

These results establish that *Tif1γ* and *Smad4* are both important and opposing regulators of TGFβ-induced EMT *in vitro*. In addition, we demonstrate that the capacity of *Tif1γ* inactivation to enhance TGFβ-induced EMT is completely dependent on the presence

of Smad4. These *in vitro* results parallel the alterations in differentiation seen in pancreatic tumors upon single and combined *Tif1 γ* and *Smad4* inactivation (Vincent et al., 2009a, 2012), and suggest that the EMT phenotype in KTT (Pdx1-Cre; Kras^{G12D}; Tif1 γ ^{lox/lox}) mice reflects direct functions of Tif1 γ in the maintenance of epithelial differentiation.

III – Discussion

Nos travaux visant à étudier le rôle de TIF1 γ dans le pancréas sont les premiers à démontrer son rôle suppresseur de tumeur (Vincent et al., 2009a). Ce rôle a été confirmé, récemment, dans d'autres néoplasies, comme la leucémie myélomonocytaire chronique (Aucagne et al., 2011) et l'hépatocarcinome (Herquel et al., 2011), indiquant que l'effet suppresseur de tumeur de TIF1 γ ne se limite pas au pancréas. A ce jour, aucune mutation du gène *TIF1 γ* n'a été trouvée chez l'Homme. Une étude a cependant mis en évidence une hyperméthylation du promoteur de *TIF1 γ* chez des patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique (Aucagne et al., 2011). Nous avons observé une perte d'expression de *Tif1 γ* chez des patients atteints de PDAC (Vincent et al., 2009a). La raison de cette perte d'expression n'est pas encore connue. En 2008, le séquençage de 24 tumeurs du pancréas n'a pas révélé de mutation de *TIF1 γ* (Jones et al., 2008). Nos travaux confirment également le rôle central des protéines de la famille TIF1 dans les processus de cancérogenèse. En effet, il a été montré que TIF1 α était un suppresseur de tumeur dans le foie (Khetchoumian et al., 2007). Plus récemment, il a été montré que ce rôle dépendait de l'interaction physique de TIF1 α avec les protéines TIF1 β et TIF1 γ (Herquel et al., 2011). Les autres protéines TIF1 pourraient donc participer au rôle suppresseur de tumeur de TIF1 γ dans le PDAC.

Nos résultats suggèrent également que les IPMN pourraient être des précurseurs des PDAC (Vincent et al., 2009a, 2012). Cependant, nous n'avons pas pu démontrer que les PDAC développés chez les souris KTT, avaient pour origine les IPMN. Par ailleurs, d'autres études ont montré que la délétion de *Smad4* accélérerait le développement de lésions précancéreuses pancréatiques (Bardeesy et al., 2006b; Izeradjene et al., 2007; Kojima et al., 2007). Compte tenu de la ressemblance du phénotype, et du fait que *Tif1 γ* a été décrit pour interagir avec les protéines Smads, il était donc tentant de spéculer que ces deux facteurs exerçaient leur fonction onco-suppressive par une même voie. Nos résultats démontrent néanmoins, que l'inactivation combinée de *Tif1 γ* et *Smad4* accélérerait le développement de tumeurs invasives. Ces 2 facteurs inhiberaient donc l'initiation tumorale par des voies oncosuppressives distinctes (Vincent et al., 2012). D'autre part, nos résultats *in vivo* suggèrent que TIF1 γ et SMAD4 participeraient à l'acquisition de propriétés agressives par les cellules tumorales. En effet, la perte de *Tif1 γ* induit le développement de tumeurs pancréatiques très peu différenciées, c'est à dire compatible avec une EMT. De la même

façon, la perte de Smad4 dans les tumeurs déficientes pour Tif1 γ , inhiberait la capacité des cellules à réaliser une EMT, expliquant le développement de tumeurs très différenciées (Vincent et al., 2012). TIF1 γ et SMAD4 exerceraient donc des rôles opposés dans l'acquisition d'un phénotype tumoral. Cette hypothèse a été validée par des études *in vitro*, où nous avons déterminé que Tif1 γ inhibait l'EMT induite par Smad4 (données non publiées). Ces résultats ont été confirmés récemment dans un modèle de cellules tumorales mammaires humaines (Hesling et al., 2011).

PARTIE 3 CONCLUSIONS ET PERPECTIVES

Mes travaux de thèse se sont intéressés au rôle du TGF β au cours de la progression tumorale de l'adénocarcinome du pancréas. La grande majorité des approches thérapeutiques conventionnelles n'ont pas permis d'améliorer le pronostic sombre de cette pathologie. Depuis 2003, des modèles murins de cancer du pancréas ont été développés permettant une meilleure compréhension de la physiopathologie de ce cancer. Ces modèles ont permis d'étudier plus spécifiquement certains aspects de la voie du TGF β qui ont été présentés dans ce manuscrit.

I Coopération entre Kras^{G12D} et le TGF β

Mes travaux ont permis de générer un nouvel outil permettant d'étudier *in vivo* les effets de l'activation de la voie du TGF β (allèle T β RI^{CA}). Ce modèle murin a été à la base d'une partie de mes travaux de thèse s'intéressant à la relation entre la voie du TGF β et l'oncogène Kras^{G12D} dans le cancer du pancréas. Nous avons montré que l'activation de la voie du TGF β , dans des cellules pancréatiques exprimant l'oncogène Kras^{G12D} induisait une inflammation du pancréas favorisant la progression tumorale. Cet effet serait, au moins en partie, dépendant la mort des cellules acineuses et de la stimulation de la sécrétion de cytokines proinflammatoires par la voie NF-KB. La suite de ce projet permettra de mieux comprendre comment la coopération entre la voie du TGF β et l'oncogène Kras permet d'induire la mort des cellules pancréatiques et le développement d'un phénotype inflammatoire.

Les perspectives de ce projet sont les suivantes :

Premièrement, nous caractériserons les **mécanismes moléculaires de la coopération entre les voies Kras et TGF β** . Dans des cellules acineuses exprimant Kras^{G12D} et traitées au TGF β , nous avons observé une forte potentialisation de la phosphorylation de la séquence SXS de la protéine Smad2 par rapport aux cellules « sauvages » (Vincent *et al.* en préparation). Nous déterminerons si cette potentialisation du signal est associée à une phosphorylation de la région « linker » de Smad2 ou de Smad3 par les protéines MAPK (Hayashida and Schnaper, 2003; Li et al., 2009). Initialement décrite comme un mécanisme de répression de l'activité transcriptionnelle des protéines Smads (Kretzschmar et al., 1999), la phosphorylation du

domaine « linker » représente un lien intéressant entre la voie du TGF β et l'oncogène Kras^{G12D}. Il a par exemple été démontré que la phosphorylation de ce domaine par ERK2 était nécessaire à la synthèse de collagène induit par la voie des Smads (Li et al., 2009). Enfin, il a été montré très récemment que la phosphorylation de la région « linker » de Smad2 par les kinases ERK pouvait stabiliser la phosphorylation du domaine SXS, stimulant ainsi l'activité transcriptionnelle des protéines Smads (Hough et al., 2012).

D'autre part, il a été décrit que l'activation des voies p38 et JNK par la kinase TAK1 était essentielle dans l'induction de l'apoptose par le TGF β (Sorrentino et al., 2008; Yamashita et al., 2008; Várady et al., 2011). Ces voies pouvant être également activées par Kras, il est possible de faire l'hypothèse qu'une potentialisation spécifique de ces voies favoriserait l'apoptose induite par le TGF β . La voie PI3K/Akt est une autre voie pouvant être activée à la fois par la voie du TGF β et l'oncogène Kras. L'activation de cette voie est classiquement associée à l'échappement à l'effet pro-apoptotique du TGF β (Conery et al., 2004; Band et al., 2009) et à la sécrétion de cytokines proinflammatoires au cours de la pancréatite (Samuel et al., 2006a). Par conséquent, il sera intéressant de déterminer si l'inhibition spécifique de la voie p38 ou JNK (*via* des inhibiteurs chimiques) permet de diminuer l'apoptose et d'augmenter la sécrétion de cytokines proinflammatoires des cellules pancréatiques. A l'inverse, l'inhibition de la voie PI3K/Akt pourrait augmenter la capacité du TGF β à induire l'apoptose des cellules acineuses et atténuer le phénotype inflammatoire.

Deuxièmement, nous déterminerons **les mécanismes cellulaires permettant à la voie du TGF β et à Kras^{G12D} d'induire la mort des cellules acineuses**. Nous nous intéresserons plus particulièrement à 3 mécanismes impliqués dans l'apoptose des cellules acineuses pancréatiques. Grâce au modèle *in vitro* que nous avons développé, il sera analysé par RT-PCR quantitative et Western-Blot, i) l'expression de marqueurs associés au stress du réticulum endoplasmique granuleux (Grp78, CHOP, XBP1) (Szmola and Sahin-Tóth, 2010), ii) l'activation directe de marqueurs pro-apoptotiques tels que Bim (Ramesh et al., 2009) ou encore iii) l'auto-activation des enzymes pancréatiques comme le trypsinogène PRSS1 (Kereszturi and Sahin-Tóth, 2009). Les résultats obtenus seront confrontés à l'analyse *in vivo* de ces marqueurs.

Troisièmement, nous analyserons **les mécanismes responsables de la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les cellules acineuses**. Il a été montré que la pancréatite est associée à une activation de la voie NF-KB et à une importante sécrétion de cytokines pro-

inflammatoires comme l'IL6 ou l'IL1 β par ces mêmes cellules (Yu et al., 2006, 2009). Les mécanismes permettant aux cellules acineuses de sécréter ces cytokines pro-inflammatoires restaient néanmoins méconnues. Nos résultats ont démontré que la voie du TGF β et l'oncogène Kras pouvait activer, dans les cellules pancréatiques, l'expression d'une sous-unité de NF-KB, p50, et stimuler *in vivo* l'expression de cytokines proinflammatoires. Nous analyserons si l'expression de p50 dans notre système est associée i) à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de NF-KB, grâce à des rapporteurs luciférase sensibles à cette voie (Bartholin et al., 2007), et ii) à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL6, IL1 β , IL1,...) grâce à des analyses ELISA et de RT-PCR quantitative.

D'autre part, il a été démontré que les cytokines proinflammatoires participaient à la fois au recrutement de cellules immunitaires mais également à la progression tumorale. Plusieurs études récentes ont en effet démontré que l'expression d'IL-6 dans le stroma facilitait la progression tumorale pancréatique en activant la voie Stat3 dans les cellules cancéreuses (Corcoran et al., 2011; Lesina et al., 2011; Fukuda et al., 2011). Nous déterminerons dans notre modèle de pancréatite (souris **CKR** ; Pdx1-Cre ; Kras^{G12D} ; LSL-T β RI^{CA}) si la voie Stat3 est activée (Immuno-Histo-Chimie anti-phosphoStat3) dans les cellules pancréatiques formant les lésions PanIN. Enfin, nous testerons si l'injection d'un inhibiteur de T β RI (SB431542) dans des souris CKR (20 mg/kg, injection i.p 2 fois/jour pendant 3 jours), permet d'inhiber le développement des lésions PanIN associées à la pancréatite, en diminuant l'activation de Stat3 dans ces mêmes lésions. L'injection de cet inhibiteur semble avoir peu d'effets toxiques sur les animaux et permet de plus d'inhiber efficacement la voie du TGF β *in vivo* (Segawa et al., 2010; Grainger et al., 2010).

Quatrièmement, nous étudierons le rôle de la **coopération entre la voie du TGF β et l'oncogène Kras^{G12D} chez des patients atteints de pancréatite chronique**. Le statut de Kras ainsi que la sécrétion de TGF β seront déterminés, respectivement, par séquençage de l'ADN circulant et par ELISA, à partir du sérum des patients. Une étude rétrospective sera réalisée afin de déterminer si le risque que présente cette population de développer un PDAC, est lié à la présence de mutation activatrice de Kras associée à une forte sécrétion de TGF β .

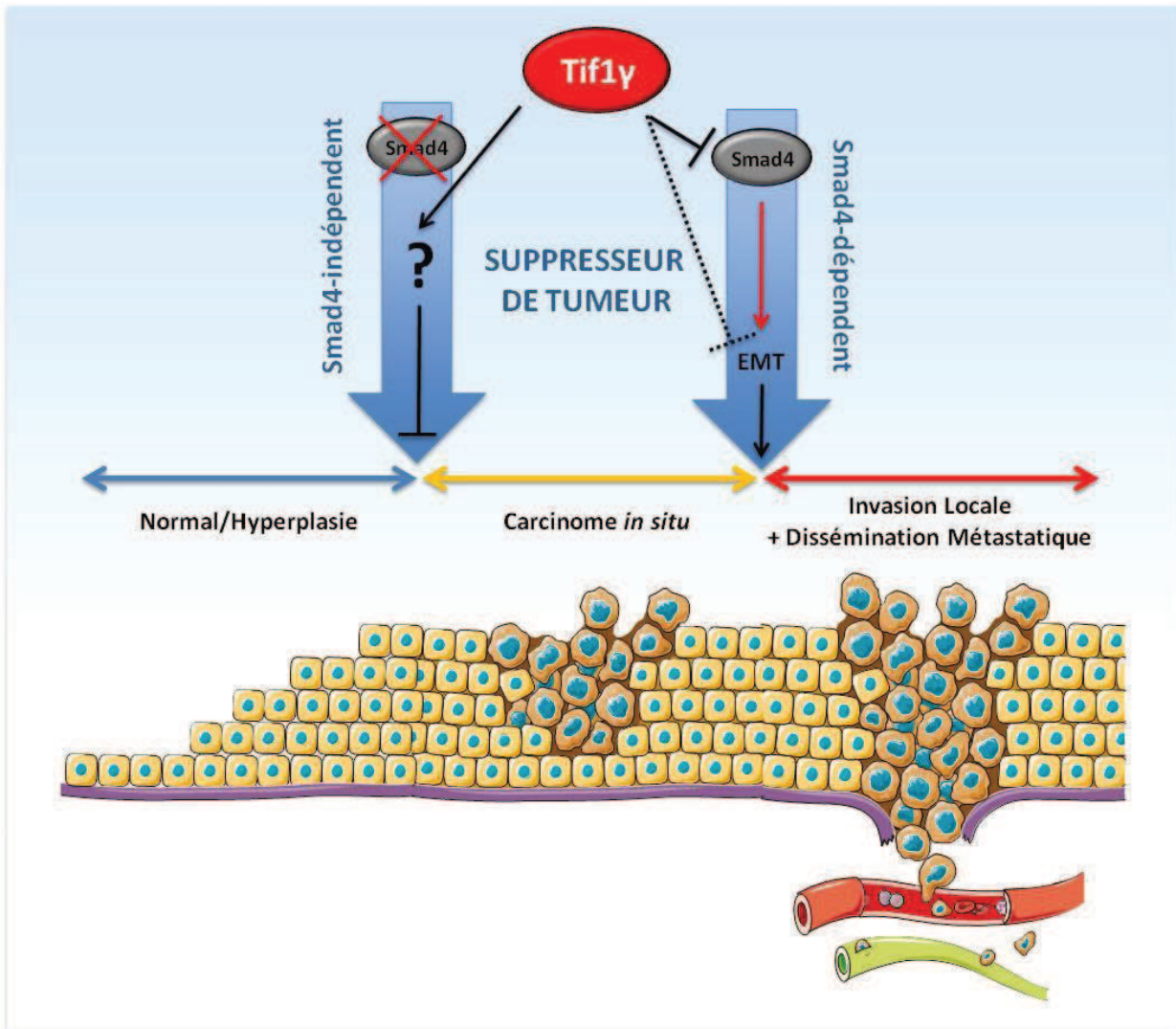


Figure 34 Rôle suppresseur de tumeur de TIF1 γ . TIF1 γ pourrait inhiber la tumorigenèse à deux niveaux : i) au cours de l'initiation tumorale en activant des voies indépendantes de Smad4 et ii) au cours de la progression tumorale *via* son effet inhibiteur sur la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) pouvant être activée par Smad4.

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

II Rôle Suppresseur de tumeur de Tif1 γ

TIF1 γ a été identifié en 1999 (Venturini et al., 1999), mais a suscité un surcroît d'intérêt ces dernières années, comme en témoigne le nombre de publications qui a fortement augmenté depuis 2008. En effet, selon les données Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), 1 seule étude était référencée en 2000, 4 en 2004, 13 en 2008 pour atteindre 38 publications en juillet 2012.

Nos travaux sur le pancréas nous ont permis de démontrer pour la première fois le rôle suppresseur de tumeur de cette protéine (Vincent et al., 2009a). Les programmes cellulaires permettant à Tif1 γ de ralentir la progression tumorale restent encore aujourd'hui inconnus et constituent un axe de recherche majeur de l'équipe. Nous avons aujourd'hui des arguments *in vivo* permettant d'affirmer que les programmes suppresseurs de tumeur de TIF1 γ , au cours de l'initiation tumorale, sont indépendants de ceux contrôlés par SMAD4. Ces 2 facteurs peuvent également interagir entre eux, dans des stades plus tardifs de la progression tumorale, afin de réguler notamment la transition épithélio-mésenchymateuse et la différenciation des cellules cancéreuses (Vincent et al., 2012) (**Figure 34**).

II.1 Caractérisation des Programmes « Suppresseur de tumeur » de TIF1 γ

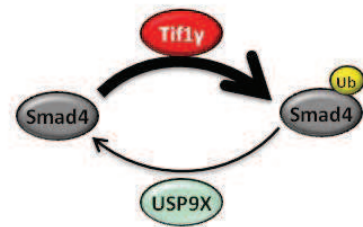
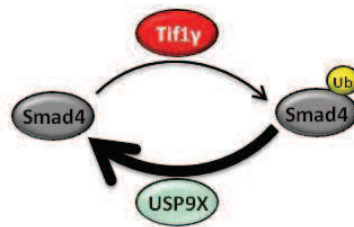
Afin de mieux comprendre les fonctions biologiques de Tif1 γ , nous avons mis en place, en parallèle des études *in vivo*, **des analyses transcriptomiques *in vitro*** permettant de définir les programmes cellulaires de Tif1 γ . Des expériences de « micro-arrays » nous ont permis de définir le profil transcriptomique de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) (sauvage, Tif1 γ ^{KO}, Smad4^{KO} et Tif1 γ ^{KO}/Smad4^{KO}) traités au TGF β (2h, 20 ng/mL). Nos résultats préliminaires révèlent i) que la majorité des gènes, dont l'expression est régulée par Tif1 γ , est indépendante de la voie du TGF β et de Smad4 ; et ii) que Tif1 γ serait un élément important d'un point de contrôle du fuseau mitotique appelé le « spindle checkpoint ». Ce point de contrôle vérifie le bon attachement des microtubules du fuseau mitotique sur les kinétochores des chromatides sœurs lors de la phase G2/M du cycle cellulaire. De façon intéressante, l'altération du point de contrôle G2/M a été associée à la fois à l'activation oncogénique de Ras (Knauf et al., 2006) et au développement tumoral du PDAC (Chang et al., 2012). Une des hypothèses permettant d'expliquer le phénotype des souris KTT (Vincent et al., 2009a) serait que l'activation de l'oncogène Kras^{G12D} dans le pancréas induirait

Activité dominante

USP9X

TIF1 γ

Ubiquitination
de Smad4



Complexe de
Transcription Actif

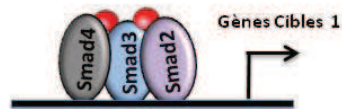


Figure 35 Un nouveau modèle du mode d'action de Tif1 γ dans la voie du TGF β . Dans ce modèle, l'interaction de Smad4 ou de TIF1 γ avec les Smads 2 et 3, serait dépendante de la balance des activités E3 Ligase de TIF1 γ et de déubiquitinylyase de USP9X.

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

l'altération du point de contrôle G2/M *via* l'inactivation spécifique de Tif1 γ . Une analyse transcriptomique similaire est en cours de réalisation dans des cellules pancréatiques primaires de souris. Ces cellules ont été isolées à partir de souris sauvage ou exprimant spécifiquement dans leur pancréas des mutations inactivatrices de *Smad4* (Pdx1-Cre ; *Smad4*^{lox/lox}), *Tif1 γ* (Pdx1-Cre ; Tif1 γ ^{lox/lox}) ou *Smad4* et *Tif1 γ* (Pdx1-Cre ; *Smad4*^{lox/lox} ; Tif1 γ ^{lox/lox}).

II.2 Rôle de l'Activité E3 ligase de TIF1 γ dans la tumorigenèse

Différentes études ont permis de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans la voie du TGF β . Le groupe de Stéfano Piccolo avait tout d'abord démontré que le domaine E3 ligase de TIF1 γ était capable de polyubiquitiner SMAD4 et d'induire sa dégradation (Dupont et al., 2005). Cependant ce rôle fut révisé quelques années plus tard, lorsque ce même groupe conclua que TIF1 γ induisait la mono-ubiquitinylation de SMAD4 (Dupont et al., 2009). Cette mono-ubiquitination, au niveau de la lysine 519, induit la relocalisation de SMAD4 dans le cytoplasme et inhibe son interaction avec les SMAD2 et 3. Cette modification de SMAD4 est réversible *via* l'interaction de la déubiquitinase UPS9X avec le domaine MH1/Linker de SMAD4 (Dupont et al., 2009). D'autre part, le groupe de Joan Massagué a démontré que TIF1 γ pouvait également interagir avec les SMAD2 et SMAD3 afin de réguler d'autres effets du TGF β distincts de ceux dépendants de SMAD4 (He et al., 2006). Les résultats d'une autre étude, à laquelle notre équipe a participé, soutiennent ces conclusions. Nous avons en effet montré que le TGF β , au cours de la différenciation des iNKT (invariant Natural Killer) pouvait engager des voies dépendantes soit de TIF1 γ , soit de SMAD4, soit indépendantes de TIF1 γ et de SMAD4 (Doisne et al., 2009) (Annexe I). Nos travaux dans le modèle de prédisposition au PDAC confirment également que Tif1 γ aurait des effets indépendants de *Smad4* (Vincent et al., 2012). Ainsi, TIF1 γ n'apparaît pas dans ces systèmes comme un inhibiteur de la voie du TGF β mais comme un médiateur de certains effets biologiques du TGF β . Néanmoins, il est tout à fait possible que dans d'autres systèmes, comme le développement embryonnaire, les effets de TIF1 γ dépendants de SMAD4 soient prépondérants (Dupont et al., 2005, 2009). **Par conséquent, le rôle de TIF1 γ dans la voie du TGF β semble donc être fortement dépendant du contexte cellulaire.** Notre étude illustre parfaitement cela : alors que Tif1 γ inhibe l'initiation tumorale indépendamment de

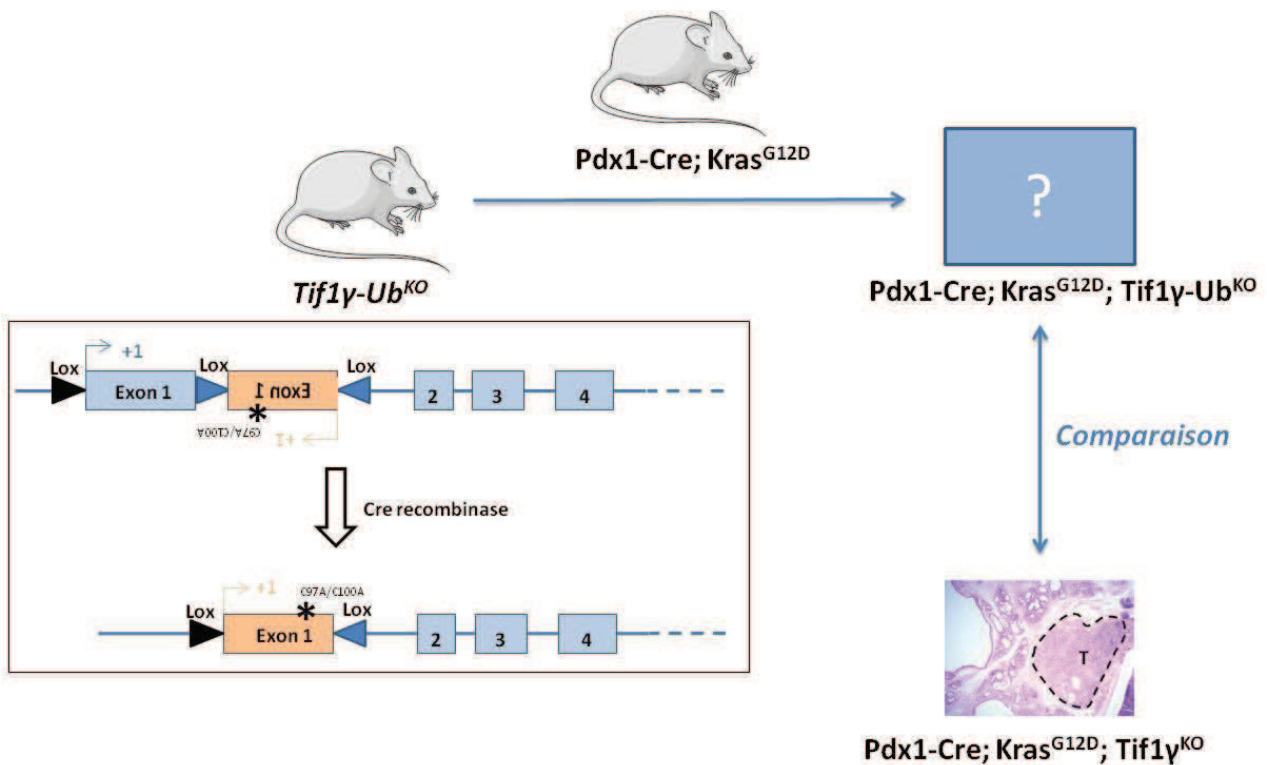


Figure 36 Stratégie mise en place pour étudier *in vivo* le rôle de l'activité E3 ligase de TIF1γ.

En absence de Cre-recombinase, ces souris expriment une protéine TIF1γ sauvage. En présence de Cre-recombinase, le locus est recombinaison de manière à abroger l'expression de TIF1γ sauvage et permettre l'expression d'une forme mutée de TIF1γ (C97A/C100A) dépourvue d'activité E3-ubiquitine ligase. Ces souris seront alors croisées avec les autres souris disponibles au laboratoire. Le phénotype des animaux *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; TIF1γ-Ub^{KO}* sera comparé avec celui des animaux *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; TIF1γ^{LL}*.

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

Smad4, ces 2 facteurs interagissent fonctionnellement afin de réguler la différenciation des cellules cancéreuses.

Les deux activités biologiques de TIF1 γ sont certes distinctes mais ne sont pas mutuellement exclusives. Il est en effet possible de combiner ces 2 activités dans un modèle intégratif (**Figure 35**). Ce modèle repose sur la balance qui existe entre l'activité E3 ligase de TIF1 γ et la déubiquitinylyase USP9X, pour l'activation de la protéine Smad4 (Dupont et al., 2009). Ainsi, ce tandem pourrait réguler l'association des protéines SMAD2 et 3, soit avec SMAD4 (activité USP9X « dominante ») soit avec TIF1 γ (activité TIF1 γ « dominante »).

Des travaux sont actuellement en cours au laboratoire afin de déterminer si **l'activité ubiquitine ligase de TIF1 γ joue un rôle dans l'activité suppresseur de tumeur de cette protéine**. Pour cela, l'équipe étudie actuellement le rôle d'une protéine Tif1 γ mutée spécifiquement pour son domaine E3 ligase, en utilisant à la fois des approches *in vitro* et *in vivo*. L'une d'entre elles est la génération d'un nouveau modèle murin exprimant de manière conditionnelle une protéine Tif1 γ mutée pour son activité E3 ligase (Tif1 γ -Ub^{KO}) (**Figure 36**). Dans des conditions où la Cre recombinase n'est pas exprimée, la souris exprimera un allèle Tif1 γ sauvage. Lorsque ces souris seront croisées avec des lignées exprimant la Cre recombinase, l'exon 1 de Tif1 γ sera excisé et sera remplacé (grâce à la stratégie Flex®) par un exon 1 muté au niveau du domaine RING. Ainsi, les souris Pdx1-Cre ; Tif1 γ -Ub^{KO} exprimeront une protéine Tif1 γ dépourvue d'activité E3 ligase. Il sera ainsi possible de déterminer si les effets suppresseurs de tumeur de Tif1 γ sont dépendants ou non de son activité E3 ligase.

L'étude du domaine RING de TIF1 γ apparait primordiale à la vue de l'importance croissante des E3 ligase dans la progression tumorale (Lipkowitz and Weissman, 2011), de l'identification de nombreuses dé-ubiquitinases dans la régulation de la voie du TGF β (Dupont et al., 2009) ainsi que dans la progression tumorale (Eichhorn et al., 2012). De façon intéressante, une étude très récente publiée dans *Nature* a démontré que l'inactivation de la déubiquitinylyase USP9X, spécifique de Smad4, facilitait la progression tumorale dans un modèle de PDAC (Pérez-Mancera et al., 2012). Nous pouvons faire l'hypothèse que la régulation de l'ubiquitination de SMAD4 pourrait participer à la progression tumorale *in vivo*, et donc que l'activité E3 ligase de TIF1 γ pourrait être impliquée dans ce processus.

Pour conclure, les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis d'aborder *in vivo* la relation complexe qu'il existe entre la voie du TGF β et l'oncogène Kras au cours de la

tumorigenèse pancréatique. Les modèles *in vivo* et *in vitro* que nous avons développés, permettront notamment d'éclaircir le lien qu'il existe entre l'inflammation et la progression tumorale pancréatique. Ces résultats devraient permettre à terme de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à inhiber l'effet pro-inflammatoire du TGF β . D'autre part, une partie importante de mes travaux s'est focalisée sur le rôle *in vivo* de la protéine TIF1 γ . Nos travaux ainsi que ceux d'autres équipes permettent aujourd'hui de définir TIF1 γ comme un gène suppresseur de tumeur potentiellement important. Il apparait absolument nécessaire aujourd'hui de caractériser les programmes cellulaires mis en jeu par TIF1 γ au cours de la progression tumorale. Ces résultats permettront de mieux comprendre les programmes altérés au cours de la tumorigenèse pancréatique et ainsi de définir de nouvelles cibles thérapeutiques.

ANNEXES

Article 6

Doisne, J.-M., L. Bartholin, K.-P. Yan, C.N. Garcia, N. Duarte, J.-B. Le Luque, **D.F. Vincent**, F. Cyprian, B. Horvat, S. Martel, R. Rimokh, R. Losson, K. Benlagha, and J.C. Marie. 2009. iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *The Journal of experimental medicine* (2009)

Article 7

Pommier, R.M., J. Gout, **D.F. Vincent**, C.E. Cano, B. Kaniewski, S. Martel, J. Rodriguez, G. Fourel, U. Valcourt, J.C. Marie, J.L. Iovanna, and L. Bartholin. 2012. The human NUPR1/P8 gene is transcriptionally activated by transforming growth factor β via the SMAD signalling pathway. *The Biochemical journal* (2012)

iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF- β signaling

Jean-Marc Doisne,¹ Laurent Bartholin,^{2,6,7,9} Kai-Ping Yan,⁴
Céline N. Garcia,^{3,6,8} Nadia Duarte,¹ Jean-Benoît Le Luduec,^{5,6}
David Vincent,^{2,6,7,9} Farhan Cyprian,^{3,6,8} Branka Horvat,^{3,6,8}
Sylvie Martel,^{2,6,7,9} Ruth Rimokh,^{2,6,7} Régine Losson,⁴
Kamel Benlagha,¹ and Julien C. Marie^{3,6,8}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U561/Groupe AVENIR, Hôpital Cochin St Vincent de Paul, Université Descartes, Paris F-75014, France

²INSERM, U590, IFR62, Lyon, F-69008, France

³INSERM, U758, IFR128, Lyon, F-69007, France

⁴Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, F-67404, France

⁵INSERM U851 IFR128, Lyon, F-69007, France

⁶Université Lyon, Lyon, F-69003, France

⁷Centre Léon Bérard, Lyon, F-69008, France

⁸Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, F-69007, France

⁹INSERM, U590/Groupe AVENIR, Lyon, F-69008, France

Invariant natural killer T (iNKT) cells constitute a distinct subset of T lymphocytes exhibiting important immune-regulatory functions. Although various steps of their differentiation have been well characterized, the factors controlling their development remain poorly documented. Here, we show that TGF- β controls the differentiation program of iNKT cells. We demonstrate that TGF- β signaling carefully and specifically orchestrates several steps of iNKT cell development. In vivo, this multifaceted role of TGF- β involves the concerted action of different pathways of TGF- β signaling. Whereas the Tif-1 γ branch controls lineage expansion, the Smad4 branch maintains the maturation stage that is initially repressed by a Tif-1 γ /Smad4-independent branch. Thus, these three different branches of TGF- β signaling function in concert as complementary effectors, allowing TGF- β to fine tune the iNKT cell differentiation program.

CORRESPONDENCE

Julien C. Marie:
julien.marie@inserm.fr

Abbreviations used: α GalCer, α -galactosylceramide; AAD, amino-actinomycin-D; CA, constitutively active; DP, double-positive; iNKT, invariant natural killer T; Tif-1 γ , transcriptional intermediary factor 1 γ .

Natural killer T cells (NKT) are a unique T cell lineage with the capacity to regulate immune responses. NKT cells are multifunctional. They have been described as being important in a variety of immune responses, including the response to tumors, infectious agents, the maintenance of self-tolerance, and the prevention of autoimmunity (1, 2). In contrast to conventional T lymphocytes and other regulatory T cells, NKT cells do not recognize peptide antigen presented by classical MHC-encoded class I or II molecules; instead, their TCR interacts with glycolipid antigen presented by the MHC class I-like molecule CD1d (3). These T lymphocytes are mainly CD4⁺CD8⁻, but a subset can be CD4⁻CD8⁻. NKT cells branch away

from T cell lineage at the double-positive (DP) CD4⁺CD8⁺ stage in the thymus (4).

Invariant NKT (iNKT) cells represent a subclass of NKT cells. They derive from DP thymocytes that express a TCR with a CDR3 α region formed by a semiinvariant rearrangement of V α 14-J α 18. iNKT cells are positively selected upon recognition of CD1d expressed on DP thymocytes loaded with glycolipids (1). iNKT react to a glycosphingolipid α -galactosylceramide (α GalCer) presented by CD1d (5). CD1d- α GalCer tetramers, which uniformly stain all iNKT cells, have been used to characterize some NKT cell developmental steps and precursors. As CD1d- α GalCer tetramer⁺

K.-P. Yan's present address is The Wistar Institute, Philadelphia, PA 19104.

J.-M. Doisne and L. Bartholin contributed equally to this paper.

© 2009 Doisne et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.jem.org/misc/terms.shtml>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

precursors progress to mature HSA^{low} cells, three differentiation stages have been reported. iNKT cells go from the CD44^{low} NK1.1⁻ stage, through the CD44^{high} NK1.1⁻ stage, and finally reach the CD44^{high} NK1.1⁺ stage. This iNKT differentiation sequence is accompanied by a massive cellular expansion occurring between the CD44^{low} NK1.1⁻ stage and the CD44^{high} NK1.1⁻ stage. A majority of CD44^{high} NK1.1⁻ cells emigrate to the peripheral tissues, where they cease to proliferate and rapidly express a mature phenotype, becoming CD44^{high} NK1.1⁺ and producing both IL-4 and IFN- γ (6). iNKT cells represent \sim 2.5% of splenic T lymphocytes and 30% of liver T cells (5). Interestingly, a fraction of the CD44^{high} NK1.1⁻ cells do not emigrate to the periphery, but instead proceed to their terminal maturation inside the thymus, where they acquire the NK1.1 marker and other NK-related markers that characterize the lineage (e.g., Ly49 and NKG2 family members). The CD44^{high} NK1.1⁺ population constitutes long-lived resident cells for several months (7). Although the importance of peripheral iNKT cells in the regulation of immune system has been widely reported, the significance of the iNKT intrathymic long-lived residents remains unknown (5).

Although it is known that CD1d expression on DP thymocytes is required for iNKT cell selection and lineage differentiation (6), and that both IL-15 and CD122 (IL-15R β) expression are involved in the transition between the CD44^{high} NK1.1⁻ and CD44^{high} NK1.1⁺ stages, factors that control iNKT cell differentiation are poorly documented (8, 9). Some studies have proposed a role for two cytokines, GM-CSF and lymphotoxin, in iNKT cell development (10, 11). However, a recent investigation has reported that GM-CSF does not affect iNKT cell numbers in the thymus or in the periphery, but rather regulates their ability to secrete cytokines (12). Moreover, a role for lymphotoxin has been ascribed in iNKT cell emigration from the thymus rather than in iNKT cell development (13). Recently, it has been suggested, by us and others, that TGF- β could influence iNKT differentiation (14, 15).

TGF- β is a widely expressed cytokine involved in the control of proliferation and differentiation of numerous cell types both inside and outside the immune system. The three isoforms of TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3) signal through a common serine-threonine kinase receptor complex composed of the TGF- β R1 and TGF- β R2 subunits. Binding of TGF- β to its receptor leads to the activation of the intracellular kinase domain of TGF- β R2, which in turn phosphorylates the kinase domain of the TGF- β R1 subunit. The latter then phosphorylates the receptor-associated Smads (R-Smads), Smad2 and/or Smad3, which bind the common Smad (C-Smad), Smad4. Complexes of Smad2-Smad4 and Smad3-Smad4 then migrate to the nucleus and regulate the transcription of various genes. Interestingly, Smad-independent pathways, such as MEK/MAP kinase, have also been reported (16). For many years Smad4 had been considered to be an obligate partner for the R-Smads Smad2 and Smad3 and the mediation of the TGF- β response through the Smad branch. However, the differences in phenotype observed between R-Smad-null and Smad4-null organisms suggested

that Smad2 and Smad3 could have Smad4-independent biological functions. A role has recently been proposed for the transcriptional intermediary factor 1 γ (Tif-1 γ) in the TGF- β signaling pathway (17, 18). This ubiquitous protein (also known as TRIM33, RFG7, PTC7, and ectodermin) selectively binds receptor-phosphorylated Smad2/Smad3 in competition with Smad4. Although the Smad2-Tif-1 γ interaction has biological effects independent of the Smad3-Tif-1 γ complex in vitro, the importance of the Tif-1 γ branch in TGF- β signaling in vivo remains unknown.

TGF- β signaling plays a crucial role on T cell biology because mice selectively deprived of TGF- β R1 or - β R2 on their T cells develop massive autoimmunity and die by 3 wk of age (15, 19). Thymic development of conventional CD4 and CD8 T cells does not appear to be under TGF- β control, but TGF- β seems clearly involved in the peripheral differentiation of selective T cell subsets such as Foxp3⁺ regulatory T cells and Th17 cells (15, 20, 21, 22). Interestingly, the complete deprivation of TGF- β signaling in α/β T lymphocytes, obtained by the crossing of a strain of floxed TGF- β R2 mice with CD4-Cre transgenic mice (CD4-Cre x TGF- β R2^{fl/fl}), leads to a sharp defect in CD1d- α GalCer tetramer⁺ NK1.1⁺ cells in both the thymus and the spleen (14, 15). These observations suggest that TGF- β could control the thymic development of the iNKT cells. However, given that the ablation of TGF- β signaling in T cells is associated with strong autoimmune disorders, T cell activation and acute cytotoxicity (15), it has been difficult to decipher whether the defect of iNKT cells in CD4-Cre x TGF- β R2^{fl/fl} mice is a direct effect of TGF- β on iNKT cell precursors or the consequence of autoimmune disorders that affect the capacity of the thymus environment to differentiate iNKT cells. Whether TGF- β constitutes a specific factor directly controlling the thymic differentiation of iNKT precursor thus remains totally unknown.

In this study, we demonstrate that TGF- β signaling directly orchestrates several steps of iNKT precursor differentiation, ascribing a crucial and specific role for this cytokine in iNKT thymic development. We provide evidence that three branches of TGF- β signaling, Smad4, Tif-1 γ , and the Tif-1 γ -Smad4-independent signaling pathway, function in concert. Each of these TGF- β signaling branches is selectively dedicated to the control of a specific differentiation step of iNKT cells, allowing TGF- β to fine tune the iNKT cell differentiation program.

RESULTS

TGF- β signaling directly and specifically controls iNKT precursor differentiation

We have previously reported that thymic development of conventional CD4, CD8 T lymphocytes is not affected by TGF- β signaling (14, 15, 21). In the thymus, iNKT cells branch away from the T cell lineage at the CD4⁺CD8⁺ (DP) stage and are positively selected upon recognition of CD1d expressed on DP cells that are themselves loaded with glycolipids. Thus, a putative effect of TGF- β on the thymic development of iNKT cells could affect iNKT precursors alone, the capacity

of DP to select iNKT precursors, or both. To test these three hypotheses, we have performed mixed BM transfers in reconstituted, sublethally irradiated B cell- and T cell-deficient recipients (*rag2^{ko}*). BM cells from *CD1d^{ko}* mice, which DP cells can lead to iNKT precursors but cannot positively select, were transferred into *rag2^{ko}* recipients with congenic Ly9.1-expressing BM cells from either *CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl}* mice or *CD4-Cre x TGF- β RII^{wt}* littermate controls (Fig. 1 A). In *CD4-Cre* mice, the Cre transgene is expressed at the DP stage of thymocyte development. Consistent with this, DP thymocytes and their progeny from *CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl}* BM cells escape TGF- β control. 6–7 wk after BM transfers, we analyzed the capacity of *CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl}* DP thymocytes to complement the deficiency of DP from *CD1d^{ko}* BM to select iNKT cells. Strikingly, iNKT cells from *CD1d^{ko}* donors were found in the spleens of all chimeric mice. However, iNKT cells from *CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl}* BM were barely detectable compared with iNKT cells from *CD4-Cre x TGF- β RII^{wt}* BM (Fig. 1 A). In addition, from the *CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl}/CD4-Cre x TGF- β RII^{wt}* mixed BM transfer, only iNKT cells from wild-type mouse

BM were detectable (unpublished data). Thus, in the absence of TGF- β control, DP thymocytes remain a suitable environment for iNKT differentiation. In agreement with this, the expression of CD1d at the surface of DP thymocytes from *CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl}* mice was similar to that of DP cells from littermate controls (unpublished data) and co-culture of V α 14 hybridoma cell lines with DP thymocytes from either *CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl}* mice or littermate controls showed no significant difference in the capacity of DP to present α GalCer antigen (Fig. 1 B).

Collectively, this first set of experiments reveals that TGF- β directly affects thymic iNKT precursor cells and not the thymic environment mandatory for their selection, suggesting a specific role for TGF- β in the thymus that is confined to the control of iNKT precursor development.

TGF- β signaling controls several steps of iNKT precursor differentiation

Thymic iNKT precursor differentiation goes through several established chronological steps defined by CD44 and NK1.1 expression. To determine the effects of TGF- β signaling on

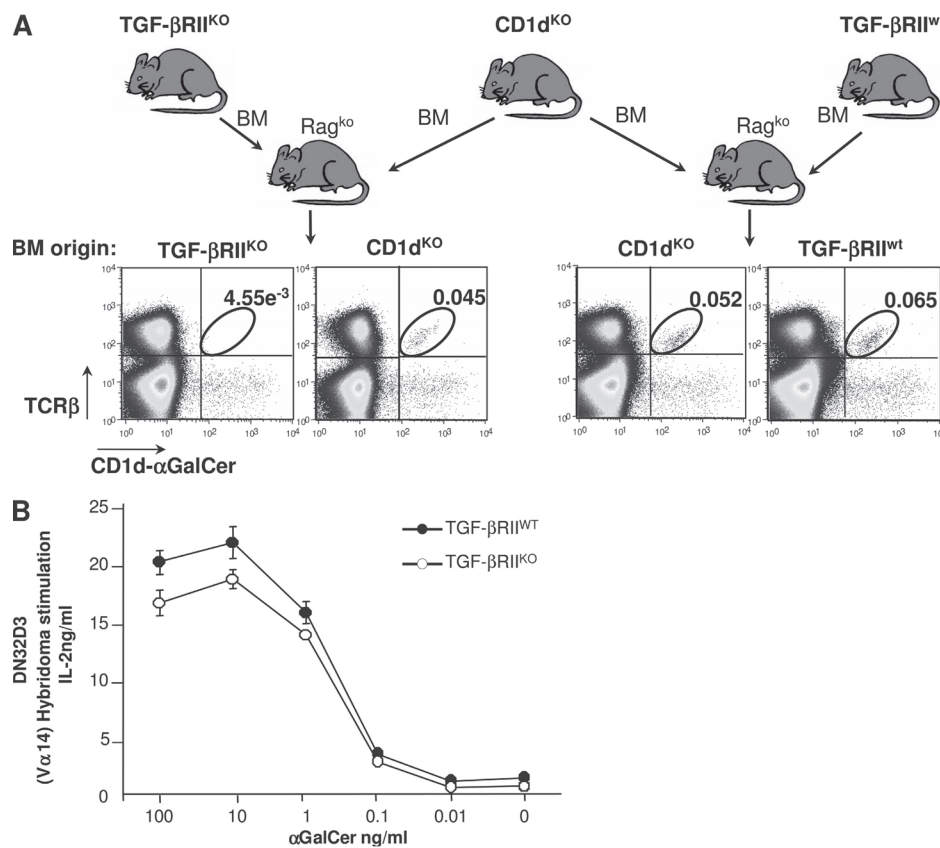
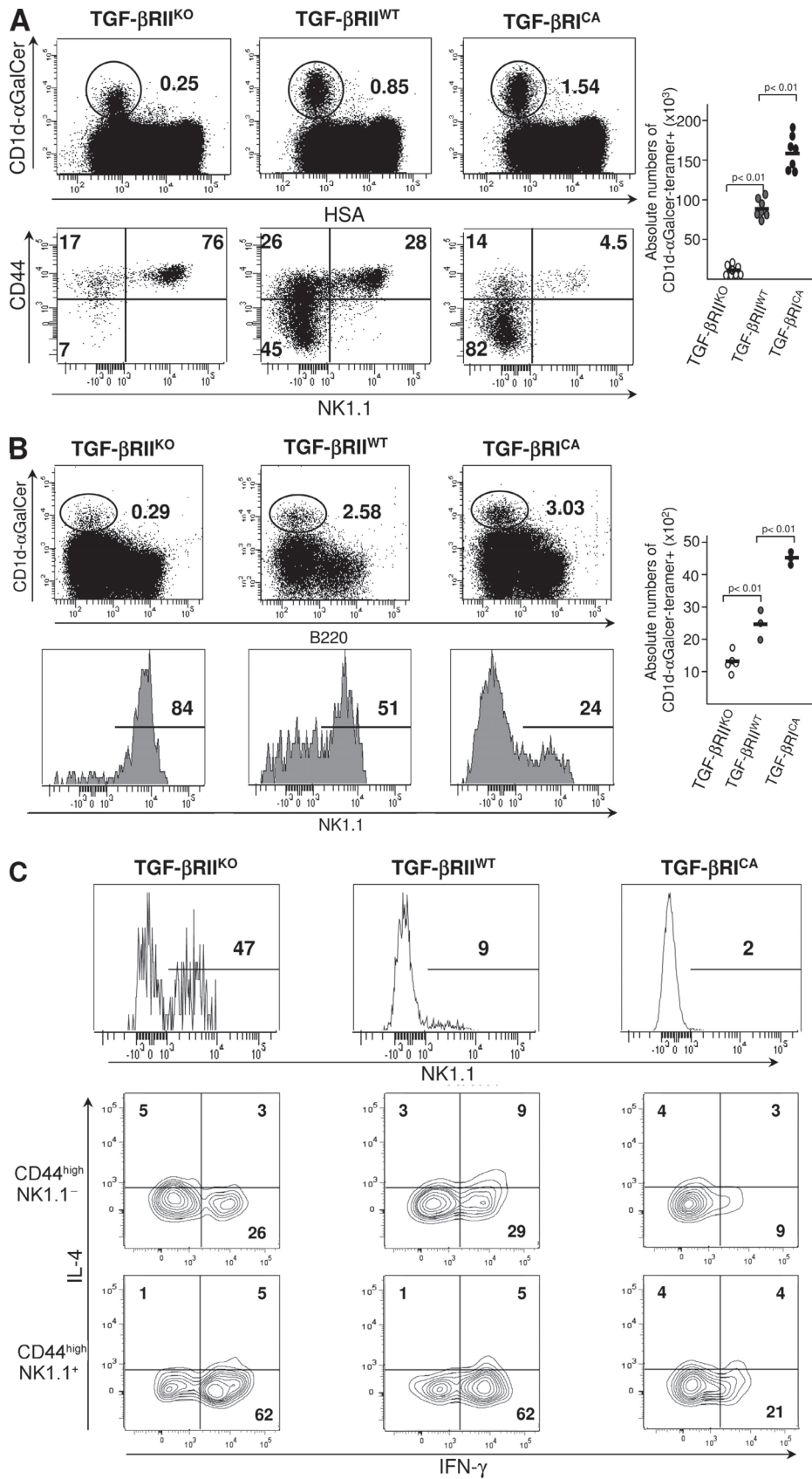


Figure 1. Functional thymic environment to select iNKT cells in the absence of TGF- β signaling. (A) Flow cytometric analysis of splenocytes in mixed BM chimeras. T cell-depleted BM from 2-wk-old *CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl}* mice or wild-type littermate mice were mixed with BM from *CD1d^{ko}* mice (ratio 1:1) and transferred into *rag2^{ko}* animals. 6–7 wk later, the presence in the spleen of iNKT cells was investigated using CD1d- α GalCer tetramers and TCR- β staining. The results are representative of three different experiments with three animals per group. (B) Proliferation analysis of CD1d-restricted V α 14-expressing DN32D3 hybridoma in the presence of thymocytes from either wild-type animals or *CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl}* mice and different concentration of α GalCer. Mean \pm SD. $n = 2$, from two independent experiments.



iNKT precursor differentiation, CD44 and NK1.1 stainings were performed on CD1d- α GalCer tetramer⁺ thymocytes, purified either from CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice or CD4-Cre x Stop^{fl/fl} TGF- β RI^{CA} mice, the latter exhibiting a constitutively active (CA) TGF- β signaling in their T cells, and a normal thymic development of CD4 and CD8 conventional T lymphocyte (21). Few CD1d- α GalCer-tetramer⁺ thymocytes were observed in CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice and their repartition among the different steps of differentiation was greatly affected compared with those from littermate controls (Fig. 2 A). Whereas in wild-type thymus, iNKT cell precursors were mainly NK1.1⁻ at 2 wk of age, CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} iNKT cell precursors from littermate animals exhibited a repartition among the different steps of differentiation that was more similar to what is usually observed in adult mice. The early stages of development were rarely represented because the majority of the precursors were NK1.1⁺ and also express NK markers such as NKG2D, NKG2A/C/E, and Ly49C/I (Fig. S1). In clear contrast with the aforementioned observations, our analysis on CD1d- α GalCer-tetramer⁺ thymocytes purified from CD4-Cre x Stop^{fl/fl} TGF- β RI^{CA} mice revealed an overrepresentation of the early differentiation stage CD44^{low} NK1.1⁻ and a large deficiency in both CD44^{high} NK1.1⁻ precursors and the mature CD44^{high} NK1.1⁺ cell subset (Fig. 2 A). To exclude the possibility that the rare iNKT cells observed in CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} animals were caused by a potential defect of Cre-mediated recombination, CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice were bred onto a Cre recombination reporter allele, i.e., YFP flanked by LoxP sites were knocked into the ROSA26 locus (Rosa26 YFP^{fl/fl}). In these animals, all the CD1d- α GalCer tetramer⁺ cells were both YFP⁺ and deficient for TGF- β RII (unpublished data). In agreement with the lack of thymic iNKT cell precursors, few CD1d- α GalCer tetramer⁺ T cells were detectable in both the liver and spleen from CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice compared the controls (Fig. 2 B and not depicted). Moreover, as in the thymus, the few iNKT cells observed at the periphery of CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice were mostly NK1.1⁺ (Fig. 2, B and C), but produced both IFN- γ and IL-4, which is similar to iNKT cells from wild-type animals (Fig. 2 C), suggesting that these cells are fully functional. In clear contrast, the overexpression of TGF- β signaling in T cells lead to an increase of peripheral CD1d- α GalCer tetramers⁺ T cells, but these cells presented a defect of maturation with both a defective NK1.1 expression and a weak IFN- γ production compared with iNKT cells from wild-type animals (Fig. 2, B and C).

Overall, these results reveal that TGF- β signaling controls several key steps of iNKT cell differentiation ranging from the early to late precursor differentiation stage. TGF- β signaling affects the maturation of both the thymic resident iNKT cells and iNKT precursors that have reached the periphery.

TGF- β signaling controls apoptosis in early iNKT precursors

Because the iNKT differentiation step between the CD44^{low} NK1.1⁻ and the CD44^{high} NK1.1⁻ stage is accompanied by a massive cellular expansion (6), it is possible that the defect of both CD44^{low} NK1.1⁻ and CD44^{high} NK1.1⁻ cells observed in CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice, results from an impairment of their proliferation capacity. Surprisingly, Ki-67 staining of both CD44^{low} NK1.1⁻ and CD44^{high} NK1.1⁻ cells from 14-d-old CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice and CD4-Cre x Stop^{fl/fl} TGF- β RI^{CA} mice was similar to that observed for all differentiation stages in the littermate controls (Fig. S2). We thus postulated that TGF- β could affect the survival of iNKT cell precursors. When CD1d- α GalCer tetramer⁺ thymocytes were stained with both anti-annexin V and 7-aminocincomycin-D (AAD), two to three times more apoptotic CD44^{low} NK1.1⁻ cells and CD44^{high} NK1.1⁻ cells were observed in CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice compared with the littermate controls, demonstrating an antiapoptotic effect of TGF- β signaling on early iNKT precursors (Fig. 3 A). Because IL-7 has been established as a crucial cytokine for the survival of thymocytes, particularly for iNKT cells (23, 24), we asked whether TGF- β could affect CD127 (IL-7-R α) expression on early iNKT cell precursors (Fig. 3 B). Consistent with their apoptosis, CD44^{low} NK1.1⁻ and CD44^{high} NK1.1⁻ cells from CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice expressed lower levels of CD127. Interestingly, the overexpression of TGF- β signaling (TGF- β RI^{CA}) affects neither CD127 expression nor the survival capacity of iNKT precursors, suggesting that in wild-type animals, endogenous TGF- β signaling levels appear to be sufficient to maintain early iNKT survival.

TGF- β signaling is thus crucial to both maintain a high level of CD127 expression on early iNKT cell precursors and prevent the apoptotic death of these highly dividing cells.

TGF- β signaling controls T-bet and CD122 (IL-15R β) in iNKT precursors

The deprivation of TGF- β signaling leads to a massive representation of CD44^{high} NK1.1⁺ precursors among the few CD1d- α GalCer tetramers⁺ T cells. Moreover the overexpression of TGF- β signaling is associated with a sharp reduction of this same late stage of iNKT differentiation (Fig. 2), suggesting that TGF- β signaling represses the transition

Figure 2. Control of iNKT cell precursor development by TGF- β signaling. Flow cytometric analysis of the presence of iNKT cells in the thymus (A), liver (B), or spleen (C) of 14-d-old CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice (TGF- β RII^{KO}), CD4-Cre x Stop^{fl/fl} TGF- β RI^{CA} mice (TGF- β RI^{CA}), or wild-type mice (TGF- β RII^{wt}). Absolute numbers of CD1d- α GalCer tetramer⁺ cells among either HSA^{low} cells or B220⁺ cells are illustrated by graphs and absolute numbers for each development stage are illustrated in supplemental table 1. CD44, NK1.1 staining on purified CD1d- α GalCer tetramers⁻ thymocytes (A) and on CD1d- α GalCer tetramers⁻ B220⁻ cells from either the liver (B) or spleen (C). IL-4, IFN- γ , staining on either NK1.1⁻ or NK1.1⁺ CD1d- α GalCer tetramer⁺ B220⁻ cells from spleen (C). The results are representative of three or four different experiments with three animals per group.

between CD44^{high} NK1.1⁻ and CD44^{high} NK1.1⁺ cells and that the few mature cells observed have escaped TGF- β signaling. The transition between CD44^{high} NK1.1⁻ and CD44^{high} NK1.1⁺ cells is known to be dependent on the cell surface expression of the IL-2/IL-15 receptor common β subunit (CD122). Interestingly, although CD122 is not highly expressed on CD44^{high} NK1.1⁻ and CD44^{high} NK1.1⁺ cells, its modest expression has been shown to play a key role on iNKT maturation (25). To further investigate the mechanisms by which TGF- β controls the progression of CD44^{high} NK1.1⁻ to CD44^{high} NK1.1⁺ cells, we analyzed CD122 (IL-15R β) expression on CD1d- α GalCer tetramer⁺ thymocytes. In agreement with the representation of the mature stage observed in Fig. 2, CD122 was expressed early on iNKT precursors escaping TGF- β regulation as compared with cell controls (Fig. 4 A). In clear contrast, CD122 cell-surface expression was impaired on all precursors from CD4-Cre x Stop^{fl/fl} TGF- β RI^{CA} mice compared with precursors from their littermate controls (Fig. 4 B). Because the transcription factor T-bet has been shown to be a key factor for the maturation of iNKT cell precursors and to control CD122 cell surface expression (26), we proceeded to investigate whether TGF- β signaling modulates T-bet expression in iNKT cell precursors. The abrogation of TGF- β signaling in CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice lead to early expression of T-bet in precursors, whereas T-bet expression was highly repressed in the same iNKT precursors from CD4-Cre x Stop^{fl/fl} TGF- β RI^{CA} mice (Fig. 4, A and B). Interestingly, CD44^{high} NK1.1⁺ cells from all three kinds of mice, even when rare, expressed similar levels of T-bet, suggesting that these cells are fully mature.

Altogether, these results reveal that TGF- β signaling directly or indirectly represses T-bet and CD122 expression in both CD44^{low} NK1.1⁻ and CD44^{high} NK1.1⁻ precursors, and prevents the latter from massively maturing.

The Smad4 branch of TGF- β signaling controls iNKT cell late differentiation

TGF- β R can signal through three different branches: the Smad4-dependent pathway, the Tif-1 γ -dependent pathway, and the Tif-1 γ /Smad4-independent pathway. The Smad4 branch has been reported to act as a mediator for many TGF- β effects in numerous cell types. Thus, we first investigated the role of Smad4 in iNKT cell differentiation. To do this, we used mice selectively deficient for Smad4 in their T cells from the DP stage. These animals were obtained by breeding of CD4-Cre transgenic animals with floxed *smad4* mice, as previously described (27). Interestingly, the proportion of CD44^{low} NK1.1⁻ and CD44^{high} NK1.1⁻ precursors was similar to that observed in control littermate mice (Fig. 5 A), excluding a role for the Smad4 branch in the survival maintenance of early iNKT precursors. Moreover mature CD44^{high} NK1.1⁺ cells were not overrepresented in the absence of Smad4-dependent signaling, contrary to what was observed when TGF- β signaling was totally abrogated (Fig. 5 A). This, again, excludes a role for the Smad4 branch in the transition of CD44^{high} NK1.1⁻ cells to CD44^{high} NK1.1⁺ cells. However, the CD44^{high} NK1.1⁺ cells, express a lower level of NK1.1 marker in the absence of Smad4-dependent signaling (Fig. 5 A). Because NK1.1 expression has been shown to be dependent on CD122 and T-bet expression (25, 26), we next analyzed the expression of CD122 and T-bet. We

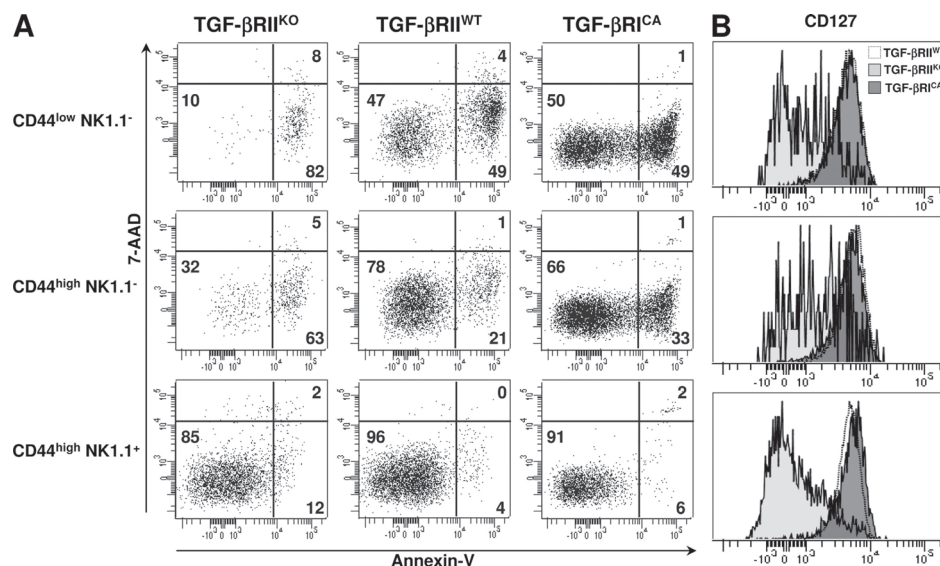


Figure 3. Control iNKT cell precursor apoptosis by TGF- β signaling. Flow cytometric analysis of CD1d- α GalCer tetramer⁺ enriched from thymus from 14-d-old CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice (TGF- β RII^{KO}), CD4-Cre x Stop^{fl/fl} TGF- β RI^{CA} mice (TGF- β RI^{CA}), or wild-type mice (TGF- β RII^{WT}) and stained for either CD44, NK1.1, or annexin V and incubated with 7-AAD (A) or CD44, NK1.1, and CD127 (B). These results are representative of three different experiments with two or three mice per group.

found that the low level of NK1.1 expression observed in CD4-Cre x Smad4^{fl/fl} was associated with the impairment of both CD122 and T-bet expression, in CD44^{high} NK1.1⁺ precursors (Fig. 5 B).

The Smad4 branch of TGF- β signaling thus maintains both T-bet and CD122 expressions in mature iNKT precursors.

The Tif-1 γ branch of TGF- β signaling controls early iNKT cell differentiation

Given that the role of the Smad4 branch appears to be restricted to the late maturation steps of iNKT precursors, we proceeded by investigating the contribution of another TGF- β signaling pathway, the Tif-1 γ branch, in iNKT cell development. We generated mice selectively deficient for Tif-1 γ in their T cells, from the DP stage, by breeding CD4-Cre transgenic animals with floxed *tif-1 γ* mice (Fig. S3 A). The CD4-Cre x Tif-1 γ ^{fl/fl} mice did not develop any sign of autoimmunity and inflammation (unpublished data). Moreover, in these animals, the conventional CD4/CD8 T cell development in the thymus was similar that observed in wild-type animals (Fig. S3 B). However, as observed in CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} animals, the deprivation of the Tif-1 γ -dependent signaling pathway led to a large decrease in the proportion of CD1d- α GalCer-tetramer⁺ cells in the thymus. As in the absence of total TGF- β signaling, the deprivation of the Tif-1 γ branch led to a large defect in CD44^{low} NK1.1⁻ precursors associated with their apoptosis and to a loss of CD127 surface expression (Fig. 6, A and B). However, contrary to what we observed in CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice, no effect, either at the CD44^{high} NK1.1⁺ precursor stage or on CD122 and T-bet expression, was observed in CD4-Cre x Tif-1 γ ^{fl/fl} mice (unpublished data), excluding a potential role for the Tif-1 γ branch in the transition of CD44^{high} NK1.1⁻ precursors to CD44^{high} NK1.1⁺ precursors.

Altogether, these results demonstrate that the Tif-1 γ branch of TGF- β signaling is responsible for the survival maintenance of the early precursors of iNKT cells.

The Tif-1 γ /Smad4-independent branch of TGF- β signaling controls iNKT cell intermediate differentiation

Because we found that TGF- β signaling represses both T-bet and CD122 expression in both CD44^{high} NK1.1⁻ and CD44^{high} NK1.1⁺ precursors, and hence impairs their maturation in CD44^{high} NK1.1⁺ cells, TGF- β signaling in wild-type mice should be repressed, at least at the intermediate stage (CD44^{high} NK1.1⁻) of differentiation, to allow these precursors to proceed to maturity. The analysis of both *tgf- β rI* and *tgf- β rII* expression revealed a down-regulation of the expression of both TGF- β R genes in CD44^{high} NK1.1⁻ precursors compared with early and late precursors (Fig. 7 A). This down-regulation was confirmed at the protein level by analysis of the surface expression of TGF- β R (Fig. 7 B). In addition, this lack of TGF- β R expression at the CD44^{high} NK1.1⁻ stage was associated with the repression of several genes known to be up-regulated by TGF- β signaling (Fig. 7 C), confirming an impairment of TGF- β responsiveness in the CD44^{high} NK1.1⁻ precursors compared with the other differentiation stages.

Interestingly, neither the ablation of the Tif-1 γ branch nor the ablation of the Smad4 branch by itself can explain the over-representation of mature CD44^{high} NK1.1⁺ precursor cells observed in the complete absence of TGF- β signaling (CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice; Fig. 2). We thus analyzed iNKT cell development in the absence of both the Tif-1 γ and Smad4 branches, using CD4-Cre x Tif-1 γ ^{fl/fl} x Smad4^{fl/fl} animals. Interestingly, the deprivation of these two branches of TGF- β signaling did not mimic the total ablation of the TGF- β signaling pathway (CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice; Fig. 2), but led

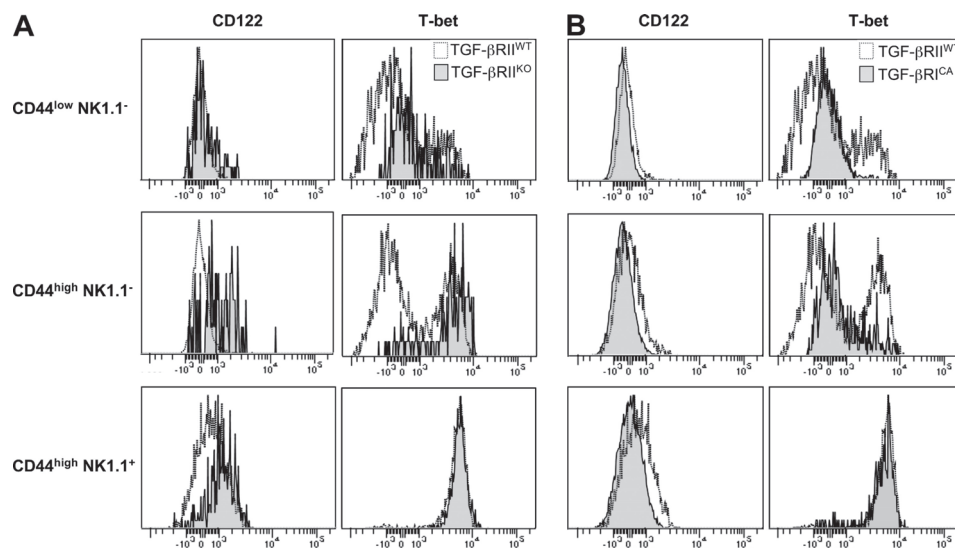


Figure 4. Control of T-bet and CD122 expression by TGF- β signaling. (A and B) Flow cytometric analysis of CD1d- α GalCer tetramer⁺ cells enriched from thymocytes from either CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice (TGF- β RII^{KO}; A) or CD4-Cre x Stop^{fl/fl} TGF- β RI^{CA} mice (TGF- β RI^{CA}; B) stained for CD44, NK1.1, T-bet, and CD122. These results are representative of four different experiments with two mice per group.

to the addition of the phenotypes observed when the Tif-1 γ and Smad4 branches were switched off separately (Fig. 7 D). We observed a large defect of CD44^{low} NK1.1⁻ precursors associated with their apoptosis, as in the absence of the Tif-1 γ signaling pathway, and a low expression of NK1.1 on CD44^{high} NK1.1⁺ cells associated with the impairment of both CD122 and T-bet expression in CD44^{high} NK1.1⁺ as reported in the absence of the Smad4 signaling pathway (Fig. 7 D and not depicted). CD44^{high} NK1.1⁺ precursors were not overrep-

resented, suggesting that the transition of CD44^{high} NK1.1⁻ precursors to CD44^{high} NK1.1⁺ precursors is repressed by the Tif-1 γ /Smad4-independent branch of TGF- β signaling, which is regulated by the level of expression of TGF- β R.

DISCUSSION

iNKT cells constitute a unique thymus-dependent T cell subset, characterized by the expression of a semiinvariant (V α 14-J α 18 in mice and V α 24-J α 18 in human) TCR- α

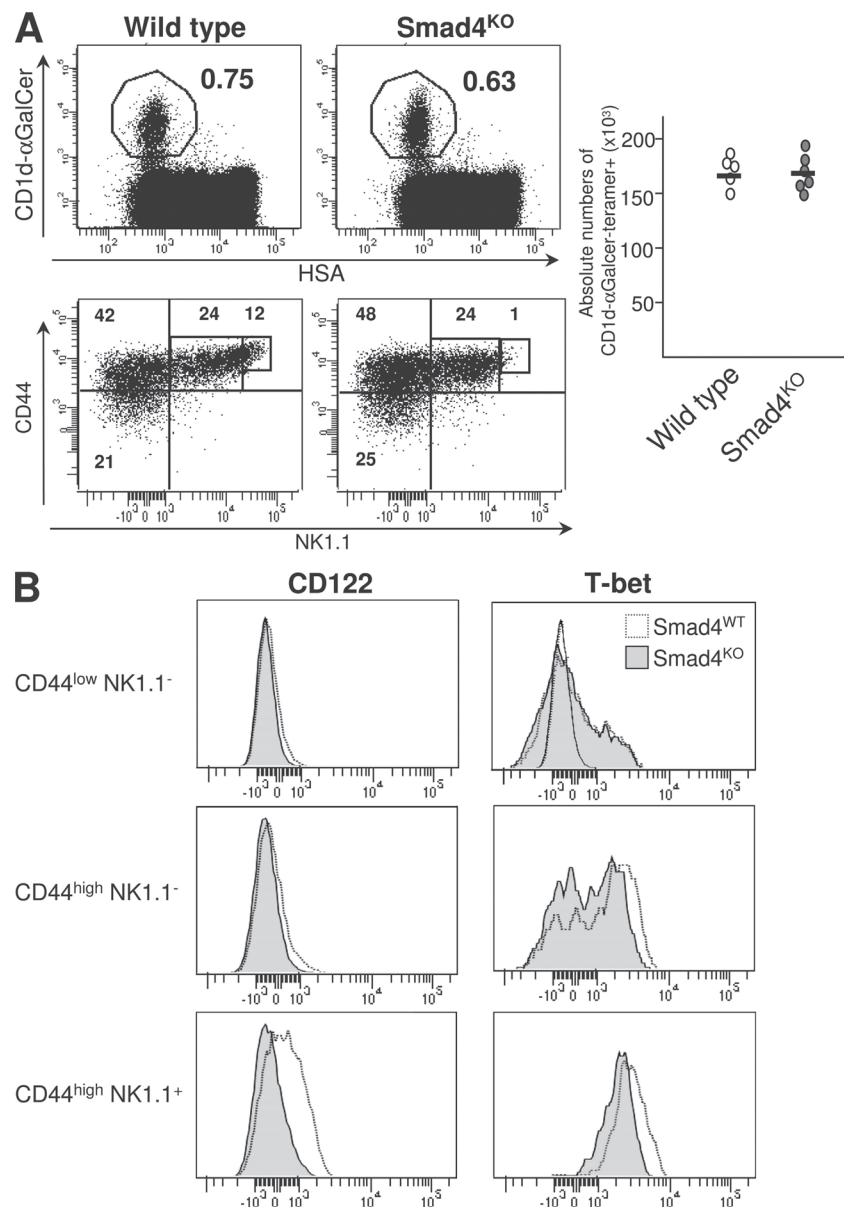


Figure 5. Role of Smad4 signaling in iNKT cell differentiation. (A) Flow cytometric analysis of the presence of iNKT cells in the thymuses from either 16-d-old CD4-Cre x Smad4 mice (Smad4^{KO}) or wild-type mice and staining for CD44 and NK1.1 on CD1d- α GalCer tetramer⁺ cells from the same thymuses. Absolute numbers of CD1d- α GalCer tetramer⁺ cells among either HSA^{low} cells are illustrated by graphs and absolute numbers for each development stage are illustrated in Table S1. (B) Flow cytometric analysis on CD1d- α GalCer tetramer⁺ cells enriched from thymuses from either CD4-Cre x Smad4^{fl/fl} mice (Smad4^{KO}) or wild-type mice littermate stained for CD44, NK1.1, T-bet, and CD122. These results are representative of three different experiments with two mice per group.

chain and markers traditionally associated with the NK cell lineage. iNKT cells are developmentally and functionally distinct from the mainstream CD4 and CD8 T cells. iNKT cells have been associated with a broad array of disorders, ranging from transplant rejection to tumors, various forms of autoimmunity, atherosclerosis, allergy, and infection (5). Because of the importance of iNKT cells in immune regulation during

various pathological processes (28), it is critical to define the factors that govern their development. Our findings reveal TGF- β to be a key factor for thymic iNKT cell development. Although thymic precursors of both iNKT cells and conventional T cells require interaction with their respective self-ligands in the thymus environment for positive selection, the HSA^{low} iNKT cell precursors subsequently undergo a

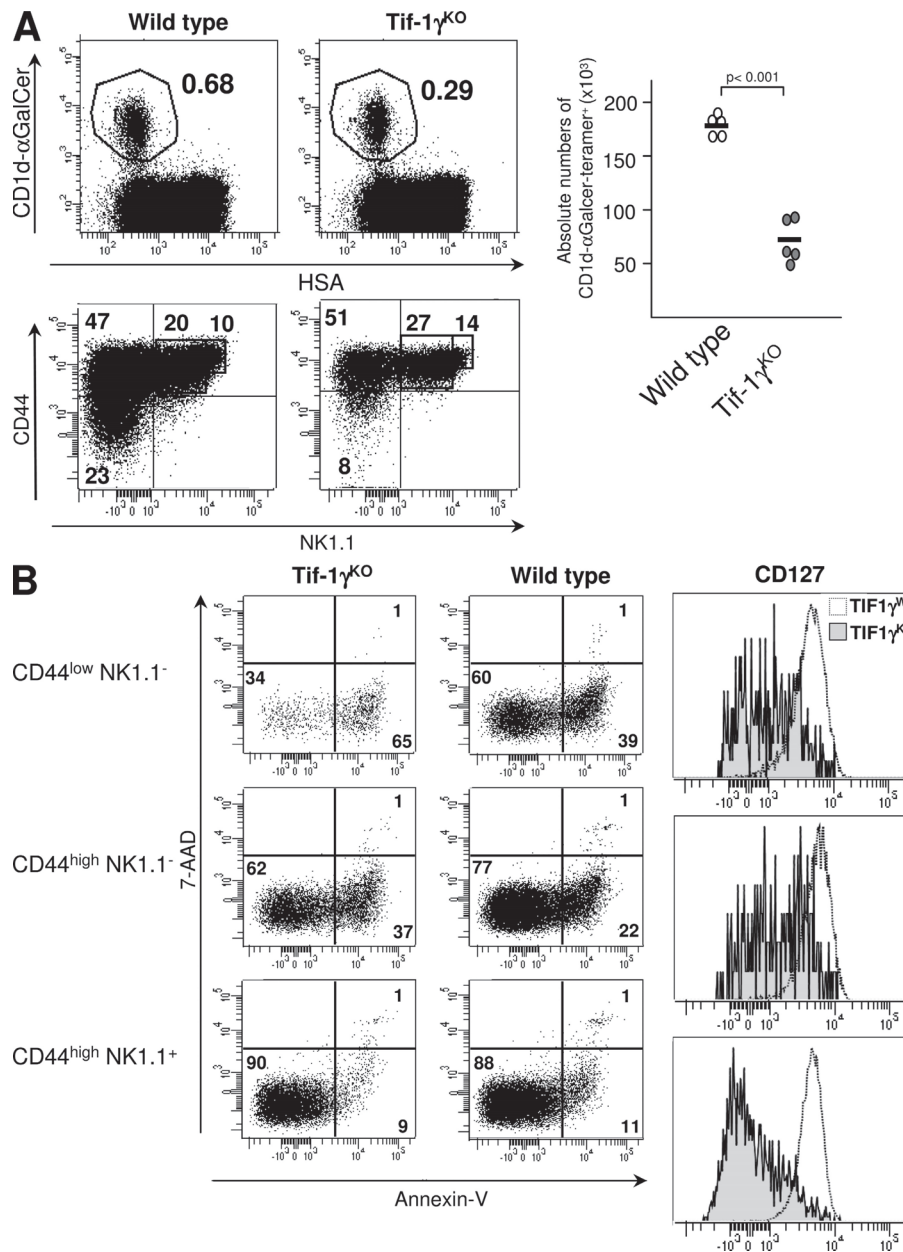


Figure 6. Role of Tif-1 γ signaling in iNKT cell differentiation. (A) Flow cytometric analysis of the presence of iNKT cells in thymuses from either 16 d-old CD4-Cre x Tif-1 $\gamma^{fl/fl}$ mice (Tif-1 γ^{KO}) or wild-type mice and staining for CD44 and NK1.1 on CD1d- α GalCer tetramer⁺ cells from the same thymuses. Absolute numbers of CD1d- α GalCer tetramer⁺ cells among either HSA^{low} cells are illustrated by graphs and absolute numbers for each development stage are illustrated in supplemental table 1. (B) Flow cytometric analysis on CD1d- α GalCer tetramer⁺ cells enriched from thymuses from either CD4-Cre x Tif-1 $\gamma^{fl/fl}$ mice (Tif-1 γ^{KO}) or wild-type littermate mice and stained for CD44, NK1.1, Annexin V, 7-AAD, and CD127. Mean fluorescence intensity is reported on the CD127 histograms. These results are representative of three different experiments with two mice per group.

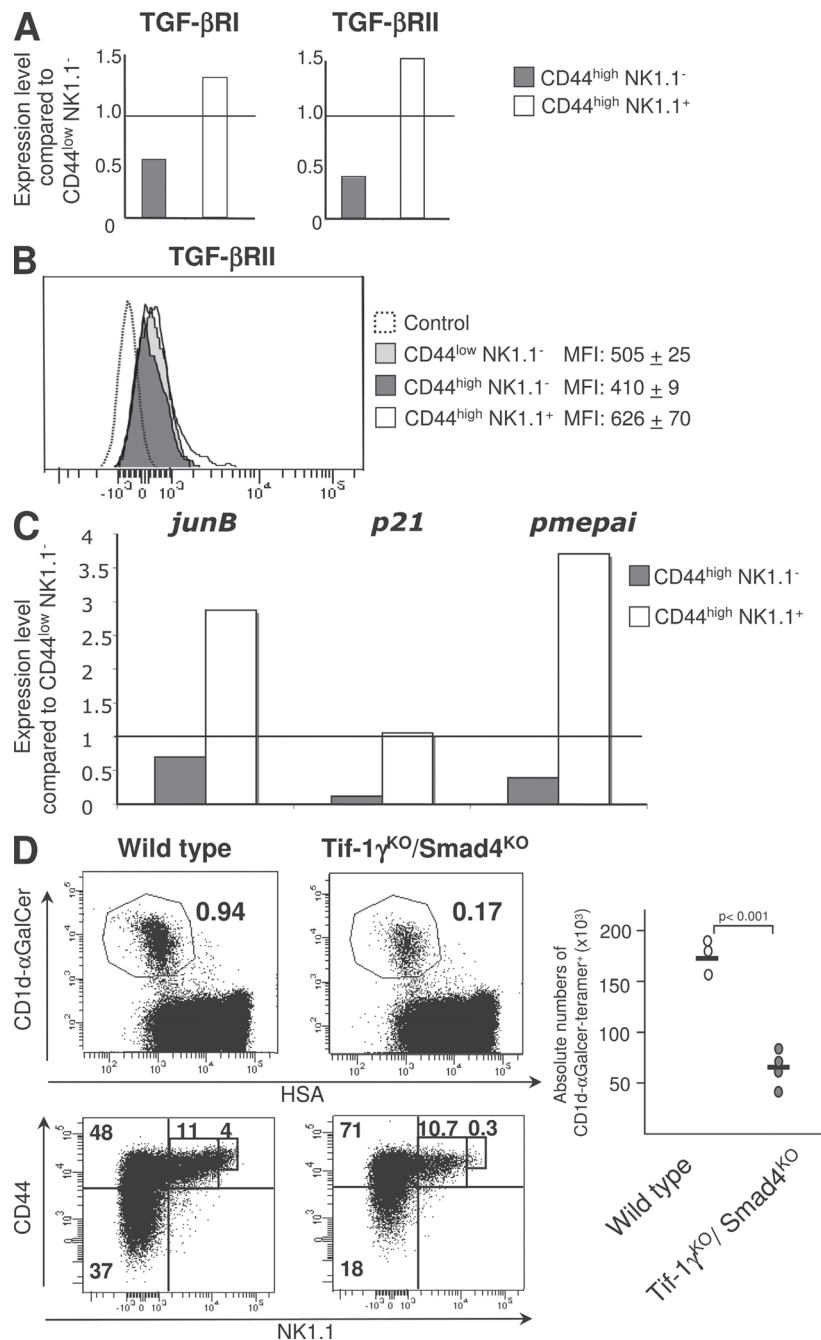


Figure 7. Role of Tif-1 γ /Smad4-independent signaling in the control of iNKT maturation. (A) *tgf-b* receptor expression analysis by RT-PCR performed on purified CD1d- α GalCer thymocytes from 16-d-old C57BL/6 mice. Relative gene expression are normalized on both *hprt* and *g3pdh* expression. (B) Flow cytometric analysis of CD1d- α GalCer tetramer⁺ cells from iNKT cell-enriched thymocytes of C57BL/6 mice, stained for TGF- β RII. Means of fluorescence intensity (MFI) are reported with their SD. (C) *jun-b*, *p21*, *pme-pai* expression analysis by RT-PCR performed on purified CD1d- α GalCer thymocytes from C57BL/6 mice. Relative gene expression was normalized on β actin expression. The results are representative of three different experiments from five to eight mice. (D) Flow cytometric analysis of the presence of iNKT cells in thymuses from either 13–14-d-old CD4-Cre x Tif-1 γ ^{fl/fl} x Smad4^{fl/fl} mice or wild-type littermate mice and staining for CD44 and NK1.1 on CD1d- α GalCer tetramer⁺ cells from the same thymuses. Absolute numbers of CD1d- α GalCer tetramer⁺ cells among HSA^{low} cells are illustrated by graphs, and absolute numbers for each development stage are illustrated in Table S1. The results are representative of three different experiments with at least three mice per group.

complex series of activation and differentiation events. We have clearly demonstrated that TGF- β directly orchestrates the sequence of thymic events that iNKT precursors undergo. This sequence includes a lineage expansion, acquisition of the CD44^{high} phenotype before either their migration to the periphery or their long stay in the thymus, and their maturation to CD44^{high} NK1.1⁺ (25, 29). Unlike IL-15, whose action is restricted to the maturation step, we revealed that TGF- β controls several key steps of iNKT cell differentiation, ascribing a crucial role for this cytokine iNKT cell development. Moreover, although iNKT cells and conventional α/β T cells are derived from a common lineage at the DP stage, neither the ablation nor the overexpression of TGF- β signaling in DP cells affects the thymic development of conventional α/β T cells (15, 21). Thus, TGF- β appears as a key factor whose action in the thymus is confined to the control of several steps of iNKT cell differentiation.

iNKT cell lineage expansion has been regarded as the consequence of multiple rounds of cell division occurring between the CD44^{low} NK1.1⁻ and CD44^{high} NK1.1⁻ stages (5). Our results suggest that when they escape from TGF- β control, the CD44^{low} NK1.1⁻ and CD44^{high} NK1.1⁻ precursors keep dividing, but a large proportion of them undergo apoptosis, which dramatically reduces the pool of cells for the next iNKT differentiation steps, and thus reduces the total number of iNKT cells. Our observations strongly indicate that the iNKT lineage expansion is not only restricted to precursor cell proliferation, but also results from the survival maintenance of these dividing precursors by TGF- β . This TGF- β antiapoptotic effect is correlated with the maintenance of IL-7R α (CD127) expression at the cell surface of iNKT precursors, suggesting a role for the IL-7/IL-7R signaling pathway in early iNKT precursors' survival. In agreement with this, a large decrease in iNKT precursors has been reported in IL-7^{KO} mice (24). Furthermore, our findings demonstrate that both the survival of iNKT early precursors and the maintenance of CD127 expression are under the control of the Tif-1 γ branch of TGF- β signaling. However, whether Tif-1 γ directly controls CD127 expression remains to be investigated. Tif-1 γ is a ubiquitous nuclear protein that has been recently shown to be involved in hematopoietic cell fate via the TGF- β pathway in vitro (17). Interestingly, in zebrafish, a mutation in *mon*, which is a gene identified as being an orthologous gene of *tif-1 γ* in mammals, leads to massive apoptosis of hematopoietic cells (30). Moreover, that TGF- β has largely been reported to play an antiapoptotic role (31) supports our results, suggesting that the Tif-1 γ branch could be a key signaling pathway for the TGF- β antiapoptotic effect. In addition to the control of apoptosis, Tif-1 γ could regulate CD44 expression, and thus control the progression from CD44^{low} to CD44^{high} precursors.

After the expansion phase, precursors that become CD44^{high} NK1.1⁻ can either stay in the thymus or colonize peripheral organs and undergo a maturation phase accompanied by the cell-surface expression of both CD122 (IL-15 β R chain) and NK1.1. This maturation step has been reported to be

dependent on the expression of T-bet, a transcription factor originally implicated in the Th1 cell lineage commitment (26). T-bet has been shown to induce CD122 in iNKT cell precursors (32). We have demonstrated a role for TGF- β in the repression of both T-bet and CD122 expression in iNKT cell precursors. Interestingly, the ectopic expression of T-bet in immature iNKT cell precursors has been shown to be sufficient to induce their full maturation and function (32). Given the central role of T-bet in iNKT cell maturation, by controlling the expression of T-bet in iNKT cells, TGF- β is a key regulator for iNKT cell maturation. The absence of overrepresentation of CD44^{high} NK1.1⁺ mature stage in both single- and double-knockout mice for Tif-1 γ and Smad4 revealed that a Tif-1 γ /Smad4-independent branch of TGF- β signaling represses iNKT precursor maturation. Interestingly, in wild-type mice, TGF- β signaling in CD44^{high} NK1.1⁻ precursors is impaired, leading to iNKT precursor maturation. Several arguments suggest the MEK/MAPK branch as a putative candidate of the Tif-1 γ /Smad4-independent pathway to explain how TGF- β represses both T-bet and iNKT precursor maturation. TGF- β has been proposed to repress T-bet during Th1/Th2 lineage commitment in vitro. Recent studies have demonstrated that this repression is under the MEK signaling pathway (33). Moreover, in wild-type animals, we found that the down-regulation of TGF- β signaling at the CD44^{high} NK1.1⁻ stage was associated with the repression of *mek1*, whereas the expression of other actors of the MAPK, such as *p38* and *Erk*, remained constant during iNKT cell differentiation (Fig. S4). Additional experiments should be carried out to confirm the role of MEK in iNKT cell differentiation. By repressing the maturation of both highly dividing CD44^{low} NK1.1⁻ and CD44^{high} NK1.1⁻ cells, the Tif-1 γ /Smad4-independent pathway allows precursors to stay longer in highly divided stages, and thus could also contribute to promote iNKT lineage expansion along with the Tif-1 γ branch. Interestingly, the TGF- β signaling effects on the control of iNKT maturation are not restricted to the thymus because iNKT peripheral maturation was similarly affected. The large defect of mature NK1.1⁺ cells at the periphery in CD4-Cre x Stop^{fl/fl} TGF- β RI^{CA} mice is also associated with their incapacity to produce IFN- γ , underlining the role of TGF- β in the repression of iNKT cell maturation. Moreover, the rare but fully mature, peripheral iNKT cells generated in the absence of TGF- β control produce both IL-4 and IFN- γ , which is similar to iNKT cells from wild-type mice, suggesting that TGF- β is not mandatory for iNKT cell function.

Maturing CD44^{high} NK1.1⁺ precursors express high levels of TGF- β R at their cell surface, and their responsiveness to TGF- β is highly increased. This reactivation of TGF- β signaling in CD44^{high} NK1.1⁺ precursors is not associated with a repression of T-bet expression. This apparent discrepancy can be explained by the relay role of the Smad4 branch of TGF- β signaling. The Smad4 branch is responsible for the maintenance of both T-bet and CD122 expression in the CD44^{high} NK1.1⁺ precursors, and allows them to mature and acquire a high level of NK1.1. Our data suggest that once

precursors have turned on their maturation program, the Smad4 branch thwarts the TGF- β inhibitory effect on maturation driven by the Tif-1 γ /Smad4-independent branch. Thus, TGF- β has a double-edged sword effect on iNKT cell differentiation, through the Tif-1 γ /Smad4-independent branch, which represses their maturation, and through the Smad4 branch, which continues the maturation process. In CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl} mice, all TGF- β signaling branches are turned off, thus the maturation is not repressed by Tif-1 γ /Smad4-independent branch, and the iNKT cell precursor matures fully.

Therefore, the multifaceted role of TGF- β during iNKT cell differentiation can be explained not only by the concerted action of different signaling branches, such as the Tif-1 γ branch and the Tif-1 γ /Smad4-independent branch, but also by the interaction, or competition, between branches, such as the Smad4 branch and the Tif-1 γ /Smad4-independent branch. Interestingly, the analysis of TGF- β branches during the differentiation of several cell types has also suggested an interaction between the TGF- β signaling pathways. In numerous cancers, at the early stage of tumor development, TGF- β represses tumor-growth, whereas at later stages TGF- β facilitates tumor progression. The activation of the Tif-1 γ /Smad4-independent branch (MAPK) by TGF- β has been proposed to facilitate tumor progression by TGF- β . The loss of tumor growth inhibition by TGF- β and the acquisition of oncogenic capacity correlates with the loss of the Smad4 branch function (34). Competition between the Smad4 branch and the Tif-1 γ branch has also been suggested. During the blastula stage of *Xenopus*, a role for Tif-1 γ in the targeting of Smad4 for ubiquitination and degradation has been reported, suggesting a potential regulation of the Smad4 branch by Tif-1 γ protein (18). However, the interactions between TGF- β signaling branches appear to be specific for a given cell type, because during human hematopoiesis, although two distinct roles have been ascribed to the Tif-1 γ branch and the Smad4 branch, no variation in Smad4 protein levels have been reported after overexpression or deletion of Tif-1 γ in human hematopoietic cells (17). In iNKT cell differentiation, the expression levels of both Tif-1 γ and Smad4 stay constant over the different stages of iNKT cell development (unpublished data) suggesting that the Tif-1 γ branch and the Smad4 branch do not interfere with one another, but work in concert during a cellular differentiation program, each branch dedicated to a specific task.

In sum, our results propose that TGF- β is a key regulator of iNKT cell differentiation. We have revealed that through different branches of its signaling pathway, TGF- β can fine tune the complex iNKT cell differentiation cell program. These different signaling pathways function as complementary effector arms that, in association with a modulation of TGF- β responsiveness between the differentiation stages, can explain the multiple roles of TGF- β during iNKT cell development. TGF- β assures lineage expansion via the Tif-1 γ branch and maturation acquisition via the Tif-1 γ /Smad4-independent branch, whereas the maintenance of the maturation process involves the Smad4-dependent pathway. At an

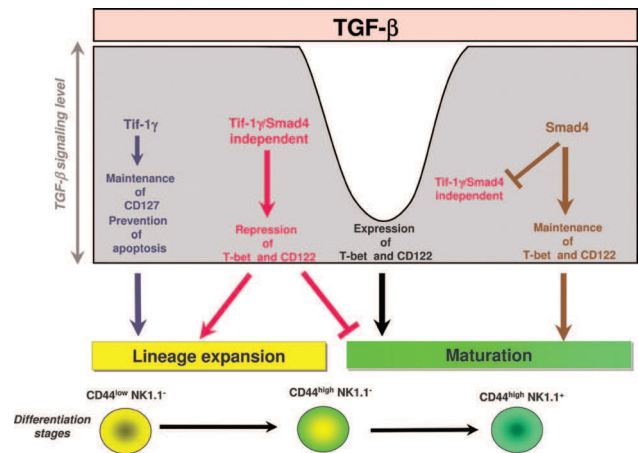


Figure 8. Schematic model summarizing the effects of the three branches of TGF- β signaling on iNKT cell differentiation. The Tif-1 γ -dependent branch prevents the apoptosis and allows lineage expansion. The Tif-1 γ /Smad4-independent branch prevents maturation, and thus allows lineage expansion. The Smad4-dependent branch allows maturation.

early stage, the Tif-1 γ /Smad4-independent branch represses precursor maturation and allows iNKT lineage expansion in concert with Tif-1 γ branch. Next, the TGF- β responsiveness is impaired, allowing precursor maturation. Finally, maturing precursors restore their capacity to fully respond to TGF- β and the Smad4 branch assures the continuation of the maturation program by maintaining high level of both T-bet and CD122 (Fig. 8). The action of each branch is conditioned by the action of the others. These sequential roles of the TGF- β signaling branches during iNKT cell development ascribe a crucial role for TGF- β in the iNKT cell differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Mice. CD4-Cre x TGF- β RII^{fl/fl}, and CD4-Cre x Smad4^{fl/fl} mice were generated as previously described (15). Stop^{fl/fl} TGF- β RI^{CA} transgenic animals have been generated by insertion at the HPRT locus of the *Lox-Stop-Lox* cassette positioned upstream of the TGF- β RI^{CA}-HA fusion gene (21). Tif-1 γ ^{fl/fl} mice harboring floxed exon 2–4 were generated by K.-P. Yan. The selective deletion of the Tif-1 γ in Tif-1 γ cells is illustrated in Fig. S3. R26RYFP (Rosa26-YFP^{fl/fl}) mice were provided by Frank Constantini (Columbia University, New York, NY) and CD1d^{KO} mice by Luc Van Kaer (Vanderbilt University, Nashville, TN). Beside the Stop^{fl/fl} TGF- β RI^{CA} mice which were backcrossed 6 times in C57BL/6, each mouse strain was backcrossed 8–10 times in a C57BL/6 (B6) background, and only littermates were used as controls. C57BL/6 mice were purchased from Charles Rivers Laboratories. Mice were maintained in a specific pathogen-free animal facility at the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (Lyon, France) and handled in the accordance with the institutional guidelines, and the protocols were approved by Comité Régional d’Ethique pour l’Expérimentation Animale.

Radiation BM chimeras. Radiation BM chimeras were generated upon transfer of 2–3 $\times 10^6$ T cell-depleted BM cells into lethally irradiated Rag2^{KO} recipients, as previously described (15).

Lymphocyte isolation. Cell suspensions were prepared from the thymus, spleen, and liver. Red cells in spleen were lysed with 168 mM NH₄Cl and liver lymphocytes were separated by gradient density using Percoll (GE Healthcare), as previously described (15).

NKT cell enrichment. Thymuses were depleted of CD8⁺, CD16/32⁺, CD19⁺ cells using mAbs directed against CD8 α (clone 53–6.7), CD16/32 (clone 24G2), and CD19 (clone 1D3; all from BD), respectively, along with mouse depletion Dynabeads (Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

Antibodies and flow cytometry. CD24-FITC (clone M1/69) mAbs, CD122-PE (clone TM- β 1), Ki67-PE (clone B56), NK-1.1-PerCP-Cy5.5 (clone PK136), Ly9.1, TCR- β -FITC (H57-597) annexin V-APC and 7-AAD, NKG2A/C/E (20D5), NKG2D (C7), and Ly49C/I (5E6) were obtained from BD. CD127-PE (clone A7R34), NK-1.1-PE-Cy7 (clone PK136), T-bet-Alexa Fluor 647 (clone eBio4B10), CD44-Alexa Fluor 700 (clone IM7), IL-4 (11B11), and IFN- γ (XMG1.2) were purchased from eBioscience. CD1d- α -GalCer tetramers were produced with streptavidin-APC (BD) or streptavidin-PE-Cy7 (eBioscience) and used for staining as previously described (25). Anti-TGF- β R2-biot was purchased from R&D Systems. Anti-Smad4 (EP618Y) was purchased from Abcam and monoclonal and anti-Tif-1 γ (5T γ 3E9) were gifts from Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (Strasbourg, France). For intracellular staining, cells were activated with 500 ng/ml PMA and 5 ng/ml ionomycin (Sigma-Aldrich), and then resuspended in Cytofix/Cytoperm solution from a Fixation/permeabilization kit (BD) and stained according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry and cell sorting was performed using a two-laser FACSAria (BD) cell sorter/analyzer and analyzed using either BD FACSDiva software v5.0.1 (BD) or FlowJo (Tree Star, Inc.).

In vitro stimulation. 5×10^5 mouse thymocytes were incubated for 48 h with the CD1d-restricted V α 14-expressing DN3D3 hybridoma at a 1/10 ratio in 100 μ l total volume with increasing concentrations of α GalCer, ranging from 0.01 to 100 ng/ml, and culture supernatants were analyzed by ELISA for IL-2 content, as described previously (25).

Quantitative RT-PCR. CD1d- α -GalCer tetramer⁺ thymocytes were FACS-sorted into three groups: CD44^{low} NK1.1⁻, CD44^{high} NK1.1⁻, and CD44^{high} NK1.1⁺. RNA was isolated using the RNeasy kit (QIAGEN) and reverse transcribed into cDNA with Superscript RT-PCR kit (Invitrogen). RT-PCR was performed with platinum SYBR Green kit (Invitrogen) on an Applied Biosystems 7000 machine with the primers listed. Relative gene expression was normalized to *hprt* and *g3pdh*/ β actin levels in agreement with works from vandesompele et al. (35). The primers used are as follows: *hprt*, 5'-TCATTATGCCGAGGATTTGGA-3' and 5'-CAGAGGGCCACAA-TGTGATG-3'; *g3pdh*, 5'-GCATGGCCTTCCGTGTCC-3' and 5'-TGT-CATCATACTTGGCAGGTTTCT-3'; *tgf β R1*, 5'-CAGACGAAGCAGACTGGACCAG-3' and 5'-TGCTGCAATCAGGACCCTGC-3'; *tgf β R2*, 5'-GAAGAATACACCACCAGCAGTC-3' and 5'-ATGATGACAGC-TATGGCAATCC-3'; *p38*, 5'-ACCTAAAGCCAGCAACCTAGC-3' and 5'-GGTAGCCACGTAGCCTGTATC-3'; *mek1*, 5'-AACTGGGA-GCTGGCAACGG-3' and 5'-TGCGGGTTTGATCTCCAGGTG-3'; *erk*, 5'-GCTGACTCCAAAGCTCTGGATTTAC-3' and 5'-CTCCTTAGG-TAAGTCGTCCAACCTCC-3'; *p21*, 5'-TTGCACTCTGGTGTCTG-AGC-3' and 5'-GGGCACTTCAGGTTTCTC-3'; *junB*, 5'-GACGA-CCTGCACAAGATGAA-3' and 5'-TGCTGAGGTTGGTGTAGACG-3'; *pmepai*, 5'-CAGGAGGAGACGATGGAC-3' and 5'-AGGTAGGGG-TAGGTGGGTTG-3'; and β actin SuperArray commercial Q-PCR primers.

Statistics. The unpaired, two-tailed Student's *t* test was used for statistical confirmation of cell number comparisons.

Online supplemental materials. NK marker stainings, MEK/ERK/P38 mRNA expression, *Tif-1 γ* expression, NKT proliferation, and NKT absolute numbers are available online. The online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20090127/DC1>.

The expert assistance of S. Guignès, A. Lambert, A. Ruiz, P. Contard, and C. Angleraux is highly appreciated. We thank S. Karlsson, C.B. Wilson, F. Constantini, L. Van Kaer, for providing *Tgf β R1*^{fl/fl}, *Smad4*^{fl/fl}, *CD4-Cre*, *R26RYFP*, *CD1d*^{fl/fl} mice, respectively. We

also thank members of our laboratory for advice and helpful discussions, and both R. Buckland and J.P. Rasmussen for manuscript editing.

This work was supported by grants from ANR JCJC06_136846 (J.C. Marie), ARC 3989 (J.C. Marie), ARC 3891 (L. Bartholin) ligue contre le cancer (J.C. Marie and L. Bartholin) INSERM Groupe AVENIR R04193KS (K. Benlagha), FRM INE20051105133 (K. Benlagha), ANR R07119KS (K. Benlagha), and INCa (R. Rimokh and J.C. Marie). F. Cyprian and D. Vincent are supported by an MRT fellowship. L. Bartholin is supported by Ligue Nationale Contre le Cancer and INSERM AVENIR.

The authors have no conflicting financial interests.

Submitted: 15 January 2009

Accepted: 24 April 2009

REFERENCES

- Kronenberg, M., and L. Gapin. 2002. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2:557–568.
- Kronenberg, M., and A. Rudensky. 2005. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature.* 435:598–604.
- Godfrey, D.L., H.R. MacDonald, M. Kronenberg, M.J. Smyth, and L. Van Kaer. 2004. NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* 4:231–237.
- Kronenberg, M. 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu. Rev. Immunol.* 23:877–900.
- Bendelac, A., P.B. Savage, and L. Teyton. 2007. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25:297–336.
- McNab, F.W., S.P. Berzins, D.G. Pellicci, K. Kyparissoudis, K. Field, M.J. Smyth, and D.I. Godfrey. 2005. The influence of CD1d in postselection NKT cell maturation and homeostasis. *J. Immunol.* 175:3762–3768.
- Berzins, S.P., F.W. McNab, C.M. Jones, M.J. Smyth, and D.I. Godfrey. 2006. Long-term retention of mature NK1.1⁺ NKT cells in the thymus. *J. Immunol.* 176:4059–4065.
- Lodolce, J.P., D.L. Boone, S. Chai, R.E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, and A. Ma. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity.* 9:669–676.
- Ohteki, T., S. Ho, H. Suzuki, T.W. Mak, and P.S. Ohashi. 1997. Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1⁺ T cell receptor-alpha beta⁺ cell development. *J. Immunol.* 159:5931–5935.
- Sato, H., T. Nakayama, Y. Tanaka, M. Yamashita, Y. Shibata, E. Kondo, Y. Saito, and M. Taniguchi. 1999. Induction of differentiation of pre-NKT cells to mature Valpha14 NKT cells by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:7439–7444.
- Elewaut, D., L. Brossay, S.M. Santee, O.V. Naidenko, N. Burdin, H. De Winter, J. Matsuda, C.F. Ware, H. Cheroutre, and M. Kronenberg. 2000. Membrane lymphotoxin is required for the development of different subpopulations of NK T cells. *J. Immunol.* 165:671–679.
- Bezbradica, J.S., L.E. Gordy, A.K. Stanic, S. Dragovic, T. Hill, J. Hawiger, D. Unutmaz, L. Van Kaer, and S. Joyce. 2006. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates effector differentiation of invariant natural killer T cells during thymic ontogeny. *Immunity.* 25:487–497.
- Franki, A.S., K. Van Beneden, P. Dewint, K.J. Hammond, S. Lambrecht, G. Leclercq, M. Kronenberg, D. Deforce, and D. Elewaut. 2006. A unique lymphotoxin {alpha}beta-dependent pathway regulates thymic emigration of V{alpha}14 invariant natural killer T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:9160–9165.
- Li, M.O., S. Sanjabi, and R.A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity.* 25:455–471.
- Marie, J.C., D. Liggitt, and A.Y. Rudensky. 2006. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity.* 25:441–454.
- Derynck, R., and Y.E. Zhang. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 425:577–584.
- He, W., D.C. Dorn, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M.A. Moore, and J. Massague. 2006. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1 gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell.* 125:929–941.

18. Dupont, S., L. Zacchigna, M. Cordenonsi, S. Soligo, M. Adorno, M. Rugge, and S. Piccolo. 2005. Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell*. 121:87–99.
19. Liu, Y., P. Zhang, J. Li, A.B. Kulkarni, S. Perruche, and W. Chen. 2008. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 9:632–640.
20. Marie, J.C., J.J. Letterio, M. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201:1061–1067.
21. Bartholin, L., F.S. Cyprian, D. Vincent, C.N. Garcia, S. Martel, B. Horvat, C. Berthet, S. Goddard-Leon, I. Treilleux, R. Rimokh, and J.C. Marie. 2008. Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor beta signaling through the TbetRI/ALK5 receptor. *Genesis*. 46:724–731.
22. Li, M.O., and R.A. Flavell. 2008. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell*. 134:392–404.
23. Leonard, W.J., E.W. Shores, and P.E. Love. 1995. Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol. Rev.* 148:97–114.
24. Matsuda, J.L., L. Gapin, S. Sidobre, W.C. Kieper, J.T. Tan, R. Ceredig, C.D. Surh, and M. Kronenberg. 2002. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat. Immunol.* 3:966–974.
25. Benlagha, K., T. Kyin, A. Beavis, L. Teyton, and A. Bendelac. 2002. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science*. 296:553–555.
26. Townsend, M.J., A.S. Weinmann, J.L. Matsuda, R. Salomon, P.J. Farnham, C.A. Biron, L. Gapin, and L.H. Glimcher. 2004. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity*. 20:477–494.
27. Yang, X.O., R. Nurieva, G.J. Martinez, H.S. Kang, Y. Chung, B.P. Pappu, B. Shah, S.H. Chang, K.S. Schluns, S.S. Watowich, et al. 2008. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 29:44–56.
28. Matsuda, J.L., T. Mallevaey, J. Scott-Browne, and L. Gapin. 2008. CD1d-restricted iNKT cells, the ‘Swiss-army knife’ of the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 20:358–368.
29. Pellicci, D.G., K.J. Hammond, A.P. Uldrich, A.G. Baxter, M.J. Smyth, and D.I. Godfrey. 2002. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1⁻CD4⁺ CD1d-dependent precursor stage. *J. Exp. Med.* 195:835–844.
30. Ransom, D.G., N. Bahary, K. Niss, D. Traver, C. Burns, N.S. Trede, N. Paffett-Lugassy, W.J. Saganic, C.A. Lim, C. Hersey, et al. 2004. The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol.* 2:E237.
31. Letterio, J.J., and A.B. Roberts. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* 16:137–161.
32. Matsuda, J.L., Q. Zhang, R. Ndonge, S.K. Richardson, A.R. Howell, and L. Gapin. 2006. T-bet concomitantly controls migration, survival, and effector functions during the development of Valpha14i NKT cells. *Blood*. 107:2797–2805.
33. Park, I.K., J.J. Letterio, and J.D. Gorham. 2007. TGF-beta 1 inhibition of IFN-gamma-induced signaling and Th1 gene expression in CD4⁺ T cells is Smad3 independent but MAP kinase dependent. *Mol. Immunol.* 44:3283–3290.
34. Javelaud, D., and A. Mauviel. 2005. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene*. 24:5742–5750.
35. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3:RESEARCH0034.

The human *NUPR1/P8* gene is transcriptionally activated by transforming growth factor β via the SMAD signalling pathway

Roxane M. POMMIER*^{†‡§||}¹, Johann GOUT*^{†‡§||}¹, David F. VINCENT*^{†‡§||}, Carla E. CANO¶, Bastien KANIEWSKI*^{†‡§||}, Sylvie MARTEL*^{†‡§||}, Jonathan RODRIGUEZ*^{†‡§||}, Geneviève FOUREL*^{†‡§||}, Ulrich VALCOURT*^{†‡§||}, Julien C. MARIE*^{†‡§||}, Juan L. IOVANNA¶ and Laurent BARTHOLIN*^{†‡§||}²

*Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France, †CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France, ‡Université de Lyon, F-69000 Lyon, France, §Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France, ||Centre Léon Bérard, F-69000 Lyon, France, and ¶Inserm U624, Stress Cellulaire, Parc Scientifique et Technologique de Luminy, F-13228 cedex 09 Marseille, France

NUPR1 (nuclear protein 1), also called P8 (molecular mass 8 kDa) or COM1 (candidate of metastasis 1), is involved in the stress response and in cancer progression. In the present study, we investigated whether human *NUPR1* expression was regulated by TGF β (transforming growth factor β), a secreted polypeptide largely involved in tumorigenesis. We demonstrate that the expression of *NUPR1* was activated by TGF β at the transcriptional level. We show that this activation is mediated by the SMAD proteins, which are transcription factors specifically involved in the signalling of TGF β superfamily members. *NUPR1* promoter analysis reveals the presence of a

functional TGF β -response element binding the SMAD proteins located in the genomic DNA region corresponding to the 5'-UTR (5'-untranslated region). Altogether, the molecular results of the present study, which demonstrate the existence of a TGF β /SMAD/NUPR1 activation cascade, open the way to consider and investigate further a new mechanism enabling TGF β to promote tumorigenesis by inducing stress resistance.

Key words: cytokine, nuclear protein 1 (NUPR1), promoter, SMAD, stress, transforming growth factor β (TGF β).

INTRODUCTION

A cell constantly receives a multitude of signals informing it about its condition and that of its environment. When it receives signals threatening its integrity or its ability to function (exposure to toxic substances or radiation, thermal or osmotic stress, or a lack of nutrients or oxygen etc.), a cell expresses stress proteins in order to deal with these attacks [1]. This stressed state, permitting the cell to survive such hostile conditions, may be transitory (acute stress), after which there is a return to normal conditions, or permanent (chronic stress), part of a more long-term adaptive process. Whether transient or permanent, this stressed state has the aim of ensuring that the cell survives and continues to perform its functions. If the conditions of stress become incompatible with maintaining the biological functions normally carried out by the cells, these cells are 'eliminated' by fail-safe programmes such as apoptosis or senescence.

To ride out these detrimental conditions, cancer cells frequently hijack and take advantage of the survival signals provided by the stress proteins, while avoiding fail-safe programs [2]. The combined effect of these two events (survival stimulus from the stress proteins and avoiding the fail-safe programs) gives cancer cells a selective benefit, which results in uncontrolled tumour growth. During tumour progression, cancer cells must resist diverse stress factors, such as a lack of nutrients and oxygen, the presence of pro-apoptotic and cytostatic factors secreted in the tumoural microenvironment, and repeated attacks by the

immune system. To survive in such hostile conditions, cancer cells express numerous stress proteins, which are more or less specific to a given stress factor.

Among these, the protein NUPR1 (nuclear protein 1), also called P8 (molecular mass 8 kDa) or COM1 (candidate of metastasis 1), has been found to be expressed in the pancreas of rats suffering from pancreatitis as a reaction to the injection of sodium taurocholate into the main pancreatic duct in order to create severe chemical stress [3]. NUPR1 is an evolutionarily conserved protein (it is present in *Drosophila*, *Xenopus*, nematodes and mammals). It is structurally related to the HMG (high-mobility group) transcriptional regulators, which are involved in the stress response and in cancer progression through their effect on chromatin remodelling and transcription. NUPR1 has been shown to interact with the histone acetylation-regulating factor MSL1 (male-specific lethal 1 homologue), suggesting that NUPR1 may be implicated in chromatin remodelling [4]. NUPR1 also interacts with various factors controlling the cell cycle, programmed cell death and autophagy [5]. The functional relevance of these interactions remains elusive.

TGF β (transforming growth factor β) is a secreted polypeptide that is part of a large family of cytokines and growth factors, including TGF β s, BMPs (bone morphogenetic proteins) and activins [6,7]. The 'canonical' signalling pathway activated by TGF β family members is mediated by the SMAD family of transcription factors. Contrasting with its tumour suppressor role in the majority of untransformed cells, TGF β behaves like a

Abbreviations used: CHIP, chromatin immunoprecipitation; COM1, candidate of metastasis 1; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DTT, dithiothreitol; EMSA, electrophoretic mobility-shift assay; EST, expressed sequence tag; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GST, glutathione transferase; HEK, human embryonic kidney; MH2, MAD homology 2; MEF, mouse embryonic fibroblast; NUPR1, nuclear protein 1; P8, molecular mass 8 kDa; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; P/S, penicillin and streptomycin mix; qPCR, quantitative PCR; RT-qPCR, reverse transcription quantitative PCR; SBE, SMAD-binding element; siRNA, small interfering RNA; TGF β , transforming growth factor β ; T β R, TGF β receptor; 5'-UTR, 5'-untranslated region.

¹ These authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed (email laurent.bartholin@lyon.unicancer.fr).

pro-oncogenic factor in most transformed tissues by stimulating EMT (epithelial-mesenchymal transition), immunosuppression and the remodelling of the extracellular matrix [8,9]. We showed that *NUPRI* was involved in TGF β -induced tumour aggressiveness, establishing for the first time a functional interaction between TGF β and a stress protein such as NUPRI [9a].

In the present study we investigate whether human *NUPRI* is a direct molecular target of TGF β . We show that the expression of the *NUPRI* is activated by TGF β at the transcriptional level through the SMAD signalling pathway. We cloned a 2340 bp *NUPRI* promoter fragment (spanning nucleotide residues -2111 to +229) and identified a functional TGF β regulatory sequence binding the SMAD proteins in a genomic region corresponding to the 5'-UTR (5'-untranslated region).

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructs

The *NUPRI* gene is located on the negative strand of chromosome 16 in position 16p11.2. The complete sequence of the *NUPRI* promoter is available in GenBank[®] (NC_000016). The transcription start codon is predicted by the ENSEMBL database (ENST00000324873) and the EST (expressed sequence tag) database (accession number BM751285). The nucleotide positions in the present study are relative to this predicted transcription start site (+1). We noted the existence of an alternative transcription start located upstream from the putative TATA box as suggested by the existence of another EST 42 bp upstream (accession number BP214401).

Different genomic DNA fragments corresponding to the *NUPRI* promoter were cloned into the luciferase pGL3-basic (Promega) reporter plasmid. Human genomic DNA (Promega) was used as a PCR template (PrimeSTAR[™] HS, TaKaRa) to clone the different fragments of the *NUPRI* promoter: (-2111/+229), (-2111/+208), (-2111/+152), (-2111/+117), (-2111/+105), (-2111/+86), (-2111/+71), (-2111/+1) and (+1/+229). Amplified fragments were cloned in the pGL3-basic-Luciferase vector by homologous recombination (In-Fusion HD Cloning Kit, Clontech). All of the constructs were verified by sequencing (GATC Corporation). Mammalian expression vectors pcDNA3.1-*SMAD3* and pcDNA3.1-*SMAD4* were provided by Peter Ten Dijke (Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands) and described in [10] and Aristidis Moustakas [11] (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden) respectively. Bacterial GST (glutathione transferase)-*SMAD3* Δ C fusion protein expression vector was provided by A. Mauviel [12] (Curie Institute, Orsay, France).

Cell culture

The HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and HEK (human embryonic kidney)-293T cancer cell lines were obtained from the A.T.C.C. and cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), supplemented with 0.03% L-glutamine and containing 10% FBS (fetal bovine serum) and P/S (a mix of 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin sulfate). Colo 357 cells (human pancreatic adenocarcinoma) (a gift from Dr Caroline Hill, Cancer Research UK, London Research Institute, London, U.K.) were cultured in RPMI medium supplemented with 0.03% L-glutamine and containing 10% FBS and P/S. Immortalized MEFs (mouse embryonic fibroblasts) prepared from *Smad4*^{lox/lox} embryos [13] were generated in our laboratory. Briefly, *Smad4*^{lox/lox} MEFs were isolated from E12.5 (embryonic

day 12.5) mouse embryos and spontaneously immortalized through successive passages. MEFs were cultured in DMEM supplemented with 0.03% L-glutamine and containing 10% FBS, 1% non-essential amino-acids and P/S. MEFs were infected either with an empty retroviral vector (pBABE-wt) or a Cre-expressing retroviral vector (pBABE-Cre). After infection, MEFs were cultured in the presence of 3 μ g/ml puromycin (Invivogen) to select stably infected cells. All cell lines were propagated at 37°C under 5% (v/v) CO₂ atmosphere. Recombinant human TGF β 1 was purchased from Peprotech and was used at a 10 ng/ml final concentration. Actinomycin D was purchased from Sigma-Aldrich and was used at a 5 μ g/ml final concentration.

RNA interference experiments

Colo 357 cells were seeded and reverse-transfected in 24-well plates (10⁵ cells per well), with Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen) and 20 pmol of control siRNA (small interfering RNA) or siRNA directed against *SMAD4* (Invitrogen). Culture medium was changed 6 h after transfection and, 2 days after transfection, cells were treated with TGF β for 24 h.

Reporter assays

Cells were seeded the day before transfection into 12-well plates (10⁵ cells per well for HEK-293T cells and 1.5 \times 10⁵ cells per well for HepG2 cells). Transient transfections (Exgen 500, Euromedex) were performed using luciferase pGL3-basic reporter plasmids (Promega) encoding firefly luciferase under the control of different fragments of the *NUPRI* promoter. phRL-CMV vector (Promega) encoding *Renilla* luciferase under the control of the CMV (cytomegalovirus) ubiquitous promoter was co-transfected in order to determine the transfection efficiency and to normalize firefly luciferase values. Where indicated, expression vectors encoding SMAD3 and SMAD4 proteins were also co-transfected. The total amount of transfected material was kept constant (750 ng) using pcDNA3.1 empty vector (Invitrogen). The day after transfection, cells were treated with TGF β . At 24 h after TGF β treatment, firefly and *Renilla* luciferase activities were quantified in whole-cell lysates (Passive Lysis Buffer, Promega) using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). The firefly luciferase activity was normalized with regard to the *Renilla* luciferase activity, and the ratios were related to the basal condition (untreated cells) arbitrarily set at 1.0. Experiments were performed in triplicate.

RT-qPCR (reverse transcription quantitative PCR)

As described previously [14], total RNAs were extracted from the different cell lines (HEK-293T, Colo 357, HepG2 and MEFs) using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). First-strand cDNAs were prepared using 250 ng of RNA and SuperScriptII Reverse Transcriptase in the presence of random primers (Invitrogen), after incubation with DNase I (Invitrogen). qPCR (quantitative PCR) was performed using an Applied Biosystems ABI PRISM 7000 Sequence Detection thermocycler (annealing temperature 60°C) and iTaq SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). Primers (Sigma-Aldrich) used for qPCR are presented in Supplementary Table S1 (at <http://www.BiochemJ.org/bj/445/bj4450285add.htm>). As described previously [15], all of the real-time values were averaged and compared using the threshold cycle (C_T) method, where the amount of target RNA ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) is normalized to the endogenous *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) or *HPRT* (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) expression

reference (ΔC_T). The amount of target in untreated cells was set as the calibrator at 1.0. Experiments were performed in duplicate.

Western blotting

Total protein extracts (20 μ g) were prepared using RIPA lysis buffer [50 μ M Tris, pH 7.5, 150 μ M NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and commercial protease and phosphatase inhibitor cocktail tablets (Roche)] from Colo 357 cells and MEFs, and were subjected to electrophoresis on SDS/PAGE (10% gels). The separated proteins were transferred on to PVDF membranes (Millipore) by electroblotting. Rabbit monoclonal anti-SMAD4 (1:1000 dilution, Epitomics) and mouse monoclonal anti- β -actin (1:5000 dilution, Sigma-Aldrich) were used as primary antibodies. Goat anti-rabbit IgG (1:10 000 dilution, Dako) and rabbit anti-mouse IgG (1:10 000 dilution, Dako) were used as secondary antibodies. Western blots were revealed using the ECL Western detection system (GE Healthcare).

EMSA (electrophoretic mobility-shift assay)

The genomic DNA region corresponding to the 5'-UTR of *NUPR1* (+1/+229), used as a probe for EMSAs, was amplified by PCR (see Supplementary Table S1 for primer sequences) using the pGL3-*hNUPR1* (+1/+229)-Luc vector as a template. After enzymatic digestion by KpnI and NheI, probes were labelled at their 3' extremity by biotinylation (Biotin 3' End DNA Labelling kit, Thermo Scientific). The nuclear extracts were prepared from 8×10^7 HepG2 cells treated or not with TGF β for 45 min. Cells were washed with PBS and further lysed in a hypotonic buffer [10 mM Hepes, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.1% Nonidet P40, 1 mM DTT (dithiothreitol), 2 mM NaVO₃, 10 mM NaF and commercial protease inhibitor cocktail tablets (Roche)]. After 15 min of incubation on ice, nuclei were centrifuged and washed twice with the above-described buffer. Then, chromatin proteins were extracted using a hypertonic buffer (20 mM Hepes, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF in DMSO and 0.5 mM DTT). Protein concentrations in cleared lysates were then measured using a commercial kit (Bio-Rad Protein Assay). A 1 μ g portion of recombinant proteins, e.g. GST (wild-type, Santa Cruz Biotechnology) or GST-SMAD3 Δ C [16], were incubated with the 3'-labelled probes (20 fmol) for 20 min at room temperature (23 °C) in the presence of 50 ng/ml poly(dI-dC) in 1 \times binding buffer (LightShift Chemiluminescent EMSA kit, Thermo Scientific) as described previously [17]. For competition assays with antibodies, 0.25 μ g of nuclear extracts were pre-incubated for 20 min at room temperature with antibodies directed against SMAD4 (rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology), SMAD7 (goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) or GAPDH (goat polyclonal IgG, Abcam), followed by 20 min of incubation at room temperature of the labelled probes (20 fmol) in the presence of 50 ng/ml poly(dI-dC) in 1 \times binding buffer. Protein-DNA complexes were resolved on a non-denaturing 4% polyacrylamide gel (pre-run for 30 min at 100 V) in 0.5 \times TBE for 60 min at 100 V and transferred on to Hybond N+ membrane in 0.5 \times TBE for 45 min at 100 V. DNAs were cross-linked to the membrane for 10 min (312 nm irradiation) and revealed using a horseradish peroxidase-conjugated streptavidin system (LightShift Chemiluminescent EMSA kit, Thermo Scientific).

ChIP (chromatin immunoprecipitation)

Colo 357 cells (10^7) were treated with or without TGF β for 45 min and ChIP assay was performed following the

manufacturer's protocol (ChIP assay kit, Millipore) [18]. Briefly, chromatin was cross-linked with formaldehyde and subjected to immunoprecipitation using either anti-SMAD4 (rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) or control rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) antibodies. Following reversal of the cross-links, DNA was extracted according the standard phenol/chloroform procedure and analysed by qPCR performed using specific primers presented in Supplementary Table S1. All the results obtained are represented as percentage of input values and normalized to the values observed in untreated conditions, arbitrarily set at 1.0.

Statistics

Results were represented as means \pm S.E.M. or S.D. Statistical significance was tested using Student's *t* test ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$). Means, S.E.M. or S.D. and Student's *t* test were representative of three independent experiments.

RESULTS

TGF β activates the transcription of the *NUPR1* gene

To investigate *NUPR1* activation by TGF β , we studied the accumulation of *NUPR1* transcripts in response to TGF β in diverse cell types known for their sensitivity to this cytokine. HepG2 cells, Colo 357 cells, MEFs and HEK-293T cells were used (Figure 1A). The amount of *NUPR1* mRNA was significantly increased in HEK-293T (2-fold), HepG2 (3-fold), MEFs (4-fold) and Colo 357 (7-fold) cell lines in the presence of TGF β as compared with untreated cells.

We subsequently studied the kinetic accumulation of *NUPR1* mRNA in response to TGF β . We used the Colo 357 cells, which exhibited the highest up-regulation of *NUPR1* gene expression in response to TGF β . Colo 357 cells were therefore treated with TGF β for a range of periods (from 0.5 h to 24 h) and the expression of *NUPR1* mRNA was analysed. RT-qPCR results (Figure 1B) showed that increasing amounts of *NUPR1* transcripts were detectable as early as 1 h after the beginning of TGF β treatment. This rapid accumulation of *NUPR1* mRNA is suggestive of a TGF β direct effect.

Next, we explored whether the accumulation of *NUPR1* transcripts in response to TGF β treatment was due to a transcriptional activation. For this, we tested whether the transcription inhibitor actinomycin D could compromise *NUPR1* activation by TGF β . Colo 357 cells were treated with TGF β and actinomycin D, alone or in combination, for 12 h or 24 h. As shown in Figure 1(C), the TGF β -mediated up-regulated expression of *NUPR1* is totally inhibited by the presence of actinomycin D. This result demonstrates that the *NUPR1* mRNA level is transcriptionally modified by TGF β .

SMAD-dependent transcriptional activation of human *NUPR1* by TGF β

The TGF β signalling pathway involves two kinase receptors, T β RI (TGF β receptor type I) and T β RII. The SMAD proteins mediate the 'canonical' signalling pathway in response to TGF β . After binding to its receptors, TGF β induces the phosphorylation of T β RI, which in turn phosphorylates SMAD2 and SMAD3 proteins (R-SMADs). Phosphorylated SMAD2 and SMAD3 proteins then interact with the common SMAD4 (Co-SMAD) protein. The SMAD2-SMAD3-SMAD4 complex accumulates within the nucleus, binds to DNA and activates

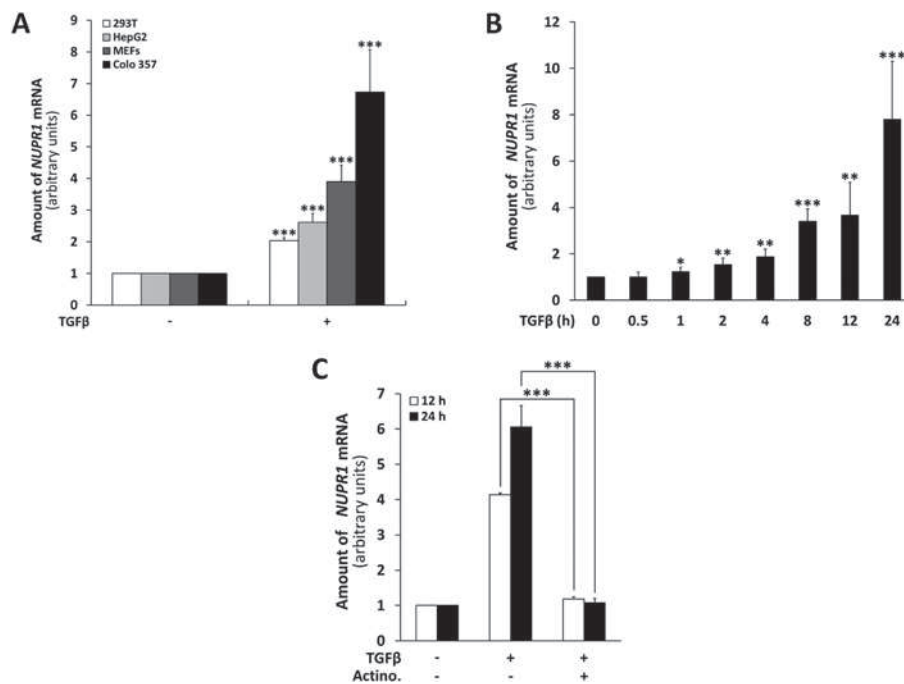


Figure 1 TGF β activates the transcription of *NUPR1* via the SMAD signalling pathway

(A) RT-qPCR analysis of *NUPR1* expression in HEK-293T, HepG2, MEFs and Colo 357 cells treated or not with TGF β for 24 h. (B) Time-course analysis for the *NUPR1* gene expression in Colo 357 cells in the presence of TGF β assessed by RT-qPCR. (C) Effect of actinomycin D (Actino.) treatment on *NUPR1* mRNA accumulation in Colo 357 cells after TGF β treatment, evaluated by RT-qPCR.

the transcription of target genes. In order to inhibit the SMAD pathway, we inactivated *SMAD4* by RNA interference. We transiently transfected Colo 357 cells either with a control siRNA or a siRNA directed against *SMAD4*. The cells were then treated with TGF β for 24 h and *NUPR1* expression was quantified further. Western blotting and RT-qPCR analyses revealed an effective (>70%) reduction of *SMAD4* expression (Figure 2A), which is correlated with a significant reduction of *NUPR1* mRNA accumulation in response to TGF β (Figure 2B). This result was confirmed by taking advantage of genetically engineered mice available in our laboratory and bearing a conditional knockout *Smad4* floxed allele [13,19]. We prepared *Smad4*^{lox/lox} MEFs and infected them with either a Cre-expressing retroviral vector or a control retroviral vector. Western blotting analysis and RT-qPCR revealed a major decrease (>80%) in *Smad4* expression in the presence of the Cre recombinase (Figure 2C). As expected, Cre-mediated *Smad4* inactivation was found to be correlated with a significant diminution of murine *Nupr1* mRNA accumulation after TGF β treatment (Figure 2D). Taken together, these results demonstrate that the SMAD signalling pathway is crucial for enabling optimal activation of *NUPR1* by TGF β .

Identification of TGF β -response elements in the *NUPR1* promoter

The results presented above show that TGF β activates *NUPR1* gene expression at the transcriptional level via the SMAD signalling pathway. We then analysed further the promoter region of *NUPR1*. We generated the pGL3-*hNUPR1*(-2111/+229)-Luc reporter, which contains a genomic DNA region extending from -2111 to +229 nucleotides relative to the *NUPR1* transcription start. We carried out transient transfections of HepG2 or HEK-293T cells with this reporter vector, as well as with plasmids encoding SMAD3 and SMAD4 proteins, before treating cells with TGF β for 24 h. The co-transfection of vectors expressing SMAD3 and SMAD4 was aimed at optimizing

the response to TGF β . In the two cell lines, we observed a 2-fold increase in transcriptional activity in the presence of TGF β and a 5-fold increase in the combined presence of TGF β and exogenous SMAD3 and SMAD4 proteins (Figure 3A). We also observed in HEK-293T cells that SMAD3 and SMAD4, in the absence of exogenous TGF β , could almost activate transcription up to the level observed with the combined use of TGF β and overexpressed SMAD3/SMAD4 (Supplementary Figure S1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/445/bj4450285add.htm>). These results thus showed that this genomic DNA region of the *NUPR1* gene that extends from position -2111 to +229 is sensitive to TGF β .

TGF β -activated SMAD complexes accumulate in the nucleus [6] and regulate target gene expression by binding to DNA sequences called SBEs (SMAD-binding elements) containing the 5'-AGnC-3' (where n is any nucleotide) minimal motif [20]. The extended 5'-CAGACA-3' sequence binds SMAD proteins with higher affinity, and was identified in the promoter of several TGF β -target genes, such as human *PAI-1* (plasminogen activator inhibitor-1) [21]. *In silico* analysis of the -2111/+229 *NUPR1* promoter allowed us to identify fourteen putative SBEs (5'-CAGAC-3' and 5'-AGACA-3') (Figure 3B and Supplementary Figure S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/445/bj4450285add.htm>). Interestingly, these sites are not distributed evenly along this genomic DNA sequence. Indeed, putative SBE concentration is higher in the region corresponding to the 5'-UTR (+1/+229) of *NUPR1*, and more precisely in a 170 bp (+60/+229) sequence, which contains six SBEs (out of 14 putative SBEs present in the analysed -2111/+229 promoter). Interestingly, this 170-bp long SBE-enriched region is the only *NUPR1* promoter region that is conserved between humans and mice (75% nucleotide homology) (Supplementary Figure S2). This conservation suggests that the region corresponding to the 5'-UTR of *NUPR1* might be of special importance in the *NUPR1* gene

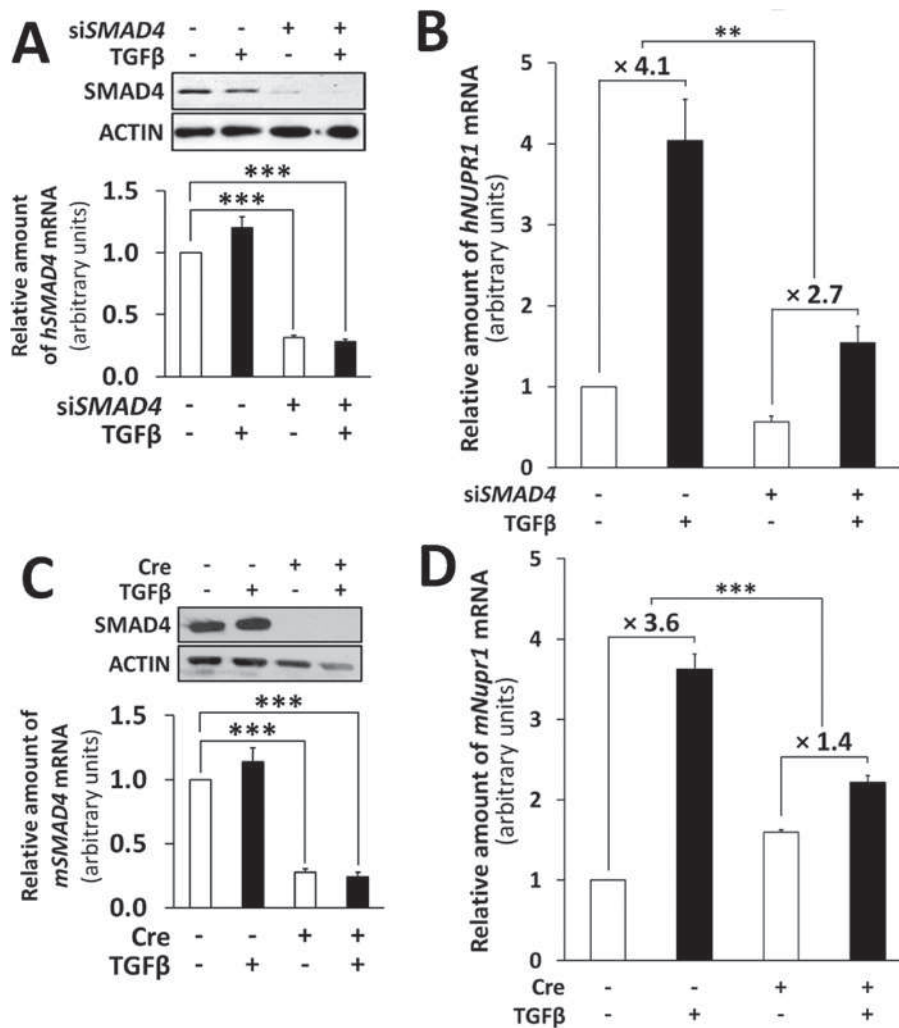


Figure 2 SMAD-dependent transcriptional activation of *NUPR1* by *TGFβ*

(A) SMAD4 protein (Western blotting, top panel) and mRNA (RT-qPCR, bottom panel) expression in Colo 357 cells transiently transfected either with a control siRNA or *SMAD4*-specific siRNA (siSMAD4). (B) *NUPR1* mRNA accumulation after *TGFβ* treatment (24 h) in Colo 357 cells transiently transfected either with a control siRNA or *SMAD4*-specific siRNA was evaluated by RT-qPCR. (C) SMAD4 (Western blotting, top panel) and mRNA (RT-qPCR, bottom panel) expression in *Smad4^{lox/lox}* MEFs stably infected either with an empty retroviral vector or retroviral vector expressing Cre recombinase (Cre). (D) Murine *Nupr1* transcript accumulation after *TGFβ* treatment (24 h) in *Smad4^{lox/lox}* MEFs stably infected either with an empty retroviral vector or retroviral vector expressing Cre recombinase was evaluated by RT-qPCR.

response to *TGFβ*. In this context, to precisely map the *TGFβ*-responsive elements, we cloned reporter plasmids containing different *NUPR1* promoter fragments presenting serial deletions at the 3' extremity of the 5'-UTR. Six fragments were designed to sequentially remove one by one the different putative SBEs present in the 5'-UTR. These reporters were transfected into HEK-293T cells. Cells were then treated with *TGFβ* in the presence of overexpressed SMAD3 and SMAD4 proteins (Figure 4). Deletions from position +229 to +152 do not significantly affect the induction of the *NUPR1* promoter by *TGFβ*. By contrast, the deletion of nucleotides +152 to +117 significantly reduces activation by *TGFβ*, consistent with the existence of a major *TGFβ*-responsive element in this region. Thus the *TGFβ*-mediated transcriptional regulation is mainly dependent on a 35 bp-length sequence located between +152 and +117 positions and containing a SBE (5'-AGACA-3'). In order to definitively demonstrate the importance of the 5'-UTR region in the *TGFβ*-dependent transcriptional activation of *NUPR1* gene, we cloned the pGL3-*hNUPR1*(+1/+229)-Luc construct. Results obtained with this reporter plasmid showed that *NUPR1* 5'-UTR was

sufficient to induce the activation of the reporter gene by *TGFβ* and exogenous SMAD proteins (Figure 4). In conclusion, the promoter region corresponding to the 5'-UTR (+1/+229) of *NUPR1* is necessary and sufficient to allow the transcriptional activation of this gene in response to *TGFβ*.

SMAD proteins bind to the *NUPR1* promoter

We next investigated whether SMAD proteins could directly interact with the *NUPR1* promoter. For this, we tested whether the 5'-UTR of *NUPR1* could physically and directly interact with the SMAD proteins. We therefore carried out EMSAs using a GST-SMAD3ΔC recombinant protein. GST-SMAD3ΔC is a truncated SMAD3 protein, which no longer contains its MH2 (MAD homology 2) domain in the C-terminal position. In the absence of this MH2 domain, the affinity of SMAD3 for DNA, ensured by the N-terminal domain, is strongly increased [22]. We observed a shift of the *NUPR1* 5'-UTR probe in the presence of GST-SMAD3ΔC, whereas no shift was observed with the control

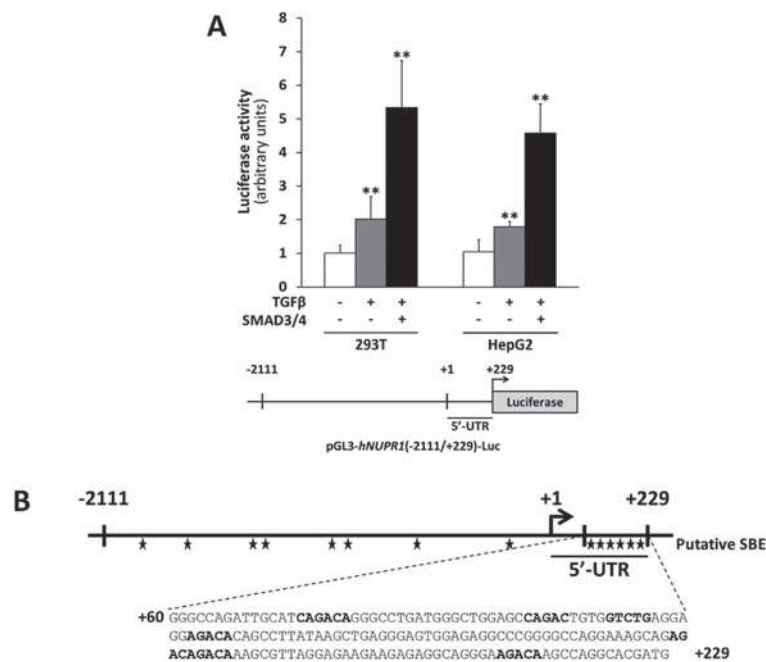


Figure 3 *NUPR1* promoter is activated by the TGFβ/SMAD signalling pathway

(A) Luciferase reporter assay in HepG2 and HEK-293T cells transiently transfected with the pGL3-*hNUPR1*(-2111/+229)-Luc reporter plasmid with or without pcDNA3.1-SMAD3 and pcDNA3.1-SMAD4, treated or not with TGFβ for 24 h. (B) Schematic representation of the *NUPR1* promoter. Putative SBEs (5'-CAGAC-3' or 5'-AGACA-3') are indicated in bold (see Supplementary Figure S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/445/bj4450285add.htm> for more details).

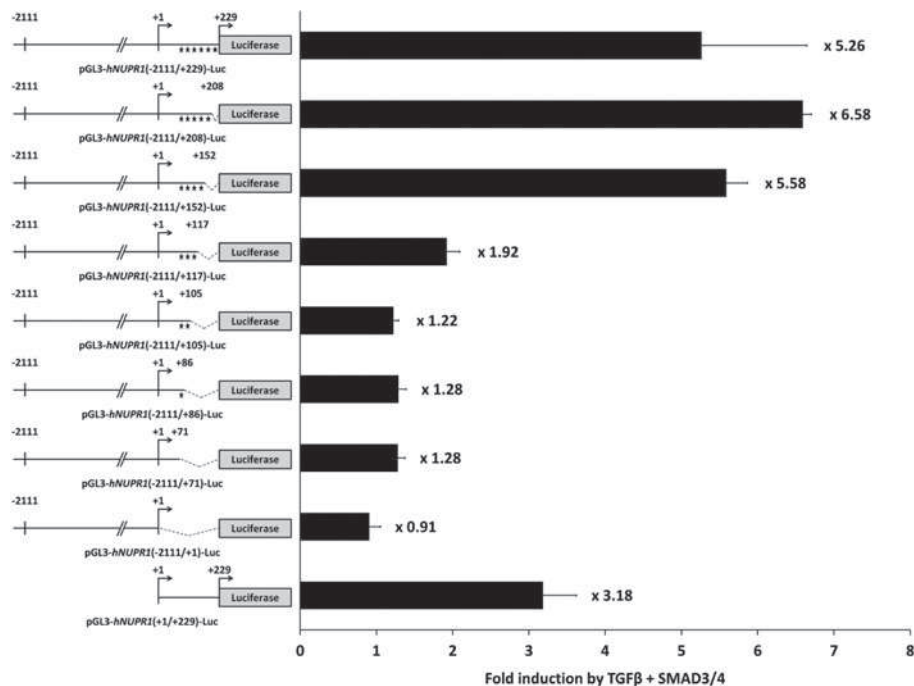


Figure 4 Identification of TGFβ-response elements in the *NUPR1* gene

Luciferase reporter assay in HEK-293T cells transiently transfected with reporters containing the indicated fragment of the *NUPR1* promoter with TGFβ, and SMAD3 and SMAD4 expression vectors.

probe or the recombinant wild-type GST protein (Figure 5A). These results indicate that the SMAD3 protein can specifically and directly bind to the 5'-UTR of the *NUPR1* gene.

We next explored whether an endogenous protein complex could bind to the 5'-UTR of *NUPR1* after TGFβ treatment. To do this, we performed EMSA using nuclear protein extracts

prepared from HepG2 cells either treated or not for 45 min with TGFβ, the length of time sufficient for the nuclear translocation of SMAD2-SMAD3-SMAD4 proteins in response to TGFβ. Our results revealed a shifted band in the presence of nuclear extracts of cells treated with TGFβ (Figure 5B). This indicated an interaction between the 5'-UTR of *NUPR1* and the endogenous

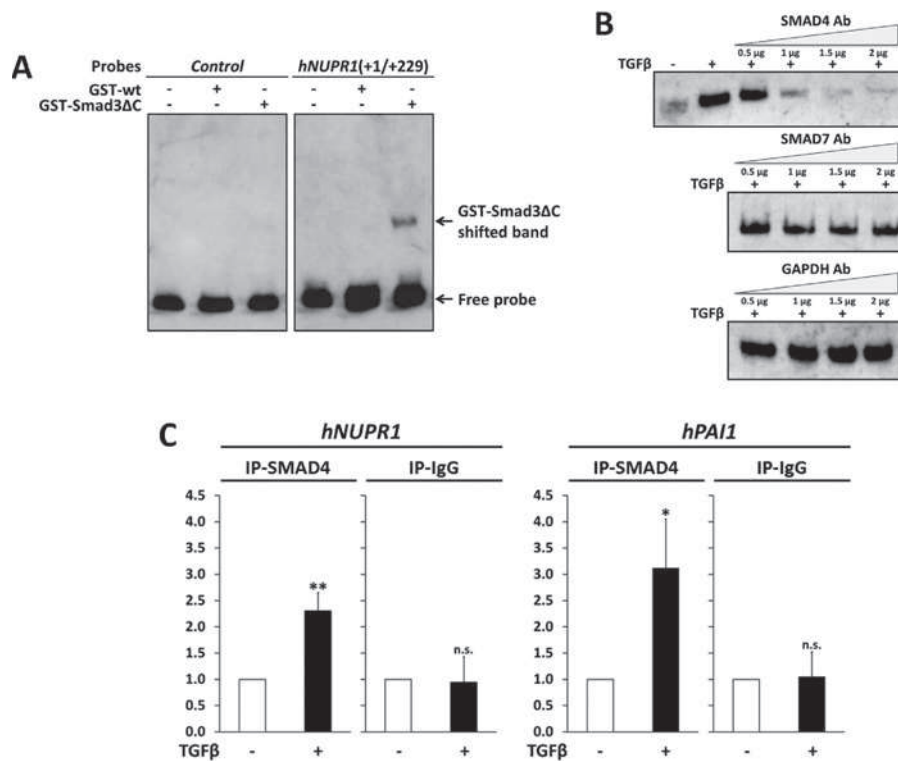


Figure 5 SMAD proteins bind to the *NUPR1* promoter

(A) EMSA performed with a labelled probe corresponding to the *NUPR1* 5'-UTR (+1/+229) in the presence of recombinant GST-SMAD3ΔC. An irrelevant labelled control probe and GST wild-type (wt) protein were used as negative controls. (B) EMSA performed with the *NUPR1* 5'-UTR (+1/+229) and nuclear proteins prepared from HepG2 cells with or without TGFβ (45 min), and pre-incubated or not with increasing concentrations of the indicated antibody (anti-SMAD4, anti-GAPDH and anti-SMAD7). (C) ChIP (IP) assay performed in Colo 357 cells treated or not with TGFβ (45 min). qPCR was performed using primers specific to either *NUPR1* or *PAI-1*. Anti-SMAD4 and rabbit IgG antibodies were used for ChIP. All results obtained were represented as 'percentage input' values and normalized to the untreated condition arbitrarily set at 1.0.

proteins involved in the TGFβ signalling pathway. Then, we investigated whether the complex that binds to the *NUPR1* 5'-UTR after TGFβ treatment actually contains SMAD proteins. For that, we were able to show that pre-incubation of nuclear extracts with an anti-SMAD4 antibody was sufficient to decrease the formation of the DNA-protein complex in a dose-dependent manner (Figure 5B). Binding of the anti-SMAD4 antibody to the SMAD transcriptional complex probably masks the DNA-interacting domain, consequently preventing the interaction of this complex with DNA. Inhibition of band shift formation using competing antibodies has already been described by others [23,24]. As a negative control, no effect was observed using monoclonal isotypical antibodies directed against GAPDH or SMAD7. Altogether, our results indicate that TGFβ treatment induces the binding of a SMAD4 transcriptional complex to the *NUPR1* 5'-UTR that we demonstrated in Figure 4 to confer sensitivity to TGFβ.

Finally, we investigated whether endogenous SMAD4 was recruited to the endogenous promoter of *NUPR1* gene. We performed ChIP experiments in Colo 357 cells. Our results (Figure 5C, left-hand panels) revealed an enrichment (2.5-fold) of SMAD4 bound to the *NUPR1* promoter in cells treated with TGFβ. As a positive control, we verified that the presence of SMAD4 was also enhanced at the well-known TGFβ-sensitive *PAI-1* (encoded by the *SERPINE1* gene) promoter (3-fold). Importantly, no enrichment (of *NUPR1* or *PAI-1*) after TGFβ treatment was detected in precipitates using control IgG (Figure 5C, right-hand panels). Additionally, the *ACTIN* signal was not detected to a significant level in any of the precipitates,

confirming the specificity of the association of SMAD4 with the *NUPR1* promoter.

DISCUSSION

In previous studies, we reported preliminary observations suggesting that TGFβ treatment or SMAD4 overexpression could activate *NUPR1* expression in mouse fibroblasts [25] and human Panc-1 cells [26], with the precise molecular mechanism remaining elusive. In this context, and considering the important role of both molecules in cancer, it was of particular interest to further analyse the regulation of *NUPR1* by TGFβ. The present study provides molecular evidence that *NUPR1* is a direct target gene of the TGFβ-SMAD axis. Indeed, we demonstrated here that TGFβ could activate the transcription of the *NUPR1* gene via the canonical pathway of the SMAD proteins. We cloned the *NUPR1* promoter, allowing us to identify precisely the TGFβ-responsive elements. We demonstrated, using reporter assays, that the activation of *NUPR1* by TGFβ was dependent on a 35 bp sequence (+117/+152) containing a SBE (5'-AGACA-3') which is located in the genomic DNA region corresponding to the 5'-UTR of *NUPR1*. We also showed that a DNA probe corresponding to the 5'-UTR of *NUPR1* could physically interact with SMAD proteins. Finally, ChIP experiments revealed that TGFβ could induce the binding of the endogenous SMAD4 protein to the 5'-UTR of *NUPR1*. Taken together, the results of the present study reveal that *NUPR1* is a transcriptional target of TGFβ involving the SMAD proteins, through a TGFβ-responsive element located in the 5'-UTR of *NUPR1*.

The +1/+229 bp *NUPR1* 5'-UTR is enriched in putative SBE, since it contains six out of the 14 putative SBE present in the -2111/+229 bp *NUPR1* promoter (Supplementary Figure S2). Even more striking, the SBE that we identified in the TGF β -responsive element is located in a 25 bp region (+99-CAGACTgtgGTCTGaggaggAGACA- +123), which contains a cluster of three aggregated SBEs (Supplementary Figure S2). The TGF β -responsive element we identified with our serial deletions corresponds to the more distal (3') SBE, but it will be of particular interest to test the functionality of the two other SBEs, which are positioned into a palindromic orientation, a configuration previously described to bind SMAD proteins with higher affinity than the usual SBEs [27].

NUPR1 expression appears to be a crucial element in cancer cells [5]. It appears to be critical for tumour development in immunodeficient mice [28–30], and is found overexpressed in human cancers [31,32], in which its expression is inversely correlated with apoptosis [33,34]. It is also involved in the resistance to anti-tumoral treatments [35] and the formation of metastases [36]. Our results regarding the regulation of *NUPR1* by TGF β , coupled with the latter's oncogenic properties, make the stress protein *NUPR1* a prime candidate for involvement in the oncogenic response induced by TGF β . Indeed, as TGF β and *NUPR1* play a part in tumour progression [28,30], it is tempting to speculate on the involvement of *NUPR1* in mediating the pro-oncogenic properties of TGF β . We put forward the hypothesis of a new mechanism that enables TGF β to promote tumorigenesis by inducing stress resistance. It is noteworthy that approximately 50% of the pancreatic tumours present a deletion of the locus containing *SMAD4* [also named *DPC4* (deleted in pancreatic carcinoma 4)] [37]. Whether or not *NUPR1/P8* plays a role in *SMAD4*-negative tumours remains elusive. In this context, we can speculate that *NUPR1/P8* activation may involve *SMAD4*-independent pathways, which have been largely described to be involved in the oncogenic properties of TGF β [38]. Moreover, *NUPR1/P8* expression could also be activated by other pathways, which are totally independent of TGF β . Finally, we cannot rule out the possibility that *NUPR1/P8* may be dispensable for tumour aggressiveness in certain subtype of tumours, such as *SMAD4*-negative tumours. Further work need to be performed to address the exact role and the precise genetic background of the TGF β -*NUPR1/P8* axis during pancreatic tumorigenesis. Analysis of large collections of human pancreatic tumours along with the generation of murine models will allow us to clarify the role of the response to cellular stress in tumorigenesis induced by TGF β *in vivo*.

AUTHOR CONTRIBUTION

Roxane Pommier, Johann Gout, Ulrich Valcourt, Julien Marie, Carla Cano, Juan Iovanna and Laurent Bartholin designed the experiments. Roxane Pommier, Bastien Kaniewski, Sylvie Martel, Jonathan Rodriguez and Geneviève Fourel performed the experiments. All of the authors analysed the experimental results. Roxane Pommier, Johann Gout and Laurent Bartholin wrote the paper, and all authors were involved in critical reading of the paper prior to submission.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Peter Ten Dijke and Aristidis Moustakas for the mammalian expression vectors encoding the human *SMAD3* and *SMAD4*, and Alain Mauviel for the bacterial vector encoding the GST-Smad3 Δ C protein. We also thank Caroline Hill for giving us the Colo 357 cells.

FUNDING

This work was supported by the PANSTRESS grant [grant number 2010-203] from INCa (Institut National du Cancer). It was also supported by the Avenir program from INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). R.M.P. was supported by

fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de France (MESR); J.G. by a fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer; D.F.V. by a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC); B.K. by the PANSTRESS grant from INCa. S.M. has a permanent position of senior technician at the Centre Léon Bérard.

REFERENCES

- 1 Simmons, S. O., Fan, C. Y. and Ramabhadran, R. (2009) Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening. *Toxicol. Sci.* **111**, 202–225
- 2 Murakami, S., Noguchi, T., Takeda, K. and Ichijo, H. (2007) Stress signaling in cancer. *Cancer Sci.* **98**, 1521–1527
- 3 Mallo, G. V., Fiedler, F., Calvo, E. L., Ortiz, E. M., Vasseur, S., Keim, V., Morisset, J. and Iovanna, J. L. (1997) Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth. *J. Biol. Chem.* **272**, 32360–32369
- 4 Gironella, M., Malicet, C., Cano, C., Sandi, M. J., Hamidi, T., Taui, R. M., Baston, M., Valaco, P., Moreno, S., Lopez, F. et al. (2009) p8/nupr1 regulates DNA-repair activity after double-strand γ irradiation-induced DNA damage. *J. Cell. Physiol.* **221**, 594–602
- 5 Cano, C. E., Hamidi, T., Sandi, M. J. and Iovanna, J. L. (2011) Nupr1: the Swiss-knife of cancer. *J. Cell. Physiol.* **226**, 1439–1443
- 6 Moustakas, A. and Heldin, C. H. (2009) The regulation of TGF β signal transduction. *Development* **136**, 3699–3714
- 7 Liu, T. and Feng, X. H. (2010) Regulation of TGF- β signalling by protein phosphatases. *Biochem. J.* **430**, 191–198
- 8 Ikushima, H. and Miyazono, K. (2010) TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 415–424
- 9 Inman, G. J. (2011) Switching TGF β from a tumor suppressor to a tumor promoter. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 93–99
- 9a Cano, C. E., Sandi, M. J., Hamidi, T., Calvo, E. L., Turrini, O., Bartholin, L., Loncle, C., Secq, V., Garcia, S., Lomber, G., Kroemer, G., Urrutia, R. and Iovanna, J. L. (2012) Homotypic cell cannibalism, a cell-death process regulated by the nuclear protein 1, opposes metastasis in pancreatic cancer. *EMBO Mol. Med.*, in the press
- 10 Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. and Miyazono, K. (1997) Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily. *Nature* **389**, 622–626
- 11 Moren, A., Itoh, S., Moustakas, A., Dijke, P. and Heldin, C. H. (2000) Functional consequences of tumorigenic missense mutations in the amino-terminal domain of Smad4. *Oncogene* **19**, 4396–4404
- 12 Vindevoghel, L., Lechleider, R. J., Kon, A., de Caestecker, M. P., Utito, J., Roberts, A. B. and Mauviel, A. (1998) *SMAD3/4*-dependent transcriptional activation of the human type VII collagen gene (*COL7A1*) promoter by transforming growth factor β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 14769–14774
- 13 Yang, X., Li, C., Herrera, P. L. and Deng, C. X. (2002) Generation of Smad4/Dpc4 conditional knockout mice. *Genesis* **32**, 80–81
- 14 Vincent, D. F., Yan, K. P., Treilleux, I., Gay, F., Arfi, V., Kaniewski, B., Marie, J. C., Lepinasse, F., Martel, S., Goddard-Leon, S. et al. (2009) Inactivation of TIF1 γ cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet.* **5**, e1000575
- 15 Bartholin, L., Cyprian, F. S., Vincent, D., Garcia, C. N., Martel, S., Horvat, B., Berthet, C., Goddard-Léon, S., Treilleux, I., Rimokh, R. and Marie, J. C. (2008) Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor β signaling through the T β RI/ALK5 receptor. *Genesis* **46**, 724–731
- 16 Bartholin, L., Maguer-Satta, V., Hayette, S., Martel, S., Gadoux, M., Bertrand, S., Corbo, L., Lamadon, C., Morera, A. M., Magaud, J. P. and Rimokh, R. (2001) FLRG, an activin-binding protein, is a new target of TGF β transcription activation through Smad proteins. *Oncogene* **20**, 5409–5419
- 17 Bartholin, L., Wessner, L. L., Chirgwin, J. M. and Guise, T. A. (2007) The human Cyr61 gene is a transcriptional target of transforming growth factor β in cancer cells. *Cancer Lett.* **246**, 230–236
- 18 Bartholin, L., Powers, S. E., Melhuish, T. A., Lasse, S., Weinstein, M. and Wotton, D. (2006) TGF β inhibits retinoid signaling. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 990–1001
- 19 Vincent, D. F., Gout, J., Chuvin, N., Arfi, V., Pommier, R., Bertolino, P., Jonckheere, N., Ripoche, D., Kaniewski, B., Martel, S. et al. (2012) Tif1 γ suppresses murine pancreatic tumoral transformation by a Smad4-independent pathway. *Am. J. Pathol.*, doi:10.1016/j.ajpath.2012.02.006
- 20 Shi, Y., Wang, Y. F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J. and Pavletich, N. P. (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- β signaling. *Cell* **94**, 585–594
- 21 Denrler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. and Gauthier, J. M. (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* **17**, 3091–3100

- 22 Song, C. Z., Siok, T. E. and Gelehrter, T. D. (1998) Smad4/DPC4 and Smad3 mediate transforming growth factor- β (TGF- β) signaling through direct binding to a novel TGF- β -responsive element in the human plasminogen activator inhibitor-1 promoter. *J. Biol. Chem.* **273**, 29287–29290
- 23 Fu, Y., Ishii, K. K., Munakata, Y., Saitoh, T., Kaku, M. and Sasaki, T. (2002) Regulation of tumor necrosis factor α promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J. Virol.* **76**, 5395–5403
- 24 Han, S. S., Yun, H., Son, D. J., Tompkins, V. S., Peng, L., Chung, S. T., Kim, J. S., Park, E. S. and Janz, S. (2010) NF- κ B/STAT3/PI3K signaling crosstalk in iMyc^{Flu} B lymphoma. *Mol. Cancer* **9**, 97
- 25 Garcia-Montero, A. C., Vasseur, S., Giono, L. E., Canepa, E., Moreno, S., Dagorn, J. C. and Iovanna, J. L. (2001) Transforming growth factor β -1 enhances Smad transcriptional activity through activation of p8 gene expression. *Biochem. J.* **357**, 249–253
- 26 Malicet, C., Lesavre, N., Vasseur, S. and Iovanna, J. L. (2003) p8 inhibits the growth of human pancreatic cancer cells and its expression is induced through pathways involved in growth inhibition and repressed by factors promoting cell growth. *Mol. Cancer* **2**, 37
- 27 Zawel, L., Dai, J. L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Kern, S. E. (1998) Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol. Cell* **1**, 611–617
- 28 Vasseur, S., Hoffmeister, A., Garcia, S., Bagnis, C., Dagorn, J. C. and Iovanna, J. L. (2002) p8 is critical for tumour development induced by rasV12 mutated protein and E1A oncogene. *EMBO Rep.* **3**, 165–170
- 29 Mohammad, H. P., Seachrist, D. D., Quirk, C. C. and Nilson, J. H. (2004) Reexpression of p8 contributes to tumorigenic properties of pituitary cells and appears in a subset of prolactinomas in transgenic mice that hypersecrete luteinizing hormone. *Mol. Endocrinol.* **18**, 2583–2593
- 30 Sandi, M. J., Hamidi, T., Malicet, C., Cano, C., Loncle, C., Pierres, A., Dagorn, J. C. and Iovanna, J. L. (2011) p8 expression controls pancreatic cancer cell migration, invasion, adhesion and tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.* **226**, 3442–3451
- 31 Ito, Y., Yoshida, H., Motoo, Y., Iovanna, J. L., Tomoda, C., Uruno, T., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Matsuzuka, F. et al. (2005) Expression of p8 protein in medullary thyroid carcinoma. *Anticancer Res.* **25**, 3419–3423
- 32 Su, S. B., Motoo, Y., Iovanna, J. L., Xie, M. J., Mouri, H., Ohtsubo, K., Yamaguchi, Y., Watanabe, H., Okai, T., Matsubara, F. and Sawabu, N. (2001) Expression of p8 in human pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**, 309–313
- 33 Su, S. B., Motoo, Y., Iovanna, J. L., Berthezene, P., Xie, M. J., Mouri, H., Ohtsubo, K., Matsubara, F. and Sawabu, N. (2001) Overexpression of p8 is inversely correlated with apoptosis in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1320–1324
- 34 Ito, Y., Yoshida, H., Motoo, Y., Iovanna, J. L., Nakamura, Y., Kakudo, K., Uruno, T., Takamura, Y., Miya, A., Noguchi, S. et al. (2005) Expression of p8 protein in breast carcinoma; an inverse relationship with apoptosis. *Anticancer Res.* **25**, 833–837
- 35 Giroux, V. (2006) p8 is a new target of gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **12**, 235–241
- 36 Ree, A. H., Tvermyr, M., Engebraaten, O., Rooman, M., Rosok, O., Hovig, E., Meza-Zepeda, L. A., Bruland, O. S. and Fodstad, O. (1999) Expression of a novel factor in human breast cancer cells with metastatic potential. *Cancer Res.* **59**, 4675–4680
- 37 Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H. and Kern, S. E. (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* **271**, 350–353
- 38 Heldin, C.-H., Landström, M. and Moustakas, A. (2009) Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 166–176

SUPPLEMENTARY ONLINE DATA

The human *NUPR1/P8* gene is transcriptionally activated by transforming growth factor β via the SMAD signalling pathway

Roxane M. POMMIER*^{†‡§||}1, Johann GOUT*^{†‡§||}1, David F. VINCENT*^{†‡§||}, Carla E. CANO¶, Bastien KANIEWSKI*^{†‡§||}, Sylvie MARTEL*^{†‡§||}, Jonathan RODRIGUEZ*^{†‡§||}, Geneviève FOUREL*^{†‡§||}, Ulrich VALCOURT*^{†‡§||}, Julien C. MARIE*^{†‡§||}, Juan L. IOVANNA¶ and Laurent BARTHOLIN*^{†‡§||}2

*Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France, †CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France, ‡Université de Lyon, F-69000 Lyon, France, §Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France, ||Centre Léon Bérard, F-69000 Lyon, France, and ¶Inserm U624, Stress Cellulaire, Parc Scientifique et Technologique de Luminy, F-13228 cedex 09 Marseille, France

Table S1 Primer sequences used for qRT-PCR, EMSA experiments and ChIP assay

Fw, forward; Rev, reverse.

(a) RT-qPCR

Oligonucleotide	Sequence
Human <i>NUPR1</i> Fw	5'-GGTCGCACCAAGAGAGAAGC-3'
Human <i>NUPR1</i> Rev	5'-CTCCGCAGTCCCCTCTCTAT-3'
Human <i>SMAD4</i> Fw	5'-GTGGAATAGCTCCAGCTATC-3'
Human <i>SMAD4</i> Rev	5'-CGGCATGGTATGAAGTACTCC-3'
Human <i>GAPDH</i> Fw	5'-CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT-3'
Human <i>GAPDH</i> Rev	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'
Human <i>HPRT</i> Fw	5'-GAGGGAGAAAAATGCCGAGTG-3'
Human <i>HPRT</i> Rev	5'-CTCCGAAAGCAGTGAGGTAAG-3'
Murine <i>Gapdh</i> Fw	5'-CCCAGCAAGGACACTGAGCAAGAG-3'
Murine <i>Gapdh</i> Rev	5'-CTAGGCCCTCTCTGTTATTATGGGG-3'
Murine <i>Nupr1</i> Fw	5'-CCCTTCCCAGCAACCTCTAAA-3'
Murine <i>Nupr1</i> Rev	5'-TCTTGGTCCGACCTTTCCGA-3'
Murine <i>Smad4</i>	Superarray primer (Qiagen)
Murine <i>Hprt</i> Fw	5'-TGACCTTGATTTATTTGCATACC-3'
Murine <i>Hprt</i> Rev	5'-CGAGCAAGACGTTCCAGTCT-3'

(b) EMSA

Oligonucleotide	Sequence
Human <i>NUPR1</i> +1 Fw	5'-CTGGTACCGACTCAGGGACCGACTCTTC-3'
Human <i>NUPR1</i> +229 Rev	5'-CTGGCTAGCCATCGTGCCTGGCTTCTT-3'

(c) ChIP assay

Oligonucleotide	Sequence
Human <i>NUPR1</i> Fw	5'-ATGACTGTGTTACTGGGCTGG-3'
Human <i>NUPR1</i> Rev	5'-GCTTGTCTTCCCTGCCTCTC-3'
Human <i>PAI1</i> Fw	5'-AGCCAGACAAGGTTGTTG-3'
Human <i>PAI1</i> Rev	5'-GACCACCTCCAGGAAAG-3'
Human β ACTIN Fw	5'-AGCCATGTACGTTGCTATCCAG-3'
Human β ACTIN Rev	5'-CTTCTCCTTAATGTCACGCACG-3'

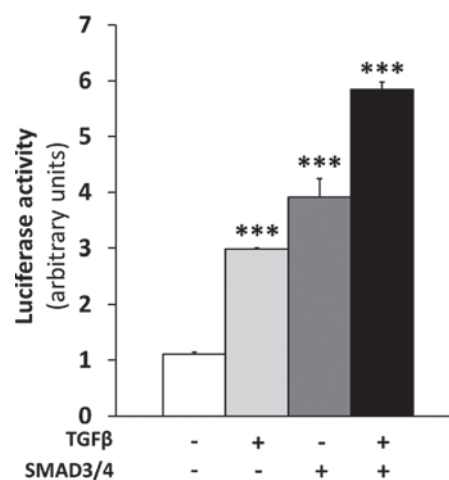


Figure S1 *NUPR1* promoter is activated by the TGF β /SMAD signalling pathway

Luciferase reporter assay in HEK-293T cells transiently transfected with the pGL3-*hNUPR1*(-2111/+229)-luc reporter plasmid with or without pcDNA3.1-SMAD3 and pcDNA3.1-SMAD4, treated or not with TGF β for 24 h.

¹ These authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed (email laurent.bartholin@lyon.unicancer.fr).

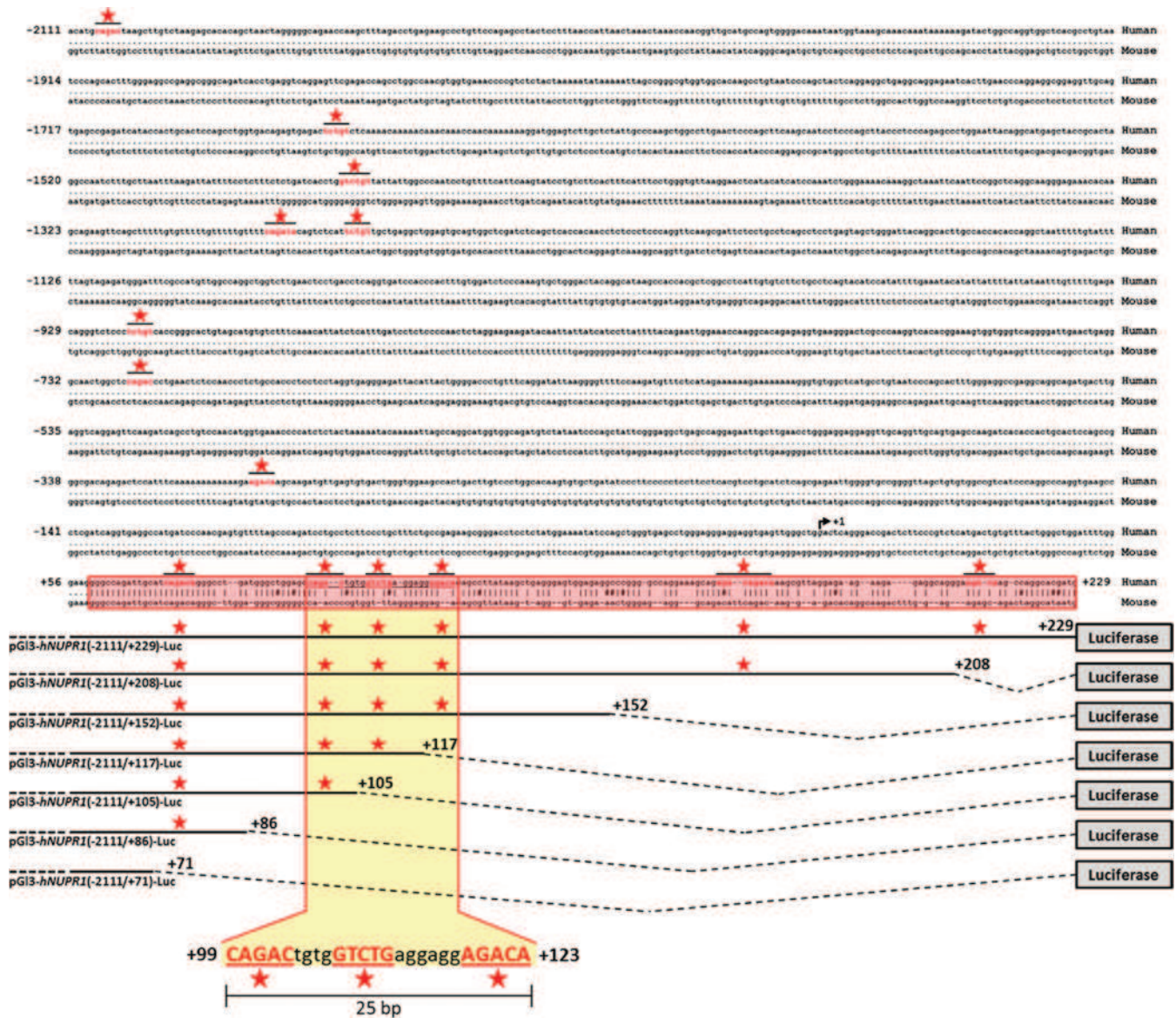


Figure S2 *In silico* analysis of the *NUPR1* promoter

Human genomic sequence of the *NUPR1* promoter located between positions – 2111 and + 229 was aligned with the corresponding murine *Nupr1* promoter region. Red bold nucleotides and red star: putative SBEs; + 1 arrow: transcription start site; red box: conserved region between human *NUPR1* and murine *Nupr1* promoter.

Received 5 March 2012/1 May 2012; accepted 1 May 2012
 Published on the Internet 27 June 2012, doi:10.1042/BJ20120368

REFERENCES

- Adrych, K., M. Smoczynski, M. Stojek, T. Sledzinski, J. Korczynska, E. Goyke, and J. Swierczynski. 2011. Coordinated increase in serum platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor- β 1 in patients with chronic pancreatitis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*. 11:434–40.
- Aguirre, A.J., N. Bardeesy, M. Sinha, L. Lopez, D. a Tuveson, J. Horner, M.S. Redston, and R. a Depinho. 2003. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development*. 17:3112–26.
- Ahmed, M.M., D. Sheldon, M. a Fruitwala, K. Venkatasubbarao, E.Y. Lee, S. Gupta, C. Wood, M. Mohiuddin, and W.E. Strodel. 2008. Downregulation of PAR-4, a pro-apoptotic gene, in pancreatic tumors harboring K-ras mutation. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 122:63–70.
- Allton, K., A.K. Jain, H.-M. Herz, W.-W. Tsai, S.Y. Jung, J. Qin, A. Bergmann, R.L. Johnson, and M.C. Barton. 2009. Trim24 targets endogenous p53 for degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:11612–6.
- Almoguera, C., D. Shibata, K. Forrester, J. Martin, N. Arnheim, and M. Perucho. 1988. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*. 53:549–54.
- Ancrile, B., K.-H. Lim, and C.M. Counter. 2007. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes & development*. 21:1714–9.
- Annes, J.P. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science*. 116:217–224.
- Ansieau, S., J. Bastid, A. Doreau, A.-P. Morel, B.P. Bouchet, C. Thomas, F. Fauvet, I. Puisieux, C. Doglioni, S. Piccinin, R. Maestro, T. Voeltzel, A. Selmi, S. Valsesia-Wittmann, C. Caron de Fromental, and A. Puisieux. 2008. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer cell*. 14:79–89.
- Archer, H., N. Jura, J. Keller, M. Jacobson, and D. Bar-Sagi. 2006. A mouse model of hereditary pancreatitis generated by transgenic expression of R122H trypsinogen. *Gastroenterology*. 131:1844–55.
- Ardito, C.M., B.M. Grüner, K.K. Takeuchi, C. Lubeseder-Martellato, N. Teichmann, P.K. Mazur, K.E. DelGiorno, E.S. Carpenter, C.J. Halbrook, J.C. Hall, D. Pal, T. Briel, A. Herner, M. Trajkovic-Arsic, B. Sipos, G.-Y. Liou, P. Storz, N.R. Murray, D.W. Threadgill, M.

Sibilia, M.K. Washington, C.L. Wilson, R.M. Schmid, E.W. Raines, H.C. Crawford, and J.T. Siveke. 2012. EGF Receptor Is Required for KRAS-Induced Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer Cell*. 22:304–317.

Ascoli, C. a, and G.G. Maul. 1991. Identification of a novel nuclear domain. *The Journal of cell biology*. 112:785–95.

Aucagne, R., N. Droin, J. Paggetti, B. Lagrange, A. Largeot, A. Hammann, A. Bataille, L. Martin, K. Yan, P. Fenaux, R. Losson, E. Solary, J. Bastie, and L. Delva. 2011. Transcription intermediary factor 1 γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *JCI*.

Bai, X., J. Kim, Z. Yang, M.J. Jurynek, T.E. Akie, J. Lee, J. LeBlanc, A. Sessa, H. Jiang, A. DiBiase, Y. Zhou, D.J. Grunwald, S. Lin, A.B. Cantor, S.H. Orkin, and L.I. Zon. 2010. TIF1 γ controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell*. 142:133–43.

Baines, A.T. 2011. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. 3:1787–1808.

Band, A.M., M. Björklund, and M. Laiho. 2009. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates transforming growth factor- β signaling by destabilizing ski and inducing Smad7. *The Journal of biological chemistry*. 284:35441–9.

Bardeesy, N., A.J. Aguirre, G.C. Chu, K.-H. Cheng, L.V. Lopez, A.F. Hezel, B. Feng, C. Brennan, R. Weissleder, U. Mahmood, D. Hanahan, M.S. Redston, L. Chin, and R. a Depinho. 2006a. Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:5947–52.

Bardeesy, N., K.-H. Cheng, J.H. Berger, G.C. Chu, J. Pahler, P. Olson, A.F. Hezel, J. Horner, G.Y. Lauwers, D. Hanahan, and R. a DePinho. 2006b. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes & development*. 20:3130–46.

Bartholin, L., F.S. Cyprian, D.F. Vincent, C.N. Garcia, S. Martel, B. Horvat, C. Berthet, S. Goddard-Leon, I. Treilleux, R. Rimokh, and J.C. Marie. 2008. Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor β signaling through the T β RI/ALK5 receptor. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*. 46:724–31.

Bartholin, L., S. Guindon, S. Martel, L. Corbo, and R. Rimokh. 2007. Identification of NF- κ B responsive elements in follistatin related gene (FLRG) promoter. *Gene*. 393:153–62.

Bartsch, D.K., M. Sina-Frey, S. Lang, A. Wild, B. Gerdes, P. Barth, R. Kress, R. Grützmann, M. Colombo-Benkmann, A. Ziegler, S. a Hahn, M. Rothmund, and H. Rieder. 2002. CDKN2A germline mutations in familial pancreatic cancer. *Annals of surgery*. 236:730–7.

Batut, J., B. Schmierer, J. Cao, L. a Raftery, C.S. Hill, and M. Howell. 2008. Two highly related regulatory subunits of PP2A exert opposite effects on TGF-beta/Activin/Nodal signalling. *Development (Cambridge, England)*. 135:2927–37.

Berlin, J.D. 2002. Phase III Study of Gemcitabine in Combination With Fluorouracil Versus Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *Journal of Clinical Oncology*. 20:3270–3275.

Blackford, A., O.K. Serrano, C.L. Wolfgang, G. Parmigiani, S. Jones, X. Zhang, D.W. Parsons, J.C.-H. Lin, R.J. Leary, J.R. Eshleman, M. Goggins, E.M. Jaffee, C. a Iacobuzio-Donahue, A. Maitra, J.L. Cameron, K. Olino, R. Schulick, J. Winter, J.M. Herman, D. Laheru, A.P. Klein, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, V.E. Velculescu, and R.H. Hruban. 2009. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 15:4674–9.

De Boeck, M., and P. Ten Dijke. 2012. Key role for ubiquitin protein modification in TGFβ signal transduction. *Upsala journal of medical sciences*. 117:153–65.

Booth, D.M., J. a Murphy, R. Mukherjee, M. Awais, J.P. Neoptolemos, O.V. Gerasimenko, A.V. Tepikin, O.H. Petersen, R. Sutton, and D.N. Criddle. 2011. Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*. 140:2116–25.

Bosetti, C., E. Lucenteforte, D.T. Silverman, G. Petersen, P.M. Bracci, B.T. Ji, E. Negri, D. Li, H. a Risch, S.H. Olson, S. Gallinger, a B. Miller, H.B. Bueno-de-Mesquita, R. Talamini, J. Polesel, P. Ghadirian, P. a Baghurst, W. Zatonski, E. Fontham, W.R. Bamlet, E. a Holly, P. Bertuccio, Y.T. Gao, M. Hassan, H. Yu, R.C. Kurtz, M. Cotterchio, J. Su, P. Maisonneuve, E.J. Duell, P. Boffetta, and C. La Vecchia. 2011. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*.

Bourboulia, D., and W.G. Stetler-Stevenson. 2010. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Seminars in cancer biology*. 20:161–8.

Bowers, G., D. Reardon, T. Hewitt, P. Dent, R.B. Mikkelsen, K. Valerie, G. Lammering, C. Amir, and R.K. Schmidt-Ullrich. 2001. The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene*. 20:1388–97.

Browne, J.A., A.L. Pearson, R.A. Zahr, I. Niculescu-Duvaz, D.L. Baines, and M.E.C. Dockrell. 2008. TGF-beta activates ERK5 in human renal epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 373:440–4.

Budhidarmo, R., Y. Nakatani, and C.L. Day. 2012. RINGs hold the key to ubiquitin transfer. *Trends in biochemical sciences*. 37:58–65.

Burris, H.A., M.J. Moore, J. Andersen, M.R. Green, M.L. Rothenberg, M.R. Modiano, M.C. Cripps, R.K. Portenoy, A.M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Nelson, F.A. Dorr, C.D. Stephens, and D.D. Von Hoff. 1997. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 15:2403–13.

Buscemi, L., D. Ramonet, F. Klingberg, A. Formey, J. Smith-Clerc, J.-J. Meister, and B. Hinz. 2011. The single-molecule mechanics of the latent TGF- β 1 complex. *Current biology : CB*. 21:2046–54.

Caldas, C., S.A. Hahn, R.H. Hruban, A. Hahn, M.S. Redston, J. Yeo, and S.E. Kern. 1994. Detection of K- ras Mutations in the Stool of Patients with Pancreatic Adenocarcinoma and Pancreatic Ductal Hyperplasia Detection of K-ras Mutations in the Stool of Patients with Pancreatic Adenocarcinoma and Pancreatic Ductal Hyperplasia . 3568–3573.

Carrière, C., A.L. Young, J.R. Gunn, D.S. Longnecker, and M. Korc. 2009. Acute pancreatitis markedly accelerates pancreatic cancer progression in mice expressing oncogenic Kras. *Biochemical and biophysical research communications*. 382:561–5.

Carrière, C., A.L. Young, J.R. Gunn, D.S. Longnecker, and M. Korc. 2011. Acute pancreatitis accelerates initiation and progression to pancreatic cancer in mice expressing oncogenic kras in the nestin cell lineage. *PloS one*. 6:e27725.

Cartwright, T., D. a Richards, and K. a Boehm. 2008. Cancer of the pancreas: are we making progress? A review of studies in the US Oncology Research Network. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*. 15:308–13.

Cellurale, C., G. Sabio, N.J. Kennedy, M. Das, M. Barlow, P. Sandy, T. Jacks, and R.J. Davis. 2011. Requirement of c-Jun NH(2)-terminal kinase for Ras-initiated tumor formation. *Molecular and cellular biology*. 31:1565–76.

Chandra, M., S. Zang, H. Li, L.J. Zimmerman, J. Champer, A. Tsuyada, A. Chow, W. Zhou, Y. Yu, H. Gao, X. Ren, R.-J. Lin, and S.E. Wang. 2012. Nuclear translocation of type I TGF- β receptor confers a novel function in RNA processing. *Molecular and cellular biology*.

- Chang, D.Z., Y. Ma, B. Ji, Y. Liu, P. Hwu, J.L. Abbruzzese, C. Logsdon, and H. Wang. 2012. Increased CDC20 expression is associated with pancreatic ductal adenocarcinoma differentiation and progression. *Journal of hematology & oncology*. 5:15.
- Chang, E.H., M.A. Gonda, R.W. Ellis, E.M. Scolnick, and D.R. Lowy. 1982. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 79:4848–52.
- Chapnick, D. a, L. Warner, J. Bernet, T. Rao, and X. Liu. 2011. Partners in crime: the TGFβ and MAPK pathways in cancer progression. *Cell & bioscience*. 1:42.
- Chang, M.J., P. a Frenkel, Q. Lin, M. Yamada, R.J. Schwartz, E.N. Olson, P. Overbeek, M.D. Schneider, and M. Yumada. 1998. A constitutive mutation of ALK5 disrupts cardiac looping and morphogenesis in mice. *Developmental biology*. 199:72–9.
- Chaudhry, S.S., S. a Cain, A. Morgan, S.L. Dallas, C.A. Shuttleworth, and C.M. Kielty. 2007. Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFβ1. *The Journal of cell biology*. 176:355–67.
- Chen, Q., H. Chen, D. Zheng, C. Kuang, H. Fang, B. Zou, W. Zhu, G. Bu, T. Jin, Z. Wang, X. Zhang, J. Chen, L.J. Field, M. Rubart, W. Shou, and Y. Chen. 2009. Smad7 is required for the development and function of the heart. *The Journal of biological chemistry*. 284:292–300.
- Chen, Y.-G., a. Hata, R.S. Lo, D. Wotton, Y. Shi, N. Pavletich, and J. Massague. 1998. Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes & Development*. 12:2144–2152.
- Cipriano, R., C.E. Kan, J. Graham, D. Danielpour, M. Stampfer, and M.W. Jackson. 2011. TGF-beta signaling engages an ATM-CHK2-p53-independent RAS-induced senescence and prevents malignant transformation in human mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:8668–73.
- Conery, A.R., Y. Cao, E.A. Thompson, C.M. Townsend, T.C. Ko, and K. Luo. 2004. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nature cell biology*. 6:366–72.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouché, R. Guimbaud, Y. Bécouarn, A. Adenis, J.-L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardière, J. Bennouna, J.-B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Péré-Vergé, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, and M. Ducreux. 2011. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*. 364:1817–25.

Corcoran, R.B., G. Contino, V. Deshpande, A. Tzatsos, C. Conrad, C.H. Benes, D.E. Levy, J. Settleman, J. a Engelman, and N. Bardeesy. 2011. STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer research*. 71:5020–9.

Cui, Y., J. a Brosnan, A.L. Blackford, S. Sur, R.H. Hruban, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, A. Maitra, L. a Diaz, C. a Iacobuzio-Donahue, and J.R. Eshleman. 2012. Genetically defined subsets of human pancreatic cancer demonstrate unique in vitro chemosensitivity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*.

Cullinan, S., C.G. Moertel, H.S. Wieand, A.J. Schutt, J.E. Krook, J.F. Foley, B.D. Norris, C.G. Kardinal, L.K. Tschetter, and J.F. Barlow. 1990. A phase III trial on the therapy of advanced pancreatic carcinoma. Evaluations of the Mallinson regimen and combined 5-fluorouracil, doxorubicin, and cisplatin. *Cancer*. 65:2207–12.

Van Cutsem, E., H. van de Velde, P. Karasek, H. Oettle, W.L. Vervenne, a Szawlowski, P. Schoffski, S. Post, C. Verslype, H. Neumann, H. Safran, Y. Humblet, J. Perez Ruixo, Y. Ma, and D. Von Hoff. 2004. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 22:1430–8.

Dai, F., X. Lin, C. Chang, and X.-H. Feng. 2009. Nuclear export of Smad2 and Smad3 by RanBP3 facilitates termination of TGF-beta signaling. *Developmental cell*. 16:345–57.

Daly, A.C., R. a Randall, and C.S. Hill. 2008. Transforming growth factor beta-induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Molecular and cellular biology*. 28:6889–902.

DeFeo, D., M.A. Gonda, H.A. Young, E.H. Chang, D.R. Lowy, E.M. Scolnick, and R.W. Ellis. 1981. Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78:3328–32.

Deckers, M., M. van Dinther, J. Buijs, I. Que, C. Löwik, G. van der Pluijm, and P. ten Dijke. 2006. The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer research*. 66:2202–9.

Derynck, R., and Y.E. Zhang. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 425:577–84.

Descargues, P., A.K. Sil, Y. Sano, O. Korchynskiy, G. Han, P. Owens, X.-J. Wang, and M. Karin. 2008. IKKalpha is a critical coregulator of a Smad4-independent TGFbeta-Smad2/3 signaling pathway that controls keratinocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:2487–92.

- ten Dijke, P., and H.M. Arthur. 2007. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8:857–69.
- Ding, Y., J.D. Cravero, K. Adrian, and P. Grippo. 2010. Modeling Pancreatic Cancer In Vivo. 39:283–292.
- Direnzo, D., D.A. Hess, B. Damsz, J.E. Hallet, B. Marshall, C. Goswami, Y. Liu, T. Deering, R.J. Macdonald, and S.F. Konieczny. 2012. INDUCED MIST1 EXPRESSION PROMOTES REMODELING OF MOUSE PANCREATIC ACINAR CELLS. *Gastroenterology*.
- Dissin, J., L.R. Mills, D.L. Mains, O. Black, and P.D. Webster. 1975. Experimental induction of pancreatic adenocarcinoma in rats. *Journal of the National Cancer Institute*. 55:857–64.
- Dockrell, M.E.C., M.K. Phanish, and B.M. Hendry. 2009. Tgf-beta auto-induction and connective tissue growth factor expression in human renal tubule epithelial cells requires N-ras. *Nephron. Experimental nephrology*. 112:e71–9.
- Doisne, J.-M., L. Bartholin, K.-P. Yan, C.N. Garcia, N. Duarte, J.-B. Le Luduec, D.F. Vincent, F. Cyprian, B. Horvat, S. Martel, R. Rimokh, R. Losson, K. Benlagha, and J.C. Marie. 2009. iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *The Journal of experimental medicine*. 206:1365–78.
- Donninger, H., L. Hesson, M. Vos, K. Beebe, L. Gordon, D. Sidransky, J.W. Liu, T. Schlegel, S. Payne, A. Hartmann, F. Latif, and G.J. Clark. 2010. The Ras effector RASSF2 controls the PAR-4 tumor suppressor. *Molecular and cellular biology*. 30:2608–20.
- Le Douarin, B., A.L. Nielsen, J.M. Garnier, H. Ichinose, F. Jeanmougin, R. Losson, and P. Chambon. 1996. A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *The EMBO journal*. 15:6701–15.
- Le Douarin, B., C. Zechel, J.M. Garnier, Y. Lutz, L. Tora, P. Pierrat, D. Heery, H. Gronemeyer, P. Chambon, and R. Losson. 1995. The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *The EMBO journal*. 14:2020–33.
- Dupont, S., M. Inui, and S.J. Newfeld. 2012. Regulation of TGF-β signal transduction by mono- and deubiquitylation of Smads. *FEBS Letters*.
- Dupont, S., A. Mamidi, M. Cordenonsi, M. Montagner, L. Zacchigna, M. Adorno, G. Martello, M.J. Stinchfield, S. Soligo, L. Morsut, M. Inui, S. Moro, N. Modena, F. Argenton, S.J. Newfeld, and S. Piccolo. 2009. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell*. 136:123–35.

Dupont, S., L. Zacchigna, M. Cordenonsi, S. Soligo, M. Adorno, M. Rugge, and S. Piccolo. 2005. Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell*. 121:87–99.

Duronio, V. 2008. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *The Biochemical journal*. 415:333–44.

Edlund, S., S. Bu, N. Schuster, and P. Aspenstro. 2003. Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)-induced Apoptosis of Prostate Cancer Cells Involves Smad7-dependent Activation of p38 by TGF- β -activated Kinase 1 and Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 3. *Journal of Cellular Biochemistry*. 14:529–544.

Eichhorn, P.J. a, L. Rodón, A. González-Juncà, A. Dirac, M. Gili, E. Martínez-Sáez, C. Aura, I. Barba, V. Peg, A. Prat, I. Cuartas, J. Jimenez, D. García-Dorado, J. Sahuquillo, R. Bernards, J. Baselga, and J. Seoane. 2012. USP15 stabilizes TGF- β receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF- β signaling in glioblastoma. *Nature medicine*. 18:429–35.

Ellis, R.W., D. DeFeo, M.E. Furth, and E.M. Scolnick. 1982. Mouse cells contain two distinct ras gene mRNA species that can be translated into a p21 onc protein. *Molecular and cellular biology*. 2:1339–45.

Esteban, L.M., C. Vicario-abejón, A. Fernández-medarde, K. Yienger, E. Lopez, M. Malumbres, R. Mckay, J.M. Ward, A. Pellicer, P. Ferna, C. Vicario-abejo, E.V.A. Lopez, and R.O.N.M.C. Kay. 2001. Targeted Genomic Disruption of H-ras and N-ras, Individually or in Combination, Reveals the Dispensability of Both Loci for Mouse Growth and Development Targeted Genomic Disruption of H-ras and N-ras, Individually or in Combination, Reveals the Disp.

Esteva, F.J., D. Yu, M.-C. Hung, and G.N. Hortobagyi. 2010. Molecular predictors of response to trastuzumab and lapatinib in breast cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*. 7:98–107.

Feng, X.-H., and R. Derynck. 2005. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annual review of cell and developmental biology*. 21:659–93.

Fesinmeyer, M.D., M. a Austin, C.I. Li, A.J. De Roos, and D.J. Bowen. 2005. Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 14:1766–73.

Flaherty, K.T., U. Yasothan, and P. Kirkpatrick. 2011. Vemurafenib. *Nature reviews. Drug discovery*. 10:811–2.

Forrester, N. a, R.N. Patel, T. Speiseder, P. Groitl, G.G. Sedgwick, N.J. Shimwell, R.I. Seed, P.Ó. Catnaigh, C.J. McCabe, G.S. Stewart, T. Dobner, R.J. a Grand, A. Martin, and A.S. Turnell. 2011. Adenovirus E4orf3 targets Transcriptional Intermediary Factor 1 γ for proteasome-dependent degradation during infection. *Journal of virology*.

Friess, H., Y. Yamanaka, M. Büchler, M. Ebert, H.G. Beger, L.I. Gold, and M. Korc. 1993. Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology*. 105:1846–56.

Fukuda, A., S.C. Wang, J.P. Morris, A.E. Folias, A. Liou, G.E. Kim, S. Akira, K.M. Boucher, M. a Firpo, S.J. Mulvihill, and M. Hebrok. 2011. Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. *Cancer cell*. 19:441–55.

Gallagher, A.J., and W.P. Schiemann. 2007. Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer research*. 67:3752–8.

Garcea, G., A.R. Dennison, C.J. Pattenden, C.P. Neal, C.D. Sutton, and D.P. Berry. 2008. Survival following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. A systematic review of the literature. *JOP : Journal of the pancreas*. 9:99–132.

Gatza, C.E., S.Y. Oh, and G.C. Blobe. 2010. Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer. *Cellular signalling*. 22:1163–74.

Giardiello, F.M., J.D. Brensinge, A.C. Tersmette, S.N. Goodman, G.M. Petersen, S.V. Booker†, M. Cruz-Correa, and J. a. Offerhaus†. 2000. Very High Risk of Cancer in Familial Peutz-Jeghers Syndrome. *Gastroenterology*. 119:1447–1453.

Goggins, M., M. Shekher, K. Turnacioglu, M. Coggins, C.J. Yeo, R.H. Hruban, and S.E. Kern. 1998. Genetic Alterations of the Transforming Growth Factor β Receptor Genes in Pancreatic and Biliary Adenocarcinomas Advances in Brief Genetic Alterations of the Transforming Growth Factor β Receptor Genes in Pancreatic and Biliary Adenocarcinomas1. 5329–5332.

Gomes, L.R., L.F. Terra, R.A. Wailemann, L. Labriola, and M.C. Sogayar. 2012. TGF- β 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC cancer*. 12:26.

Gomis, R.R., C. Alarcón, C. Nadal, C. Van Poznak, and J. Massagué. 2006. C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer cell*. 10:203–14.

Gorelik, L., and R.A. Flavell. 2001. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nature medicine*. 7:1118–22.

Goumans, M.J., G. Valdimarsdottir, S. Itoh, F. Lebrin, J. Larsson, C. Mummery, S. Karlsson, and P. ten Dijke. 2003. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Molecular cell*. 12:817–28.

Gradwohl, G., a Dierich, M. LeMeur, and F. Guillemot. 2000. Neurogenin3 Is Required for the Development of the Four Endocrine Cell Lineages of the Pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:1607–11.

Grainger, J.R., K. a Smith, J.P. Hewitson, H.J. McSorley, Y. Harcus, K.J. Filbey, C. a M. Finney, E.J.D. Greenwood, D.P. Knox, M.S. Wilson, Y. Belkaid, A.Y. Rudensky, and R.M. Maizels. 2010. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- β pathway. *The Journal of experimental medicine*. 207:2331–41.

Grütter, M.G., and J. Luban. 2012. TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling. *Current opinion in virology*. 2:142–50.

Gu, G., J. Dubauskaite, and D. a Melton. 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development (Cambridge, England)*. 129:2447–57.

Guerra, C., M. Collado, C. Navas, A.J. Schuhmacher, I. Hernández-Porras, M. Cañamero, M. Rodriguez-Justo, M. Serrano, and M. Barbacid. 2011. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer cell*. 19:728–39.

Guerra, C., A.J. Schuhmacher, M. Cañamero, P.J. Grippo, L. Verdaguer, L. Pérez-Gallego, P. Dubus, E.P. Sandgren, and M. Barbacid. 2007. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer cell*. 11:291–302.

Di Guglielmo, G.M., C. Le Roy, A.F. Goodfellow, and J.L. Wrana. 2003. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nature cell biology*. 5:410–21.

Gui, T., Y. Sun, A. Shimokado, and Y. Muragaki. 2012. The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Journal of signal transduction*. 2012:289243.

Gukovskaya, A.S., and I. Gukovsky. 2011. Which way to die: the regulation of acinar cell death in pancreatitis by mitochondria, calcium, and reactive oxygen species. *Gastroenterology*. 140:1876–80.

Hadjantonakis, A.K., L.L. Cox, P.P. Tam, and A. Nagy. 2001. An X-linked GFP transgene reveals unexpected paternal X-chromosome activity in trophoblastic giant cells of the mouse placenta. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*. 29:133–40.

Haglund, K., and I. Dikic. 2005. Ubiquitylation and cell signaling. *The EMBO journal*. 24:3353–9.

Hanahan, D., and R. a Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646–74.

Hatakeyama, S. 2011. TRIM proteins and cancer. *Nature reviews. Cancer*. 11:792–804.

Hau, P., P. Jachimczak, and U. Bogdahn. 2009. Treatment of malignant gliomas with TGF-beta2 antisense oligonucleotides. *Expert review of anticancer therapy*. 9:1663–74.

Hau, P., P. Jachimczak, R. Schlingensiepen, F. Schulmeyer, T. Jauch, A. Steinbrecher, A. Brawanski, M. Proescholdt, J. Schlaier, J. Buchroithner, J. Pichler, G. Wurm, M. Mehdorn, R. Strege, G. Schuierer, V. Villarrubia, F. Fellner, O. Jansen, T. Straube, V. Nohria, M. Goldbrunner, M. Kunst, S. Schmaus, G. Stauder, U. Bogdahn, and K.-H. Schlingensiepen. 2007. Inhibition of TGF-beta2 with AP 12009 in recurrent malignant gliomas: from preclinical to phase I/II studies. *Oligonucleotides*. 17:201–12.

Haumaitre, C., E. Barbacci, M. Jenny, M.O. Ott, G. Gradwohl, and S. Cereghini. 2005. Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:1490–5.

Hayashida, T., and H.W. Schnaper. 2003. Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad-signaling pathways enhances TGF- β dependent responses in human mesangial cells.

He, J., X. Sun, K.-Q. Qian, X. Liu, Z. Wang, and Y. Chen. 2009. Protection of cerulein-induced pancreatic fibrosis by pancreas-specific expression of Smad7. *Biochimica et biophysica acta*. 1792:56–60.

He, W., D.C. Dorn, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. a S. Moore, and J. Massagué. 2006. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1 γ and Smad4 branches of the TGF β pathway. *Cell*. 125:929–41.

Heldin, C.-H., M. Landström, and A. Moustakas. 2009. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Current opinion in cell biology*. 21:166–76.

Herquel, B., K. Ouararhni, K. Khetchoumian, M. Ignat, M. Teletin, M. Mark, G. Béchade, A. Van Dorselaer, S. Sanglier-Cianférani, A. Hamiche, F. Cammas, I. Davidson, and R. Losson. 2011. Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form

regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:8212–7.

Hesling, C., L. Fattet, G. Teyre, D. Jury, P. Gonzalo, J. Lopez, C. Vanbelle, A.-P. Morel, G. Gillet, I. Mikaelian, and R. Rimokh. 2011. Antagonistic regulation of EMT by TIF1 γ and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO reports*. 12:665–72.

Hingorani, S.R., E.F. Petricoin, A. Maitra, V. Rajapakse, C. King, M. a Jacobetz, S. Ross, T.P. Conrads, T.D. Veenstra, B. a Hitt, Y. Kawaguchi, D. Johann, L. a Liotta, H.C. Crawford, M.E. Putt, T. Jacks, C.V.E. Wright, R.H. Hruban, A.M. Lowy, and D. a Tuveson. 2003. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer cell*. 4:437–50.

Hingorani, S.R., L. Wang, A.S. Multani, C. Combs, T.B. Deramaudt, R.H. Hruban, A.K. Rustgi, S. Chang, and D. a Tuveson. 2005. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer cell*. 7:469–83.

Hinz, S., L. Pagerols-Raluy, H.-H. Oberg, O. Ammerpohl, S. Grüssel, B. Sipos, R. Grützmann, C. Pilarsky, H. Ungefroren, H.-D. Saeger, G. Klöppel, D. Kabelitz, and H. Kalthoff. 2007. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer research*. 67:8344–50.

Hoem, D., and a Viste. 2012. Improving survival following surgery for pancreatic ductal adenocarcinoma—a ten-year experience. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 38:245–51.

Von Hoff, D.D., R.K. Ramanathan, M.J. Borad, D. a Laheru, L.S. Smith, T.E. Wood, R.L. Korn, N. Desai, V. Trieu, J.L. Iglesias, H. Zhang, P. Soon-Shiong, T. Shi, N.V. Rajeshkumar, A. Maitra, and M. Hidalgo. 2011. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 29:4548–54.

Holley, R.W., R. Armour, J.H. Baldwin, and S. Greenfield. 1983. Activity of a kidney epithelial cell growth inhibitor on lung and mammary cells. *Cell biology international reports*. 7:141–7.

Holley, R.W., P. Bhlen, R. Fava, J.H. Baldwin, G. Kleeman, and R. Armour. 1980. Purification of kidney epithelial cell growth inhibitors *Cell Biology* : 77:5989–5992.

Horiguchi, K., T. Shirakihara, A. Nakano, T. Imamura, K. Miyazono, and M. Saitoh. 2009. Role of Ras signaling in the induction of snail by transforming growth factor-beta. *The Journal of biological chemistry*. 284:245–53.

Hough, C., M. Radu, and J.J.E. Doré. 2012. Tgf-Beta induced erk phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling. *PLoS one*. 7:e42513.

Hruban, R.H., N.V. Adsay, J. Albores-Saavedra, M.R. Anver, A.V. Biankin, G.P. Boivin, E.E. Furth, T. Furukawa, A. Klein, D.S. Klimstra, G. Kloppel, G.Y. Lauwers, D.S. Longnecker, J. Luttges, A. Maitra, G.J. Offerhaus, L. Pérez-Gallego, M. Redston, and D. Tuveson. 2006. Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer research*. 66:95–106.

Hruban, R.H., N.V. Adsay, J. Albores-Saavedra, C. Compton, E.S. Garrett, S.N. Goodman, S.E. Kern, D.S. Klimstra, G. Klöppel, D.S. Longnecker, J. Lüttges, and G.J. Offerhaus. 2001. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *The American journal of surgical pathology*. 25:579–86.

Hruban, R.H., A.D.M.V. Mansfeld, G.J.A. Offerhaus, D.H.J.V. Weering, D.C. Allison, S.N. Goodman, T.W. Kensler, K.K. Bose, J.L. Cameron, and J.L. Bost. 1993. K-ras Oncogene Activation in Adenocarcinoma of the Human Pancreas A Study of 82 Carcinomas Using a Combination of Mutant-Enriched Polymerase Chain Reaction Analysis. 143:545–554.

Hruban, R.H., K. Takaori, D.S. Klimstra, N.V. Adsay, J. Albores-Saavedra, A.V. Biankin, S.A. Biankin, C. Compton, N. Fukushima, T. Furukawa, M. Goggins, Y. Kato, G. Klöppel, D.S. Longnecker, J. Lüttges, A. Maitra, G.J.A. Offerhaus, M. Shimizu, and S. Yonezawa. 2004. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *The American journal of surgical pathology*. 28:977–87.

Hu, C., S. Zhang, X. Gao, X. Gao, X. Xu, Y. Lv, Y. Zhang, Z. Zhu, C. Zhang, Q. Li, J. Wong, Y. Cui, W. Zhang, L. Ma, and C. Wang. 2012. Roles of the KRAB-associated co-repressor KAP1 S473 phosphorylation in DNA damage response. *The Journal of biological chemistry*. 287:18937–18952.

Hustinx, S.R., L.M. Leoni, C.J. Yeo, P.N. Brown, M. Goggins, S.E. Kern, R.H. Hruban, and A. Maitra. 2005. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 18:959–63.

Hwang, R.F., T. Moore, T. Arumugam, V. Ramachandran, K.D. Amos, A. Rivera, B. Ji, D.B. Evans, and C.D. Logsdon. 2008. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer research*. 68:918–26.

Iacobuzio-Donahue, C. a, B. Fu, S. Yachida, M. Luo, H. Abe, C.M. Henderson, F. Vilardell, Z. Wang, J.W. Keller, P. Banerjee, J.M. Herman, J.L. Cameron, C.J. Yeo, M.K. Halushka, J.R. Eshleman, M. Raben, A.P. Klein, R.H. Hruban, M. Hidalgo, and D. Laheru. 2009a.

DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 27:1806–13.

Iacobuzio-Donahue, C. a, B. Fu, S. Yachida, M. Luo, H. Abe, C.M. Henderson, F. Vilardell, Z. Wang, J.W. Keller, P. Banerjee, J.M. Herman, J.L. Cameron, C.J. Yeo, M.K. Halushka, J.R. Eshleman, M. Raben, A.P. Klein, R.H. Hruban, M. Hidalgo, and D. Laheru. 2009b. DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 27:1806–13.

Ijichi, H., A. Chytil, A.E. Gorska, M.E. Aakre, B. Bierie, M. Tada, D. Mohri, K. Miyabayashi, Y. Asaoka, S. Maeda, T. Ikenoue, K. Tateishi, C.V.E. Wright, K. Koike, M. Omata, and H.L. Moses. 2011. Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. 121.

Ijichi, H., A. Chytil, A.E. Gorska, M.E. Aakre, Y. Fujitani, S. Fujitani, C.V.E. Wright, and H.L. Moses. 2006. Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor- β signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes & Development*. 3147–3160.

Ikushima, H., and K. Miyazono. 2010a. Cellular context-dependent “colors” of transforming growth factor-beta signaling. *Cancer science*. 101:306–12.

Ikushima, H., and K. Miyazono. 2010b. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nature reviews. Cancer*. 10:415–24.

Inman, G.J., F.J. Nicola, and C.S. Hill. 2002a. Nucleocytoplasmic Shuttling of Smads 2 , 3 , and 4 Permits Sensing of TGF- β Receptor Activity. 10:283–294.

Inman, G.J., F.J. Nicolás, J.F. Callahan, J.D. Harling, L.M. Gaster, A.D. Reith, N.J. Laping, and C.S. Hill. 2002b. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology*. 62:65–74.

Inoue, Y., and T. Imamura. 2008. Regulation of TGF- β family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Science*. 99:2107–2112.

Izeradjene, K., C. Combs, M. Best, A. Gopinathan, A. Wagner, W.M. Grady, C.-X. Deng, R.H. Hruban, N.V. Adsay, D. a Tuveson, and S.R. Hingorani. 2007. Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer cell*. 11:229–43.

Jackson, E.L., N. Willis, K. Mercer, R.T. Bronson, D. Crowley, R. Montoya, T. Jacks, and D. a Tuveson. 2001. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes & development*. 15:3243–8.

Janda, E., K. Lehmann, I. Killisch, M. Jechlinger, M. Herzig, J. Downward, H. Beug, and S. Grünert. 2002. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *The Journal of cell biology*. 156:299–313.

Jaschinski, F., T. Rothhammer, P. Jachimczak, C. Seitz, A. Schneider, and K.-H. Schlingensiepen. 2011. The antisense oligonucleotide trabedersen (AP 12009) for the targeted inhibition of TGF- β 2. *Current pharmaceutical biotechnology*. 12:2203–13.

Ji, B., L. Tsou, H. Wang, S. Gaiser, D.Z. Chang, J. Daniluk, Y. Bi, T. Grote, D.S. Longnecker, and C.D. Logsdon. 2009. Ras activity levels control the development of pancreatic diseases. *Gastroenterology*. 137:1072–82, 1082.e1–6.

Jones, S., X. Zhang, D.W. Parsons, J.C.-H. Lin, R.J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, H. Kamiyama, A. Jimeno, S.-M. Hong, B. Fu, M.-T. Lin, E.S. Calhoun, M. Kamiyama, K. Walter, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, J. Hartigan, D.R. Smith, M. Hidalgo, S.D. Leach, A.P. Klein, E.M. Jaffee, M. Goggins, A. Maitra, C. Iacobuzio-Donahue, J.R. Eshleman, S.E. Kern, R.H. Hruban, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, and K.W. Kinzler. 2008. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*. 321:1801–6.

Jonsson, J., L. Carlsson, T. Edlund, and H. Edlund. 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*. 371:606–9.

Jørgensen, M.C., J. Ahnfelt-Rønne, J. Hald, O.D. Madsen, P. Serup, and J. Hecksher-Sørensen. 2007. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocrine reviews*. 28:685–705.

Kalser, M.H., and S.S. Ellenberg. 1985. Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)*. 120:899–903.

Kanies, C.L., J.J. Smith, C. Kis, C. Schmidt, S. Levy, K.S. a Khabar, J. Morrow, N. Deane, D. a Dixon, and R.D. Beauchamp. 2008. Oncogenic Ras and transforming growth factor-beta synergistically regulate AU-rich element-containing mRNAs during epithelial to mesenchymal transition. *Molecular cancer research : MCR*. 6:1124–36.

Karnoub, A.E., and R. a Weinberg. 2008. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:517–31.

- Kastrinos, F., B. Mukherjee, N. Tayob, F. Wang, J. Sparr, V.M. Raymond, P. Bandipalliam, E.M. Stoffel, S.B. Gruber, and S. Syngal. 2009. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 302:1790–5.
- Katajisto, P., T. Vallenius, K. Vaahtomeri, N. Ekman, L. Udd, M. Tiainen, and T.P. Mäkelä. 2007. The LKB1 tumor suppressor kinase in human disease. *Biochimica et biophysica acta*. 1775:63–75.
- Kawaguchi, Y., B. Cooper, M. Gannon, M. Ray, R.J. MacDonald, and C.V.E. Wright. 2002. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature genetics*. 32:128–34.
- Kennedy, N.J., H.K. Sluss, S.N. Jones, D. Bar-Sagi, R. a Flavell, and R.J. Davis. 2003. Suppression of Ras-stimulated transformation by the JNK signal transduction pathway. *Genes & development*. 17:629–37.
- Kereszturi, E., and M. Sahin-Tóth. 2009. Intracellular autoactivation of human cationic trypsinogen mutants causes reduced trypsinogen secretion and acinar cell death. *The Journal of biological chemistry*. 284:33392–9.
- Khetchoumian, K., M. Teletin, M. Mark, T. Lerouge, M. Cerviño, M. Oulad-Abdelghani, P. Chambon, and R. Losson. 2004. TIF1delta, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *The Journal of biological chemistry*. 279:48329–41.
- Khetchoumian, K., M. Teletin, J. Tisserand, M. Mark, B. Herquel, M. Ignat, J. Zucman-Rossi, F. Cammas, T. Lerouge, C. Thibault, D. Metzger, P. Chambon, and R. Losson. 2007. Loss of Trim24 (Tif1alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nature genetics*. 39:1500–6.
- Kim, J., and V. Kaartinen. 2008. Generation of mice with a conditional allele for Trim33. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*. 46:329–33.
- Kim, Y.J., J.S. Hwang, Y.B. Hong, I. Bae, and Y.-S. Seong. 2012. Transforming growth factor beta receptor I inhibitor sensitizes drug-resistant pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Anticancer research*. 32:799–806.
- Kinzler, K.W., and B. Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 87:159–70.
- Klein, a. P. 2004. Prospective Risk of Pancreatic Cancer in Familial Pancreatic Cancer Kindreds. *Cancer Research*. 64:2634–2638.

Klimstra, D.S., and D.S. Longnecker. 1994. K-ras Mutations in Pancreatic Ductal Proliferative Lesions. 145:1547–1548.

Klugbauer, S., and H.M. Rabes. 1999. The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*. 18:4388–93.

Knauf, J. a, B. Ouyang, E.S. Knudsen, K. Fukasawa, G. Babcock, and J. a Fagin. 2006. Oncogenic RAS induces accelerated transition through G2/M and promotes defects in the G2 DNA damage and mitotic spindle checkpoints. *The Journal of biological chemistry*. 281:3800–9.

Koera, K., K. Nakamura, K. Nakao, J. Miyoshi, K. Toyoshima, T. Hatta, H. Otani, a Aiba, and M. Katsuki. 1997. K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene*. 15:1151–9.

Koinuma, D., M. Shinozaki, A. Komuro, K. Goto, M. Saitoh, A. Hanyu, M. Ebina, T. Nukiwa, K. Miyazawa, and T. Imamura. 2003. Arkadia ampli ® es TGF- β superfamily signalling through degradation of Smad7. 22:6458–6470.

Kojima, K., S.M. Vickers, N.V. Adsay, N.C. Jhala, H.-G. Kim, T.R. Schoeb, W.E. Grizzle, and C. a Klug. 2007. Inactivation of Smad4 accelerates Kras(G12D)-mediated pancreatic neoplasia. *Cancer research*. 67:8121–30.

Krantz, S.B., M. a Shields, S. Dangi-Garimella, E. Cheon, M.R. Barron, R.F. Hwang, M.S. Rao, P.J. Grippo, D.J. Bentrem, and H.G. Munshi. 2011. MT1-MMP cooperates with KrasG12D to promote pancreatic fibrosis through increased TGF- β signaling. *Molecular cancer research : MCR*. 1294–1304.

Kretzschmar, M., J. Doody, I. Timokhina, and J. Massagué. 1999. A mechanism of repression of TGF β / Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes & development*. 13:804–16.

Kuratomi, G., A. Komuro, K. Goto, M. Shinozaki, K. Miyazawa, K. Miyazono, and T. Imamura. 2005. NEDD4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2) negatively regulates TGF- β (transforming growth factor- β) signalling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF- β type I receptor. *The Biochemical journal*. 386:461–70.

Kusy, S., N. Gault, F. Ferri, D. Lewandowski, V. Barroca, A. Jaracz-Ros, R. Losson, and P.-H. Romeo. 2011. Adult hematopoiesis is regulated by TIF1 γ , a repressor of TAL1 and PU.1 transcriptional activity. *Cell stem cell*. 8:412–25.

De La O, J.-P., and L.C. Murtaugh. 2009. Notch and Kras in pancreatic cancer: at the crossroads of mutation, differentiation and signaling. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 8:1860–4.

Lallemand-Breitenbach, V., and H. de Thé. 2010. PML nuclear bodies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a000661.

Lamar, J.M., V. Iyer, and C.M. DiPersio. 2008. Integrin alpha3beta1 potentiates TGFbeta-mediated induction of MMP-9 in immortalized keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*. 128:575–86.

Lamouille, S., and R. Derynck. 2007. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *The Journal of cell biology*. 178:437–51.

Lampel, M., and H.F. Kern. 1977. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histology*. 373:97–117.

de Larco, J.E., and G.J. Todaro. 1978. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75:4001–5.

Lee, J., K.-T. Jang, C.-S. Ki, T. Lim, Y.S. Park, H.Y. Lim, D.-W. Choi, W.K. Kang, K. Park, and J.O. Park. 2007a. Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*. 109:1561–9.

Lee, J., J. Seo, H. Kim, J.B. Chung, and K.H. Kim. 2003. Signal transduction of cerulein-induced cytokine expression and apoptosis in pancreatic acinar cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1010:104–8.

Lee, M.K., C. Pardoux, M.C. Hall, P.S. Lee, D. Warburton, J. Qing, S.M. Smith, and R. Derynck. 2007b. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *The EMBO journal*. 26:3957–67.

Leight, J.L., M. a Wozniak, S. Chen, M.L. Lynch, and C.S. Chen. 2012. Matrix rigidity regulates a switch between TGF-β1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Molecular biology of the cell*. 23.

Lemercier, C., R.Q. To, B.J. Swanson, G.E. Lyons, and S.F. Konieczny. 1997. Mist1: a novel basic helix-loop-helix transcription factor exhibits a developmentally regulated expression pattern. *Developmental biology*. 182:101–13.

Leaf, E.B., J.A. Proper, M.J. Getz, and H.L. Moses. 1986. Transforming growth factor type beta regulation of actin mRNA. *Journal of cellular physiology*. 127:83–8.

Lesina, M., M.U. Kurkowski, K. Ludes, S. Rose-John, M. Treiber, G. Klöppel, A. Yoshimura, W. Reindl, B. Sipos, S. Akira, R.M. Schmid, and H. Algül. 2011. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer cell*. 19:456–69.

Levy, L., and C.S. Hill. 2006. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine & growth factor reviews*. 17:41–58.

Levy, L., M. Howell, D. Das, S. Harkin, V. Episkopou, and C.S. Hill. 2007. Arkadia activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation. *Molecular and cellular biology*. 27:6068–83.

Levy-Lahad, E., and E. Friedman. 2007. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *British journal of cancer*. 96:11–5.

Li, F., B. Zeng, Y. Chai, P. Cai, C. Fan, and T. Cheng. 2009. The linker region of Smad2 mediates TGF- β -dependent ERK2-induced collagen synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 386:289–293.

Li, M.O., S. Sanjabi, and R. a Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*. 25:455–71.

Lilja, H.S., E. Hyde, D.S. Longnecker, H.S. Lija, and J.D. Yager. 1977. DNA Damage and Repair in Rat Tissues following Administration of Azaserine DNA Damage and Repair in Rat Tissues following Administration of Azaserine. 3925–3931.

Lim, J.E., M.W. Chien, and C.C. Earle. 2003. Prognostic factors following curative resection for pancreatic adenocarcinoma: a population-based, linked database analysis of 396 patients. *Annals of surgery*. 237:74–85.

Lim, W., S. Olschwang, J.J. Keller, A.M. Westerman, F.H. Menko, L. a. Boardman, R.J. Scott, J. Trimbath, F.M. Giardiello, and S.B. Gruber. 2004. Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers¹ ☆. *Gastroenterology*. 126:1788–1794.

Lin, S., J. Yang, A.G. Elkahlon, A. Bandyopadhyay, L. Wang, J.E. Cornell, I.-T. Yeh, J. Agyin, G. Tomlinson, and L.-Z. Sun. 2012. Attenuation of TGF- β signaling suppresses premature senescence in a p21-dependent manner and promotes oncogenic Ras-mediated metastatic transformation in human mammary epithelial cells. *Molecular biology of the cell*. 23:1569–1581.

Lin, X., Y. Chen, A. Meng, and X. Feng. 2007. Termination of TGF- β Superfamily Signaling Through SMAD Dephosphorylation—A Functional Genomic View. *Journal of Genetics and Genomics*. 34:1–9.

Lin, X., X. Duan, Y. Liang, Y. Su, K.H. Wrighton, J. Long, M. Hu, C.M. Davis, J. Wang, F.C. Brunicardi, Y. Shi, Y. Chen, and A. Meng. 2006. PPM1A Functions as a Smad Phosphatase to Terminate TGF β Signaling. *Cell*. 915–928.

Lin, X., M. Liang, and X.H. Feng. 2000. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor- β signaling. *The Journal of biological chemistry*. 275:36818–22.

Ling, J., Y. Kang, R. Zhao, Q. Xia, D.-F. Lee, Z. Chang, J. Li, B. Peng, J.B. Fleming, H. Wang, J. Liu, I.R. Lemischka, M.-C. Hung, and P.J. Chiao. 2012. KrasG12D-induced IKK2/ β /NF- κ B activation by IL-1 α and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell*. 21:105–20.

Lipkowitz, S., and A.M. Weissman. 2011. RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nature Reviews Cancer*. 11:629–643.

Loukopoulos, P., K. Kanetaka, M. Takamura, T. Shibata, M. Sakamoto, and S. Hirohashi. 2004. Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas*. 29:193–203.

Lowe, S.W., and C.J. Sherr. 2003. Tumor suppression by Ink4a–Arf: progress and puzzles. *Current Opinion in Genetics & Development*. 13:77–83.

Lowenfels, A.B., P. Maisonneuve, G. Cavallini, R.W. Ammann, P.G. Lankisch, J.R. Andersen, E.P. Dimagno, A. Andrén-Sandberg, and L. Domellöf. 1993. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *The New England journal of medicine*. 328:1433–7.

Maitra, A., N.V. Adsay, P. Argani, C. Iacobuzio-Donahue, A. De Marzo, J.L. Cameron, C.J. Yeo, and R.H. Hruban. 2003. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 16:902–12.

Maitra, A., N. Fukushima, K. Takaori, and R.H. Hruban. 2005. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Advances in anatomic pathology*. 12:81–91.

Mani, S. a, W. Guo, M.-J. Liao, E.N. Eaton, A. Ayyanan, A.Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C.C. Zhang, M. Shipitsin, L.L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang, and R. a

Weinberg. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 133:704–15.

Mao, R., Y. Fan, Y. Mou, H. Zhang, S. Fu, and J. Yang. 2011. TAK1 lysine 158 is required for TGF- β -induced TRAF6-mediated Smad-independent IKK/NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *Cellular signalling*. 23:222–7.

Marquardt, H., M.W. Hunkapiller, L.E. Hood, and G.J. Todaro. 1984. Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor. *Science (New York, N.Y.)*. 223:1079–82.

Massagué, J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annual review of cell biology*. 6:597–641.

Massagué, J. 2008. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 134:215–30.

Matallanas, D., D. Romano, F. Al-Mulla, E. O'Neill, W. Al-Ali, P. Crespo, B. Doyle, C. Nixon, O. Sansom, M. Drosten, M. Barbacid, and W. Kolch. 2011. Mutant K-Ras activation of the proapoptotic MST2 pathway is antagonized by wild-type K-Ras. *Molecular cell*. 44:893–906.

Matsuo, Y., P.M. Campbell, R. a Brekken, B. Sung, M.M. Ouellette, J.B. Fleming, B.B. Aggarwal, C.J. Der, and S. Guha. 2009. K-Ras promotes angiogenesis mediated by immortalized human pancreatic epithelial cells through mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Molecular cancer research : MCR*. 7:799–808.

Matsuura, I., N.G. Denissova, G. Wang, D. He, J. Long, and F. Liu. 2004. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature*. 430:226–31.

Matthaei, H., R.D. Schulick, R.H. Hruban, and A. Maitra. 2011. Cystic precursors to invasive pancreatic cancer. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. 8:141–50.

Mazzon, E., D. Impellizzeri, R. Di Paola, I. Paterniti, E. Esposito, A. Cappellani, P. Bramanti, and S. Cuzzocrea. 2012. Effects of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway Inhibition on the Development of Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Mice. *Pancreas*. 00:1–11.

Medicherla, S., L. Li, J.Y. Ma, A.M. Kapoun, N.J. Gaspar, Y.-W. Liu, R. Mangadu, G. O'Young, A. a Protter, G.F. Schreiner, D.H. Wong, and L.S. Higgins. 2007. Antitumor activity of TGF-beta inhibitor is dependent on the microenvironment. *Anticancer research*. 27:4149–57.

Melisi, D., S. Ishiyama, G.M. Scwab, J.B. Fleming, Q. Xia, G. Tortora, J.L. Abbruzzese, and P.J. Chiao. 2008. LY2109761, a novel transforming growth factor beta receptor type I and

type II dual inhibitor, as a therapeutic approach to suppressing pancreatic cancer metastasis. *Molecular cancer therapeutics*. 7:829–40.

Mohammad, K.S., D. Javelaud, P.G.J. Fournier, M. Niewolna, C.R. McKenna, X.H. Peng, V. Duong, L.K. Dunn, A. Mauviel, and T. a Guise. 2011. TGF-beta-RI kinase inhibitor SD-208 reduces the development and progression of melanoma bone metastases. *Cancer research*. 71:175–84.

Monti, P., F. Marchesi, M. Reni, A. Mercalli, V. Sordi, A. Zerbi, G. Balzano, V. Di, P. Allavena, and L. Piemonti. 2004. A comprehensive in vitro characterization of pancreatic ductal carcinoma cell line biological behavior and its correlation with the structural and genetic profile. *Cytokine*. 236–247.

Moore, P.S., B. Sipos, S. Orlandini, C. Sorio, F.X. Real, N.R. Lemoine, T. Gress, C. Bassi, A. K-ras, and D.P.C. Smad. 2001. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. 798–802.

Morel, A.-P., G.W. Hinkal, C. Thomas, F. Fauvet, S. Courtois-Cox, A. Wierinckx, M. Devouassoux-Shisheboran, I. Treilleux, A. Tissier, B. Gras, J. Pourchet, I. Puisieux, G.J. Browne, D.B. Spicer, J. Lachuer, S. Ansieau, and A. Puisieux. 2012. EMT Inducers Catalyze Malignant Transformation of Mammary Epithelial Cells and Drive Tumorigenesis towards Claudin-Low Tumors in Transgenic Mice. *PLoS Genetics*. 8:e1002723.

Morel, A.-P., M. Lièvre, C. Thomas, G. Hinkal, S. Ansieau, and A. Puisieux. 2008. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS one*. 3:e2888.

Morris, J.P., S.C. Wang, and M. Hebrok. 2010. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature reviews. Cancer*. 10:683–95.

Morsut, L., K.-P. Yan, E. Enzo, M. Aragona, S.M. Soligo, O. Wendling, M. Mark, K. Khetchoumian, G. Bressan, P. Chambon, S. Dupont, R. Losson, and S. Piccolo. 2010. Negative control of Smad activity by ectodermin/Tiflgamma patterns the mammalian embryo. *Development (Cambridge, England)*. 137:2571–8.

Moustakas, A., and C.-H. Heldin. 2009. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development (Cambridge, England)*. 136:3699–714.

Mu, Y., S.K. Gudey, and M. Landström. 2011a. Non-Smad signaling pathways. *Cell and Tissue Research*. 2001:38pe–38.

Mu, Y., R. Sundar, N. Thakur, M. Ekman, S.K. Gudey, M. Yakymovych, A. Hermansson, H. Dimitriou, M.T. Bengoechea-Alonso, J. Ericsson, C.-H. Heldin, and M. Landström. 2011b.

TRAF6 ubiquitinates TGF β type I receptor to promote its cleavage and nuclear translocation in cancer. *Nature Communications*. 2:330.

Mulder, K.M., and S.L. Morris. 1992. Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 267:5029–31.

Nagano, Y., K.J. Mavrakis, K.L. Lee, T. Fujii, D. Koinuma, H. Sase, K. Yuki, K. Isogaya, M. Saitoh, T. Imamura, V. Episkopou, K. Miyazono, and K. Miyazawa. 2007. Arkadia induces degradation of SnoN and c-Ski to enhance transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry*. 282:20492–501.

Nagashio, Y., H. Ueno, M. Imamura, H. Asaumi, S. Watanabe, T. Yamaguchi, M. Taguchi, M. Tashiro, and M. Otsuki. 2004. Inhibition of transforming growth factor beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 84:1610–8.

Navas, C., I. Hernández-Porras, A.J. Schuhmacher, M. Sibilía, C. Guerra, and M. Barbacid. 2012. EGF Receptor Signaling Is Essential for K-Ras Oncogene-Driven Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 22:318–330.

Neel, N.F., T.D. Martin, J.K. Stratford, T.P. Zand, D.J. Reiner, and C.J. Der. 2011. The RalGEF-Ral Effector Signaling Network: The Road Less Traveled for Anti-Ras Drug Discovery. *Genes & cancer*. 2:275–87.

Nemunaitis, J., M. Nemunaitis, N. Senzer, P. Snitz, C. Bedell, P. Kumar, B. Pappen, P.B. Maples, D. Shawler, and H. Fakhrai. 2009. Phase II trial of Belagenpumatucel-L, a TGF-beta2 antisense gene modified allogeneic tumor vaccine in advanced non small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Cancer gene therapy*. 16:620–4.

Neuzillet, C., a Sauvanet, and P. Hammel. 2011. Prognostic factors for resectable pancreatic adenocarcinoma. *Journal of visceral surgery*. 148:e232–43.

Niu, J., C. Jiang, C. Li, L. Liu, K. Li, Z. Jian, and T. Gao. 2011. Foxp3 expression in melanoma cells as a possible mechanism of resistance to immune destruction. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 60:1109–18.

Noordhuis, M.G., R.S.N. Fehrmann, G.B. a Wisman, E.R. Nijhuis, J.J. van Zanden, P.D. Moerland, E. Ver Loren van Themaat, H.H. Volders, M. Kok, K. a ten Hoor, H. Hollema, E.G.E. de Vries, G.H. de Bock, A.G.J. van der Zee, and E. Schuurin. 2011. Involvement of the TGF-beta and beta-catenin pathways in pelvic lymph node metastasis in early-stage cervical cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 17:1317–30.

Obata, J., M. Yano, H. Mimura, T. Goto, R. Nakayama, Y. Mibu, C. Oka, and M. Kawaichi. 2001. p48 subunit of mouse PTF1 binds to RBP-Jkappa/CBF-1, the intracellular mediator of Notch signalling, and is expressed in the neural tube of early stage embryos. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 6:345–60.

Olson, S.H., and R.C. Kurtz. 2012. Epidemiology of pancreatic cancer and the role of family history. *Journal of surgical oncology*.

Oneil Machado, N. 2012. Pancreatic fistula after pancreatectomy: definitions, risk factors, preventive measures, and management-review. *International journal of surgical oncology*. 2012:602478.

Oster, M.W., R. Gray, L. Panasci, and M.C. Perry. 1986. Chemotherapy for Advanced Pancreatic Cancer. 33601.

Ozdamar, B., R. Bose, M. Barrios-Rodiles, H.-R. Wang, Y. Zhang, and J.L. Wrana. 2005. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science (New York, N.Y.)*. 307:1603–9.

Padua, D., X.H.-F. Zhang, Q. Wang, C. Nadal, W.L. Gerald, R.R. Gomis, and J. Massagué. 2008. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*. 133:66–77.

Pardali, K., and A. Moustakas. 2007. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 1775:21–62.

Pardoll, D. 2003. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annual review of immunology*. 21:807–39.

Penafuerte, C., N. Bautista-Lopez, M. Bouchentouf, E. Birman, K. Forner, and J. Galipeau. 2011. Novel TGF-beta antagonist inhibits tumor growth and angiogenesis by inducing IL-2 receptor-driven STAT1 activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 186:6933–44.

Penheiter, S.G., R.D. Singh, C.E. Repellin, M.C. Wilkes, M. Edens, P.H. Howe, R.E. Pagano, and E.B. Leof. 2010. Type II Transforming Growth Factor- β Receptor Recycling Is Dependent upon the Clathrin Adaptor Protein Dab2. 21:4009–4019.

Perlman, R., W.P. Schiemann, M.W. Brooks, H.F. Lodish, and R. a Weinberg. 2001. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nature cell biology*. 3:708–14.

- Pin, C.L., J.M. Rukstalis, C. Johnson, and S.F. Konieczny. 2001. The bHLH transcription factor *Mist1* is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *The Journal of cell biology*. 155:519–30.
- Pino, M.S., M. Shrader, C.H. Baker, F. Cognetti, H.Q. Xiong, J.L. Abbruzzese, and D.J. McConkey. 2006. Transforming growth factor alpha expression drives constitutive epidermal growth factor receptor pathway activation and sensitivity to gefitinib (Iressa) in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer research*. 66:3802–12.
- Proetzel, G., S.A. Pawlowski, M.V. Wiles, M. Yin, G.P. Boivin, P.N. Howles, J. Ding, M.W. Ferguson, and T. Doetschman. 1995. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nature genetics*. 11:409–14.
- Pruitt, K., A.S. Ulkü, K. Frantz, R.J. Rojas, V.M. Muniz-Medina, V.M. Rangnekar, C.J. Der, and J.M. Shields. 2005. Ras-mediated loss of the pro-apoptotic response protein Par-4 is mediated by DNA hypermethylation through Raf-independent and Raf-dependent signaling cascades in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 280:23363–70.
- Puisieux, a, S. Valsesia-Wittmann, and S. Ansieau. 2006. A twist for survival and cancer progression. *British journal of cancer*. 94:13–7.
- Pylyayeva-gupta, Y., E. Grabocka, and D. Bar-sagi. 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer*. 11:761–774.
- Pérez-Mancera, P. a, C. Guerra, M. Barbacid, and D. a Tuveson. 2012. What We Have Learned About Pancreatic Cancer from Mouse Models. *Gastroenterology*. 1–14.
- Ramesh, S., G.M. Wildey, and P.H. Howe. 2009. Transforming growth factor beta (TGFbeta)-induced apoptosis: the rise & fall of Bim. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 8:11–7.
- Ransom, D.G., N. Bahary, K. Niss, D. Traver, C. Burns, N.S. Trede, N. Paffett-Lugassy, W.J. Saganic, C.A. Lim, C. Hersey, Y. Zhou, B. a Barut, S. Lin, P.D. Kingsley, J. Palis, S.H. Orkin, and L.I. Zon. 2004. The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS biology*. 2:E237.
- Recavarren, C., D.M. Labow, J. Liang, L. Zhang, M. Wong, H. Zhu, J. Wang, F. Francis, and R. Xu. 2011. Histologic characteristics of pancreatic intraepithelial neoplasia associated with different pancreatic lesions. *Human pathology*. 42:18–24.
- Reynisdottir, I., K. Polyak, a Iavarone, and J. Massague. 1995. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes & Development*. 9:1831–1845.

Riall, T.S., J.L. Cameron, K.D. Lillemoe, J.M. Winter, K. a Campbell, R.H. Hruban, D. Chang, and C.J. Yeo. 2006. Resected periampullary adenocarcinoma: 5-year survivors and their 6- to 10-year follow-up. *Surgery*. 140:764–72.

Richter, A.M., G.P. Pfeifer, and R.H. Dammann. 2009. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochimica et biophysica acta*. 1796:114–28.

Rivera, J.A., F. Graeme-Cook, J. Werner, K. Z'graggen, A.K. Rustgi, D.W. Rattner, A.L. Warshaw, and C. Fernández-del Castillo. 1997. A rat model of pancreatic ductal adenocarcinoma: targeting chemical carcinogens. *Surgery*. 122:82–90.

Roberts, A.B., M.A. Anzano, C.A. Meyers, J. Wideman, R. Blacher, Y.C. Pan, S. Stein, S.R. Lehrman, J.M. Smith, and L.C. Lamb. 1983. Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney. *Biochemistry*. 22:5692–8.

Roberts, A.B., M.B. Sporn, R.K. Assoian, J.M. Smith, N.S. Roche, L.M. Wakefield, U.I. Heine, L.A. Liotta, V. Falanga, and J.H. Kehrl. 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83:4167–71.

Roberts, A.B., F. Tian, S.D. Byfield, C. Stuelten, A. Ooshima, S. Saika, and K.C. Flanders. 2006. Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine & growth factor reviews*. 17:19–27.

Rose, S.D., G.H. Swift, M.J. Peyton, R.E. Hammer, and R.J. MacDonald. 2001. The role of PTF1-P48 in pancreatic acinar gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 276:44018–26.

Rosendahl, J., H. Bödeker, J. Mössner, and N. Teich. 2007. Hereditary chronic pancreatitis. *Orphanet journal of rare diseases*. 2:1.

Ross, S., and C.S. Hill. 2008. How the Smads regulate transcription. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 40:383–408.

Rowland-goldsmith, M.A., H. Maruyama, K. Matsuda, T. Idezawa, M. Ralli, S. Ralli, and M. Korc. 2002. Soluble Type II Transforming Growth Factor- β Receptor Attenuates Expression of Metastasis-associated Genes and Suppresses Pancreatic Cancer Cell Metastasis 1 Soluble Type II Transforming Growth Factor- β Receptor Attenuates Expression of Metastasis-assoc. 161–167.

Rukstalis, J.M., and J.F. Habener. 2009. Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. *Islets*. 1:177–84.

- Runyan, C.E., T. Hayashida, S. Hubchak, J.F. Curley, and H.W. Schnaper. 2009. Role of SARA (SMAD anchor for receptor activation) in maintenance of epithelial cell phenotype. *The Journal of biological chemistry*. 284:25181–9.
- Réjiba, S., S. Wack, M. Aprahamian, and A. Hajri. 2007. K-ras oncogene silencing strategy reduces tumor growth and enhances gemcitabine chemotherapy efficacy for pancreatic cancer treatment. *Cancer science*. 98:1128–36.
- Safina, a, E. Vandette, and a V. Bakin. 2007. ALK5 promotes tumor angiogenesis by upregulating matrix metalloproteinase-9 in tumor cells. *Oncogene*. 26:2407–22.
- Samuel, I., M.A. Yorek, A. Zaheer, and R.A. Fisher. 2006a. Bile-pancreatic juice exclusion promotes Akt/NF-kappaB activation and chemokine production in ligation-induced acute pancreatitis. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 10:950–9.
- Samuel, I., A. Zaheer, and R.A. Fisher. 2006b. In vitro evidence for role of ERK, p38, and JNK in exocrine pancreatic cytokine production. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 10:1376–83.
- Sanford, L.P., I. Ormsby, A.C.G. Groot, H. Sariola, R. Friedman, G.P. Boivin, E.L. Cardell, and T. Doetschman. 1997. β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non- TGF β β knockout phenotypes overlapping with other TGF β . 2670:2659–2670.
- Schlingensiepen, K.-H., R. Schlingensiepen, A. Steinbrecher, P. Hau, U. Bogdahn, B. Fischer-Blass, and P. Jachimczak. 2006. Targeted tumor therapy with the TGF-beta 2 antisense compound AP 12009. *Cytokine & growth factor reviews*. 17:129–39.
- Schmierer, B., and C.S. Hill. 2007. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8:970–82.
- Schniewind, B., S. Groth, S. Sebens Mürköster, B. Sipos, H. Schäfer, H. Kalthoff, F. Fändrich, and H. Ungefroren. 2007. Dissecting the role of TGF-beta type I receptor/ALK5 in pancreatic ductal adenocarcinoma: Smad activation is crucial for both the tumor suppressive and prometastatic function. *Oncogene*. 26:4850–62.
- Schubbert, S., K. Shannon, and G. Bollag. 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature reviews. Cancer*. 7:295–308.
- Segawa, S., D. Goto, Y. Yoshiga, M. Sugihara, T. Hayashi, Y. Chino, I. Matsumoto, S. Ito, and T. Sumida. 2010. Inhibition of transforming growth factor-beta signalling attenuates interleukin (IL)-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease in mice. *Clinical and experimental immunology*. 160:394–402.

Shi, W., C. Sun, B. He, W. Xiong, X. Shi, D. Yao, and X. Cao. 2004. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *The Journal of cell biology*. 164:291–300.

Shih, W.-L., M.-H. Liao, P.-Y. Lin, C.-I. Chang, H.-L. Cheng, F.-L. Yu, and J.-W. Lee. 2010. PI 3-kinase/Akt and STAT3 are required for the prevention of TGF-beta-induced Hep3B cell apoptosis by autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase. *Cancer letters*. 290:223–37.

Shim, J.-H., C. Xiao, A.E. Paschal, S.T. Bailey, P. Rao, M.S. Hayden, K.-Y. Lee, C. Bussey, M. Steckel, N. Tanaka, G. Yamada, S. Akira, K. Matsumoto, and S. Ghosh. 2005. TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes & development*. 19:2668–81.

Shimizu, K., M. Goldfarb, Y. Suard, M. Perucho, Y. Li, T. Kamata, J. Feramisco, E. Stavnezer, J. Fogh, and M.H. Wigler. 1983. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80:2112–6.

Shrestha-Bhattarai, T., and V.M. Rangnekar. 2010. Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular Par-4. *Oncogene*. 29:3873–3880.

Siegel, P.M., W. Shu, R.D. Cardiff, W.J. Muller, J. Massague, and J. Massagué. 2003. Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:8430–5.

Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal. 2012. *Cancer Statistics*, 2012.

Sipos, B., S. Frank, T. Gress, S. Hahn, and G. Klöppel. 2009. Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated. *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*. 9:45–54.

Sipos, B., S. Möser, and H. Kalthoff. 2003. A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Archiv*. 444–452.

Smit, V.T., A.J. Boot, A.M. Smits, G.J. Fleuren, C.J. Cornelisse, and J.L. Bos. 1988. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic acids research*. 16:7773–82.

Smith, A.L., T.P. Robin, and H.L. Ford. 2012. Molecular Pathways: Targeting the TGF-β Pathway for Cancer Therapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*.

- Solar, M., C. Cardalda, I. Houbracken, M. Martín, M.A. Maestro, N. De Medts, X. Xu, V. Grau, H. Heimberg, L. Bouwens, and J. Ferrer. 2009. Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Developmental cell*. 17:849–60.
- Sommers, S.C., S.A. Murphy, and S. Warren. 1954. Pancreatic duct hyperplasia and cancer. *Gastroenterology*. 27:629–40.
- Sorrentino, A., N. Thakur, S. Grimsby, A. Marcusson, V. von Bulow, N. Schuster, S. Zhang, C.-H. Heldin, and M. Landström. 2008. The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nature cell biology*. 10:1199–207.
- Steinle, A.U., H. Weidenbach, M. Wagner, G. Adler, and R.M. Schmid. 1999. NF-B/Rel Activation in Cerulein Pancreatitis. *Gastroenterology*. 420–430.
- Stoffers, D.A., N.T. Zinkin, V. Stanojevic, W.L. Clarke, and J.F. Habener. 1997. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nature genetics*. 15:106–10.
- Stuelten, C.H., S. DaCosta Byfield, P.R. Arany, T.S. Karpova, W.G. Stetler-Stevenson, and A.B. Roberts. 2005. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. *Journal of cell science*. 118:2143–53.
- Su, Y., L. Zhang, X. Gao, F. Meng, J. Wen, H. Zhou, A. Meng, and Y.-G. Chen. 2007. The evolutionally conserved activity of Dapper2 in antagonizing TGF-beta signaling. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 21:682–90.
- Szmola, R., and M. Sahin-Tóth. 2010. Pancreatitis-associated chymotrypsinogen C (CTRC) mutant elicits endoplasmic reticulum stress in pancreatic acinar cells. *Gut*. 59:365–72.
- Sánchez-Capelo, A. 2005. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine & growth factor reviews*. 16:15–34.
- Targoff, I.N., G. Mamyrova, E.P. Trieu, O. Perurena, B. Koneru, T.P. O’Hanlon, F.W. Miller, and L.G. Rider. 2006. A novel autoantibody to a 155-kd protein is associated with dermatomyositis. *Arthritis and rheumatism*. 54:3682–9.
- Tascilar, M., H.G. Skinner, C. Rosty, T. Sohn, R.E. Wilentz, G.J.A. Offerhaus, V. Adsay, A. Ross, J.L. Cameron, S.E. Kern, C.J. Yeo, R.H. Hruban, and M. Goggins. 2001. The SMAD4 Protein and Prognosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma The SMAD4 Protein and Prognosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. 4115–4121.

Thiery, J.P., H. Acloque, R.Y.J. Huang, and M.A. Nieto. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139:871–90.

Thuault, S., U. Valcourt, M. Petersen, C. Heldin, and A. Moustakas. 2006. Transforming growth factor- β employs HMGA2 to elicit epithelial–mesenchymal transition. *JCB*. 174:175–183.

Toubaji, A., M. Achta, M. Provenzano, V.E. Herrin, R. Behrens, M. Hamilton, S. Bernstein, D. Venzon, B. Gause, F. Marincola, and S.N. Khleif. 2008. Pilot study of mutant ras peptide-based vaccine as an adjuvant treatment in pancreatic and colorectal cancers. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 57:1413–20.

Tramacere, I., L. Scotti, M. Jenab, V. Bagnardi, R. Bellocco, M. Rota, G. Corrao, F. Bravi, P. Boffetta, and C. La Vecchia. 2010. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 126:1474–86.

Tran, P.T., E.H. Shroff, T.F. Burns, S. Thiyagarajan, S.T. Das, T. Zabuawala, J. Chen, Y.-J. Cho, R. Luong, P. Tamayo, T. Salih, K. Aziz, S.J. Adam, S. Vicent, C.H. Nielsen, N. Withofs, A. Sweet-Cordero, S.S. Gambhir, C.M. Rudin, and D.W. Felsher. 2012. Twist1 Suppresses Senescence Programs and Thereby Accelerates and Maintains Mutant Kras-Induced Lung Tumorigenesis. *PLoS Genetics*. 8:e1002650.

Trouilloud, I., O. Dubreuil, T. Boussaha, C. Lepère, B. Landi, A. Zaanani, J.-B. Bachet, and J. Taieb. 2011. Medical treatment of pancreatic cancer: new hopes after 10 years of gemcitabine. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 35:364–74.

Tsai, W.-W., Z. Wang, T.T. Yiu, K.C. Akdemir, W. Xia, S. Winter, C.-Y. Tsai, X. Shi, D. Schwarzer, W. Plunkett, B. Aronow, O. Gozani, W. Fischle, M.-C. Hung, D.J. Patel, and M.C. Barton. 2010. TRIM24 links a non-canonical histone signature to breast cancer. *Nature*. 468:927–32.

Tsubaki, M., Y. Yamazoe, M. Yanae, T. Satou, T. Itoh, J. Kaneko, Y. Kidera, K. Moriyama, and S. Nishida. 2011. Blockade of the Ras/MEK/ERK and Ras/PI3K/Akt pathways by statins reduces the expression of bFGF, HGF, and TGF- β as angiogenic factors in mouse osteosarcoma. *Cytokine*. 54:100–7.

Turati, F., C. Galeone, V. Edefonti, M. Ferraroni, P. Lagiou, C. La Vecchia, and a Tavani. 2012. A meta-analysis of coffee consumption and pancreatic cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 23:311–8.

Tuveson, D. a, A.T. Shaw, N.A. Willis, D.P. Silver, E.L. Jackson, S. Chang, K.L. Mercer, R. Grochow, H. Hock, D. Crowley, S.R. Hingorani, T. Zaks, C. King, M.A. Jacobetz, L. Wang, R.T. Bronson, S.H. Orkin, R.A. DePinho, and T. Jacks. 2004. Endogenous oncogenic K-

ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer cell*. 5:375–87.

Valcourt, U., M. Kowanetz, H. Niimi, and C. Heldin. 2005. TGF- β and the Smad Signaling Pathway Support Transcriptomic Reprogramming during Epithelial- Mesenchymal Cell Transition. *Molecular Biology of the Cell*. 16:1987–2002.

Venturini, L., J. You, M. Stadler, R. Galien, V. Lallemand, M.H. Koken, M.G. Mattei, a Ganser, P. Chambon, R. Losson, and H. de Thé. 1999. TIF1 γ , a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene*. 18:1209–17.

Viloria-Petit, A.M., L. David, J.Y. Jia, T. Erdemir, A.L. Bane, D. Pinnaduwege, L. Roncari, M. Narimatsu, R. Bose, J. Moffat, J.W. Wong, R.S. Kerbel, F.P. O'Malley, I.L. Andrusis, and J.L. Wrana. 2009. A role for the TGF β -Par6 polarity pathway in breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:14028–33.

Vincent, D.F., J. Gout, N. Chuvin, V. Arfi, R.M. Pommier, P. Bertolino, N. Jonckheere, D. Ripoche, B. Kaniewski, S. Martel, J.-B. Langlois, S. Goddard-Léon, A. Colombe, M. Janier, I. Van Seuning, R. Losson, U. Valcourt, I. Treilleux, P. Dubus, N. Bardeesy, and L. Bartholin. 2012. Tif1 γ Suppresses Murine Pancreatic Tumoral Transformation by a Smad4-Independent Pathway. *American Journal of Pathology*.

Vincent, D.F., B. Kaniewski, S.E. Powers, C. Havenar-daughton, J.C. Marie, D. Wotton, and L. Bartholin. 2010. Rapid Strategy to Detect the Recombined Allele in LSL-TbRI CA Transgenic Mice. *Genesis*. 562:559–562.

Vincent, D.F., K.-P. Yan, I. Treilleux, F. Gay, V. Arfi, B. Kaniewsky, J.C. Marie, F. Lepinasse, S. Martel, S. Goddard-Leon, J.L. Iovanna, P. Dubus, S. Garcia, A. Puisieux, R. Rimokh, N. Bardeesy, J.-Y. Scoazec, R. Losson, and L. Bartholin. 2009a. Inactivation of TIF1 γ cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS genetics*. 5:e1000575.

Vincent, T., E.P. a Neve, J.R. Johnson, A. Kukalev, F. Rojo, J. Albanell, K. Pietras, I. Virtanen, L. Philipson, P.L. Leopold, R.G. Crystal, A.G. de Herreros, A. Moustakas, R.F. Pettersson, and J. Fuxe. 2009b. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nature cell biology*. 11:943–50.

Vink, E.I., M. a Yondola, K. Wu, and P. Hearing. 2012. Adenovirus E4-ORF3-dependent relocalization of TIF1 α and TIF1 γ relies on access to the Coiled-Coil motif. *Virology*. 422:317–25.

- Várady, G., B. Sarkadi, and K. Fátýol. 2011. TTRAP is a novel component of the non-canonical TRAF6-TAK1 TGF- β signaling pathway. *PloS one*. 6:e25548.
- Wang, G., C. Jin, Y. Hou, L. Zhang, S. Li, L. Zhang, B. Wu, Q. Li, C. Xu, Y. Tian, and L. Zhang. 2012. Overexpression of Shp-2 attenuates apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes through the ERK pathway. *Experimental and molecular pathology*. 93:50–55.
- Wang, L., H.-L. Liu, Y. Li, and P. Yuan. 2011. Proteomic analysis of pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic carcinoma in rat models. *World journal of gastroenterology : WJG*. 17:1434–41.
- Watabe, T., and K. Miyazono. 2009. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell research*. 19:103–15.
- Wedén, S., M. Klemp, I.P. Gladhaug, M. Møller, J.A. Eriksen, G. Gaudernack, and T. Buanes. 2011. Long-term follow-up of patients with resected pancreatic cancer following vaccination against mutant K-ras. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 128:1120–8.
- Whitcomb, D.C. 2004. Inflammation and Cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 287:G315–9.
- Wildi, S., J. Kleeff, J. Mayerle, A. Zimmermann, E.P. Böttinger, L. Wakefield, M.W. Büchler, H. Friess, and M. Korc. 2007. Suppression of transforming growth factor beta signalling aborts caerulein induced pancreatitis and eliminates restricted stimulation at high caerulein concentrations. *Gut*. 56:685–92.
- Wilkes, M.C., H. Mitchell, S.G. Penheiter, J.J. Doré, K. Suzuki, M. Edens, D.K. Sharma, R.E. Pagano, and E.B. Leof. 2005. Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer research*. 65:10431–40.
- Williard, D.E., E. Twait, Z. Yuan, A.B. Carter, and I. Samuel. 2010. Nuclear factor kappa B-dependent gene transcription in cholecystokinin- and tumor necrosis factor-alpha-stimulated isolated acinar cells is regulated by p38 mitogen-activated protein kinase. *American journal of surgery*. 200:283–90.
- Wolfman, J.C., T. Palmby, C.J. Der, A. Wolfman, C. Hill, and N. Carolina. 2002. Cellular N-Ras Promotes Cell Survival by Downregulation of Jun N-Terminal Protein Kinase and p38 Cellular N-Ras Promotes Cell Survival by Downregulation of Jun N-Terminal Protein Kinase and p38.
- Wray, C.J., S. a. Ahmad, J.B. Matthews, and A.M. Lowy. 2005. Surgery for Pancreatic Cancer: Recent Controversies and Current Practice. *Gastroenterology*. 128:1626–1641.

- Xu, X., J. D'Hoker, G. Stangé, S. Bonn , N. De Leu, X. Xiao, M. Van de Casteele, G. Mellitzer, Z. Ling, D. Pipeleers, L. Bouwens, R. Scharfmann, G. Gradwohl, and H. Heimberg. 2008. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*. 132:197–207.
- Xu, Y., and B. Pasche. 2007. TGF- β signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Genet*. 16:1–13.
- Yamaguchi, K., K. Shirakabe, H. Shibuya, K. Irie, I. Oishi, N. Ueno, T. Taniguchi, E. Nishida, and K. Matsumoto. 1995. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science (New York, N.Y.)*. 270:2008–11.
- Yamashita, M., K. Fatyol, C. Jin, X. Wang, Z. Liu, and Y.E. Zhang. 2008. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- β . 31:918–924.
- Yang, L., and H.L. Moses. 2008. Transforming growth factor beta: tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer? *Cancer research*. 68:9107–11.
- Yang, Y., O. Dukhanina, B. Tang, M. Mamura, J.J. Letterio, J. Macgregor, S.C. Patel, S. Khozin, Z. Liu, J. Green, M.R. Anver, G. Merlino, and L.M. Wakefield. 2002. Lifetime exposure to a soluble TGF- β antagonist protects mice against. *Journal of Clinical Investigation*. 109:1533–1536.
- Yang, Y.-A., G.-M. Zhang, L. Feigenbaum, and Y.E. Zhang. 2006. Smad3 reduces susceptibility to hepatocarcinoma by sensitizing hepatocytes to apoptosis through downregulation of Bcl-2. *Cancer cell*. 9:445–57.
- Yasuda, H., K. Kataoka, H. Ichimura, M. Mitsuyoshi, T. Iida, M. Kita, and J. Imanishi. 1999. Cytokine expression and induction of acinar cell apoptosis after pancreatic duct ligation in mice. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 19:637–44.
- Yasuda, M. 2008. Fractalkine and TGF- β 1 levels reflect the severity of chronic pancreatitis in humans. *World Journal of Gastroenterology*. 14:6488.
- Yi, J.Y., I. Shin, and C.L. Arteaga. 2005. Type I Transforming Growth Factor β Receptor Binds to and Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase *. *Biochemistry*. 280:10870 –10876.
- Yokoe, T., Y. Toiyama, Y. Okugawa, K. Tanaka, M. Ohi, Y. Inoue, Y. Mohri, C. Miki, and M. Kusunoki. 2010. KAP1 is associated with peritoneal carcinomatosis in gastric cancer. *Annals of surgical oncology*. 17:821–8.

- Yoo, B.M., M. Yeo, T.Y. Oh, J.H. Choi, W.W. Kim, J.H. Kim, S.W. Cho, S.J. Kim, and K. Hahm. 2005. Amelioration of pancreatic fibrosis in mice with defective TGF-beta signaling. *Pancreas*. 30:e71–9.
- Yu, J.H., K.H. Kim, and H. Kim. 2006. Suppression of IL-1beta expression by the Jak 2 inhibitor AG490 in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Biochemical pharmacology*. 72:1555–62.
- Yu, J.H., J.W. Lim, and H. Kim. 2009. Altered gene expression in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells: pathologic mechanism of acute pancreatitis. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 13:409–16.
- Zhang, L., F. Zhou, Y. Drabsch, R. Gao, B.E. Snaar-Jagalska, C. Mickanin, H. Huang, K.-A. Sheppard, J. a Porter, C.X. Lu, and P. Ten Dijke. 2012. USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF- β type I receptor. *Nature cell biology*. 14:717–726.
- Zhang, Q., X. Yang, M. Pins, B. Javonovic, T. Kuzel, S.-J. Kim, L.V. Parijs, N.M. Greenberg, V. Liu, Y. Guo, and C. Lee. 2005. Adoptive transfer of tumor-reactive transforming growth factor-beta-insensitive CD8+ T cells: eradication of autologous mouse prostate cancer. *Cancer research*. 65:1761–9.
- Zhang, Y.E. 2009. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Research*. 19:128–39.
- Zhao, S., Y. Wang, L. Cao, M.M. Ouellette, and J.W. Freeman. 2010. Expression of oncogenic K-ras and loss of Smad4 cooperate to induce the expression of EGFR and to promote invasion of immortalized human pancreas ductal cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 127:2076–87.
- Zhou, Q., J. Brown, A. Kanarek, J. Rajagopal, and D. a Melton. 2008. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 455:627–32.
- Zhu, J., A. Feng, J. Sun, Z. Jiang, G. Zhang, K. Wang, S. Hu, and X. Qu. 2011a. Increased CD4(+) CD69(+) CD25(-) T cells in patients with hepatocellular carcinoma are associated with tumor progression. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 26:1519–26.
- Zhu, L., L. Wang, X. Wang, X. Luo, L. Yang, R. Zhang, H. Yin, D. Xie, Y. Pan, and Y. Chen. 2011b. Hepatic deletion of Smad7 in mouse leads to spontaneous liver dysfunction and aggravates alcoholic liver injury. *PloS one*. 6:e17415.