



HAL
open science

Identification de l'ActivinB comme nouvel acteur de la plasticité des cellules beta endocrines au cours de la tumorigenèse des Tumeurs NeuroEndocrines Pancréatiques

Doriane Ripoche

► **To cite this version:**

Doriane Ripoche. Identification de l'ActivinB comme nouvel acteur de la plasticité des cellules beta endocrines au cours de la tumorigenèse des Tumeurs NeuroEndocrines Pancréatiques. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10131 . tel-01223664

HAL Id: tel-01223664

<https://theses.hal.science/tel-01223664>

Submitted on 3 Nov 2015

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Présentée devant
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ECOLE DOCTORALE « Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire »

Pour l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 25 septembre 2015 par

Doriane RIPOCHE

**Identification de l'ActivinB comme nouvel acteur de la plasticité
des cellules β endocrines au cours de la tumorigenèse
des Tumeurs NeuroEndocrines Pancréatiques**

Directeur de thèse: Dr Chang Xian ZHANG

Co-Encadrant: Dr Philippe BERTOLINO

Laboratoire d'accueil: INSERM U1052 / CNRS UMR 5286

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

JURY

Pr Jérôme LAMARTINE	Président du jury
Dr Patrick COLLOMBAT	Rapporteur
Dr Célio POUPONNOT	Rapporteur
Dr Richard TOMASINI	Examineur
Dr Thomas WALTER	Examineur
Dr Philippe BERTOLINO	Co-Encadrant

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

M. le Professeur Germain GILLET

Vice-président du Conseil Scientifique

M. Alain HELLEU

Directeur Général des Services

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

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et
Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers 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. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

*« Tu ne sais jamais à quel point tu es fort
jusqu'au jour où être fort reste la seule option »*

(B. Marley)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les différents membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer mes travaux : le Pr. **Jérôme LAMARTINE**, le Dr. **Patrick COLLOMBAT**, le Dr. **Célio POUPONNOT**, le Dr. **Richard TOMASINI** et le Dr. **Thomas WALTER**.

Je remercie également le Pr. **Jérôme LAMARTINE** et le Dr. **Sabine BAILLY**, d'avoir participé à mes comités de suivi de thèse, afin d'évaluer l'avancée de mes travaux, mais également de m'apporter leurs aides et conseils.

Je remercie tous les différents collaborateurs, d'ici ou d'ailleurs, qui ont contribué à mes travaux de thèse : le Dr. **Olov ANDERSSON**, le Dr **Olli RITVOS**, les personnels des animaleries d'**ALECS-SPF** et d'**ANICAN**, la plateforme d'histologie **ANIPATH**, **Christine CARREIRA** pour la réalisation de coupes de tissus, un peu capricieux, et l'équipe du Dr **Laurent BARTHOLIN**, en particulier **David VINCENT**, **Johann GOUT** et **Roxane POMMIER**.

Je remercie également **l'équipe d'Enseignement de Génétique** de l'Université Claude Bernard, en particulier le Pr **Patrick RAVEL-CHAPUIS**, de m'avoir donné l'occasion d'enseigner l'embryologie en 2^{ème} année de Licence. Mes deux années d'enseignements resteront une très bonne expérience personnelle et professionnelle.

Je remercie enfin **la Ligue contre le Cancer et tous les donateurs** pour avoir financé ma 4^{ème} année de thèse, me permettant de finaliser mes travaux.

Une thèse nous apprend beaucoup sur le plan professionnel et scientifique. Mais, elle m'aura avant tout permis, grâce aux différentes personnes qui m'ont entourées, d'en apprendre bien plus sur moi-même, et d'en sortir grandie, avec une force et une volonté que je vais mettre à profit dans ma « nouvelle » vie.

Je veux remercier particulièrement, mon directeur de thèse, le Dr. **Chang X. ZHANG** de son accueil au sein de son équipe, il y a de ça maintenant 5 ans. Merci de m'avoir fait entrer dans cette équipe aux personnalités très différentes, avec une ambiance de travail idéale et des

collègues au top. Merci enfin d'avoir été si compréhensif, alors que j'ai du parfois faire passer ma thèse au second plan.

J'aimerais vraiment remercier du fond du cœur le Dr. **Philippe BERTOLINO**, mon co-encadrant... (hé hé pas d'HDR, pas de directeur... !). Tu as cru en moi durant toutes ces années. Tu m'as appris tellement de choses différentes sur le plan technique et scientifique.

Dès mon arrivée en Master, tu m'as rapidement fait confiance et laissée autonome, dans la gestion des manips et des souris, entre lancement des « breedings » et marquages des « slides ». Et oui, à partir de ce moment, j'ai du apprendre ton Français inimitable : mettre la membrane dans le « bucket », laisser sécher le « pellet », trouver le bon « read-out » de la manip, sans oublier celles un peu « tricky »... Et j'en passe, je pourrais écrire un lexique ! Mais le plus embêtant, c'est que c'est contagieux !!!

En fin de Master, tu m'as fait confiance pour passer le concours pour la MRT. Delà, l'aventure de la thèse a commencé. Merci pour ton enthousiasme, qui, dès la première année, m'aura permis de prendre confiance en moi et de gagner en assurance et autonomie. Tu m'as vraiment permis de trouver ma place et de m'épanouir dans l'équipe. Merci également pour ton esprit en ébullition permanente et les projets qui fusent de tous les côtés. Au début dur de tout encaisser quand on est la seule sous ta houlette. A partir de la 2^{ème} année de thèse, les choses se sont un peu compliquées de mon côté. Ta compréhension et ton soutien m'ont vraiment permis de garder pied au cours de ces dernières années assez rudes. Merci d'avoir été si compréhensif. Je pense que beaucoup de chefs le seraient bien moins. Un grand merci également pour ta présence, pour la moindre question scientifique ou pour un paquet d'Haribo ! Cette expérience de 5 ans à tes côtés m'aura faite évoluer et grandir. J'admire la passion que tu as pour ce que tu fais malgré les épreuves endurées ces derniers temps. Je suis sûre que cela portera ces fruits un jour. Je te souhaite le meilleur pour la suite. Encore un grand MERCI.

Un grand merci au Dr. **Anca HENINNO**. Nous n'avons pas pu partager de nombreuses années ensemble, mais en tout cas cette année aura été au top. Tu es quelqu'un de géniale, enthousiaste jusqu'au bout de tes chaussures loufoques et colorées... ! Tu as su redonner un coup de pep's au 5^{ème}. Je te souhaite ce qu'il y a de mieux pour la suite !

Merciiii aux **trois Rs (Rémy, Rami, Romain, Samuele)**. Que de mecs dans cette équipe... J'ai quand même survécu à vos nombreuses vanes et moqueries quotidiennes. Il en

a fallu du self-control pour ne pas prendre un Rami pour taper sur un Rémy... Je crois que grâce à vous (ou pas) je me suis endurcie ! En tout cas, je suis sûre d'une chose, je ne suis pas susceptible ! **Rémy**, particulièrement un grand merci pour tous les conseils et techniques que tu m'as apprises dès mon arrivée. Merci également pour tes coups de gueule, tes vanes pourries, tes espionnages intempestifs, tes inventions et brevets qui ne verront jamais le jour, (mais qui ont eu le mérite de nous faire rire) et pour nos délires et fous rires. Tu as grandement contribué au bon déroulement de cette thèse. Arrête de te poser trop de questions, profite, fonce et aie confiance en toi. Bonne continuation à vous les Post-Docs (plein de courage, vous en aurez besoin). Buona fortuna ! Et à notre « petit » dernier le thésard, bon courage pour la fin de thèse et surtout pour la « nouvelle » vie qui t'attend. Pas de prise de tête. Profite à fond.

Je voulais remercier également toutes les personnes qui sont passées ou viennent d'arriver dans l'équipe (**Delphine, Fouzia, Sophie et tous les stagiaires**), pour leurs aides, leurs conseils, les discussions qui remontent le moral ou encore juste les bons moments passés ensemble. Je garde en mémoire de bons souvenirs avec vous tous. **Delphine**, bon courage pour la suite. Je croise les doigts pour que ce que tu désires se réalise... Merci d'avoir été à mon écoute ces derniers temps. J'ai pu me vider la tête et reprendre confiance, grâce à toi. **Sophie**, bon courage pour ta thèse. Tu es quelqu'un de super. Continue de booster notre Rémy.

Je remercie les **autres membres de notre équipe** qui ont pu me conseiller et m'aider lors de réunion ou de simples papotages.

Un grand merci à tous **mes collègues du 5 et du 6**, passés ou présents, pour ce qui m'ont apporté sur un point scientifique ou non. Je crois que les autres étages des bâtiments du CRCL peuvent nous envier. Nous avons une ambiance et entente incomparable. Continuez cette joie de vivre et « collaboration ». J'attends les photos du prochain mardi gras !

Merci Merci Merci à mes Koupines du « Mercredi » : **Roxane, Mélanie, Lindsay, Clotilde, Charlotte, Ebti, Elodie**. Tradition que nous avons instaurée il y a de ça 5 ans déjà avec Roxane, manger entre filles pour se raconter des potins ou nos déboires de stagiaires ... Le grand bol d'air du milieu de semaine ! Ca va me manquer ! Un grand merci surtout à **Roxane et Mélanie** de m'avoir soutenue dans les épreuves que j'ai du endurer. Vous avez toujours été là, lorsque j'avais besoin de parler. Vous avez toujours su trouver les bons mots pour me remonter le moral. Je vous en remercie du fond du cœur !

Merci **ma Zine** d'être venue nous rendre visite dans notre antre lyonnaise (avec les Schoko-bons surtout). Comme à chaque fois que l'on se retrouve, c'est crise de rire, délire que nous seules pouvons comprendre... Ces petits moments passés ensembles m'ont fait « voyager dans le temps »... Tu entres dans mon « TOP 50 »... Merciiii !

Merci à **mes grandes sœurs Emmanuelle et Ingrid** d'avoir toujours été présentes pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci pour les week-ends en famille, les parties de jeux mémorables, les séjours dans la campagne de St Momo ou les massages en tant que cobaye..., Je remercie aussi **mes neveux et nièces Charline, Noémie, Clément, Pauline, Romane et Théo**, qui m'ont permis le temps d'un week-end de décompresser, de jouer avec autres choses que des pipettes et de trouver mon hymne de fin de thèse « Libérée, Délivrée... ».

Bien sûr, je remercie plus que tout **mon Papa et ma Maman**. Qu'est ce que j'aurais fait sans vous... ! Vous avez été d'un soutien immense durant ces longues années d'études. Merci pour avoir su me faire confiance et m'avoir laissée faire mes propres choix. Merci aussi d'avoir été là dans les moments difficiles au téléphone ou pour un week-end en Bourgogne. Nous y avons trouvé un petit coin de paradis, au calme, avec des bons petits plats ! Merci pour nous avoir rendu maintes et maintes services. Nous n'arriverons jamais à vous rendre la pareille autant que ce que vous nous avez apporté. Vous avez un tel courage et une telle force après toutes les épreuves que vous avez endurées l'un et l'autre. La vie ne vous a pas tous les jours gâté. Je suis tellement admirative et fière. **Papa**, merci pour ta gentillesse, malgré que l'on te taquine bien souvent. **Maman**, merci pour ton écoute, tu es une « psy » et une « dameuse » fabuleuse. Merci pour tout.

Enfin, merci à **Régis, mon petit mari**. Je t'entends d'ici : « Je vois pas pourquoi ? J'ai rien fait à part apporter des emmer... ». Et si tu as fait énormément depuis maintenant plus de 8 ans que l'on se connaît. Merci tout d'abord pour m'avoir soutenue à fond dans mes études, et m'avoir encouragée dans mes choix. Tu as été un facteur essentiel dans ma poursuite d'études. Merci de tout cœur de m'avoir suivie. Grâce à toi, j'ai pu venir à Lyon et je sais que ça a été très dur pour toi. Malheureusement, la vie sur Lyon n'a vraiment pas été facile. Les « problèmes » se sont enchaînés. Ce qui aurait pu nous séparer, nous a encore plus soudé. Merci de mener ce combat pour toi, pour nous, pour notre avenir. Le plus beau cadeau que tu puisses me faire, c'est de te battre chaque jour pour rester avec moi le plus longtemps possible, pour profiter de chaque instant et vivre encore de folles aventures. Deux ans et demi

plus tard, tu peux le dire : « Toujours vivant !!! ». Je suis extrêmement fière de toi, fière d'être ta ptite femme. Merci vraiment pour tout ce que tu es !

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	19
INDEX DES FIGURES	23
INDEX DES TABLEAUX	25
AVANT-PROPOS	27
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	29
PARTIE I : HETEROGENEITE DES TUMEURS NEUROENDOCRINES PANCREATIQUES	31
A. Caractéristiques des Tumeurs Neuroendocrines du Pancréas	33
1. Hétérogénéité cellulaire	33
i. Histologie et Différenciation cellulaire	33
ii. Taux de prolifération des cellules tumorales	35
2. Hétérogénéité fonctionnelle	35
3. Hétérogénéité hormonale	37
4. Hétérogénéité génétique et moléculaire	37
i. Syndromes héréditaires	37
ii. Caractéristiques moléculaires des TNEPs sporadiques	41
B. Modèles murins de TNEPs et Hétérogénéité tumorale	43
1. Modèle d'inhibition de p53 et pRb par expression de l'antigène grand T du virus simien 40 dans les cellules β : modèle RipTag2.	43
2. Modèle d'activation de la signalisation Shh dans les cellules β , par surexpression du facteur de transcription Gli2	45
3. Modèle murin d'inactivation du gène <i>Men1</i>	45
i. Modèles murins d'inactivation hétérozygote	45
ii. Modèles murins d'inactivation conditionnelle	46
PARTIE II : PLASTICITE DU PANCREAS ENDOCRINE	49
A. Concept général sur la plasticité cellulaire	51
1. Différenciation cellulaire au cours du développement et maintien de l'homéostasie des tissus	51
i. Cellules souches et développement	51
ii. Cellules souches chez l'adulte	51
2. Plasticité et reprogrammation cellulaire des cellules différenciées	53

B.	Plasticité des cellules pancréatiques dans le développement, l'homéostasie et les pathologies des cellules β endocrines	57
1.	Plasticité et développement du pancréas : différenciation des cellules β endocrines	57
i.	De l'induction pancréatique à l'apparition des progéniteurs multipotents	59
ii.	Compartimentation du pancréas : destinée acinaire, ductale ou endocrine	59
iii.	Différenciation des cellules β	60
2.	Maintien de l'homéostasie des cellules β : réplication ou néogenèse et plasticité cellulaire	61
i.	Place de la réplication des cellules β dans le maintien physiologique de la masse des îlots pancréatiques	61
ii.	Néogenèse et plasticité cellulaire lors de la régénération des cellules β pancréatiques	63
iii.	Réplication et néogenèse des cellules β : cas de la gestation	65
3.	Rôle de la plasticité dans les pathologies des îlots pancréatiques : cas du diabète	67
i.	Le diabète de type I	67
ii.	Le diabète de type II	67
iii.	Le diabète gestationnel	68
C.	Mécanismes et facteurs de plasticité cellulaire dans le pancréas endocrine	71
1.	Rôle essentiel des facteurs de transcription dans l'identité des cellules β endocrines	71
i.	Pdx1	71
ii.	Nkx6.1/2	72
iii.	Ngn3	72
iv.	Pax4 et Arx	73
2.	Mécanismes contrôlant l'expression des facteurs de transcription essentiels à l'identité des cellules endocrines	75
i.	Voies de signalisation impliquées lors du développement	75
ii.	Mécanismes émergents dans le contrôle de l'identité des cellules endocrines	77
PARTIE III: LA SUPER-FAMILLE TGF-β ET LE PANCREAS ENDOCRINE		87
A.	Description de la famille TGF- β	89
1.	Les différents membres de la famille	89
i.	Les ligands	89
ii.	Les récepteurs	95
iii.	Les effecteurs Smads	97
2.	Les voies de signalisation	97
i.	Voie de signalisation « canonique » : spécificité des récepteurs de type I pour les Smads	97
ii.	Voie de signalisation « canonique » : mécanisme de signalisation	99
iii.	Voie de signalisation « canonique » : réponse transcriptionnelle des Smads.	99
B.	Rôle des membres de la famille TGF- β dans le développement et la plasticité du pancréas endocrine	101

1. Expression des membres de la famille TGF- β dans les cellules endocrines pancréatiques durant le développement et chez l'adulte	101
i. Expression durant l'embryogenèse	101
ii. Expression au sein des îlots pancréatiques adultes	103
2. Rôle des membres de la famille TGF- β dans le développement embryonnaire du pancréas endocrine	105
i. Les Activins	105
ii. Les TGF- β s	107
i. Les BMPs	109
ii. Smad2/3 et leur inhibiteur Smad7	109
3. Rôle de la famille TGF- β chez l'adulte dans la morphogenèse des îlots pancréatiques	110
i. Les Activins	110
ii. L'implication des Smad2/3 et leur inhibiteur Smad7	111
4. Rôle des ligands dans la plasticité des cellules endocrines pancréatiques	113
i. Implication des ligands dans la différenciation des cellules endocrines durant l'embryogenèse	113
ii. Implication des ligands dans la plasticité des cellules endocrines matures et leur identité cellulaire	115

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE **117**

RESULTATS **119**

PARTIE I : L'EXPRESSION D'ACTIVINB DANS LES INSULINOMES *MEN1* INDUIT UNE DEDIFFERENCIATION

DES CELLULES β **121**

A. Introduction	123
B. Résultats	125
1. Publication soumise	125
2. Résultats complémentaires	171
i. Etude d'un autre modèle murin développant des insulinomes : le modèle RipTag2	171
ii. Validation de l'expression d'ActivinB au sein d'insulinomes sporadiques humains	175
C. Conclusion	175

PARTIE II : MENIN REGULE L'EXPRESSION D'*INHBB* GRACE A LA METHYLATION D'HISTONES **177**

A. Introduction	179
B. Matériels et Méthodes	181
1. Culture cellulaire	181
2. Analyse transcriptomique	181
3. RT-PCR et RT-PCR quantitative en temps réel	182
4. Test luciférase	182
5. Western Blot	183
6. Immunoprécipitation de la Chromatine (CHIP)	183

C. Résultats	185
1. L'absence de Menin dans différentes lignées cellulaires conduit à l'expression du gène <i>Inhbb</i>	185
2. Menin inhibe la transcription du gène <i>Inhbb</i> , grâce à la triméthylation H3K27 sur son promoteur	187
D. Conclusion	187
DISCUSSION	189
A. TNEPs et Plasticité Cellulaire	191
1. Modèle <i>βMen1</i>	191
2. Modèle RipTag2	193
B. ActivinB et Plasticité Cellulaire	194
1. Régulation des marqueurs de l'identité des cellules β par l'ActivinB	194
i. L'ActivinB induit une dédifférenciation des cellules β tumorales ou une perte de fonctionnalité ?	194
ii. Concordance de mes observations avec la littérature	194
iii. Marqueurs de l'identité des cellules β : cibles dépendantes ou indépendantes des Smads ?	195
2. Rôle de l'ActivinB dans la plasticité des cellules tumorales et l'émergence de TNEPs hétérogènes	196
i. Dédifférenciation cellulaire et survie	196
ii. Mécanismes d'échappement tumoral des cellules β invalidées pour Men1	197
3. L'ActivinB peut-il être impliqué dans des maladies métaboliques ?	197
C. Menin et épigénétique	198
1. Implication de Menin dans la régulation d' <i>Inhbb</i> au sein des TNEPs	198
i. Relation Menin-ActivinB dans nos modèles murins	198
ii. Expression de l'ActivinB dans des TNEPs chez l'homme	199
2. Menin et le complexe PRC2 : interactions et fonctions	199
i. Menin, nouvel acteur dans la triméthylation des marques H3K27 ?	199
ii. Interaction physique ou fonctionnelle entre Menin et PRC2 ?	201
3. Menin, un nouvel acteur de la plasticité cellulaire et épigénomique	202
PERSPECTIVES & CONCLUSION	203
A. Retombées Fondamentales	205
1. ActivinB et identité des cellules β	205
2. Menin et régulations épigénétiques	205
B. Retombées Translationnelles et Cliniques	206
1. En Cancérologie	206
2. ActivinB et maladies métaboliques	207
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	209
AUTRES PUBLICATIONS	244

ABBREVIATIONS

ACTRIIA ou B: ACTivin Receptor IIA ou B

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

AKT ou PKB : Protein Kinase B

ALK: Activin Like Kinase

AMH: Anti-Mullerian Hormone

AMHRII : Anti-Mullerian Hormone Receptor II

ARN: Acide RiboNucléique

ARNm: ARN messenger

ARX: Aristaless Related homeoboX

ATRX: Alpha Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked

BHLHE22: Basic Helix-Loop-Helix family, member E22

BMP: Bone Morphogenetic Protein

BMPRII: BMP Receptor II

c-MAF: MAF

CDK: Cyclin Dependent Kinase

ChgA : ChromograninA

CHIP : CHromatin ImmunoPrecipitation

CK19: Cytokératine 19

Co-SMAD: COmmon mediator SMAD

CS: Cellules Souches

DANs: Differential screening selected gene Abberative in Neuroblastoma

DAXX ou DAP6: Death-Associated Protein 6

DNA: DeoxyriboNucleic Acid

DNMT1: DNA (cytosine-5-)-MethylTransferase 1

EGF: Epidermal Growth Factor

EMT: Epithelial-Mesenchymal transition

EZH2: Enhancer of Zeste Homolog 2

Fc : Fragment constant

FGF: Fibroblast Growth Factor

FOXO: FOlkhead boX subgroup O

FST: FolliStaTin

FSTL: FolliStaTin-Like

GDF: Growth and Differentiation Factor

GLI2: GLIoma-associated oncogene homolog 2

GLUT2: GLUcose Transporter 2

GS: Domaine riche en Glycine-Sérine

GTPases: Guanosine TriPhosphatases

H2A/2B/3/4: Histone 2A/2A/3/4

H3K27me3: triméthylation de la lysine 27 (K27) de l'histone H3

H3K4me3: triméthylation de la lysine 4 (K4) de l'histone H3

HDAC: Histone DeACetylase

HIF1 α : Hypoxia Inducible Factor 1 α

HIT: Hamster Insulinoma Tumor cells, transformed with SV40

HOX: HomeobOX

I-SMAD: Inhibitor SMAD

ID1: Inhibitor of DNA binding 1

IFN γ : InterFeroN gamma

IL-1 β : InterLeukin 1beta

IL-6: InterLeukin 6

INHBA/B/C/E: INHibin Beta A/B/C/E

Inhbb- β Men1: modèle murin d'invalidation du gène *Inhbb* combiné au modèle *β Men1*

INS1: INSulinoma rat cells

iPS: induces Pluripotent Stem cell

LAP: Latency Associated Protein

LOH: Loss Of Heterozygosity

LOX ou LoxP: Locus Of X (cross)-over in P1 bacteriophage

MAFA ou MAFB: Musculo-Aponeurotic Fibrosarcoma oncogene homolog A ou B

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MEFs: Mouse Embryonic Fibroblasts

MEN1: Multiple Endocrine Neoplasia type I

MH1 ou 2: Mad Homology domaine 1 ou 2

MIN6: Mouse INsulinoma cell line 6, transformed with SV40

miR ou miRNA: micro RNA

MLL: Mixed Lineage Leukemia

mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

NEM1: Néoplasies Endocrines Multiples de type I

NF-1: NeuroFibromin-1

NF- κ B: Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1

NGN3: NeuroGeniN3

NICD: Notch IntraCellular Domain

NKX6.1/6.2: NK6 homeoboX 1/2

pAKT: phosphoAKT

PAX4: Paired Box 4

PcG: Polycomb Group

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDIC: Poorly Differentiated Invasive Carcinoma

PDX1: Pancreatic and Duodenal homeoboX 1

PI3K: PhosphoInositide 3 Kinase

PP: Polypeptide Pancréatique

PRC2: Polycomb Repressive Complex 2

pSMAD: phosphoSMAD ou SMAD phosphorylé

PTF1a: Pancreas specific Transcription Factor 1a

R-SMAD: Receptor-activated SMAD

RB: RetinoBlastoma 1

RE: Réticulum Endoplasmique

RIP: Rat Insulin Promoter

RipTag2: Rat insulin 2 promoter-SV40 large T antigen transgene expression

RNA: RiboNucleic Acid

ROS: Reactive Oxygen Species

RPM: Rotation Par Minute

SHH: Sonic HedgeHog

SMAD: Contraction de Sma (Small) et Mad (Mothers against decapentaplegic)

SOX6 ou 9: SRY (Sex determining Region-Y) bOX 6 ou 9

SUZ12: Supressor of zeste 12 homolog

SV40: Simian Virus 40

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

TNEPs: Tumeurs NeuroEndocrines Pancréatiques

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TP53: Tumor Protein p53

TSC1/2: Tuberous SCLerosis 1/2

T β RII: TGF β Receptor II

UTR: UnTranslated Region

VHL: Von Hippel-Lindau

VIP: Vasoactive Intestinal Peptide

α Men1: modèle murin d'invalidation conditionnelle du gène *Men1* dans les cellules α

β Men1: modèle murin d'invalidation conditionnelle du gène *Men1* dans les cellules β

β MenTag: modèle murin combinant le modèle *β Men1* et RipTag2

Nomenclature :

Les gènes sont écrits en italiques et les protéines en lettres droites (ex : *Men1* et Menin).

Pour les gènes murins, la première lettre est en majuscule et les autres en minuscules (ex : *Men1*).

Pour les gènes humains, toutes les lettres sont en majuscules (ex : *MEN1*).

Les protéines possèdent la première lettre en majuscule et les autres en minuscules (ex : Menin)

Les stades embryonnaires sont écrits E + le nombre de jour de développement de l'embryon (ex : E8,5, stade embryonnaire 8,5 jours)

INDEX DES FIGURES

FIGURE 1: HETEROGENEITES DES TNEPS	32
FIGURE 2: DIFFERENCE HISTOLOGIQUE ENTRE LES TNEPS « BIEN DIFFERENCIEES » ET « PEU DIFFERENCIEES »	32
FIGURE 3: LA PATHOLOGIE NEM1	38
FIGURE 4: MUTATIONS DU GENE MEN1 (CORBO ET AL, 2010; THAKKER, 2014)	38
FIGURE 5: PROCESSUS DE DIFFERENCIATION DES CELLULES MATURES ADULTES DURANT LE DEVELOPPEMENT SELON WADDINGTON (EGUIZABAL ET AL, 2013)	50
FIGURE 6: DIFFERENTS MECANISMES DE PLASTICITE CELLULAIRE (SUGIMOTO ET AL, 2011).....	52
FIGURE 7: DEVELOPPEMENT DU PANCREAS (SHIH ET AL, 2013)	56
FIGURE 8 : DIFFERENCIATION ET SPECIFICATION DES CELLULES PANCREATIQUES (SHIH ET AL, 2013)	58
FIGURE 9: MAINTIEN PHYSIOLOGIQUE DE L'HOMEOSTASIE DES CELLULES β ENDOCRINES PAR REPLICATION	62
FIGURE 10: PLASTICITE DES CELLULES ENDOCRINES DANS LES DIABETES DE TYPE I ET II.....	66
FIGURE 11: FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUES DANS LA DIFFERENCIATION DES CELLULES β ENDOCRINES DURANT LE DEVELOPPEMENT	70
FIGURE 12: LE GLUCOSE, NOUVEAU FACTEUR IMPLIQUE DANS LA DEDIFFERENCIATION	78
FIGURE 13: PROCESSUS DE SYNTHESE ET DE MATURATION DES miR	80
FIGURE 14: ROLE DES miR DANS LE MAINTIEN DE L'IDENTITE DES CELLULES ENDOCRINES β ET α	80
FIGURE 15: REPRESENTATION D'UN NUCLEOSOME (CUI & MIAO, 2010).....	82
FIGURE 16: REPRESENTATION DES DOMAINES BIVALENTS (WENG ET AL, 2012)	84
FIGURE 17: REPRESENTATION DES DIFFERENTS MEMBRES DE LA FAMILLE TGF- β	88
FIGURE 18 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES DIFFERENTS LIGANDS DE LA FAMILLE TGF- β	90
FIGURE 19: STRUCTURE DES RECEPTEURS DE TYPE I ET II DE LA FAMILLE TGF- β	94
FIGURE 20: REPRESENTATION CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE ENTRE LES SMADS ET LES RECEPTEURS DE TYPE I (MASSAGUE, 2000)	96

FIGURE 21 : VOIE DE SIGNALISATION « CANONIQUE » DE LA FAMILLE TGF- β	98
FIGURE 22: EXPRESSION DES LIGANDS ET RECEPTEURS DE LA FAMILLE TGF- β DANS LE PANCREAS AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE.	102
FIGURE 23: ROLES DES LIGANDS TGF- β DANS LA PLASTICITE DES CELLULES β ENDOCRINES	112
FIGURE 24: ROLE DE L'ACTIVINB DANS LA PLASTICITE DES CELLULES β TUMORALES ET L'EMERGENCE DE TUMEURS NEUROENDOCRINES HETEROGENES	124
FIGURE 25: LES LESIONS TUMORALES, DEVELOPPEES PAR LES SOURIS RIPTAG2, N'EXPRIMENT PAS L'ACTIVINB ..	170
FIGURE 26: LES PDIC, QUI SE DEVELOPPENT DANS LES SOURIS RIPTAG2 ET β MEN TAG, NE PRESENTENT PAS DE CARACTERES PANCREATIQUES, MAIS MONTRENT UNE ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION pSMAD1/5.....	172
FIGURE 27: L'ACTIVINB EST EXPRIMEE DANS DES INSULINOMES SPORADIQUES HUMAINS ET SON EXPRESSION EST CORRELEE AVEC UNE PERTE D'INSULINE.....	174
FIGURE 28: L'ABSENCE DE MENIN DANS DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES CONDUIT A L'EXPRESSION D'INHBB	184
FIGURE 29: L'EXPRESSION D'INHBB EST REGULEE PAR DES MODIFICATIONS DES MARQUES H3K27ME3 A SON PROMOTEUR, GRACE A MENIN	186
FIGURE 30: DIFFERENTS MECANISMES DE PLASTICITE CELLULAIRE CONDUISANT AU DEVELOPPEMENT DES TNEPs DANS LES MODELES MURINS β MEN1 ET RIPTAG2.....	192
FIGURE 31: HYPOTHESES D'INTERACTION DE MENIN AVEC LE COMPLEXE PRC2.....	200

INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU 1: LES DIFFERENTES TNEPS: LEURS SIGNES CLINIQUES ASSOCIES, L'HORMONE PRODUITE	34
TABLEAU 2: FREQUENCES DES GENES RETROUVES MUTES DANS LES TNEPS SPORADIQUES (ZHANG ET AL, 2013)	40
TABLEAU 3: MODELES MURINS PRESENTANT DE L'HETEROGENEITE TUMORALE DANS LES TNEPS DEVELOPPEES	44
TABLEAU 4: TABLEAU RECAPITULATIF DES DIFFERENTS RECEPTEURS DE LA FAMILLE TGF- β	94
TABLEAU 5: MODELES MURINS TRANSGENIQUES UTILISES POUR IDENTIFIER LES ROLES DES MEMBRES ACTIVINS DANS LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU PANCREAS ENDOCRINE ET LA MORPHOGENESE ADULTE.	104
TABLEAU 6: MODELES MURINS TRANSGENIQUES UTILISES POUR IDENTIFIER LES ROLES DES MEMBRES TGF- β ET BMPs DANS LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU PANCREAS ENDOCRINE ET LA MORPHOGENESE ADULTE ..	108
TABLEAU 7: MODELES MURINS TRANSGENIQUES UTILISES POUR IDENTIFIER LES ROLES DES EFFECTEURS SMADS DANS LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU PANCREAS ENDOCRINE ET LA MORPHOGENESE ADULTE.	108

AVANT-PROPOS

Le cancer est bien souvent défini, dans les dictionnaires généralistes, comme « une maladie qui a pour mécanisme une prolifération cellulaire anarchique, incontrôlée et incessante » (Larousse). Cependant, avec les nombreuses avancées du siècle dernier, nous ne devrions plus parler **DU** cancer mais **DES** cancers. En effet, de nos jours, le terme « cancer » recouvre un vaste ensemble de maladies, différentes les unes des autres, classées selon les cellules et les tissus, à partir desquels les tumeurs se forment. Il n'existe pas moins de 200 types de cancers. Chaque organe, selon la cellule touchée, peut développer des tumeurs très différentes, au niveau des symptômes cliniques et de l'évolution de la maladie. De plus, il existe de grandes variations entre patients, pour un même type de cancer, selon leur historique génétique ou environnemental, complexifiant les diagnostics et thérapies. C'est pour cela que depuis quelques années, la médecine personnalisée a vu le jour, afin de traiter les patients de façon individualisée, en tenant compte des caractéristiques génétiques et biologiques des tumeurs, propre à chaque personne.

C'est le cas pour les Tumeurs NeuroEndocrines Pancréatiques (TNEPs), pour lesquelles il existe une grande hétérogénéité de tumeurs, qui peuvent être de nature très différentes. Ce qui est actuellement mal connu, est le mécanisme qui conduit au développement de ces lésions tumorales hétérogènes.

La première hypothèse est une origine cellulaire différente pour chaque tumeur. En effet, le pancréas endocrine est formé de multiples structures isolées, réparties au sein des acini, appelées les îlots de Langerhans. Ces îlots sont composés de cinq types cellulaires : β , α , δ , ϵ et PP (Pancreatic Polypeptide). Afin d'assurer le maintien de l'homéostasie du glucose au sein de l'organisme, ces cellules vont sécréter chacune leur propre hormone, comme l'Insuline pour les cellules β ou le Glucagon pour les cellules α , qui vont être conduites, grâce à un système vasculaire dense, à leurs organes cibles tels que le foie, les tissus adipeux ou les muscles. Ainsi, si un certain type de cellules endocrines acquiert des modifications génétiques et biologiques, elles peuvent conduire au développement d'une tumeur particulière.

La deuxième hypothèse est la mise en place d'un processus de plasticité par les cellules endocrines. La plasticité cellulaire est définie par la capacité des cellules à adopter des propriétés biologiques (génétiques, moléculaires, phénotypiques) d'un autre type cellulaire. Cette plasticité cellulaire prend notamment place au cours du développement embryonnaire, grâce à la capacité d'une cellule immature, à donner tous les tissus différenciés d'un individu adulte. Ce mécanisme a été rapporté dans des cancers, que ce soit dans l'émergence des tumeurs précoces ou leur évolution tardive, et il est désormais bien connu que les cellules pancréatiques différenciées possèdent un certain potentiel de plasticité.

Afin de répondre à ces questions, notre groupe s'intéresse depuis quelques années à l'étude de l'origine cellulaire des TNEPs et la place de la plasticité des cellules endocrines pancréatiques dans leur émergence et leur évolution.

Nous cherchons particulièrement à mettre en évidence des facteurs extra- ou intracellulaires, impliqués dans ce mécanisme. Une famille de facteur de croissance nous intéresse particulièrement, la famille Transforming Growth Factor- β (TGF- β). De leur découverte, dans les années 70, à leurs fonctions émergentes mises en évidence actuellement, notamment au sein du pancréas endocrine, la recherche scientifique sur cette famille subit un intérêt croissant grâce à leurs rôles biologiques, qui prennent place dans un large spectre de tissus et systèmes, du développement embryonnaire à l'homéostasie et les pathologies cellulaires chez l'adulte.

L'introduction bibliographique portera, dans un premier temps, sur les TNEPs. Je caractériserai leur hétérogénéité (partie I.A) et décrirai les différents modèles murins transgéniques, utilisés pour modéliser et étudier cette hétérogénéité tumorale (partie I.B). Puis, dans une deuxième partie, après avoir brièvement décrit les concepts généraux de la plasticité cellulaire (partie II.A), j'aborderai en particulier la plasticité du pancréas endocrine (partie II.B), ainsi que les facteurs connus ou émergents, responsable du maintien de l'identité des cellules endocrines (partie II.C). Enfin, nous terminerons sur le rôle de la famille TGF- β (partie III.A) dans le développement embryonnaire du pancréas endocrine et sa morphogenèse adulte, ainsi que son implication dans la plasticité des cellules endocrines (partie III.B).

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I :
HETEROGENEITE DES TUMEURS
NEUROENDOCRINES PANCREATIQUES

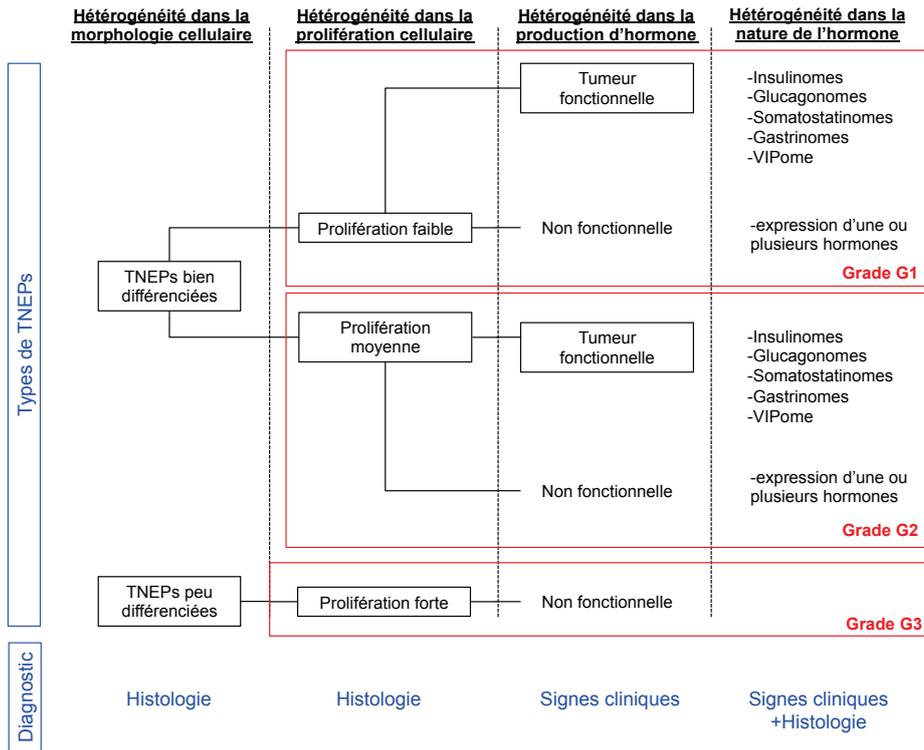


FIGURE 1: HETEROGENEITES DES TNEPs

Ce diagramme représente les différentes formes d'hétérogénéité des TNEPs, qui conduisent à la classification des tumeurs, grâce à un diagnostic histologique et clinique.

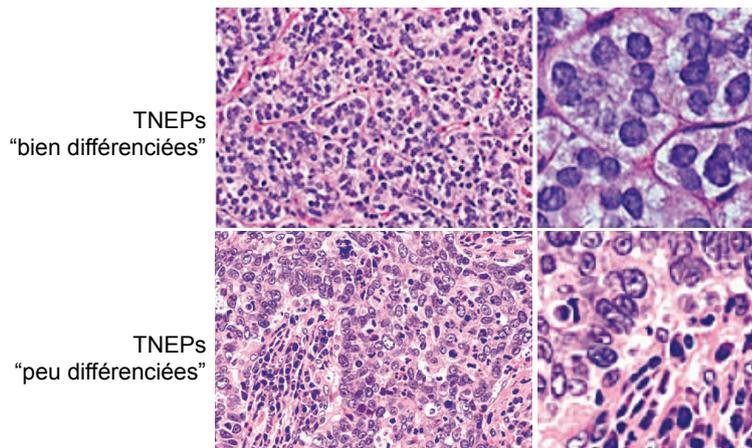


FIGURE 2: DIFFERENCE HISTOLOGIQUE ENTRE LES TNEPs « BIEN DIFFERENCIEES » ET « PEU DIFFERENCIEES »

Ces différences sont décrites plus en détails en partie I.A.1.i.

A. CARACTERISTIQUES DES TUMEURS NEUROENDOCRINES DU PANCREAS

Les Tumeurs Neuroendocrines Pancréatiques (TNEPs) sont des tumeurs rares, représentant environ 2% des tumeurs du pancréas. Elles touchent 2 personnes par million tous les ans. Cependant, une augmentation du nombre de cas, due aux améliorations technologiques et diagnostiques, a été observée ces dernières années. Ces TNEPs touchent principalement les adultes avec une moyenne d'âge de 50 ans. Aucune différence homme-femme n'est observée. Actuellement, peu de facteurs de risques sont connus pour être responsables de cette pathologie. Cependant, des études récentes pointent notamment le diabète comme un facteur favorisant l'émergence des TNEPs (Halfdanarson et al, 2014; Haugvik et al, 2015).

La particularité de ces TNEPs est leur grande hétérogénéité cellulaire, fonctionnelle ou encore moléculaire, qui conduit à l'apparition de tumeurs variées et complexifie les diagnostics et traitements (Figure 1).

1. Hétérogénéité cellulaire

i. Histologie et Différenciation cellulaire

Les TNEPs sont diagnostiquées par l'état de « différenciation » des cellules les constituant. Ce terme « différenciation » ne désigne pas l'expression de facteurs caractéristiques des cellules matures, différenciées, mais la morphologie et la structure cellulaire des tumeurs.

Il est décrit des TNEPs « bien différenciées » et « peu différenciées ». Dans le premier cas, l'analyse histologique montre une organisation cellulaire particulière, sous forme trabéculaire, glandulaire ou encore alvéolaire, avec une grande uniformité dans leur population cellulaire. En revanche, pour les tumeurs « peu différenciées », il n'existe pas d'organisation précise. Les cellules, de tailles variables, sont agrégées en feuillet mal défini, présentant une haute densité cellulaire (Figure 2) (Verbeke, 2010).

**TABLEAU 1: LES DIFFERENTES TNEPs: LEURS SIGNES CLINIQUES ASSOCIES, L'HORMONE PRODUITE
ET LEUR FREQUENCE D'APPARITION**

TNEPs		Signes cliniques	Hormone	Fréquence sur tous les TNEPs
Bien différenciées	Insulinome	Hypoglycémie	Insuline	30-45
	Gastrinome (pancréatique et duodénal)	Douleur Ulçère Diarrhée	Gastrine	16-30
	VIPomes	Diarrhée Hypocalcémie déshydratation	Polypeptide intestinal vasoactif	<10
	Glucagonome	Intolérance au glucose Perte de poids Rougeur cutanée	Glucagon	<10
	Somatostatine	Diabète Diarrhée	Somatostatine	<5
	Non fonctionnelle	-	Expression d'une ou plusieurs hormones	25-100
Peu différenciées		-	Pas d'hormone	rare

Bien que les marqueurs ChromograninA et Synaptophysin soient utilisés pour identifier le caractère endocrine des lésions tumorales, peu d'éléments histologiques, autre que la morphologie cellulaire, sont connus pour différencier les classes de TNEPs, notamment les classes « bien différenciées » G1 et G2 (Figure 1). Cependant, bien que structurellement semblables, ces tumeurs pourraient présenter une expression différente de marqueurs de maturité.

ii. Taux de prolifération des cellules tumorales

Les cellules tumorales des TNEPs présentent des taux de prolifération différents. Bien que les tumeurs « peu différenciées » soient toutes très prolifératives, au sein des tumeurs « bien différenciées », on retrouve des lésions avec un faible ou moyen index mitotique. Récemment, il a été mis en évidence une nouvelle catégorie de TNEPs « bien différenciées », présentant un taux de prolifération supérieur à ceux décrit auparavant (Basturk et al, 2014; Basturk et al, 2015). Il s'avère donc que l'hétérogénéité de prolifération soit plus grande, que ce qui est actuellement connu.

2. Hétérogénéité fonctionnelle

A l'origine, la fonctionnalité des TNEPs n'est pas défini par la capacité des cellules à produire une hormone, mais par la présence ou non de symptômes chez les patients. Au sein des tumeurs « bien différenciées », certaines lésions vont induire des signes cliniques chez les patients, elles sont dites « fonctionnelles » (Tableau 1). C'est le cas lors de sécrétion importante d'Insuline par exemple. D'autres lésions, bien que produisant une ou plusieurs hormones, n'engendreront aucun symptôme, ce sont des tumeurs « non fonctionnelles ». C'est le cas des PPomes par exemple, qui produisent le Polypeptide Pancréatique, mais n'engendrent aucun signe clinique sur les patients (Anlauf et al, 2006; DeLellis et al, 2004). Un défaut de sécrétion des hormones pourrait être à l'origine de cette absence de fonctionnalité des cellules et de signes cliniques associés (Anlauf et al, 2006). Cependant, ceci reste à être confirmé par des analyses plus poussées.

3. Hétérogénéité hormonale

Le pancréas endocrine est composé de différents types de cellules endocrines qui vont sécréter chacune une hormone spécifique. Ainsi, si ce sont les cellules β productrices d'Insuline qui deviennent tumorales, elles vont développer des insulinomes. Dans le cas de cellules α , positives au Glucagon, les lésions sont appelées glucagonomes (Tableau 1).

Cette diversité hormonale des tumeurs est encore plus complexe car au cours de la tumorigenèse, les lésions peuvent changer d'hormones sécrétées voire produire plusieurs hormones, et devenir multihormonales (Guimaraes et al, 2015; Larsson et al, 1975). A l'heure actuelle, cette multihormonalité est encore peu caractérisée. Il n'a pas encore été bien décrit s'il s'agit d'un type de cellules endocrines produisant plusieurs hormones, ou au sein d'une même tumeur, différentes cellules endocrines monohormonales.

4. Hétérogénéité génétique et moléculaire

i. Syndromes héréditaires

Il existe 4 syndromes héréditaires, pour lesquels les patients développent des TNEPs (Jensen et al, 2008).

- *La Neurofibromatose 1*

Cette pathologie est caractérisée par des atteintes au niveau de la peau et du système nerveux. Elle est due à des altérations dans le gène suppresseur de tumeur Neurofibromin-1 (*NF-1*), qui code la protéine Neurofibromin. Bien que les tumeurs duodénales se développent majoritairement, des TNEPs ont été rapportées dans de très rares cas (Nishi et al, 2012).

- *La Sclérose Tubéreuse*

La sclérose tubéreuse est une maladie autosomique dominante, due à des mutations sur l'un des gènes Tuberos Sclerosis 1 ou 2 (*TSC1* ou *TSC2*), codant respectivement l'Hamartin et la Tuberin. Elle est caractérisée principalement par des atteintes cutanées et neurologiques, mais dans de rares cas des TNEPs peuvent se développer, notamment lors d'atteintes de *TSC2*. Des tumeurs fonctionnelles, particulièrement insulinomes et gastrinomes, ou des tumeurs non fonctionnelles ont été décrites (Merritt et al, 2006).

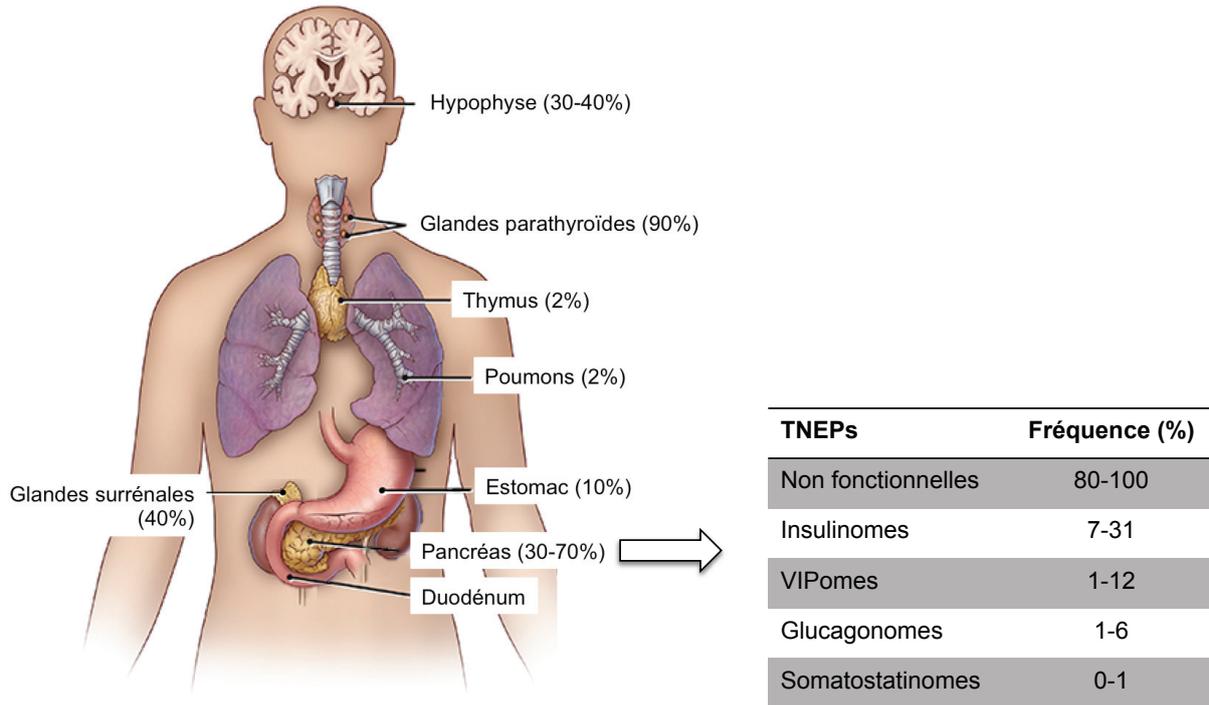


FIGURE 3: LA PATHOLOGIE NEM1

Représentation anatomique des organes endocrines atteints par des lésions tumorales dans la pathologie NEM1 et leur fréquence d'apparition chez les patients, ainsi que le tableau de fréquences des TNEPs majeures se développant chez ces patients (Jensen et al, 2008).

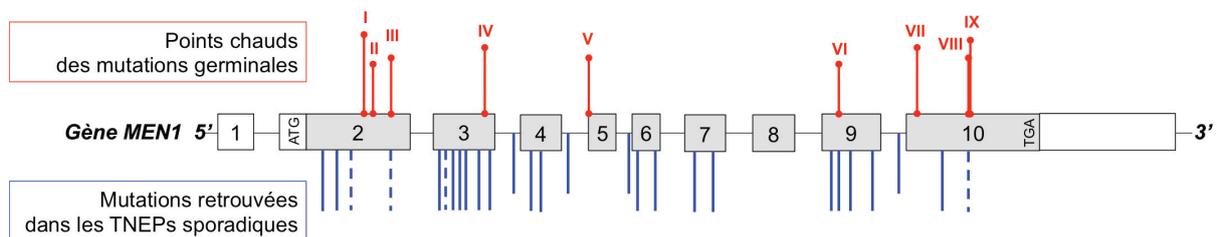


FIGURE 4: MUTATIONS DU GENE MEN1 (CORBO ET AL, 2010; THAKKER, 2014)

Les « points chauds », représentés en rouge, sont responsables de 20% des mutations germinales dans le syndrome héréditaire NEM1. Chaque barre bleue représente une mutation somatique retrouvée dans les TNEPs sporadiques. Les barres représentées en pointillées correspondent à des mutations somatiques identiques à des mutations germinales de la pathologie NEM1.

- *La maladie Von Hippel-Lindau (VHL)*

La pathologie VHL est une maladie autosomique dominante, engendrée par des mutations hétérozygotes germinales du gène suppresseur de tumeur *VHL*. Les altérations de ce gène conduisent au développement de tumeurs bénignes ou malignes dans différents tissus endocrines ou non, y compris dans les îlots pancréatiques. Ainsi, dans 10 à 17% des patients atteints de VHL, le développement de TNEPs, majoritairement non fonctionnelles, est retrouvé (Cassol & Mete, 2015).

- *Les Néoplasies Endocrines Multiples de type 1 (NEM1)*

La pathologie NEM1 est une maladie autosomique dominante, caractérisée par le développement de tumeurs dans différents organes endocrines, comme l'hypophyse, les glandes surrénales ou le pancréas endocrine (Figure 3). Les TNEPs, retrouvées dans 20 à 70% des patients NEM1, sont caractérisées par des microadénomes multiples et variés, dont les plus fréquents sont les tumeurs non fonctionnelles et les insulinomes.

Le gène responsable de la pathologie, le gène suppresseur de tumeur Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (*MEN1*), qui code la protéine Menin, compte actuellement 1133 mutations germinales. La majorité de ces mutations sont retrouvées dans la région codante ou les sites d'épissage du gène. 75% d'entre elles sont inactivatrices et induisent une protéine non fonctionnelle (Lemos & Thakker, 2008). Il existe notamment 9 sites, responsables de 20% des mutations germinales connues, qui pourraient être considérés comme des points chauds (Figure 4) (Thakker, 2014). Des groupes ont tenté de faire une corrélation entre les mutations du gène et les manifestations cliniques de la pathologie chez les patients. Cependant, aucun lien génotype/phénotype n'a actuellement été fait (Lemos & Thakker, 2008). L'hétérogénéité tumorale observée n'est donc pas liée à une différence de mutation du gène.

Enfin, dans 90% des TNEPs de cette pathologie, une perte d'hétérozygotie (LOH) du gène *MEN1*, est observée, conduisant à la perte d'une portion du chromosome et donc du gène. Les autres lésions, qui ne présentent pas de LOH, montrent des mutations de l'allèle sain du gène, invalidant sa fonction suppresseur de tumeur (Pannett & Thakker, 2001).

TABLEAU 2: FREQUENCES DES GENES RETROUVES MUTES DANS LES TNEPS SPORADIQUES (ZHANG ET AL, 2013)

Gènes	Fréquences des mutations
<i>MEN1</i>	44%
<i>DAXX/ATRX</i>	43%
<i>mTOR</i>	15%
<i>TP53</i>	3%

ii. *Caractéristiques moléculaires des TNEPs sporadiques*

Bien que de nombreuses études cherchent à comprendre les causes génétiques et moléculaires de l'émergence de tumeurs sporadiques, qui représentent 90% des TNEPs, peu de choses sont actuellement connues sur les mécanismes conduisant à leur développement. Cependant, les gènes initiateurs de ces tumeurs commencent à être bien décrits. En effet, les gènes *MEN1*, *DAXX* (ou *DP6*, Death-Associated Protein)/*ATRX* (Alpha Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked) ou encore *mTOR* (mammalian Target Of Rapamycin), ont été trouvés mutés dans des TNEPs non familiales (Tableau 2) (Jiao et al, 2011).

- *MEN1*

En plus de son rôle dans la pathologie familiale héréditaire NEM1, grâce à différents groupes, la place du gène *MEN1* a été étudiée dans les TNEPs sporadiques. Il a été montré qu'une inactivation somatique de ce gène par mutation a lieu dans la moitié des TNEPs sporadiques (Agarwal et al, 1997; Corbo et al, 2010; Jiao et al, 2011). Il existe à l'heure actuelle 203 mutations somatiques décrites pour *MEN1*, dont certaines sont identiques aux mutations germinales, retrouvées dans la pathologie NEM1 (Figure 4). Ces mutations sont retrouvés à 14% dans les insulinomes, 16% dans les tumeurs non fonctionnelles et 60% dans les glucagonomes (Lemos & Thakker, 2008; Wang et al, 1998). Bien que non familiales, les TNEPs sporadiques semblent être reliées de façon étroite à une altération du gène *MEN1*.

- *DAXX/ATRAX*

Les protéines Daxx et Atrx sont retrouvées mutées dans 43% des TNEPs (Tableau 2). Celles-ci agissent ensemble en dimère dans le contrôle de la stabilité de la chromatine, en particulier au niveau des télomères. En cas d'absence de ces protéines, la longueur des télomères se trouve modifiée, favorisant la tumorigenèse (de Wilde et al, 2012; Heaphy et al, 2011; Lewis et al, 2010). De plus, Daxx est aussi impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire grâce à la stabilisation de la protéine Tumor protein p53 (TP53). En cas de mutation de *DAXX* et de dommage à l'ADN, Tp53 ne pouvant être stabilisée et le cycle cellulaire arrêté, les cellules accumulent des défauts génétiques, prolifèrent et génèrent des tumeurs, comme les TNEPs (Li et al, 2007).

- *mTOR*

mTor, connue pour son rôle dans la prolifération et la survie cellulaire, est trouvée mutée dans 15% des TNEPs, induisant une activation anormale de sa voie de signalisation chez les patients (Missiaglia et al, 2010; Zhou et al, 2011). Un traitement de souris, développant des insulinomes, avec un inhibiteur de mTor (Évérolimus), combiné à une inhibition du facteur de croissance épidermique (EGF), augmente la survie de ces souris (Chiu et al, 2010). Ainsi, l'inhibition de la voie mTor, chez des individus atteints de TNEPs mutées pour cette protéine, pourrait favoriser la survie et conduire à un meilleur pronostic vital.

- *TP53*

TP53, connu pour son rôle de suppresseur de tumeurs, est impliqué dans les TNEPs, avec Daxx. Il a été également mis en évidence dans l'émergence des carcinomes très prolifératifs et dans le développement d'insulinomes murins lors de son inhibition dans les cellules β (Hanahan, 1985; Rindi et al, 2001). L'implication de *TP53* reste cependant peu étudiée, car il existe très peu de TNEPs mutées pour ce gène.

Au vu de cette grande hétérogénéité de TNEPs, le diagnostic, ainsi que les traitements, s'avèrent complexes. En effet, les premiers traitements donnés au patient ne permettent pas de traiter les tumeurs mais de limiter l'hypersécrétion d'hormones et les signes cliniques associés. La première ligne de traitement pour la tumeur est la chirurgie (Kulke et al, 2010; Metz & Jensen, 2008). L'utilisation de chimiothérapie est actuellement débattue. En effet, les molécules cytotoxiques montrent un effet moindre sur les lésions, avec un faible taux de prolifération (Kulke et al, 2010). Des avancées sur des thérapies ciblées, touchant une atteinte moléculaire particulière, sont actuellement en cours. C'est le cas pour l'utilisation de l'évérolimus, lors d'altérations de la voie mTor (Yao et al, 2008).

Ces dernières années, des avancées importantes ont été réalisées afin de diagnostiquer et de traiter au mieux ces tumeurs, en fonction leur nature et caractéristiques moléculaires. Il reste cependant à comprendre l'origine cellulaire de ces lésions afin d'empêcher leur émergence précocement ou de freiner leur évolution.

B. MODELES MURINS DE TNEPs ET HETEROGENEITE TUMORALE

Durant ces 20 dernières années, différents groupes ont mis au point des modèles murins conduisant au développement de TNEPs, afin d'étudier leur origine cellulaire et leur évolution au cours de la tumorigenèse. C'est le cas dans des modèles d'inactivation totale de gènes d'inhibiteurs du cycle cellulaire comme *p18/p27* ou du récepteur au Glucagon (Babu et al, 2013; Franklin et al, 2000; Yu et al, 2011).

Certains modèles sont particulièrement intéressants, développant des TNEPs de nature différente du compartiment touché par la modification génétique. Ces modèles sont de bons outils pour étudier et comprendre quelle peut être l'origine cellulaire des TNEPs et les mécanismes conduisant à leur émergence.

1. Modèle d'inhibition de p53 et pRb par expression de l'antigène grand T du virus simien 40 dans les cellules β : modèle RipTag2.

L'expression de l'antigène grand T du virus simien 40 (SV40) va permettre aux cellules d'échapper aux points de contrôle du cycle cellulaire, proliférer de façon incontrôlée et développer des tumeurs. Grâce à sa fixation sur la protéine Retinoblastoma 1 (pRB), cet antigène provoque l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire et, par inhibition des fonctions de p53, leur échappement à l'apoptose. Dans le cas du modèle RipTag2 (Rat insulin promoter-SV40 large T antigen), développé depuis une trentaine d'années, cet antigène est spécifiquement exprimé dans les cellules β pancréatiques, grâce au promoteur de l'Insuline de rat (Rat Insulin Promoter ou RIP) (Hanahan, 1985).

Ces souris développent à 5-7 semaines des hyperplasies des cellules β , conduisant à des insulinomes à partir de 12 semaines, provoquant de fortes hypoglycémies et la létalité de la souris (Tableau 3). Plus récemment, des tumeurs très prolifératives et invasives, n'exprimant ni hormone de cellules endocrines pancréatiques, ni les marqueurs neuroendocrines ChromograninA et Synaptophysin, ont été mises en évidence (Hunter et al, 2013).

TABLEAU 3: MODELES MURINS GENERES POUR L'ETUDE DE LA TUMORIGENESE DES TNEPS
ET LEUR HETEROGENEITE

Modèle murin		Hétérogénéité tumorale des TNEPs	Mécanisme d'hétérogénéité tumorale	Références	
Modèle d'expression de l'antigène T du SV40		<i>RipTag2</i>	Insulinomes et tumeurs non différenciées	?	<i>Hunter et al. 2013</i>
Modèle d'activation de la voie SHH		<i>Pdx1-CreER;CLEG2;Kif3aff</i>	Ilots pancréatiques normaux et tumeurs non différenciées	Plasticité cellulaire (perte de maturité cellulaire)	<i>Landsman et al. 2011</i>
Modèle d'invalidation du gène <i>Men1</i>	Délétion hétérozygote	<i>Men1^{TSM/+} ou Men1^{AN3-B/+}</i>	Insulinomes	?	<i>Crabtree et al. 2001</i>
		<i>Men1^{+/-T}</i>	Insulinomes, gastrinomes, glucagonomes et tumeurs mixtes	?	<i>Bertolino et al. 2003a</i>
	Délétion homozygote spécifique dans les cellules β	<i>Men1^{DN/DN};RIP-cre</i>	Insulinomes	?	<i>Crabtree et al. 2003</i>
		<i>Men1^{FF}-RipCre+</i>	Insulinomes +/- perte d'Insuline	?	<i>Bertolino et al. 2003b</i>
		<i>Men1^{LoxP/LoxP}-RipCre+</i>	Insulinomes	?	<i>Biondi et al. 2004</i>
	Délétion homozygote spécifique dans les cellules α	<i>Men1^{FF}-GluCre+</i>	Glucagonomes, insulinomes	Plasticité cellulaire (conversion α/β)	<i>Lu et al. 2010</i>
<i>Glu-Cre;Men1 ff</i>		Insulinomes	Plasticité cellulaire (conversion α/β) ?	<i>Shen et al. 2010</i>	

Les auteurs ont comparé ces lésions aux TNEPs peu différenciées des patients. Ce modèle murin présente donc une hétérogénéité tumorale endocrine. Actuellement, aucune étude sur l'origine cellulaire de ces lésions n'a été réalisée et aucun mécanisme, expliquant cette hétérogénéité, n'a été pointé.

2. Modèle d'activation de la signalisation Shh dans les cellules β , par surexpression du facteur de transcription Gli2

La voie Sonic Hedgehog (SHH) est essentielle au cours de l'embryogenèse dans le développement du pancréas. Afin d'étudier son rôle dans les îlots pancréatiques adultes, Landsmann et *coll.* ont généré des souris surexprimant le facteur Glioma-associated oncogene homolog 2 (GLI2) dans les cellules β , grâce au promoteur d'Insuline de rat, conduisant à l'activation de la voie Shh.

Une activation prolongée de la voie Shh dans les cellules β conduit au développement de tumeurs hautement prolifératives et non différenciées (Tableau 3). C'est grâce à un mécanisme de perte de maturité des cellules β et une réexpression des marqueurs de cellules pancréatiques immatures que les TNEPs se développent. En effet, les cellules endocrines retournent à un état non différencié et prolifèrent de façon accrue (Landsman et al, 2011).

La présence dans ce modèle de tumeurs non différenciées et d'îlots pancréatiques normaux, est due à un mécanisme de plasticité des cellules endocrines, induit par la voie de signalisation Shh, les conduisant à se dédifférencier et développer des tumeurs.

3. Modèle murin d'inactivation du gène *Men1*

Comme il a été décrit précédemment (partie I.A.4), le gène *MEN1*, prend une place de choix dans la tumorigenèse des TNEPs, qu'elles soient héréditaires ou sporadiques. Afin d'étudier son rôle dans la tumorigenèse pancréatique, divers modèles murins ont été générés (Tableau 3).

i. Modèles murins d'inactivation hétérozygote

Les premiers modèles, par Crabtree et Bertolino, consistent en l'inactivation hétérozygote d'un allèle du gène. Dans le premier cas, les souris développent des hyperplasies des îlots pancréatiques et des tumeurs à partir de 9 mois. Ces tumeurs présentent essentiellement une

expression de l'Insuline. De plus, comme chez les patients NEM1, les souris développent des tumeurs hypophysaires, parathyroïdiennes et surrénaliennes (Crabtree et al, 2001). Le modèle généré par notre groupe montre des caractéristiques encore plus proches de la pathologie humaine. En effet, les proportions de tumeurs pancréatiques, hypophysaires et surrénaliennes correspondent à ce qui est retrouvé chez les patients. De plus, différents types de TNEPs ont été observés : insulinomes, glucagonomes et tumeurs multihormonales (Bertolino et al, 2003a).

Ces modèles ont permis de mettre en évidence l'importance du gène *Men1* dans l'émergence et l'hétérogénéité des TNEPs, mais aucun mécanisme, responsable de cette hétérogénéité, n'a été décrit.

ii. Modèles murins d'invalidation conditionnelle

Pour étudier de façon plus précise le rôle de *Men1* dans la tumorigenèse pancréatique, des modèles murins d'invalidation spécifique ont été générés par la suite, consistant en une absence de la protéine Menin dans un type cellulaire défini.

- *Dans les cellules β*

L'invalidation conditionnelle du gène *Men1* dans les cellules β a été réalisée grâce au système Cre/Lox, consistant en l'expression spécifique de l'enzyme Cre recombinase dans les cellules β , sous le contrôle du promoteur de l'Insuline de rat, et la présence de site d'excision LoxP (Locus of X (cross)-over in P1 bacteriophage) au sein du gène *Men1*. Trois modèles différents ont été développés, décrivant le développement d'insulinomes exclusivement (Bertolino et al, 2003b; Biondi et al, 2004; Crabtree et al, 2003).

Ces différents modèles ont permis principalement de mettre en évidence le rôle de *Men1* et sa protéine dans la prolifération et le contrôle du cycle cellulaire, grâce à ses interactions avec de nombreux partenaires, permettant de réguler la transcription de gènes cibles (Matkar et al, 2013). Aucune réelle hétérogénéité tumorale n'a été observée au sein de ces souris. Cependant, notre groupe a mis en évidence une diminution d'expression de l'Insuline au sein des tumeurs, dont le mécanisme n'a pas été approfondi.

- *Dans les cellules α*

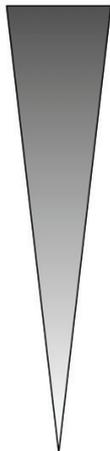
De la même manière, l'inactivation conditionnelle du gène *Men1* dans les cellules α a été réalisée grâce à l'expression de la Cre Recombinase sous le contrôle du promoteur du Glucagon. Notre groupe a observé l'apparition de glucagonomes et d'insulinomes au sein de la même souris. Grâce au traçage cellulaire, il a été démontré que les cellules β des insulinomes sont issues de cellules α ayant perdu le gène *Men1* (Lu et al, 2010).

De façon intéressante, l'inactivation spécifique du gène *Men1* dans les cellules α a permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme conduisant à l'hétérogénéité tumorale. En effet, les cellules α deviennent plastiques, co-expriment l'Insuline et le Glucagon à certains stades de tumorigenèse et génèrent des insulinomes.

Les modèles murins sont de bons outils pour étudier l'hétérogénéité tumorale et ont, d'ores et déjà, permis de mettre en évidence un mécanisme conduisant au développement de différents types de lésions : la plasticité cellulaire. Dans un premier cas, les cellules deviennent plastiques et conduisent à développer des tumeurs (cas de l'activation de Shh). Dans l'autre cas, les cellules sont tumorales et dans un mécanisme d'échappement ou d'évolution, au cours de la tumorigenèse, elles deviennent plastiques et changent de nature (cas de l'inactivation conditionnelle du gène *Men1* dans les cellules α).

PARTIE II :
PLASTICITE DU PANCREAS ENDOCRINE

Potentiel de
différenciation



Totipotence

(Cellule-œuf)

Pluripotence

(Cellules donnant les trois
feuilletts embryonnaires)

Multipotence

(Cellules engagées dans un
tissu spécifique;
cellules souches adultes)

Unipotence

(Cellules différenciées)

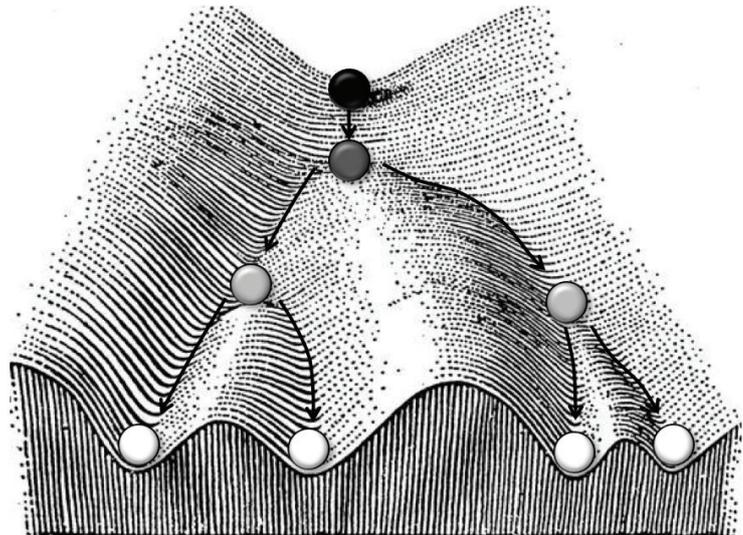


FIGURE 5: PROCESSUS DE DIFFERENCIATION DES CELLULES MATURES ADULTES DURANT LE DEVELOPPEMENT

SELON WADDINGTON (EGUIZABAL ET AL, 2013)

Au cours du développement, une cellule-œuf fertilisée va donner, par divisions et différenciations successives, les différents types cellulaires, constituant un organisme vivant.

A. CONCEPT GENERAL SUR LA PLASTICITE CELLULAIRE

1. Différenciation cellulaire au cours du développement et maintien de l'homéostasie des tissus

i. Cellules souches et développement

La cellule souche (CS) est la base de toute cellule, tissu et organisme différencié. Possédant la capacité de s'autorenouveler, elle reste dans un état immature quiescent pour donner, en cas de besoins physiologiques, des cellules matures différenciées. Au cours du développement embryonnaire, différents types de cellules souches entrent en jeu afin de générer un organisme multicellulaire viable. On retrouve (Figure 5):

- ✓ les CS totipotentes, correspondant à la cellule-œuf, capables de donner tous les types cellulaires
- ✓ les CS pluripotentes, capables de donner les trois feuillets embryonnaires
- ✓ les CS multipotentes, plus matures, générant toutes les cellules d'un tissu
- ✓ les progéniteurs, aux capacités de différenciation plus restreintes
- ✓ les précurseurs, déjà engagés dans un type cellulaire défini.

Toutes ces cellules sont capables d'acquérir de nouveaux programmes génétiques, avec l'expression de facteurs de transcription ou de cytokines différents, conduisant à la différenciation cellulaire (Waddington, 1957).

ii. Cellules souches chez l'adulte

Le rôle de ces cellules souches ne se restreint pas au développement embryonnaire. En effet, la génération de nouvelles cellules, à partir de tissus post-embryonnaires, est un élément essentiel des vies multicellulaires animales et végétales, pour la croissance, la réparation des tissus lésés ou encore la reproduction. Chez l'adulte, ces cellules souches sont capables de se différencier et maintenir l'intégrité cellulaire et fonctionnelle du tissu.

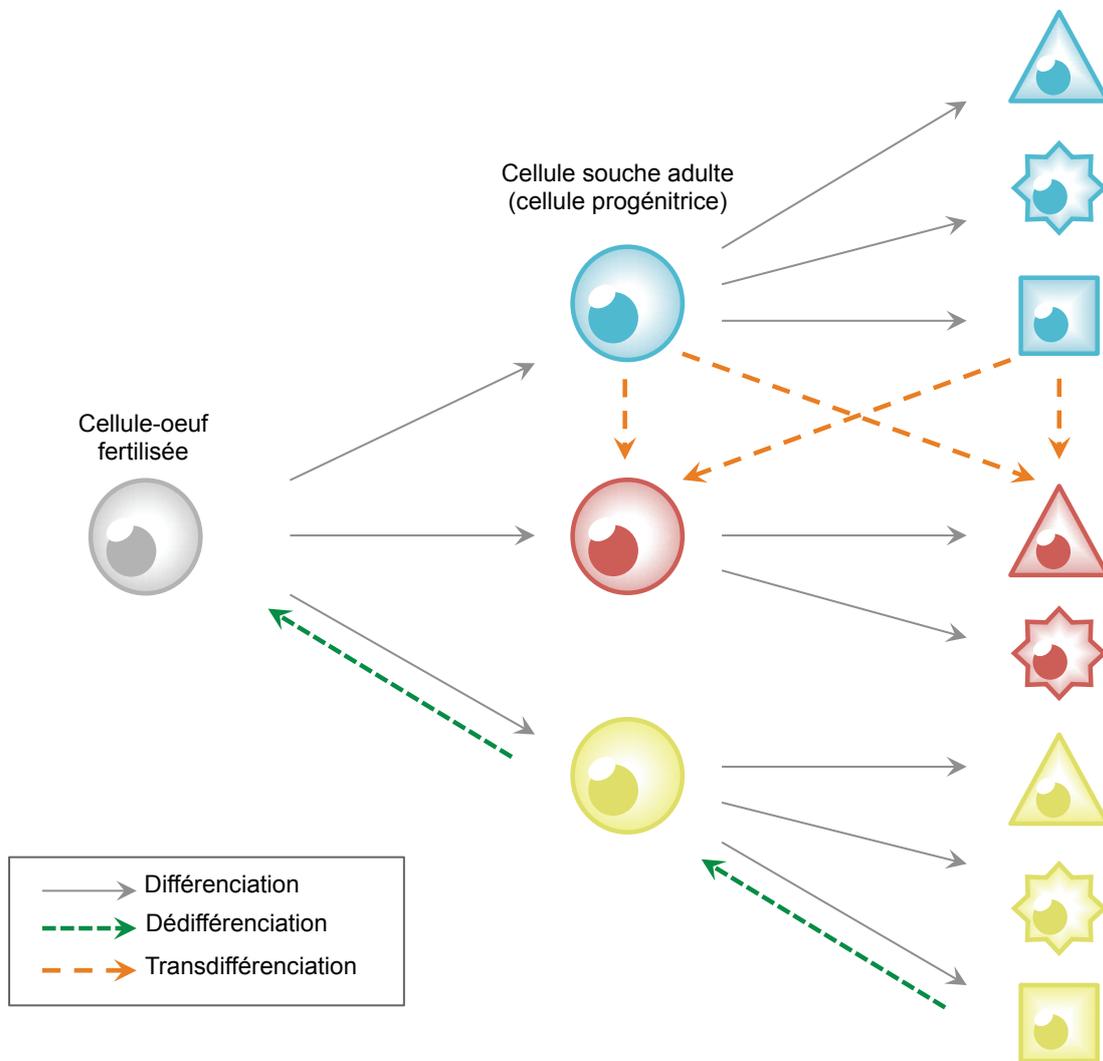


FIGURE 6: DIFFERENTS MECANISMES DE PLASTICITE CELLULAIRE (SUGIMOTO ET AL, 2011)

Les cellules différenciées, formées à partir d'une cellule-œuf, peuvent subir des mécanismes de plasticité les conduisant à perdre leurs caractères matures, c'est la dédifférenciation, ou à se convertir en une cellule d'un autre type cellulaire proche, c'est la transdifférenciation (détaillé en partie II.A.2).

Chez l'homme, cette capacité reste majoritairement limitée à certains tissus, dont la peau, l'intestin, le système hématopoïétique, les testicules pour la spermatogenèse et le cerveau (Wabik & Jones, 2015).

2. Plasticité et reprogrammation cellulaire des cellules différenciées

Outre les cellules souches, les cellules différenciées sont elles aussi capables de plasticité cellulaire, afin de maintenir intact leur propre tissu et type cellulaire. Il est désormais bien accepté que les cellules ne soient pas différenciées de façon irréversible, mais peuvent, lors de besoins physiologiques ou de stress pathologiques, modifier leurs programmes génétiques et moléculaires pour changer de nature cellulaire. Comparativement aux cellules embryonnaires, le degré de plasticité des cellules différenciées reste toutefois limité. Cette plasticité cellulaire fait intervenir deux mécanismes naturels : la dédifférenciation et la transdifférenciation.

La dédifférenciation est définie par la perte des marqueurs identitaires et matures de la cellule différenciée, pouvant se répercuter sur sa fonction. La cellule revient ainsi dans un état moins différencié, mais peut rester cependant dans son lignage cellulaire, comme progéniteurs ou précurseurs, sans retourner à un état de cellules pluripotentes (Figure 6) (Jopling et al, 2011).

La transdifférenciation est caractérisée par la conversion d'une cellule différenciée en un autre type cellulaire proche, sans état immature intermédiaire (Figure 6). Actuellement, chez les mammifères, cette conversion directe a été principalement observée expérimentalement. A l'état naturel et en condition physiologique, la conversion ne serait pas directe et passerait par un état de dédifférenciation, permettant à la cellule de se redifférencier en un autre type cellulaire (Eguizabal et al, 2013; Jopling et al, 2011).

Au cours de ces deux processus, les cellules ne retournent pas à un état de pluripotence. En revanche, la reprogrammation cellulaire a pour but de permettre à une cellule différenciée de redevenir pluripotente, pour ainsi générer un type cellulaire éloigné de son type d'origine. Contrairement aux mécanismes précédents, ce processus n'est pas naturel et nécessite des manipulations génétiques *in vitro*, comme l'expression de facteurs de transcription particuliers (Takahashi & Yamanaka, 2006). Ce processus est actuellement très utilisé pour les thérapies cellulaires et la médecine régénérative, avec la génération de cellules souches pluripotentes induites ou iPS (induced Pluripotent Stem cells), qui peuvent être utilisées pour

la différenciation et génération de cellules matures (Eguizabal et al, 2013; Jopling et al, 2011).

Les premières observations de dédifférenciation et transdifférenciation *in vivo* ont été faites chez le poisson-zèbre ou les amphibiens (Jopling et al, 2010; Knopf et al, 2011; Odelberg et al, 2000; Tsonis et al, 2004). Bien que, chez les mammifères, la régénération des tissus par dédifférenciation ou transdifférenciation soit limitée, il a été rapporté, chez la souris une dédifférenciation des cellules nerveuses de Schwann durant le développement embryonnaire ou lors d'un dommage nerveux local (Mirsky et al, 2008; Woodhoo et al, 2009) et une conversion des cellules musculaires lisses de l'œsophage en cellules musculaires squelettiques durant le développement post-natal (Patapoutian et al, 1995).

Chez les mammifères, le mécanisme de plasticité le plus connu est la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Elle a d'abord été mise en évidence durant le développement embryonnaire, comme mécanisme permettant la formation du mésoderme ou le développement de la crête neurale à partir de cellules épithéliales. Elle a depuis été mise en cause dans différents processus pathologiques comme la cicatrisation, la fibrose ou encore la progression tumorale (Nieto, 2013; Thiery et al, 2009). Elle se caractérise par la perte des marqueurs épithéliaux et le gain de facteurs mésenchymateux. Actuellement, ce mécanisme est surtout étudié pour son implication dans l'émergence de métastases durant la tumorigenèse. Les cellules tumorales de type épithéliales pourraient acquérir des altérations génétiques et moléculaires, les conduisant à exprimer des facteurs mésenchymateux. Ceux-ci leur permettent de migrer dans l'organisme et de coloniser un nouvel organe, donnant alors des métastases.

Ces exemples montrent la place importante de la plasticité des cellules dans des processus physiologiques au cours du développement ou pathologiques chez l'adulte. Dans le cas du pancréas, cette plasticité possède une place d'autant plus importante que des types cellulaires variés, mais aux origines proches, se côtoient et communiquent entre eux pour la fonction de l'organe.

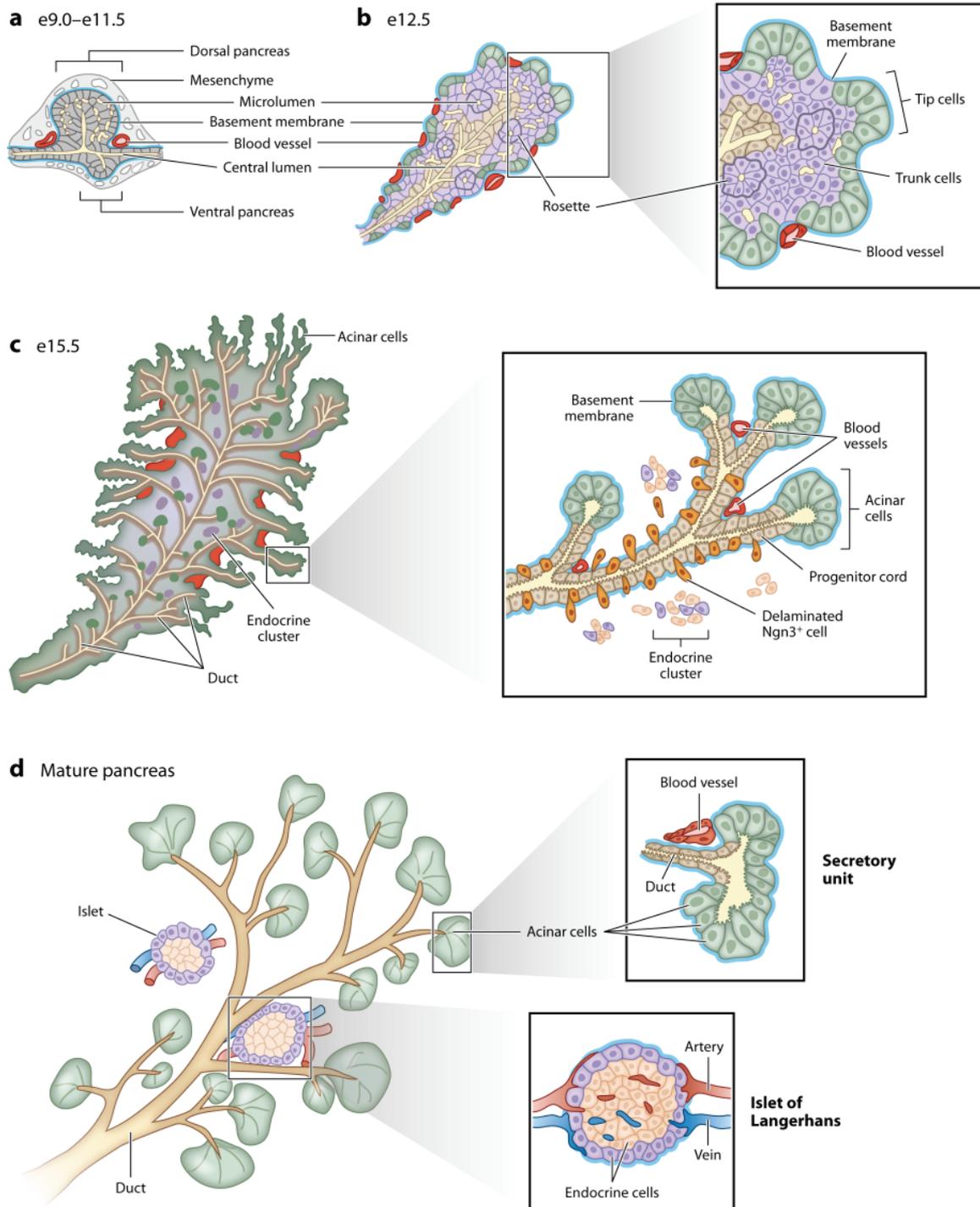


FIGURE 7: DEVELOPPEMENT DU PANCREAS (SHIH ET AL., 2013)

a- entre le stade embryonnaire e9 et e11,5, bourgeonnements épithéliaux de part et d'autre de l'endoderme intestinal : formation du pancréas ventral et dorsal. **b-** au stade e12,5, fusion des bourgeons pancréatiques et début de différenciation des cellules pancréatiques (acineuses *en vert* et endocrines/ductales *en violet*). **c-** au stade e15,5, formation des ductes primitifs (*en marron*) et début de différenciation des cellules endocrines (*en rose et violet*). **d-** structure finale du pancréas, composé de cellules acineuses regroupées en fin de ductes et de petits groupes de cellules endocrines, formant les îlots de Langerhans (détaillé en partie II.B.1).

B. PLASTICITE DES CELLULES PANCREATIQUES

DANS LE DEVELOPPEMENT, L'HOMÉOSTASIE ET

LES PATHOLOGIES DES CELLULES β ENDOCRINES

Le maintien de l'intégrité structurelle du pancréas endocrine est essentiel pour la fonction des îlots pancréatiques dans la régulation de la concentration de glucose de l'organisme. Cet équilibre est basé sur la réplication/prolifération des cellules endocrines différenciées, notamment β , lors de changements et besoins physiologiques (Dor et al, 2004). Cependant, ces dix dernières années, de nombreuses études ont pointé l'implication des différents types cellulaires pancréatiques dans la génération de nouvelles cellules endocrines. Dans cette partie, je me concentrerai uniquement sur les processus de plasticité, impliqués dans la génération ou le maintien des cellules β endocrines, dans un contexte physiologique ou pathologique.

1. Plasticité et développement du pancréas : différenciation des cellules β endocrines

L'utilisation des modèles murins transgéniques a permis ces dernières années de mieux comprendre le développement embryonnaire du pancréas chez les rongeurs (Figure 7).

Au stade embryonnaire de 9 jours (E9), l'émergence de bourgeons épithéliaux de part et d'autre de l'endoderme intestinal représente la première étape morphologiquement visible du développement pancréatique. Ces deux bourgeonnements vont fusionner en un seul organe au stade 12,5 jours. Simultanément, les cellules prolifèrent, menant à une augmentation rapide de la taille de l'organe, et vont former des structures tubulaires ramifiées. Durant cette première phase, appelée transition primaire (Pictet et al, 1972), l'épithélium pancréatique reste non différencié. A partir du stade embryonnaire E12,5 jusqu'à la naissance, l'épithélium continue son expansion en un réseau de ramifications complexes. En parallèle, les différentes cellules, constituant le pancréas, se différencient. A la fin de son développement, le pancréas a acquis son organisation cellulaire, caractérisée par des groupes de cellules acineuses localisées en fin de ductes et des cellules endocrines, agrégées en îlots pancréatiques ou îlots de Langerhans, dispersés à travers le pancréas.

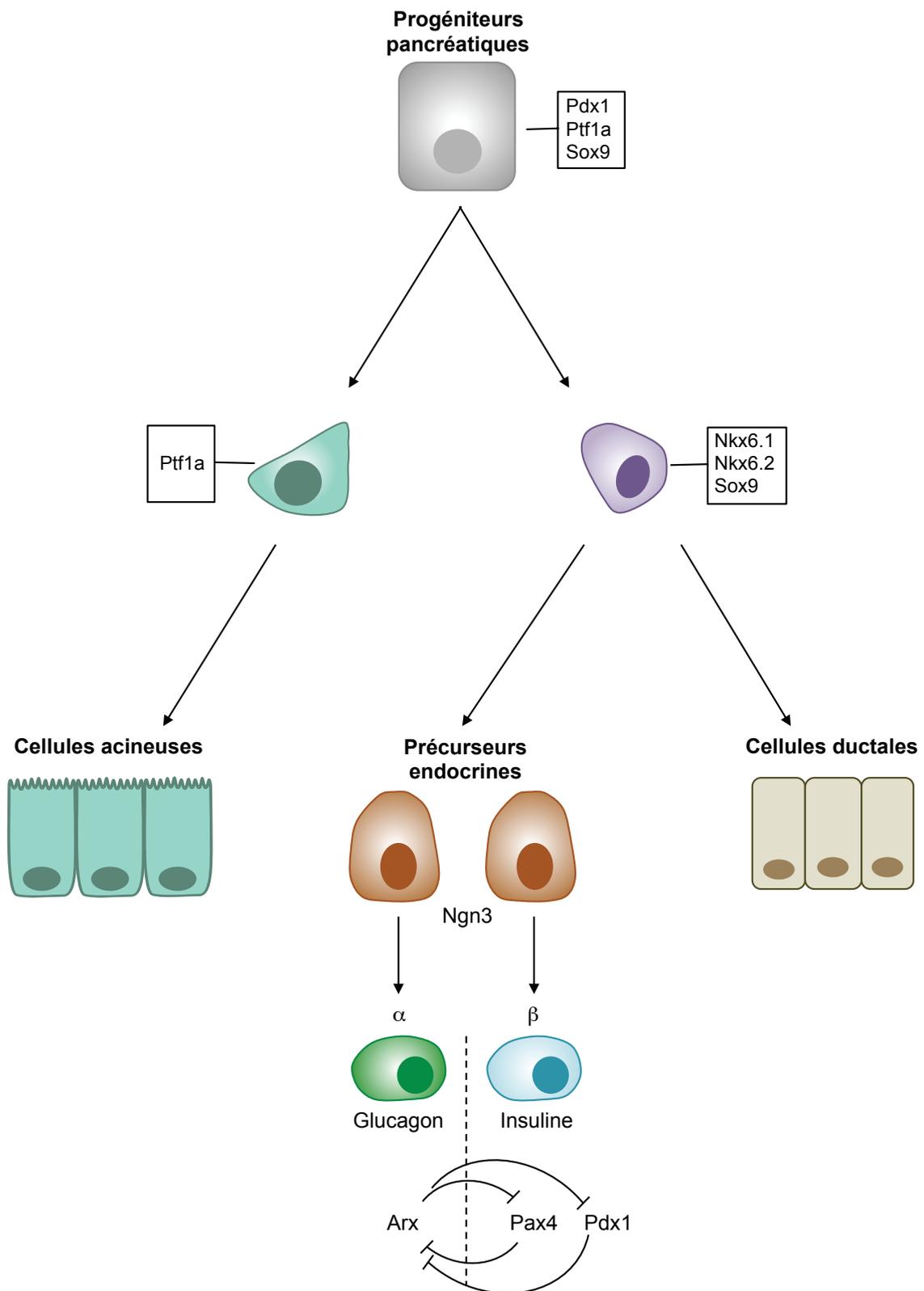


FIGURE 8 : DIFFERENCIATION ET SPECIFICATION DES CELLULES PANCREATIQUES (SHIH ET AL, 2013)

C'est grâce à l'expression de facteurs de transcription spécifiques, aux différents stades du développement, que les progéniteurs vont se différencier en différents types de cellules pancréatiques acineuses, ductales ou endocrines (détaillé en partie II.B.1).

i. De l'induction pancréatique à l'apparition des progéniteurs multipotents

Aux alentours du stade embryonnaire E8,5, la région prépancréatique dorsale et ventrale est spécifiée dans l'endoderme intestinal par différents mécanismes moléculaires, dont l'exclusion de facteur Shh ou des facteurs de croissance Bone Morphogenetic Protein (BMP) et Fibroblast Growth Factor (FGF) (Deutsch et al, 2001; Hebrok et al, 1998; Kim & Melton, 1998; Rossi et al, 2001).

A ce stade, le bourgeon pancréatique dorsal et ventral ne possède pas de types cellulaires différenciés. Ils sont constitués entièrement de cellules progénitrices multipotentes (Figure 8) (Zhou et al, 2007). Ces cellules vont alors exprimer plusieurs facteurs de transcription, permettant de déterminer leur destinée cellulaire pancréatique. Trois facteurs de transcription principaux sont retrouvés : Pancreatic and Duodenal homeobox 1 (PDX1), Pancreas specific Transcription Factor 1a (PTF1a) et SRY box 9 (SOX9) (Ahlgren et al, 1996; Kawaguchi et al, 2002; Seymour et al, 2007). Des expériences de traçages cellulaires *in vivo* ont ainsi permis de montrer que la délétion de Ptf1a redirige les progéniteurs, destinés au pancréas, en cellules du duodénum (Kawaguchi et al, 2002). A l'inverse, une expression ectopique de Pdx1 et Ptf1a est suffisante pour diriger les précurseurs du duodénum dans une voie de spécification pancréatique (Afelik et al, 2006).

ii. Compartimentation du pancréas : destinée acinaire, ductale ou endocrine

La conversion du tissu embryonnaire pancréatique, formé de cellules progénitrices multipotentes, en organe, composé de cellules différenciées, est un processus avec différentes étapes de différenciation, commençant par la séparation du compartiment acinaire et endocrine/ductal.

Parallèlement aux changements structuraux dynamiques que subit l'épithélium pancréatique, les cellules progénitrices multipotentes s'engagent dans deux types de différenciation cellulaire. En effet, des expériences de traçages cellulaires ont révélé que les cellules, émergeant au bord du tissu pancréatique, correspondent aux cellules acineuses, alors que les cellules composant le corps du tissu représentent les cellules endocrines et ductales (Kopp et al, 2011b; Pan et al, 2013; Solar et al, 2009; Zhou et al, 2007). Chacun de ces compartiments cellulaires va exprimer des facteurs de transcription qui lui sont propres. Les facteurs de transcription NK6 homeobox 1/2 (NKX6.1/6.2) et Ptf1a sont des acteurs clés de ce processus (Figure 8). Ils sont coexprimés au sein des progéniteurs multipotents, mais leur

expression devient exclusive d'un des deux compartiments cellulaires après la première étape de différenciation. Ainsi, Nkx6.1/6.2 sont exclusivement retrouvés dans les cellules du corps du tissu pancréatique, correspondant au compartiment endocrine et ductal. Ptf1a est quant à lui exprimé exclusivement dans les futures cellules acineuses (Schaffer et al, 2010).

Une fois cette première spécification effectuée, aux alentours de E12,5, les cellules non acineuses subissent un changement morphologique, permettant la formation du ducte primitif. Au sein de cette structure, un petit groupe de cellules va exprimer le facteur de transcription Neurogenin3 (NGN3), qui marque le début de la différenciation endocrine (Figure 8) (Gradwohl et al, 2000; Gu et al, 2002; Schwitzgebel et al, 2000). Ngn3 va inhiber l'expression du facteur Sox9, caractéristique des cellules ductales (Magenheim et al, 2011; Seymour et al, 2008; Seymour et al, 2007; Wang et al, 2010). Les cellules exprimant Ngn3 vont alors sortir du ducte primitif pour se différencier en cellules endocrines et donner les îlots pancréatiques. Le contrôle de l'expression de ce facteur est donc crucial dans l'initiation de la différenciation endocrine et la formation des ductes.

iii. Différenciation des cellules β

Après expression du facteur Ngn3, les précurseurs endocrines sortent du ducte primitif pour rejoindre le tissu stromal adjacent. Bien qu'unipotents, ils sont capables de générer les 5 types cellulaires endocrines. Les précurseurs, exprimant Ngn3, vont subir des modifications dynamiques dans l'expression de leur gène, résultant en l'activation de facteurs de transcription, spécifiques pour chaque type cellulaire endocrine. Ces facteurs contribuent pleinement à la plasticité des précurseurs endocrines et à l'identité de chaque cellule (Holland et al, 2002; Mastracci & Sussel, 2012). C'est le cas des facteurs de transcription Paired box 4 (PAX4), Pdx1 et Nkx6.1, qui sont des déterminants essentiels de la cellule β (Figure 8) (Collombat et al, 2003; Gannon et al, 2008; Sosa-Pineda et al, 1997). Ainsi, l'expression forcée de ces facteurs dans des précurseurs endocrines va favoriser la différenciation en cellules β , au détriment des cellules α (Collombat et al, 2009; Schaffer et al, 2013; Yang et al, 2011b).

Le développement du pancréas rend compte de la plasticité de ses cellules, qui passent par différents stades de maturité cellulaire, grâce à des programmes transcriptionnels qui évoluent et permettent l'expression de facteurs spécifiques, impliqués dans la différenciation et l'identité des cellules pancréatiques.

2. Maintien de l'homéostasie des cellules β : réplication ou néogenèse et plasticité cellulaire

Le maintien de l'homéostasie des cellules β endocrines permet aux îlots pancréatiques de garder une fonction physiologique intacte et un contrôle constant de la concentration en glucose. Ce processus est une balance permanente entre la production de cellules et leur mort par apoptose. Au sein de la communauté scientifique, la contribution du processus de réplication cellulaire et de néogenèse pancréatique, est hautement débattue depuis plus de dix ans (Dor & Melton, 2004; Ziv et al, 2013).

i. Place de la réplication des cellules β dans le maintien physiologique de la masse des îlots pancréatiques

La réplication des cellules β permet la formation de nouvelles cellules par division mitotique de cellules matures existantes (Ballian et al, 2007). Ce mécanisme est important dans le pancréas post-natal avec une augmentation de 4 fois de la masse des cellules β pour donner des îlots pancréatiques adultes. Il diminue avec l'âge chez les rongeurs comme chez l'homme (Bock et al, 2003; Hanley et al, 2010; Rankin & Kushner, 2009; Teta et al, 2005; Tschen et al, 2009). Différentes études, grâce aux manipulations génétiques chez la souris, ont pointé le rôle important de la prolifération et de différentes protéines du cycle cellulaire dans ce processus (Heit et al, 2006). Ainsi, une expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27, sous le contrôle du promoteur d'Insuline de rat, induit un diabète chez les animaux, avec une perte de la masse des cellules β (Uchida, 2006). La même observation a été faite après une invalidation des protéines Cyclin Dependent Kinase 4 (CDK4) et cyclin D2 (Georgia & Bhushan, 2004; Rane et al, 1999). Des expériences de traçages cellulaires chez la souris ont également démontré l'utilisation de la réplication par les cellules β dans le maintien de la masse de l'îlot pancréatique adulte (Brennan et al, 2007; Dor et al, 2004; Kopinke et al, 2011).

En condition normale, physiologique chez l'adulte, les cellules β nouvellement formées proviennent donc d'une réplication de cellules différenciées existantes et non de cellules souches ou progéniteurs, présents au sein du pancréas (Figure 9). Ce processus ne s'apparente pas à de la plasticité, décrite précédemment, n'induisant pas de changement de nature cellulaire (Partie II.A).

Maintien des cellules β en conditions physiologiques

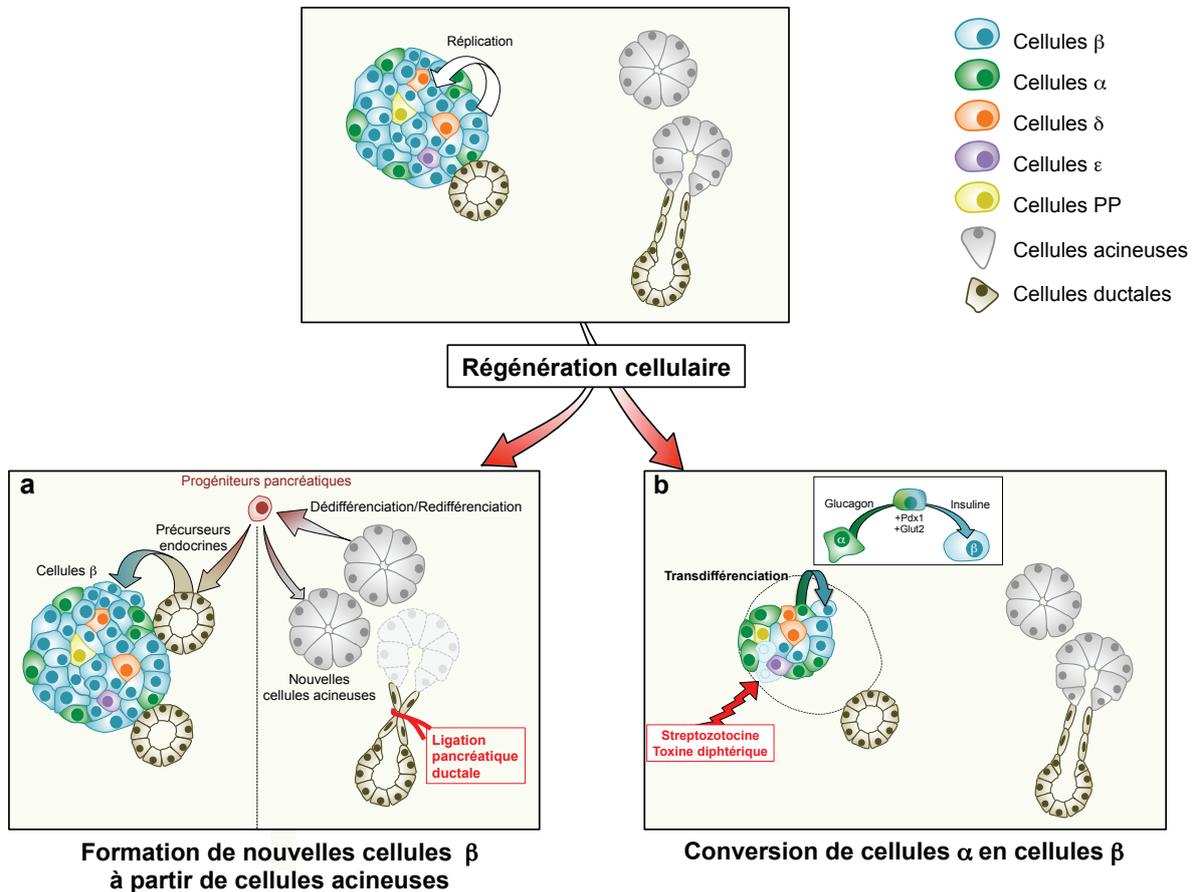


FIGURE 9: MAINTIEN PHYSIOLOGIQUE DE L'HOMÉOSTASIE DES CELLULES β ENDOCRINES PAR REPLICATION ET PAR NEOGENESE LORS DE REGENERATIONS TISSULAIRES

Bien que la place de la plasticité cellulaire soit hautement débattue en condition physiologique, lors de régénérations cellulaires, les cellules pancréatiques sont capables de devenir plastiques pour former de nouvelles cellules β endocrines. C'est le cas (a) lors de destruction de cellules acineuses par ligation ductale, avec une dédifférenciation et redifférenciation des cellules acineuses restantes ou (b) lors de destruction de cellules β par l'action d'un agent chimique ou d'une toxine, avec une transdifférenciation des cellules α (détaillé en partie II.B.2.ii).

Cependant, des études contradictoires ont suggéré le maintien de la masse des cellules β grâce à de la néogenèse, c'est-à-dire la formation de nouvelles cellules à partir de la différenciation de progéniteurs, ou de la plasticité de cellules matures existantes.

ii. Néogenèse et plasticité cellulaire lors de la régénération des cellules β pancréatiques

Différentes sources de cellules souches ont été supposées par des études *in vitro* et *in vivo*, mais les différentes observations restent toutefois contradictoires. En effet, des études ont pointé l'existence de cellules souches pancréatiques au sein des ductes, du pancréas exocrine ou des îlots pancréatiques (Bonner-Weir et al, 2000; Seaberg et al, 2004; Smukler et al, 2011; Zulewski et al, 2001). Il a notamment été identifié au sein des îlots pancréatiques humains et de rat, une population de cellules endocrines n'exprimant pas les hormones pancréatiques, mais la Nestin, marqueur spécifique des cellules souches neurales. Il a été supposé que ces cellules pourraient participer à la néogenèse des cellules endocrines (Zulewski et al, 2001). Cependant, des études *in vivo* ont indiqué que ces cellules positives pour la Nestin sont exclusivement présentes dans des tissus non endodermaux, comme les cellules endothéliales ou mésenchymateuses (Lardon et al, 2002; Selander & Edlund, 2002). Cette étude remet en question les résultats de Zulewski et *coll.*, et la présence de cellules souches au sein des îlots pancréatiques. Enfin, un marquage des cellules en division n'a pas mis en évidence la présence de cellules souches au sein du pancréas, contrairement à la peau et l'intestin, connus pour en posséder (Teta et al, 2007). Ainsi, l'existence de cellules progénitrices pancréatiques chez l'adulte reste très controversée et nécessite des études approfondies pour conclure sur leur présence.

D'autre part, il a été émis l'hypothèse que la néogenèse des cellules β pourrait venir, non pas de cellules souches, mais de cellules pancréatiques matures, subissant une dédifférenciation ou transdifférenciation, lors de stimuli externes et de dommages pancréatiques, nécessitant une régénération des cellules. Différentes études ont permis d'analyser cette plasticité cellulaire, grâce à des modèles murins, permettant une lésion pancréatique par chirurgie ou par destruction chimique, et des modèles génétiquement modifiés (Figure 9) (Desgraz et al, 2011).

- *Lésions pancréatiques par chirurgie*

Une ligation du ducte pancréatique, créant une dégénérescence des cellules acineuses, a montré des résultats contradictoires sur la plasticité des cellules pancréatiques et la génération de nouvelles cellules β . En effet, des études ne montrent pas l'implication de cellules souches ou de plasticité entre les différents compartiments pancréatiques pour la génération des cellules (Kopp et al, 2011a; Kopp et al, 2011b; Rankin et al, 2013; Solar et al, 2009; Xiao et al, 2013a). Cependant, d'autres groupes ont mis en évidence une augmentation de la masse des cellules β , grâce à des cellules progénitrices du ductes, positives pour Ngn3 (Van de Casteele et al, 2013; Xu et al, 2008).

Une étude récente de Pan *et coll.* a permis de comprendre le mécanisme complet, impliqué dans la néogenèse pancréatique lors d'une ligation du ducte (Figure 9) (Pan et al, 2013). Après la ligation, la majorité des cellulaires acineuses, en amont, dégèrent, mais certaines acquièrent des caractéristiques moléculaires des cellules progénitrices multipotentes, présentes lors du développement embryonnaire. Ces progéniteurs donnent naissance par différenciation à des cellules acineuses, pour régénérer le pancréas exocrine lésé, ou des cellules ductales, qui, de la même façon qu'au cours du développement embryonnaire, vont exprimer Ngn3 et se différencier en cellules endocrines β . Ce modèle fait ainsi appel à la dédifférenciation et redifférenciation des cellules acineuses pour la régénération du compartiment exocrine, mais également ductal et endocrine.

- *Destruction des cellules β par molécule chimique ou modification génétique chez la souris*

La streptozotocine est fréquemment utilisée, chez les rongeurs, pour induire une destruction des cellules β et ainsi étudier les diabètes. Différentes études ont montré une coexpression de différentes hormones après un traitement avec cette molécule. En effet, des groupes ont pu mettre en évidence des cellules coexprimant l'Insuline et le Glucagon, mais également des cellules α présentant des marqueurs des cellules β , comme Pdx1 ou le transporteur au glucose Glucose Transporter 2 (GLUT2) (Fernandes et al, 1997; Guz et al, 2001; Thyssen et al, 2006). Ainsi, ces observations suggèrent l'implication des cellules α dans la régénération des cellules β , suite à leur destruction chimique (Figure 9).

De même, une destruction quasiment complète des cellules β , grâce à un traitement avec la toxine diphtérique, ciblant un récepteur exprimé spécifiquement sur ces cellules, a montré par traçage cellulaire une conversion des cellules α en cellules β pour régénérer les îlots pancréatiques. Environ 5 à 10% des cellules α sont reprogrammées pour exprimer l'Insuline, Pdx1, Nkx6.1 ou Glut2 (Thorel et al, 2010).

Grâce à différentes méthodes de régénération cellulaire, la plasticité des cellules pancréatiques a été ainsi démontrée *in vivo* chez les rongeurs. Elle a récemment été mise en évidence également chez le poisson-zèbre dans un modèle de destruction des cellules β , qui induit une transdifférenciation des cellules α en cellules β pour leur régénération (Ye et al, 2015). Ces mécanismes sont peu connus et décrits chez l'homme, par l'incapacité de créer des modifications génétiques et des traçages cellulaires *in vivo*.

iii. Réplication et néogenèse des cellules β : cas de la gestation

Durant la gestation, une résistance physiologique à l'Insuline se met en place. Afin de contrecarrer ce processus, une augmentation adaptative de sécrétion d'Insuline a lieu, par le biais d'une hypertrophie et d'une hyperplasie des cellules β , ainsi qu'une augmentation de leur fonction, chez les rongeurs comme chez l'homme (Bone & Taylor, 1976; Parsons et al, 1992; Rieck & Kaestner, 2010; Sorenson & Brelje, 1997; Van Assche et al, 1978). Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont pu mettre en avant le rôle de la prolifération des cellules β matures existantes dans l'augmentation de leur masse chez les rongeurs en particulier. En effet, une augmentation de prolifération se met en place, grâce à la Prolactine, qui régule différentes cibles, dont Menin, suppresseur de tumeur, qui intervient dans le contrôle de protéines du cycle cellulaire (Karnik et al, 2007). A l'heure actuelle, la place de la réplication des cellules β semble être l'élément clé dans ce processus.

Cependant, récemment, il a été pointé l'implication de la néogenèse dans l'émergence de nouvelles cellules β , à partir de cellules progénitrices, en cas de gestation chez l'homme comme chez les rongeurs (Abouna et al, 2010; Butler et al, 2010; Toselli et al, 2014). La plasticité des cellules pancréatiques pourrait être impliquée dans l'augmentation de la masse des cellules β , mais ces observations restent encore peu nombreuses et demandent des études complémentaires.

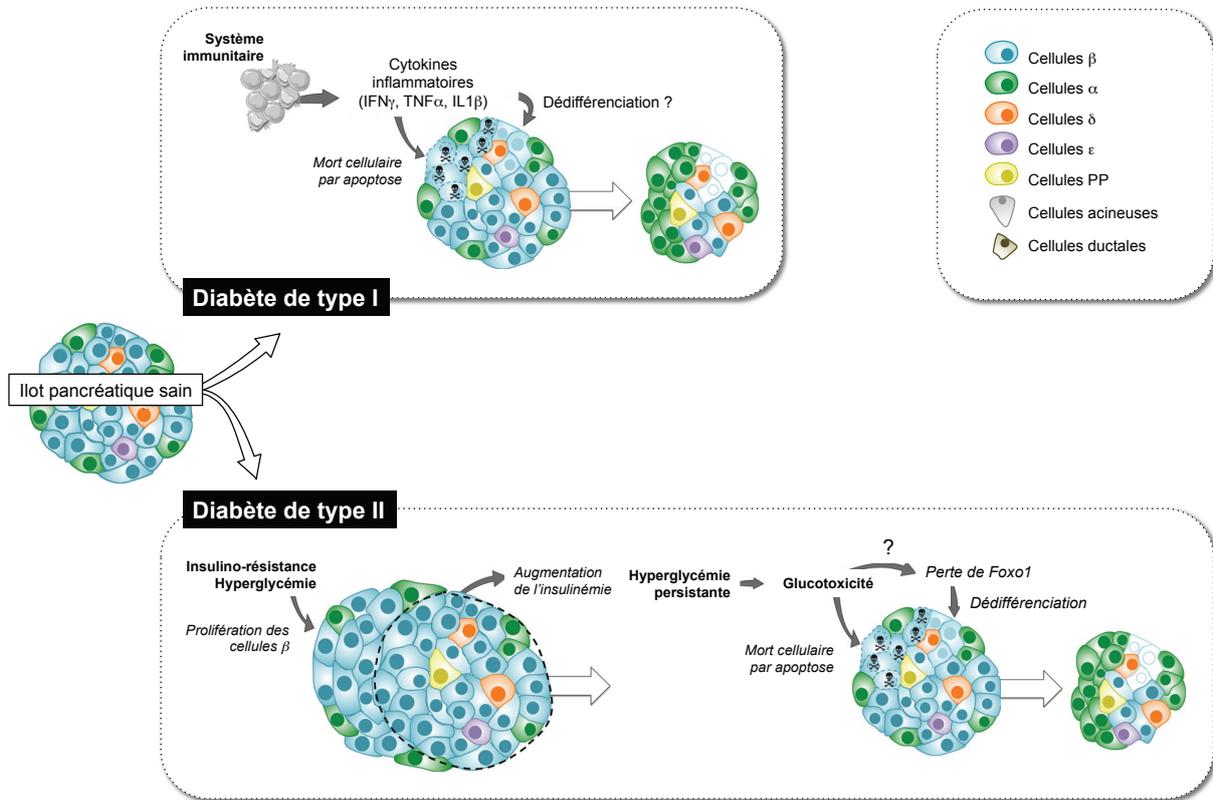


FIGURE 10: PLASTICITE DES CELLULES ENDOCRINES DANS LES DIABETES DE TYPE I ET II

La dédifférenciation pourrait être un mécanisme impliqué dans la pathogenèse du diabète de type I et II, conduisant à la perte de fonction des cellules β endocrines. Dans le diabète de type I, elle pourrait être médiée par les cytokines proinflammatoires présentes dans l'environnement des cellules endocrines. Pour le diabète de type II, la glucotoxicité semble être un élément clé dans cette plasticité cellulaire, que ce soit pour la fonction de facteurs de transcription comme Foxo1 ou l'induction de stress cellulaire (détaillé partie II.B.3).

En conclusion, il semble donc exister une certaine plasticité des cellules matures au sein du pancréas adulte murin, sans réelle preuve de cellules souches existantes. Dans des conditions normales physiologiques, la réplication cellulaire se met en place pour maintenir l'intégrité des îlots pancréatiques. Mais lors de régénération tissulaire, il peut être observé de la néogenèse et de la plasticité des acini et ductes pancréatiques. Ces différents mécanismes de formation de cellules β semblent fortement liés aux types de stress subi et au degré de dommages des îlots pancréatiques.

3. Rôle de la plasticité dans les pathologies des îlots pancréatiques : cas du diabète

La plasticité des cellules endocrines pancréatiques a été récemment pointée dans certains cas de diabète. Le diabète est défini par 3 types de pathologies : le diabète de type I, de type II et le diabète gestationnel.

i. Le diabète de type I

Le diabète de type I est lié à une destruction auto-immune des cellules β pancréatiques. Aucune étude n'a réellement démontré un rôle de la plasticité cellulaire dans ce diabète. Cependant, le stress induit par le système immunitaire et la présence de cytokines inflammatoires dans l'environnement des cellules β pourraient favoriser une plasticité des cellules endocrines (Figure 10) (décrit plus en détails en Partie II.C.2.ii).

ii. Le diabète de type II

Le diabète de type II est caractérisé par un dysfonctionnement des cellules β et une résistance des organes périphériques (foie, tissu adipeux et muscles) à la réponse de l'Insuline, pour réduire l'hyperglycémie. Ce type de diabète présente une pathogenèse complexe (Ahren, 2005; Prentki & Nolan, 2006). En effet, dans un premier temps, une résistance des tissus périphériques à l'Insuline induit une hyperglycémie, qui conduit à une augmentation de sécrétion d'Insuline et de la masse des cellules β , afin de contrecarrer cette insulino-résistance. Le maintien d'un haut taux de glucose sanguin induit une glucotoxicité des cellules β , et une perte de leur masse (Poitout & Robertson, 2008). Cette destruction a tout d'abord été attribuée à une augmentation de l'apoptose (Butler et al, 2003b; Lupi & Del Prato, 2008). Ce mécanisme a d'ailleurs été observé chez des patients diabétiques (Butler et al, 2003a). Cependant, il semblerait que le taux d'apoptose ne soit pas suffisamment élevé

pour expliquer le dysfonctionnement des cellules β et la diminution de leur nombre, observé en cas de diabète (Butler et al, 2003a; Butler et al, 2003b). Récemment, il a été proposé qu'une dédifférenciation des cellules β pourrait être le mécanisme parallèle à l'apoptose, conduisant à la diminution de sécrétion d'Insuline. Ainsi, une diminution des marqueurs Musculo-aponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (MAFA), Nkx6.1 et Pdx1 a été observée dans des tissus humains de patients diabétiques de type II (Yang et al, 2012) et dans des modèles murins développant des diabètes (Matsuoka et al, 2010; Talchai et al, 2012b).

De plus, des études sur des modèles murins génétiquement modifiés ont démontré une dédifférenciation et proposé un mécanisme de pathogenèse du diabète. Talchai et *coll.* ont étudié, lors de différents stress physiologiques, l'effet de l'inactivation du facteur de transcription Forkhead box 1 (FOXO1) spécifiquement dans les cellules β , facteur connu pour déterminer le devenir cellulaire des cellules entéroendocrines (Talchai et al, 2012a). En réponse à des gestations multiples chez les femelles ou au vieillissement chez les mâles, les souris invalidées pour Foxo1 montrent un phénotype similaire au diabète de type 2 humain. En effet, les souris présentent une diminution de 30% de la masse des cellules β et une sécrétion d'Insuline diminuée. Les auteurs ont montré que la diminution de la masse β est due à une dédifférenciation de ces cellules, avec perte des marqueurs Insuline, Pdx1 et MafA. Ces cellules dédifférenciées retournent à un état de progéniteurs endocrines et peuvent ainsi se convertir en autres cellules endocrines comme les cellules α , δ ou PP (Talchai et al, 2012b). Les auteurs concluent que la perte progressive de Foxo1 chez des patients diabétiques pourrait conduire à une dédifférenciation, causant le dysfonctionnement des cellules β (Figure 10).

Un autre modèle murin, développant un diabète par manque d'excitabilité des cellules β , montre également une dédifférenciation de ces cellules, qui vont exprimer le facteur de transcription Ngn3, caractéristique des précurseurs endocrines. Contrairement au modèle précédent, ces cellules ne sont pas capables de se redifférencier en cellules endocrines α (Wang et al, 2014).

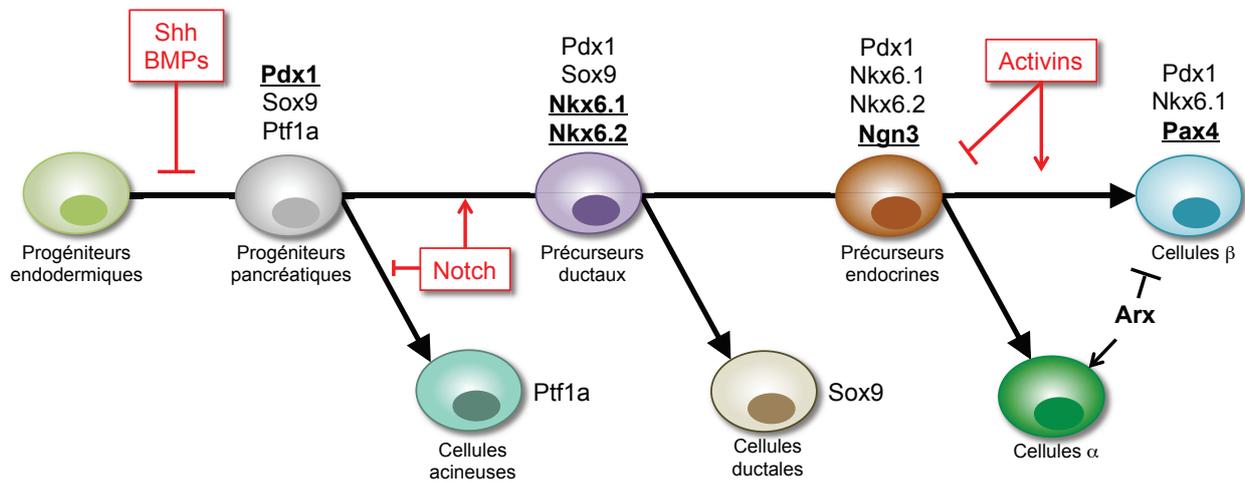
iii. Le diabète gestationnel

Lors de la gestation, une augmentation de la masse des cellules β est induite pour compenser l'insulino-résistance qui se met en place. Lorsque cette compensation n'a pas lieu, un diabète dit gestationnel se développe (Rieck & Kaestner, 2010; Zhang et al, 2010). Karnik

et *coll.* ont ainsi pu montrer l'implication de Menin dans ce processus. En effet, lors de gestation, les souris développent des îlots hyperplasiques, grâce à la diminution de l'expression de Menin dans les cellules β , qui favorise la prolifération. Lors d'une réexpression de Menin dans ces cellules, la prolifération est inhibée et une hyperglycémie est induite (Karnik et al, 2007). Un défaut de prolifération des cellules β semble ainsi conduire au diabète gestationnel. Actuellement, aucune étude n'a montré l'importance de la plasticité de ces cellules dans la survenue du diabète, comme c'est le cas pour un diabète de type II (Partie II.B.3.ii).

La plasticité cellulaire, et particulièrement la dédifférenciation, pourrait être le mécanisme expliquant une part du dysfonctionnement et de la perte de masse des îlots pancréatiques dans le diabète. Outre cette pathologie, les TNEPs, qui se développent au sein des îlots pancréatiques présentent une grande hétérogénéité par la nature des hormones produites, leur fonctionnalité ou encore leurs caractéristiques moléculaires (Partie I.A). Des mécanismes de plasticité cellulaire ont été proposés pour expliquer cette hétérogénéité, grâce notamment à l'inactivation conditionnelle du gène *Men1*, chez la souris, au sein des cellules α , qui conduit à leur transdifférenciation en cellules β (partie détaillée en Partie I.B.3.ii).

Au cours du développement embryonnaire du pancréas endocrine, du maintien de son intégrité ou de la progression de ses pathologies, cet organe possède des cellules avec un certain degré de plasticité. Bien que les processus de conversions cellulaires commencent à être bien décrits, les facteurs impliqués restent encore peu connus.



***FIGURE II: FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUES DANS LA DIFFERENCIATION
DES CELLULES β ENDOCRINES DURANT LE DEVELOPPEMENT***

Chaque étape de différenciation est régie par différentes expressions de facteurs de transcription, caractéristiques de chaque type cellulaire pancréatique, comme Pdx1, Nkx6.1/2, Ngn3 et Pax4. L'expression de ces facteurs est contrôlée par les voies de signalisation de Shh, Notch ou encore la famille TGF- β , afin de générer et spécifier les différents lignages cellulaires pancréatiques (détaillé en partie II.C).

C. MECANISMES ET FACTEURS DE PLASTICITE CELLULAIRE DANS LE PANCREAS ENDOCRINE

Les études sur le développement embryonnaire ont conduit à mieux connaître les facteurs clés de l'identité de chaque type cellulaire. Actuellement, grâce à ces connaissances, de nouveaux mécanismes sont étudiés pour leur capacité à réguler ces facteurs, et ainsi la plasticité des cellules.

1. Rôle essentiel des facteurs de transcription dans l'identité des cellules β endocrines

i. Pdx1

Pdx1 est le premier facteur de transcription produit durant le développement pancréatique, par des progéniteurs présents dans l'endoderme (Gu et al, 2002). Depuis de nombreuses années, il est bien connu que ce facteur est important pour le développement du pancréas. En effet, les souris invalidées pour Pdx1 ne développent pas de pancréas, étant incapables de produire des cellules acineuses, ductales et endocrines (Jonsson et al, 1994; Stoffers et al, 1997) (partie II.B.1.i).

Au cours du développement, Pdx1 est restreint aux cellules β et intervient dans leur différenciation et leur fonction (Figure 11). Ainsi, une invalidation spécifique de Pdx1 dans ces cellules induit une hyperglycémie et compromet leur différenciation (Ahlgren et al, 1998; Gannon et al, 2008). Il est désormais bien connu que ce facteur est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes spécifiques de ces cellules comme l'Insuline ou Glut2 (Ahlgren et al, 1998). Ainsi, une expression ectopique de Pdx1 dans des cellules pancréatiques non β induit une différenciation de ces cellules, leur permettant de produire de l'Insuline (Ferber et al, 2000; Heller et al, 2001; Yang et al, 2011b). Enfin, Pdx1 permet le maintien de l'identité des cellules β , notamment en réprimant le programme cellulaire α . Une étude récente de Gao et *coll.* a ainsi montré que suite à la délétion spécifique de Pdx1 dans les cellules β , ces cellules se reprogramment et expriment Musculo-aponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (MAFB), facteur spécifique des cellules α (Gao et al, 2014b).

ii. *Nkx6.1/2*

Nkx6.1/2 sont des facteurs de transcription exprimés au cours du développement pancréatique, essentiels dans la génération des cellules endocrines, notamment β (Binot et al, 2010; Henseleit et al, 2005; Schaffer et al, 2010). Ils ont tout d'abord été décrits pour leur rôle important dans la compartimentation des cellules acineuses et cellules endocrines/ductales (Figure 11) (Schaffer et al, 2010). En effet, l'inactivation de ces facteurs chez l'embryon de souris induit une expression ectopique du facteur *Ptf1a* dans les cellules du pancréas en développement, avec une augmentation des gènes caractéristiques des cellules acineuses et une diminution des cellules précurseurs endocrines exprimant *Ngn3*. A l'inverse, une expression forcée des facteurs *Nkx6* sous contrôle du promoteur de *Pdx1* réprime l'expression de *Ptf1a*, bloquant la différenciation de cellules acineuses, et induisant une augmentation des marqueurs endocrines.

De plus, ces facteurs ont récemment été montrés essentiels dans la différenciation et l'identité des cellules β endocrines (Figure 11). L'expression ectopique de *Nkx6.1* dans des cellules entéroendocrines a montré une reprogrammation partielle de ces cellules en cellules β avec une expression de l'Insuline (Lee et al, 2014). De plus, une expression forcée du facteur *Nkx6.1* dans les précurseurs endocrines, sous contrôle du promoteur du gène *Ngn3*, induit une augmentation du nombre de cellules β en détriment des autres cellules endocrines (Schaffer et al, 2013). A l'inverse, son inactivation conduit à la mort des souris, par hyperglycémie, quelques jours après la naissance. Celle-ci est due à un défaut de différenciation des cellules β , et une augmentation des autres cellules endocrines. De même, une perte de ce facteur dans les cellules β matures chez l'adulte conduit à un développement de diabète. Chez ces souris, l'identité des cellules β est fragilisée, montrant une co-expression de l'Insuline et de la Somatostatine, hormone spécifique des cellules δ . La perte de ce facteur tend ainsi les cellules β à devenir δ (Taylor et al, 2013).

iii. *Ngn3*

Ngn3 est le facteur de transcription clé des précurseurs endocrines (Figure 11). L'induction de ce facteur est un élément essentiel durant le développement embryonnaire, permettant de déterminer le devenir endocrine des cellules pancréatiques (Gradwohl et al, 2000; Gu et al, 2002; Schwitzgebel et al, 2000). En effet, si les cellules ne l'expriment pas, elles vont se

différencier en cellules ductales et constituer les ductes pancréatiques (Magenheim et al, 2011; Wang et al, 2010). De plus, son expression à des stades précis du développement embryonnaire semble importante dans le choix de différenciation endocrine. En effet, son expression précoce au sein des progéniteurs pancréatiques permet une émergence de cellules α alors que plus tardivement, les cellules β et δ se développent (Johansson et al, 2007).

Chez l'adulte, son expression et son rôle dans la néogenèse pancréatique est encore controversé (Xiao et al, 2013a; Xiao et al, 2013b). Récemment Xiao et *coll.* ont publié deux études montrant l'absence de transdifférenciation des cellules ductales surexprimant Ngn3 en cellules β et de rares cas de néogenèse β après la naissance chez la souris. Enfin, la régénération cellulaire semble permettre une surexpression de ce facteur dans certaines cellules ductales et permettre la différenciation en cellules β (Van de Casteele et al, 2013). Cependant, ceci reste de rares cas et ne constitue pas un processus naturel physiologique courant pour le maintien de la masse β .

iv. Pax4 et Arx

Pax4 fait partie d'une famille de facteurs de transcription clés du développement embryonnaire et de la différenciation cellulaire, par contrôle de la prolifération, la migration et la survie des cellules.

Au niveau du développement du pancréas, il est essentiel à la génération des précurseurs endocrines et la maturation des cellules β (Figure 11) (Collombat et al, 2009; Sosa-Pineda et al, 1997). En effet, les souris invalidées pour Pax4 ne présentent pas de cellules β mais une augmentation des cellules α (Sosa-Pineda et al, 1997). De même, une expression de Pax4 dans des cellules souches embryonnaires humaines permet une différenciation en cellules β (Liew et al, 2008).

Chez l'adulte, il est exprimé majoritairement dans les cellules β et permet le maintien de leur identité cellulaire. Ainsi, une expression ectopique de ce facteur dans les cellules α conduit ces cellules à se transdifférencier en cellules β pancréatiques, permettant la régénération de la masse de cellules β et empêchant ainsi le diabète induit par streptozotocine (Al-Hasani et al, 2013; Collombat et al, 2009). Cependant, de façon surprenante, une surexpression de Pax4 dans des cellules β induit une diminution des marqueurs MafA et Glut2 (Hu He et al, 2011). Ces études montrent son implication dans la plasticité cellulaire.

Des études approfondies du rôle de Pax4 dans les cellules β adultes semblent néanmoins nécessaires pour connaître le rôle de ce facteur dans le maintien de l'identité β .

Il existe, au sein des cellules α , un facteur, ayant un rôle similaire dans la différenciation et le maintien de l'identité α , le facteur de transcription Aristaless Related homeobox (ARX) (Figure 11). Une invalidation totale de ce facteur chez la souris induit une absence de cellules α et une augmentation des cellules β (Collombat et al, 2003). De même, la perte d'Arx au sein des cellules α est suffisante pour induire la conversion de ces cellules en cellules β et régénérer la masse de cellules β détruites par streptozotocine (Courtney et al, 2013). Enfin, une expression forcée d'Arx dans les cellules β entraîne leur conversion en cellules α (Collombat et al, 2007).

Ces différentes études ont conduit à comprendre la relation entre Pax4 et Arx. Ces deux facteurs sont co-exprimés précocement dans le développement embryonnaire. Chacun des facteurs va inhiber l'expression de l'autre, permettant de déterminer l'identité α ou β de la cellule. Ces deux facteurs sont donc des éléments clés de la différenciation et plasticité cellulaire endocrine.

Bien que ces facteurs puissent changer l'identité de précurseurs endocrines *in vitro* ou *in vivo*, ils semblent perdre cette capacité lorsqu'ils sont dérégulés dans des cellules différenciées. En effet, l'expression de Pdx1 ou Nkx6.1 n'est pas suffisante pour convertir des cellules différenciées α en cellules β (Schaffer et al, 2013; Yang et al, 2011b). Comme c'est le cas pour la différenciation des cellules endocrines pendant le développement embryonnaire, la conversion cellulaire fait intervenir de nombreux facteurs qui agissent temporellement et de concert, pour rendre une cellule plastique capable de changer d'identité cellulaire.

Le rôle de ces différents facteurs est à l'heure actuelle très bien connu au cours du développement. Cependant, au sein des cellules endocrines adultes, les mécanismes qui les régulent et les conduisent à contrôler l'identité et la plasticité des cellules endocrines semblent encore flous.

2. Mécanismes contrôlant l'expression des facteurs de transcription essentiels à l'identité des cellules endocrines

i. Voies de signalisation impliquées lors du développement

- *Shh*

Shh a un rôle essentiel dans le développement pour l'induction du pancréas. En effet, il est spécifiquement exclu de l'endoderme pancréatique, pour permettre l'expression de marqueurs caractéristiques de ce tissu (Figure 11) (Hebrok et al, 1998; Kim & Melton, 1998). Ainsi une expression ectopique de Shh dans les cellules exprimant Pdx1 induit une absence de pancréas (Apelqvist et al, 1997).

Chez l'adulte, il est désormais connu que sa signalisation est présente dans les cellules pancréatiques différenciées des îlots et des ductes (Hebrok et al, 2000; Thomas et al, 2000). Mais peu de choses sont décrites sur son rôle. Récemment, une étude *in vivo* a permis de mettre en évidence qu'une augmentation de l'activation de la signalisation Shh au sein des cellules β différenciées induit une dédifférenciation de ces cellules, par perte des facteurs de transcription clé de son identité : l'Insuline, MafA et Nkx6.1. De plus, ces cellules réexpriment le facteur Sox9, caractéristique de cellules progénitrices embryonnaires (Landsman et al, 2011). Ainsi, la voie de signalisation Shh est impliquée dans la plasticité cellulaire pancréatique durant l'embryogenèse mais aussi chez l'adulte.

- *Notch*

Notch est un récepteur de surface cellulaire, dont la voie de signalisation est essentielle au cours du développement embryonnaire du pancréas, dans la différenciation des progéniteurs pancréatiques vers les compartiments endocrines et ductaux. En effet, une répression de sa signalisation induit une expansion excessive du compartiment exocrine. A l'inverse, l'activation constitutive de Notch permet une activation du facteur Nkx6.1 et l'expansion des cellules endocrines (Figure 11) (Afelik et al, 2012; Esni et al, 2004; Murtaugh et al, 2003; Schaffer et al, 2010; Wang et al, 2011).

Bien que des études *in vitro* suggèrent que Notch soit impliqué dans la conversion cellulaire et la génération de cellules productrices d'Insuline (Baeyens et al, 2009; Baeyens et al, 2005), *in vivo*, la surexpression du domaine intracellulaire de Notch (NICD), dans les cellules β différenciées n'a pas induit de phénotype particulier (Murtaugh et al, 2003).

Ainsi, Notch est essentiel au développement mais ne semble pas être impliqué dans la plasticité des cellules adultes.

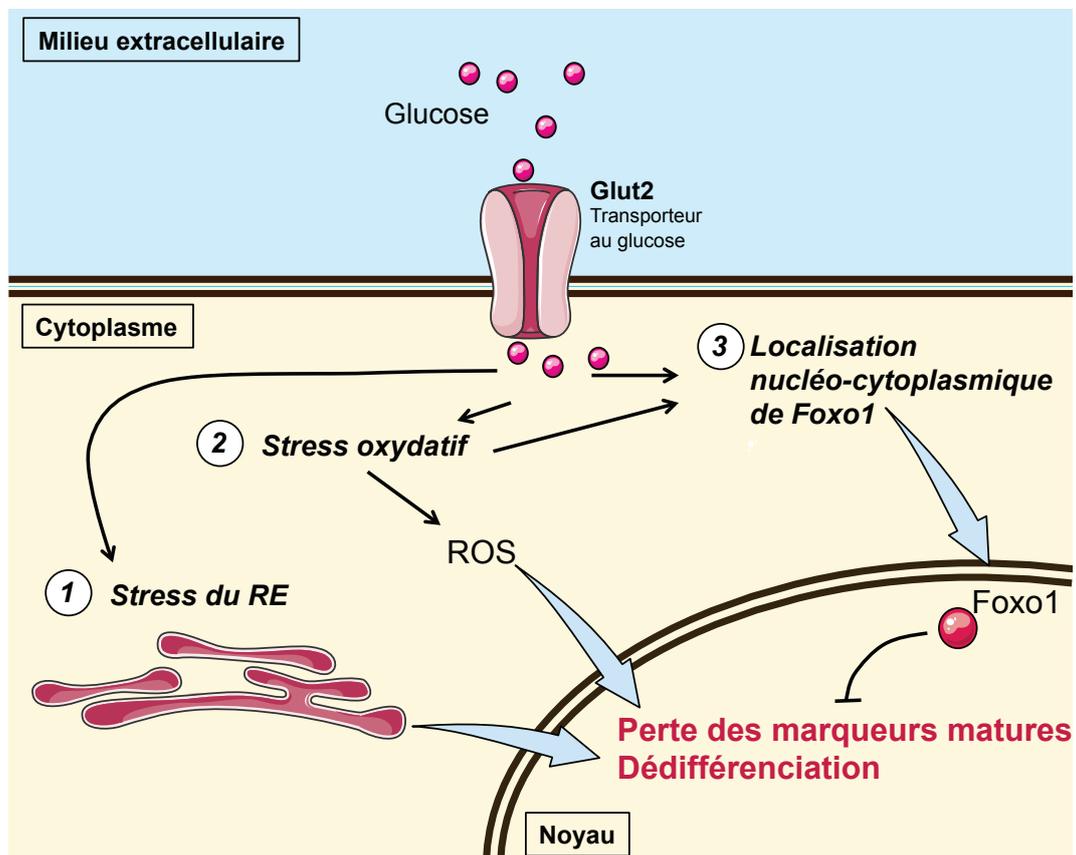
- *TGF- β*

La super-famille des facteurs de croissance transformants ou Transforming Growth Factor β (TGF- β) est composée de nombreux facteurs de croissance, possédant un large spectre de fonctions biologiques, du développement à l'homéostasie des tissus adultes. Ainsi, les ligands de cette famille possèdent des rôles dans la différenciation et la plasticité cellulaire du pancréas endocrine (détaillé en partie III.B.4). Précocement dans le développement, lors de l'induction pancréatique, les ligands BMPs, sécrétés par le mésoderme cardiaque, permettent la spécification du pancréas et du foie (Deutsch et al, 2001; Rossi et al, 2001). Puis, au cours du développement, ces ligands ainsi que les Activins vont jouer un rôle majeur dans le devenir des cellules endocrines et leur différenciation, en contrôlant l'expression de facteurs clés comme Pdx1 et Pax4 pour les cellules β ou Arx pour les cellules α (Figure 11) (Frandsen et al, 2007; Kanno et al, 2006; Mamin & Philippe, 2007). Ainsi, de nombreuses études utilisent désormais les Activins et les BMPs pour générer des cellules produisant l'Insuline *in vitro*, notamment dans les thérapies cellulaires pour les diabètes. Les ligands TGF- β sont moins impliqués durant le développement. Cependant, ils contrôlent l'expression d'Insuline, grâce à leur effecteur Small Mothers against decapentaplegic 3 (Smad3), et donc l'identité des cellules β adultes (Lin et al, 2009).

ii. Mécanismes émergents dans le contrôle de l'identité des cellules endocrines

- *Nutriments et glucose*

La place du glucose dans la néogenèse et la plasticité des cellules pancréatiques a, depuis plusieurs années, été supposée dans des modèles de rats infusés au glucose (Bernard et al, 1999; Jetton et al, 2008; Paris et al, 2003). Ces études ont démontré une augmentation de la masse de cellules β , sans observer de prolifération de celles-ci. Cependant aucune étude approfondie n'a permis d'identifier de cellules précurseurs. Plus récemment, c'est grâce au modèle du poisson-zèbre que les nutriments ont été pointés pour induire la néogenèse des cellules β (Ninov et al, 2013).



***FIGURE 12: LE GLUCOSE, NOUVEAU FACTEUR IMPLIQUÉ DANS LA DEDIFFÉRENCIATION
DES CELLULES β ENDOCRINES***

Le glucose, par son entrée dans la cellule β grâce au transporteur Glut2, induit, lors de variations de concentrations, des mécanismes 1) de stress du réticulum endoplasmique (RE) et 2) de stress oxydatif, qui peuvent conduire à une dédifférenciation. Le glucose est également connu pour contrôler la localisation de Foxo1 (3), facteur de transcription important dans le maintien de l'identité et la fonction de la cellule β (détaillé partie II.C.2.ii).

Les auteurs ont ainsi pu démontrer une augmentation de la prolifération des cellules β existantes, mais également une différenciation de cellules β nouvellement formées à partir de progéniteurs du ducte pancréatique, lors de haute concentration en nutriments. Ceci a également été suggéré pour la pathogenèse du diabète. En effet, dans le cas du diabète de type II, les patients sont hyperglycémiques. Les cellules β deviennent ainsi glucotoxiques et meurent par apoptose. Cependant, des études ont montré que les fortes concentrations en glucose induisent un stress du réticulum endoplasmique (RE) et un stress oxydatif (Reactive oxygen species ROS), conduisant à une dédifférenciation des cellules β (Figure 12) (Guo et al, 2013; Lombardi et al, 2012; Robertson, 2004).

Enfin, le glucose pourrait, comme le stress oxydatif, réguler la localisation nucléocytoplasmique de facteurs de transcription, comme Foxo1, déjà impliqué dans la plasticité cellulaire et le développement de diabète (détaillé en partie II.B.3.ii). En effet, en cas d'hyperglycémie, ce facteur est retrouvé au niveau des noyaux des cellules endocrines β , permettant ainsi d'agir sur le contrôle de l'identité de ces cellules endocrines (Figure 12) (Talchai et al, 2012b).

Il semble que les nutriments et le glucose aient une place importante dans la plasticité cellulaire et pourraient alors avoir un rôle clé dans la pathogenèse du diabète.

- *Cytokines proinflammatoires*

Les cytokines proinflammatoires ont été impliquées dans la pathogenèse des diabètes de type I et de type II. Dans le premier cas, l'infiltration des cellules immunitaires mononucléaires induit une sécrétion de Tumor Necrosis Factor α (TNF α), Interferon γ (IFN γ) et Interleukin-1 β (IL-1 β) au sein des îlots pancréatiques et la destruction des cellules β . Pour le diabète de type II, le TNF α et l'Interleukin-6 (IL-6) sont sécrétés par les adipocytes et l'IL-1 β par les cellules β endocrines, lors d'hyperglycémie (Donath et al, 2003; Maedler et al, 2002). Ces cytokines, constituant l'environnement cellulaire des îlots pancréatiques dans ces pathologies, pourraient être impliquées dans la plasticité cellulaire des cellules endocrines. Une étude de Oetjen et coll. a pu montrer le rôle de l'IL-1 β sur la transcription du gène de l'Insuline *in vitro*. En effet, la présence de cette cytokine induit une diminution de l'activité du promoteur de l'Insuline sur des cellules β HIT (cellules tumorales d'insulinomes d'hamster) (Oetjen et al, 2007). Ce rôle sur la transcription serait médié par l'inhibition du

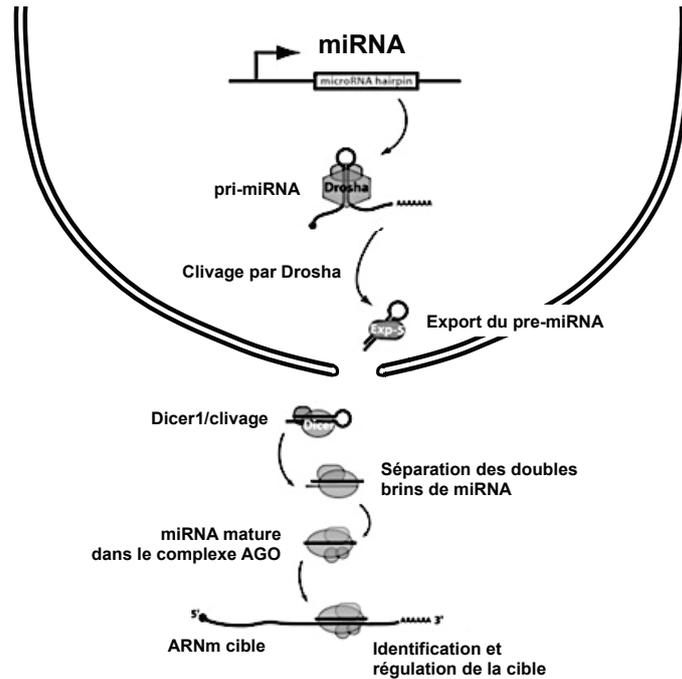


FIGURE 13: PROCESSUS DE SYNTHÈSE ET DE MATURATION DES MIR

Transcrits à partir d'une séquence d'ADN spécifique, les miR, ou miRNA, vont subir différents clivages par les protéines Drosha et Dicer1. Ils sont ensuite exportés par l'Exportine 5 dans le cytoplasme où ils se lient à leur ARNm cible, provoquant sa dégradation ou sa répression traductionnelle.

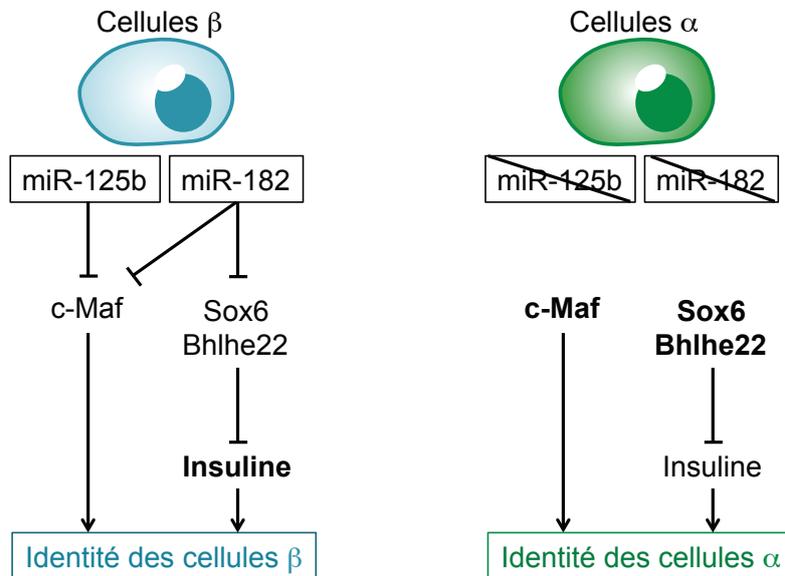


FIGURE 14: RÔLE DES MIR DANS LE MAINTIEN DE L'IDENTITÉ DES CELLULES ENDOCRINES β ET α

Les miR-125b et miR-182 ont été montrés essentiels dans le maintien de l'identité des cellules β , par l'inhibition d'expression du facteur c-Maf ou des inhibiteurs d'Insuline, Sox6 et Bhlhe22. Ces miR ne sont pas retrouvés exprimés au sein des cellules α , expliquant l'expression du c-Maf et l'absence d'expression d'Insuline.

facteur de transcription MafA, important dans la transcription de l'Insuline. Dans le même sens, une stimulation au TNF α inhibe l'expression d'Insuline dans des cellules β MIN6 d'insulinomes murins, par inhibition de la transcription des facteurs clés MafA et Pdx1 (Zhao et al, 2012). Les cytokines proinflammatoires peuvent donc être importantes pour le contrôle de la fonction des cellules β mais également pour leur identité, en agissant sur les facteurs de transcription caractéristiques de ces cellules.

- *Les miR*

Les miR ou microARN sont des petits ARNs non codants se liant à la région 3'UTR (Untranslated Region) des ARN messagers (ARNm), pour les dégrader et ainsi inhiber la production de la protéine (Figure 13).

Ces dix dernières années, différentes études ont montré l'implication de ces miR dans le développement et la différenciation des cellules endocrines pancréatiques (Kaspi et al, 2014). La perte de l'enzyme Dicer, contribuant à l'établissement des miR, conduit à une agénèse du pancréas chez la souris, avec un défaut de développement de tous les types cellulaires pancréatiques (Lynn et al, 2007). Ceci correspond au même phénotype que dans les souris invalidées pour le facteur de transcription Pdx1, essentiel pour l'émergence et la différenciation des progéniteurs pancréatiques (Jonsson et al, 1994).

De plus, des études récentes ont montré un rôle des miR dans le maintien de l'identité des cellules endocrines, particulièrement β (Klein et al, 2013). Ainsi, grâce à un criblage des différents miR exprimés dans chaque type cellulaire endocrine pancréatique, Klein et *coll.* ont pu mettre en évidence l'expression de 13 miR principaux dans les cellules α et 171 dans les cellules β . Une étude plus approfondie du proto-oncogène c-Maf, exprimé exclusivement dans les cellules α , leur a permis de montrer que certains miR surexprimés dans les cellules β *in vitro*, vont se fixer sur l'ARNm du c-Maf, permettant sa dégradation et le maintien de l'identité β (Figure 14). Dans les cellules α , ces miR sont absents ou très faibles, expliquant l'expression de ce facteur.

Dans le même sens, les miR permettraient de réguler l'expression d'Insuline dans les cellules β . Ainsi, dans des souris ne pouvant produire de miR, par une invalidation totale de l'enzyme Dicer (Melkman-Zehavi et al, 2011) ou spécifique dans les cellules β (Kalis et al, 2011), une perte d'Insuline est observée.

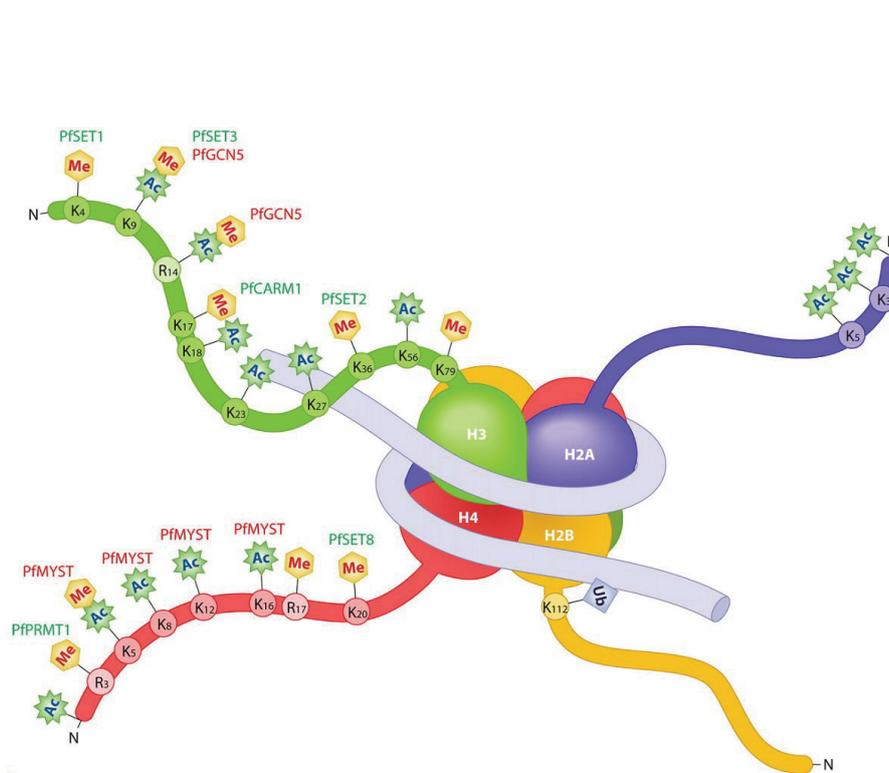


FIGURE 15: REPRESENTATION D'UN NUCLEOSOME (CUI & MIAO, 2010)

Les nucléosomes sont constitués de 4 histones différents (H2A, H2B, H3, H4), représentés deux fois, formant ainsi un octamère. C'est autour de cette structure que s'enroule la chromatine (en gris). Ces protéines sont hautement conservées entre espèce (exemple ici chez le *Plasmodium falciparum*, Pf). Comme chez les mammifères, des méthylations (ici en jaune) ou acétylations (en vert) de certains résidus de ces histones permettent de réguler cet enroulement et ainsi la condensation de la chromatine. La majorité des modifications, catalysées par des enzymes spécifiques (noté au-dessus de chaque modification), ont lieu sur les histones H3 et H4.

Les miR, présents en condition normale, permettraient ainsi, au sein des cellules β , une dégradation et répression des inhibiteurs de la transcription d'Insuline, comme SRY box 6 (SOX6) ou Basic Helix-Loop-Helix family, member E22 (BHLHE22), et ainsi une production de l'hormone (Figure 14) (Melkman-Zehavi et al, 2011).

Ces études mettent en avant le rôle que pourrait avoir les miR dans la plasticité cellulaire et les conversions entre cellules. Il a été notamment montré que les souris invalidées pour Dicer ont une augmentation des gènes neuronaux au niveau des cellules endocrines (Kanji et al, 2013). Dans ce cas, la perte des miR rendrait les cellules endocrines plastiques et permettraient une redirection vers un type neuronal. Une dérégulation des miR pourrait ainsi permettre l'expression de facteurs de transcription clés d'un type cellulaire, comme Pax4 ou Arx, conduisant à la conversion cellulaire.

- *Modifications épigénétiques*

Les modifications épigénétiques sont des processus qui permettent de contrôler la condensation de la chromatine et l'accessibilité des facteurs de transcription sur cette dernière. Grâce à ces mécanismes, l'expression des gènes est régulée au niveau transcriptionnelle. On retrouve la méthylation de l'ADN et les modifications des histones.

La méthylation de l'ADN s'effectue grâce à des enzymes DNA Methyltransférases (DNMT), comme DNMT1. Cette enzyme a été montrée impliquée dans le maintien de l'identité des cellules β endocrines. En effet, une invalidation spécifique de Dnmt1 dans les cellules β murines conduit à une perte progressive des méthylations de l'ADN et une conversion des cellules β en cellules α (Bramswig et al, 2013). Ceci est dû à une réactivation dans ces cellules du gène Arx suite à la déméthylation (Dhawan et al, 2011). Ainsi, la déméthylation de l'ADN peut être un processus impliqué dans les phénomènes de plasticité cellulaire du pancréas endocrine par modification d'expression des gènes clés des cellules comme Pax4 ou Arx.

Les modifications d'histones font aussi partie de la régulation épigénétique de l'expression des gènes. Ces protéines constituent les nucléosomes, structures enroulant la chromatine et permettant sa condensation. Les modifications sur les résidus des histones, comme l'acétylation ou la méthylation (Figure 15), vont permettre de modifier la conformation de la chromatine autour des nucléosomes, rendant ou non possible l'accès des facteurs de transcription.

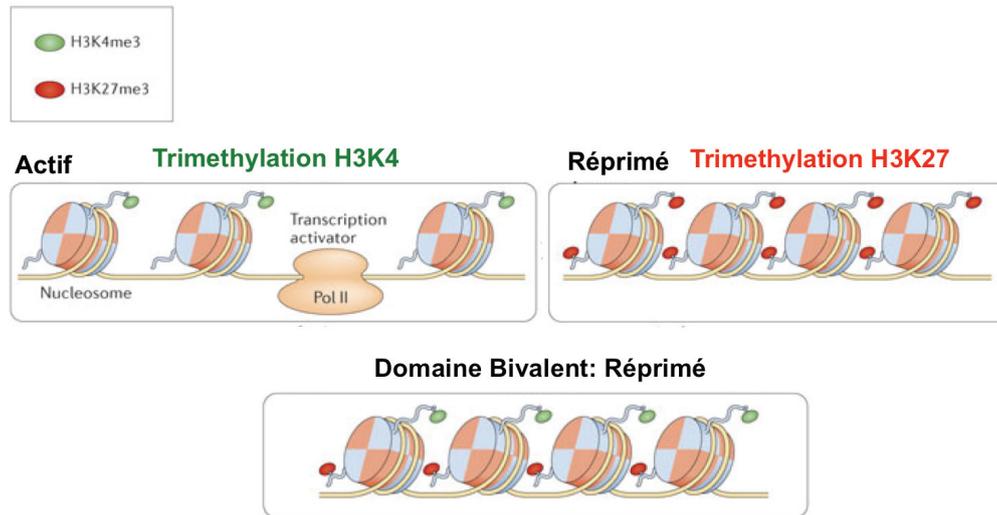


FIGURE 16: REPRESENTATION DES DOMAINES BIVALENTS (WENG ET AL., 2012)

La majorité des promoteurs de gènes vont posséder soit une triméthylation en position H3K4, conduisant à un état décondensé de la chromatine et à une accessibilité des facteurs de transcription, soit une triméthylation en position H3K27, qui, à l'inverse, ne permet pas une fixation à l'ADN de facteurs. Les domaines bivalents, quant à eux, possèdent les deux types de marques, qui conduisent à une répression de la transcription (détaillé en partie II.C.3.ii).

Ces modifications ont été impliquées dans le développement du pancréas et la détermination des devenir cellulaires. Tout d'abord, les enzymes Histone Déacetylases (HDAC) de classe I, qui sont responsables de la déacétylation des histones, semblent promouvoir le développement des cellules endocrines (Haumaitre et al, 2008). Les HDAC de classe IIa limitent quant à elles les étapes finales de différenciation des cellules β , en inhibant l'expression de Pax4. En effet, une invalidation des HDAC5 et 9 chez la souris augmente le nombre de cellules β (Lenoir et al, 2011). De même, les méthylation des histones sont importants au cours du développement embryonnaire. En effet, depuis quelques années, il a été décrit la présence de gènes développementaux bivalents, possédant des histones aux méthylation activatrices (triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 ou H3K4me3) et inhibitrices (triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 ou H3K27me3) au sein de la même région (Figure 16). Ces doubles marques permettent une répression de la transcription mais également une rapide activation quand le gène est nécessaire, notamment au cours du développement (Voigt et al, 2013).

Pdx1 est décrit comme un gène bivalent. Il est réprimé avant le stade des progéniteurs pancréatiques, puis à E10,5 les marques H3K27me3 sont perdues, permettant sa rapide expression dans les progéniteurs multipotents (van Arensbergen et al, 2010). Ainsi, il pourrait être possible que certains gènes spécifiques de la différenciation des cellules endocrines restent bivalents dans les cellules différenciées et qu'une modification de leurs marques induise leur répression ou expression, résultant en une conversion cellulaire.

En conclusion, les cellules pancréatiques peuvent être plastiques et se convertir en un autre type cellulaire pancréatique. Ceci fait intervenir des facteurs de transcription clés des différents types cellulaires, mais également des mécanismes régulant leur expression. C'est la combinaison de tous ces éléments qui conduit à une plasticité cellulaire.

PARTIE III:
LA SUPER-FAMILLE TGF- β ET
LE PANCREAS ENDOCRINE

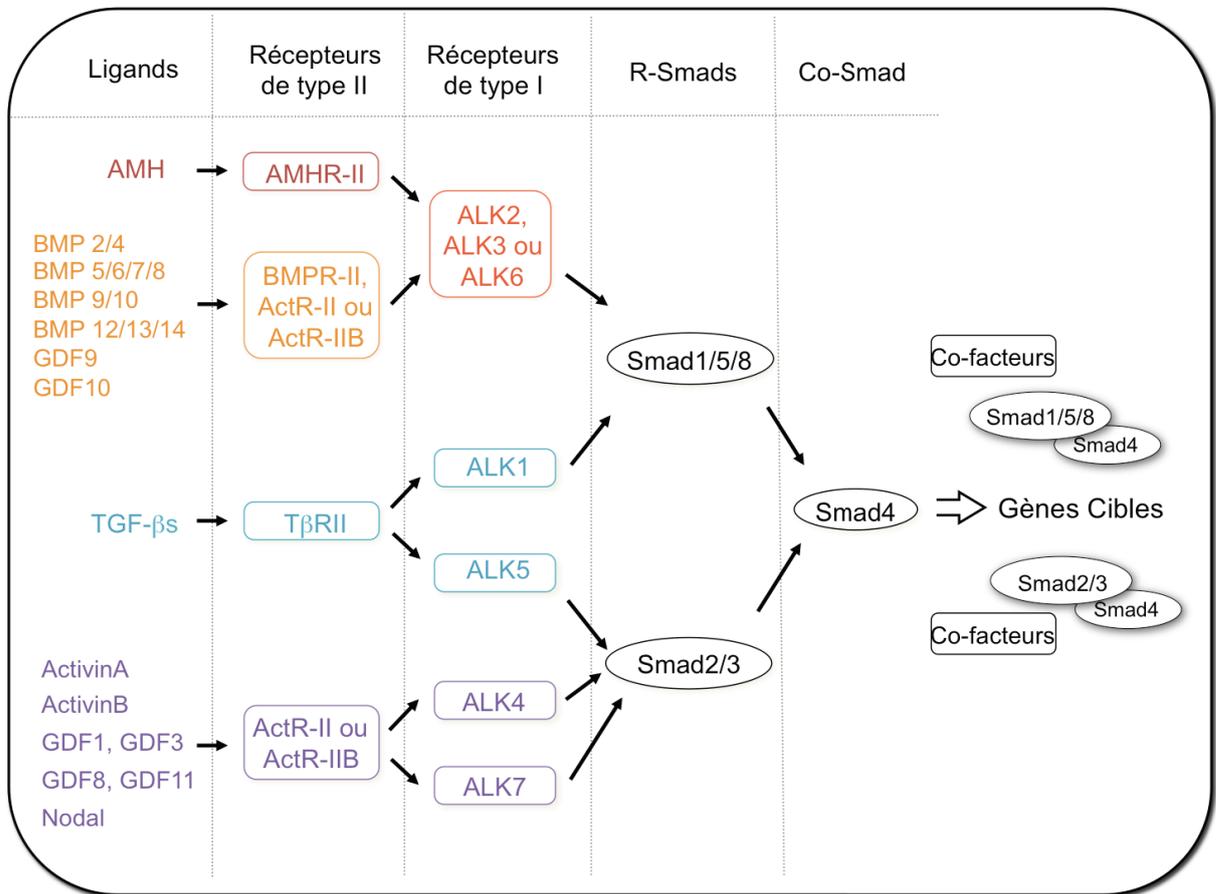


FIGURE 17: REPRESENTATION DES DIFFERENTS MEMBRES DE LA FAMILLE TGF-β

La famille TGF-β est composée de 5 sous-groupes de ligands, qui, grâce à des récepteurs de type I et II spécifiques, vont induire une réponse intracellulaire, à travers des effecteurs communs, appelés Smad, pour contrôler l'expression de gènes cibles (détaillé partie II.A).

A. DESCRIPTION DE LA FAMILLE TGF- β

La super-famille TGF- β est connue pour son large spectre de fonctions, impliquées aussi bien dans le développement embryonnaire, que la fonction des tissus adultes et leurs pathologies. Au sein de cette famille de facteurs de croissance, on retrouve 5 grands sous-groupes : les TGF- β , les BMPs, les Activins, les facteurs de croissance et différenciation ou Growth and Differentiation Factors (GDFs) et l'hormone anti-Müllérienne (AMH) (Figure 17). A l'heure actuelle, 33 ligands ont été décrits (Derynck & Miyazono, 2008). Ils induisent une réponse cellulaire, grâce à un complexe de récepteurs, activant des effecteurs intracellulaires.

1. Les différents membres de la famille

i. Les ligands

Ces facteurs de croissance, phylogénétiquement très proches (Figure 18), sont synthétisés à partir d'un polypeptide précurseur, contenant un propeptide et un domaine mature en région C-terminale. Après différentes étapes de clivages protéolytiques et de maturation post-traductionnelle, des homodimères ou hétérodimères matures sont formés.

- *Les TGF- β s*

Trois isoformes du TGF- β ont été décrites (TGF- β 1, 2 et 3). Ces ligands existent avant tout comme homodimères, mais une forme hétérodimérique TGF- β 1/2 a été identifiée (Cheifetz et al, 1987). Lors de leur sécrétion hors de la cellule, les dimères restent associés par liaisons non covalentes à leur propeptide, ou domaine de latence Latent Associated Protein (LAP), qui nécessite une dissociation pour que le ligand soit actif et se fixe à son récepteur (Bottinger et al, 1996).

- *Les BMPs*

Les BMPs ont été mis en évidence dans les années 65 pour leur capacité à stimuler la synthèse osseuse (Urist, 1965).

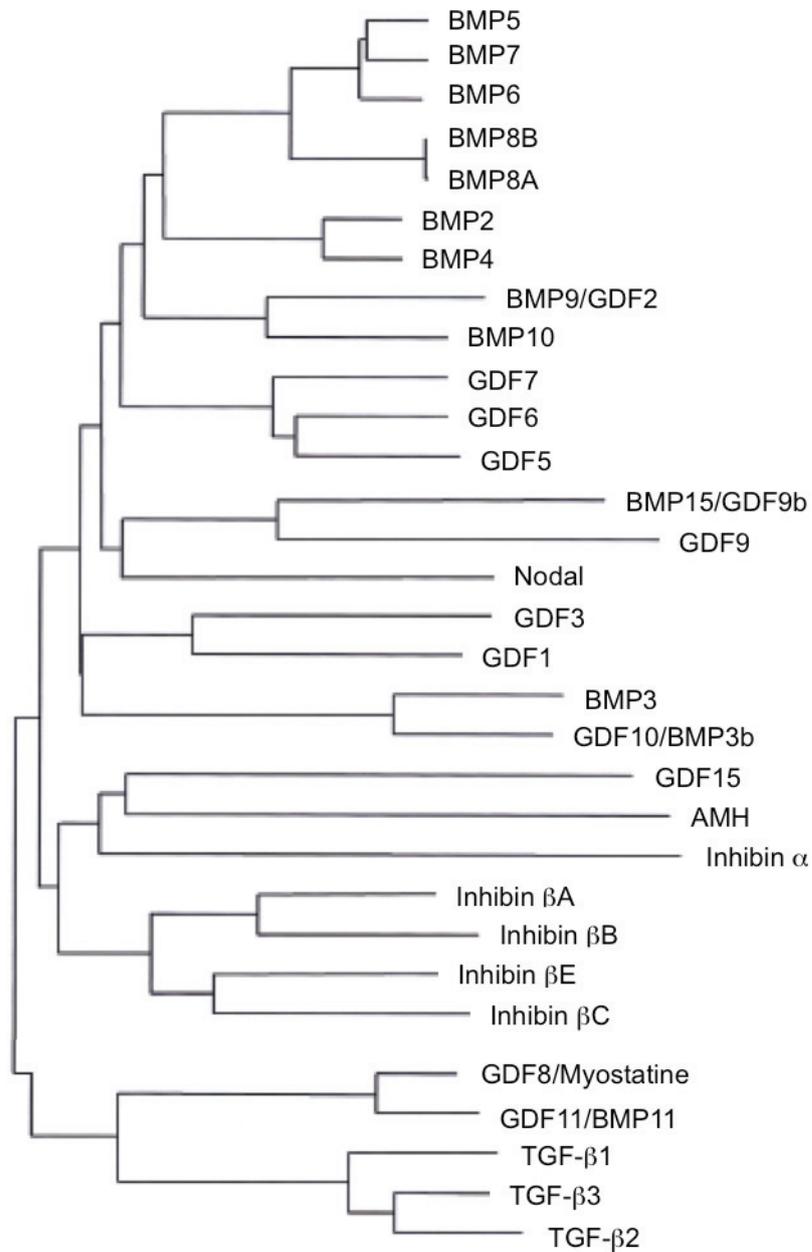


FIGURE 18 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES DIFFERENTS LIGANDS DE LA FAMILLE TGF- β
(DERYNCK & MIYAZONO, 2008)

C'est la plus grande sous-famille du TGF- β (Kawabata et al, 1998; Lavery et al, 2008), comprenant une vingtaine de membres, sous-divisés en 4 sous-groupes : BMP2/4 ; BMP5/6/7/8 ; BMP9/10 et BMP12/13/14 (Mazerbourg & Hsueh, 2006; von Bubnoff & Cho, 2001). Mis à part les BMP3 et 15, qui sont actifs en monomères, tous les BMPs forment des complexes homo- ou hétérodimériques (BMP2/5 ; BMP2/6 ; BMP2/7 ; BMP4/7) (Israel et al, 1996; Little & Mullins, 2009; Sieber et al, 2009). Une fois synthétisés, les ligands peuvent être sécrétés avec ou sans leur prodomaine.

La disponibilité des ligands à l'extérieur de la cellule va être régulée, grâce aux interactions avec la matrice extracellulaire, en particulier la fibrilline, capable d'interagir avec les BMPs matures ou ceux liés à leur prodomaine, mais également grâce à des inhibiteurs des formes matures (Brown et al, 2005; Sengle et al, 2008a; Sengle et al, 2008b). Les ligands BMPs possèdent trois types d'inhibiteurs, qui leur sont spécifiques : Noggin, Chordin et les membres de la famille des DANs (Differential screening selected gene Abberative in Neuroblastoma). Bien que structurellement différentes, ces protéines vont avoir une action spécifique sur la famille BMP, en bloquant l'interaction des ligands avec les récepteurs. Elles ont été décrites avant tout pour leur rôle au cours de l'embryogenèse (Piccolo et al, 1999; Piccolo et al, 1996; Yokouchi et al, 1999; Zimmerman et al, 1996). Une autre famille d'inhibiteurs, la Follistatin (FST) et les Follistatin-like (FSTL), sont connus pour interagir avec certains ligands BMPs, comme BMP4, BMP5, BMP6, BMP7 et BMP15 (Rider & Mulloy, 2010). Cependant, cette interaction reste de plus faible affinité que pour les ligands Activins.

- *Les Activins*

Les Activins sont des protéines homo ou hétérodimériques, dont les sous-unités appelées β sont reliées par pont disulfure (Walton et al, 2012). Chez l'homme, comme chez la souris, il existe 4 gènes codant 4 sous-unités β différentes : Inhibin beta A (INHBA), Inhibin beta B (INHBB), Inhibin beta C (INHBC) et Inhibin beta E (INHBE), donnant respectivement les sous-unités β A, β B, β C et β E. Les ligands les plus étudiés sont l'ActivinA (β A/ β A) et l'ActivinB (β B/ β B). Leurs actions peuvent être inhibées par la Follistatin (FST) ou Follistatin-like (FSTL) (Nakamura et al, 1990). Ces inhibiteurs vont neutraliser les ligands en recouvrant les sites de fixation aux récepteurs (Stamler et al, 2008; Thompson et al, 2005).

Au sein de cette sous-famille, on retrouve également les Inhibins, InhibinA et B, hétérodimériques, qui possèdent une structure similaire aux Activins, mais comprenant une sous-unité α associée respectivement à une sous-unité β A ou β B (Phillips & Woodruff, 2004). Elles vont se lier, grâce à leur co-récepteur Betaglycan, aux récepteurs de type II des Activins, les empêchant de s'y fixer (Gray et al, 2000; Mathews & Vale, 1991; Mathews et al, 1992).

Nodal est un ligand apparenté aux Activins, par sa capacité à induire une voie intracellulaire similaire. Contrairement, aux Activins, il a besoin d'un co-récepteur, Cripto, pour activer les effecteurs intracellulaires. Cripto est une petite protéine liée à la membrane par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI). Il est connu pour son rôle de co-récepteur de Nodal au cours de l'embryogenèse (Schier & Shen, 2000). Cependant, il va également agir comme un inhibiteur non compétitif des ligands Activins, en formant un complexe avec l'ActivinA et ses récepteurs, qui induit une signalisation plus faible qu'en son absence (Gray et al, 2003; Kelber et al, 2008).

- *Les GDFs*

Ce sous-groupe de facteurs de croissance est beaucoup moins décrit et étudié que les précédents. Selon leur complexe de récepteurs auxquels ils s'associent, ils peuvent activer une voie de signalisation TGF- β /Activin ou BMP. Ainsi, GDF1, GDF3, GDF8 (connu sous le nom Myostatine) et GDF11 vont être associés à une signalisation Activins, utilisant comme Nodal, le co-récepteur Cripto (Andersson et al, 2007; Cheng et al, 2003; Gray & Vale, 2012). En revanche, GDF10 et GDF9 vont utiliser les récepteurs et effecteurs des BMPs. Pour d'autres GDFs, comme GDF15, aucune étude n'a actuellement décrit ses récepteurs. Comme pour les ligands Activines et BMPs, la follistatin peut inhiber la fonction de certains ligands GDFs. Ceci est notamment décrit pour GDF8/Myostatine, où son inhibition par la FST conduit à une augmentation de la masse musculaire (Cash et al, 2009).

- *L'AMH.*

L'AMH est un homodimère, connu pour son rôle dans la détermination sexuelle mâle, par sa capacité à régresser les ductes Müllériens (Josso & Clemente, 2003) (Broekmans et al, 2008).

TABLEAU 4: TABLEAU RECAPITULATIF DES DIFFERENTS RECEPTEURS DE LA FAMILLE TGF- β ET LES GENES QUI LES CODENT

	Nom du gène	Nom de la protéine
Récepteurs de type I	<i>ACVR1L</i>	ALK1
	<i>ACVR1</i>	ALK2
	<i>BMPR1A</i>	ALK3
	<i>ACVR1B</i>	ALK4
	<i>TGFBR1</i>	ALK5
	<i>BMPR1B</i>	ALK6
	<i>ACVR1C</i>	ALK7
Récepteurs de type II	<i>TGFBR2</i>	T β RII
	<i>ACVR2A</i>	ActRIIA
	<i>ACVR2B</i>	ActRIIB
	<i>BMPR2</i>	BMPRII
	<i>AMHR2</i>	AMHRII
Récepteurs de type III	<i>TGFBR3</i>	Betaglycan
	<i>ENG</i>	Endoglin

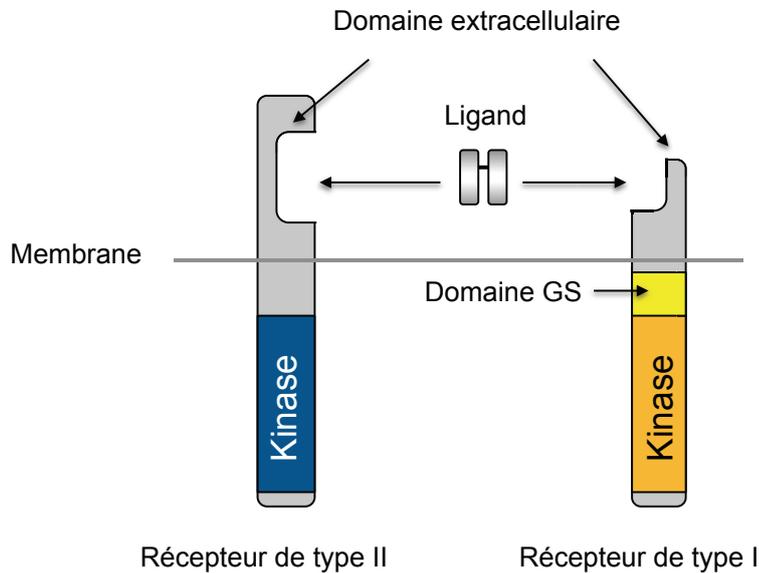


FIGURE 19: STRUCTURE DES RECEPTEURS DE TYPE I ET II DE LA FAMILLE TGF- β

Les deux types de récepteurs de la famille TGF- β possèdent une structure similaire avec un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une région cytoplasmique. Le récepteur de type I possède quant à lui une boîte riche en glycine-sérine (GS), essentielle à son activation par le récepteur de type II.

ii. Les récepteurs

• Les récepteurs de type I

Il est décrit 7 récepteurs de type I, Activin-Like Kinase 1 à 7 (ALK1 à ALK7), codés par des gènes spécifiques (Tableau 4). Ces protéines possèdent un domaine extracellulaire riche en cystéine, un domaine transmembranaire à hélice, une région cytoplasmique sérine-thréonine, responsable de kinase, mais également une boîte riche en glycine-sérine (GS), essentielle à leur activation (Figure 19) (Mathews & Vale, 1991; ten Dijke et al, 1993). Chaque récepteur va être associé préférentiellement à une famille de ligand (Figure 17).

• Les récepteurs de type II

Il existe 5 récepteurs de type II (Tableau 4) : TGF- β Receptor II (T β RII), Activin Receptor IIA et IIB (ActRIIA et ActRIIB), BMP Receptor II (BMPRII) et AMH Receptor II (AMHRII). Ils possèdent la même structure que les récepteurs de type I, mais contrairement à eux, ils n'ont pas de boîte GS, et sont constitutivement actifs (Figure 19).

• Les récepteurs de type III : Betaglycan et Endoglin

Le Betaglycan est une glycoprotéine transmembranaire, qui possède un large domaine extracellulaire, ainsi qu'une région cytoplasmique courte, sans activité kinase (Lopez-Casillas et al, 1991). Il favorise la présentation du TGF- β aux récepteurs de type II (Lopez-Casillas et al, 1993). De plus, il est décrit pour lier les Inhibins et former un complexe avec le récepteur de type II, ActRII, inhibant ainsi la fixation du ligand Activin et le recrutement du récepteurs de type I (Chapman et al, 2002; Lewis et al, 2000; Wiater et al, 2009). Enfin, plus récemment, il a été montré que les ligands BMP2, BMP4, BMP7 et GDF5 sont capables de se lier au Betaglycan, agissant ainsi sur leur signalisation (Kirkbride et al, 2008).

L'Endoglin est une glycoprotéine membranaire, composée d'un domaine extracellulaire glycosylé et d'un domaine cytoplasmique constitutivement actif. Cette protéine accessoire n'induit pas directement de signalisation cellulaire, mais module la réponse de différents ligands de la famille TGF- β . Il est notamment connu pour son rôle, au niveau des cellules endothéliales en prolifération, où il favorise la croissance cellulaire au travers du complexe TGF- β /ALK1 et inhibe les fonctions du TGF- β avec ALK5 (ten Dijke et al, 2008). Ses fonctions ont été élargies aux BMPs et Activins (Barbara et al, 1999).

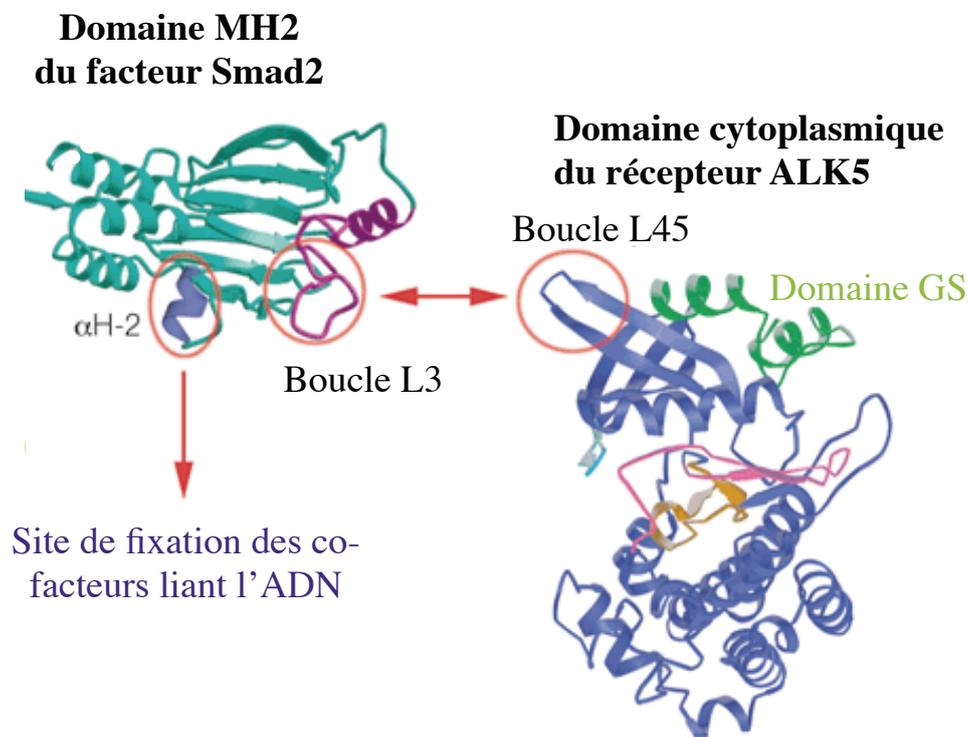


FIGURE 20: REPRESENTATION CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE ENTRE LES SMADS ET LES RECEPTEURS DE TYPE I (MASSAGUE, 2000)

Une spécificité de substrat des récepteurs de type I pour les Smads prend place grâce à une différence en acides aminés au niveau de la boucle L3 du domaine MH2 des Smads et de la boucle L45 du domaine cytoplasmique des récepteurs ALK. Cet exemple montre la spécificité du récepteur ALK5 pour Smad2 (détaillé partie II.A.2.i).

Il va ainsi interagir avec les récepteurs de type I, comme ALK1, et les récepteurs de type II, T β RII, ActRIIA et ActRIIB.

iii. Les effecteurs Smads

Les différents ligands de la famille TGF- β vont induire un signal intracellulaire grâce à des effecteurs appelés les Smads. Ils sont composés de deux domaines Mad Homology domain MH1, responsable de la liaison à l'ADN, et MH2, responsable de l'activité transcriptionnelle, liés par une région dite « Linker » (Shi et al, 1997; Shi et al, 1998). Il existe 3 sous classes de Smads (Massague et al, 2005). Les Smads activés par les récepteurs (Receptor-activated SMAD ou R-SMAD), au nombre de 5 (Smad1, 2, 3, 5, 8), vont être phosphorylés par les récepteurs de type I. Puis, ils vont se lier à Smad4, appelé « médiateur commun » (Common mediator SMAD ou Co-SMAD), pour aller dans le noyau et réguler la transcription des gènes cibles. La dernière classe d'effecteurs, les Smads inhibiteurs (Inhibitor-SMAD ou I-SMAD), Smad 6 et 7, vont inhiber la transduction du signal respectivement, au niveau de l'interaction avec Smad4 et au niveau de la phosphorylation des R-Smads.

2. Les voies de signalisation

Les ligands de la famille TGF- β possèdent deux types de voies de signalisation : le premier par les effecteurs Smads est dit « canonique », le deuxième, indépendante des Smads est dite « non canonique ». Il existe trois voies de signalisation « non canoniques », décrites pour être activées par les ligands et réguler leurs fonctions clés : la voie des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPKinases), la voie PhosphoInositide 3 Kinase (PI3K) et la voie des Guanosine TriPhosphatases (GTPases) (Zhang, 2009). Elles ont surtout été décrites pour les ligands TGF- β , mais sont désormais impliquées lors de stimulations aux BMPs et Activins. Je ne traiterai en détail que de la voie de signalisation « canonique ».

i. Voie de signalisation « canonique » : spécificité des récepteurs de type I pour les Smads

Il est désormais bien connu, qu'il existe une spécificité de substrat des récepteurs de type I pour certains Smads (Figure 20). En effet, grâce à une variation de séquences d'acides aminés dans la boucle L45 des récepteurs de type I et la boucle L3 des Smads, les récepteurs ALK4, ALK5 et ALK7 vont phosphoryler les Smad2 et Smad3, alors que les récepteurs ALK1,

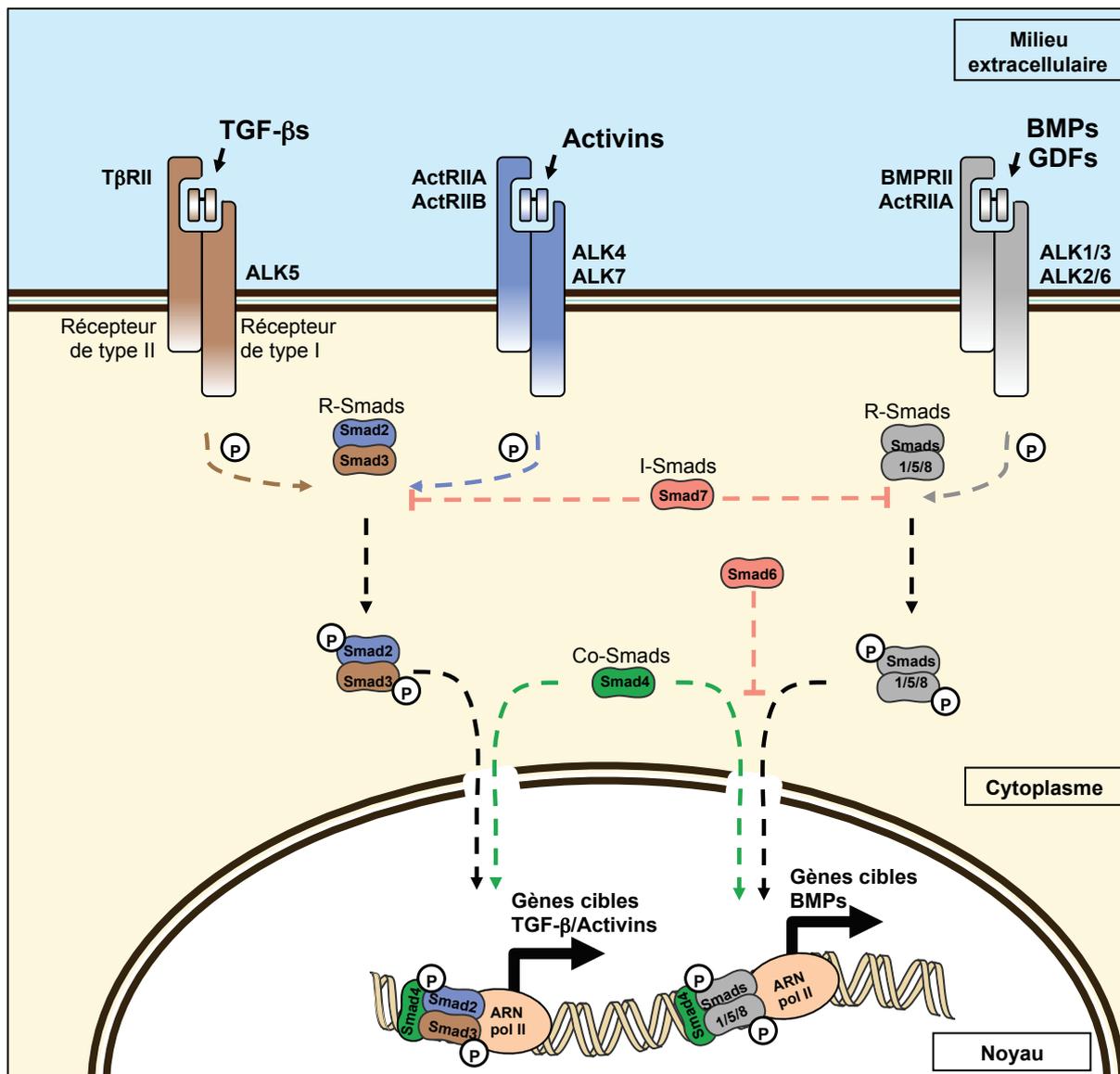


FIGURE 21 : VOIE DE SIGNALISATION « CANONIQUE » DE LA FAMILLE TGF-β

Grâce à la spécificité des récepteurs de type I pour certains effecteurs Smads, la signalisation des ligands de la famille est divisée en deux : d'un côté la signalisation TGF-β/Activins/Nodal (à gauche) et de l'autre la signalisation BMP/GDF (à droite). Dans les deux cas, les ligands, au travers de leurs récepteurs et effecteurs, contrôlent dans le noyau la transcription de leurs gènes cibles spécifiques.

ALK2, ALK3 et ALK6 vont activer les Smad1, Smad5 et Smad8 (Chen et al, 1998; Miyazawa et al, 2002). Cette spécificité a divisé en deux la voie de signalisation de la famille TGF- β : la signalisation TGF- β /Activins/Nodal d'un côté et BMP/GDF de l'autre (Figure 21). Cependant, cette représentation est restrictive et simpliste. En effet, il a été décrit que certains GDFs comme GDF1, GDF3, GDF8 ou GDF11 vont activer la voie TGF- β /Activins (Andersson et al, 2007; Andersson et al, 2006; Rebbapragada et al, 2003). De même, il est bien acquis que les Activins transduisent leur signal grâce à ALK4/7 et les Smad2 et Smad3. Mais des études récentes ont rapporté un effet de l'ActivinB sur les Smad1/5/8 (Besson-Fournier et al, 2012). En effet, il a été démontré que l'ActivinB est capable de se fixer au récepteur ALK3 et induire une signalisation BMP.

ii. Voie de signalisation « canonique » : mécanisme de signalisation

Les ligands vont se fixer sur un homodimère de récepteurs de type I ou II présents à la surface de la cellule (Figure 21). Les ligands TGF- β , Activins, BMP6 et BMP7 vont préférentiellement lier leurs récepteurs de type II, qui va permettre le recrutement d'un homodimère de récepteur de type I (Greenwald et al, 2003; Wrana et al, 1992). A l'inverse, les BMP2 et BMP4 vont se fixer préférentiellement sur leurs récepteurs de type I, ALK3 ou ALK6 pour recruter les récepteurs de type II et former le complexe ligand-récepteurs (Koenig et al, 1994; Macias-Silva et al, 1998). Le second type de récepteur est alors recruté pour former un complexe tétramérique. Le domaine kinase du récepteur de type II va alors phosphoryler des résidus du domaine GS du récepteur de type I, menant à son activation. Le domaine kinase du récepteur ALK va alors phosphoryler à son tour les effecteurs Smads, qui lui sont spécifiques, qui vont se lier à Smad4 et transloquer dans le noyau, où ils régulent la transcription des gènes cibles (Schmierer & Hill, 2007).

iii. Voie de signalisation « canonique » : réponse transcriptionnelle des Smads.

Les effecteurs Smads ont la capacité, avec leur domaine MH1, de se lier à l'ADN sur un motif spécifique CAGAC, appelé Smad-Binding Element (SBE). Cependant, cette liaison est de faible affinité. Ainsi, la réponse transcriptionnelle des Smads nécessite leur interaction avec d'autres facteurs de transcription, afin d'activer ou réprimer la transcription de gènes cibles ou de contrôler l'ouverture de la chromatine (Feng & Derynck, 2005; Massague, 2012).

La régulation de la transcription des gènes cibles des complexes R-Smad-Smad4 est finement contrôlée, grâce à leur association avec différents facteurs de transcription, se liant à l'ADN (Feng & Derynck, 2005). Tout d'abord, ces partenaires vont fournir une spécificité dans les gènes cibles. Ainsi, les Smad2/3 et Smad1/5/8 vont posséder des cibles différentes, spécifiant une réponse TGF- β /Activins ou BMP. De plus, les protéines recrutées vont spécifier l'effet transcriptionnel sur les gènes, c'est-à-dire induire une réponse inhibitrice ou activatrice. Enfin, certains de ces co-facteurs vont permettre d'assurer une réponse des ligands TGF- β , spécifique du type cellulaire impliqué (Mullen et al, 2011).

Les complexes Smads sont également importants dans le contrôle de la structure de la chromatine et la régulation épigénétique (Xi et al, 2011). En effet, ils peuvent permettre en association avec des Histones AcétylTransférases (HAT) ou des HDACs, une modification des marques des histones et conduire à un changement de conformation de la chromatine (Ross et al, 2006). Enfin, les Smads sont capables en association avec le facteur Foxo ou des déméthylases de contrôler la méthylation de l'ADN et donc l'accessibilité de facteurs de transcription à leur gène (Thillainadesan et al, 2012).

La variété de rôles et d'effets des Smads montre la complexité des régulations transcriptionnelles exercées par les ligands TGF- β . Il est donc compliqué de définir une réponse consensus, qui dépend du ligand impliqué mais également du contexte cellulaire.

B. ROLE DES MEMBRES DE LA FAMILLE TGF- β DANS LE DEVELOPPEMENT ET LA PLASTICITE DU PANCREAS ENDOCRINE

La super-famille du TGF- β a, depuis de nombreuses années, démontré sa forte implication dans les processus de pluripotence et de différenciation cellulaire, pendant le développement embryonnaire ou le maintien de l'intégrité des tissus adultes (Watabe & Miyazono, 2009). Les ligands ont également montré une grande importance dans des pathologies comme le cancer, lors de la transition épithélio-mésenchymateuse pour l'émergence des métastases.

Au sein du pancréas endocrine, ces membres possèdent des rôles divers, allant du développement embryonnaire, au contrôle de la nature des cellules endocrines et leur fonction. Dans cette partie, après avoir évoqué l'expression des membres de cette famille, je me concentrerai sur leur implication dans le développement embryonnaire et la morphogenèse des îlots pancréatiques adultes, mise en évidence par des modèles murins. Puis, j'évoquerai leur rôle dans la plasticité des cellules progénitrices et endocrines matures, grâce au contrôle de leurs marqueurs spécifiques.

1. Expression des membres de la famille TGF- β dans les cellules endocrines pancréatiques durant le développement et chez l'adulte

i. Expression durant l'embryogenèse

L'étude d'expression des différents membres de la famille TGF- β a permis de pointer les candidats à la régulation du développement du pancréas endocrine.

Différents ligands ont été détectés au sein du pancréas en développement (Figure 22). Les 3 isoformes du TGF- β sont présentes, mais durant l'organogenèse, elles vont être exprimées exclusivement au sein des acini du pancréas exocrine (Dichmann et al, 2003; Tulachan et al, 2007). Les Activins A et B sont également détectées dans le pancréas fœtal, dans les cellules endocrines α et β nouvellement formées, pour le premier ligand, et exclusivement dans les cellules α pour le second (Furukawa et al, 1995; Maldonado et al, 2000).

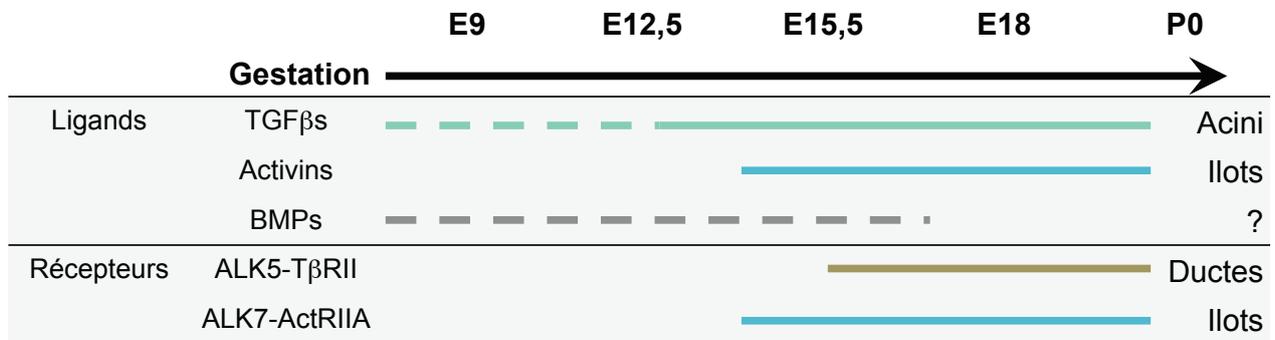


FIGURE 22: EXPRESSION DES LIGANDS ET RECEPTEURS DE LA FAMILLE TGF-β DANS LE PANCREAS AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE.

L'expression des différents ligands de la famille TGF-β, ainsi que leurs récepteurs, durant l'embryogenèse (détaillé en partie III.B.1.i), démontre le rôle de cette famille de facteurs de croissance dans la mise en place et l'organisation des différents compartiments pancréatiques (détaillé en partie III.B.2).

Quatre ligands BMPs sont exprimés dans le pancréas en développement, BMP4, 5, 6 et 7, mais aucune étude n'a précisé leur localisation (Dichmann et al, 2003).

Différents récepteurs sont également exprimés durant le développement du pancréas (Figure 22). T β R II et ALK5 sont exclusivement présents au sein des ductes en fin de gestation, et ALK1 dans les vaisseaux sanguins du pancréas (Tulachan et al, 2007). On retrouve ALK7 et ActR IIA dans les îlots pancréatiques fœtaux pour la sous-classe des Activins, alors que ALK4 et ActR IIB sont très faiblement ou non exprimés (Tsuchida, 2004; Watabe & Miyazono, 2009). Aucune étude n'a rapporté l'expression des autres récepteurs, en particulier ceux des BMPs. La présence de ces récepteurs ainsi que des ligands des 3 sous-classes indique l'importance de cette famille dans le développement embryonnaire du pancréas.

De plus, des études d'expression des Smad2 et Smad3 et de leur forme phosphorylée ont montré qu'ils étaient présents et actifs au sein du pancréas durant le développement embryonnaire (Brorson et al, 2001; El-Gohary et al, 2013). Au stade E11, une large expression des formes phosphorylées est retrouvée dans le pancréas embryonnaire de souris. A partir du stade E12,5, Smad2 et Smad3 phosphorylés sont exprimés spécifiquement dans les noyaux des cellules α et β nouvellement formées. Cette expression est maintenue au stade E18,5 et 10 semaines après la naissance des animaux (El-Gohary et al, 2013). Cette phosphorylation et présence nucléaire indiquent une forte activité des Smads au sein du pancréas endocrine et de ces cellules durant le développement.

ii. Expression au sein des îlots pancréatiques adultes

Bien que peu de publication rapporte l'expression des membres du TGF- β au sein des îlots pancréatiques adultes, une étude récente de Yang et *coll.* a pu mettre en évidence l'expression de certains récepteurs de cette famille au sein des cellules β et îlots pancréatiques humains ou de rongeurs, comme ALK2, ALK3, ALK4, ALK5, ainsi que BMP RII , ActR IIA et T β R II (Yang et al, 2011a). Ceci avait été mis en évidence précédemment pour les récepteurs ActR IIA et ALK7 (Bertolino et al, 2008; Watanabe et al, 1999). En ce qui concerne les ligands, l'expression des différentes isoformes du TGF- β a été reportée généralisée dans l'îlot, mais les cellules plus fortement marquées semblent co-exprimer l'Insuline (Rane et al, 2006; Yamanaka et al, 1993).

**TABLEAU 5: MODELES MURINS TRANSGENIQUES UTILISES POUR IDENTIFIER LES ROLES DES MEMBRES ACTIVINS
DANS LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU PANCREAS ENDOCRINE ET LA MORPHOGENESE ADULTE.**

Membres de la famille TGF- β			Modèle murin	Phénotype	Références
Activins	Ligands	ActivinA	Invalidation totale	/	<i>Matzuk et al. 1995</i>
		ActivinB	Invalidation totale	Diminution du nombre d'îlots chez l'adulte; ratio α/β modifié	<i>Matzuk et al. 1994</i> <i>Bonomi et al. 2012</i>
		GDF11	Invalidation totale	Augmentation des cellules Ngn3+; hypoplasie des îlots	<i>Harmon et al. 2004</i> <i>Dichmann et al. 2006</i>
	Récepteurs de type I	ALK4	Invalidation totale	/	<i>Gu et al. 1998</i> <i>Ripoche et al. 2013</i>
			Constitutif actif	Hypoplasie des îlots pancréatiques	<i>Yamaoka et al. 1998</i>
		ALK7	Invalidation totale	Pas de défaut de développement; prolifération des cellules endocrines adultes	<i>Jornvall et al. 2004</i> <i>Bertolino et al. 2008</i>
	Récepteurs de type II	ActRIIA	ActRIIA et ActRIIB hétérozygote	Défaut de formation et de différenciation des cellules endocrines; hypoplasie des îlots pancréatiques adultes	<i>Shiozaki et al. 1999</i> <i>Kim et al. 2000</i> <i>Goto et al. 2007</i>
		ActRIIB			
			Dominant négatif	Hypoplasie des îlots pancréatiques	<i>Yamaoka et al. 1998</i>
	Inhibiteurs	FSTL3	Invalidation totale	Hyperplasie des îlots pancréatiques adultes	<i>Mukherjee et al. 2007</i> <i>Brown et al. 2011</i>

Les Activins ont été détectées dans les cellules α , β et δ du pancréas endocrine, mais les différentes études semblent contradictoires (La Rosa et al, 2004; Tsuchida, 2004; Yasuda et al, 1993).

2. Rôle des membres de la famille TGF- β dans le développement embryonnaire du pancréas endocrine

Les différents travaux sur de nombreux modèles murins ont permis de décrire et de souligner l'importance de la super-famille TGF- β dans le développement embryonnaire du pancréas endocrine.

i. Les Activins

- *Les ligands ActivinA et ActivinB*

Les souris, présentant une invalidation totale de l'ActivinA, ne montre pas de défaut d'organogenèse, bien que ce modèle soit léthal quelques jours après la naissance, par défaut de lactation des souris (Matzuk et al, 1995). Cette étude ne semble pas pointer le rôle de ce ligand dans le développement des îlots pancréatiques, mais aucune étude poussée sur les embryons n'a été réalisée. Cependant, des études *ex vivo* sur cultures primaires de pancréas fœtaux humains et de rat pointent le rôle de ce ligand, non pas sur la prolifération des cellules endocrines fœtales, mais sur la maturation et différenciation de ces cellules (Demeterco et al, 2000; Yasuda et al, 2007) (détaillé en partie III.B.4.i).

Tout comme l'ActivinA, l'invalidation totale de l'ActivinB ne conduit pas à de gros défauts d'organogenèse, ni à la létalité des souris (Tableau 5) (Matzuk et al, 1994; Vassalli et al, 1994). Cependant, 2 mois après leur naissance, elles montrent une hyperinsulinémie avec des taux sanguins d'Insuline deux fois plus élevés que chez les souris contrôles (Bertolino et al, 2008). L'absence d'études sur le pancréas foetal ne permet pas de conclure à un rôle de ce ligand, durant le développement, sur les progéniteurs et précurseurs endocrines, mais plutôt un rôle dans la fonction des cellules endocrines.

- *Le ligand GDF11*

Des études sur GDF11, un homologue de la Myostatine, ont pu montrer son rôle direct dans l'embryogenèse (Tableau 5). En effet, son invalidation totale conduit chez la souris à des défauts dans l'organogenèse intestinale (Dichmann et al, 2006; Harmon et al, 2004).

L'absence de GDF11 induit une augmentation des cellules progénitrices exprimant Ngn3, mais ne résulte pas en une augmentation des cellules endocrines pancréatiques dans les stades tardifs. En effet, la masse de cellules β se trouve diminuée dans ces souris, dû à un défaut de maturation et une persistance de l'état immature des cellules (Dichmann et al, 2006). GDF11 pourrait alors limiter la prolifération des précurseurs pancréatiques durant le développement embryonnaire et/ou permettre la différenciation terminale des précurseurs Ngn3 en cellules matures. Ceci induit chez l'adulte des îlots hypoplasiques et une masse de cellules β diminuée.

Le manque d'études poussées sur des embryons invalidés pour l'ActivinA ou ActivinB ne permet pas de conclure sur le rôle de ces ligands dans le développement du pancréas endocrine, contrairement à GDF11. Ces études, ainsi que l'expression des différents membres aux stades de la compartimentation ductal/endocrine, convergent vers un rôle de la sous-classe des Activins dans le développement embryonnaire du pancréas, notamment dans la formation des cellules endocrines. L'inactivation totale de l'inhibiteur FSTL3, qui induit une hyperplasie des cellules β et le développement de gros îlots pancréatiques, permet de confirmer le rôle des ligands Activins (Brown et al, 2011; Mukherjee et al, 2007).

- *Les récepteurs de type II : ActRIIA et ActRIIB*

Les souris hétérozygotes pour ActRIIA et ActRIIB présentent un défaut d'organogenèse intestinale à E8,5, menant à l'absence de différenciation pancréatique (Kim et al, 2000). Cette étude permet de conclure sur un rôle de ces récepteurs dans la formation du pancréas endocrine embryonnaire (Tableau 5). De plus, l'inactivation hétérozygote combinée d'ActRIIB et Smad2 a permis de confirmer le rôle des ligands Activins à travers ces récepteurs de type II, plutôt que les BMPs, n'utilisant pas la voie des Smad2/3 pour réguler leurs gènes cibles (Goto et al, 2007). Dans cette étude, les souris présentent comme précédemment, un défaut de formation du pancréas, mais également une masse des îlots adultes diminuée.

- *Les récepteurs de type I : ALK4 et ALK7*

L'implication des récepteurs de type I, ALK4 et ALK7, dans le développement, confirme également le rôle des Activins dans ce processus (Tableau 5). Le modèle murin d'inactivation

totale d'ALK4 est létal au stade embryonnaire E9,5, avant la gastrulation (Gu et al, 1998; Ripoché et al, 2013), signifiant son rôle important dans l'embryogenèse.

De plus, l'expression d'ALK4 constitutivement actif a montré une létalité post-natale des animaux, présentant une hypoplasie des îlots pancréatiques, due à un défaut dans le développement embryonnaire, dans la différenciation terminale ou dans l'expansion des cellules β matures (Yamaoka et al, 1998). De façon surprenante, ce modèle montre le même phénotype que l'expression d'un dominant négatif pour le récepteur de type II, ActRIIB (hypoplasies des îlots, diminution de la masse des cellules β et ratio α - β identiques). La similitude de phénotype peut être due à l'utilisation du récepteur ActRIIB par d'autres ligands et voies intracellulaires, comme les BMPs/GDFs. Ceci peut également s'expliquer par le double rôle des Activins dans le développement du pancréas. Ainsi, une activation forcée d'ALK4 bloque la génération de précurseurs endocrines et donc le développement de cellules matures, et une perte de signalisation d'ActRIIB, permet la génération de précurseurs mais empêche leur maturation. Dans les deux cas, les cellules endocrines ne se différencient pas. L'utilisation de modèles murins d'inactivation conditionnelle dans les cellules progénitrices ou précurseurs endocrines pourraient permettre de préciser leur rôle. Contrairement à ALK4, l'inactivation totale du récepteur ALK7, n'induit pas de défaut d'organogenèse (Jornvall et al, 2004), signifiant des fonctions plutôt tardives dans le développement embryonnaire, et surtout sur la morphogenèse adulte.

ii. Les TGF- β s

Tout comme les Activins, le TGF- β favorise le développement des cellules endocrines pancréatiques durant l'embryogenèse et plus précisément leur différenciation. Une étude sur l'expression d'un dominant négatif pour le récepteur T β RII du TGF- β a permis d'induire une augmentation du nombre de précurseurs endocrines à partir du stade E14,5 avec expression du facteur Ngn3 (Tulachan et al, 2007). De plus, la surexpression du TGF- β 1 spécifiquement dans les cellules β induit une hypoplasie des îlots (Grewal et al, 2002; Moritani et al, 2005), démontrant le rôle de ce ligand dans l'inhibition de la prolifération des cellules β dans les stades tardifs de développement (Tableau 6).

TABLEAU 6: MODELES MURINS TRANSGENIQUES UTILISES POUR IDENTIFIER LES ROLES DES MEMBRES TGF- β ET BMPs DANS LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU PANCREAS ENDOCRINE ET LA MORPHOGENESE ADULTE

Membres de la famille TGF- β			Modèle murin	Phénotype	Références
TGF- β s	Ligands	TGF- β	Surexpression dans les cellules β	Hypoplasie des îlots pancréatiques	<i>Grewal et al. 2002</i> <i>Moritani et al. 2005</i>
	Récepteurs de type II	T β RII	Dominant négatif	Augmentation des cellules Ngn3+ et cellules endocrines α et β	<i>Tulachan et al. 2007</i>
BMPs	Ligands	BMP6	Surexpression dans les cellules Pdx1	Absence de prolifération ou de différenciation des progéniteurs pancréatiques	<i>Dichmann et al. 2003</i>
	Récepteurs de type I	ALK3	Dominant négatif	Augmentation du nombre de cellules endocrines	<i>Ahnfelt-Ronne et al. 2010</i>
	Inhibiteurs	Noggin	Expression <i>ex vivo</i>	Augmentation du nombre de cellules endocrines	<i>Ahnfelt-Ronne et al. 2010</i>

TABLEAU 7: MODELES MURINS TRANSGENIQUES UTILISES POUR IDENTIFIER LES ROLES DES EFFECTEURS SMADS DANS LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU PANCREAS ENDOCRINE ET LA MORPHOGENESE ADULTE.

Membres de la famille TGF- β			Modèle murin	Phénotype	Références
Effecteurs	R-Smads	Smad2	Hétérozygote Smad2	Augmentation du nombre de cellules Ngn3+, Nkx2.2+ et Nkx6.1+	<i>Harmo et aln. 2004</i>
			Invalidation spécifique dans les cellules Pdx1	Augmentation du nombre de cellules endocrines positives pour l'Insuline et le Glucagon chez l'embryon	<i>El-Gohary et al. 2013</i>
			Invalidation dans les cellules β	Hyperplasie des îlots pancréatiques	<i>Nomura et al. 2014</i>
		Smad3	Invalidation totale	Augmentation du nombre de cellules endocrines positives pour l'Insuline et le Glucagon chez l'embryon	<i>El-Gohary et al. 2013</i>
	I-Smads	Smad7	Surexpression dans les cellules Pdx1	Hyperplasie des îlots pancréatiques par augmentation de prolifération des cellules endocrines	<i>Smart et al. 2006</i>
			Invalidation totale	Diminution des cellules endocrines chez l'embryon	<i>El-Gohary et al. 2013</i>

i. Les BMPs

Contrairement aux Activins et TGF- β s, les BMPs empêchent l'induction pancréatique précoce et le développement des progéniteurs pancréatiques (Tableau 6).

Tout d'abord, il réprime le développement du pancréas au détriment du foie. En effet, sécrété avec FGF par le mésoderme cardiaque, il favorise une différenciation hépatique (Shin et al, 2007; Zaret et al, 2008). De plus, l'inhibition de ces ligands par une expression de leur inhibiteur Noggin ou par un dominant négatif ALK3 dans le pancréas de souris *ex vivo* à E12,5, a induit une augmentation du nombre de cellules endocrines au détriment des cellules exocrines (Ahnfelt-Ronne et al, 2010). A l'inverse, une surexpression du ligand BMP6 spécifiquement dans les cellules exprimant Pdx1 a montré une absence de prolifération ou de différenciation des progéniteurs pancréatiques (Dichmann et al, 2003). La même inhibition de prolifération a été observée lors d'une stimulation d'îlots pancréatiques murins adultes avec BMP2 et 4 *in vitro* (Bruun et al, 2014). Les BMPs ont donc plutôt un rôle inhibiteur dans le développement et la mise en place des îlots pancréatiques.

ii. Smad2/3 et leur inhibiteur Smad7

Les modèles murins transgéniques pour les effecteurs Smad2, Smad3 et Smad7 ont permis de confirmer l'implication des sous-classes du TGF- β et des Activins dans le développement des îlots pancréatiques (Tableau 7).

Le groupe de Seung Kim a permis de démontrer le rôle des Smad2 et Smad3 dans le recrutement des progéniteurs endocrines et leur différenciation. En effet, le modèle d'inactivation hétérozygote de Smad2 décrit une augmentation du nombre de cellules progénitrices exprimant Ngn3, ainsi que de cellules positives pour Nkx2.2 et Nkx6.1 au stade E17,5, combinée à une perte de la masse des cellules β (Harmon et al, 2004). De même, une surexpression ectopique de Smad7, dans les cellules exprimant Pdx1 au cours de l'embryogenèse, a montré une malformation du pancréas, avec un défaut de différenciation des cellules β , dont le nombre est diminué de 85% environ, conduisant à une létalité des souris un jour après la naissance (Smart et al, 2006). Ces travaux confirment que les ligands, qui transduisent leur signal grâce à Smad2 et Smad3, possèdent un double rôle : ils empêchent la génération de précurseurs endocrines, mais favorise leur différenciation.

Plus récemment, El-Gohary et *coll.* ont montré des résultats contradictoires à ces précédentes études, décrivant une augmentation du nombre de cellules endocrines dans les stades E17,5-E18 d'embryogenèse, dans un cas d'inactivation spécifique de Smad2 dans les cellules Pdx1, et d'un modèle d'inactivation totale de Smad3. A l'inverse, la perte de Smad7 induit une diminution du nombre de cellules endocrines pancréatiques au stade E17,5, l'effet inverse d'une inactivation des Smad2/3 (El-Gohary et al, 2013).

Bien que contradictoires, ces études confirment l'implication des Smad2/3/7 dans le recrutement des progéniteurs pancréatiques durant le développement du pancréas et leur différenciation, mais demandent des études complémentaires pour conclure sur leur rôle précis.

3. Rôle de la famille TGF- β chez l'adulte dans la morphogenèse des îlots pancréatiques

Chez l'adulte, les rôles décrits des ligands de la famille TGF- β sont principalement des rôles dans la fonction des cellules endocrines, sur leur sécrétion d'hormone et leur réponse au glucose. L'implication de cette famille dans le développement des îlots pancréatiques après la naissance et leur évolution reste peu connue.

i. Les Activins

- *Les ligands ActivinA et ActivinB*

De part la létalité post-natale des souris invalidées pour l'ActivinA et l'absence de modèle murin d'inactivation conditionnelle dans les cellules endocrines matures, aucune étude n'a permis de décrire un rôle de ce ligand dans la morphogenèse des îlots adultes.

En revanche, une étude du modèle murin d'inactivation totale d'ActivinB à l'âge adulte a pointé son implication dans la morphogenèse des îlots pancréatiques. En effet, les souris présentent une diminution de la masse des îlots pancréatiques, due à un nombre réduit d'îlots totaux (Bonomi et al, 2012). De plus, la proportion de cellules endocrines α et β est modifiée, avec une diminution du nombre de cellules α et une augmentation de cellules β (Tableau 5)

Cependant, ces données sont contradictoires avec nos propres observations. Nos analyses morphométriques de la surface de cellules β sur des souris âgées de 2 à 14 mois ne montrent aucune différence sur ce même modèle murin (non publiées). Une répartition différente des

groupes d'animaux pourraient expliquer cette différence. Le groupe de Bonomi a regroupé les animaux par leur poids, mêlant des souris âgées de 6 à 12 mois, alors que nous avons réparti les souris selon leur âge, donc selon le même stade de développement et de morphogenèse du pancréas.

- *Les récepteurs*

Les différents modèles murins d'inactivation ou d'expression d'un récepteur de type II non fonctionnel ont permis également de mettre en avant une hypoplasie des îlots après l'embryogenèse, confirmant leur rôle dans la morphogenèse adulte (Goto et al, 2007; Kim et al, 2000; Shiozaki et al, 1999). Des études sur des modèles murins d'inactivation spécifiques de ces récepteurs dans les cellules matures permettraient de confirmer ces observations.

Comme décrit précédemment, le récepteur ALK7 n'aurait pas de rôle lors de l'embryogenèse. Cependant, il est impliqué dans la morphogenèse adulte de l'îlot pancréatique et dans le maintien de la masse de cellules β (Tableau 5). En effet, à l'âge de 2 mois, les animaux ne présentent pas de défaut d'organisation ou de génération des différentes cellules endocrines. Cependant, avec l'âge, la taille des îlots et la masse de cellules β augmentent à 5 et 12 mois, due à une prolifération excessive (Bertolino et al, 2008).

- ii. *L'implication des Smad2/3 et leur inhibiteur Smad7*

Des études chez les souris adultes ont permis de mettre en évidence un rôle des Smads dans la morphogenèse des îlots pancréatiques (Tableau 7).

En effet, l'inactivation conditionnelle de Smad2 dans les cellules β endocrines (Smad2 β KO) montre une hyperplasie des îlots pancréatiques et particulièrement des cellules β à 7 et 23 semaines, due à une augmentation de la prolifération (Nomura et al, 2014). Cette même observation a été faite lors d'une surexpression de Smad7, bloquant la phosphorylation des Smad2/3, dans les cellules positives pour Pdx1. En effet, une hyperplasie des îlots pancréatiques à 4 et 5 mois a été induite, par une augmentation de la prolifération des cellules endocrines (Smart et al, 2006). En revanche, les souris présentant une inactivation totale de Smad3 ne montrent aucune différence morphologique et histologique des îlots pancréatiques à 2 et 4 mois (Lin et al, 2009). L'absence d'études embryonnaires du modèle Smad2 β KO ne permet pas d'exclure un effet de l'inactivation de Smad2 durant le développement embryonnaire, impactant sur la morphologie à l'âge adulte. Cependant, la surexpression de

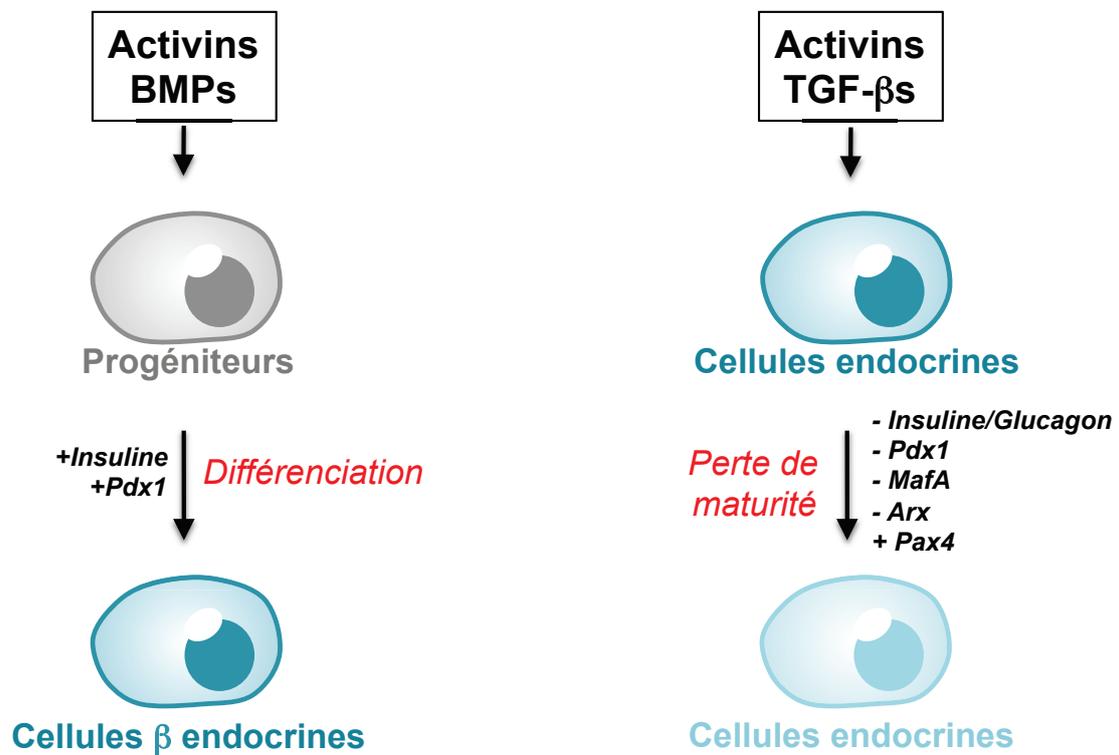


FIGURE 23: ROLES DES LIGANDS TGF- β DANS LA PLASTICITE DES CELLULES β ENDOCRINES

In vitro, les ligands Activins et BMPs induisent une différenciation des progéniteurs pancréatiques en cellules endocrines β , grâce à la régulation de marqueurs spécifiques de leur identité comme l'Insuline et Pdx1. Cependant, sur des cellules β matures en culture, les Activins et les TGF- β s semblent avoir une action contraire, induisant une perte des marqueurs de maturité des cellules β . Ces études *in vitro* pointent un rôle inverse des ligands selon l'état de différenciation des cellules, mais démontrent leur importance dans la plasticité des cellules β endocrines.

Smad7 est induite après naissance des animaux et s'affranchit des effets durant l'embryogenèse. Les études sur les Smads permettent de mettre en avant un rôle important des facteurs de croissance TGF- β et Activins durant le développement embryonnaire, mais également la morphogenèse adulte.

En conclusion, grâce à ces différentes études, il a été démontré un rôle essentiel dans le développement du pancréas et notamment des îlots pancréatiques de chaque sous-groupe de la famille TGF- β . Cependant, des études sur des modèles murins d'inactivation conditionnelle, inductible ou non, dans des cellules progénitrices exprimant Pdx1, des précurseurs exprimant Ngn3 ou les cellules endocrines matures permettraient de confirmer et préciser le rôle des différents membres dans les étapes du développement.

4. Rôle des ligands dans la plasticité des cellules endocrines pancréatiques

i. Implication des ligands dans la différenciation des cellules endocrines durant l'embryogenèse

- *Les Activins/GDF11*

Comme présenté précédemment, les modèles murins transgéniques pour GDF11, ainsi que les études *ex vivo* pour l'ActivinA, ont permis de mettre en évidence le rôle de la sous-famille des Activins dans la différenciation des précurseurs endocrines (Demeterco et al, 2000; Dichmann et al, 2006; Yasuda et al, 2007). En effet, les Activins sont des acteurs importants de la plasticité cellulaire des cellules souches ou progéniteurs. Au sein du pancréas et des cellules endocrines, de nombreuses études ont pu mettre en avant le rôle de ces ligands dans l'expression des marqueurs de maturité des cellules endocrines et dans leur état de différenciation (Figure 23).

Depuis plusieurs années, l'ActivinA est utilisé comme facteur de différenciation de cellules souches embryonnaires humaines (Kunisada et al, 2012; Pagliuca et al, 2014; Rezaia et al, 2014) ou murines (Liu & Lee, 2012; Nakanishi et al, 2007), en combinaison avec d'autres facteurs, pour l'obtention de cellules productrices d'Insuline. Ceci démontre la capacité de ce ligand à moduler la nature des cellules.

De façon similaire, l'expression de l'ActivinB dans la notochorde d'embryon de poulet permet l'expression de Pdx1 et d'Insuline, via la répression de Shh (Hebrok et al, 1998). De

plus, un traitement avec de l'ActivinB de cellules souches humaines sous forme de corps embryoides ou de cellules progénitrices pancréatiques AR42J induit une surexpression des marqueurs d'identité des cellules β endocrines, comme Pdx1 ou Pax4 (Frandsen et al, 2007; Kanno et al, 2006; Matsuoka et al, 2007). De la même manière, dans un modèle murin de régénération d'îlots pancréatiques, l'inhibition *in vivo* de la signalisation de ces Activins, par l'inhibiteur FST, diminue la différenciation terminale des cellules β (Zhang et al, 2004). Ceci traduit l'importance de ces ligands dans la différenciation et l'émergence de cellules pancréatiques au caractère endocrine.

- *Les BMPs*

Grâce aux modèles murins, les différentes études ont pu montrer le rôle inhibiteur des BMPs, au cours du développement pancréatique précoce, dans l'induction des progéniteurs et la génération des précurseurs.

En effet, ils semblent favoriser la différenciation exocrine et non endocrine (Ahnfelt-Ronne et al, 2010). Cette sous-famille ne serait alors pas impliquée dans la différenciation des précurseurs endocrines en cellules endocrines matures. Ceci a été mis en évidence notamment dans un modèle murin, avec atténuation de la voie de signalisation ALK3/BMP4 au sein des cellules β . Cette signalisation est essentielle à la fonction des îlots pancréatiques et la production d'Insuline, mais n'est pas impliquée dans la différenciation des cellules et le développement des îlots pancréatiques (Goulley et al, 2007).

Cependant, *in vitro*, ces ligands sont capables d'induire la différenciation de progéniteurs pancréatiques ou l'expression d'Insuline. Des études sur les progéniteurs pancréatiques AR42J, par traitement à l'exendine-4, ont démontré que les BMPs pouvaient être importants dans la différenciation des cellules β (Yew et al, 2005). En effet, les effecteurs Smad1 et Smad8, le récepteur ALK1 ainsi que BMP2 sont surexprimés au cours de ce processus. L'inhibition de cette voie de signalisation avec un récepteur ALK1 soluble annule la surexpression des Smads, mais également la différenciation des cellules, avec une diminution de l'Insuline, Pdx1 et Pax4. De même, le traitement de cellules β INS1 (d'insulinomes de rat) ou d'îlots en culture par le ligand BMP3 induit une augmentation de l'expression d'Insuline (Bonner et al, 2011).

Des études plus récentes ont mis en application ce rôle des BMPs dans la différenciation de cellules progénitrices humaines en cellules productrices d'Insuline (Figure 23) (Sui et al,

2013; Xu et al, 2011b). L'utilisation du ligand BMP4 a permis d'induire une expression des facteurs Pdx1 et Nkx6.1, facteurs clés des cellules β matures. De plus, l'utilisation de Noggin, inhibiteur de ce ligand, a montré une absence de Nkx6.1, mais une expression des marqueurs Ngn3 et Synaptophysin, caractéristiques de progéniteurs pro-endocrines (Sui et al, 2013). Ces observations confirment le rôle des BMPs dans la différenciation des cellules progénitrices en cellules endocrines β et leur action *in vitro* sur la régulation du marqueur clé de ces cellules, l'Insuline.

- *TGF- β*

Il est bien connu que les ligands TGF- β s sont fortement impliqués dans la différenciation des tissus (Watabe & Miyazono, 2009). Cependant, par le peu d'étude *in vitro* et *in vivo*, le TGF- β a un rôle moins décrit que les Activins sur ce processus au sein du pancréas et sur l'expression des marqueurs de maturité des cellules endocrines. Des stimulations de lignées cellulaires β matures pointent un rôle majoritaire de ce ligand dans le maintien de l'identité β (partie II. B. 4. ii).

- ii. Implication des ligands dans la plasticité des cellules endocrines matures et leur identité cellulaire*

- *Les Activins*

De façon surprenante, des stimulations par les ligands Activins de cellules endocrines matures ont pointé leur rôle dans la perte de maturité de ces cellules (Figure 23). L'ActivinA induit, sur des îlots pancréatiques isolés ou sur une lignée cellulaire β pancréatique MIN6, une perte de l'Insuline, MafA, Pdx1 ou Glut2, caractéristiques des cellules β endocrines (Szabat et al, 2010). L'utilisation de Follistatin dans cette étude a inhibé les effets du ligand. De plus, il a été démontré que l'ActivinA a un rôle important sur la régulation de l'expression de Pax4, facteur de transcription principalement exprimé lors du développement embryonnaire par les cellules β pancréatiques et important dans la différenciation de ces cellules. En effet, une stimulation de cellules productrices d'Insuline NIT-1 et INS1b avec ce ligand induit une forte augmentation de l'expression de Pax4 (Ueda, 2000). Cette expression ectopique pourrait traduire un retour des cellules à un état plus immature, sans être totalement dédifférenciées.

Peu d'études ont décrit un effet des ligands Activins sur les cellules α . Néanmoins, Mamin et *coll.* ont induit une perte d'expression du Glucagon et du facteur Arx, grâce à une stimulation de lignées α pancréatiques avec l'ActivinA (Mamin & Philippe, 2007). Ceci suggère un effet semblable des Activins sur différents types de cellules endocrines, provoquant la perte de maturité de ces cellules.

Les études tendent à démontrer un rôle double de ces ligands, sur la différenciation de progéniteurs mais également sur la perte de maturité des cellules endocrines bien différenciées. Ces Activins sont donc des facteurs de croissance clés de la plasticité des cellules progénitrices ou endocrines différenciées.

- *Les TGF- β s*

Sayo et *coll.* ont été les premiers à montrer un rôle du ligand TGF- β dans l'induction d'expression d'Insuline dans une lignée pancréatique β INS1, grâce à l'induction du facteur Pdx1 (Sayo et al, 2000). Cependant, des études plus récentes ont démontré un résultat inverse (Lin et al, 2009). En effet, le TGF- β par l'intermédiaire de l'effecteur Smad3 inhibe l'expression d'Insuline et l'activité de son promoteur dans des îlots pancréatiques de rat et dans différentes lignées cellulaires.

Dans cette dernière étude, les auteurs décrivent non seulement un rôle sur l'Insuline, mais la forte diminution de nombreux gènes caractéristiques des cellules β matures, suite à une stimulation au TGF- β ou la présence d'un récepteur T β RI constitutivement actif (Lin et al, 2009). Récemment, une molécule inhibitrice du récepteur ALK5 a été décrite pour protéger les cellules β de la perte de leurs facteurs de maturité, induite dans un modèle de diabète (Blum et al, 2014). Cette étude démontre le rôle de ces ligands dans la perte de maturité des cellules β pancréatiques dans un contexte de pathologie et de stress cellulaire (Figure 23).

Toutes ces études démontrent l'importance de cette super-famille au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte dans la différenciation et l'identité des cellules endocrines pancréatiques. De plus, des études récentes commencent à pointer leur implication dans des pathologies comme le diabète. Connaissant l'importance de cette super-famille au cours de la tumorigénèse, de nouvelles études pourraient permettre de décrire leur rôle dans la plasticité tumorale des cellules endocrines et le développement des TNEPs hétérogènes.

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Bien que les TNEPs soient des lésions tumorales rares, leur étude reste un enjeu majeur, de part leur hétérogénéité et les difficultés diagnostiques et thérapeutiques qui en découlent. L'implication de la perte d'expression du gène *MEN1* dans le développement de ces tumeurs est désormais bien acquise que ce soit dans la pathologie héréditaire NEM1 mais également dans les tumeurs sporadiques. Bien que controversée dans le maintien de la masse des cellules β , la plasticité cellulaire pancréatique commence à être bien décrite dans le cas de régénération cellulaire ou dans des pathologies comme le diabète.

L'objectif de mes travaux en début de thèse était alors :

-d'étudier *in vivo* l'origine cellulaire et le rôle de la plasticité dans l'émergence et l'évolution d'insulinomes invalidés pour le gène *Men1*.

-de mettre en évidence des facteurs impliqués dans cette plasticité tumorale, dans le but de pouvoir les utiliser pour les diagnostics, voire en thérapie ciblée.

Ainsi, mes travaux m'ont permis de mettre en évidence:

- 1) un nouveau rôle d'un ligand de la famille TGF- β , l'ActivinB, dans la plasticité des cellules β tumorales *Men1* (partie I) (publication soumise).
- 2) la régulation de ce ligand par Menin, grâce à la méthylation d'histones, faisant de ce suppresseur de tumeur un acteur dans les régulations épigénétiques et la plasticité cellulaire des TNEPs (Partie II) (papier en préparation).

J'ai également participé à des travaux sur l'étude de l'origine cellulaire des gastrinomes pancréatiques (Bonnavion et al. 2015. Accepté).

Nous avons également publié un manuscrit sur la génération d'un nouveau modèle murin d'invalidation conditionnelle du récepteur de type I ALK4, qui pourrait permettre de comprendre un peu mieux les fonctions de ce récepteur au sein des îlots pancréatiques, en s'affranchissant de la létalité du modèle murin d'invalidation totale (Ripoche et al, 2013).

Les différents travaux, auxquels j'ai participé, ne seront pas détaillés dans ce manuscrit, mais sont disponibles dans la partie « Autres Publications ».

Manuscrits soumis ou en préparation :

Ripoche Doriane, Gherardi Samuele, Cordier-Bussat Martine, Goehrig Delphine, Zhang Chang X. and Bertolino Philippe. **Menin regulates *Inhbb* expression through histone modifications.** *En préparation.*

Ripoche Doriane, Charbord Jérémie, Hennino Ana, Teinturier Romain, Bonnavion Rémy, Jaafar Rami, Cordier-Bussat Martine, Ritvos Olli, Zhang Chang X., Andersson Olov and Bertolino Philippe (2015). **ActivinB-induced β -cell dedifferentiation promotes insulinoma tumor plasticity and progression.** *Soumis.*

Manuscrits publiés:

Bonnavion Rémy, Teinturier Romain, Jaafar Rami, Ripoche Doriane, Leteurtre Emmanuelle, Chen Yuan-Jia, Rehfeld Jens F., Lepinasse Florian, Hervieu Valérie, Pattou François, Vantyghem Marie-Christine, Scoazec Jean-Yves, Bertolino Philippe and Zhang Chang Xian (2015). **Islet cells serve as cells of origin of pancreatic gastrin-expressing tumours.** *Molecular and cellular biology (Accepté).*

Ripoche Doriane, Gout Johann, Pommier Roxane M., Jaafar Rami, Zhang Chang X., Bartholin Laurent and Bertolino Philippe (2013). **Generation of a conditional mouse model to target *Acvr1b* disruption in adult tissues.** *Genesis 51: 120-127.*

RESULTATS

PARTIE I :

L'EXPRESSION D'ACTIVIN β DANS LES

INSULINOMES *MEN1* INDUIT UNE

DEDIFFERENCIATION DES CELLULES β

A. INTRODUCTION

Les TNEPs, bien que rares, sont complexes dans leur diagnostic et traitement de part leur très grande hétérogénéité, fonctionnelle et hormonale. Notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années à comprendre l'origine cellulaire de ces TNEPs, liées à une perte du gène *MEN1*, afin de mieux appréhender la détection et le suivi thérapeutique de ces lésions tumorales.

En 2010, nous avons publié une étude mettant en avant le rôle de la plasticité cellulaire dans l'émergence d'insulinomes, suite à une invalidation du gène *Men1* spécifiquement dans les cellules α (Lu et al, 2010). Bien que les insulinomes représentent l'atteinte tumorale la plus commune du pancréas endocrine, l'origine et l'évolution de ces tumeurs restent peu décrites. Nous ignorions jusqu'à présent si ces lésions étaient sujettes à des mécanismes de plasticité/dédifférenciation cellulaires à l'origine de l'hétérogénéité des TNEPs.

Les Activins, membres de la famille TGF- β , participent au développement du pancréas endocrine, à la plasticité cellulaire et à la fonction des îlots pancréatiques adultes (partie III.B). Connaissant la fonction des Activins A et B dans les cellules β et leur fréquente surexpression dans différentes tumeurs, nous avons supposé que ces ligands pourraient contribuer à la tumorigenèse des cellules β .

Le but de cette étude était de :

- caractériser la plasticité cellulaire et fonctionnelle des insulinomes *Men1*
- identifier les ligands de la famille TGF- β , dérégulés dans ces lésions tumorales
- comprendre le rôle de ces ligands dans la plasticité et la progression des tumeurs β

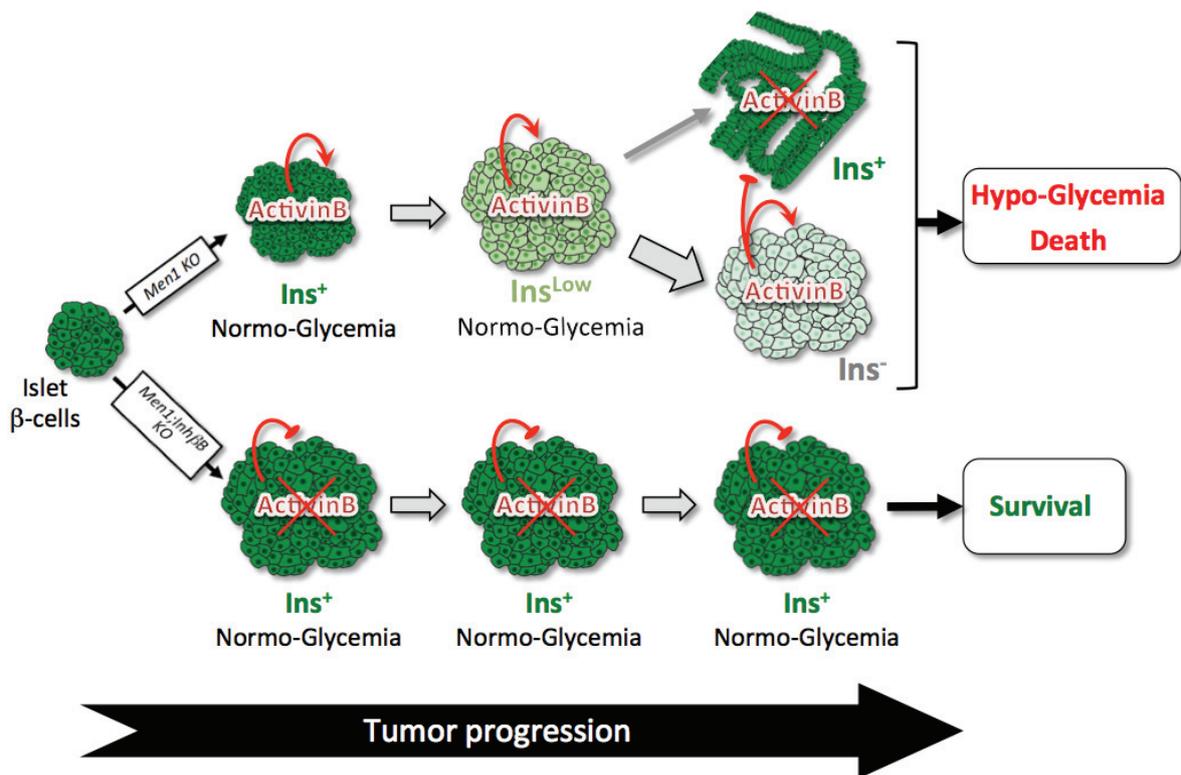


FIGURE 24: ROLE DE L'ACTIVINB DANS LA PLASTICITE DES CELLULES β TUMORALES ET L'EMERGENCE DE TUMEURS NEUROENDOCRINES HETEROGENES

Ce graphique représente la synthèse de mes travaux soumis et résumés en partie I.B des Résultats.

B. RESULTATS

1. Publication soumise

L'utilisation d'un modèle murin, développant des insulinomes invalidés pour le gène *Men1* (modèle $\beta Men1$ (*Men1^{F/F}; RipCre⁺*)), m'a permis de mettre en évidence l'existence de mécanismes de dédifférenciation et de réactivation tumorale dans les insulinomes, et leur progression de lésions bénignes vers des atteintes agressives. Ces travaux m'ont permis d'identifier et caractériser l'implication de l'ActivinB, un ligand de la famille TGF- β , dans la mise en place de ces mécanismes (Figure 24).

Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence que les cellules β des tumeurs $\beta Men1$ perdaient progressivement, entre 6 et 14 mois, leur expression d'Insuline, sans expression de d'autres hormones pancréatiques. J'ai ensuite démontré que cette perte était systématiquement corrélée avec une surexpression d'ActivinB dans ces cellules. De la même manière, dans un modèle de surexpression de ce ligand dans les cellules β du poisson-zèbre, nous avons montré la diminution d'Insuline. J'ai ensuite tenté de comprendre le mécanisme d'action de l'ActivinB dans la perte d'expression de l'Insuline *in vivo* et *in vitro*. Grâce à des stimulations *in vitro* sur des lignées β MIN6 et β TC, j'ai pu mettre en évidence que les cellules β présentaient, en plus de l'Insuline, la perte de plusieurs marqueurs, essentiels au maintien de la maturité/fonctionnalité des cellules β adultes (MafA, Glut2, Nkx6.1 et Pdx1). Grâce à des analyses histologiques, sur le modèle $\beta Men1$, j'ai validé cette perte de marqueurs *in vivo*, dans les lésions surexprimant l'ActivinB. Ces résultats ont ensuite été validés par l'utilisation de souris $\beta Men1$ invalidées pour l'ActivinB (modèle *Inh β b- $\beta Men1$* (*Men1^{F/F}; RipCre⁺; Inhbb^{KO/KO}*)). Ces travaux nous ont ainsi permis de montrer que l'ActivinB est un nouvel acteur de la plasticité des cellules β tumorales.

De plus, nous avons mis en évidence, la surexpression du facteur Pax4 *in vitro*, mais également *in vivo* dans les insulinomes et dans le modèle de poisson-zèbre. Cette surexpression semble directement liée à l'ActivinB et sa voie de signalisation Smad2/3. Les cellules β tumorales, en présence d'ActivinB, semblent retourner dans un état moins

différencié, sans pour autant revenir à un état de progéniteurs/précurseurs endocrines (absence de Sox9 et Ngn3).

L'étude approfondie des modèles *Inh β b- β Men1* et *β Men1* m'a également permis de montrer que les mécanismes de dédifférenciation, contrôlés par l'ActivinB, contribuent activement à la progression des insulinomes *Men1* et à l'émergence tardive de tumeurs agressives, présentant une forte production d'Insuline et un taux de prolifération élevé. J'ai découvert que l'émergence de ces lésions bien différenciées, qui apparaissent tardivement (après 12 mois), conduisent systématiquement à la mort des animaux, en raison de l'hypoglycémie induite par les forts taux d'Insuline que ces tumeurs produisent.

ActivinB-induced β -cell dedifferentiation promotes insulinoma tumor plasticity and progression

Doriane Ripoché, Jérémie Charbord, Ana Hennino, Romain Teinturier, Rémy Bonnavion, Rami Jaafar, Olli Ritvos, Chang X. Zhang, Olov Andersson and Philippe Bertolino.

Soumis Mai 2015.

26 **ABSTRACT**

27 Loss of pancreatic β -cell maturity occurs in diabetes and insulinomas. Although
28 both physiological and pathological stresses are known to promote β -cell
29 dedifferentiation, little is known about the molecules involved in this process. Here
30 we demonstrate that ActivinB, a TGF β -related ligand, is upregulated during
31 tumorigenesis and drives the loss of β -cell maturity in a mouse insulinoma model.
32 Importantly, deleting ActivinB abolished β -cell dedifferentiation and increased mice
33 survival. Using transgenic zebrafishes, we demonstrate that ActivinB overexpression
34 in β -cells downregulates insulin expression *in vivo*. Our data further identify Pax4 as
35 a previously unknown ActivinB target and potent contributor to the β -cell
36 dedifferentiation. Finally, we show that a subset of the dedifferentiated β -cells go on
37 to form aggressive, well-differentiated tumours, through a tumour escape mechanism
38 that renders the cells resistant to ActivinB. Hence, this work reveals an unexpected
39 role for ActivinB in islet plasticity and progression of insulinoma through its
40 participation in β -cell dedifferentiation.

41 **INTRODUCTION**

42 Loss of maturity and acquisition of embryonic traits are well-established
43 paradigms that contribute to tumors heterogeneity and metastasis (Brabletz,
44 2012;Marusyk, et al., 2012). Endocrine tumors that develop from pancreatic islet-
45 cells are highly heterogeneous. Whereas functional tumors are associated with
46 symptoms related to the hormones they produce – e.g., insulin or glucagon – non-
47 functional tumors do not cause a clinical syndrome (Asa, 2011). Although poorly
48 differentiated endocrine tumor of the pancreas exists, the cause and contribution of β -
49 cell dedifferentiation in the initiation and progression of those lesions remain
50 undetermined. Loss of Insulin expression has been observed in transgenic mouse
51 models of insulinoma, supporting the existence of a mechanism that reverts the
52 differentiated state of mature β -cells in β -cell tumors (Bertolino, et al.,
53 2003;Pelengaris, et al., 2002). Recently, Landsman *et al.* demonstrated that elevated
54 Hedgehog/Gli signaling in β -cells alters their identity and leads to the development of
55 undifferentiated endocrine pancreatic tumors (Landsman, et al., 2011). Therefore, the
56 participation of β -cell dedifferentiation in adult pancreatic pathologies such as islet
57 tumours and diabetes underscores the need to identify the autocrine factors
58 controlling these mechanisms.

59 While the characterization of signals that regulate β -cell development and
60 regeneration is the focus of intense work (Ziv, et al., 2013), less is known about
61 mechanisms and molecules that control the differentiation state of mature adult β -
62 cells under pathological conditions. The phenomenon of β -cell dedifferentiation –
63 characterized by a loss of expression of key β -cell genes, such as those encoding
64 Insulin, Glucose transporter 2 (Glut2) and transcription factors associated with the
65 cells' mature phenotype – was first reported in mouse and recently confirmed in

66 cultured human islets in the absence of any pathological context (Russ, et al.,
67 2008;Spijker, et al., 2013;Weinberg, et al., 2007). Further evidence has confirmed
68 that the differentiated state of mature adult β -cells is not permanent and lost in
69 response to signals such as oxidative stress and changes in transcriptional profile
70 (Back, et al., 2009;Bernardo, et al., 2008;Dhawan, et al., 2011). The contribution of
71 β -cell dedifferentiation to pathological conditions *in vivo* is also supported by recent
72 work suggesting that β -cell dedifferentiation caused by *FoxO1* disruption underlies β -
73 cell failure in type II diabetes (Talchai, et al., 2012).

74 Activins are TGF- β -related ligands that participate in a wide array of biological
75 processes in development and cancer (Sulyok, et al., 2004;Xia and Schneyer,
76 2009;Zhou, et al., 2010). Activins and their receptors control embryonic patterning of
77 foregut-derived organs (Kim, et al., 2000) and are closely associated with the
78 development of the endocrine pancreas (Zhang, et al., 2004). Although ActivinA and
79 ActivinB are expressed in pancreatic islets, their presence in β -cells is still debated
80 (Brown, et al., 2011;La Rosa, et al., 2004;Ogawa, et al., 1993). Nevertheless,
81 transgenic mouse models have confirmed roles for these ligands in adult islets and in
82 β -cell proliferation (Brown and Schneyer, 2010;Oliver-Krasinski and Stoffers, 2008).
83 Interestingly, ActivinA decreases the expression of mature β -cell genes, highlighting
84 a possible contribution of Activins to β -cell dedifferentiation and islet plasticity
85 (Szabat, et al., 2010). In contrast, the effect of ActivinB in pancreatic islets is less
86 clear.

87 Given that ActivinA and B affect the function of islet β -cells and are frequently
88 overexpressed in various tumors (Antsiferova and Werner, 2012), we hypothesized
89 that Activins could contribute to β -cell tumor plasticity. Using a mouse insulinoma
90 model based on the targeted disruption of the *Men1* gene (Bertolino, et al., 2003), we

91 found β -cell tumors to overexpress ActivinB. Further, our work reveals that ActivinB
92 mediates β -cell dedifferentiation, causing tumor β -cells to lose their mature
93 characteristic while keeping an endocrine identity. The role of ActivinB in β -cell
94 dedifferentiation was further supported by the absence of dedifferentiated β -cells in
95 tumors lacking ActivinB expression, and the late onset of a subset of aggressive,
96 differentiated insulinomas resistant to ActivinB signaling.

97
98

99 **RESULTS**

100 ***β -cell tumors progressively lose Insulin expression and develop late-onset Insulin-*** 101 ***positive proliferating lesions.***

102 Expression of Insulin is a hallmark of mature differentiated β -cells. Having
103 previously shown reduced Insulin immuno-reactivity in insulinomas that develop
104 from the *Men1^{F/F};RipCre* mouse (*β Men1*) (Bertolino, et al., 2003), we hypothesized
105 that insulinomas undergo cellular dedifferentiation. We first confirmed loss of Insulin
106 expression in advanced *β Men1* tumors. Although a few β -cells scattered within islet
107 structures maintained normal Insulin immuno-reactivity, we found Insulin expression
108 abolished in several lesions (**Figure 1A**). More importantly, we found that a subset of
109 lesions formed by polarized β -cells organized in trabecular structures and showing a
110 strong Insulin expression developed from the age of 10 months as isolated lesions or
111 within dedifferentiated Insulin-negative (Ins^-) β -cell tumors (**Figure 1A and B**).
112 Interestingly, we found these lesions to differ from normal islet β -cells or Ins^- tumors
113 by their high Ki67 proliferation index, suggesting that they represent a subset of
114 aggressive Insulinoma with a late onset (**Figure 1C**).

115 Loss of Insulin expression was next analyzed at various tumor progression stages.
116 Although hyperplastic and dysplastic lesions in *βMen1* mice developed at 4 and 6
117 months, respectively, they showed Insulin staining comparable to controls (**Figure**
118 **2A**). The earliest Insulin reduced expression was evident in 8-month-old adenomas.
119 At 10 months, this reduction was obvious in most islet lesions, and even more
120 pronounced at 14 months in tumors (**Figure 2A, Supplemental Figure 1**). We
121 subsequently used ChromograninA, a marker of neuroendocrine tumors, to address
122 whether Ins⁻ lesions retain their endocrine character. As shown in Figure 2A, we
123 found ChromograninA expressed in all tumors analyzed and further found that
124 Insulin and ChromograninA were colocalized only in a subset of β-cell tumors
125 (**Supplemental Figure 2**). Next, we thought to determine whether β-cells that had
126 lost insulin expression originated from *Men1*-disrupted β-cells. Lineage-tracing of
127 Menin expression in Ins⁺, Ins⁻ islet-tumors and α-cells demonstrated that both Ins⁺
128 and Ins⁻ lesions were lacking Menin expression compared to α-cells that retain Menin
129 expression at all analyzed ages (**Figure 2B**). Consistent with this observation we
130 found Menin β-cell disruption to be almost complete at 1 month of age supporting the
131 idea that Ins⁻/ChromograninA⁺ tumors originated from Ins⁺ Menin disrupted β-cells
132 (**Supplemental Figure 3**).

133 Given the known α- to β- tumor-cell trans-differentiation that occurs in *Men1*
134 glucagonomas (Lu, et al., 2010), we analyzed whether Ins⁻ lesions expressed
135 Glucagon, Somatostatin or Pancreatic polypeptide and failed to detect those
136 hormones in Ins⁻ β-cell lesions (**Figure 2C**). This observation suggests that the loss of
137 Insulin expression observed in tumor β-cells reflects a dedifferentiation rather than a
138 trans-differentiation.

139

140 *ActivinB expression is selectively increased during β -cell tumorigenesis.*

141 Having found tumor β -cells to lose their Insulin expression, we speculated that
142 an autocrine factor produced by tumor cells may promote this effect. We explored
143 transcriptomic analyses of *Men1*-KO β -cell and Insulinoma models (Serewko-Auret,
144 et al., 2010; Yang, et al., 2010), looking for candidates known to inhibit Insulin
145 expression. Given the importance of TGF- β signaling in Insulin synthesis and
146 maintenance of β -cell maturity (Blum, et al., 2014; Brown and Schneyer, 2010), we
147 paid particular attention to related ligands. In this way we identified the *Inh β B* gene
148 coding for ActivinB to be upregulated in β -cells and insulinomas depleted of *Men1*.
149 Histological analyses performed with 2 independent ActivinB antibodies, further
150 confirmed the selective induction of ActivinB expression in β -cell tumors and the
151 near absence of ActivinB in control β -cells (**Supplemental Figure 4**). Next, we
152 sought delineate the onset of ActivinB overexpression and analyzed ActivinB
153 expression in pancreas sections collected from aging *β Men1* mice. Whereas ActivinB
154 was absent in 4-month-old hyperplastic islets, we detected this ligand, within a group
155 of clustered cells randomly located within 6-month-old dysplastic islets (**Figure 3A**).
156 At 10 and 14 months of age, the number of cells expressing ActivinB was robustly
157 increased. Surprisingly, 14-month-old lesions developed small areas of cells lacking
158 ActivinB expression (* in **Figure 3A**). Those regions were reminiscent of the Insulin-
159 positive (Ins⁺) trabecular lesions found within 14-month-old dedifferentiated tumors
160 (**Figure 1A**). Using a co-immunofluorescence approach, we found lesions with
161 reduced levels of Insulin or a lack of Insulin to express high levels of ActivinB, while
162 ActivinB was absent in Ins⁺ tumors and control islets (**Figure 3B**). Based on Smad3
163 known-repression of Insulin gene expression (Lin, et al., 2009), we used an antibody
164 that recognizes the phosphorylated form of Smad3 (P-Smad3) and found the nuclei of

165 Ins^- and Ins^+ lesions had strong and no immuno-reactivity, respectively (**Figure 3C**).
166 More importantly, while we found that the surface of Ins^- lesions expressed ActRII,
167 the type II receptor through which ActivinB signals (**Figure 3D**), the surface of Ins^+
168 tumors did not, supporting the idea that late-onset Ins^+ tumors had developed a
169 blunted response to ActivinB-induced inhibition of Insulin expression.

170

171 *ActivinB expression induces the downregulation of insulin expression in β -cell*
172 *both in vitro and in vivo.*

173 We next tested the direct effect of ActivinB stimulation on transcription of Insulin
174 genes *in vitro*. Using cultured Min6 and β TC β -cells, we found that stimulation with
175 ActivinB significantly inhibited both *Ins1* and *Ins2* gene expression, an effect that
176 was reversed by the SB431543 inhibitor, which blocks Smad2 and Smad3
177 phosphorylation through Alk4 and Alk7 receptors (**Figure 4A, Supplemental Figure**
178 **5**). To further validate this observation, we used transgenic zebrafish larvae to
179 determine whether the downregulation of insulin expression by ActivinB is an
180 evolutionarily conserved mechanism. We generated transgenic zebrafish that have an
181 integrated cre-/loxP-based system to induce expression of *inh β B* specifically in β -
182 cells. In double-transgenic larvae overexpressing *inh β B* in β -cells (termed inh β B-OE),
183 expression of the insulin gene was found significantly downregulated (**Figure 4B**).
184 We also evaluated the expression of insulin in β -cells by generating triple-transgenic
185 larvae that carry the ins:GFP transgene in addition to the cre-/loxP-system (**Figure**
186 **4C**). We observed a significant, 70% decrease in GFP fluorescence in the inh β B-OE
187 zebrafish larvae. There was a global decrease in GFP fluorescence across β -cells in
188 inh β B-OE larvae, suggesting that the reduction in insulin mRNA levels in these
189 larvae is due to downregulation of insulin expression in each individual β -cell. Thus,

190 the ability of ActivinB to reduce insulin expression is evolutionarily conserved
191 between mouse and fish.

192

193 *ActivinB decreases the expression of mature β -cell genes and contributes to the*
194 *dedifferentiation of β -cell tumors in vivo.*

195 Maintenance of β -cell maturity is orchestrated by a subset of transcription factors
196 that are essential for adult β -cells (Bernardo, et al., 2008; Oliver-Krasinski and
197 Stoffers, 2008). As shown in Figure 5A and Supplemental Figure 6, we found that the
198 expression of *Ins1*, *Ins2*, *Mafa*, *Slc2a2*, *Nkx6.1* and *Pdx1* was significantly reduced in
199 Min6 cells following ActivinB treatment, whereas the expression of *Mafb* and *Nkx2.2*
200 remained unchanged. Interestingly, the expression of the paired box4 (Pax4), a
201 transcription factor involved in pancreatic β -cell differentiation and more recently
202 shown to promote β -cell dedifferentiation in mature β -cells (Hu He, et al., 2011),
203 was strongly induced by ActivinB treatment. The specificity of ActivinB induction of
204 Pax4 expression was confirmed by using the SB431542 inhibitor (**Figure 5B and C**).
205 These observations were further validated in β TC cells (**Supplemental Figure 7**).

206 We next investigated these markers in Ins^+ lesions (which express ActivinB) or
207 Ins^- lesions (which do not express ActivinB). As shown in figure 5D, we were unable
208 to detect MafA in Ins^- tumors, whereas we found Pdx1 and Nkx6.1 expression to be
209 reduced yet still present in those lesions compared to control and Ins^+ lesions.
210 Membrane expression of the glucose transporter Glut2 (encoded by the *Slc2a2* gene)
211 was absent at the surface of the β -cells lacking Insulin expression, suggesting that
212 those cells had lost their glucose-sensing capacity. A marked increase in Pax4
213 expression was also evident in Ins^- lesions that overexpressed ActivinB, as seen by
214 the strong staining observed in the lesion lacking Insulin expression. Finally, we

215 found dedifferentiated lesions to lack the expression of Sox9 and Ngn3 supporting the
216 idea that tumor β -cells had lost their maturity rather than acquired a progenitor-like
217 phenotype (**Supplemental Figure 8**). Interestingly, Ins^+ lesions were found to
218 express identical levels of tested mature markers compared to controls, making their
219 polarized shape, glandular organization and elevated Ki67 index the sole
220 characteristics that differentiate them from normal islet β -cells.

221

222 ***ActivinB disruption rescues tumor β -cell dedifferentiation.***

223 We examined the consequences of ActivinB loss on β -cell tumorigenesis. Taking
224 advantage of the viability of the homozygous *Inh β B*-KO mouse (Vassalli, et al.,
225 1994), we generated *Inh β B^{KO/KO};Men1^{F/F};RipCre* compound mutants (termed *Inh β B-*
226 *β Men1*) to investigate the differentiation characteristics of the tumors that developed.
227 At 10 and 14 months of age, the islets of all the analyzed *Inh β B- β Men1* lesions
228 stained homogeneously for Insulin, yet the intensity of the observed staining was
229 slightly weaker than in control or *Inh β B*-KO mutant islets (**Figure 6A**).
230 Quantification of the respective surface area occupied by Ins^+ and Ins^- lesions within
231 the pancreas revealed that the massive reduction of Insulin expression occurring in
232 *β Men1* tumors was abolished in *Inh β B- β Men1* compound mutants (**Figure 6B**). The
233 lack of ActivinB expression was confirmed in tumors developed by the *Inh β B- β Men1*
234 mice (**Supplemental Figure 9**), supporting the notion that the loss of Insulin
235 observed in the *β Men1* lesions results from an autocrine effect of ActivinB. Lesions
236 that developed in the *Inh β B- β Men1* mice were found to be well differentiated and to
237 express MafA, Nkx6.1, Pdx1 and Pax4 levels comparable to those in age-matched
238 control islets (**Figure 6C**). As in normal pancreas, the expression of Glut2 was

239 obvious at the surface of β -cells in tumors. More interestingly, Insulin-reactive
240 lesions with glandular shape were absent in 14-month-old *Inh β B- β Men1* mice
241 (**Figure Supplement 1**), suggesting that such lesions represent the late evolution of
242 the dedifferentiated tumors found specifically in the *β Men1* mice.

243

244 ***ActivinB disruption promotes the survival of mice that develop insulinomas.***

245 Having found that the lack of ActivinB rescues tumor β -cell dedifferentiation
246 and abolished the onset of aggressive insulinomas found in *β Men1* mutants, we next
247 sought to determine how these observations impacted mouse survival. Although
248 quantification of the tumor mass showed no reduction in the *Inh β B- β Men1* pancreata,
249 we found that the surface of the compound-mutant lesions plateaued at 6 months
250 (**Supplemental Figure 10**). Analysis of glucose serum concentrations revealed, as
251 expected, that *β Men1* animals became hypoglycemic by the age of 10 months,
252 whereas none of the *Inh β B- β Men1* mutants had developed hypoglycemia by the age
253 of 14 months despite the rescued Insulin expression seen in β -cell lesions (**Figure**
254 **7A**). Consistent with the reduced tumor load and normoglycemia seen at 14 months,
255 we found *β Men1* animals lacking ActivinB to demonstrate a prolonged survival after
256 10 months of age (**Figure 7B**). Taken together these observations confirm that tumor
257 onset and/or progression was altered in the *Inh β B- β Men1* animals and more
258 importantly that in the absence of ActivinB there are no dedifferentiated β -cells that
259 can go on to form aggressive tumors, which are associated with a worse prognosis
260 (**Figure 7C**).

261

262

263 CONCLUSION / DISCUSSION

264 Ample evidence from clinical studies and mouse work shows that pancreatic
265 cells demonstrate a high degree of cellular plasticity in response to various stresses
266 and pathological conditions. Here, we report that islet β -cell tumors induced by the
267 loss of the *Men1* suppressor gene are subjected to a β -cell dedifferentiation prior to a
268 late onset of aggressive insulinomas. More importantly, we provide solid evidence
269 that ActivinB mediates these processes.

270 We demonstrate that ActivinB, barely detectable in normal β -cells, is markedly
271 induced in dysplastic lesions and causes tumor cells to progressively lose their Insulin
272 expression and their capacity to express mature markers essential for β -cell function,
273 such as MafA, Pdx1, Nkx6.1 and Glut2. To that extent, the identification of ActivinB
274 as an endogenous modulator of β -cell plasticity brings a new twist to its previously
275 reported role in inhibiting Insulin secretion (Bertolino, et al., 2008; Wu, et al., 2014).
276 This role is consistent with the emerging functions of TGF β /BMP superfamilies in
277 the suppression of adult β -cell maturation (Blum, et al., 2014). Smad-BMP signaling
278 prevents β -cell differentiation in stem cells, zebrafish and mice (Chung, et al., 2010),
279 and TGF β , ActivinA and Smad3 are capable of repressing Insulin and a subset of
280 mature β -cell genes in islet β -cell lines and isolated mouse islets (Lin, et al.,
281 2009; Szabat, et al., 2010). Using Min6 and β TC cells, we found that ActivinB
282 represses the expression of several genes associated with β -cell maturity.
283 Interestingly, Szabat *et al.* report that ActivinA-stimulation of Min6 cells has the
284 same effects (Szabat, et al., 2010). Thus, both ActivinA and ActivinB can promote β -
285 cell dedifferentiation *in vitro*, through the same target genes. This observation is
286 somewhat conflicting with the acute, antagonistic roles previously reported for

287 ActivinA and ActivinB in β -cell Insulin secretion (Bertolino, et al., 2008;Wu, et al.,
288 2014). Nevertheless, both Activins have the capacity to activate Smad3-
289 phosphorylation through the use of Alk4/Alk7 type I receptors, which may explain
290 their common *in vitro* effects on β -cell maturity. Wu *et al.* recently demonstrated that
291 ActivinB is a more potent inducer of Smad3-phosphorylation than ActivinA in
292 isolated islets and β -cell lines (Wu, et al., 2014). Given that Smad3 has the capacity
293 to bind and mediate repression of the *Insulin* promoter (Lin, et al., 2009), our data
294 suggest that ActivinA may not induce a β -cell dedifferentiation *in vivo* as seen for
295 ActivinB. Indeed, we did not detect an increase in ActivinA expression in *Men1* β -
296 cell tumors, confirming that the observed β -cell dedifferentiation results solely from
297 the autocrine effects of ActivinB. This conclusion is supported by the lack of β -cell
298 dedifferentiation in the *Inh β B- β Men1* compound mutant mice.

299 Besides inducing the loss of β -cell maturity, ActivinB strongly upregulates Pax4,
300 both in a β -cell line and in Ins⁻ dedifferentiated lesions. While Pax4 is essential for
301 the development and differentiation of Insulin-producing β -cells in the mammalian
302 pancreas (Sosa-Pineda, et al., 1997), its functions in adult β -cells have been proposed
303 to orchestrate a network of genes that govern β -cell expansion and survival under
304 physiological and pathological conditions (Brun and Gauthier, 2008). Examining the
305 consequences of increased Pax4 expression in ActivinB-expressing tumor cells is
306 therefore important. However, the low proliferative index of dedifferentiated tumors
307 does not corroborate the previously described role of Pax4 in β -cell-induced
308 proliferation in rat and human islets (Brun, et al., 2004). Interestingly, long-term
309 conditional overexpression of Pax4 in mature islet β -cells represses the expression of
310 Insulin, MafA and Glut2, consistent with the occurrence of β -cell dedifferentiation

311 (Hu He, et al., 2011). This observation suggests that ActivinB-mediated induction of
312 Pax4 may contribute to triggering or maintaining β -cell dedifferentiation under the
313 pathophysiological context of β -cell tumors – a hypothesis supported by the lack of
314 Pax4 overexpression and β -cell dedifferentiation in the tumors in *Inh β B- β Men1* mice
315 lacking ActivinB expression.

316 While we initially demonstrated that ActivinB inhibits Insulin secretion
317 (Bertolino, et al., 2008), work by Wu *et al.* confirmed that transient stimulation of
318 isolated pancreatic islets with exogenous ActivinB suppresses Glucose Stimulated
319 Induced Secretion (GSIS) and ATP production (Wu, et al., 2014). In the diabetic state,
320 loss of acute GSIS is associated with a loss of β -cell mature phenotype (Weir and
321 Bonner-Weir, 2004). Therefore, it will be important to determine whether a sustained
322 inhibition of GSIS and ATP production mediated by upregulation of ActivinB in β -
323 cells could contribute to the observed plasticity of tumor β -cells. Our observations
324 suggest that tumor β -cells overexpress ActivinB as a means of protecting against the
325 overproduction of Insulin in animals developing insulinomas. Although physiologic
326 protection against an Insulin overload may occur through limitation of GSIS in the
327 early stages of tumor progression, the loss of β -cell functionality through
328 dedifferentiation is likely to be the major protective mechanism operating in these
329 tumors. In parallel, while we found the first signs of a moderate hypoglycemia to
330 correlate with a reduction in survival of the *β Men1* mice from the age of 10 months,
331 the glycemia and survival of the *Inh β B- β Men1* mutants at this age were comparable
332 to that of control animals. Histological analysis revealed that the reduction in survival
333 of the *β Men1* mice was associated with the onset of glandular lesions that do not
334 express ActivinB but strongly express Insulin and have an elevated proliferation

335 index. Interestingly, we found that *InhβB-βMen1* mice lack this type of lesion,
336 suggesting that ActivinB-induced β-cell dedifferentiation is a critical step in the late
337 onset of those aggressive insulinomas. Despite constituting only 3.6 to 7.6% of the
338 lesions that develop at the age of 14 months in the *βMen1* mice, insulinomas are
339 likely to be responsible for the poor survival of these mice. This hypothesis would
340 explain why the *InhβB-βMen1* mutants have a survival rate comparable to that of
341 control animals, although it does not clarify why those mice have normal glycemia
342 (126.4±5.9 mg/dL (n=5)) despite their elevated Ins⁺ tumor load. We speculate that
343 those mice have somehow developed Insulin resistance, though we were unable to
344 demonstrate a glucose intolerance when challenging the mice with an IPGTT (data
345 not shown).

346 While the field of pancreatic endocrine tumors is still puzzled by the functional
347 complexity and cellular diversity of islet tumors, our results identify ActivinB as an
348 intrinsic β-cell candidate that contributes to the plasticity of islet tumors. Unlike
349 previous Insulinomas mouse models, which develop aggressively proliferative,
350 poorly dedifferentiated carcinomas upon forced activation of Hedgehog/Gli signaling
351 or expression of the sv40 large T antigen in β-cells (Hunter, et al., 2013; Landsman, et
352 al., 2011), the dedifferentiated tumors in the *βMen1* mouse model have a low
353 proliferative potential and lack expression of the Sox9 and Ngn3 markers of early
354 pancreatic progenitors, similar to the pancreatic endocrine tumors found in MEN1
355 patients. Such observations highlight the complexity and subtlety of the mechanism
356 that may control β-cell tumor dedifferentiation *in vivo*. Although our work relates to
357 tumors that develop upon disruption of the *Men1* gene in mice, ActivinB re-
358 expression occurs in various sporadic forms of pancreatic human islet tumors (La
359 Rosa, et al., 2004). ActivinB therefore has potential as a biomarker and drug target

360 that could refine the clinical classification of pancreatic endocrine tumors as well as
361 provide new therapeutic approaches to limiting the onset of aggressive tumors. More
362 importantly, our work uncovers a previously unknown physiological role of ActivinB
363 in the maintenance of β -cell maturity. Identifying the *in vivo* signals that trigger the
364 expression of ActivinB in pancreatic islet cells will be crucial to further
365 understanding the cellular contexts that promote β -cell dedifferentiation.

366

367 **MATERIALS AND METHODS**

368 *Mice strains and procedure*

369 *β Men1* and *Inh β B-KO* have been previously described (Bertolino, et al.,
370 2003; Vassalli, et al., 1994). Control (*Men1^{F/F}*), *β Men1* and *Inh β B- β Men1* mice were
371 maintained in mixed 129sv/C57bl6 background. Glucose measurements were done
372 with a glucometer (Abbot, Rungis, France) from 6-hour-fasted mice. All animal
373 experiments were performed in accordance with the animal care guidelines of the
374 European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethical
375 Committee.

376

377 *Immunohistochemical and Immunofluorescence analysis*

378 Pancreases, collected from 6h-fasted mice, were fixed 24h in 4% formalin prior
379 paraffin embedding. Immunohistochemical staining (IHC) were revealed with DAB
380 according to the manufacturer's instructions (DAB-Kit, Vector Laboratories,
381 Peterborough, UK). For immunofluorescence samples were counterstained with Dapi
382 (Vector Laboratories, Peterborough, UK). Lists of antibodies are provided in
383 supplemental material.

384

385 ***Vector construction and generation of transgenic zebrafish***

386 insulin:loxP-mCherry-STOP-loxP-inhbb^{K1101} was generated from the insulin:loxP-
387 mCherry-STOP-loxP-H2B-GFP construct (Hesselson, et al., 2009) by excising H2B-
388 GFP and inserting the *inhbb* gene, using In-Fusion HD cloning kit (Clontech,
389 Mountain View, USA). Independent transgenic lines were generated, and similar
390 results obtained with the offspring of different founders. Primers used for cloning
391 were inhbb-infusion-FWD: ggccggccaggcgcgccaccatggacacgatattatgaa and inhbb-
392 infusion-REV: tctagagtcgcccgccttcaggcacagccgcactcct. *Tg(insulin:loxP-mCherry-*
393 *STOP-loxP-inhbb,cryaa:Cerulean)* zebrafish line was crossed with
394 *Tg(insulin:Cre,cryaa:Venus)* (Hesselson, et al., 2009) or double-transgenic for
395 *Tg(insulin:Cre,cryaa:Venus)* and *Tg(insulin:GFP)* (Huang, et al., 2001). Controls
396 corresponded to siblings of the experimental larvae and carried *Tg(insulin:loxP-*
397 *mCherry-STOP-loxP-inhbb,cryaa:Cerulean)* or *Tg(insulin:loxP-mCherry-STOP-*
398 *loxP-inhbb,cryaa:Cerulean);Tg(insulin:GFP)*.

399

400 ***Tumor and β -cell morphometric analyses***

401 Tumor and β -cell surface measurements were calculated with Histolab[™] software
402 (Alphelys, Plaisir, France) after a visual elimination of artifacts from whole pancreas
403 scanning acquired on an Eclipse E44 microscope (Nikon, Champigny sur Marne,
404 France). Briefly, pancreas were cleared of fat and lymph nodes before fixation.
405 Pancreas sections were stained with Hematoxylin & Eosin (tumor mass
406 quantification) or for insulin and glucagon (β -cell mass quantification).
407 Quantifications were performed blind to the genotype on at least 2 randomized
408 sections distant from 30 μ M.

409

410 ***Cell Culture***

411 Min6 and β TC cells were cultured as described (Szabat, et al., 2010). Cells were
412 subjected to a 24h serum starvation prior 72h stimulation with 1nM ActivinB
413 (Peprotech, Rocky Hill, USA). When mentioned, 10nM of SB431542 (Sigma, Lyon,
414 France) was added to the stimulation media.

415

416 ***Real-Time Reverse Transcriptase-PCR and Western Blot analysis***

417 RNA isolations were done with a RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, USA). Real-Time
418 PCR analyses were carried out on a Step One RT System (Applied Biosystem, Saint
419 Aubin, France) using SYBR-Green reagent (Life Technology, Saint Aubin, France)
420 and results of each samples normalized to *Tpb*. Primer-sequences are provide in
421 supplemental material. For Western-Blots, proteins were extracted with a RIPA
422 buffer and quantified using a DC-assay kit (Biorad, Hercules, USA). Antibodies are
423 listed in supplemental-material.

424

425 ***Statistical analyses***

426 Statistical analyses were performed as described in figure legends; unpaired Student's
427 *t* tests were used unless indicated. All analyses were performed by using Prism5
428 Software (GraphPad, San Diego, USA); *P* value of ± 0.05 was considered significant.
429 Results are given as means \pm SEM.

430

431

432 **ACKNOWLEDGEMENTS**

433 The authors thank ALECs-SFP (Lyon) and ANICAN (CRCL-Lyon) animal staffs for
434 maintenance of mouse strains. We are grateful to Dr B. Sosa-Pineda for the anti-Pax4

435 antibody. We thank Tamsin Lindström for critical reading and editing the manuscript.
436 This work was supported by La Ligue contre le Cancer (CD42 and CD69), Lyon I
437 University and l'Agence Nationale de Recherche (grant SVSE2
438 ANR10BLAN124004). DR was supported by fellowships from the French Ministry of
439 Education and Research and La Ligue.

440

441 **COMPETING INTERESTS**

442 The authors declare that no financial and non-financial competing interests exist
443 regarding the present work.

444

445 **REFERENCES**

446 Antsiferova M, and Werner S. The bright and the dark sides of activin in wound
447 healing and cancer. *Journal of cell science* 2012;**125**(Pt 17):3929-37 doi:
448 10.1242/jcs.094789.

449 Asa SL. Pancreatic endocrine tumors. *Modern pathology : an official journal of the*
450 *United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2011;**24 Suppl 2**:S66-77
451 doi: 10.1038/modpathol.2010.127.

452 Back SH, Scheuner D, Han J, et al. Translation attenuation through eIF2alpha
453 phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in
454 beta cells. *Cell metabolism* 2009;**10**(1):13-26 doi: 10.1016/j.cmet.2009.06.002.

455 Bernardo AS, Hay CW, and Docherty K. Pancreatic transcription factors and their
456 role in the birth, life and survival of the pancreatic beta cell. *Molecular and cellular*
457 *endocrinology* 2008;**294**(1-2):1-9 doi: 10.1016/j.mce.2008.07.006.

458 Bertolino P, Holmberg R, Reissmann E, Andersson O, Berggren PO, and Ibanez CF.
459 Activin B receptor ALK7 is a negative regulator of pancreatic beta-cell function.

460 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
461 2008;**105**(20):7246-51 doi: 10.1073/pnas.0801285105.

462 Bertolino P, Tong WM, Herrera PL, Casse H, Zhang CX, and Wang ZQ. Pancreatic
463 beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene
464 causes full penetrance of insulinoma development in mice. Cancer research
465 2003;**63**(16):4836-41

466 Blum B, Roose AN, Barrandon O, et al. Reversal of beta cell de-differentiation by a
467 small molecule inhibitor of the TGFbeta pathway. eLife 2014;**3**:e02809 doi:
468 10.7554/eLife.02809.

469 Brabletz T. To differentiate or not--routes towards metastasis. Nature reviews. Cancer
470 2012;**12**(6):425-36 doi: 10.1038/nrc3265.

471 Brown ML, Kimura F, Bonomi LM, Ungerleider NA, andSchneyer AL. Differential
472 synthesis action of TGFss superfamily ligands in mouse and rat islets. Islets
473 2011;**3**(6):367-75 doi: 10.4161/isl.3.6.18013.

474 Brown ML, andSchneyer AL. Emerging roles for the TGFbeta family in pancreatic
475 beta-cell homeostasis. Trends in endocrinology and metabolism: TEM
476 2010;**21**(7):441-8 doi: 10.1016/j.tem.2010.02.008.

477 Brun T, Franklin I, St-Onge L, et al. The diabetes-linked transcription factor PAX4
478 promotes {beta}-cell proliferation and survival in rat and human islets. The Journal
479 of cell biology 2004;**167**(6):1123-35 doi: 10.1083/jcb.200405148.

480 Brun T, andGauthier BR. A focus on the role of Pax4 in mature pancreatic islet beta-
481 cell expansion and survival in health and disease. Journal of molecular
482 endocrinology 2008;**40**(2):37-45 doi: 10.1677/JME-07-0134.

483 Chung WS, Andersson O, Row R, Kimelman D, and Stainier DY. Suppression of
484 Alk8-mediated Bmp signaling cell-autonomously induces pancreatic beta-cells in

485 zebrafish. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
486 America 2010;**107**(3):1142-7 doi: 10.1073/pnas.0910205107.

487 Dhawan S, Georgia S, Tschen SI, Fan G, and Bhushan A. Pancreatic beta cell identity
488 is maintained by DNA methylation-mediated repression of Arx. Developmental cell
489 2011;**20**(4):419-29 doi: 10.1016/j.devcel.2011.03.012.

490 Hesselson D, Anderson RM, Beinat M, and Stainier DY. Distinct populations of
491 quiescent and proliferative pancreatic beta-cells identified by H2Acre mediated
492 labeling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
493 America 2009;**106**(35):14896-901 doi: 10.1073/pnas.0906348106.

494 Hu He KH, Lorenzo PI, Brun T, et al. In vivo conditional Pax4 overexpression in
495 mature islet beta-cells prevents stress-induced hyperglycemia in mice. Diabetes
496 2011;**60**(6):1705-15 doi: 10.2337/db10-1102.

497 Huang H, Vogel SS, Liu N, Melton DA, and Lin S. Analysis of pancreatic
498 development in living transgenic zebrafish embryos. Molecular and cellular
499 endocrinology 2001;**177**(1-2):117-24 doi: 10.1016/S0303-7207(01)00408-7.

500 Hunter KE, Quick ML, Sadanandam A, Hanahan D, and Joyce JA. Identification and
501 characterization of poorly differentiated invasive carcinomas in a mouse model of
502 pancreatic neuroendocrine tumorigenesis. PloS one 2013;**8**(5):e64472 doi:
503 10.1371/journal.pone.0064472.

504 Kim SK, Hebrok M, Li E, et al. Activin receptor patterning of foregut organogenesis.
505 Genes & development 2000;**14**(15):1866-71 doi: 10.1101/gad.14.15.1866.

506 La Rosa S, Uccella S, Marchet S, Capella C, and Lloyd RV. Localization of inhibins
507 activins in normal endocrine cells and endocrine tumors of the gut and pancreas: an
508 immunohistochemical and in situ hybridization study. The journal of histochemistry

509 and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 2004;**52**(2):217-
510 25 doi: 10.1177/002215540405200210.

511 Landsman L, Parent A, and Hebrok M. Elevated Hedgehog/Gli signaling causes beta-
512 cell dedifferentiation in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of
513 the United States of America 2011;**108**(41):17010-5 doi: 10.1073/pnas.1105404108.

514 Lin HM, Lee JH, Yadav H, et al. Transforming growth factor-beta/Smad3 signaling
515 regulates insulin gene transcription and pancreatic islet beta-cell function. The
516 Journal of biological chemistry 2009;**284**(18):12246-57 doi:
517 10.1074/jbc.M805379200.

518 Lu J, Herrera PL, Carreira C, et al. Alpha cell-specific Men1 ablation triggers the
519 transdifferentiation of glucagon-expressing cells and insulinoma development.
520 Gastroenterology 2010;**138**(5):1954-65 doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.046.

521 Marusyk A, Almendro V, and Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass
522 for cancer? Nature reviews. Cancer 2012;**12**(5):323-34 doi: 10.1038/nrc3261.

523 Ogawa K, Abe K, Kurosawa N, et al. Expression of alpha, beta A and beta B subunits
524 of inhibin or activin and follistatin in rat pancreatic islets. FEBS letters
525 1993;**319**(3):217-20 doi: 10.1016/0014-5793(93)80549-A.

526 Oliver-Krasinski JM, and Stoffers DA. On the origin of the beta cell. Genes &
527 development 2008;**22**(15):1998-2021 doi: 10.1101/gad.1670808.

528 Pelengaris S, Khan M, and Evan GI. Suppression of Myc-induced apoptosis in beta
529 cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic
530 progression. Cell 2002;**109**(3):321-34 doi: 10.1016/S0092-8674(02)00738-9.

531 Russ HA, Bar Y, Ravassard P, and Efrat S. In vitro proliferation of cells derived from
532 adult human beta-cells revealed by cell-lineage tracing. Diabetes 2008;**57**(6):1575-
533 83 doi: 10.2337/db07-1283.

534 Serewko-Auret MM, Mould AW, Loffler KA, Duncan R, Kay GF, and Hayward NK.
535 Alterations in gene expression in MEN1-associated insulinoma development.
536 *Pancreas* 2010;**39**(8):1140-6 doi: 10.1097/MPA.0b013e3181dc67fc.

537 Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, and Gruss P. The Pax4 gene is
538 essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian
539 pancreas. *Nature* 1997;**386**(6623):399-402 doi: 10.1038/386399a0.

540 Spijker HS, Ravelli RB, Mommaas-Kienhuis AM, et al. Conversion of mature human
541 beta-cells into glucagon-producing alpha-cells. *Diabetes* 2013;**62**(7):2471-80 doi:
542 10.2337/db12-1001.

543 Sulyok S, Wankell M, Alzheimer C, and Werner S. Activin: an important regulator of
544 wound repair, fibrosis, and neuroprotection. *Molecular and cellular endocrinology*
545 2004;**225**(1-2):127-32 doi: 10.1016/j.mce.2004.07.011.

546 Szabat M, Johnson JD, and Piret JM. Reciprocal modulation of adult beta cell
547 maturity by activin A and follistatin. *Diabetologia* 2010;**53**(8):1680-9 doi:
548 10.1007/s00125-010-1758-0.

549 Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, and Accili D. Pancreatic beta cell
550 dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell*
551 2012;**150**(6):1223-34 doi: 10.1016/j.cell.2012.07.029.

552 Vassalli A, Matzuk MM, Gardner HA, Lee KF, and Jaenisch R. Activin/inhibin beta
553 B subunit gene disruption leads to defects in eyelid development and female
554 reproduction. *Genes & development* 1994;**8**(4):414-27 doi: 10.1101/gad.8.4.414.

555 Weinberg N, Ouziel-Yahalom L, Knoller S, Efrat S, and Dor Y. Lineage tracing
556 evidence for in vitro dedifferentiation but rare proliferation of mouse pancreatic
557 beta-cells. *Diabetes* 2007;**56**(5):1299-304 doi: 10.2337/db06-1654.

558 Weir GC, and Bonner-Weir S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during
559 progression to diabetes. *Diabetes* 2004;**53** Suppl 3:S16-21 doi:
560 10.2337/diabetes.53.suppl_3.S16.

561 Wu H, Mezghenna K, Marmol P, et al. Differential regulation of mouse pancreatic
562 islet insulin secretion and Smad proteins by activin ligands. *Diabetologia*
563 2014;**57**(1):148-56 doi: 10.1007/s00125-013-3079-6.

564 Xia Y, and Schneyer AL. The biology of activin: recent advances in structure,
565 regulation and function. *The Journal of endocrinology* 2009;**202**(1):1-12 doi:
566 10.1677/JOE-08-0549.

567 Yang Y, Gurung B, Wu T, Wang H, Stoffers DA, and Hua X. Reversal of preexisting
568 hyperglycemia in diabetic mice by acute deletion of the *Men1* gene. *Proceedings of*
569 *the National Academy of Sciences of the United States of America*
570 2010;**107**(47):20358-63 doi: 10.1073/pnas.1012257107.

571 Zhang YQ, Cleary MM, Si Y, et al. Inhibition of activin signaling induces pancreatic
572 epithelial cell expansion and diminishes terminal differentiation of pancreatic beta-
573 cells. *Diabetes* 2004;**53**(8):2024-33 doi: 10.2337/diabetes.53.8.2024.

574 Zhou X, Wang JL, Lu J, et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by
575 ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* 2010;**142**(4):531-43 doi:
576 10.1016/j.cell.2010.07.011.

577 Ziv O, Glaser B, and Dor Y. The plastic pancreas. *Developmental cell* 2013;**26**(1):3-7
578 doi: 10.1016/j.devcel.2013.06.013.

579
580
581
582

583 **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

584

585 ***List of used Primary antibodies:***

Antigen	Species	Source	Dilution		
			IHC	IF	WB
ActivinB	Rabbit	Abnova	1/2000	1/2000*	/
ActivinB	Rabbit	Abcam	1/2000	1/2000*	/
ActRIIA	Rabbit	Genetex	/	1/150	/
ChromograninA	Rabbit	Immunostar	1/2000	1/100	/
Glucagon	Rabbit	Cell Signaling	1/750	/	/
Glut2	Rabbit	Chemicon	/	1/200	/
Insulin	Guinea-Pig	Dako	1/5000	1/200	/
Ki67	Goat	Santa Cruz Biotech.	/	1/1000*	/
MafA	Rabbit	Abcam	/	1/4000*	1/1000
Ngn3	Goat	Beta Cell Biol. Consortium	/	1/10000*	/
Nkx2.2	Mouse	DHSB	/	/	1/1000
Nkx6.1	Mouse	DHSB	/	1/5000*	1/1000
Pax4	Rabbit	Dr B. Sosa-Pineda	/	1/30000*	1/5000
Pdx1	Goat	Abcam	/	1/500	1/10000
PP	Goat	Imgenex	1/500	/	/
PSmad3	Rabbit	Cell signaling	/	1/50	/
Somatostatin	Goat	Santa Cruz Biotech.	1/5000	/	/
Sox9	Rabbit	Sigma Aldrich	/	1/500	/

586

587 * Combined with a Tyramide Signal Amplification (TSA system, Perkin-Elmer)

588

589

590

591

592 **List of used secondary antibodies:**

Antigen	Species	Source	Dilution
Biotinylated anti-rabbit IgG	Horse	Vector	1/200
Biotinylated anti-goat IgG	Horse	Vector	1/200
Biotinylated anti-mouse IgG	Goat	Vector	1/200
Biotinylated anti-guinea-pig IgG	Goat	Vector	1/200
Anti-Guinea Pig Alexa Fluor® 488	Donkey	Jackson Immunoresearch	1/200
Anti-Rabbit Alexa Fluor® 555	Donkey	Invitrogen	1/200

593

594 **Primer used for real-time quantitative RT-PCR:**

Primers	Forward	Reverse
Tbp	5'-TGG TGT GCA CAG GAG CCA AG-3'	5'-TTC ACA TCA CAG CTC CCC AC-3'
Ins1	5'-AGG ACC CAC AAG TGG AAC AAC-3'	5'-GTG CAG CAC TGA TCC ACA ATG-3'
Ins2	5'-GCT CTC TAC CTG GTG TGT GGG-3'	5'-CTC CAC CCA GCT CCA GTT GTG-3'
Mafa	5'-TCA GCA AGG AGG AGG TCA TCC GA-3'	5'-TGG CTC TGG AGC TGG CAC TTC T-3'
Mafb	5'-AGC AGG TGT GAC TCA CGA TG-3'	5'-AGA AGC GGT CCT CCA CAC TA-3'
Sc12a2	5'-TTT GGT GGG TGG CTC GGG GA-34	5'-GGG CGT GTG CCG GTC CAA AT-3'
Nkx6.1	5'-ACT TGG CAG GAC CAG AGA GA-3'	5'-AGA GTT CGG GTC CAG AGG TT-3'
Nkx2.2	5'-TTG TCA TTG TCC GGT GAC TC-3'	5'-TCT ACG ACA GCA GCG ACA AC-3'
Pdx1	5'-AGG TGC TTA CAC AGC GGA AC-3'	5'-GGG TCC CGC TAC TAC GTT TC-3'
Pax4	5'-TGG ACA CCC GAC AGC ACA T-3'	5'-CTT AAG GCT CCG TGA GAT GTC A-3'

595

596

597

598

599

600

601

602

Figure 1

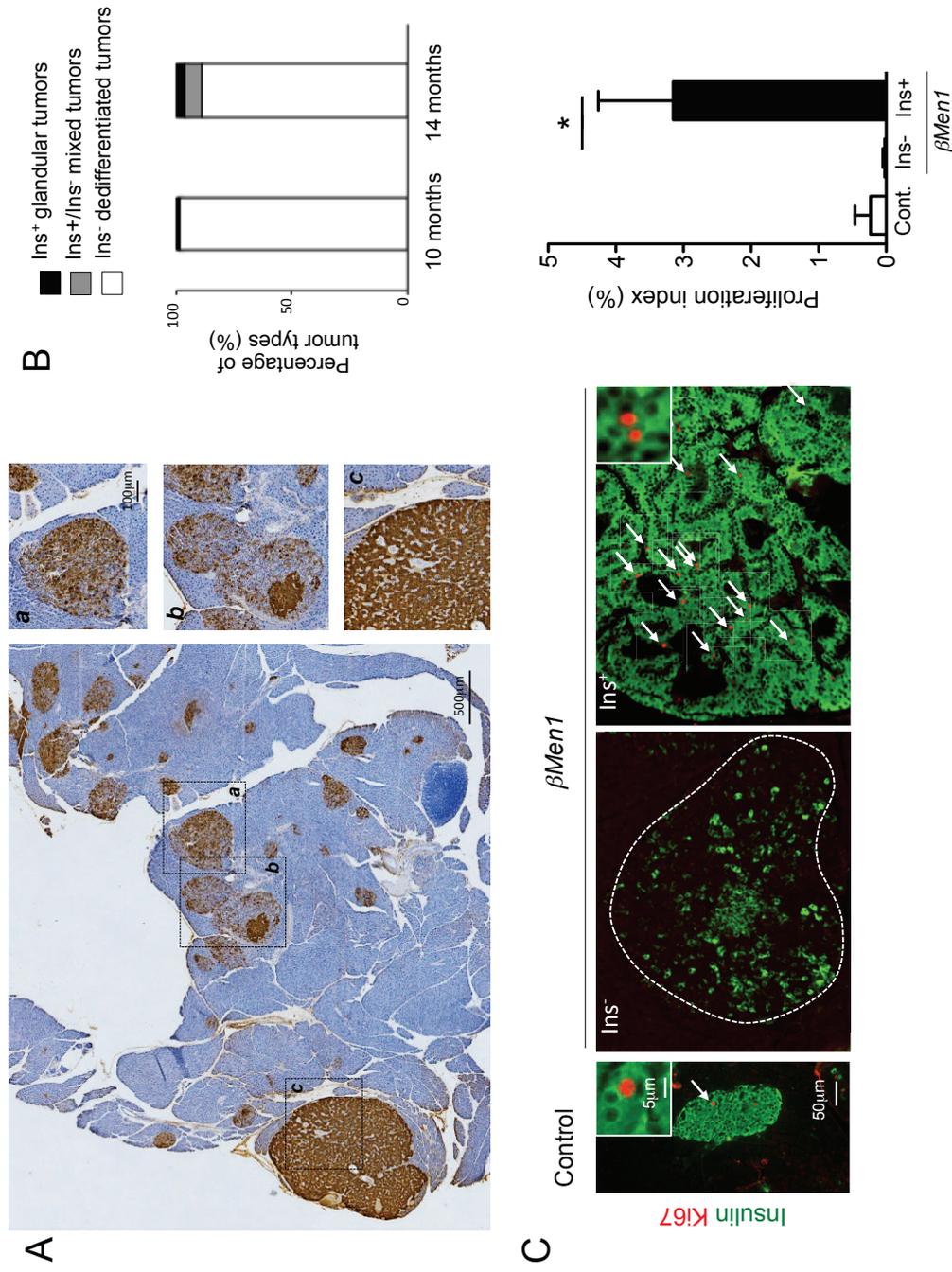


Figure 1. Analysis of Insulin expression in β Men1 β -cell tumors reveals a tumor heterogeneity and the late onset of high proliferative insulinomas. (A) Representative whole pancreas scan depicting the Insulin staining heterogeneity seen in 14-month-old β Men1 developed tumors. Right panels are magnified views of tumor subtypes squared by dashed lines. *a*: Ins⁻ dedifferentiated lesions, *b*: mixed Ins⁺/Ins⁻ expressing tumors, *c*: trabecular tumors with strong Insulin immunoreactivity. (B) Quantification of the different tumor types seen in β Men1 mice at 10 and 14 months of age. Data are mean of pancreas sections analyzed in 3 independent mice per age. (C) Representative result of immunofluorescent Ki67 and Insulin costaining within a control islet, an Ins⁻ lesions and a trabecular Ins⁺ tumor. Dashed lines surround Ins⁺ islet. White arrows indicate Ki67 positive nuclei found in Ins⁺ cells. Insets are magnified views of representative Ki67 positive cells. Graph shows the percentage of positive Ki67 cells per counted islet β -cells. Minimums of one thousand cells were counted from 3 independent controls (Cont.), and β Men1 mice. Data are shown as mean \pm SEM; *: $p < 0.05$, Student-t test.

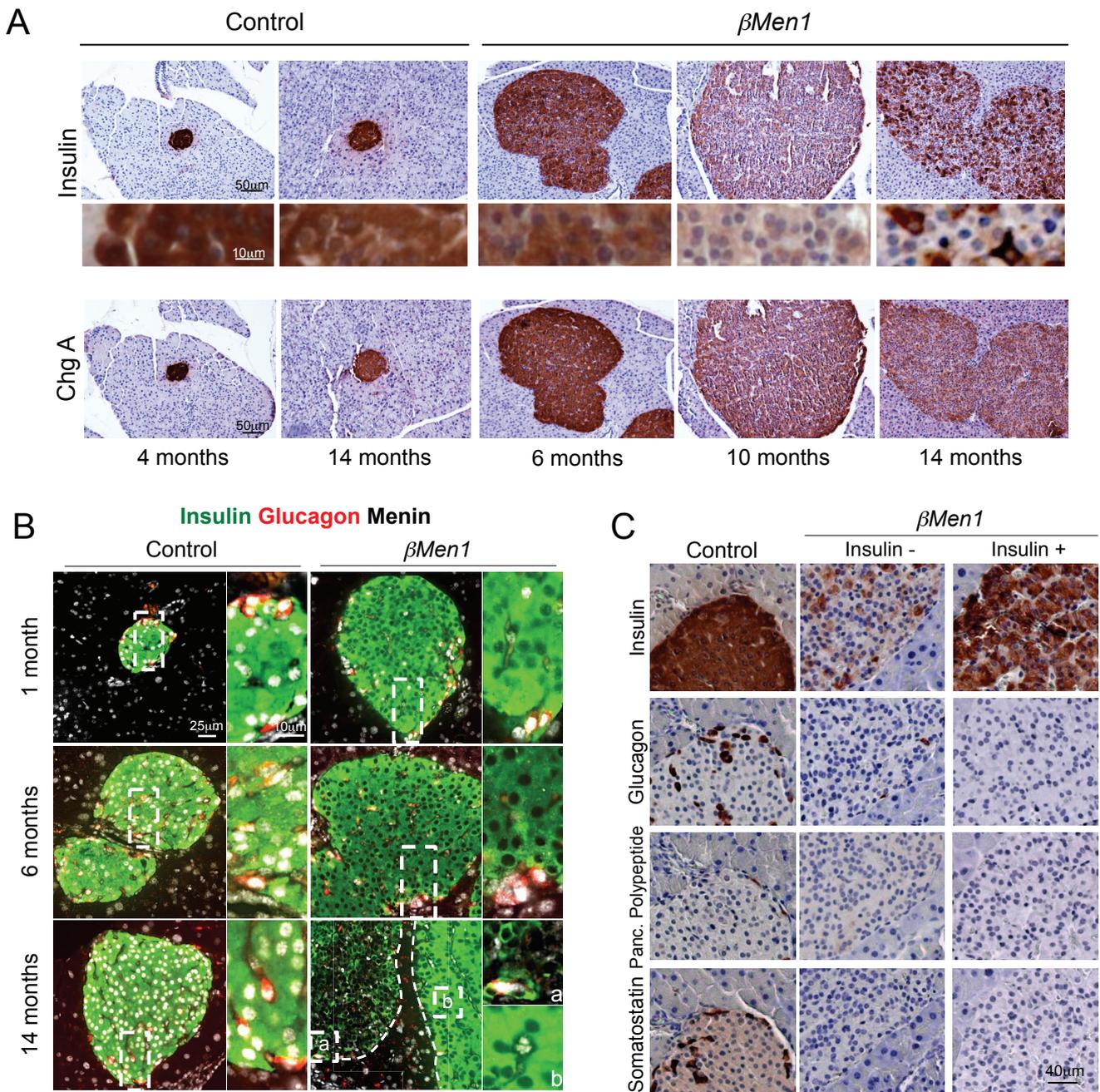


Figure 2. Progressive dedifferentiation of $\beta Men1$ tumor β -cells. (A) Immunohistochemical analysis of Insulin and ChromograninA (Chg A) expression. Representative pictures of pancreas serial-sections are shown at various tumor progression stages. Staining of 4 and 14-month-old control islets are shown as reference. Horizontal rectangle-pictures are magnified view of Insulin stained islet areas. (B) Lineage tracing of Menin expression. Representative result of Insulin (green), Glucagon (red) and Menin (gray) triple-immunofluorescent analysis of 1, 6, 14-months control and $\beta Men1$ pancreas. Right pictures are magnification of dashed rectangle. (C) Immunohistochemical staining of endocrine hormones in 14-month-old pancreas serial sections. Expressions of Insulin, Glucagon, Pancreatic polypeptide (Panc. polypeptide) and Somatostatin were analyzed in control islets and $\beta Men1$ lesions for their Insulin positive or negative status.

Figure 3

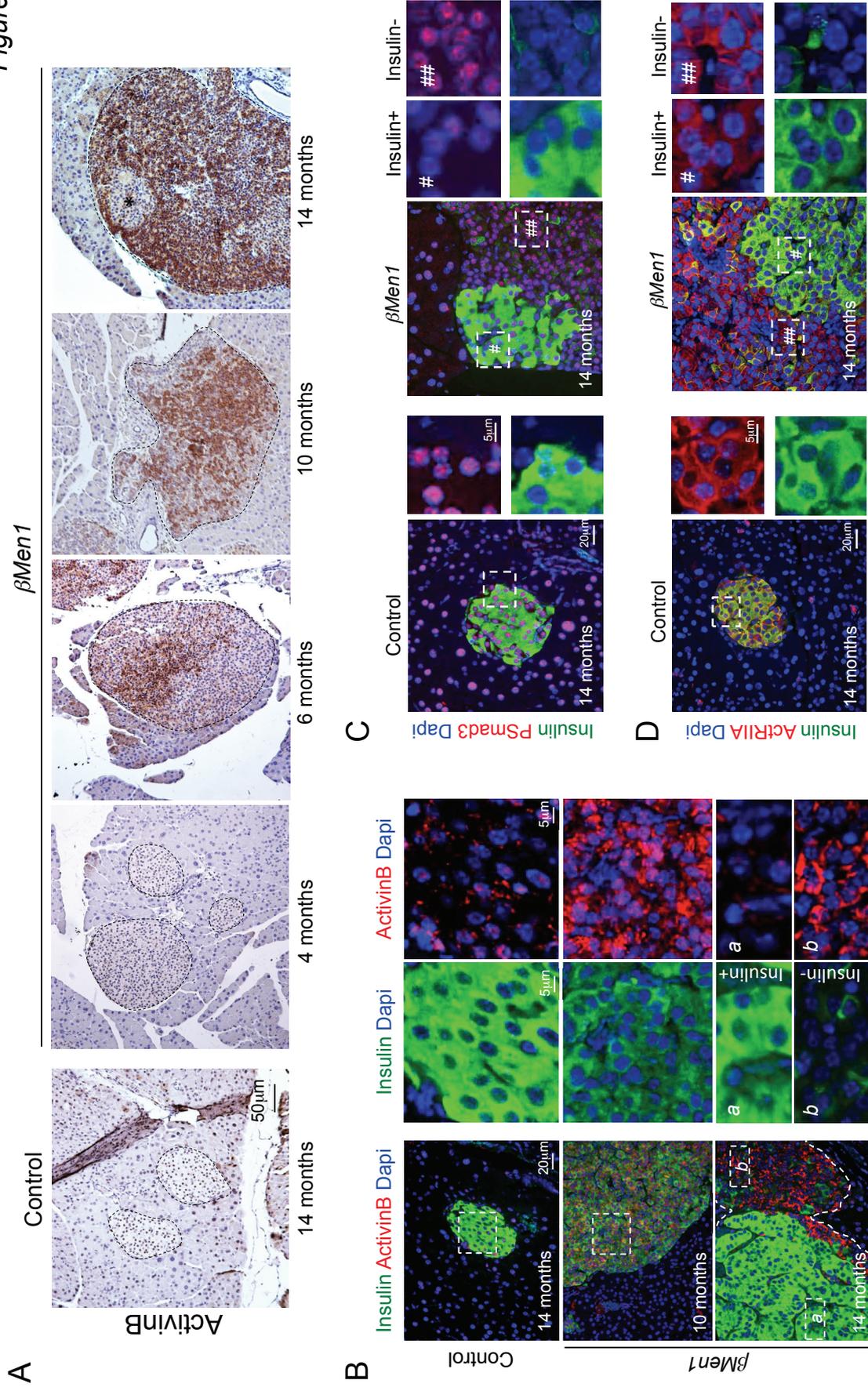


Figure 3. ActivinB induced-expression in β -tumor-cells leads to a progressive down-regulation of insulin expression mediated through ActRII and Smad3 signaling. (A) Immunohistochemical analysis of ActivinB expression in β Men1 and control pancreas. Islets are outlined by dashed lines. *: indicates an ActivinB negative area. (B) Immunofluorescent (IF) colocalization of ActivinB and insulin within 10, 14 months tumor lesions and control islets. (C, D) Immunofluorescent (IF) colocalization of insulin and P-Smad3 (C) or ActRII (D) expression in β Men1 tumors. Right panels are higher magnifications of Ins⁺ (#), Ins⁻(##) dashed areas.

Figure 4

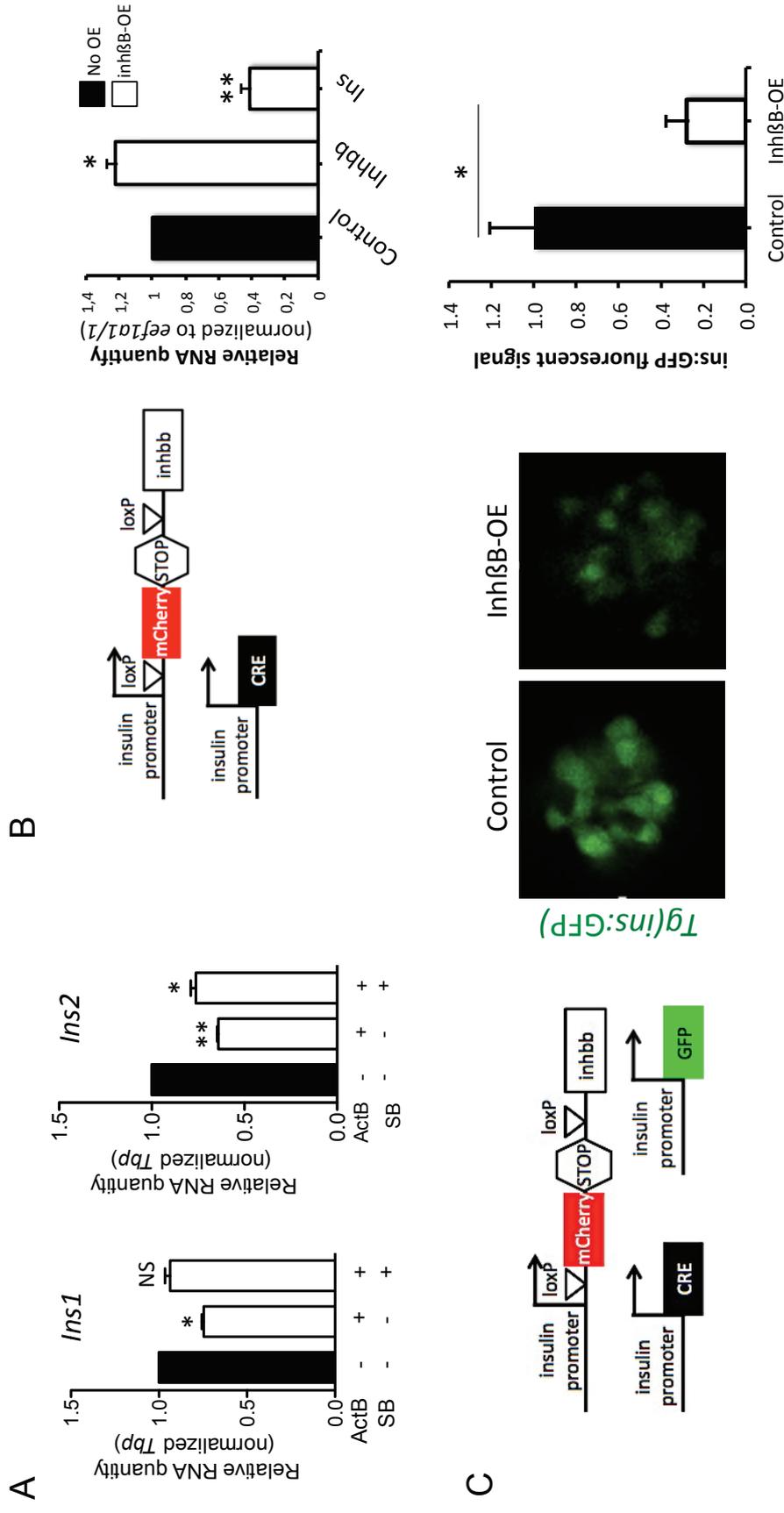


Figure 4. ActivinB induces the downregulation of insulin expression in β -cells both in vitro and in transgenic zebrafish larvae that overexpress ActivinB in β -cells. (A) Quantitative RT-PCR analysis of *Ins1* and *Ins2* gene expression in Min6 cells following 72h ActivinB (ActB) treatment. SB: SB431542 inhibitor. Graphs are representative examples of 3 independent experiments. Data are presented as mean \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; NS: not significant, Student-t test. (B) In double-transgenic larvae (inh β B-OE), expression of cre in β -cells excises the mCherry-Stop cassette, enabling the expression of *inhbb* in the β -cells. Quantitative RT-PCR analysis of *inhbb* and *insulin* (*ins*) genes in control versus inh β B-OE zebrafish larvae. Data shown are the mean \pm SEM obtained using 8 larvae at 7 dpf from one zebrafish founder. For each gene, values obtained for inh β B-OE zebrafish larvae are compared to those for non-overexpressing larvae (control values are normalized to 1). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; Wilcoxon test. (C) In triple-transgenic larvae, insulin-expressing cells are also labeled by the ins:GFP transgene. Fluorescence of ins:GFP+ cells in control vs. inh β B-OE islets at the focal plane with the highest GFP fluorescence. Each image is representative of one plane in control and inh β B-OE islets. The right panel shows the quantification of the fluorescent signal. The quantified surface area displaying the islet was set to 2552 μ m². Data shown are the mean \pm SEM obtained with 3 zebrafish larvae at 7 dpf. * $P < 0.05$; Wilcoxon test.

Figure 5

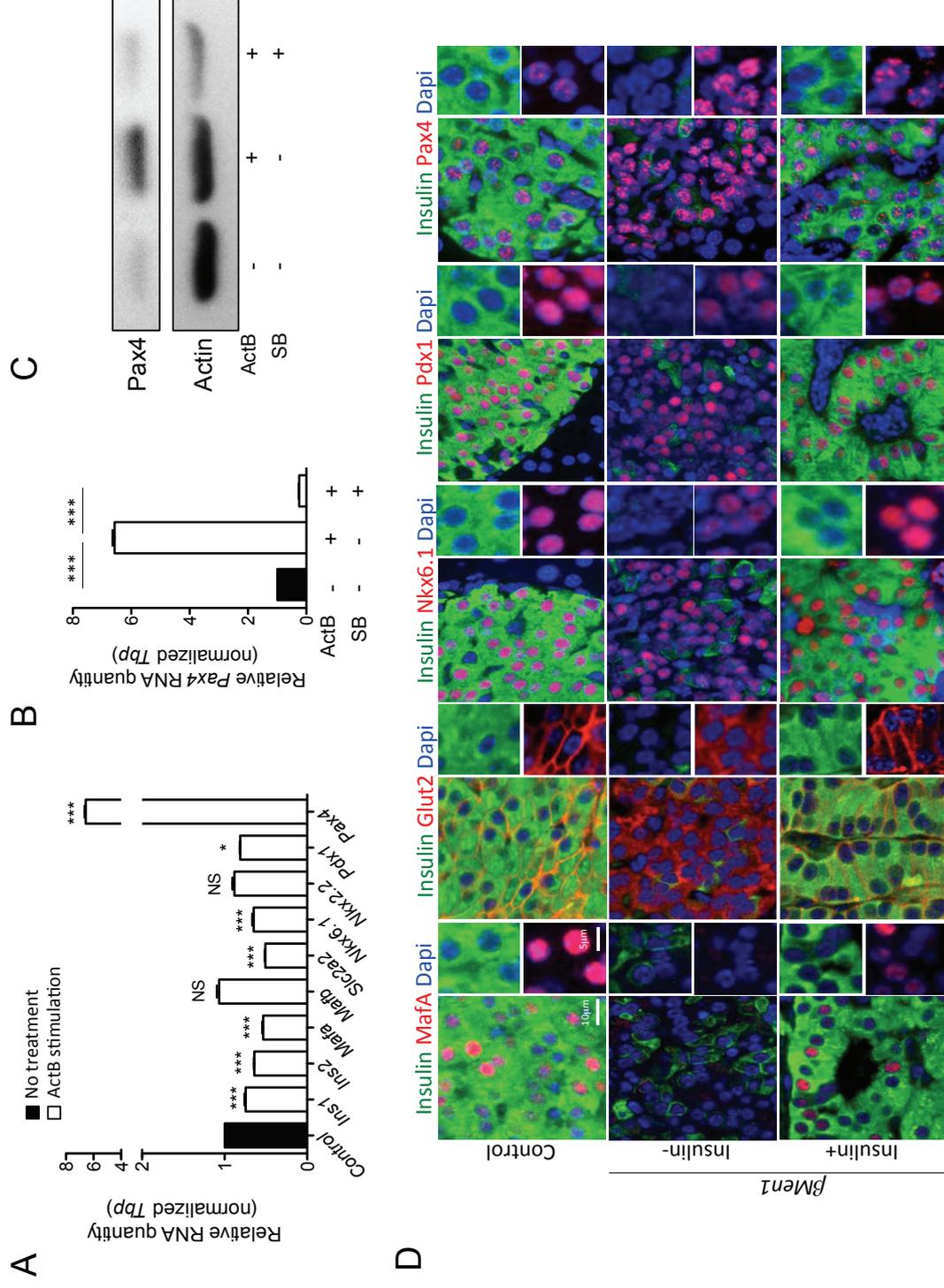


Figure 5. ActivinB induced a cell dedifferentiation through the misregulation of mature β -cell markers. (A) Quantitative RT-PCR analysis of mature β -cell gene expression in Min6 cells following 72 hours-ActivinB stimulation. The graph is a representative example of 3 independent experiments. Data are presented as mean \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; NS: not significant; Student-t test. (B, C) Analysis of Pax4 gene (B) and protein (C) expression in Min6 cells subjected to 72h ActivinB (ActB) stimulation in the presence or absence of SB431542 (SB). The graph is a representative of 3 independent experiments. Data are represented as mean \pm SEM. ****: $p < 0.0001$; student-t test. (D) Immunofluorescent (IF) colocalization of Insulin and mature β -cell markers in ins- and ins+ tumors developed at the age of 14 months. Right panels are magnified views of separate fluorescence channels.

Figure 6

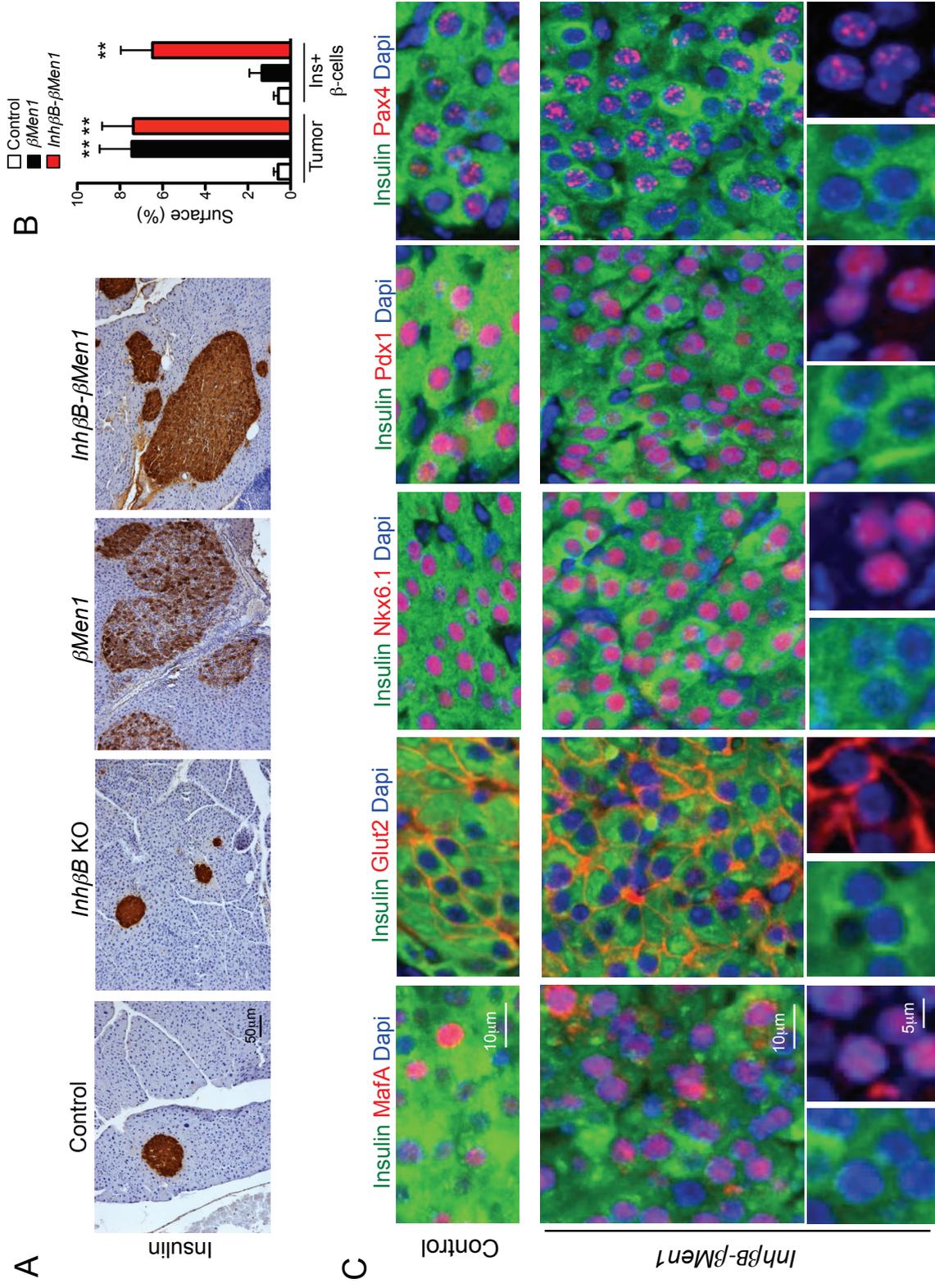


Figure 6. Inactivation of ActivinB restores tumor β -cell differentiation in β *Men1* Insulinomas. (A) Immunohistochemical analysis of Insulin expression in 14-month-old pancreas from animals of indicated genotype. (B) Morphometric measurements of total tumor vs. Insulin immunoreactive (*Ins*⁺) β -cell surfaces observed in 14-month old β *Men1* (*n*=4), *InhβB-βMen1* (*n*=4), and control mice (*n*=4). Data represent the mean of surface \pm SEM. **: *p*<0.01; student-t test. (C) Immunofluorescent (IF) colocalization of Insulin and mature β -cell markers in *InhβB-βMen1* tumors at the age of 14 months. Lower panels are magnified views of separate fluorescence channels.

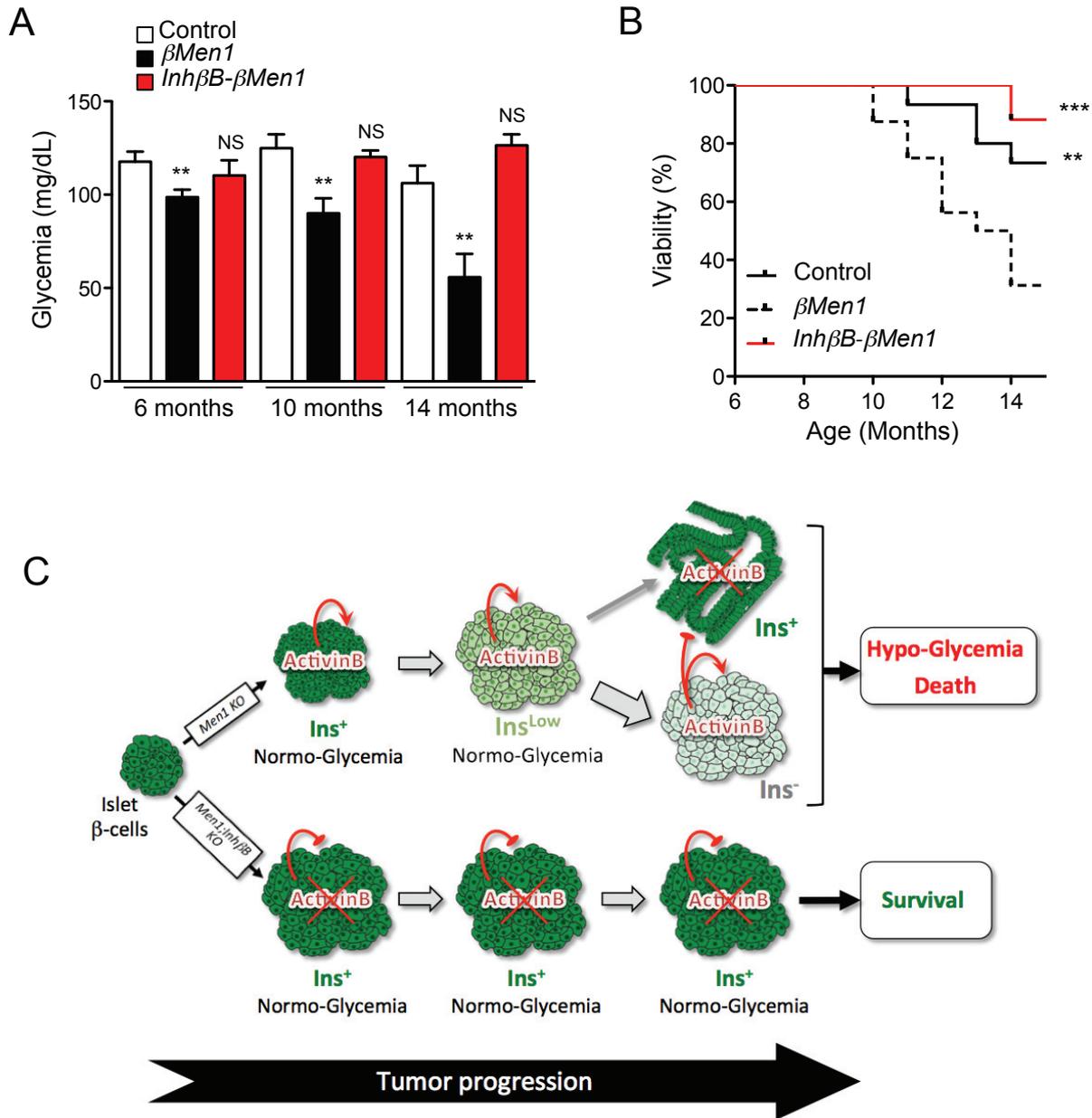
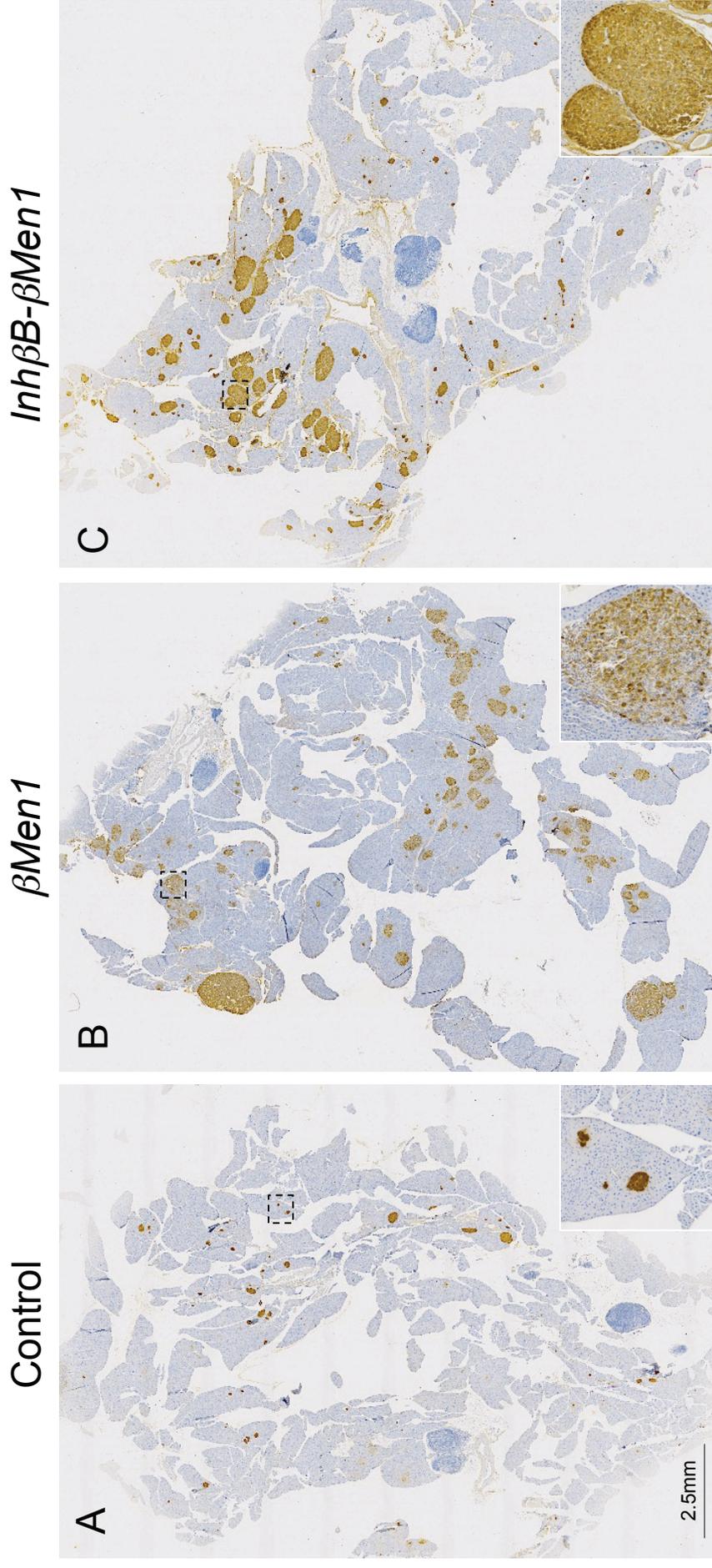
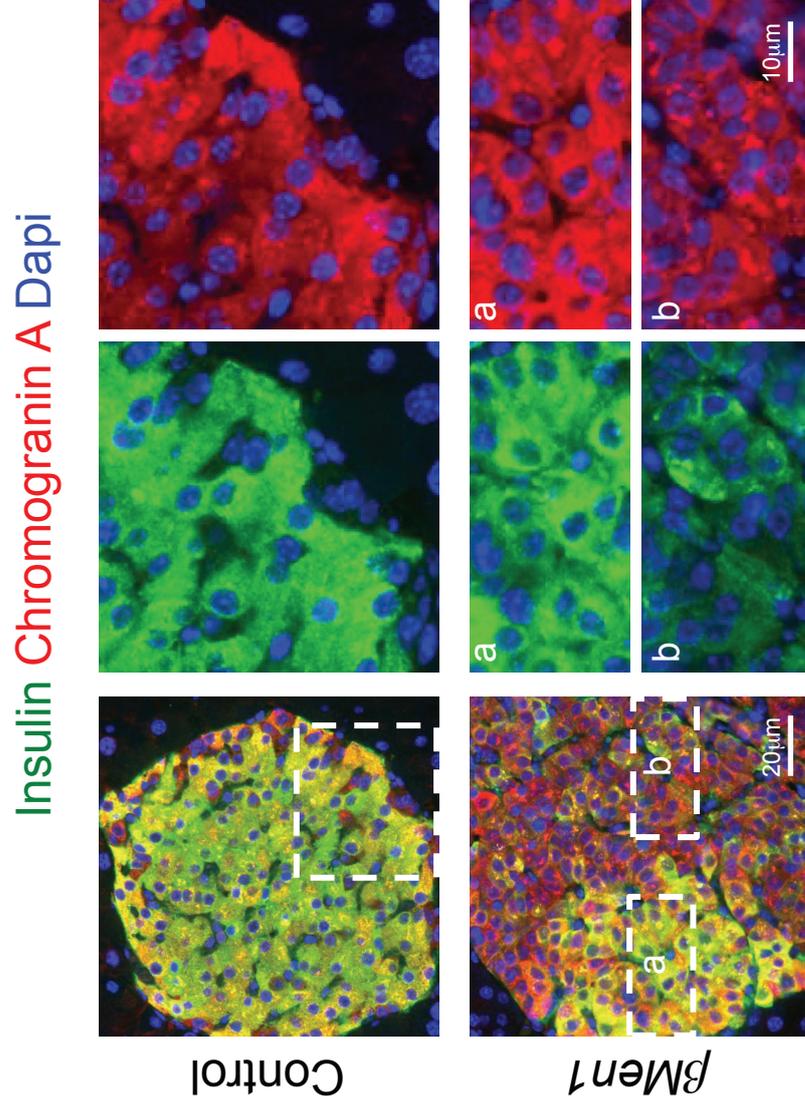


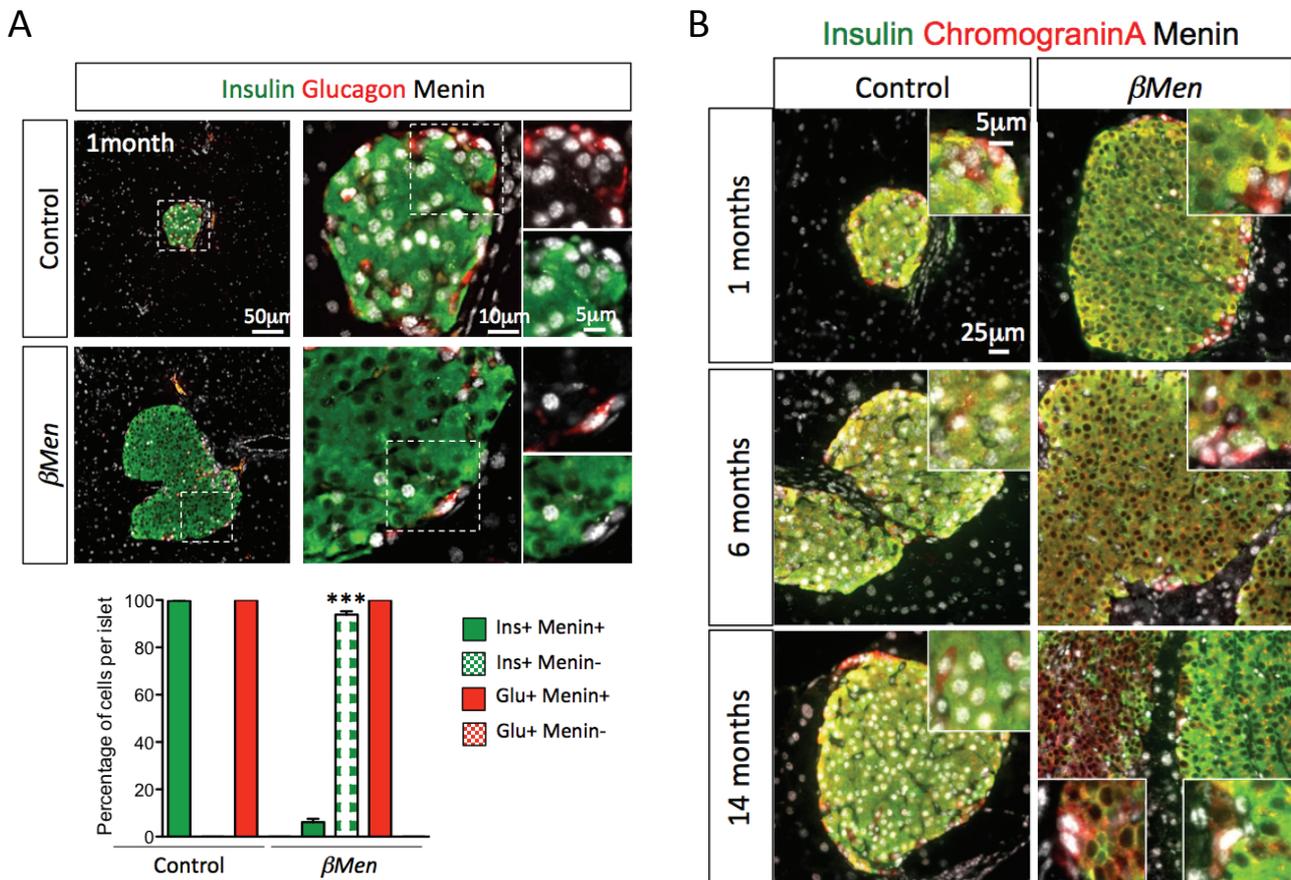
Figure 7. Inactivation of ActivinB improves survival of mice developing Insulinomas. (A) Blood glucose measures from 6h-fasted mice at indicated ages; $\beta Men1$ (n=25), $Inh\beta B-\beta Men1$ (n=26) and control mice (n=45). Mean glycemia \pm SEM are shown. *:p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001; NS: not significant; Student-t test. (B) Survival curve of $\beta Men1$ (n=16), $Inh\beta B-\beta Men1$ (n=14) and control mice (n=14). **: p<0.01; ***: p<0.001; Mantel-Cox test. (C) Schematic view of the proposed role of ActivinB induced expression on β -cell tumor progression.



Supplemental Figure 1. Low magnification scans showing pancreas sections with immunohistochemical insulin staining. Each picture represent a whole section of 14-month-old (A) control, (B) β Men1, and (C) *Inh* β B- β Men1 animals. Insets are magnifications of dashed areas.

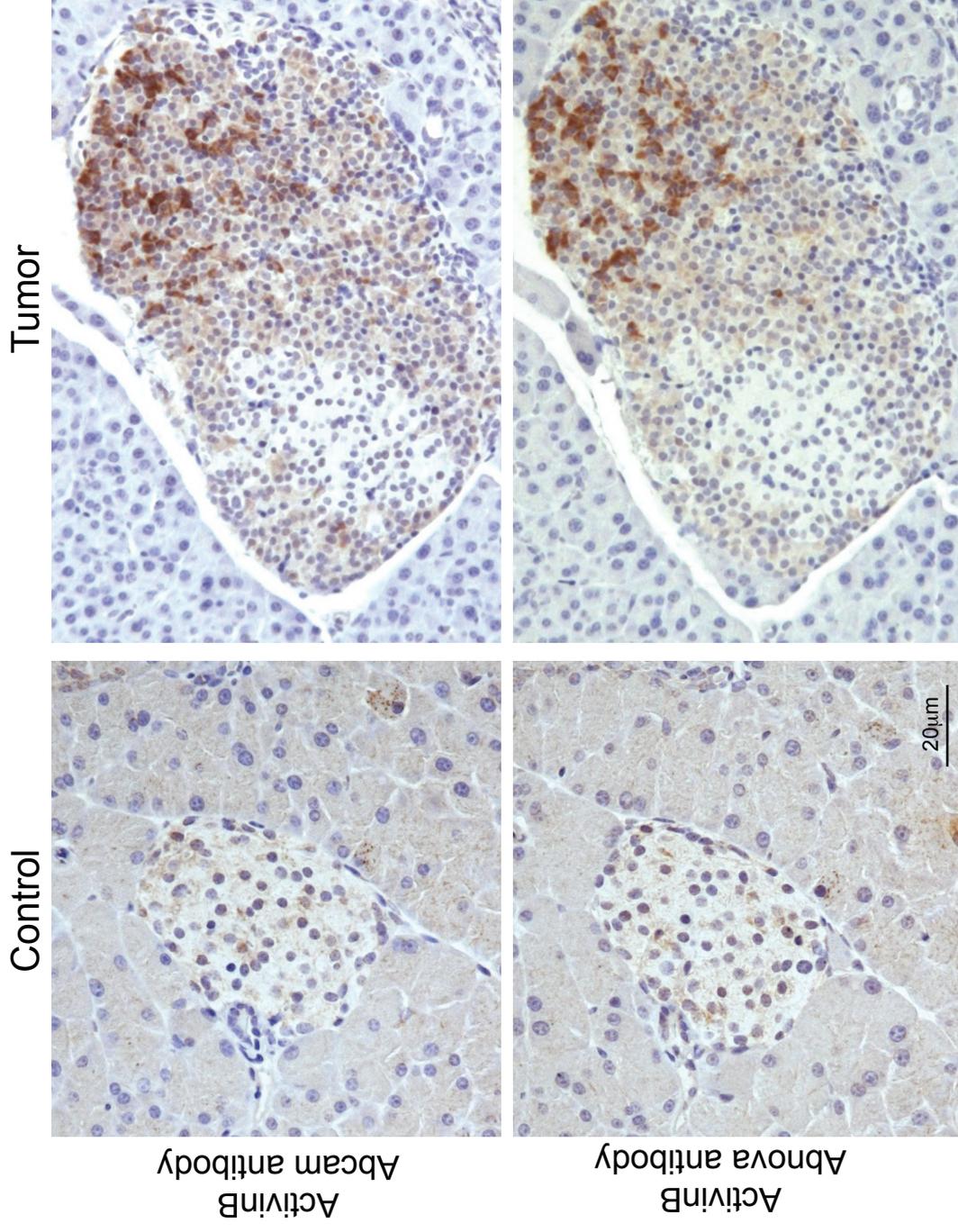


Supplemental Figure 2. Analysis of Chromogranin A and insulin co-expression. Representative picture of double-Immunofluorescent analysis performed on pancreas sections from 14-month-old β Men1 and control mice. Right panels represent higher magnifications of dashed areas.

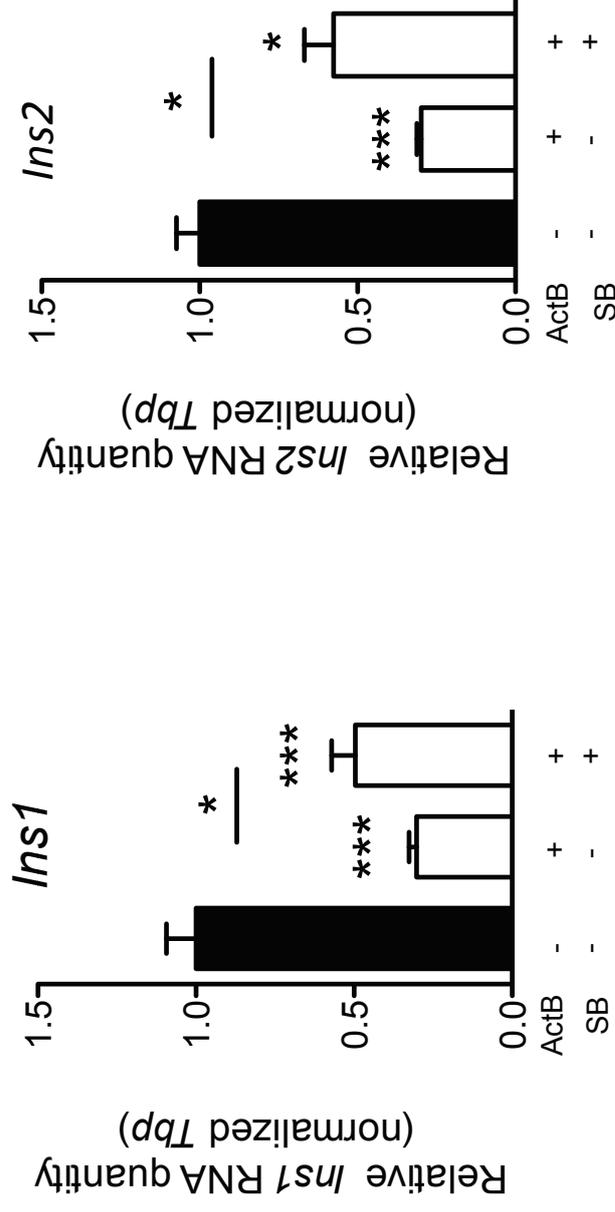


Supplemental Figure 3. Quantification and tracing of Men1 invalidation in pancreatic islet lineages. (A) Quantification of Menin disruption in α - and β -cells. Representative picture of triple-Immunofluorescent analysis performed on pancreas sections from 1-month-old β Men1 and control mice. Right panels represent higher magnifications of dashed areas. Graph shows the percentage of α or β -cells, expressing or not Menin. 3 mice per genotype were analyzed. For control mice, 743 β -cells and 284 α -cells were counted and for β Men1 mice, 3217 β -cells and 308 α -cells. Data are represented as mean of mice percentage \pm SEM. ***: $p < 0.001$; Student-t test. (B) Lineage-tracing of Menin expression in ChromograninA expressing cells. Representative result of Insulin (green), ChromograninA (red) and Menin (gray) triple-immunofluorescent analysis of 1, 6, 14-months control and β Men1 pancreas. Insets represent higher magnifications. Note that while all ChromograninA⁺/Insulin⁺ cells have lost Menin expression in β Men pancreas, most of the ChromograninA⁺/insulin⁻ cells demonstrate this loss. The residual Menin staining seen in ChromograninA⁺ cells (insets) correspond to the expression of Menin in non β -islet-cell lineages (i.e. Glucagon-, Somatostatin- and Pancreatic Polypeptide-expressing cells).

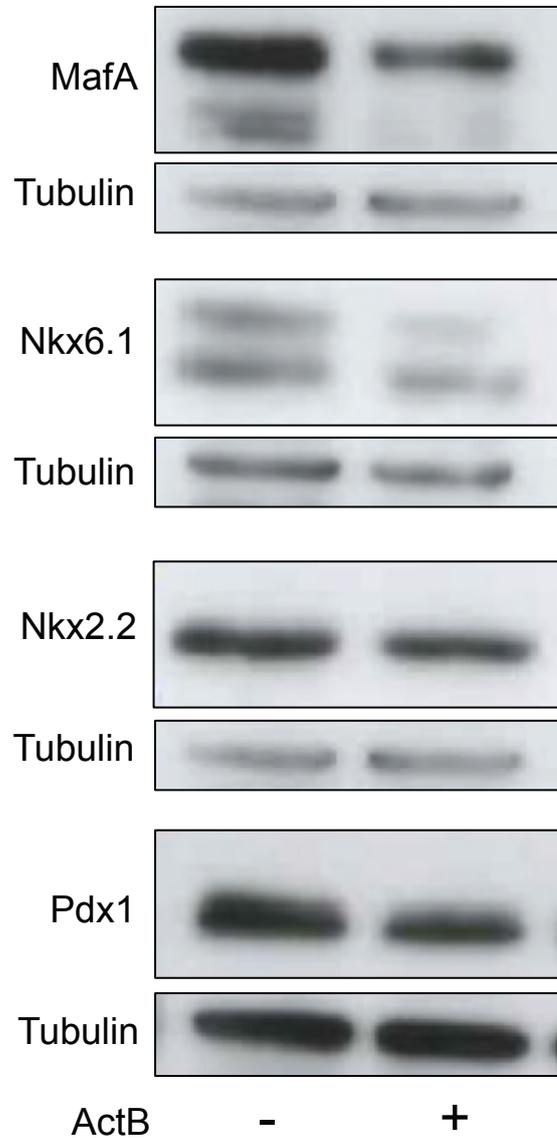
Supplemental Figure 4



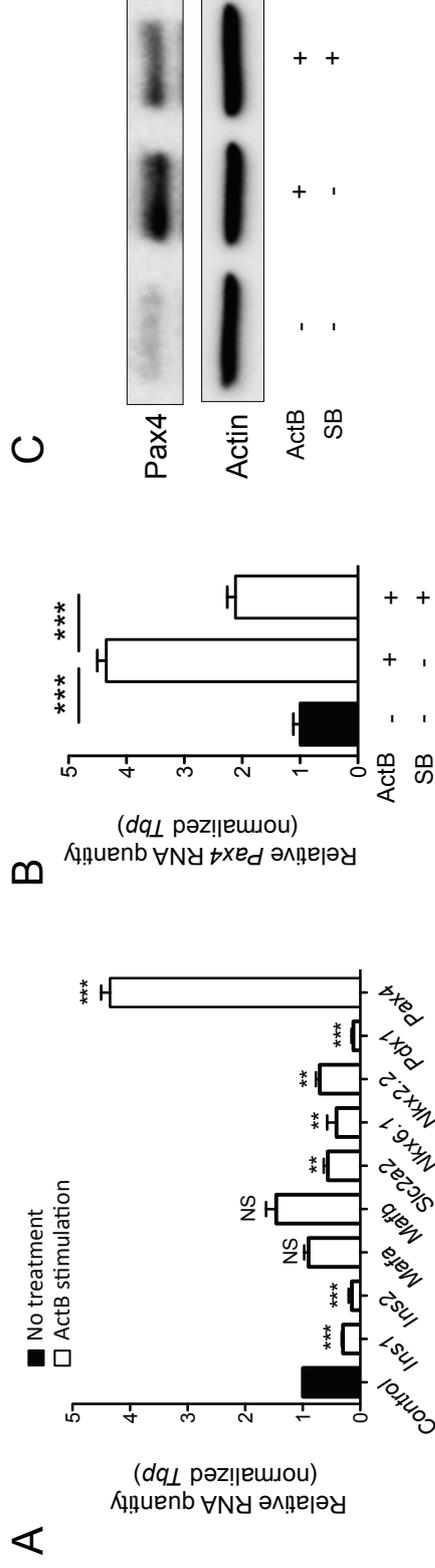
Supplemental Figure 4. Validation of the ActivinB immunohistochemical staining obtained with 2 independent antibodies. Serial sections of 14-month-old mixed tumors and control pancreas were used to test the immunoreactivity of Abcam (ab56059) and Abnova (H00003625-D01P) commercial antibodies. Note the similar expression pattern seen for the tested antibodies in both control and tumor islet.



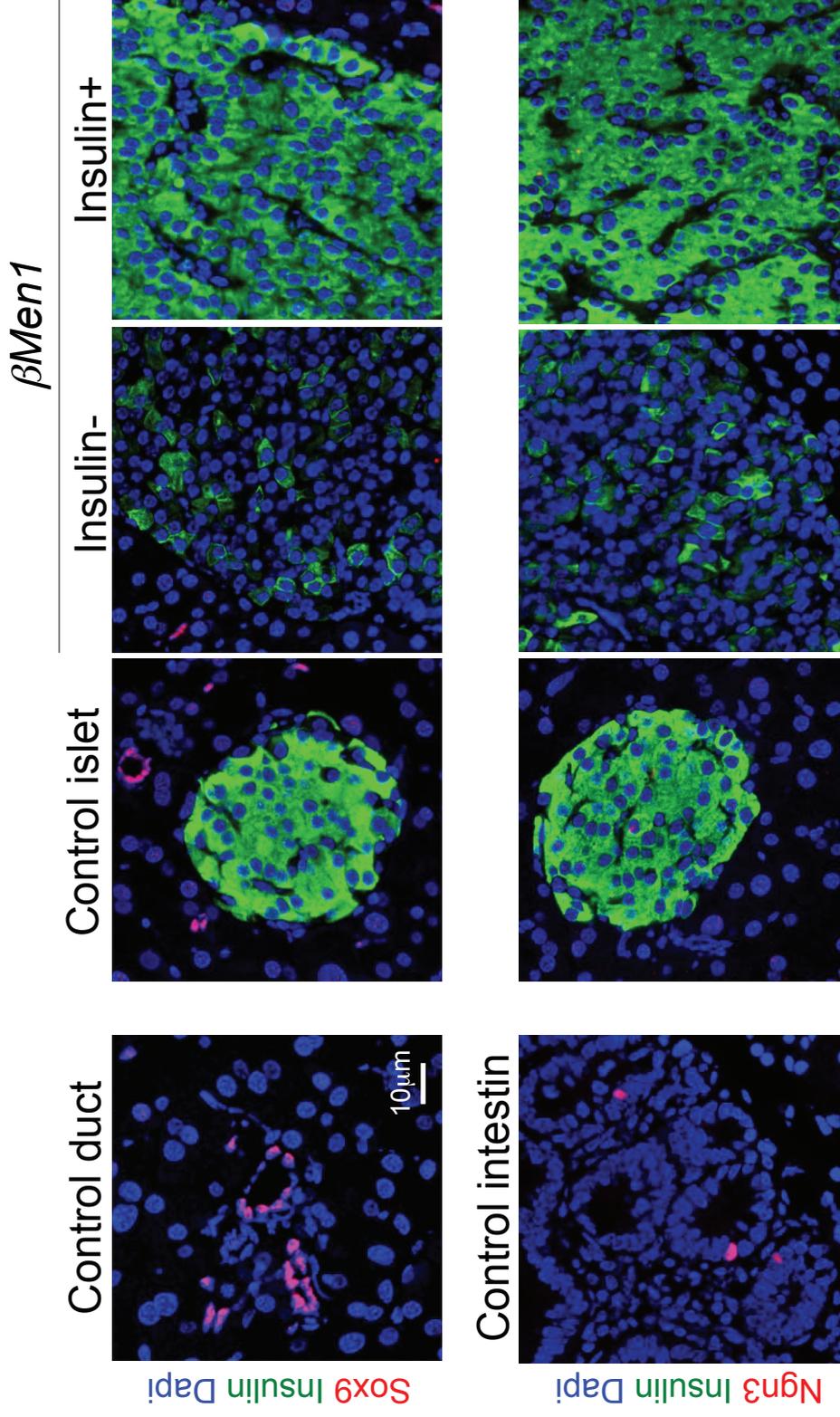
Supplemental Figure 5. ActinB induces the downregulation of insulin expression in β TC cells. Quantitative RT-PCR analysis of *Ins1* and *Ins2* gene expression in β TC cells following 72h ActinB (ActB) treatment. SB: SB431542 inhibitor. Graphs are representative examples of 3 independent experiments. Data are presented as mean \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; NS: not significant, Student-t test.



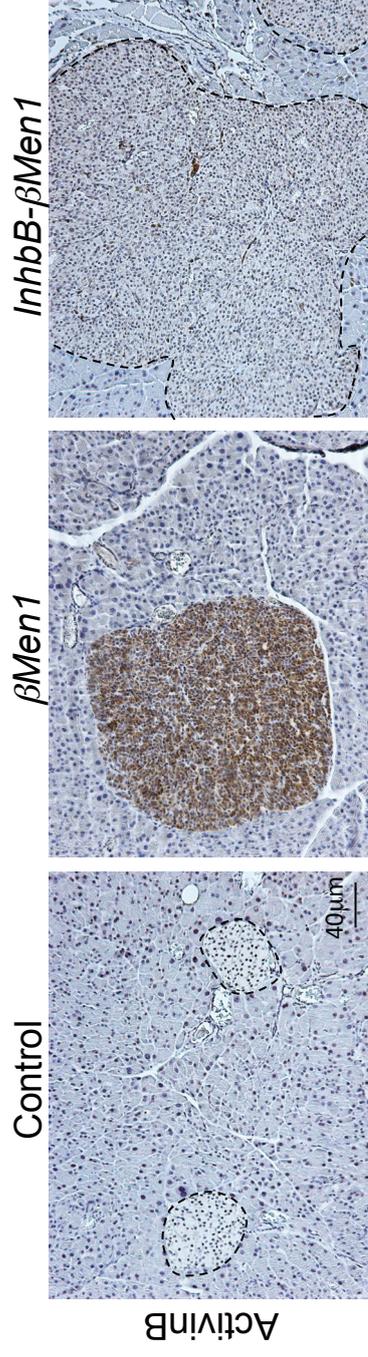
Supplemental Figure S6. Analysis of mature β -cell markers in Min6 cells following ActinB (ActB) stimulation. Expression levels of MafA, Nkx6.1, Nkx2.2 and Pdx1 were analyzed in ActinB treated (+) or untreated (-) cells. Tubulin is used as a loading control.



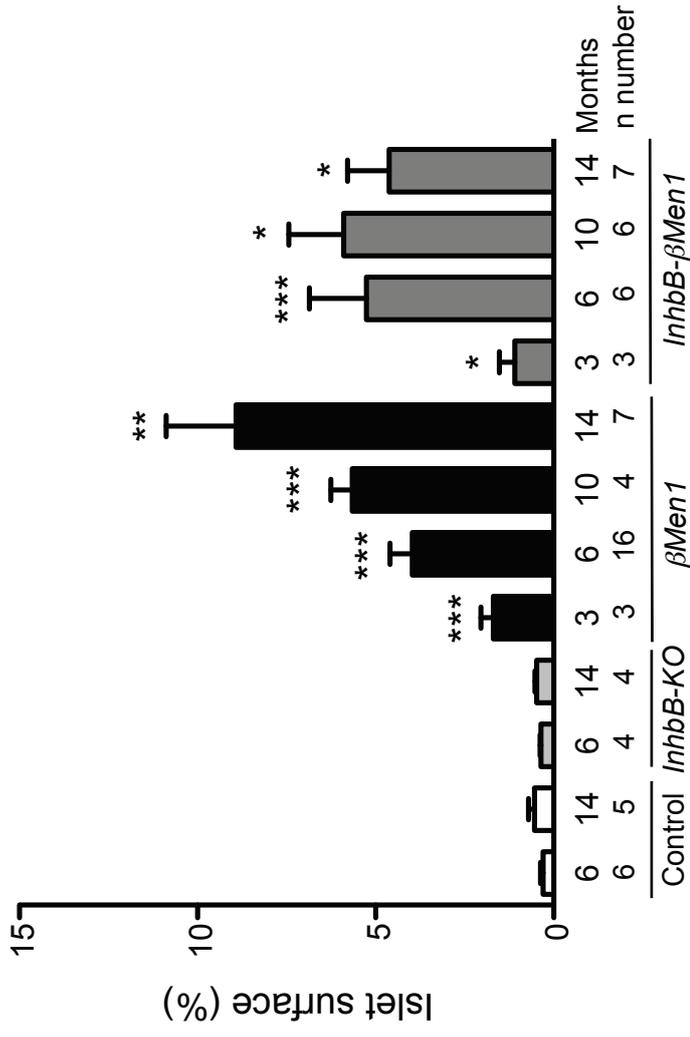
Supplemental Figure 7. ActivinB induced a cell dedifferentiation through the misregulation of mature β -cell markers in β TC cells. (A and B) Quantitative RT-PCR analysis of mature β -cell gene expression following 72 hours-ActivinB stimulation. The graph is a representative example of 2 independent experiments. Data are presented as mean \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; NS: not significant; Student-t test. (B and C) Analysis of Pax4 gene (B) and protein (C) expression in β TC cells subjected to 72h ActivinB (ActB) stimulation in the presence or absence of SB431542 (SB). The graph is a representative of 2 independent experiments. Data are represented as mean \pm SEM. **: $p < 0.001$; student-t test.



Supplemental Figure 8. Analysis of Sox9 and Ngn3 expression in 14-month-old Ins^- and Ins^+ $\beta Men1$ tumor lesions. Co-immunofluorescent staining was performed using antibodies recognizing Sox9 or Ngn3 in combination with an anti-Insulin antibody. Note that pancreatic ducts and intestinal tissues present on the same pancreatic sections were used as internal control expressing respectively Sox9 and Ngn3 (left panel).



Supplemental Figure 9. Validation of ActivinB targeted disruption within InhbB- β Men1 pancreatic β -cell tumors. ActivinB expression was analyzed by immunohistochemistry performed on 14-months-old control or mutant (β Men1 and InhbB- β Men1) pancreas sections. Dashed lines delineate the islets location.



Supplemental Figure 10. Measurements of islet cell surface during the course of tumorigenesis. Endocrine occupied surface were calculated on H&E stained whole pancreatic sections at indicated ages. Graph shows the percentage of endocrine surface normalized to exocrine surfaces. Number of analyzed pancreas per genotype and age are indicated in the graph (n). Data are represented as mean of mice surface \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; Student-t test.

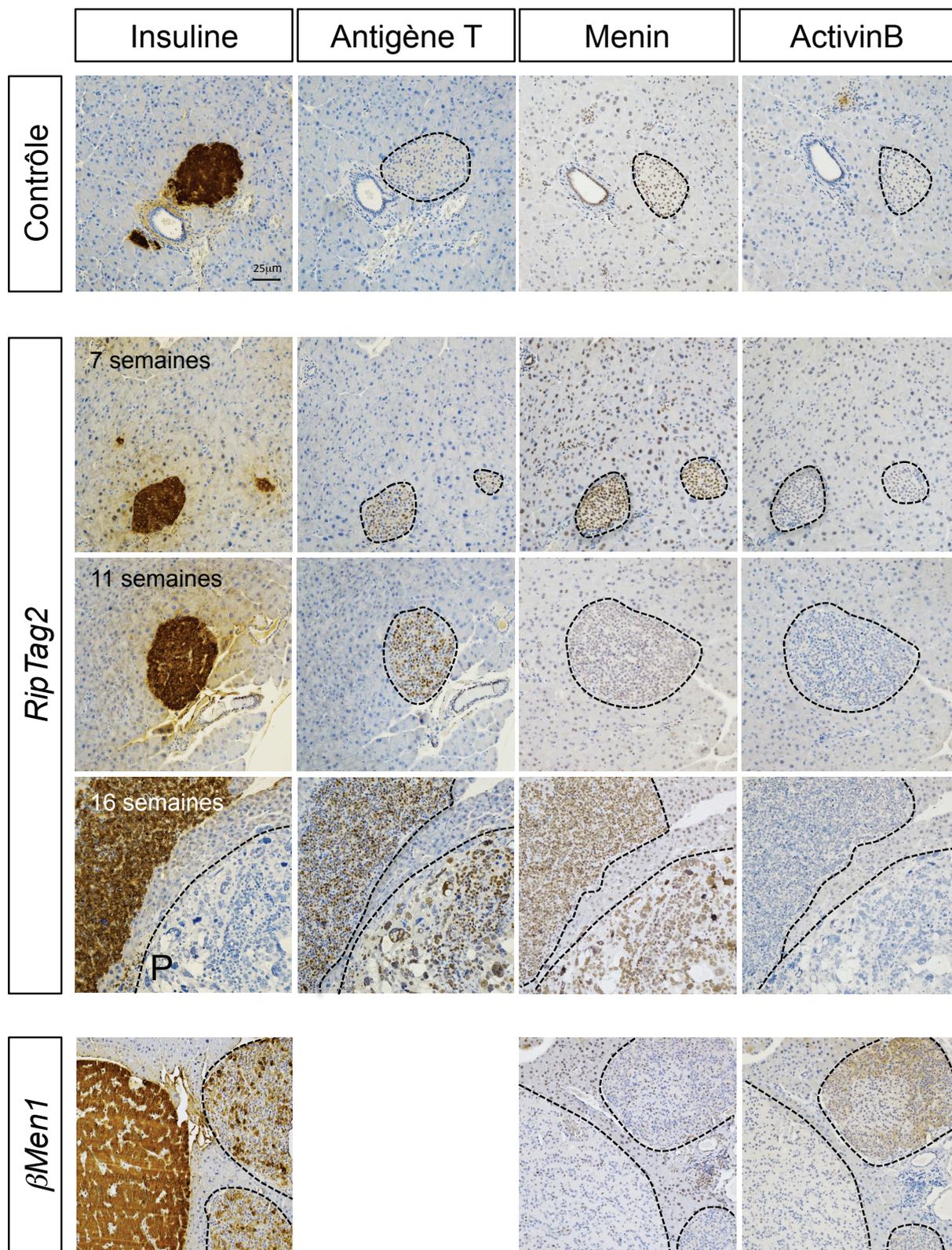


FIGURE 25: LES LÉSIONS TUMORALES, DÉVELOPPÉES PAR LES SOURIS *RIPTAG2*, N'EXPRIMENT PAS L'ACTIVINB

Des marquages immunohistochimiques de l'Insuline (Dako, 1/5000), de l'Antigène T (SCBT, 1/400), de Menin (Bethyl, 1/8000) et de l'ActivinB (Abnova, 1/2000) ont été réalisés sur des coupes de pancréas de souris contrôles, RipTag2 (à 7, 11 et 16 semaines) et β Men1 (à 16 mois). Les lignes pointillées noires encerclent les îlots pancréatiques. La lettre P indique les tumeurs peu différenciées PDIC.

2. Résultats complémentaires

i. Etude d'un autre modèle murin développant des insulinomes : le modèle RipTag2

- *Analyse de l'expression d'ActivinB dans les lésions tumorales RipTag2*

A la suite de ces résultats, nous avons voulu valider nos observations dans un autre modèle murin développant des insulinomes, sans invalidation du gène *Men1*. Nous avons utilisé le modèle RipTag2, qui consiste en l'expression de l'antigène grand T du virus simien 40, sous le contrôle du promoteur du gène de l'Insuline de rat (détaillé partie I.B.1) (Hanahan, 1985). De façon intéressante, ce modèle développe différents types de lésions exprimant l'Insuline et ne l'exprimant pas. Ces dernières sont appelées carcinomes peu différenciés invasifs (PDIC) (Hunter et al, 2013).

J'ai tout d'abord analysé l'expression de l'ActivinB dans ces lésions. Je n'ai pas mis en évidence d'expression de ce ligand dans les insulinomes développés chez ces souris. Ceci corrèle avec une production d'Insuline, maintenue dans les tumeurs (Figure 25). En effet, les souris deviennent rapidement hypoglycémiques, aux alentours de 6 semaines, contrairement aux souris β *Men1*, et meurent à partir de 12 semaines (données non montrées). De la même manière, dans les PDIC, je n'ai pas détecté d'ActivinB, bien que ces lésions n'expriment pas d'Insuline (Figure 25). Le développement de TNEPs hétérogènes dans ce modèle murin est donc indépendant de l'action de l'ActivinB, contrairement au modèle β *Men1*.

- *Caractérisation des PDIC et de leur origine cellulaire*

M'intéressant aux mécanismes conduisant à l'hétérogénéité des TNEPs, j'ai caractérisé ces PDIC et tenté de comprendre leur origine cellulaire. Comme dans la précédente publication d'Hunter et coll., nous avons pu montrer l'absence d'Insuline et de ChromograninA (ChgA) dans ces lésions, mais également l'absence d' α -amylase et de CK19 (Hunter et al, 2013). Ceci met en évidence que ces tumeurs ne présentent pas les caractéristiques principales de cellules différenciées exocrines, endocrines ou ductales (Figure 26A). Nous avons également confirmé la présence de l'antigène grand T et la forte prolifération de ces lésions, grâce à un marquage Ki67 (Figure 26A). Enfin, nous avons détecté une forte expression de Menin dans ces lésions, plus importante que dans les lésions exprimant l'Insuline (Figure 26A), suggérant que ces carcinomes ne présentent pas de perte de ce gène suppresseur de tumeurs.

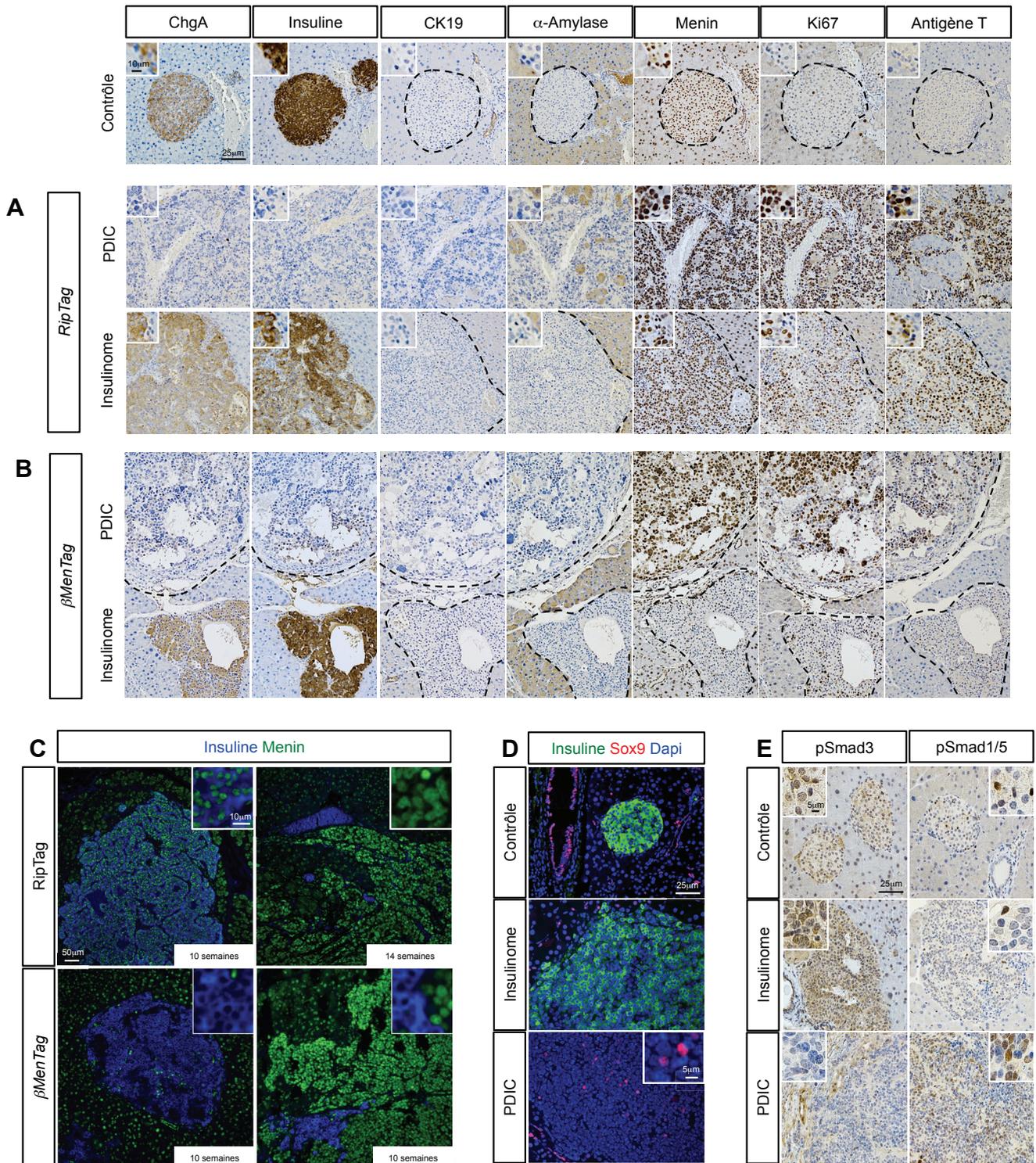


FIGURE 26: LES PDIC, QUI SE DEVELOPPENT DANS LES SOURIS *RIP TAG2* ET *BETA MEN TAG*, NE PRESENTENT PAS DE CARACTERES PANCREATIQUES, MAIS MONTRENT UNE ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION *PSMAD1/5*

A. et B. Caractérisation par immunomarquages des lésions PDIC et insulinomes, développées dans les souris *RipTag2* (A) et *betaMenTag* (B). **C.** Immunofluorescence pour les protéines Menin en vert et Insuline en bleu sur des lésions *RipTag2* à 10 et 14 semaines et *betaMenTag* à 10 semaines. **D.** Détection de l'Insuline (Dako, 1/200, vert) et Sox9 (Sigma, 1/500, rouge) par immunofluorescence sur les lésions PDIC et insulinomes de souris *betaMenTag* et contrôles. **E.** Immunomarquage de pSmad3 (Cell Signalling, 1/500) et pSmad1/5 (Cell Signalling, 1/200) dans des îlots contrôles, des insulinomes et des PDIC de souris *betaMenTag*. Les encarts représentent des grossissements de tumeurs. Les îlots pancréatiques sont encerclés d'une ligne pointillée.

Afin d'étudier l'impact de la perte du gène *Men1* dans l'émergence de ces TNEPs, nous avons généré un nouveau modèle murin combinant une invalidation du gène *Men1* et l'expression de l'antigène T dans les cellules β (modèle β *MenTag* (*Men1^{FF};RipCre⁺;RipTag2*)). De façon surprenante, les PDIC du modèle β *MenTag* se développent avec l'expression de l'antigène grand T mais également une forte expression de Menin. Les autres lésions, exprimant l'Insuline, ont en revanche perdu l'expression de cette protéine (Figure 26C). Ces cellules n'ont alors pas la même origine que les cellules tumorales des insulinomes. Comme dans le modèle *RipTag2*, les PDIC présentent les mêmes caractéristiques que précédemment (Figure 26B). De plus, des immunomarquages du facteur Sox9, important au cours du développement embryonnaire pancréatique et exprimé par les cellules ductales adultes, ont montré quelques cellules exprimant ce facteur au sein des PDIC (Figure 26D).

Les mêmes résultats ont été observés dans un modèle murin d'invalidation du gène *Men1* dans les progéniteurs pancréatiques, grâce à l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *Ptf1a* (données non présentées). Ces observations pourraient traduire une origine non pancréatique des cellules tumorales des PDIC, avec une possible fuite de l'expression de l'antigène grand T dans un autre compartiment cellulaire.

Hunter et coll. ont pu pointer l'expression dans les PDIC du facteur Inducible factor 1 (Id1) (Hunter et al, 2013), facteur impliqué dans l'inhibition de la différenciation cellulaire et exprimé principalement dans les cellules souches embryonnaires, les cellules souches adultes et cellules souches cancéreuses (Nam & Benezra, 2009; Perk et al, 2005). Ceci confirme l'état immature de ces cellules tumorales. De plus, il est connu que les protéines de la famille Id sont des gènes cibles des ligands de la famille TGF- β , en particulier des BMPs (Miyazono & Miyazawa, 2002; ten Dijke et al, 2003). Nous avons donc analysé la phosphorylation des Smad3 et Smad1/5 pour mettre en évidence la sous-famille de ligands qui peut être impliquée dans l'émergence et/ou l'évolution de ces PDIC. Nous avons pu montrer une absence de pSmad3 dans ces tumeurs, contrairement à son expression cytoplasmique dans les îlots contrôles et insulinomes (Figure 26E). En revanche, de nombreux noyaux de ces carcinomes expriment pSmad1/5, qui sont peu nombreux dans les contrôles et insulinomes. Ces résultats montrent la présence d'un ligand BMP ou GDF au sein de ces carcinomes, qui pourrait ainsi réguler Id1.

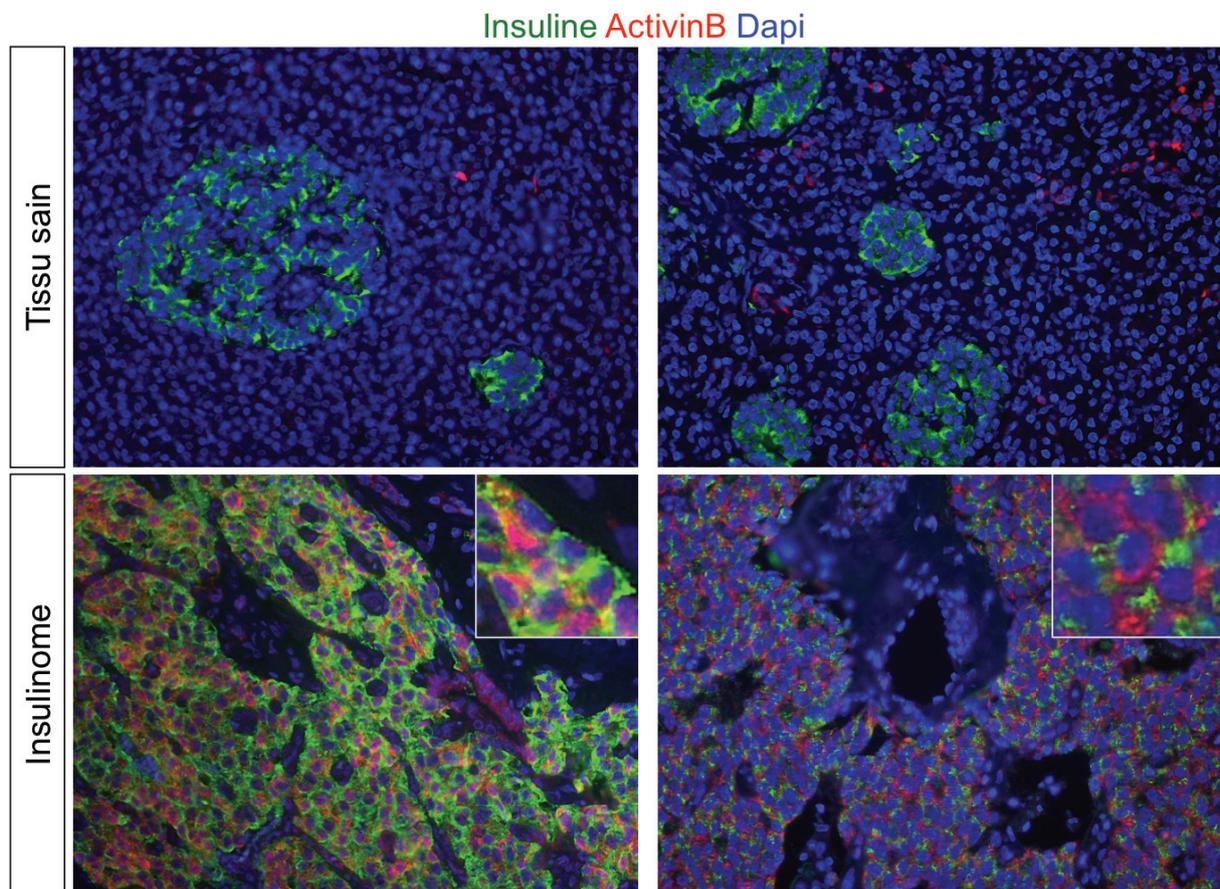


FIGURE 27: L'ACTIVINB EST EXPRIMEE DANS DES INSULINOMES SPORADIQUES HUMAINS ET SON EXPRESSION EST CORRELEE AVEC UNE PERTE D'INSULINE

Une immunofluorescence, ciblant l'Insuline (en vert) et l'ActivinB (en rouge), a été réalisée sur des insulinomes de trois patients différents.

ii. Validation de l'expression d'ActivinB au sein d'insulinomes sporadiques humains

Afin de valider nos observations chez l'homme, nous avons pu obtenir des insulinomes sporadiques, issus de trois patients, non atteints de pathologie NEM1. J'ai réalisé une immunofluorescence pour détecter l'expression d'ActivinB et corrélérer la présence ou non du ligand avec l'expression d'Insuline. J'ai pu mettre en évidence que le ligand est surexprimé dans certains insulinomes humains en comparaison aux îlots sains du même patient (Figure 27). De plus, il semble que les cellules qui expriment l'ActivinB perdent l'Insuline, comme nous l'avons observé dans les insulinomes de souris $\beta Men1$.

C. CONCLUSION

Mes travaux ont permis d'identifier un nouveau rôle de l'ActivinB dans le contrôle de l'identité des cellules β tumorales et dans l'émergence de TNEPs hétérogènes. J'ai pu mettre en évidence sa surexpression dans les insulinomes $Men1$, conduisant à une perte des marqueurs matures de ces cellules. Nous avons pu valider cet effet *in vitro*, mais également dans un modèle de poisson-zèbre, surexprimant le ligand spécifiquement dans les cellules β saines. Nos premières observations chez l'homme semblent concorder avec nos données chez la souris. Enfin, j'ai pu montrer que le développement de TNEPs hétérogènes chez les souris $\beta Men1$ et RipTag2 fait intervenir des processus et facteurs différents, restants à définir.

PARTIE II :

MENIN REGULE L'EXPRESSION D'*INHBB*

GRACE A LA METHYLATION D'HISTONES

A. INTRODUCTION

Après avoir mis en évidence le nouveau rôle de l'ActivinB sur la plasticité des cellules β tumorales invalidées pour le gène *Men1*, nous avons cherché à comprendre comment ce ligand, absent des îlots pancréatiques contrôles, était surexprimé dans les insulinomes.

Différentes études dans des tissus ou lignées cellulaires variées ont décrits plusieurs facteurs impliqués dans la surexpression de l'ActivinB et de son gène *Inhbb*. Tout d'abord, il a été mis en évidence qu'une augmentation de la concentration en glucose permet la régulation de l'expression d'ActivinB. En effet, des stimulations d'îlots pancréatiques, isolés de souris, avec une forte concentration en glucose, induit une surexpression de la sous-unité β B codant l'ActivinB (Bertolino et al, 2008). De même, sur des adipocytes 3T3-L1, une stimulation à l'Insuline induit une augmentation de ce ligand (Hoggard et al, 2009). Enfin, le facteur Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF1 α), impliqué dans l'hypoxie cellulaire, a été mis en évidence dans la surexpression de l'ActivinB dans des cellules cancéreuses rénales (Wacker et al, 2009). Ces différents mécanismes, sont des éléments importants au sein des îlots pancréatiques et leur dérégulation dans les insulinomes pourraient être responsable d'une expression du ligand. Cependant, nos propres analyses sur des lignées de cellules β n'ont pas permis de mettre en évidence une expression de ce ligand par ces mécanismes (données non montrées).

En revanche, son absence dans les tumeurs RipTag2, nous a suggéré le rôle du gène *Men1* et de sa protéine Menin dans cette régulation. Menin est une protéine majoritairement nucléaire dont la fonction principale est la régulation de la transcription de gènes cibles, grâce à ses interactions avec de nombreux facteurs de transcription, comme JunD ou NF- κ B (Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1) (Matkar et al, 2013). Le second rôle de Menin est la régulation épigénétique des promoteurs de certains gènes cibles, permettant de contrôler leur expression. Ainsi, il a été montré que cette protéine intervient dans les modifications d'histones. Ces histones forment les nucléosomes, responsable de l'enroulement de la chromatine. Leur modification par acétylation ou méthylation permet de réguler cet enroulement et donc la condensation de l'ADN. Lors d'une forte compaction, la chromatine n'est pas accessible aux facteurs de transcription et le gène ne

peut être exprimé. Dans ce processus, Menin a été impliquée principalement dans les méthylations des marques H3K4 et H3K27, par interaction physique ou fonctionnelle avec les effecteurs Mixed Lineage Leukemia (MLL) et Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) respectivement.

MLL fait partie du complexe trithorax impliqué dans la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4. Cette modification est une marque dite activatrice, qui permet la décondensation de la chromatine et la régulation positive de l'expression des gènes (Schuettengruber et al, 2007). Il a été démontré que Menin intervient dans ce complexe, grâce à une interaction directe avec MLL. En effet, dans des cellules endocrines pancréatiques tumorales, Menin se fixe au promoteur de gènes cibles comme p27 et recrute MLL, permettant la triméthylation H3K4 et favorisant la transcription des gènes cibles (Karnik et al, 2005). Enfin, Menin est désormais bien connu comme partenaire de MLL dans le développement de la leucémie, par modifications épigénétiques et dérégulation des gènes Homeobox (HOX) (Roudaia & Speck, 2008; Yokoyama & Cleary, 2008).

Plus récemment, il a été mis en évidence un rôle de Menin au sein du complexe Polycomb repressive complex 2 (PRC2) avec les protéines Polycomb (PcG), dont Ezh2 (Gao et al, 2009). Ce complexe permet la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3, marques répressives qui induisent une condensation de la chromatine et l'inhibition de la transcription (Sauvageau & Sauvageau, 2010; Schuettengruber et al, 2007). Aucune interaction directe n'a été démontrée à l'heure actuelle. Cependant, une publication récente suggère un grand nombre de promoteurs occupés par Menin et Ezh2 (Gao et al, 2014a).

De façon intéressante, le gène de l'ActivinB, *Inhbb*, a été mis en évidence, dans différentes études sur des cellules souches embryonnaires ou des fibroblastes, comme domaine bivalent (Ku et al, 2008; Mikkelsen et al, 2007; Pan et al, 2007; Zhao et al, 2007). Ces domaines sont des zones de promoteurs possédant à la fois les marques activatrices H3K4me3 et répressives H3K27me3, permettant une régulation rapide de ce gène par perte d'une de ces marques. Nous avons donc émis l'hypothèse que Menin pourrait réguler *Inhbb* au travers de modifications épigénétiques et de méthylations d'histones.

B. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

Deux clones de Fibroblastes Embryonnaires de Souris (MEFs) et des cellules testiculaires MA10 et LCT10, issus d'embryons de souris sauvages (+/+) et mutantes (Δ/Δ), invalidées pour le gène *Men1*, ont été utilisés pour les différentes expériences. Ces cellules sont cultivées en milieu DMEM à 4,5g/L de glucose, complété avec 15% de sérum de veau fœtal et de la pénicilline/streptomycine, à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules β endocrines *pMenTag* sont issues de tumeurs de souris *pMenTag* (*Men1^{F/F};p48-Cre⁺;RipTag2*), invalidées pour le gène *Men1*, grâce à l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *Ptfla*, et exprimant l'antigène T du SV40. Elles sont cultivées en RPMI 1640 medium (Gibco Invitrogen) à 5,5mM de glucose supplémenté avec 20% de sérum de veau fœtal, Hépes 10mM, Pyruvate 1mM, mercaptoethanol 0,5mM et pénicilline/streptomycine, à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules bTC, issues d'un insulinome murin RipTag (Efrat, 1999), sont cultivées en milieu RPMI 1640 medium 11mM de glucose (Gibco Invitrogen) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et pénicilline/streptomycine, à 37°C et 5% de CO₂.

L'invalidation de l'expression de la protéine Menin a été réalisée par ARN interférence, grâce à la co-transfection de siRNA, dirigés contre le gène *Men1* (Stealth RNAi™ SiRNA, Invitrogen ; références: *siMen1.2* : MSS237268 ; *siMen1.3* : MSS275714) ou d'un siScramble contrôle (Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Med GC, Invitrogen). Pour les transfections, les siARN et les vecteur de surexpression p3xFlag-*Men1* ou contrôle p3xFlag-*vide* ont été transfectés dans les cellules grâce au Dharmafect suivant les instructions du fournisseur (Invitrogen).

2. Analyse transcriptomique

L'analyse transcriptomique des MEFs +/+ et Δ/Δ a été réalisée en collaboration avec le Docteur Emelyne Dejeux et le Docteur Jörg Tost, au Centre National de Génotypage (Evry, France).

Une extraction d'ARN a été réalisée à partir de 3.10⁶ cellules, grâce au kit RNeasy Mini kit (Qiagen), suivant les instructions du fournisseur, avec une étape d'incubation avec de la

DNase, pour enlever toutes traces d'ADN, ainsi que l'utilisation de colonnes de centrifugation QIAshredder (Qiagen). L'ARN a été quantifié grâce à un Nanodrop et la qualité des ARNs extraits a été évaluée sur BioAnalyzer 2100, grâce au kit RNA600 Nano kit (Agilent). Les échantillons ont été préparés avec le kit RNA Amplification kit Illumina® TotalPrep (Illumina), suivant le protocole du fournisseur, en triplicat pour chaque lignée cellulaire. Brièvement, une transcription inverse a été réalisée sur 200ng d'ARN total. Les ADN complémentaires obtenus ont été marqués, grâce à la polymérase T7 et des nucléotides marqués avec la biotine, par une transcription *in vitro*, pendant 14h à 37°C. Après purification, 1,5µg d'ARNm ont été hybridés sur une puce à ADN "Mouse-6 v1.1" (Illumina) pendant 17h à 58°C. La puce a été scannée sur un lecteur "Bead Array Reader 500 Gx" et le signal fluorescent a été quantifié pour déterminer le niveau d'expression. La reproductibilité entre les deux puces à ADN a été vérifiée grâce à des contrôles internes aux puces. Le bruit de fond a été soustrait des données brutes, qui ont ensuite été transformées en log2. Les quantiles ont été normalisés. L'analyse de l'expression différentielle a été réalisée par un modèle linéaire approprié, comparant les échantillons +/+ et Δ/Δ, grâce à un test statistique t modéré de Bayes et l'ensemble de logiciel *limma* (Bioconductor) (Smyth, 2005).

3. RT-PCR et RT-PCR quantitative en temps réel

Les ARNs ont été isolés avec le kit RNeasy Mini kit Plus (Qiagen), suivant les instructions du fournisseur et ont subi une transcription inverse (Reverse Transcription, RT), grâce la SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), pour l'obtention d'ADNc. Les analyses de PCR quantitatives ont été réalisées sur un système StepOne (Applied Biosystem), avec utilisation du réactif SYBR-Green (Life Technologies). Les résultats de PCR ont été normalisés avec le gène *Hprt* ou *Tbp*.

4. Test luciférase

L'analyse de l'activité luciférase a été réalisée grâce au kit Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega), 24 heures après arrêt des transfections. Les résultats sont normalisés par rapport à l'activité de la CMV-Renilla, déterminée avec le même kit.

5. Western Blot

L'extraction des histones a été réalisée suivant le protocole d'Abcam. Les cellules sont lysées dans un tampon Triton (0,5% Triton X-100 (v/v) ; 2mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) ; 0,02% NaN_3 (w/v) ; PBS 1X) à 4°C pendant 10 minutes et sont ensuite centrifugées à 2000 rotations par minutes (RPM) pendant 10 minutes à 4°C sur la glace. Les culots sont lavés dans un demi volume de tampon Triton, puis resuspendus dans de l'acide chlorhydrique 0,2N et lysés à 4°C toute la nuit. Après centrifugation 10 minutes à 2000rpm, le contenu en protéines est déterminé par dosage avec le kit DC-assay (Biorad). Les anticorps ont été utilisés comme il suit : H3K27me3 (Rabbit, Cell Signalling, 1/1000); H3K4me3 (Mouse, Abcam, 1/1000) et H3 (Rabbit, Abcam Ab1791, 1/2000).

6. Immunoprécipitation de la Chromatine (CHIP)

2.10^6 cellules ont été utilisées pour chaque immunoprécipitation. La chromatine reliée de manière covalente (« crosslinked chromatin ») a été préparée avec le kit Shearing ChIP (Diagenode) selon les instructions du fournisseur. La chromatine a ensuite été séparée avec un sonicateur. 20µl d'ADN ont été pris comme contrôle « Input ».

5 µg d'anticorps H3K27me3 (Diagenode C15410069) ont été incubés avec 40µl de protéine G Dynabeads® pendant 2 heures à 4°C sur une roue.

La chromatine a ensuite été diluée 3,75 fois avec un tampon de dilution (20 mM Tris-HCl pH8, 50 mM NaCl, 0,1% BSA) et ajoutée aux billes préincubées. Les échantillons ont été incubés toute la nuit à 4°C sur une roue. Les complexes immuns ont été lavés deux fois avec un tampon de lavage (20 mM Tris-HCl pH8, 50 mM NaCl, 0,1% BSA, 0,1% SDS) et un tampon LiCl (100mM TrisHCl pH 8, 500mMLiCl, 1% NP40, 1% NaDoc). Les billes ont été resuspendues dans 70µL de tampon Tris-EDTA et l'ARN a été dégradé, par ajout de RNase A et incubation à 37°C pendant 30 minutes. Les liaisons covalentes de l'ADN immunoprécipité ont été supprimées par la protéinase K, incubé pendant 6 heures à 65°C et sous agitation à 950 rpm. L'ADN a été extrait avec du phénol/chloroforme/alcool isoamylique et resuspendu dans 50µL de Tris-HCl 10mM pH8. 2µl d'ADN immunoprécipité ou 2ng d'ADN Input ont été utilisés pour les analyses en PCR en temps réel.

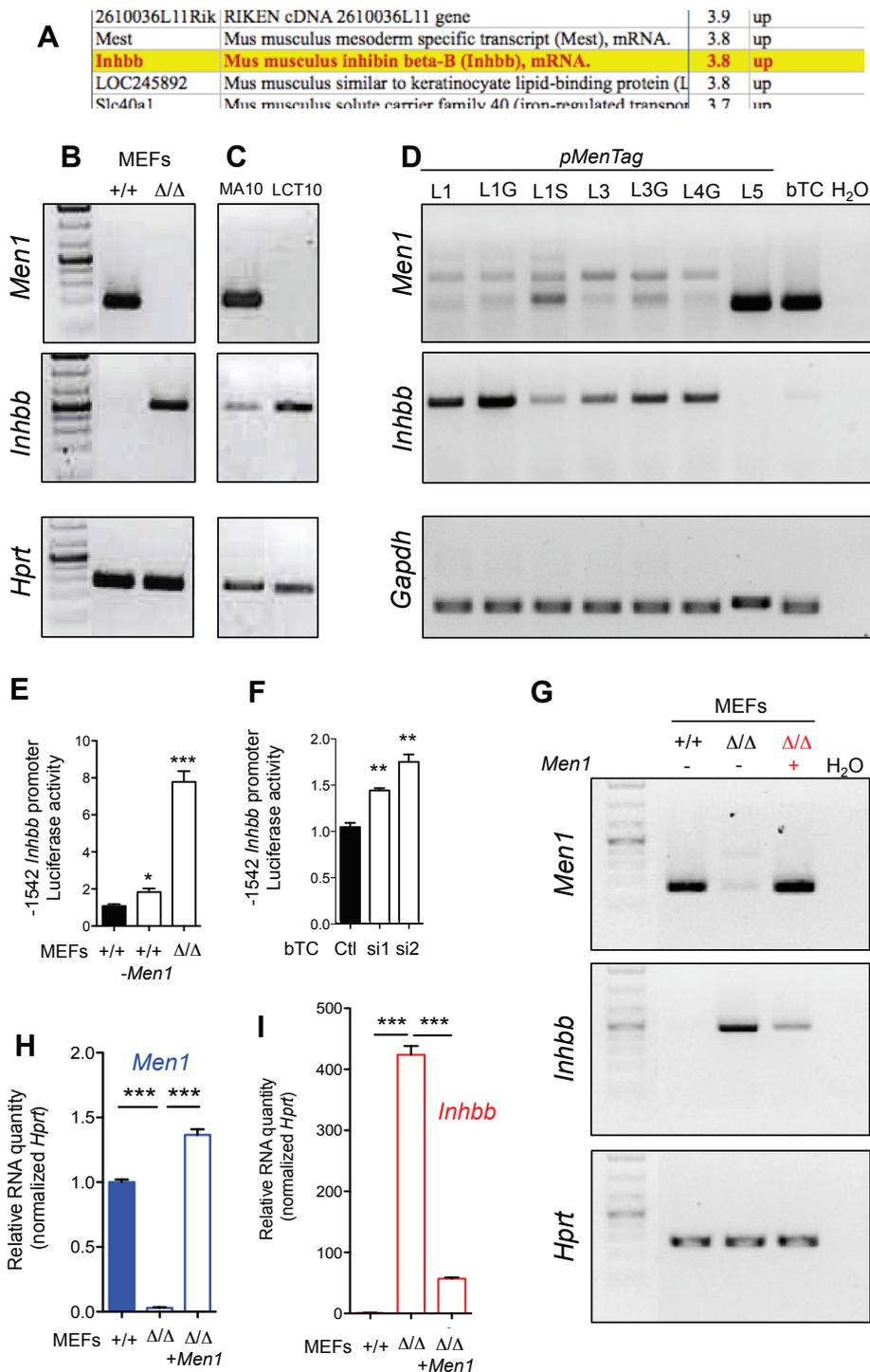


FIGURE 28: L'ABSENCE DE MENIN DANS DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES CONDUIT A L'EXPRESSION D'INHBB

A. Analyse transcriptomique réalisée sur des MEFs +/+ et MEFs Δ/Δ . Le chiffre désigne la différence d'expression entre les deux lignées. **B à D.** Analyse par PCR de l'expression de *Men1*, *Inhbb*, *Gapdh* et *Hprt* pour les MEFs (B), les lignées testiculaires (C) et les cellules β pancréatiques *pMenTag* (D). Les cellules β endocrines bTC sont utilisées comme contrôle pour les cellules β . **E et F.** Essais luciférase réalisés sur les MEFs (E) et les bTC (F) avec le promoteur -1542 de l'*Inhbb*. La transcription du gène *Men1* a été inhibée par un siRNA dans les MEFs +/+ et par deux différents siRNA (si1 et si2) dans les bTC. **H à I.** Analyses par RT-PCR quantitative et PCR de l'expression de *Men1* et *Inhbb* dans les MEFs +/+, Δ/Δ et Δ/Δ où *Men1* est réexprimé. Moyenne \pm SEM. Test t de student ; *= $p < 0.1$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$.

C. RESULTATS

1. L'absence de Menin dans différentes lignées cellulaires conduit à l'expression du gène *Inhbb*

Nos études précédentes sur la tumorigenèse des insulinomes invalidés pour le gène *Men1*, nous ont permis de mettre en évidence une surexpression du ligand ActivinB dans les cellules β tumorales. L'absence de ce ligand dans les lésions tumorales RipTag2 suggèrent un lien entre la perte de Menin et l'expression d'ActivinB. Pour étudier ce lien, nous avons tout d'abord utilisé des MEFs, issus d'embryons de souris invalidées (MEFs Δ/Δ) ou sauvages (MEFs +/+) pour le gène *Men1*. Une analyse transcriptomique sur ces cellules a montré une augmentation de plus de 3 fois de l'expression du gène *Inhbb* dans les cellules sans Menin (Figure 28A). De plus, nous avons pu valider cette observation par amplification génique par PCR (Figure 28B). Nous avons ensuite confirmé l'implication de Menin dans l'expression d'*Inhbb* dans d'autres lignées cellulaires : des cellules testiculaires sauvages (MA10) ou invalidées pour *Men1* (LCT10) et des cellules β pancréatiques tumorales issues de souris *pMenTag* (*Men1^{F/F};p48-Cre⁺;RipTag2*), invalidées pour le gène *Men1*, grâce à l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *Ptfla*, et exprimant l'antigène T du SV40. Au sein de ces cellules, nous avons pu mettre en évidence la présence du transcrit *Inhbb* uniquement dans les cellules ayant perdu Menin (Figure 28C,D)

Afin de valider le rôle de Menin dans l'expression d'*Inhbb*, le gène *Men1* a été invalidé dans les MEFs +/+ et une lignée de cellules β bTC par une approche d'ARN interférence, en combinaison avec un essai rapporteur luciférase, basé sur le promoteur -1542 du gène *Inhbb*. L'invalidation de *Men1* dans ces cellules conduit à une augmentation, bien que faible, de l'activité du promoteur du gène *Inhbb* (Figure 28E,F). De plus, lorsque l'on réexprime le gène *Men1* dans les MEFs Δ/Δ , l'expression d'*Inhbb* est diminuée. Ceci suggère un lien direct entre l'absence de Menin et l'expression du gène *Inhbb* (Figure 28G,H,I).

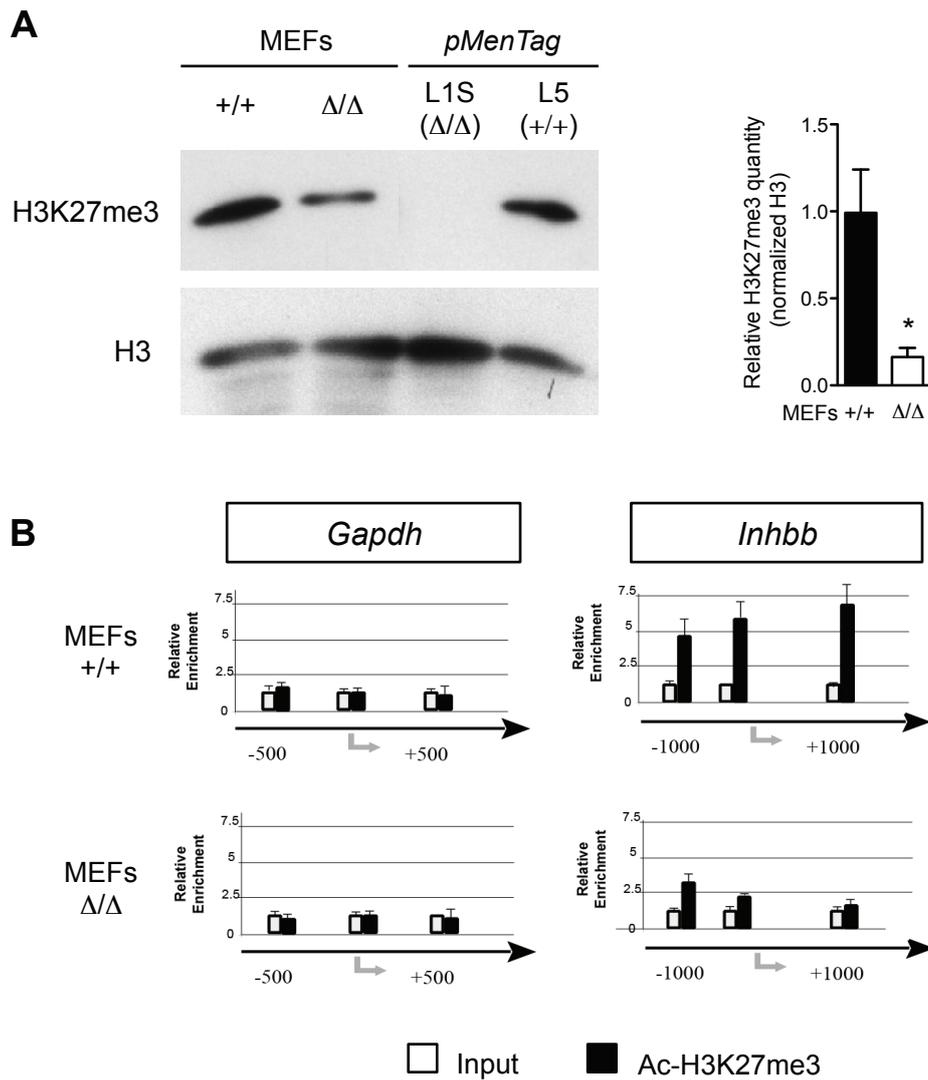


FIGURE 29: L'EXPRESSION D'INHBB EST REGULEE PAR DES MODIFICATIONS DES MARQUES H3K27ME3 A SON PROMOTEUR, GRACE A MENIN

A. Expression des marques H3K27me3 dans les MEFs +/+ et Δ/Δ et les cellules *pMenTag* L1S et L5. La détection de l'histone H3 sert de contrôle de dépôt. Le graphique représente la quantité de marques H3K27me3 en comparaison à la quantité en histone total H3 dans les MEFs, dans 5 expériences différentes. Moyenne \pm SEM. Test t-student : $*=p<0.1$. **B.** Analyses par CHIP-PCR de la présence des marques H3K27me3 sur le promoteur de l'*Inhbb* dans les MEFs +/+ et Δ/Δ . L'analyse du promoteur de *Gapdh* sert de contrôle interne. L'Input est le contrôle anticorps d'immunoprécipitation.

2. Menin inhibe la transcription du gène *Inhbb*, grâce à la triméthylation H3K27 sur son promoteur

Comme précisé dans l'introduction, le gène *Inhbb* est un gène développemental, qui est sujet aux modifications épigénétiques. Connaissant le rôle de Menin dans les régulations épigénétiques, nous avons étudié l'implication de cette protéine dans les modifications d'histones sur le promoteur de l'*Inhbb* dans les MEFs, mais également dans les lignées *pMenTag* L1S et L5. Nous avons tout d'abord analysé la présence des marques H3K27me3 dans ces cellules. De façon surprenante, nous avons trouvé une perte des marques H3K27me3 dans les cellules en absence de Menin, que ce soit les MEFs ou les cellules *pMenTag* (Figure 29A). Pour aller plus loin sur l'étude de la régulation d'*Inhbb*, nous avons réalisé sur les MEFs des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (CHIP) avec un anticorps ciblant H3K27me3, suivi d'une PCR du promoteur d'*Inhbb*. Nous avons pu mettre en évidence une forte diminution de ces marques dans les MEFs Δ/Δ au niveau du promoteur du gène *Inhbb*, en comparaison aux MEFs $+/+$ (Figure 29B). Ainsi, Menin est important dans la triméthylation H3K27 en particulier pour le promoteur de l'*Inhbb*. La perte de Menin et donc de ces marques inhibitrices dans les cellules pourrait permettre l'expression du gène.

D. CONCLUSION

Ces travaux, bien qu'en cours de réalisation, nous ont permis d'ores et déjà de pointer la fonction de Menin dans la régulation du gène *Inhbb*. Cette fonction est liée au rôle de Menin dans les régulations épigénétiques et les méthylation d'histones. Nos résultats suggèrent notamment un rôle important et nouveau de Menin dans la mise en place des marques H3K27me3, en particulier au niveau du promoteur du gène *Inhbb*. En absence de Menin, les marques inhibitrices seraient perdues et le gène pourrait être exprimé. Le mécanisme exact reste à être déterminé.

Manuscrit en préparation : « Menin regulates *Inhbb* expression through histone modification. »

Ripoche Doriane, Gherardi Samuele, Cordier-Bussat Martine, Goehrig Delphine, Cyril Cuenin, Chang X. Zhang and Philippe Bertolino.

DISCUSSION

A. TNEPs ET PLASTICITE CELLULAIRE

Mes travaux de thèse ont permis de pointer le rôle de la plasticité cellulaire dans l'hétérogénéité tumorale des TNEPs, mais également que les processus sont différents entre les modèles murins d'insulinomes $\beta Men1$ et RipTag2.

1. Modèle $\beta Men1$

Dans le premier modèle étudié, le modèle $\beta Men1$, nous avons mis en évidence une plasticité cellulaire des cellules tumorales β , avec un changement de nature au cours de la progression tumorale (Figure 30).

De façon contradictoire, Li et *coll.* ont publié des travaux récents démontrant une transdifférenciation des cellules β tumorales $Men1$ en cellules α (Li et al, 2015). Leurs résultats suggèrent le développement de glucagonomes, dus à une transdifférenciation de cellules β ayant perdu $Men1$, dans quelques souris à partir de 15 mois, montrant une glycémie et glucagonémie augmentées. Ces auteurs n'ont cependant pas réalisé de traçage cellulaire et d'immunomarquage pour la protéine Menin, afin d'étudier l'origine de leurs cellules α tumorales. De plus, leurs données ne montrent pas clairement de mécanisme de conversion cellulaire. En effet, leurs immunofluorescences, ciblant l'Insuline et le Glucagon, ne présentent pas de réelle co-expression des hormones et aucun marquage des facteurs de transcription, essentiels à l'identité α , comme Arx ou MafB, n'a été réalisé pour valider ce processus. Enfin, nos analyses par immunomarquages du Glucagon ne nous ont pas permis de mettre en évidence de glucagonomes chez ces souris aux stades tardifs de tumorigenèse. A l'inverse, elles ont révélé un très faible nombre de cellules α par section, dû à la masse importante de cellules β (données non montrées). Ainsi, nos propres données excluent la présence de glucagonomes chez ces souris et de la même manière un mécanisme de transdifférenciation.

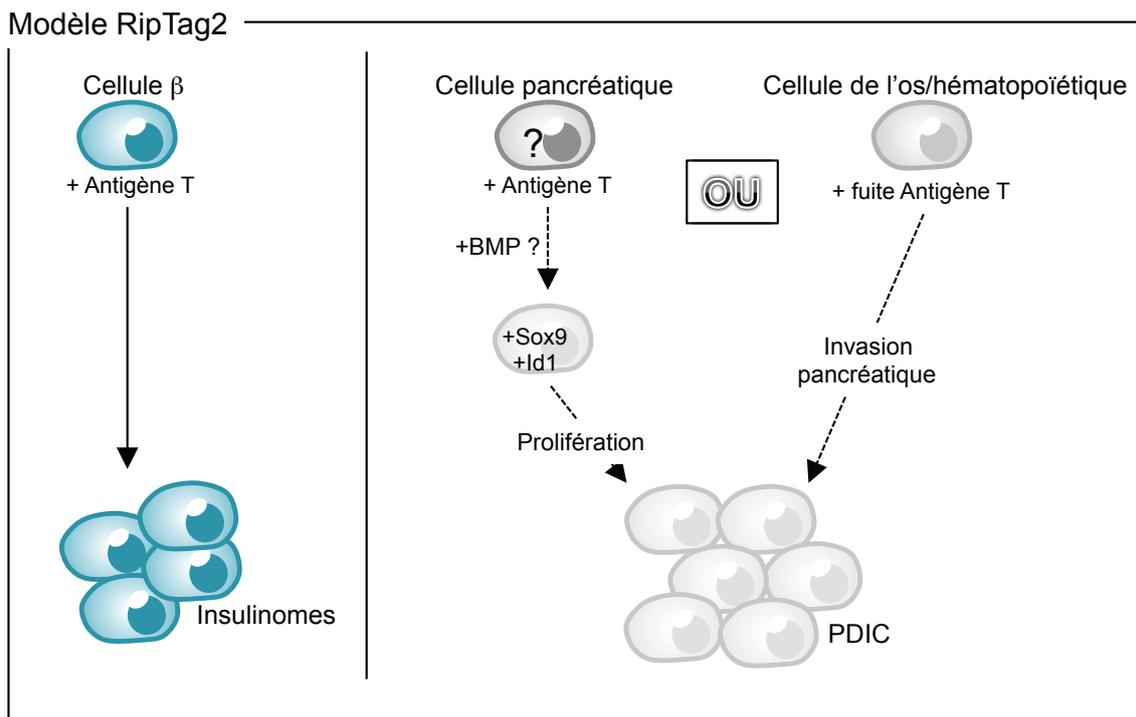
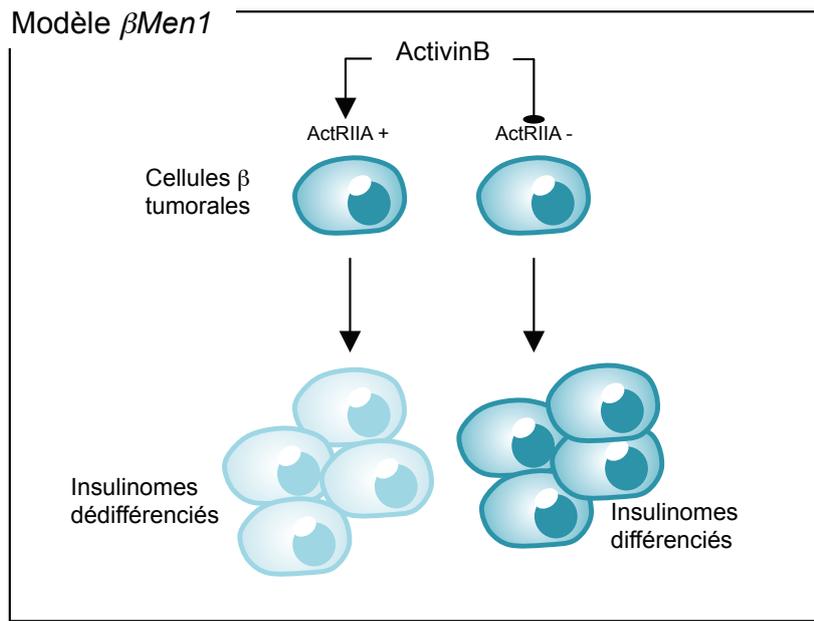


FIGURE 30: DIFFERENTS MECANISMES DE PLASTICITE CELLULAIRE CONDUISANT AU DEVELOPPEMENT DES TNEPS DANS LES MODELES MURINS $\beta MEN1$ ET RIPTAG2

Dans le modèle $\beta Men1$, l'hétérogénéité tumorale prend place, grâce à l'expression d'ActivinB, qui induit une dédifférenciation de cellules β tumorales. Dans le modèle RipTag2, développant des insulinomes et des tumeurs peu différenciées, deux hypothèses peuvent expliquer le développement des PDIC : un retour de cellules pancréatiques différenciées à un état plus immature ou une origine cellulaire non pancréatique, due à la fuite de l'antigène T (détaillé en partie A de la Discussion).

2. Modèle RipTag2

Dans le modèle RipTag2, nos résultats, en complément de ceux de Hunter et *coll.*, indiquent que les carcinomes peu différenciés invasifs ou PDIC ne présentent aucune caractéristique de cellules pancréatiques matures, endocrines, ductales ou exocrines. Deux hypothèses différentes peuvent expliquer le développement de ces tumeurs (Figure 30).

Tout d'abord, bien que ceci ne représente pas la totalité des cellules tumorales des PDIC, quelques cellules semblent exprimer Sox9, marqueur des progéniteurs pancréatiques au cours du développement. Le mécanisme de plasticité cellulaire, qui pourrait intervenir, se rapprocherait de ce qui a été observé dans le modèle murin d'activation de la voie Shh (Landsman et al, 2011). Il se pourrait alors que des cellules pancréatiques subissent de la plasticité cellulaire, comme une dédifférenciation, et deviennent des cellules immatures, qui prolifèrent et développent des tumeurs. Il reste cependant à démontrer le mécanisme de plasticité qui se met en place, ainsi qu'à définir quelles cellules pancréatiques pourraient être à l'origine de ces PDIC.

Cependant, nos données ne semblent pas suggérer que ces tumeurs dérivent d'une conversion par dédifférenciation de cellules pancréatiques différenciées. En effet, l'inactivation du gène *Men1* dans ces souris spécifiquement dans les cellules β ou progéniteurs, n'induit pas la perte de Menin dans les PDIC, alors que les autres cellules tumorales pancréatiques ne l'expriment plus. La seconde hypothèse serait alors une origine non pancréatique de ces cellules tumorales. Ces lésions pourraient émerger d'une fuite de l'expression de l'antigène T dans un autre compartiment cellulaire. Les caractéristiques de ces cellules tumorales, c'est-à-dire l'expression de Menin et la présence nucléaire de pSmad1/5, traduisant l'expression d'un facteur BMP/GDF, peuvent nous orienter vers le compartiment osseux/hématopoïétique, où Menin et BMP ont des rôles connus dans la formation/structuration de l'os et l'hématopoïèse (Chen et al, 2012; Chen et al, 2006; Hendy et al, 2005; Kaji, 2012; Kanazawa et al, 2015). Une caractérisation approfondie permettrait d'exclure cette hypothèse et savoir si les tumeurs observées sont de réelles TNEPs.

B. ACTIVINB ET PLASTICITE CELLULAIRE

1. Régulation des marqueurs de l'identité des cellules β par l'ActivinB

i. *L'ActivinB induit une dédifférenciation des cellules β tumorales ou une perte de fonctionnalité ?*

Actuellement, au sein de la communauté scientifique, il existe un débat sur le terme dédifférenciation, appliqué aux cellules β . D'un côté, il est défini comme un changement de phénotype cellulaire avec un retour à un état progéniteur. De l'autre, cette dédifférenciation s'apparente à une perte des composants matures de la cellule, qui peuvent revenir à un état immature, sans pour autant devenir précurseurs ou progéniteurs. Dans notre cas, nous avons qualifié, dans notre étude, les cellules β , ayant perdu les marqueurs matures, de cellules dédifférenciées, bien qu'elles ne soient pas revenues à un état de progéniteurs pancréatiques. Elles perdent les marqueurs principaux qui font d'elles des cellules fonctionnelles et différenciées. De plus, elles réexpriment fortement Pax4, présent principalement au cours du développement dans les premiers stades de différenciation des cellules β . Nos cellules présentent ainsi des caractères de cellules plus immatures et peuvent être qualifiées de cellules dédifférenciées.

ii. *Concordance de mes observations avec la littérature*

Nos résultats concordent avec des études, parues récemment, sur l'effet de ligand Activin sur l'identité des cellules endocrines. Ainsi, *in vitro* une stimulation de cellules β MIN6 avec l'ActivinA induit une perte des marqueurs de maturité dans ces cellules, similaire à celle que nous avons observé *in vitro* (Szabat et al, 2010). Plus récemment, Andrzejewski et coll. ont montré une surexpression des marqueurs β lors de stimulation d'une lignée cellulaire α , mais n'ont pas observé de perte des marqueurs comme l'Insuline ou MafA dans les cellules β (Andrzejewski et al, 2015). Cependant, ils ont utilisé une lignée cellulaire β INS1E, que nous n'avons pas testé. De plus, ils n'ont utilisé le ligand ActivinB que sur les lignées α . Aucune stimulation avec ce ligand n'a été réalisée sur les cellules INS1E.

Plus récemment, trois groupes ont démontré l'implication de la sous-famille TGF- β , en particulier du récepteur ALK5, dans le maintien de l'identité des cellules β endocrines. L'utilisation d'un inhibiteur de ce récepteur a permis d'induire la différenciation de cellules progénitrices *in vitro* en cellules productrices d'Insuline ou de re-différencier des cellules β , ayant perdu des marqueurs de maturité (Blum et al, 2014; Pagliuca et al, 2014; Rezanian et al, 2014). Dans le même but, j'ai réalisé des traitements de souris *β Men1*, âgées de 10 mois, avec une protéine de fusion Fc (Fragment constant), bloquant les effets de l'ActivinB. Nos premières observations ne montrent pas de re-différenciation des cellules β après 6 semaines de traitement et autopsie à 12 mois. Cependant, nous avons observé un effet de cette protéine sur le tissu adipeux, signifiant que la molécule est fonctionnelle (données non montrées). Nous devons approfondir la caractérisation des lésions après traitement pour conclure de son effet sur les îlots tumoraux. Deux hypothèses pourraient expliquer l'absence de re-différenciation des cellules. Premièrement, les îlots tumoraux dédifférenciés sont peu vascularisés. La molécule n'est peut-être pas capable d'aller au cœur des îlots et d'agir sur les cellules β . La deuxième hypothèse serait le temps de traitement choisi. Il serait peut-être préférable de traiter les souris dès l'apparition d'ActivinB aux alentours de 6-7 mois, afin de bloquer les effets du ligand précocement.

En conclusion, les différents résultats *in vitro* et *in vivo*, de différents groupes, combinés à nos observations, démontrent l'importance des ligands TGF- β dans la dédifférenciation des cellules β endocrines.

iii. Marqueurs de l'identité des cellules β : cibles dépendantes ou indépendantes des Smads ?

Nos résultats suggèrent un rôle direct de l'ActivinB sur le facteur Pax4, grâce à la voie intracellulaire canonique des Smad2/3, contrairement aux autres marqueurs comme MafA, qui ne semblent pas dépendants de ces Smads. Deux hypothèses pourraient expliquer ces différentes régulations :

- Pax4 pourrait être à l'origine de la régulation des autres facteurs, comme il a été décrit dans les travaux de Hu He et *coll.* (Hu He et al, 2011). Cependant, cette fonction est contradictoire avec le rôle dans la différenciation des cellules précurseurs en cellules β au cours du développement.

- les ligands TGF- β sont connus pour avoir des voies de signalisation indépendantes des Smads, comme les voies MAPKinases, PI3Kinase et GTPases (Zhang, 2009). En ce qui concerne l'ActivinB, il est décrit que ce ligand peut induire ces voies, pour contrôler la mise en place de l'axe antéro-postérieur durant l'embryogenèse ou la cicatrisation par formation de fibres de stress et migration cellulaire (Clements et al, 2011; Zhang et al, 2005; Zhang et al, 2011; Zhang et al, 2014). Ainsi, MafA pourrait être régulé grâce à ces voies intracellulaires, plutôt que la voie canonique des Smads. Il est notamment décrit que la voie de signalisation des MAPKinases joue un rôle dans le contrôle de la transcription et de la fonction de MafA (Benkhelifa et al, 2001; Sii-Felice et al, 2005; Vanderford et al, 2008).

2. Rôle de l'ActivinB dans la plasticité des cellules tumorales et l'émergence de TNEPs hétérogènes

i. Dédifférenciation cellulaire et survie

L'effet de l'ActivinB sur la dédifférenciation des cellules β tumorales, serait une protection contre l'augmentation importante de la masse des cellules β . Le ligand conduit à une diminution de l'activité de ces cellules, une absence de forte hypoglycémie et donc une meilleure survie des souris. En effet, dès l'apparition des lésions, n'exprimant pas l'ActivinB, mais fortement l'Insuline, les souris ne survivent pas à la forte hypoglycémie induite.

L'étude du modèle *Inh β - β Men1* nous a permis de confirmer le rôle de l'ActivinB dans la dédifférenciation des cellules β invalidées pour le gène *Men1*, par le maintien de leur état différencié. De façon surprenante, les souris développent de manière similaire au modèle *β Men1* des tumeurs, dans ce cas-là différenciées, mais ne présentent pas d'hypoglycémie et survivent au-delà de 14 mois. Or la survie de ces souris aurait du être diminuée par une forte hyperinsulinémie, causée par l'activité des cellules β tumorales différenciées, et une forte hypoglycémie.

- La première explication pourrait être un défaut de sécrétion d'Insuline par les cellules tumorales *β Men1* en absence d'ActivinB, bien que produite par ces cellules. En effet, il est connu que la famille TGF- β et notamment les Activins, ont un rôle dans la fonction de la cellule β (Bertolino et al, 2008; Wu et al, 2014). Cependant, mes analyses ont montré un taux sanguin élevé d'Insuline chez les souris *Inh β - β Men1*, plus important que chez les souris

$\beta Men1$ à 14 mois (données non montrées). Ceci suggère que les cellules tumorales sécrètent bien l'hormone.

- La deuxième hypothèse serait l'effet de l'inactivation totale de l'ActivinB chez la souris *Inh β - $\beta Men1$* , y compris dans les organes périphériques, stockant le glucose. En effet, il est connu que les Activins ont un rôle dans la réponse à l'Insuline des tissus périphériques comme le tissu adipeux et le foie (Dani, 2013; Ungerleider et al, 2013). En absence d'hypoglycémie, nous pouvons donc émettre l'hypothèse, que l'inactivation totale d'ActivinB dans les tissus périphériques, agit sur la réponse de ces organes à l'Insuline. Ainsi, bien qu'hyperinsulinémique, les souris ne répondent pas à ces stimuli de façon appropriée et ne réduisent pas le taux de glucose sanguin à la hauteur du taux d'Insuline produite.

ii. Mécanismes d'échappement tumoral des cellules β invalidées pour *Men1*

Nos travaux démontrent que l'ActivinB induit la dédifférenciation de la majorité des cellules β invalidées pour *Men1*, mais que certaines tumeurs semblent échapper à ce mécanisme, conduisant à de grosses lésions fortes en Insuline et létales pour les souris. Ces tumeurs n'expriment pas le récepteur de type II des Activins, ActRIIA, et sont donc insensibles à l'effet du ligand, qui se trouve dans l'environnement des insulinomes. L'origine cellulaire de ces lésions peut être de deux sortes :

- une cellule β dédifférenciée, qui perdrait au fur et à mesure l'expression d'ActRIIA, ne répondrait plus à l'ActivinB et se redifférencierait, exprimant fortement Pax4, facteur de différenciation embryonnaire.

- certaines cellules β isolées gardent une expression forte d'Insuline, malgré la dédifférenciation. Elles pourraient être à la base de nature un peu différentes, sans ActRIIA et sans expression d'ActivinB et évolueraient naturellement en insulinomes. Une caractérisation plus approfondie des ces cellules isolées pourraient permettre d'élucider la question.

3. L'ActivinB peut-il être impliqué dans des maladies métaboliques ?

Grâce à notre modèle de poisson-zèbre, surexprimant l'ActivinB au sein des cellules β saines, nous avons pu mettre en évidence que le rôle de ce ligand ne se limite pas aux cellules β tumorales, mais que son implication dans la plasticité cellulaire est un mécanisme plus général, dès lors qu'il est exprimé.

Différents facteurs et mécanismes, régulant l'ActivinB, sont notamment présents au cours de la mise en place de diabète et pourraient permettre l'expression de ce ligand. On retrouve notamment le Glucose et l'Insuline, déjà décrit pour contrôler l'expression d'ActivinB (Bertolino et al, 2008; Hoggard et al, 2009). Ainsi, nous pourrions envisager l'hypothèse que ce ligand pourrait être un facteur surexprimé et impliqué dans la dédifférenciation des cellules β dans des cas de diabète (Introduction Bibliographique partie II.B.3).

C. MENIN ET EPIGENETIQUE

1. Implication de Menin dans la régulation d'*Inhbb* au sein des TNEPs

i. Relation Menin-ActivinB dans nos modèles murins

Nos données sur les modèles murins ont montré la présence d'ActivinB au sein des insulinomes β *Men1*, contrairement au modèle RipTag2, où nous n'avons pas détecté le ligand que ce soit dans les insulinomes ou les PDIC. La mise en évidence de la régulation de l'*Inhbb* par Menin explique pourquoi les tumeurs RipTag2, où Menin est exprimée, ne produisent pas d'ActivinB. Afin de confirmer cette relation, nous avons établi des nouvelles lignées cellulaires, issues de tumeurs de souris *pMenTag*, invalidées pour le gène *Men1* précocement, au stade des progéniteurs. Nos données montrent une expression transcriptionnelle du gène *Inhbb* dans les cellules n'exprimant pas Menin. En revanche, la lignée exprimant Menin, ne présentent pas de transcrits *Inhbb*. Ceci valide l'implication de Menin dans la régulation d'ActivinB.

Au sein des insulinomes β *Men1*, nous avons observé l'expression d'ActivinB tardivement, à partir de 6 mois dans certaines cellules d'îlots, alors que l'absence de Menin est visible dans près de 90% des cellules à 1 mois. Cette expression tardive pourrait s'expliquer par le temps de mise en place des marques. En effet, les marques des histones sont transmises aux cellules-filles lors des divisions cellulaires (Margueron & Reinberg, 2010; Probst et al, 2009). Or, les cellules β tumorales sans Menin prolifèrent très lentement. De plus, bien que l'état de la chromatine soit modifié, ceci n'engendrera pas forcément une transcription des gènes. En effet, il faut les facteurs de transcription ou polymérase essentiels à l'induction de la

transcription du gène. Nous ne pouvons donc pas exclure qu'un facteur de transcription soit nécessaire et ne soit présent qu'aux alentours de 6 mois pour permettre l'expression d'ActivinB. Bien que nous ayons démontré l'importance de Menin dans l'expression d'ActivinB, il pourrait s'agir d'une régulation multifactorielle plus complexe.

ii. Expression de l'ActivinB dans des TNEPs chez l'homme

Nous avons validé la surexpression d'ActivinB chez des patients atteints d'insulinomes sporadiques, confirmant nos données chez la souris. Nous avons notamment observé des lésions avec plus ou moins d'expression d'ActivinB. Bien que ces tumeurs soient sporadiques et non liées à une pathologie NEM1, il ne faut pas oublier que dans environ 50% des TNEPs sporadiques, le gène *Men1* est muté. Il serait donc intéressant de connaître le statut de ce gène chez les patients analysés et de corrélérer l'expression de Menin avec celle de l'ActivinB. Ces résultats permettraient ainsi de valider l'implication de Menin dans la régulation du ligand chez l'homme.

2. Menin et le complexe PRC2 : interactions et fonctions

i. Menin, nouvel acteur dans la triméthylation des marques H3K27 ?

La première fonction connue de Menin dans les régulations épigénétiques est la mise en place des marques H3K4me3. Elle permet de recruter Mll, qui pourra trimétyler les histones (Roudaia & Speck, 2008). Depuis quelques années, le rôle de Menin dans la mise en place des marques H3K27me3 semblent émerger. Gao et coll. ont publié une étude démontrant l'implication de Menin dans le complexe PRC2 avec Ezh2, pour la répression épigénétique de l'expression de la Pléiotrophine dans des cellules cancéreuses pulmonaires (Gao et al, 2009). Ces études pointent ainsi l'implication de Menin dans la méthylation des marques inhibitrices H3K27me3. Nos résultats suggèrent également qu'une absence de Menin dans des MEFs, induit une très forte diminution générale de ces marques, et plus précisément sur le promoteur du gène *Inhbb*.

Cependant, ces observations sont contradictoires avec une étude récente de Lin et coll. En effet, ils ont montré, lors d'une perte de Menin dans des îlots pancréatiques tumoraux, la diminution des marques H3K4me3 et l'enrichissement en H3K27me3 de certains promoteurs (Lin et al, 2015).

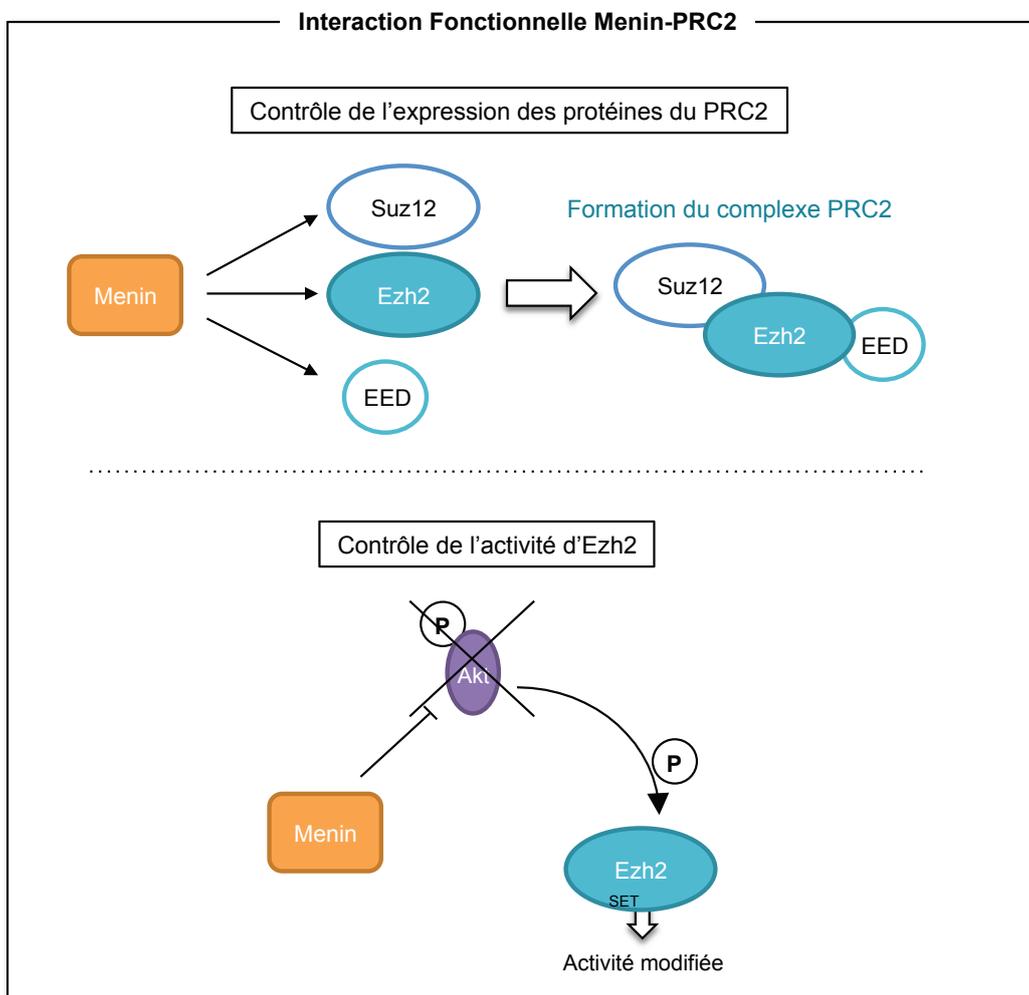
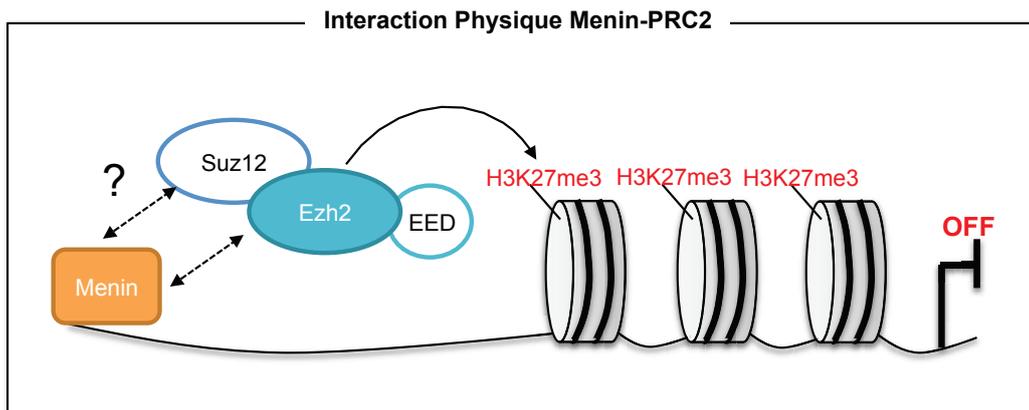


FIGURE 31: HYPOTHESES D'INTERACTION DE MENIN AVEC LE COMPLEXE PRC2

La fonction de Menin sur les marques H3K27me3 pourrait faire intervenir différents types d'interactions avec le complexe PRC2. La première hypothèse serait une interaction directe avec une des protéines du complexe. L'autre hypothèse serait une interaction fonctionnelle. Ainsi, Menin pourrait réguler l'expression des protéines du PRC2 ou de protéines « accessoires » aux complexes, ou bien, contrôler, par le biais de pAkt, l'activité d'Ezh2 (détaillé en partie C.2 de la Discussion).

Cependant, dans leur étude, ils regardent la présence des marques H3K27me3 sur les promoteurs ayant perdu les marques H3K4me3 en absence de Menin. Il serait alors intéressant d'étudier les taux d'occupation des marques H3K27me3 avec ou sans Menin, indépendamment des marques H3K4me3, sur des promoteurs possédant à l'état normal des marques H3K27me3.

Bien que ces observations demandent à être approfondies, la mise en évidence de la présence d'Ezh2 et Menin sur un grand nombre de promoteurs en commun dans des cellules cancéreuses hépatiques suggèrent que ces protéines pourraient interagir et contrôler l'expression de plusieurs gènes, grâce aux marques H3K27me3 (Gao et al, 2014a).

ii. Interaction physique ou fonctionnelle entre Menin et PRC2 ?

Menin semble être impliquée dans la triméthylation des marques H3K27 en coopération avec les protéines PcG et notamment Ezh2. Cependant, aucune étude n'a encore démontré une interaction directe de Menin avec Ezh2. Gao et *coll.* ont montré la présence des deux protéines aux mêmes promoteurs, pouvant suggérer une interaction physique (Gao et al, 2014a). Cependant dans leur étude précédente, ils n'ont pas détecté d'interaction entre Menin et Ezh2, mais plutôt entre Menin et Suppressor of zeste 12 homolog (SUZ12), faisant partie des protéines du PRC2 (Gao et al, 2009). Ainsi, Menin pourrait faire partie de ce complexe, afin peut être de recruter les protéines du PRC2 aux promoteurs, comme c'est le cas avec Mll (Figure 31).

Dans le même sens, Xu et *coll.* ont démontré le rôle de Menin dans la triméthylation des marques H3K27 pour le contrôle de l'expression de Pax2 (Xu et al, 2011a). Dans ce cas, Menin n'interagit pas directement avec le complexe PRC2, mais contrôle l'expression de la protéine Wilms tumor suppressor 1 (WT1), qui recrute les protéines PcG au promoteur de Pax2, pour méthyler les histones. Ainsi, ce serait une interaction plutôt fonctionnelle de Menin et PRC2. Menin pourrait alors contrôler l'expression de protéines « accessoires » au PRC2, qui favoriseraient sa fonction sur les histones, ou même contrôler directement l'expression des protéines PcG (Figure 31).

Enfin, il est désormais connu qu'Ezh2 peut subir des modifications post-traductionnelles, qui contrôlent son activité. Ainsi, une phosphorylation en sérine 21, par Akt phosphorylé (pAkt) permet à Ezh2 d'avoir une fonction plutôt activatrice sur la transcription des gènes, par l'intermédiaire d'autres protéines. Nos données préliminaires suggèrent que l'activation d'Akt

par phosphorylation serait plus importante en absence de Menin dans les MEFs (données non montrées). Nous pouvons donc envisager que la perte de Menin favoriserait l'activation d'Akt et ainsi la phosphorylation d'Ezh2. Menin pourrait alors contrôler l'activité d'Ezh2 de façon indirecte (Figure 31).

3. Menin, un nouvel acteur de la plasticité cellulaire et épigénomique

Bien plus qu'un simple suppresseur de tumeurs, Menin ne contrôlerait pas seulement le cycle cellulaire mais serait un acteur important dans la plasticité cellulaire, en régulant l'expression de facteurs de transcription ou cytokines, impliqués dans l'identité des cellules endocrines.

La première mise en évidence de l'implication de Menin dans la plasticité cellulaire a été faite dans la différenciation des ostéoblastes dans l'os. En effet, grâce à ses interactions avec des facteurs de transcription Smad, Runx2 (Runt-related transcription factor 2), JunD ou β -catenin, Menin contrôle la différenciation ostéoblastique *in vitro* et *in vivo* (Inoue et al, 2011; Kanazawa et al, 2015; Naito et al, 2005; Sowa et al, 2004). De plus, la protéine est impliquée dans la différenciation des lymphocytes T helper 17 (Th17), en contrôlant l'expression de gènes cibles, comme l'Interleukin-17a (Watanabe et al, 2014). Dans le cas des cellules endocrines pancréatiques, notre groupe a montré que l'absence de Menin, au sein d'insulinomes, bloque la voie de différenciation cellulaire de MafA (Hamze et al, 2013). Mes résultats viennent supporter ces observations. Dans notre cas, Menin est impliquée dans la plasticité cellulaire tumorale en contrôlant l'expression de l'ActivinB.

L'absence de Menin dans les cellules pourrait alors induire une importante modification de l'épigénome. Ceci pourrait conduire à de nombreux changements dans la régulation et l'expression de gènes spécifiques aux différents types cellulaires et induire un changement de nature des cellules.

**PERSPECTIVES
& CONCLUSION**

A. RETOMBEES FONDAMENTALES

1. ActivinB et identité des cellules β

Mes travaux ont permis de mettre en évidence un nouveau rôle important de l'ActivinB dans le contrôle de l'identité des cellules β tumorales ou non, par régulation des marqueurs spécifiques de ces cellules. Pax4 serait contrôlé par le ligand grâce à la voie canonique des Smads, contrairement à d'autres marqueurs comme MafA, qui pourraient être contrôlé par des voies non canoniques ou par le facteur Pax4.

Des études approfondies sur la place des voies de signalisation non canoniques et de Pax4 dans la régulation des marqueurs d'identité des cellules β seraient intéressantes, afin d'élucider les liens qui existent entre le ligand et ses cibles. Ces analyses complémentaires permettraient de disséquer le rôle de l'ActivinB aussi bien dans les TNEPs, mais aussi durant le développement embryonnaire et la différenciation pancréatique.

2. Menin et régulations épigénétiques

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence la régulation d'ActivinB par Menin, et plus particulièrement de mettre en évidence un nouveau rôle de Menin dans la régulation épigénétique et la triméthylation des marques H3K27.

Actuellement, nous cherchons les partenaires de Menin dans le complexe PRC2, qui seraient impliqués dans la mise en place des marques H3K27me3 et le contrôle de l'ActivinB. Nous sommes entrain de réaliser des CHIP-PCR sur le promoteur du gène *Inhbb*, afin d'étudier si les protéines Menin et Ezh2 sont présentes sur ce promoteur aux mêmes endroits et pourraient être partenaires. De plus, nous allons analyser l'expression du gène *Inhbb* dans différentes lignées cellulaires, possédant Menin, mais pour lesquelles les différents constituants du complexe PRC2 ont été invalidés.

Enfin, notre équipe travaille actuellement sur un séquençage à grande échelle après immunoprécipitation de la chromatine, issue de tumeurs β *Men1* à différents stades de tumorigenèse, afin de réaliser un épigénome des tumeurs. Ceci permettra de mettre en évidence l'impact d'une perte de Menin sur les régulations épigénétiques de gènes cibles au

sein des cellules β tumorales, ainsi que le rôle des différents acteurs des complexes trithorax et PcG dans la tumorigenèse des cellules β .

B. RETOMBÉES TRANSLATIONNELLES ET CLINIQUES

1. En Cancérologie

- Durant ma thèse, j'ai pu mettre en évidence l'implication de la plasticité cellulaire dans le développement de TNEPs, mais également que des mécanismes différents peuvent intervenir dans l'émergence de tumeurs hétérogènes. Dans cet objectif, nous devons approfondir la caractérisation des cellules tumorales des PDIC du modèle RipTag2, avec notamment l'utilisation de marqueurs spécifiques de l'os et du système hématopoïétique, ce qui permettrait d'exclure l'hypothèse d'une origine non pancréatique. À terme, nous pourrions les comparer aux tumeurs peu différenciées très prolifératives présentes chez l'homme. Nous devons également préciser le facteur responsable de la forte phosphorylation des Smad1/3/5 et l'expression d'Id1, qui pourrait être à l'origine de la plasticité des cellules.

- J'ai également identifié le ligand ActivinB, comme responsable de la dédifférenciation des cellules β , par la régulation d'expression des marqueurs de l'identité de ces cellules, *in vitro* et *in vivo*. Ce résultat pourra permettre d'améliorer les techniques de diagnostic. Nos premières observations sur des coupes de tumeurs sporadiques humaines ont confirmé nos résultats vus chez la souris, avec une expression du ligand et une diminution d'Insuline. Il est donc essentiel de continuer ces analyses sur de nouveaux insulinomes humains sporadiques ou atteints de NEM1, afin de déterminer si le ligand pourrait être un bon marqueur diagnostique d'insulinomes dédifférenciés. De plus, l'ActivinB est un ligand sécrété par les cellules et peut être alors retrouvé circulant dans le sang. Nous pourrions envisager cette cytokine comme un nouveau marqueur tumoral, permettant de valider la présence de tumeurs peu différenciées chez le patient.

- L'ActivinB semble par ailleurs être un élément protecteur au cours de la tumorigenèse. Le modèle *Inh β - β Men1* ne nous a pas permis de valider ce rôle sur la survie des souris. En revanche, nous avons généré un modèle murin permettant une invalidation spécifique de l'ActivinB, grâce au système Cre-Lox (invalidation dans les cellules β , modèle

β Inh (*Inh β ^{F/F};RipCre+*). Nous pourrions alors croiser ces souris avec le modèle *β Men1*, afin d'invalider spécifiquement l'ActivinB et Menin dans les cellules β et de s'affranchir de l'absence d'ActivinB dans les tissus périphériques. Si le rôle de l'ActivinB sur la survie est vrai, ces nouvelles souris devraient développer des insulinomes différenciés, qui conduiraient à une hypoglycémie précoce et au décès des souris prématurément.

Ce dernier élément nous permettrait d'envisager d'utiliser ce ligand en thérapie. Son injection permettrait une dédifférenciation des cellules β , qui induisent une hyperinsulinémie chez les patients, et ainsi atténuerait leurs symptômes et signes cliniques. Il serait alors intéressant de tester ce traitement sur des souris RipTag2, ne présentant pas d'expression d'ActivinB et décédant précocement d'hypoglycémie, et d'analyser, par immunohistologie, les cellules β après traitement et la survie de ces souris.

- Enfin, grâce au modèle murin *β Men1*, j'ai pu mettre en évidence le développement de tumeurs non prolifératives et dédifférenciées. Ce type de lésions n'est pas couramment décrit et observé chez l'homme. Or, avec les outils diagnostiques actuels, il se peut qu'elles ne soient pas détectables par analyses immunohistochimiques, car ces cellules tumorales n'expriment ni l'Insuline, ni Ki67. De plus, avec la place de la plasticité cellulaire dans le développement des TNEPs, qui semble être un mécanisme majeur, il s'avère, à l'heure actuelle, essentiel de réaliser des études moléculaires approfondies de différentes tumeurs humaines, afin de les caractériser au mieux. Ceci nous permettrait de comprendre leur origine cellulaire et les mécanismes de plasticité qui peuvent en être l'origine. A terme, ceci pourrait améliorer la classification et le diagnostic de ces TNEPs, et enfin conduire à des thérapies personnalisées.

2. ActivinB et maladies métaboliques

Outre les perspectives sur les TNEPs, mon travail pourrait s'inscrire dans d'autres pathologies, comme le diabète. L'ActivinB est d'ores et déjà utilisé *in vitro* pour différencier des cellules productrices d'Insuline, qui, une fois greffées au patient, s'opposent à la perte de cellules β . Nos données sur le modèle non tumoral de surexpression d'ActivinB dans le poisson-zèbre, nous ont permis de montrer que les effets de l'ActivinB ne se restreignent pas aux tumeurs, mais qu'au sein de cellules β saines, il induit leur plasticité et perte d'Insuline. Il serait intéressant d'étudier l'expression de ce ligand dans des cas de diabète pour lesquels

une dédifférenciation est observée. De plus, il pourrait être envisagé un traitement avec l'ActivinB dans les stades précoces de diabète de type II, où une hyperplasie des cellules β et une hyperinsulinémie sont observées, afin de diminuer la fonctionnalité des cellules et ainsi la résistance des tissus périphériques à l'Insuline. Ceci pourrait être testé par injection du ligand chez des souris obèses diabétiques (modèle ob/ob), lors des premiers signes de développement du diabète.

En conclusion, mes travaux de thèse ont démontré un rôle essentiel de la famille des Activins au sein des îlots pancréatiques, notamment dans la tumorigenèse et la plasticité cellulaire. Ces résultats pourront désormais s'appliquer à des domaines plus larges que la cancérologie, comme dans les diabètes. Enfin, mes travaux renforcent l'idée d'une grande hétérogénéité des TNEPs, selon leur nature, leurs caractéristiques génétiques/moléculaires, mais également dans les mécanismes de plasticité cellulaire impliqués. Il est désormais essentiel de caractériser au mieux les tumeurs humaines, afin de réaliser une classification et des diagnostics plus précis. Ceci permettra à terme la mise en place de thérapies personnalisées, en fonction des caractéristiques moléculaires et de l'origine cellulaire des tumeurs.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abouna S, Old RW, Pelengaris S, Epstein D, Ifandi V, Sweeney I, Khan M (2010) Non-beta-cell progenitors of beta-cells in pregnant mice. *Organogenesis* **6**: 125-133

Afelik S, Chen Y, Pieler T (2006) Combined ectopic expression of Pdx1 and Ptf1a/p48 results in the stable conversion of posterior endoderm into endocrine and exocrine pancreatic tissue. *Genes Dev* **20**: 1441-1446

Afelik S, Qu X, Hasrouni E, Bukys MA, Deering T, Nieuwoudt S, Rogers W, Macdonald RJ, Jensen J (2012) Notch-mediated patterning and cell fate allocation of pancreatic progenitor cells. *Development* **139**: 1744-1753

Agarwal SK, Kester MB, Debelenko LV, Heppner C, Emmert-Buck MR, Skarulis MC, Doppman JL, Kim YS, Lubensky IA, Zhuang Z, Green JS, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Liotta LA, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ (1997) Germline mutations of the MEN1 gene in familial multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *Hum Mol Genet* **6**: 1169-1175

Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H (1996) The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* **122**: 1409-1416

Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H (1998) beta-cell-specific inactivation of the mouse Ipfl/Pdx1 gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* **12**: 1763-1768

Ahnfelt-Ronne J, Ravassard P, Pardanaud-Glavieux C, Scharfmann R, Serup P (2010) Mesenchymal bone morphogenetic protein signaling is required for normal pancreas development. *Diabetes* **59**: 1948-1956

Ahren B (2005) Type 2 diabetes, insulin secretion and beta-cell mass. *Curr Mol Med* **5**: 275-286

Al-Hasani K, Pfeifer A, Courtney M, Ben-Othman N, Gjernes E, Vieira A, Druelle N, Avolio F, Ravassard P, Leuckx G, Lacas-Gervais S, Ambrosetti D, Benizri E, Hecksher-Sorensen J, Gounon P, Ferrer J, Gradwohl G, Heimberg H, Mansouri A, Collombat P (2013) Adult duct-lining cells can reprogram into beta-like cells able to counter repeated cycles of toxin-induced diabetes. *Dev Cell* **26**: 86-100

Andersson O, Bertolino P, Ibanez CF (2007) Distinct and cooperative roles of mammalian Vg1 homologs GDF1 and GDF3 during early embryonic development. *Dev Biol* **311**: 500-511

Andersson O, Reissmann E, Ibanez CF (2006) Growth differentiation factor 11 signals through the transforming growth factor-beta receptor ALK5 to regionalize the anterior-posterior axis. *EMBO Rep* **7**: 831-837

Andrzejewski D, Brown ML, Ungerleider N, Burnside A, Schneyer AL (2015) Activins A and B regulate fate-determining gene expression in islet cell lines and islet cells from male mice. *Endocrinology*: en20151167

Anlauf M, Schlenger R, Perren A, Bauersfeld J, Koch CA, Dralle H, Raffel A, Knoefel WT, Weihe E, Ruszniewski P, Couvelard A, Komminoth P, Heitz PU, Kloppel G (2006) Microadenomatosis of the endocrine pancreas in patients with and without the multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome. *Am J Surg Pathol* **30**: 560-574

Apelqvist A, Ahlgren U, Edlund H (1997) Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol* **7**: 801-804

Babu V, Paul N, Yu R (2013) Animal models and cell lines of pancreatic neuroendocrine tumors. *Pancreas* **42**: 912-923

Baeyens L, Bonne S, Bos T, Rooman I, Peleman C, Lahoutte T, German M, Heimberg H, Bouwens L (2009) Notch signaling as gatekeeper of rat acinar-to-beta-cell conversion in vitro. *Gastroenterology* **136**: 1750-1760 e1713

Baeyens L, De Breuck S, Lardon J, Mfopou JK, Rooman I, Bouwens L (2005) In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. *Diabetologia* **48**: 49-57

Ballian N, Hu M, Liu SH, Brunicardi FC (2007) Proliferation, hyperplasia, neogenesis, and neoplasia in the islets of Langerhans. *Pancreas* **35**: 199-206

Barbara NP, Wrana JL, Letarte M (1999) Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* **274**: 584-594

Basturk O, Tang L, Hruban RH, Adsay V, Yang Z, Krasinskas AM, Vakiani E, La Rosa S, Jang KT, Frankel WL, Liu X, Zhang L, Giordano TJ, Bellizzi AM, Chen JH, Shi C, Allen P, Reidy DL, Wolfgang CL, Saka B, Rezaee N, Deshpande V, Klimstra DS (2014) Poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the pancreas: a clinicopathologic analysis of 44 cases. *Am J Surg Pathol* **38**: 437-447

Basturk O, Yang Z, Tang LH, Hruban RH, Adsay V, McCall CM, Krasinskas AM, Jang KT, Frankel WL, Balci S, Sigel C, Klimstra DS (2015) The High-grade (WHO G3) Pancreatic Neuroendocrine Tumor Category Is Morphologically and Biologically Heterogenous and Includes Both Well Differentiated and Poorly Differentiated Neoplasms. *Am J Surg Pathol* **39**: 683-690

Benkhelifa S, Provot S, Nabais E, Eychene A, Calothy G, Felder-Schmittbuhl MP (2001) Phosphorylation of MafA is essential for its transcriptional and biological properties. *Mol Cell Biol* **21**: 4441-4452

Bernard C, Berthault MF, Saulnier C, Ktorza A (1999) Neogenesis vs. apoptosis As main components of pancreatic beta cell mass changes in glucose-infused normal and mildly diabetic adult rats. *Faseb J* **13**: 1195-1205

Bertolino P, Holmberg R, Reissmann E, Andersson O, Berggren PO, Ibanez CF (2008) Activin B receptor ALK7 is a negative regulator of pancreatic beta-cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 7246-7251

Bertolino P, Tong WM, Galendo D, Wang ZQ, Zhang CX (2003a) Heterozygous Men1 mutant mice develop a range of endocrine tumors mimicking multiple endocrine neoplasia type 1. *Mol Endocrinol* **17**: 1880-1892

Bertolino P, Tong WM, Herrera PL, Casse H, Zhang CX, Wang ZQ (2003b) Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer Res* **63**: 4836-4841

Besson-Fournier C, Latour C, Kautz L, Bertrand J, Ganz T, Roth MP, Coppin H (2012) Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood* **120**: 431-439

Binot AC, Manfroid I, Flasse L, Winandy M, Motte P, Martial JA, Peers B, Voz ML (2010) Nkx6.1 and nkx6.2 regulate alpha- and beta-cell formation in zebrafish by acting on pancreatic endocrine progenitor cells. *Dev Biol* **340**: 397-407

Biondi CA, Gartside MG, Waring P, Loffler KA, Stark MS, Magnuson MA, Kay GF, Hayward NK (2004) Conditional inactivation of the MEN1 gene leads to pancreatic and pituitary tumorigenesis but does not affect normal development of these tissues. *Mol Cell Biol* **24**: 3125-3131

Blum B, Roose AN, Barrandon O, Maehr R, Arvanites AC, Davidow LS, Davis JC, Peterson QP, Rubin LL, Melton DA (2014) Reversal of beta cell de-differentiation by a small molecule inhibitor of the TGFbeta pathway. *Elife* **3**: e02809

Bock T, Kyhnel A, Pakkenberg B, Buschard K (2003) The postnatal growth of the beta-cell mass in pigs. *J Endocrinol* **179**: 245-252

Bone AJ, Taylor KW (1976) Metabolic adaptation to pregnancy shown by increased biosynthesis of insulin in islets of Langerhans isolated from pregnant rat. *Nature* **262**: 501-502

Bonner C, Farrelly AM, Concannon CG, Dussmann H, Baquie M, Virard I, Wobser H, Kogel D, Wollheim CB, Rupnik M, Byrne MM, Konig HG, Prehn JH (2011) Bone morphogenetic protein 3 controls insulin gene expression and is down-regulated in INS-1 cells inducibly expressing a hepatocyte nuclear factor 1A-maturity-onset diabetes of the young mutation. *J Biol Chem* **286**: 25719-25728

Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ (2000) In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7999-8004

Bonomi L, Brown M, Ungerleider N, Muse M, Matzuk MM, Schneyer A (2012) Activin B regulates islet composition and islet mass but not whole body glucose homeostasis or insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**: E587-596

Bottinger EP, Factor VM, Tsang ML, Weatherbee JA, Kopp JB, Qian SW, Wakefield LM, Roberts AB, Thorgeirsson SS, Sporn MB (1996) The recombinant proregion of transforming growth factor beta1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor beta1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5877-5882

Bramswig NC, Everett LJ, Schug J, Dorrell C, Liu C, Luo Y, Streeter PR, Naji A, Grompe M, Kaestner KH (2013) Epigenomic plasticity enables human pancreatic alpha to beta cell reprogramming. *J Clin Invest* **123**: 1275-1284

Brennan K, Huangfu D, Melton D (2007) All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance. *PLoS Biol* **5**: e163

Broekmans FJ, Visser JA, Laven JS, Broer SL, Themmen AP, Fauser BC (2008) Anti-Mullerian hormone and ovarian dysfunction. *Trends Endocrinol Metab* **19**: 340-347

Brorson M, Hougaard DM, Nielsen JH, Tornehave D, Larsson LI (2001) Expression of SMAD signal transduction molecules in the pancreas. *Histochem Cell Biol* **116**: 263-267

Brown MA, Zhao Q, Baker KA, Naik C, Chen C, Pukac L, Singh M, Tsareva T, Parice Y, Mahoney A, Roschke V, Sanyal I, Choe S (2005) Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem* **280**: 25111-25118

Brown ML, Bonomi L, Ungerleider N, Zina J, Kimura F, Mukherjee A, Sidis Y, Schneyer A (2011) Follistatin and follistatin like-3 differentially regulate adiposity and glucose homeostasis. *Obesity (Silver Spring)* **19**: 1940-1949

Bruun C, Christensen GL, Jacobsen ML, Kanstrup MB, Jensen PR, Fjordvang H, Mandrup-Poulsen T, Billestrup N (2014) Inhibition of beta cell growth and function by bone morphogenetic proteins. *Diabetologia* **57**: 2546-2554

Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, Butler PC (2010) Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia* **53**: 2167-2176

Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003a) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**: 102-110

Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC (2003b) Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes* **52**: 2304-2314

Cash JN, Rejon CA, McPherron AC, Bernard DJ, Thompson TB (2009) The structure of myostatin:follistatin 288: insights into receptor utilization and heparin binding. *Embo J* **28**: 2662-2676

Cassol C, Mete O (2015) Endocrine manifestations of von Hippel-Lindau disease. *Arch Pathol Lab Med* **139**: 263-268

Chapman SC, Bernard DJ, Jelen J, Woodruff TK (2002) Properties of inhibin binding to betaglycan, InhBP/p120 and the activin type II receptors. *Mol Cell Endocrinol* **196**: 79-93

Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang ML, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massague J (1987) The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* **48**: 409-415

Chen G, Deng C, Li YP (2012) TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* **8**: 272-288

Chen YG, Hata A, Lo RS, Wotton D, Shi Y, Pavletich N, Massague J (1998) Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* **12**: 2144-2152

Chen YX, Yan J, Keeshan K, Tubbs AT, Wang H, Silva A, Brown EJ, Hess JL, Pear WS, Hua X (2006) The tumor suppressor menin regulates hematopoiesis and myeloid transformation by influencing Hox gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1018-1023

Cheng SK, Olale F, Bennett JT, Brivanlou AH, Schier AF (2003) EGF-CFC proteins are essential coreceptors for the TGF-beta signals Vg1 and GDF1. *Genes Dev* **17**: 31-36

Chiu CW, Nozawa H, Hanahan D (2010) Survival benefit with proapoptotic molecular and pathologic responses from dual targeting of mammalian target of rapamycin and epidermal growth factor receptor in a preclinical model of pancreatic neuroendocrine carcinogenesis. *J Clin Oncol* **28**: 4425-4433

Clements M, Pernaute B, Vella F, Rodriguez TA (2011) Crosstalk between Nodal/activin and MAPK p38 signaling is essential for anterior-posterior axis specification. *Curr Biol* **21**: 1289-1295

Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Krull J, Berger J, Riedel D, Herrera PL, Serup P, Mansouri A (2007) Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. *J Clin Invest* **117**: 961-970

Collombat P, Mansouri A, Hecksher-Sorensen J, Serup P, Krull J, Gradwohl G, Gruss P (2003) Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev* **17**: 2591-2603

Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, Madsen OD, Serup P, Heimberg H, Mansouri A (2009) The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell* **138**: 449-462

Corbo V, Dalai I, Scardoni M, Barbi S, Beghelli S, Bersani S, Albarello L, Doglioni C, Schott C, Capelli P, Chilosi M, Boninsegna L, Becker KF, Falconi M, Scarpa A (2010) MEN1 in pancreatic endocrine tumors: analysis of gene and protein status in 169 sporadic neoplasms reveals alterations in the vast majority of cases. *Endocr Relat Cancer* **17**: 771-783

Courtney M, Gjernes E, Druelle N, Ravaud C, Vieira A, Ben-Othman N, Pfeifer A, Avolio F, Leuckx G, Lacas-Gervais S, Burel-Vandenbos F, Ambrosetti D, Hecksher-Sorensen J, Ravassard P, Heimberg H, Mansouri A, Collombat P (2013) The inactivation of Arx in pancreatic alpha-cells triggers their neogenesis and conversion into functional beta-like cells. *PLoS Genet* **9**: e1003934

Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, Garrett-Beal L, Emmert-Buck MR, Edgemon KA, Lorang D, Libutti SK, Chandrasekharappa SC, Marx SJ, Spiegel AM, Collins FS (2001) A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1118-1123

Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, McNally SR, Swain GP, Montagna C, Hager JH, Hanahan D, Edlund H, Magnuson MA, Garrett-Beal L, Burns AL, Ried T, Chandrasekharappa SC, Marx SJ, Spiegel AM, Collins FS (2003) Of mice and MEN1: Insulinomas in a conditional mouse knockout. *Mol Cell Biol* **23**: 6075-6085

Cui L, Miao J (2010) Chromatin-mediated epigenetic regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* **9**: 1138-1149

- Dani C (2013) Activins in adipogenesis and obesity. *Int J Obes (Lond)* **37**: 163-166
- de Wilde RF, Edil BH, Hruban RH, Maitra A (2012) Well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors: from genetics to therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**: 199-208
- DeLellis RA, Lloyd RV, Hietz PU, Eng C (2004) *World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*, Lyon.
- Demeterco C, Beattie GM, Dib SA, Lopez AD, Hayek A (2000) A role for activin A and betacellulin in human fetal pancreatic cell differentiation and growth. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 3892-3897
- Derynck R, Miyazono K (2008) TGF- β and the TGF- β Family. *Cold Spring Harbor Monograph Archive* **50**
- Desgraz R, Bonal C, Herrera PL (2011) beta-cell regeneration: the pancreatic intrinsic faculty. *Trends Endocrinol Metab* **22**: 34-43
- Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J, Zaret KS (2001) A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* **128**: 871-881
- Dhawan S, Georgia S, Tschen SI, Fan G, Bhushan A (2011) Pancreatic beta cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of Arx. *Dev Cell* **20**: 419-429
- Dichmann DS, Miller CP, Jensen J, Scott Heller R, Serup P (2003) Expression and misexpression of members of the FGF and TGFbeta families of growth factors in the developing mouse pancreas. *Dev Dyn* **226**: 663-674
- Dichmann DS, Yassin H, Serup P (2006) Analysis of pancreatic endocrine development in GDF11-deficient mice. *Dev Dyn* **235**: 3016-3025
- Donath MY, Storling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T (2003) Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med (Berl)* **81**: 455-470
- Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429**: 41-46
- Dor Y, Melton DA (2004) How important are adult stem cells for tissue maintenance? *Cell Cycle* **3**: 1104-1106
- Efrat S (1999) Genetically engineered pancreatic beta-cell lines for cell therapy of diabetes. *Ann N Y Acad Sci* **875**: 286-293

Eguizabal C, Montserrat N, Veiga A, Izpisua Belmonte JC (2013) Dedifferentiation, transdifferentiation, and reprogramming: future directions in regenerative medicine. *Semin Reprod Med* **31**: 82-94

El-Gohary Y, Tulachan S, Guo P, Welsh C, Wiersch J, Prasad K, Paredes J, Shiota C, Xiao X, Wada Y, Diaz M, Gittes G (2013) Smad signaling pathways regulate pancreatic endocrine development. *Dev Biol* **378**: 83-93

Esni F, Ghosh B, Biankin AV, Lin JW, Albert MA, Yu X, MacDonald RJ, Civin CI, Real FX, Pack MA, Ball DW, Leach SD (2004) Notch inhibits Ptf1 function and acinar cell differentiation in developing mouse and zebrafish pancreas. *Development* **131**: 4213-4224

Feng XH, Derynck R (2005) Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 659-693

Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seiffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A (2000) Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* **6**: 568-572

Fernandes A, King LC, Guz Y, Stein R, Wright CV, Teitelman G (1997) Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets. *Endocrinology* **138**: 1750-1762

Frandsen U, Porneki AD, Floridon C, Abdallah BM, Kassem M (2007) Activin B mediated induction of Pdx1 in human embryonic stem cell derived embryoid bodies. *Biochem Biophys Res Commun* **362**: 568-574

Franklin DS, Godfrey VL, O'Brien DA, Deng C, Xiong Y (2000) Functional collaboration between different cyclin-dependent kinase inhibitors suppresses tumor growth with distinct tissue specificity. *Mol Cell Biol* **20**: 6147-6158

Furukawa M, Eto Y, Kojima I (1995) Expression of immunoreactive activin A in fetal rat pancreas. *Endocr J* **42**: 63-68

Gannon M, Ables ET, Crawford L, Lowe D, Offield MF, Magnuson MA, Wright CV (2008) pdx-1 function is specifically required in embryonic beta cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis. *Dev Biol* **314**: 406-417

Gao SB, Feng ZJ, Xu B, Wu Y, Yin P, Yang Y, Hua X, Jin GH (2009) Suppression of lung adenocarcinoma through menin and polycomb gene-mediated repression of growth factor pleiotrophin. *Oncogene* **28**: 4095-4104

Gao SB, Xu B, Ding LH, Zheng QL, Zhang L, Zheng QF, Li SH, Feng ZJ, Wei J, Yin ZY, Hua X, Jin GH (2014a) The functional and mechanistic relatedness of EZH2 and menin in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **61**: 832-839

Gao T, McKenna B, Li C, Reichert M, Nguyen J, Singh T, Yang C, Pannikar A, Doliba N, Zhang T, Stoffers DA, Edlund H, Matschinsky F, Stein R, Stanger BZ (2014b) Pdx1 maintains beta cell identity and function by repressing an alpha cell program. *Cell Metab* **19**: 259-271

Georgia S, Bhushan A (2004) Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J Clin Invest* **114**: 963-968

Goto Y, Nomura M, Tanaka K, Kondo A, Morinaga H, Okabe T, Yanase T, Nawata H, Takayanagi R, Li E (2007) Genetic interactions between activin type IIB receptor and Smad2 genes in asymmetrical patterning of the thoracic organs and the development of pancreas islets. *Dev Dyn* **236**: 2865-2874

Goulley J, Dahl U, Baeza N, Mishina Y, Edlund H (2007) BMP4-BMPRII signaling in beta cells is required for and augments glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Metab* **5**: 207-219

Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F (2000) neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1607-1611

Gray PC, Greenwald J, Blount AL, Kunitake KS, Donaldson CJ, Choe S, Vale W (2000) Identification of a binding site on the type II activin receptor for activin and inhibin. *J Biol Chem* **275**: 3206-3212

Gray PC, Harrison CA, Vale W (2003) Cripto forms a complex with activin and type II activin receptors and can block activin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5193-5198

Gray PC, Vale W (2012) Cripto/GRP78 modulation of the TGF-beta pathway in development and oncogenesis. *FEBS Lett* **586**: 1836-1845

Greenwald J, Groppe J, Gray P, Wiater E, Kwiatkowski W, Vale W, Choe S (2003) The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol Cell* **11**: 605-617

Grewal IS, Grewal KD, Wong FS, Wang H, Picarella DE, Janeway CA, Jr., Flavell RA (2002) Expression of transgene encoded TGF-beta in islets prevents autoimmune diabetes in NOD mice by a local mechanism. *J Autoimmun* **19**: 9-22

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

Gu Z, Nomura M, Simpson BB, Lei H, Feijen A, van den Eijnden-van Raaij J, Donahoe PK, Li E (1998) The type I activin receptor ActRIB is required for egg cylinder organization and gastrulation in the mouse. *Genes Dev* **12**: 844-857

Guimaraes M, Rodrigues P, Pereira SS, Nora M, Goncalves G, Albrechtsen NW, Hartmann B, Holst JJ, Monteiro MP (2015) GLP1 and glucagon co-secreting pancreatic neuroendocrine tumor presenting as hypoglycemia after gastric bypass. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep* **2015**: 150049

Guo S, Dai C, Guo M, Taylor B, Harmon JS, Sander M, Robertson RP, Powers AC, Stein R (2013) Inactivation of specific beta cell transcription factors in type 2 diabetes. *J Clin Invest* **123**: 3305-3316

Guz Y, Nasir I, Teitelman G (2001) Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* **142**: 4956-4968

Halfdanarson TR, Bamlet WR, McWilliams RR, Hobday TJ, Burch PA, Rabe KG, Petersen GM (2014) Risk factors for pancreatic neuroendocrine tumors: a clinic-based case-control study. *Pancreas* **43**: 1219-1222

Hamze Z, Vercherat C, Bernigaud-Lacheretz A, Bazzi W, Bonnavion R, Lu J, Calender A, Pouponnot C, Bertolino P, Roche C, Stein R, Scoazec JY, Zhang CX, Cordier-Bussat M (2013) Altered MENIN expression disrupts the MAFA differentiation pathway in insulinoma. *Endocr Relat Cancer* **20**: 833-848

Hanahan D (1985) Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* **315**: 115-122

Hanley SC, Austin E, Assouline-Thomas B, Kapeluto J, Blaichman J, Moosavi M, Petropavlovskaja M, Rosenberg L (2010) β -Cell mass dynamics and islet cell plasticity in human type 2 diabetes. *Endocrinology* **151**: 1462-1472

Harmon EB, Apelqvist AA, Smart NG, Gu X, Osborne DH, Kim SK (2004) GDF11 modulates NGN3+ islet progenitor cell number and promotes beta-cell differentiation in pancreas development. *Development* **131**: 6163-6174

Haugvik SP, Hedenstrom P, Korsath E, Valente R, Hayes A, Siuka D, Maisonneuve P, Gladhaug IP, Lindkvist B, Capurso G (2015) Diabetes, Smoking, Alcohol Use, and Family History of Cancer as Risk Factors for Pancreatic Neuroendocrine Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroendocrinology*

Haumaitre C, Lenoir O, Scharfmann R (2008) Histone deacetylase inhibitors modify pancreatic cell fate determination and amplify endocrine progenitors. *Mol Cell Biol* **28**: 6373-6383

Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, Bettgowda C, Rodriguez FJ, Eberhart CG, Hebbar S, Offerhaus GJ, McLendon R, Rasheed BA, He Y, Yan H, Bigner DD, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Hruban RH, Maitra A, Papadopoulos N, Meeker AK (2011) Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* **333**: 425

Hebrok M, Kim SK, Melton DA (1998) Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* **12**: 1705-1713

Hebrok M, Kim SK, St Jacques B, McMahan AP, Melton DA (2000) Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development* **127**: 4905-4913

Heit JJ, Karnik SK, Kim SK (2006) Intrinsic regulators of pancreatic beta-cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 311-338

Heller RS, Stoffers DA, Bock T, Svenstrup K, Jensen J, Horn T, Miller CP, Habener JF, Madsen OD, Serup P (2001) Improved glucose tolerance and acinar dysmorphogenesis by targeted expression of transcription factor PDX-1 to the exocrine pancreas. *Diabetes* **50**: 1553-1561

Hendy GN, Kaji H, Sowa H, Lebrun JJ, Canaff L (2005) Menin and TGF-beta superfamily member signaling via the Smad pathway in pituitary, parathyroid and osteoblast. *Horm Metab Res* **37**: 375-379

Henseleit KD, Nelson SB, Kuhlbrodt K, Hennings JC, Ericson J, Sander M (2005) NKX6 transcription factor activity is required for alpha- and beta-cell development in the pancreas. *Development* **132**: 3139-3149

Hoggard N, Cruickshank M, Moar KM, Barrett P, Bashir S, Miller JD (2009) Inhibin betaB expression in murine adipose tissue and its regulation by leptin, insulin and dexamethasone. *J Mol Endocrinol* **43**: 171-177

Holland AM, Hale MA, Kagami H, Hammer RE, MacDonald RJ (2002) Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12236-12241

Hu He KH, Lorenzo PI, Brun T, Jimenez Moreno CM, Aeberhard D, Vallejo Ortega J, Cornu M, Thorel F, Gjinovci A, Thorens B, Herrera PL, Meda P, Wollheim CB, Gauthier BR (2011) In vivo conditional Pax4 overexpression in mature islet beta-cells prevents stress-induced hyperglycemia in mice. *Diabetes* **60**: 1705-1715

Hunter KE, Quick ML, Sadanandam A, Hanahan D, Joyce JA (2013) Identification and characterization of poorly differentiated invasive carcinomas in a mouse model of pancreatic neuroendocrine tumorigenesis. *PLoS One* **8**: e64472

Inoue Y, Hendy GN, Canaff L, Seino S, Kaji H (2011) Menin interacts with beta-catenin in osteoblast differentiation. *Horm Metab Res* **43**: 183-187

Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA, Wozney JM (1996) Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* **13**: 291-300

Jensen RT, Berna MJ, Bingham DB, Norton JA (2008) Inherited pancreatic endocrine tumor syndromes: advances in molecular pathogenesis, diagnosis, management, and controversies. *Cancer* **113**: 1807-1843

Jetton TL, Everill B, Lausier J, Roskens V, Habibovic A, LaRock K, Gokin A, Peshavaria M, Leahy JL (2008) Enhanced beta-cell mass without increased proliferation following chronic mild glucose infusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**: E679-687

Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolfgang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz LA, Jr., Vogelstein B, Kinzler KW, Hruban RH, Papadopoulos N (2011) DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* **331**: 1199-1203

Johansson KA, Dursun U, Jordan N, Gu G, Beermann F, Gradwohl G, Grapin-Botton A (2007) Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types. *Dev Cell* **12**: 457-465

Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**: 606-609

Jopling C, Boue S, Izpisua Belmonte JC (2011) Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 79-89

Jopling C, Sleep E, Raya M, Marti M, Raya A, Izpisua Belmonte JC (2010) Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* **464**: 606-609

Jornvall H, Reissmann E, Andersson O, Mehrkash M, Ibanez CF (2004) ALK7, a receptor for nodal, is dispensable for embryogenesis and left-right patterning in the mouse. *Mol Cell Biol* **24**: 9383-9389

Josso N, Clemente N (2003) Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. *Trends Endocrinol Metab* **14**: 91-97

Kaji H (2012) Menin and bone metabolism. *J Bone Miner Metab* **30**: 381-387

Kalis M, Bolmeson C, Esguerra JL, Gupta S, Edlund A, Tormo-Badia N, Speidel D, Holmberg D, Mayans S, Khoo NK, Wendt A, Eliasson L, Cilio CM (2011) Beta-cell specific deletion of Dicer1 leads to defective insulin secretion and diabetes mellitus. *PLoS One* **6**: e29166

Kanazawa I, Canaff L, Abi Rafeh J, Angrula A, Li J, Riddle RC, Boraschi-Diaz I, Komarova SV, Clemens TL, Murshed M, Hendy GN (2015) Osteoblast menin regulates bone mass in vivo. *J Biol Chem* **290**: 3910-3924

Kanji MS, Martin MG, Bhushan A (2013) Dicer1 is required to repress neuronal fate during endocrine cell maturation. *Diabetes* **62**: 1602-1611

Kanno R, Ogihara T, Igarashi Y, Tanaka Y, Smith SB, Kojima I, German MS, Kawamori R, Watada H (2006) Activin A-induced expression of PAX4 in AR42J-B13 cells involves the increase in transactivation of E47/E12. *Biochim Biophys Acta* **1759**: 44-50

Karnik SK, Chen H, McLean GW, Heit JJ, Gu X, Zhang AY, Fontaine M, Yen MH, Kim SK (2007) Menin controls growth of pancreatic beta-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. *Science* **318**: 806-809

Karnik SK, Hughes CM, Gu X, Rozenblatt-Rosen O, McLean GW, Xiong Y, Meyerson M, Kim SK (2005) Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14659-14664

Kaspi H, Pasvolsky R, Hornstein E (2014) Could microRNAs contribute to the maintenance of beta cell identity? *Trends Endocrinol Metab* **25**: 285-292

Kawabata M, Imamura T, Miyazono K (1998) Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* **9**: 49-61

Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV (2002) The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* **32**: 128-134

Kelber JA, Shani G, Booker EC, Vale WW, Gray PC (2008) Cripto is a noncompetitive activin antagonist that forms analogous signaling complexes with activin and nodal. *J Biol Chem* **283**: 4490-4500

Kim SK, Hebrok M, Li E, Oh SP, Schrewe H, Harmon EB, Lee JS, Melton DA (2000) Activin receptor patterning of foregut organogenesis. *Genes Dev* **14**: 1866-1871

Kim SK, Melton DA (1998) Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13036-13041

Kirkbride KC, Townsend TA, Bruinsma MW, Barnett JV, Blobel GC (2008) Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J Biol Chem* **283**: 7628-7637

Klein D, Misawa R, Bravo-Egana V, Vargas N, Rosero S, Piroso J, Ichii H, Umland O, Zhijie J, Tsinoremas N, Ricordi C, Inverardi L, Dominguez-Bendala J, Pastori RL (2013) MicroRNA expression in alpha and beta cells of human pancreatic islets. *PLoS One* **8**: e55064

Knopf F, Hammond C, Chekuru A, Kurth T, Hans S, Weber CW, Mahatma G, Fisher S, Brand M, Schulte-Merker S, Weidinger G (2011) Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin. *Dev Cell* **20**: 713-724

Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting J, Tiesman JP, Correa PE, Olson CA, Pecquet AL, Ventura F, Grant RA, et al. (1994) Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* **14**: 5961-5974

Kopinke D, Brailsford M, Shea JE, Leavitt R, Scaife CL, Murtaugh LC (2011) Lineage tracing reveals the dynamic contribution of Hes1+ cells to the developing and adult pancreas. *Development* **138**: 431-441

Kopp JL, Dubois CL, Hao E, Thorel F, Herrera PL, Sander M (2011a) Progenitor cell domains in the developing and adult pancreas. *Cell Cycle* **10**: 1921-1927

Kopp JL, Dubois CL, Schaffer AE, Hao E, Shih HP, Seymour PA, Ma J, Sander M (2011b) Sox9+ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas. *Development* **138**: 653-665

Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, Adli M, Kasif S, Ptaszek LM, Cowan CA, Lander ES, Koseki H, Bernstein BE (2008) Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet* **4**: e1000242

Kulke MH, Anthony LB, Bushnell DL, de Herder WW, Goldsmith SJ, Klimstra DS, Marx SJ, Pasiaka JL, Pommier RF, Yao JC, Jensen RT (2010) NANETS treatment guidelines: well-differentiated neuroendocrine tumors of the stomach and pancreas. *Pancreas* **39**: 735-752

- Kunisada Y, Tsubooka-Yamazoe N, Shoji M, Hosoya M (2012) Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* **8**: 274-284
- La Rosa S, Uccella S, Marchet S, Capella C, Lloyd RV (2004) Localization of inhibins and activins in normal endocrine cells and endocrine tumors of the gut and pancreas: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Histochem Cytochem* **52**: 217-225
- Landsman L, Parent A, Hebrok M (2011) Elevated Hedgehog/Gli signaling causes beta-cell dedifferentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 17010-17015
- Lardon J, Rooman I, Bouwens L (2002) Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem Cell Biol* **117**: 535-540
- Larsson LI, Grimelius L, Hakanson R, Rehfeld JF, Stadil F, Holst J, Angervall L, Sundler F (1975) Mixed endocrine pancreatic tumors producing several peptide hormones. *Am J Pathol* **79**: 271-284
- Lavery K, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaili MH (2008) BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* **283**: 20948-20958
- Lee E, Ryu GR, Moon SD, Ko SH, Ahn YB, Song KH (2014) Reprogramming of enteroendocrine K cells to pancreatic beta-cells through the combined expression of Nkx6.1 and Neurogenin3, and reaggregation in suspension culture. *Biochem Biophys Res Commun* **443**: 1021-1027
- Lemos MC, Thakker RV (2008) Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat* **29**: 22-32
- Lenoir O, Flosseau K, Ma FX, Blondeau B, Mai A, Bassel-Duby R, Ravassard P, Olson EN, Haumaitre C, Scharfmann R (2011) Specific control of pancreatic endocrine beta- and delta-cell mass by class IIa histone deacetylases HDAC4, HDAC5, and HDAC9. *Diabetes* **60**: 2861-2871
- Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W (2000) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* **404**: 411-414
- Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC, Allis CD (2010) Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 14075-14080

Li F, Su Y, Cheng Y, Jiang X, Peng Y, Li Y, Lu J, Gu Y, Zhang C, Cao Y, Wang W, Ning G (2015) Conditional deletion of Men1 in the pancreatic beta-cell leads to glucagon-expressing tumor development. *Endocrinology* **156**: 48-57

Li Q, Wang X, Wu X, Rui Y, Liu W, Wang J, Liou YC, Ye Z, Lin SC (2007) Daxx cooperates with the Axin/HIPK2/p53 complex to induce cell death. *Cancer Res* **67**: 66-74

Liew CG, Shah NN, Briston SJ, Shepherd RM, Khoo CP, Dunne MJ, Moore HD, Cosgrove KE, Andrews PW (2008) PAX4 enhances beta-cell differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One* **3**: e1783

Lin HM, Lee JH, Yadav H, Kamaraju AK, Liu E, Zhigang D, Vieira A, Kim SJ, Collins H, Matschinsky F, Harlan DM, Roberts AB, Rane SG (2009) Transforming growth factor-beta/Smad3 signaling regulates insulin gene transcription and pancreatic islet beta-cell function. *J Biol Chem* **284**: 12246-12257

Lin W, Watanabe H, Peng S, Francis JM, Kaplan N, Pedomallu CS, Ramachandran A, Agoston A, Bass AJ, Meyerson M (2015) Dynamic epigenetic regulation by menin during pancreatic islet tumor formation. *Mol Cancer Res* **13**: 689-698

Little SC, Mullins MC (2009) Bone morphogenetic protein heterodimers assemble heteromeric type I receptor complexes to pattern the dorsoventral axis. *Nat Cell Biol* **11**: 637-643

Liu SH, Lee LT (2012) Efficient differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Exp Diabetes Res* **2012**: 201295

Lombardi A, Ulianich L, Treglia AS, Nigro C, Parrillo L, Lofrumento DD, Nicolardi G, Garbi C, Beguinot F, Miele C, Di Jeso B (2012) Increased hexosamine biosynthetic pathway flux dedifferentiates INS-1E cells and murine islets by an extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2-mediated signal transmission pathway. *Diabetologia* **55**: 141-153

Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J (1991) Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* **67**: 785-795

Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* **73**: 1435-1444

Lu J, Herrera PL, Carreira C, Bonnavion R, Seigne C, Calender A, Bertolino P, Zhang CX (2010) Alpha cell-specific Men1 ablation triggers the transdifferentiation of glucagon-expressing cells and insulinoma development. *Gastroenterology* **138**: 1954-1965

Lupi R, Del Prato S (2008) Beta-cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences. *Diabetes Metab* **34 Suppl 2**: S56-64

Lynn FC, Skewes-Cox P, Kosaka Y, McManus MT, Harfe BD, German MS (2007) MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* **56**: 2938-2945

Macias-Silva M, Hoodless PA, Tang SJ, Buchwald M, Wrana JL (1998) Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem* **273**: 25628-25636

Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY (2002) Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* **110**: 851-860

Magenheim J, Klein AM, Stanger BZ, Ashery-Padan R, Sosa-Pineda B, Gu G, Dor Y (2011) Ngn3(+) endocrine progenitor cells control the fate and morphogenesis of pancreatic ductal epithelium. *Dev Biol* **359**: 26-36

Maldonado TS, Kadison AS, Crisera CA, Grau JB, Alkasab SL, Longaker MT, Gittes GK (2000) Ontogeny of activin B and follistatin in developing embryonic mouse pancreas: implications for lineage selection. *J Gastrointest Surg* **4**: 269-275

Mamin A, Philippe J (2007) Activin A decreases glucagon and arx gene expression in alpha-cell lines. *Mol Endocrinol* **21**: 259-273

Margueron R, Reinberg D (2010) Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet* **11**: 285-296

Massague J (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 169-178

Massague J (2012) TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 616-630

Massague J, Seoane J, Wotton D (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**: 2783-2810

Mastracci TL, Sussel L (2012) The endocrine pancreas: insights into development, differentiation, and diabetes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1**: 609-628

Mathews LS, Vale WW (1991) Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* **65**: 973-982

Mathews LS, Vale WW, Kintner CR (1992) Cloning of a second type of activin receptor and functional characterization in *Xenopus* embryos. *Science* **255**: 1702-1705

Matkar S, Thiel A, Hua X (2013) Menin: a scaffold protein that controls gene expression and cell signaling. *Trends Biochem Sci* **38**: 394-402

Matsuoka TA, Kaneto H, Miyatsuka T, Yamamoto T, Yamamoto K, Kato K, Shimomura I, Stein R, Matsuhisa M (2010) Regulation of MafA expression in pancreatic beta-cells in db/db mice with diabetes. *Diabetes* **59**: 1709-1720

Matsuoka TA, Kaneto H, Stein R, Miyatsuka T, Kawamori D, Henderson E, Kojima I, Matsuhisa M, Hori M, Yamasaki Y (2007) MafA regulates expression of genes important to islet beta-cell function. *Mol Endocrinol* **21**: 2764-2774

Matzuk MM, Finegold MJ, Mather JP, Krummen L, Lu H, Bradley A (1994) Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8817-8821

Matzuk MM, Kumar TR, Bradley A (1995) Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* **374**: 356-360

Mazerbourg S, Hsueh AJ (2006) Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Hum Reprod Update* **12**: 373-383

Melkman-Zehavi T, Oren R, Kredon-Russo S, Shapira T, Mandelbaum AD, Rivkin N, Nir T, Lennox KA, Behlke MA, Dor Y, Hornstein E (2011) miRNAs control insulin content in pancreatic beta-cells via downregulation of transcriptional repressors. *Embo J* **30**: 835-845

Merritt JL, 2nd, Davis DM, Pittelkow MR, Babovic-Vuksanovic D (2006) Extensive acrochordons and pancreatic islet-cell tumors in tuberous sclerosis associated with TSC2 mutations. *Am J Med Genet A* **140**: 1669-1672

Metz DC, Jensen RT (2008) Gastrointestinal neuroendocrine tumors: pancreatic endocrine tumors. *Gastroenterology* **135**: 1469-1492

Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**: 553-560

- Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A, Jessen KR (2008) Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J Peripher Nerv Syst* **13**: 122-135
- Missiaglia E, Dalai I, Barbi S, Beghelli S, Falconi M, della Peruta M, Piemonti L, Capurso G, Di Florio A, delle Fave G, Pederzoli P, Croce CM, Scarpa A (2010) Pancreatic endocrine tumors: expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway. *J Clin Oncol* **28**: 245-255
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K (2002) Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* **7**: 1191-1204
- Miyazono K, Miyazawa K (2002) Id: a target of BMP signaling. *Sci STKE* **2002**: pe40
- Moritani M, Yamasaki S, Kagami M, Suzuki T, Yamaoka T, Sano T, Hata J, Itakura M (2005) Hypoplasia of endocrine and exocrine pancreas in homozygous transgenic TGF-beta1. *Mol Cell Endocrinol* **229**: 175-184
- Mukherjee A, Sidis Y, Mahan A, Raheer MJ, Xia Y, Rosen ED, Bloch KD, Thomas MK, Schneyer AL (2007) FSTL3 deletion reveals roles for TGF-beta family ligands in glucose and fat homeostasis in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1348-1353
- Mullen AC, Orlando DA, Newman JJ, Loven J, Kumar RM, Bilodeau S, Reddy J, Guenther MG, DeKoter RP, Young RA (2011) Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF-beta signaling. *Cell* **147**: 565-576
- Murtaugh LC, Stanger BZ, Kwan KM, Melton DA (2003) Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14920-14925
- Naito J, Kaji H, Sowa H, Hendy GN, Sugimoto T, Chihara K (2005) Menin suppresses osteoblast differentiation by antagonizing the AP-1 factor, JunD. *J Biol Chem* **280**: 4785-4791
- Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H (1990) Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* **247**: 836-838
- Nakanishi M, Hamazaki TS, Komazaki S, Okochi H, Asashima M (2007) Pancreatic tissue formation from murine embryonic stem cells in vitro. *Differentiation* **75**: 1-11
- Nam HS, Benezra R (2009) High levels of Id1 expression define B1 type adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* **5**: 515-526
- Nieto MA (2013) Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* **342**: 1234850

Ninov N, Hesselson D, Gut P, Zhou A, Fidelin K, Stainier DY (2013) Metabolic regulation of cellular plasticity in the pancreas. *Curr Biol* **23**: 1242-1250

Nishi T, Kawabata Y, Hari Y, Imaoka H, Ishikawa N, Yano S, Maruyama R, Tajima Y (2012) A case of pancreatic neuroendocrine tumor in a patient with neurofibromatosis-1. *World J Surg Oncol* **10**: 153

Nomura M, Zhu HL, Wang L, Morinaga H, Takayanagi R, Teramoto N (2014) SMAD2 disruption in mouse pancreatic beta cells leads to islet hyperplasia and impaired insulin secretion due to the attenuation of ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Diabetologia* **57**: 157-166

Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT (2000) Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. *Cell* **103**: 1099-1109

Oetjen E, Blume R, Cierny I, Schlag C, Kutschenko A, Kratzner R, Stein R, Knepel W (2007) Inhibition of MafA transcriptional activity and human insulin gene transcription by interleukin-1beta and mitogen-activated protein kinase kinase kinase in pancreatic islet beta cells. *Diabetologia* **50**: 1678-1687

Pagliuca FW, Millman JR, Gurtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, Peterson QP, Greiner D, Melton DA (2014) Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro. *Cell* **159**: 428-439

Pan FC, Bankaitis ED, Boyer D, Xu X, Van de Castele M, Magnuson MA, Heimberg H, Wright CV (2013) Spatiotemporal patterns of multipotentiality in Ptf1a-expressing cells during pancreas organogenesis and injury-induced facultative restoration. *Development* **140**: 751-764

Pan G, Tian S, Nie J, Yang C, Ruotti V, Wei H, Jonsdottir GA, Stewart R, Thomson JA (2007) Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **1**: 299-312

Pannett AA, Thakker RV (2001) Somatic mutations in MEN type 1 tumors, consistent with the Knudson "two-hit" hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 4371-4374

Paris M, Bernard-Kargar C, Berthault MF, Bouwens L, Ktorza A (2003) Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats. *Endocrinology* **144**: 2717-2727

Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL (1992) Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* **130**: 1459-1466

- Patapoutian A, Wold BJ, Wagner RA (1995) Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle. *Science* **270**: 1818-1821
- Perk J, Iavarone A, Benezra R (2005) Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **5**: 603-614
- Phillips DJ, Woodruff TK (2004) Inhibin: actions and signalling. *Growth Factors* **22**: 13-18
- Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T, De Robertis EM (1999) The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* **397**: 707-710
- Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM (1996) Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* **86**: 589-598
- Pictet RL, Clark WR, Williams RH, Rutter WJ (1972) An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol* **29**: 436-467
- Poitout V, Robertson RP (2008) Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* **29**: 351-366
- Prentki M, Nolan CJ (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* **116**: 1802-1812
- Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G (2009) Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 192-206
- Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, Barbacid M (1999) Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet* **22**: 44-52
- Rane SG, Lee JH, Lin HM (2006) Transforming growth factor-beta pathway: role in pancreas development and pancreatic disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**: 107-119
- Rankin MM, Kushner JA (2009) Adaptive beta-cell proliferation is severely restricted with advanced age. *Diabetes* **58**: 1365-1372
- Rankin MM, Wilbur CJ, Rak K, Shields EJ, Granger A, Kushner JA (2013) beta-Cells are not generated in pancreatic duct ligation-induced injury in adult mice. *Diabetes* **62**: 1634-1645

Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ, Attisano L (2003) Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol* **23**: 7230-7242

Rezania A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, O'Dwyer S, Quiskamp N, Mojibian M, Albrecht T, Yang YH, Johnson JD, Kieffer TJ (2014) Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **32**: 1121-1133

Rider CC, Mulloy B (2010) Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem J* **429**: 1-12

Rieck S, Kaestner KH (2010) Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. *Trends Endocrinol Metab* **21**: 151-158

Rindi G, Villanacci V, Ubiali A, Scarpa A (2001) Endocrine tumors of the digestive tract and pancreas: histogenesis, diagnosis and molecular basis. *Expert Rev Mol Diagn* **1**: 323-333

Ripoche D, Gout J, Pommier RM, Jaafar R, Zhang CX, Bartholin L, Bertolino P (2013) Generation of a conditional mouse model to target *Acvr1b* disruption in adult tissues. *Genesis* **51**: 120-127

Robertson RP (2004) Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* **279**: 42351-42354

Ross S, Cheung E, Petrakis TG, Howell M, Kraus WL, Hill CS (2006) Smads orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate transcription. *Embo J* **25**: 4490-4502

Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS (2001) Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* **15**: 1998-2009

Roudaia L, Speck NA (2008) A MENage a Trois in leukemia. *Cancer Cell* **14**: 3-5

Sauvageau M, Sauvageau G (2010) Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell* **7**: 299-313

Sayo Y, Hosokawa H, Imachi H, Murao K, Sato M, Wong NC, Ishida T, Takahara J (2000) Transforming growth factor beta induction of insulin gene expression is mediated by pancreatic and duodenal homeobox gene-1 in rat insulinoma cells. *Eur J Biochem* **267**: 971-978

Schaffer AE, Freude KK, Nelson SB, Sander M (2010) Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors. *Dev Cell* **18**: 1022-1029

Schaffer AE, Taylor BL, Benthuyzen JR, Liu J, Thorel F, Yuan W, Jiao Y, Kaestner KH, Herrera PL, Magnuson MA, May CL, Sander M (2013) Nkx6.1 controls a gene regulatory network required for establishing and maintaining pancreatic Beta cell identity. *PLoS Genet* **9**: e1003274

Schier AF, Shen MM (2000) Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* **403**: 385-389

Schmierer B, Hill CS (2007) TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 970-982

Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G (2007) Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* **128**: 735-745

Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS (2000) Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* **127**: 3533-3542

Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, Korbitt G, van der Kooy D (2004) Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* **22**: 1115-1124

Selander L, Edlund H (2002) Nestin is expressed in mesenchymal and not epithelial cells of the developing mouse pancreas. *Mech Dev* **113**: 189-192

Sengle G, Charbonneau NL, Ono RN, Sasaki T, Alvarez J, Keene DR, Bachinger HP, Sakai LY (2008a) Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *J Biol Chem* **283**: 13874-13888

Sengle G, Ono RN, Lyons KM, Bachinger HP, Sakai LY (2008b) A new model for growth factor activation: type II receptors compete with the prodomain for BMP-7. *J Mol Biol* **381**: 1025-1039

Seymour PA, Freude KK, Dubois CL, Shih HP, Patel NA, Sander M (2008) A dosage-dependent requirement for Sox9 in pancreatic endocrine cell formation. *Dev Biol* **323**: 19-30

Seymour PA, Freude KK, Tran MN, Mayes EE, Jensen J, Kist R, Scherer G, Sander M (2007) SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1865-1870

Shi Y, Hata A, Lo RS, Massague J, Pavletich NP (1997) A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* **388**: 87-93

Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J, Pavletich NP (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* **94**: 585-594

Shih HP, Wang A, Sander M (2013) Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**: 81-105

Shin D, Shin CH, Tucker J, Ober EA, Rentzsch F, Poss KD, Hammerschmidt M, Mullins MC, Stainier DY (2007) Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish. *Development* **134**: 2041-2050

Shiozaki S, Tajima T, Zhang YQ, Furukawa M, Nakazato Y, Kojima I (1999) Impaired differentiation of endocrine and exocrine cells of the pancreas in transgenic mouse expressing the truncated type II activin receptor. *Biochim Biophys Acta* **1450**: 1-11

Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P (2009) Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**: 343-355

Sii-Felice K, Pouponnot C, Gillet S, Lecoin L, Girault JA, Eyche A, Felder-Schmittbuhl MP (2005) MafA transcription factor is phosphorylated by p38 MAP kinase. *FEBS Lett* **579**: 3547-3554

Smart NG, Apelqvist AA, Gu X, Harmon EB, Topper JN, MacDonald RJ, Kim SK (2006) Conditional expression of Smad7 in pancreatic beta cells disrupts TGF-beta signaling and induces reversible diabetes mellitus. *PLoS Biol* **4**: e39

Smukler SR, Arntfield ME, Razavi R, Bikopoulos G, Karpowicz P, Seaberg R, Dai F, Lee S, Ahrens R, Fraser PE, Wheeler MB, van der Kooy D (2011) The adult mouse and human pancreas contain rare multipotent stem cells that express insulin. *Cell Stem Cell* **8**: 281-293

Smyth GK (2005) *limma: Linear Models for Microarray Data*, New York: Springer.

Solar M, Cardalda C, Houbracken I, Martin M, Maestro MA, De Medts N, Xu X, Grau V, Heimberg H, Bouwens L, Ferrer J (2009) Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Dev Cell* **17**: 849-860

Sorenson RL, Brelje TC (1997) Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* **29**: 301-307

Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P (1997) The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* **386**: 399-402

Sowa H, Kaji H, Hendy GN, Canaff L, Komori T, Sugimoto T, Chihara K (2004) Menin is required for bone morphogenetic protein 2- and transforming growth factor beta-regulated osteoblastic differentiation through interaction with Smads and Runx2. *J Biol Chem* **279**: 40267-40275

Stamler R, Keutmann HT, Sidis Y, Kattamuri C, Schneyer A, Thompson TB (2008) The structure of FSTL3.activin A complex. Differential binding of N-terminal domains influences follistatin-type antagonist specificity. *J Biol Chem* **283**: 32831-32838

Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF (1997) Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* **15**: 106-110

Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM (2011) Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol* **21**: 212-218

Sui L, Geens M, Sermon K, Bouwens L, Mfopou JK (2013) Role of BMP signaling in pancreatic progenitor differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cell Rev* **9**: 569-577

Szabat M, Johnson JD, Piret JM (2010) Reciprocal modulation of adult beta cell maturity by activin A and follistatin. *Diabetologia* **53**: 1680-1689

Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663-676

Talchai C, Xuan S, Kitamura T, DePinho RA, Accili D (2012a) Generation of functional insulin-producing cells in the gut by Foxo1 ablation. *Nat Genet* **44**: 406-412, S401

Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D (2012b) Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell* **150**: 1223-1234

Taylor BL, Liu FF, Sander M (2013) Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. *Cell Rep* **4**: 1262-1275

ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E (2008) Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* **11**: 79-89

ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH, Miyazono K (1993) Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* **8**: 2879-2887

ten Dijke P, Korchynskiy O, Valdimarsdottir G, Goumans MJ (2003) Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol Cell Endocrinol* **211**: 105-113

Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kushner JA (2005) Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* **54**: 2557-2567

Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA (2007) Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell* **12**: 817-826

Thakker RV (2014) Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4). *Mol Cell Endocrinol* **386**: 2-15

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**: 871-890

Thillainadesan G, Chitilian JM, Isovich M, Ablack JN, Mymryk JS, Tini M, Torchia J (2012) TGF-beta-dependent active demethylation and expression of the p15^{ink4b} tumor suppressor are impaired by the ZNF217/CoREST complex. *Mol Cell* **46**: 636-649

Thomas MK, Rastalsky N, Lee JH, Habener JF (2000) Hedgehog signaling regulation of insulin production by pancreatic beta-cells. *Diabetes* **49**: 2039-2047

Thompson TB, Lerch TF, Cook RW, Woodruff TK, Jardetzky TS (2005) The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Dev Cell* **9**: 535-543

Thorel F, Nepote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, Herrera PL (2010) Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* **464**: 1149-1154

Thyssen S, Arany E, Hill DJ (2006) Ontogeny of regeneration of beta-cells in the neonatal rat after treatment with streptozotocin. *Endocrinology* **147**: 2346-2356

Toselli C, Hyslop CM, Hughes M, Natale DR, Santamaria P, Huang CT (2014) Contribution of a non-beta-cell source to beta-cell mass during pregnancy. *PLoS One* **9**: e100398

Tschen SI, Dhawan S, Gurlo T, Bhushan A (2009) Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. *Diabetes* **58**: 1312-1320

Tsonis PA, Madhavan M, Tancous EE, Del Rio-Tsonis K (2004) A newt's eye view of lens regeneration. *Int J Dev Biol* **48**: 975-980

Tsuchida K (2004) Activins, myostatin and related TGF-beta family members as novel therapeutic targets for endocrine, metabolic and immune disorders. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **4**: 157-166

Tulachan SS, Tei E, Hembree M, Crisera C, Prasad K, Koizumi M, Shah S, Guo P, Bottinger E, Gittes GK (2007) TGF-beta isoform signaling regulates secondary transition and mesenchymal-induced endocrine development in the embryonic mouse pancreas. *Dev Biol* **305**: 508-521

Uchida T (2006) [Regulation of cell cycle in pancreatic beta-cell and development of diabetes]. *Seikagaku* **78**: 314-317

Ueda Y (2000) Activin A increases Pax4 gene expression in pancreatic beta cell lines. *FEBS Lett* **480**: 101-105

Ungerleider NA, Bonomi LM, Brown ML, Schneyer AL (2013) Increased activin bioavailability enhances hepatic insulin sensitivity while inducing hepatic steatosis in male mice. *Endocrinology* **154**: 2025-2033

Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**: 893-899

van Arensbergen J, Garcia-Hurtado J, Moran I, Maestro MA, Xu X, Van de Casteele M, Skoudy AL, Palassini M, Heimberg H, Ferrer J (2010) Derepression of Polycomb targets during pancreatic organogenesis allows insulin-producing beta-cells to adopt a neural gene activity program. *Genome Res* **20**: 722-732

Van Assche FA, Aerts L, De Prins F (1978) A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* **85**: 818-820

Van de Casteele M, Leuckx G, Baeyens L, Cai Y, Yuchi Y, Coppens V, De Groef S, Eriksson M, Svensson C, Ahlgren U, Ahnfelt-Ronne J, Madsen OD, Waisman A, Dor Y, Jensen JN, Heimberg H (2013) Neurogenin 3+ cells contribute to beta-cell neogenesis and proliferation in injured adult mouse pancreas. *Cell Death Dis* **4**: e523

Vanderford NL, Cantrell JE, Popa GJ, Ozcan S (2008) Multiple kinases regulate mafA expression in the pancreatic beta cell line MIN6. *Arch Biochem Biophys* **480**: 138-142

Vassalli A, Matzuk MM, Gardner HA, Lee KF, Jaenisch R (1994) Activin/inhibin beta B subunit gene disruption leads to defects in eyelid development and female reproduction. *Genes Dev* **8**: 414-427

- Verbeke CS (2010) Endocrine tumours of the pancreas. *Histopathology* **56**: 669-682
- Voigt P, Tee WW, Reinberg D (2013) A double take on bivalent promoters. *Genes Dev* **27**: 1318-1338
- von Bubnoff A, Cho KW (2001) Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol* **239**: 1-14
- Wabik A, Jones PH (2015) Switching roles: the functional plasticity of adult tissue stem cells. *Embo J*
- Wacker I, Sachs M, Knaup K, Wiesener M, Weiske J, Huber O, Akcetin Z, Behrens J (2009) Key role for activin B in cellular transformation after loss of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Mol Cell Biol* **29**: 1707-1718
- Waddington CH (1957) *The Strategy of the Genes.*, Vol. 20, London.
- Walton KL, Makanji Y, Harrison CA (2012) New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. *Mol Cell Endocrinol* **359**: 2-12
- Wang EH, Ebrahimi SA, Wu AY, Kashefi C, Passaro E, Jr., Sawicki MP (1998) Mutation of the MENIN gene in sporadic pancreatic endocrine tumors. *Cancer Res* **58**: 4417-4420
- Wang S, Yan J, Anderson DA, Xu Y, Kanal MC, Cao Z, Wright CV, Gu G (2010) Neurog3 gene dosage regulates allocation of endocrine and exocrine cell fates in the developing mouse pancreas. *Dev Biol* **339**: 26-37
- Wang Y, Rovira M, Yusuff S, Parsons MJ (2011) Genetic inducible fate mapping in larval zebrafish reveals origins of adult insulin-producing beta-cells. *Development* **138**: 609-617
- Wang Z, York NW, Nichols CG, Remedi MS (2014) Pancreatic beta cell dedifferentiation in diabetes and redifferentiation following insulin therapy. *Cell Metab* **19**: 872-882
- Watabe T, Miyazono K (2009) Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res* **19**: 103-115
- Watanabe R, Yamada Y, Ihara Y, Someya Y, Kubota A, Kagimoto S, Kuroe A, Iwakura T, Shen ZP, Inada A, Adachi T, Ban N, Miyawaki K, Sunaga Y, Tsuda K, Seino Y (1999) The MH1 domains of smad2 and smad3 are involved in the regulation of the ALK7 signals. *Biochem Biophys Res Commun* **254**: 707-712
- Watanabe Y, Onodera A, Kanai U, Ichikawa T, Obata-Ninomiya K, Wada T, Kiuchi M, Iwamura C, Tumes DJ, Shinoda K, Yagi R, Motohashi S, Hirahara K, Nakayama T (2014)

Trithorax complex component Menin controls differentiation and maintenance of T helper 17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 12829-12834

Weng NP, Araki Y, Subedi K (2012) The molecular basis of the memory T cell response: differential gene expression and its epigenetic regulation. *Nat Rev Immunol* **12**: 306-315

Wiater E, Lewis KA, Donaldson C, Vaughan J, Bilezikjian L, Vale W (2009) Endogenous betaglycan is essential for high-potency inhibin antagonism in gonadotropes. *Mol Endocrinol* **23**: 1033-1042

Woodhoo A, Alonso MB, Droggiti A, Turmaine M, D'Antonio M, Parkinson DB, Wilton DK, Al-Shawi R, Simons P, Shen J, Guillemot F, Radtke F, Meijer D, Feltri ML, Wrabetz L, Mirsky R, Jessen KR (2009) Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat Neurosci* **12**: 839-847

Wrana JL, Carcamo J, Attisano L, Cheifetz S, Zentella A, Lopez-Casillas F, Massague J (1992) The type II TGF-beta receptor signals diverse responses in cooperation with the type I receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**: 81-86

Wu H, Mezghenna K, Marmol P, Guo T, Moliner A, Yang SN, Berggren PO, Ibanez CF (2014) Differential regulation of mouse pancreatic islet insulin secretion and Smad proteins by activin ligands. *Diabetologia* **57**: 148-156

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 (2011) A poised chromatin platform for TGF-beta access to master regulators. *Cell* **147**: 1511-1524

Xiao X, Chen Z, Shiota C, Prasad K, Guo P, El-Gohary Y, Paredes J, Welsh C, Wiersch J, Gittes GK (2013a) No evidence for beta cell neogenesis in murine adult pancreas. *J Clin Invest* **123**: 2207-2217

Xiao X, Guo P, Shiota C, Prasad K, El-Gohary Y, Wiersch J, Gaffar I, Gittes GK (2013b) Neurogenin3 activation is not sufficient to direct duct-to-beta cell transdifferentiation in the adult pancreas. *J Biol Chem* **288**: 25297-25308

Xu B, Zeng DQ, Wu Y, Zheng R, Gu L, Lin X, Hua X, Jin GH (2011a) Tumor suppressor menin represses paired box gene 2 expression via Wilms tumor suppressor protein-polycomb group complex. *J Biol Chem* **286**: 13937-13944

Xu X, Browning VL, Odorico JS (2011b) Activin, BMP and FGF pathways cooperate to promote endoderm and pancreatic lineage cell differentiation from human embryonic stem cells. *Mech Dev* **128**: 412-427

Xu X, D'Hoker J, Stange G, Bonne S, De Leu N, Xiao X, Van de Casteele M, Mellitzer G, Ling Z, Pipeleers D, Bouwens L, Scharfmann R, Gradwohl G, Heimberg H (2008) Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* **132**: 197-207

Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG, Gold LI, Korc M (1993) Synthesis and expression of transforming growth factor beta-1, beta-2, and beta-3 in the endocrine and exocrine pancreas. *Diabetes* **42**: 746-756

Yamaoka T, Idehara C, Yano M, Matsushita T, Yamada T, Ii S, Moritani M, Hata J, Sugino H, Noji S, Itakura M (1998) Hypoplasia of pancreatic islets in transgenic mice expressing activin receptor mutants. *J Clin Invest* **102**: 294-301

Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, Kirkpatrick CL, Malmgren S, Jing X, Renstrom E, Wollheim CB, Nitert MD, Ling C (2012) Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol* **26**: 1203-1212

Yang YH, Szabat M, Bragagnini C, Kott K, Helgason CD, Hoffman BG, Johnson JD (2011a) Paracrine signalling loops in adult human and mouse pancreatic islets: netrins modulate beta cell apoptosis signalling via dependence receptors. *Diabetologia* **54**: 828-842

Yang YP, Thorel F, Boyer DF, Herrera PL, Wright CV (2011b) Context-specific alpha- to beta-cell reprogramming by forced Pdx1 expression. *Genes Dev* **25**: 1680-1685

Yao JC, Phan AT, Chang DZ, Wolff RA, Hess K, Gupta S, Jacobs C, Mares JE, Landgraf AN, Rashid A, Meric-Bernstam F (2008) Efficacy of RAD001 (everolimus) and octreotide LAR in advanced low- to intermediate-grade neuroendocrine tumors: results of a phase II study. *J Clin Oncol* **26**: 4311-4318

Yasuda H, Inoue K, Shibata H, Takeuchi T, Eto Y, Hasegawa Y, Sekine N, Totsuka Y, Mine T, Ogata E, et al. (1993) Existence of activin-A in A- and D-cells of rat pancreatic islet. *Endocrinology* **133**: 624-630

Yasuda M, Yamamoto M, Ochiai H, Eguchi Y, Arishima K (2007) Effects of growth factors on development of fetal islet B-cells in vitro. *J Vet Med Sci* **69**: 807-811

Ye L, Robertson MA, Hesselton D, Stainier DY, Anderson RM (2015) glucagon is essential for alpha cell transdifferentiation and beta cell neogenesis. *Development* **142**: 1407-1417

Yew KH, Hembree M, Prasad K, Preuett B, McFall C, Benjes C, Crowley A, Sharp S, Tulachan S, Mehta S, Tei E, Gittes G (2005) Cross-talk between bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling is essential for exendin-4-induced insulin-positive differentiation of AR42J cells. *J Biol Chem* **280**: 32209-32217

Yokouchi Y, Vogan KJ, Pearse RV, 2nd, Tabin CJ (1999) Antagonistic signaling by Caronte, a novel Cerberus-related gene, establishes left-right asymmetric gene expression. *Cell* **98**: 573-583

Yokoyama A, Cleary ML (2008) Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. *Cancer Cell* **14**: 36-46

Yu R, Dhall D, Nissen NN, Zhou C, Ren SG (2011) Pancreatic neuroendocrine tumors in glucagon receptor-deficient mice. *PLoS One* **6**: e23397

Zaret KS, Watts J, Xu J, Wandzioch E, Smale ST, Sekiya T (2008) Pioneer factors, genetic competence, and inductive signaling: programming liver and pancreas progenitors from the endoderm. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **73**: 119-126

Zhang H, Zhang J, Pope CF, Crawford LA, Vasavada RC, Jagasia SM, Gannon M (2010) Gestational diabetes mellitus resulting from impaired beta-cell compensation in the absence of FoxM1, a novel downstream effector of placental lactogen. *Diabetes* **59**: 143-152

Zhang J, Francois R, Iyer R, Seshadri M, Zajac-Kaye M, Hochwald SN (2013) Current understanding of the molecular biology of pancreatic neuroendocrine tumors. *J Natl Cancer Inst* **105**: 1005-1017

Zhang L, Deng M, Parthasarathy R, Wang L, Mongan M, Molkenstein JD, Zheng Y, Xia Y (2005) MEKK1 transduces activin signals in keratinocytes to induce actin stress fiber formation and migration. *Mol Cell Biol* **25**: 60-65

Zhang M, Liu NY, Wang XE, Chen YH, Li QL, Lu KR, Sun L, Jia Q, Zhang L (2011) Activin B promotes epithelial wound healing in vivo through RhoA-JNK signaling pathway. *PLoS One* **6**: e25143

Zhang M, Sun L, Wang X, Chen S, Kong Y, Liu N, Chen Y, Jia Q, Zhang L (2014) Activin B promotes BMSC-mediated cutaneous wound healing by regulating cell migration via the JNK-ERK signaling pathway. *Cell Transplant* **23**: 1061-1073

Zhang YE (2009) Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* **19**: 128-139

Zhang YQ, Cleary MM, Si Y, Liu G, Eto Y, Kritzik M, Dabernat S, Kayali AG, Sarvetnick N (2004) Inhibition of activin signaling induces pancreatic epithelial cell expansion and diminishes terminal differentiation of pancreatic beta-cells. *Diabetes* **53**: 2024-2033

Zhao X, Mohan R, Ozcan S, Tang X (2012) MicroRNA-30d induces insulin transcription factor MafA and insulin production by targeting mitogen-activated protein 4 kinase 4 (MAP4K4) in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **287**: 31155-31164

Zhao XD, Han X, Chew JL, Liu J, Chiu KP, Choo A, Orlov YL, Sung WK, Shahab A, Kuznetsov VA, Bourque G, Oh S, Ruan Y, Ng HH, Wei CL (2007) Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **1**: 286-298

Zhou CF, Ji J, Yuan F, Shi M, Zhang J, Liu BY, Zhu ZG (2011) mTOR activation in well differentiated pancreatic neuroendocrine tumors: a retrospective study on 34 cases. *Hepatogastroenterology* **58**: 2140-2143

Zhou Q, Law AC, Rajagopal J, Anderson WJ, Gray PA, Melton DA (2007) A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell* **13**: 103-114

Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* **86**: 599-606

Ziv O, Glaser B, Dor Y (2013) The plastic pancreas. *Dev Cell* **26**: 3-7

Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF (2001) Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* **50**: 521-533

**AUTRES
PUBLICATIONS**

LISTE DES PUBLICATIONS

Ripoche Doriane, Gout Johann, Pommier Roxane M., Jaafar Rami, Zhang Chang X., Bartholin Laurent and Bertolino Philippe (2013). **Generation of a conditional mouse model to target Acvr1b disruption in adult tissues.** *Genesis* 51: 120-127.

Patry Maeva, Teinturier Romain, Zetu Cornelia, Ripoche Doriane, Bertolino Philippe and Hennino Ana (2015). **β ig-h3 represses T cell activation in type 1 diabetes.** *Diabetes (En révision)*.

Bonnavion Rémy, Teinturier Romain, Jaafar Rami, Ripoche Doriane, Leteurtre Emmanuelle, Chen Yuan-Jia, Rehfeld Jens F., Lepinasse Florian, Hervieu Valérie, Pattou François, Vantighem Marie-Christine, Scoazec Jean-Yves, Bertolino Philippe and Zhang Chang Xian (2015). **Islet cells serve as cells of origin of pancreatic gastrin-expressing tumours.** *Molecular and Cellular Biology (En révision)*.

Gout Johann, Pommier Roxane M., Vincent David F., Ripoche Doriane, Goddard-Léon Sophie, Colombe Amélie, Treilleux Isabelle, Valcourt Ulrich, Tomasini Richard, Dufresne Marlène et al. (2013). **The conditional expression of KRAS G12D in mouse pancreas induces disorganization of endocrine islets prior the onset of ductal pre-cancerous lesions.** *Pancreatology* 13, 191–195.

Vincent David F., Gout Johann, Chuvin Nicolas, Arfi Vanessa, Pommier Roxane M., Bertolino, Philippe, Jonckheere Nicolas, Ripoche Doriane, Kaniewski Bastien, Martel Sylvie, et al. (2012). **Tif γ Suppresses Murine Pancreatic Tumoral Transformation by an Smad4-Independent Pathway.** *Am. J. Pathol.* 180, 2214–2221.

TECHNOLOGY REPORT

Generation of a Conditional Mouse Model to Target *Acvr1b* Disruption in Adult Tissues

Doriane Ripoche,^{1,2,3} Johann Gout,^{1,2,3} Roxane M. Pommier,^{1,2,3} Rami Jaafar,^{1,2,3}
Chang X. Zhang,^{1,2,3} Laurent Bartholin,^{1,2,3} and Philippe Bertolino^{1,2,3*}

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

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

³Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France

Received 13 September 2012; Revised 11 October 2012; Accepted 13 October 2012

Summary: Alk4 is a type I receptor that belongs to the transforming growth factor-beta (TGF- β) family. It takes part in the signaling of TGF- β ligands such as Activins, Gdfs, and Nodal that had been demonstrated to participate in numerous mechanisms ranging from early embryonic development to adult-tissue homeostasis. Evidences indicate that Alk4 is a key regulator of many embryonic processes, but little is known about its signaling in adult tissues and in pathological conditions where Alk4 mutations had been reported. Conventional deletion of Alk4 gene (*Acvr1b*) results in early embryonic lethality prior gastrulation, which has precluded study of Alk4 functions in postnatal and adult mice. To circumvent this problem, we have generated a conditional *Acvr1b* floxed-allele by flanking the fifth and sixth exons of the *Acvr1b* gene with loxP sites. Cre-mediated deletion of the floxed allele generates a deleted allele, which behaves as an *Acvr1b* null allele leading to embryonic lethality in homozygous mutant animals. A tamoxifen-inducible approach to target disruption of *Acvr1b* specifically in adult tissues was used and proved to be efficient for studying Alk4 functions in various organs. We report, therefore, a novel conditional model allowing investigation of biological role played by Alk4 in a variety of tissue-specific contexts. *genesis* 00:1–8, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: Alk4; tamoxifen; Cre-LoxP; conditional null allele; liver

Activins are homo- or heterodimers of Inhibin β A and β B subunits that belong to the transforming growth factor-beta (TGF- β) superfamily of ligands. Originally associated with the reproduction axis and the regula-

tion and secretion of follicle-stimulating hormones (FSHs) (Ling *et al.*, 1986), activins signaling has recently emerged in the homeostasis of numerous adult tissues as well as in pathological conditions such as wound healing, fibrosis, cachexia, inflammation, and cancer (Sulyok *et al.*, 2004; Xia and Schneyer, 2009; Zhou *et al.*, 2010). Activin ligands signal through hetero-tetrameric complexes of specific type I and type II transmembrane serine/threonine kinase receptors. Whereas ActRIIA and ActRIIB, the known Activin-type II receptors are well-studied and have benefit from the use of appropriate mouse models (Lee *et al.*, 2006; Matzuk *et al.*, 1995; Oh and Li, 1997; Song *et al.*, 1999), the functions and roles of the Alk4 and Alk7 type I Activin receptors have drawn so far less interest (Bertolino *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 1998; Jörnvall *et al.*, 2004).

Various functions, ranging from mesoderm induction, primitive streak formation, axis and left-right determination in vertebrate development, have been proposed for Alk4 and its cognate ligands (Armes and Smith, 1997; Chen *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 1997). To that extend, disruption of Alk4 by targeting *Acvr1b* in mouse was

Doriane Ripoche and Johann Gout contributed equally to this work.

* Correspondence to: Philippe Bertolino, Lyon Cancer Research Center (CRCL), Inserm U1052- CNRS 5286, Team 4, 28 Rue Laennec, Lyon 69008, France. E-mail: philippe.bertolino@inserm.fr

Contract grant sponsor: The Ligue Départementale CD42 de Lutte contre le Cancer and Lyon I University.

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/dvg.22352

shown to be lethal during embryonic development (E9.5) due to an egg cylinder development-arrest before embryos reach gastrulation (Gu *et al.*, 1998). Interestingly, and despite the accumulation of evidence indicating that Alk4 is a key regulator of many embryonic processes, very little is known about the spatiotemporal aspects of Alk4 signaling in adult tissues. This observation underscores the importance of a better understanding of Alk4 functions in tissues like liver, kidneys, pancreas, skin, brain, lung, and muscles where Alk4 expression had been reported (Roberts and Barth, 1994; Ten Dijke *et al.*, 1993). Moreover, Alk4 is capable of binding and signaling ligands that are not limited to Activin members but further include Nodal, Gdf-1, Gdf-3, Gdf-8, and Gdf-11 (Andersson *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2004; Kemaladewi *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2002; Yeo and Whitman, 2001). The importance of ligands such as Gdf-8 in muscle, Gdf-3 in adipose tissues and Gdf-1/Gdf-11 in brain reinforces the need to re-evaluate the importance of the functions modulated by Alk4 in those tissues. Such need is further emphasized by both the existence of Alk4 polymorphisms associated with muscle strength (Windelinckx *et al.*, 2011) and the identification of Alk4 mutations in patients with pituitary adenomas (Danila *et al.*, 2002) and pancreatic ductal adeno-carcinomas (PDAC) (Su *et al.*, 2001). Unfortunately, the understanding of Alk4 functions has so far been precluded by the lack of adapted mouse model. Recently, Qui *et al.* (2011) reported a novel conditional allele for *Acrv1b* based on the disruption of the entire coding sequence from the peptide signal sequence of Alk4. Use of these animals in combination with a Keratin14-Cre driver line led mutant mice to develop a severe hair loss phenotype. This work emphasizes an important role of Alk4 in hair follicle development and cycling. It represents a major advance for better understanding Alk4 adult functions, which was previously hampered by the early embryonic lethality observed in mice lacking this receptor. Here, we report another *Acrv1b* animal model with restricted spatiotemporal receptor deficiencies that will help to further address the important question of Alk4 function *in vivo*.

The *Acrv1b* gene comprises nine exons spanning 39.6 kb on mouse chromosome 15. We based our conditional targeting approach on a CreLoxP-mediated excision of the fifth and sixth *Acrv1b* exons as previous targeting of exon 5 was shown to be sufficient to inactivate Alk4 and cause embryonic lethality (Gu *et al.*, 1998). We decided to include exon 6 in our LoXP excision-strategy to further disrupt the reading of the remaining sequences due to the codon frame-shift that exists between exon 4 and exon 7 (Fig. 1a). Four ES clones with correct homologous recombination were obtained following targeting of the *Acrv1b* locus. These clones carrying the targeted (Tg) allele were screened on both arms by long-range PCR com-

bined with *EcoRV* or *BamHI* digestion (Fig. 1a and data not shown). Two ES clones were used to get chimeras that were subsequently checked by PCR for efficient germline transmission. Surprisingly, we found that the sole insertion of the Frt-*PgkNeo*-Frt-LoXP cassette in intron 4 did not result in a disrupted allele (data not shown). Taking benefit of our strategy allowing the removal of the *PgkNeo* cassette using a FLP recombinase, we use the *ACT-FLPe* deleter mice (Rodriguez *et al.*, 2000) to generate the *Acrv1b*-floxed (Fx) conditional allele (Fig. 1b,c). We next generated a deleted (Δ) *Acrv1b* allele by breeding *Acrv1b*^{Fx/Fx} animals with *Ell3a-Cre* transgenic mice (Holzenberger *et al.*, 2000). Animals carrying Fx and Δ alleles were screened by duplex PCR using similar primers (Fig. 1d). The viability of homozygous *Acrv1b*^{Fx/Fx} and *Acrv1b* ^{Δ / Δ} animals was subsequently assessed by mating heterozygous animal together. Whereas intercrosses of *Acrv1b*^{+/^{Fx}} animals did provide *Acrv1b*^{Fx/Fx} mice with an expected Mendelian ratio out of the 114 individuals analyzed, we could not obtain *Acrv1b* ^{Δ / Δ} animals from *Acrv1b*^{+/^{Fx}} intercrossing ($n = 0/83$) (Table 1). The lack of *Acrv1b* ^{Δ / Δ} mice at birth is consistent with the reported embryonic lethality associated with Alk4 disruption (Gu *et al.*, 1998) and further confirmed that the combined excision of exon 5 and exon 6 leads to a null and non-functional *Acrv1b* allele. Analyses from *Acrv1b*^{+/ ^{Δ}} intercrossing further confirmed that no viable *Acrv1b* ^{Δ / Δ} embryos could be found at E13.5 (data not shown). Note, that the identification of several embryo resorptions at that stage further supports the lack of functionality of the Δ allele and the potent use of our model to address the function of Alk4 in embryonic development.

Next, we further addressed the possibility to disrupt Alk4 in adult tissues. Ubiquitous temporal regulation of Cre recombination in mice can be achieved by expressing a Cre estrogen receptor fusion protein mutant (CreERT2) from the *Rosa26* locus (Feil *et al.*, 1997). This model responded efficiently to 4-OH-tamoxifen (4-OHT) administrations, providing, therefore, a useful tool to induce temporal recombination in embryonic and adult tissues (Haigis *et al.*, 2008; Ventura *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011). *Acrv1b*^{Fx/Fx} animals were, therefore, bred with *Rosa26-CreERT2* mice to generate *Acrv1b*^{Fx/Fx}; *Rosa26-CreERT2* mice, to evaluate Alk4 targeted disruption in adult tissues upon 4-OHT administrations. Cohorts of *Acrv1b*^{Fx/Fx}; *Rosa26-CreERT2*, *Acrv1b*^{Fx/Fx}, and *Rosa26-CreERT2* were treated during four consecutive days with 4-OHT to induce an efficient Cre recombination. Tissues collected 15 days after the last injection were used for DNA, RNA, and protein preparation as well as histological inclusion. Note that we did not find treated animals to have lost weight or developed any gross defect in dissected organs at the time of sacrifice. The recombination efficiency was first

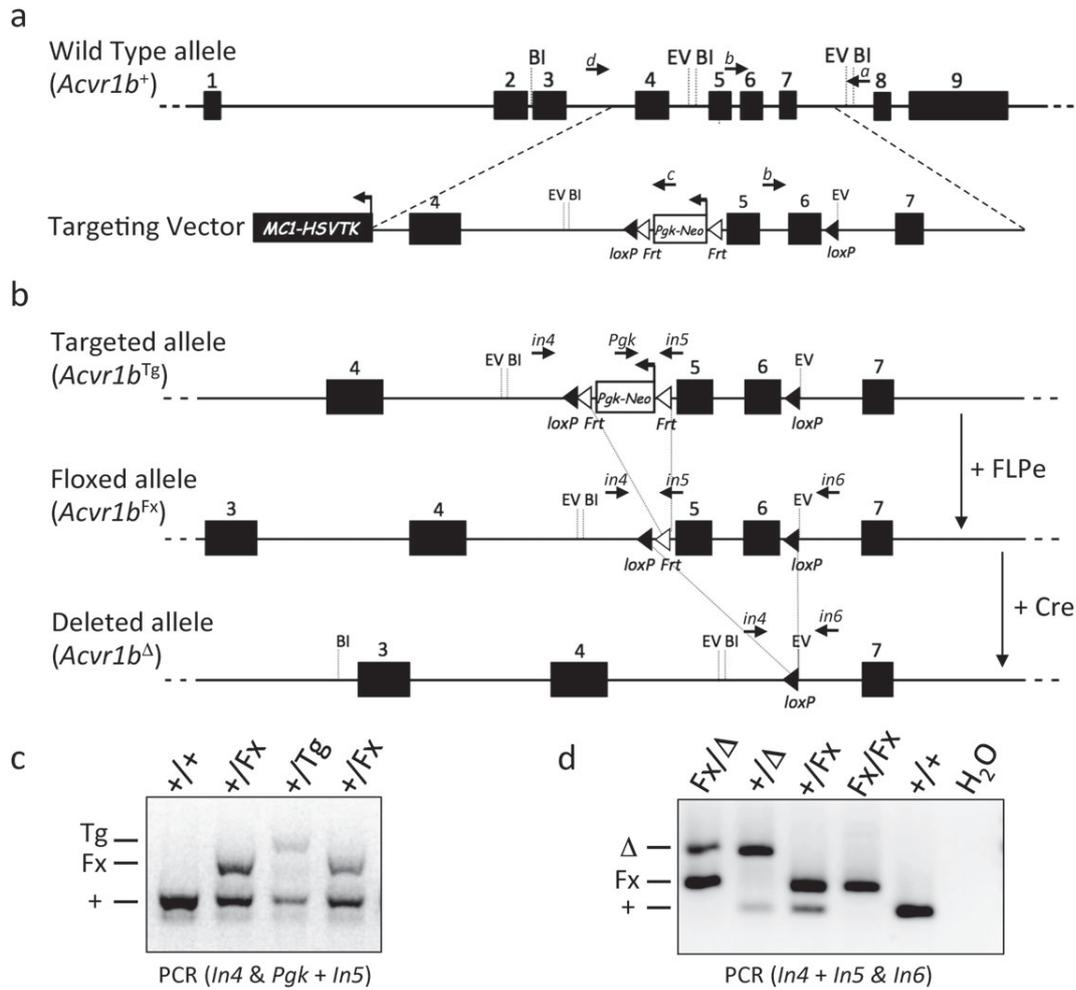


FIG. 1. Gene targeting and FLPe/Cre-mediated recombination of the *Acvr1b* locus. **(a)** Schematic view of the *Acvr1b* genomic locus on chromosome 15 and of the designed targeted vector. Exons are indicated by black boxes with numbers. Primers and restriction enzyme-site positions used for the long-range PCR screening are indicated by arrows (a, b, c, and d), or by abbreviations (EV: *EcoRV*; BI: *BamHI*). **(b)** Schematic representation of the different *Acvr1b* alleles. Vertical arrows indicate which recombinase was used to obtain the designated alleles. Primers used to genotype the different alleles are indicated by arrows (*in4*, *in5*, *in6*, and *Pgk*). **(c)** A representative example of a PCR done to genotype the Targeted (Tg) allele and to identify the floxed (Fx) allele following the FLPe recombination. PCR primers are indicated below picture, (+): wild-type allele. **(d)** representative PCR results for the identification of the deleted (Δ) allele and for the genotyping of the *Acvr1b*^{+/ Δ} and *Acvr1b*^{+/*Fx*} heterozygous intercrosses. Primers used for the PCR are indicated below the picture.

Table 1
Mendelian Repartition of *Acvr1b*^{+/*Fx*} and *Acvr1b*^{+/ Δ} Intercrosses

Breeding schemes	Expected genotypes	Number/total analyzed	Calculated ratio (%)	Expected Mendelian ratio (%)
<i>Acvr1b</i> ^{+/<i>Fx</i>} x <i>Acvr1b</i> ^{+/<i>Fx</i>}	<i>Acvr1b</i> ^{+/+}	29/114	25.4	25
	<i>Acvr1b</i> ^{+/<i>Fx</i>}	58/114	50.9	50
	<i>Acvr1b</i> ^{<i>Fx</i>/<i>Fx</i>}	27/114	23.7	25
<i>Acvr1b</i> ^{+/Δ} x <i>Acvr1b</i> ^{+/Δ}	<i>Acvr1b</i> ^{+/+}	30/83	36.2	25
	<i>Acvr1b</i> ^{+/Δ}	53/83	64.8	50
	<i>Acvr1b</i> ^{Δ/Δ}	0/83	0	25

determined by PCR performed on genomic DNA isolated from a subset of selected organs. Overall, we found the 4-OHT treatment to work convincingly, yet it showed a variable efficiency in tested-tissues when

compared with sunflower-oil-injected controls. Recombination was found to be almost complete in lungs, spleen, pancreas, and to a lesser extent liver whereas a partial recombination occurred in skin, heart, kidneys,

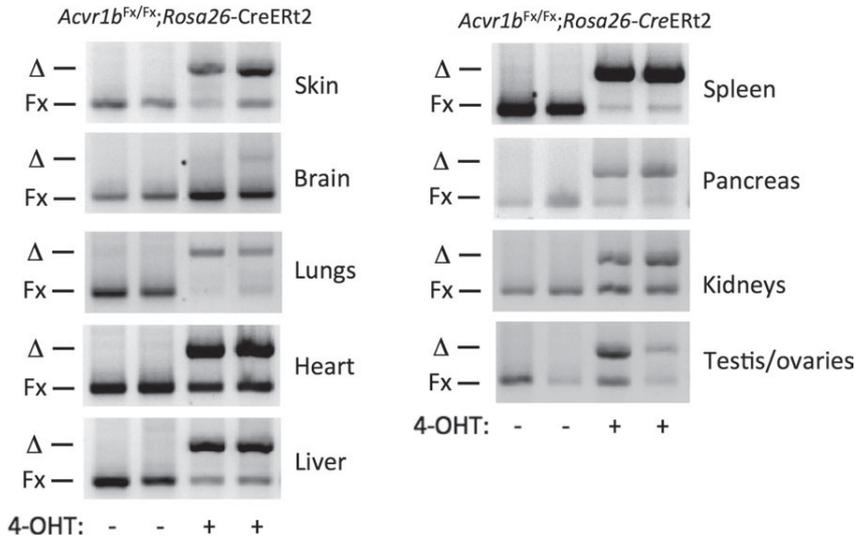


FIG. 2. Induced tissue recombination of the *Acvr1b*^{Fv} locus upon 4-OH-tamoxifen treatment. Six-week-old *Acvr1b*^{Fv/Fv};*Rosa26-CreERT2* mice were subjected to four consecutive daily Intra-Peritoneal (IP) injections of 1 mg of 4-OH-tamoxifen (4-OHT) or vehicle (sunflower oil) and sacrificed 2 weeks later for tissue sampling. Three animals 4-OHT- or oil-treated were randomly selected to collect indicated tissues (skin, brain, lung, heart, liver, spleen, pancreas, kidneys, testis, or ovaries). Genomic DNA was extracted and used to run genotyping duplex PCRs using a combination of the in4, in5, and in6 primers. A representative PCR result of two of the three independent tissue analyzed-samples is shown for each tested organ.

and ovaries/testis (Fig. 2). Out of the nine tissues tested brain was the only one showing a modest if not an absence of recombination. Note that this observation is consistent with the weak *Rosa26* expression reported in post-mitotic neurons (Hameyer *et al.*, 2007). Thus, it suggests that, despite a faint band corresponding the Δ *Acvr1b* allele seen in one of the three samples tested, Alk4 disruption in neuronal postnatal tissues should be better performed with a brain selective inducible Cre driver line.

Next, we aimed to quantify *Acvr1b* transcript by real-time PCR in tissues that had undergone recombination. As expected, most of the analyzed tissues showed a reduced *Acvr1b* expression, yet lungs surprisingly did not reveal any changes in *Acvr1b* transcript level upon 4-OHT treatments (Fig. 3a). Analysis of cDNA obtained from skin, liver, spleen, pancreas, and kidneys revealed a robust transcript reduction, whereas, as expected, the expression of *Acvr1b* was not affected in brain tissues (Fig. 3a). These results were further validated at the protein level by western blot analysis of liver protein extracts (Fig. 3b) and histological analysis. We found Alk4 protein expression to be significantly reduced in liver extract yet the presence of a weak residual band suggests that the disruption was not complete in analyzed samples. To the same extend, immunohistochemistry performed on paraffin-embedded tissues sections demonstrated a massive reduction of Alk4 expression in the liver of 4-OHT treated mice compared with matching oil-treated controls that were showing a well-delineated

Alk4 staining at the hepatocyte cell surface (Fig. 4a). Consistent with our western blot analysis we did find some liver areas where an Alk4 staining was still present, suggesting recombination was not achieved in those regions. In kidney, we also noticed the presence of large areas lacking Alk4 expression whereas some tubules within the kidney of 4-OHT-treated animals were still expressing Alk4 following induced recombination (Fig. 4b).

Together, these results validated the use of the *Acvr1b*^{Fv/Fv} mice as a novel conditional model to disrupt Alk4 receptor during embryonic development and in various adult tissues. Our work also demonstrated that the Δ allele generated upon exons 5/6 excision results in a null allele comparable of the Knock-Out allele previously reported (Gu *et al.*, 1998). This model provides, therefore, a useful tool to delineate Alk4 adult and embryonic functions and to identify novel phenotypes and biological consequences caused by its inactivation. To that extend, aging studies following 4-OHT treatments might help to precise the consequences associated with Alk4 disruption in kidneys and hepatic pathologies. More importantly, pathologies with reported *Acvr1b* mutations such as pituitary adenoma (Danila *et al.*, 2002) and pancreatic ductal adenocarcinoma (Su *et al.*, 2001) will benefit from the use of the model we report here.

In conclusion, we have produced a novel conditional *Acvr1b* floxed allele that can be ablated in embryonic and adult tissues with the help of inducible or tissue specific driven Cre transgenic line. We confirmed that

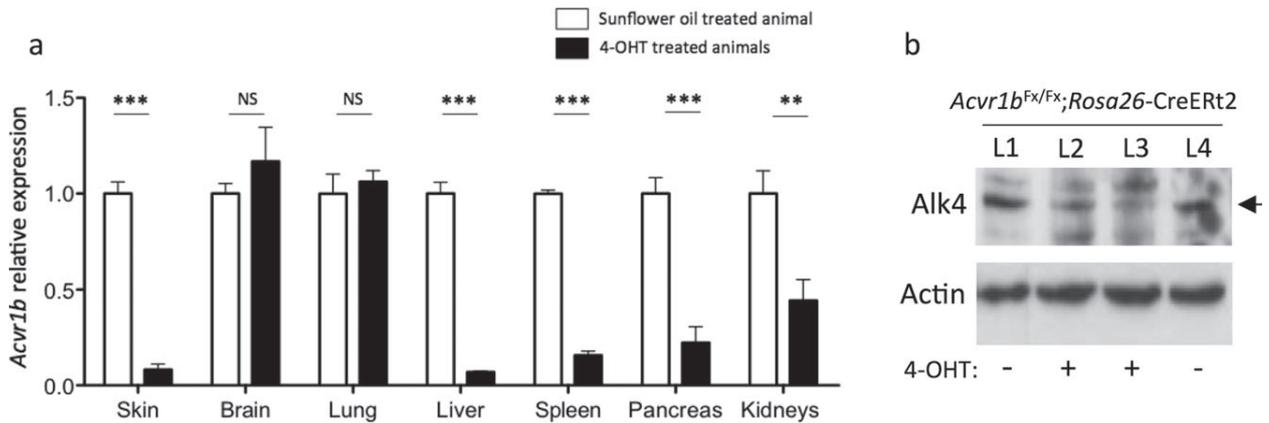


FIG. 3. Conditional 4-OH-tamoxifen (4-OHT) inactivation of *Acvr1b* reduces Alk4 transcript and protein expression in various organs. **(a)** Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis of *Acvr1b* expression performed on a subset of dissected tissues from *Acvr1b^{Fx/Fx};Rosa26-CreERT2* 4-OHT (black box), or sunflower oil (white box) treated animals. Results were normalized against *Tbp* expression. Tissue samples from three independent animals were analyzed per organ and per treatment. The data shown as means \pm SEM were compared using a student's *t* test (** <0.01 ; *** <0.001 ; NS: not significant). **(b)** Western blot analysis of Alk4 protein expression in liver tissues following mice treatment with 4-OHT or sunflower oil. An arrowhead shows the Alk4 band. A duplicate of protein extracts from independent livers of *Acvr1b^{Fx/Fx};Rosa26-CreERT2* animals are represented as indicated [L1 and L4, oil-treated controls (-); L2 and L3, 4-OHT-treated individuals (+)].

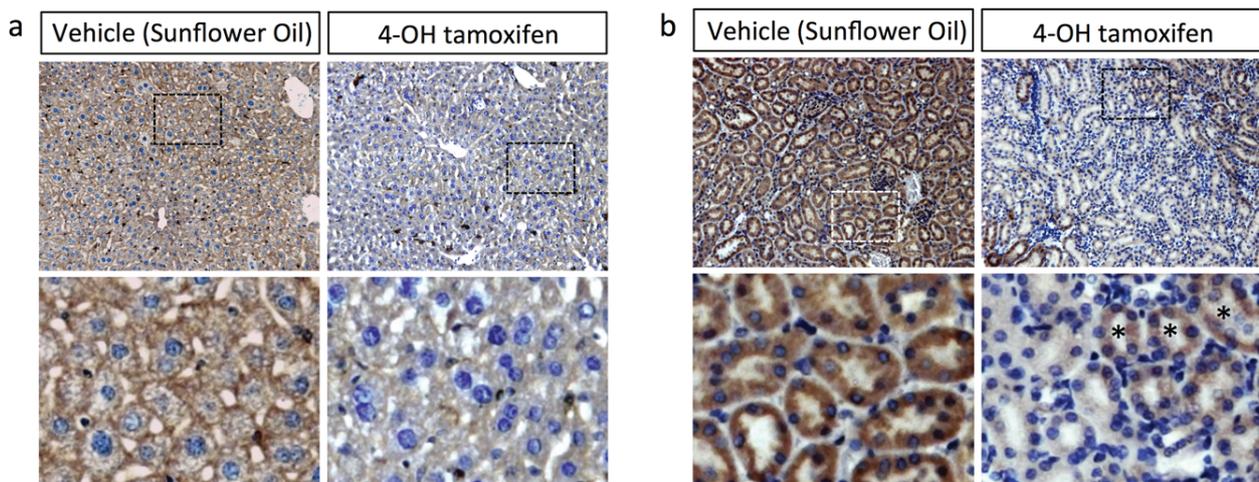


FIG. 4. 4-OH-tamoxifen treatment efficiently disrupts Alk4 expression in liver and kidneys of *Acvr1b^{Fx/Fx};Rosa26-CreERT2* treated animals. Alk4 expression was analyzed by immunohistochemistry on liver **(a)** and kidneys **(b)** paraffin-embedded tissue sections. A representative picture-set of liver and kidney staining from vehicle- or 4-OHT treated *Acvr1b^{Fx/Fx};Rosa26-CreERT2* mice are shown. Note the residual positive Alk4 staining that could be seen in a subset of kidney tubules (*) where 4-OHT treatment appeared to be less efficient. Lower panels represent higher magnification of dashed areas.

the deleted allele obtained after recombination is null and non-functional as confirmed by the embryonic lethality that occurred in animal carrying homozygous Δ alleles. Thus, *Acvr1^{Fx/Fx}* mice provide a novel and promising mouse model that will be complementary to the conditional *Acvr1b* model developed by Qiu *et al.* (2011) to study Alk4 receptor functions during adult life as well as embryonic development. This model will help to better understand the unexplored functions of this receptor in tissues homeostasis and human diseases associated with its mutation.

METHODS

Generation of *Acvr1b* Mutant Mice

All animal maintenance and experiments were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee. *Acvr1b* conditional targeting vector was produced from a mouse 129/J clone library. A *BamHI-XbaI* 5 kb DNA genomic fragment containing exon 4 was first cloned in

a pL253 vector that provided the *MCI* promoter-herpes simplex virus-thymidine kinase cassette (*MCI-HSVTK*) at the 5' terminus of the gene targeting vector for negative selection. A *Bam*HI 6 kb DNA fragment containing exon 5, 6, and 7 was also recovered and cloned in a pBS-KS for further modification. Right and left homology arms were 3 and 3.5 kb, respectively. A *Frt-PgkNeo-Frt-LoxP* neomycin selection cassette flanked by two *Frt* sites and containing one *LoxP* site at one end was obtained from a pL451 vector and cloned was inserted 489 bp upstream of exon 5. A second *LoxP* site followed by an *EcoRV* site for screening purpose was inserted 273 bp following the end of exon 6. The integrity of the entire targeting vector was verified by sequencing prior to homologous recombination. The *Cla*I-linearized targeting vector was subsequently electroporated in CK35 (129/Sv) ES cells. Five hundred G418-resistant clones were handpicked and screened by digestion of long-range PCR products. Left arm was screened by a *Bam*HI digestion of the PCR product obtained from c: (Fw-*Neo*) 5'-TCGCATTGTCTGAGTAGGTG-3' and d: (Rev-ExtLeft) 5'-ACTTTATATGCCTCAGTATGG-3' whereas right arm was screened by an *EcoRV* digestion of the PCR product obtained from a: (Fw-ExtRight) 5'-CACTGATGATGGCATCTGGA-3' and b: (Rev.int6) 5'-GAGCATGGCTCACTGTTTGA-3' amplicons. Two ES clones were selected and injected in C57BL/6 blastocyst to get chimeras that were subsequently checked for germline transmission of the targeted (Tg) allele by PCR. Genotyping of F1 mice were done using duplex PCR with In4: 5'-CAGTGGTTAAGAACTAGTGC-3'; In5: 5'-GTAGTGTTATGTGTTATTGCC-3' and *Pgk*: 5'-CTACCGGTGGATGTGGAATGTG-3' primers combination. *Acvr1b*^{Fx} and *Acvr1b*^Δ alleles were respectively generated by crossing mice carrying the *Acvr1b*^{Tg} allele with *ACT-FLPe* (Rodriguez *et al.*, 2000) or *EIIa-Cre* (Holzenberger *et al.*, 2000) driver mice. Mice carrying those Fx or Δ alleles can be requested and provided for research use upon acceptance of the present manuscript. The following primers were used for duplex PCR genotyping: In4: 5'-CAGTGGTTAAGAACTAGTGC-3'; In5: 5'-GTAGTGTTATGTGTTATTGCC-3'; and In6: 5'-GAGCAAGAGTTTCTCTATGTAG-3'.

Tamoxifen Administration

Rosa26-CreERT2 mice (Ventura *et al.*, 2007) were bred with *Acvr1b*^{Fx/Fx} to generate cohorts of mice for 4-OH-tamoxifen (4-OHT) treatments. To activate the CreERT2 recombinase, 6-week-old mice were subjected to intraperitoneal (IP) injection with 100 μL of a 10 mg/mL 4-OHT solution (Sigma Aldrich) prepared in 10% ethanol/90% sunflower oil (Sigma Aldrich). A subset group of animals was solely subjected to vehicle IP injections for control purposes. For each group, injections were done every day, 4 days in a row prior to the sacrifice of the mice

2 weeks after the first injection. Cohorts were as follow: 4-OHT-treated *Acvr1b*^{Fx/Fx}; *Rosa26-CreERT2* (*n* = 5); sunflower oil-treated *Acvr1b*^{Fx/Fx}; *Rosa26-CreERT2* (*n* = 4); 4-OHT-treated *Acvr1b*^{Fx/Fx} (*n* = 3); sunflower oil-treated *Acvr1b*^{Fx/Fx} (*n* = 2).

Tissues Recombination Analysis

Genomic DNA was isolated from freshly dissected tissues 2 weeks after the first 4-OHT/vehicle injection for PCR analysis using a duplex combination of primers to detect *Acvr1b* wild-type (204 bp), floxed (294 bp) and deleted (473 bp) alleles in the same PCR reaction. Primers sequences are as follow, In4: 5'-CAGTGGTTAAGAACTAGTGC-3'; In5: 5'-GTAGTGTTATGTGTTATTGCC-3'; and In6: 5'-GAGCAAGAGTTTCTCTATGTAG-3'.

Recombination efficiency was assessed from individual tissues collected from three tamoxifen- and three oil-treated animals.

Quantitative Analysis of Transcript Expression

RNA was extracted from freshly dissected tissues as following. Isolated tissues (skin, brain, liver, kidney, lung, pancreas, and spleen) were homogenized using a Bio-Gen Pro200 homogenizer (Pro Scientific Inc.) in a 5 M guanidine solution. Total RNA was further purified by RNeasy mini kit plus (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was transcribed using SuperScriptII reverse transcriptase (Invitrogen). Comparable amounts of tissue-cDNA from 4-OHT (*n* = 3) or sunflower oil (*n* = 3) treated *Acvr1b*^{Fx/Fx}; *Rosa26-CreERT2* mice were analyzed in duplicate for real-time PCR analysis. Primers for *Acvr1b* expression analyses were as follow *Acvr1b*-ex4Fw: 5'-GGTCCGTGAAGCAGAGATC-3', *Acvr1b*-ex5Rev: 5'-CAGTGAGCCATGCTCGTGAT-3' and all real-time PCR results were normalized to the expression of the *Tbp* housekeeping gene, *Tpb*-Fw: 5'-TGGTGTGCACAGGAGCCAAG-3', *Tpb*-Rev: 5'-TTCACATCACAGCTCCCCAC-3'. Real-time PCR analyses were carried out on a Step-One Real-Time System (Applied-Biosystem) using SYBR-Green reagent (Life Technologies). Statistical tests were done using a paired Student's *t*-test (Prism4, GraphPad). A *P* < 0.05 was considered significant.

Protein Expression and Western Blot Analysis

Proteins were extracted with a RIPA buffer from freshly dissected and Bio-Gen Pro200-homogenized livers. Proteins were quantified by the Lowry protein assay (DC-assay kit, Biorad). Twenty μg of protein per sample were separated using SDS-PAGE with a 10% resolving gel and transferred onto a PVDF membrane (GE Healthcare). Primary antibodies (rabbit anti-ALK4, Genetex; mouse anti-Actin, Santa Cruz BioTechnology) were incubated overnight at 4°C, followed by HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) and detected using a Lumi-Light ECL solution (Roche).

Immunohistochemical Analysis of Liver and Kidney Tissues

Livers and kidneys were collected from mice 2 weeks after they received their last 4-OHT or sunflower-oil IP injection. Dissected tissues were rinsed and immediately fixed in 4% neutral-buffered formaldehyde for at least 24 h, followed by dehydration and paraffin embedding. Immunohistochemical staining was carried out on 3- μ m-thick paraffin sections. Briefly, sections were rehydrated and subjected to a pH 8.0/high temperature antigen retrieval in a Tris-EDTA-Tween20 solution followed by a block of endogenous peroxidase activity. Tissue sections were incubated overnight with an anti-Alk4 antibody (rabbit polyclonal, Epitomics) followed by a detection using a biotin-streptavidin coupled secondary anti-rabbit antibody (Vector) and a DAB revelation according to the manufacturer's instructions (DAB-Kit, Vector).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Christelle Martin and the Service d'Expérimentation Animale et de Transgénèse (SEAT, CNRS UPS 44, Villejuif, France) for their help during the generation of transgenic mice. They also thank ALECS-SFP (Lyon) and ANICAN (CRCL, Lyon) animal staffs for maintenance of the different mouse strains used for this project.

LITERATURE CITED

- Andersson O, Bertolino P, Ibáñez CF. 2007. Distinct and cooperative roles of mammalian Vg1 homologs GDF1 and GDF3 during early embryonic development. *Dev Biol* 311:500–511.
- Armes NA, Smith JC. 1997. The ALK-2 and ALK-4 activin receptors transduce distinct mesoderm-inducing signals during early *Xenopus* development but do not co-operate to establish thresholds. *Development* 124:3797–3804.
- Bertolino P, Holmberg R, Reissmann DM, Andersson O, Berggren PO, Ibáñez CF. 2008. Activin B receptor ALK7 is a negative regulator of pancreatic beta-cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:7246–7251.
- Chen Y, Mironova E, Whitaker LL, Edwards L, Yost HJ, Ramsdell AF. 2004. ALK4 functions as a receptor for multiple TGF beta-related ligands to regulate left-right axis determination and mesoderm induction in *Xenopus*. *Dev Biol* 268:280–294.
- Danila DC, Zhang X, Zhou Y, Haidar JN, Klibanski A. 2002. Overexpression of wild-type activin receptor alk4-1 restores activin antiproliferative effects in human pituitary tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4741–4746.
- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. 1997. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237:752–757.
- Gu Z, Nomura M, Simpson BB, Lei H, Feijen A, Van Den Eijnden-Van Raaij J, Donahoe PK, Li E. 1998. The type I activin receptor ActRIB is required for egg cylinder organization and gastrulation in the mouse. *Genes Dev* 12:844–857.
- Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN, Niwa-Kawakita M, Sweet-Cordero A, Sebolt-Leopold J, Shannon KM, Settleman J, Giovannini M, Jacks T. 2008. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet* 40:600–608.
- Hameyer D, Loonstra A, Eshkind L, Schmitt S, Antunes C, Groen A, Bindels E, Jonkers J, Krimpenfort P, Meuwissen R, Rijswijk L, Bex A, Berns A, Bockamp E. 2007. Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. *Physiol Genomics* 31:32–41.
- Holzenberger M, Lenzner C, Leneuve P, Zaoui R, Hamard G, Vaulont S, Bouc YL. 2000. Cre-mediated germline mosaicism: a method allowing rapid generation of several alleles of a target gene. *Nucleic Acids Res* 28:E92.
- Jörnvall H, Reissmann DM, Andersson O, Mehrkash M, Ibáñez CF. 2004. ALK7, a receptor for nodal, is dispensable for embryogenesis and left-right patterning in the mouse. *Mol Cell Biol* 24:9383–9389.
- Kemaladewi DU, de Gorter DJ, Aartsma-Rus A, van Ommen GJ, ten Dijke P, t Hoen PA, Hoogaars WM. 2012. Cell-type specific regulation of myostatin signaling. *FASEB J* 26:1462–1472.
- Lee YJ, Hong KH, Yun J, Oh SP. 2006. Generation of activin receptor type IIB isoform-specific hypomorphic alleles. *Genesis* 44:487–494.
- Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R. 1986. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321:779–782.
- Matzuk MM, Kumar TR, Bradley A. 1995. Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 374:356–360.
- Oh SP, Li E. 1997. The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. *Genes Dev* 11:1812–1826.
- Oh SP, Yeo C, Lee Y, Schrewe H, Whitman M, Li E. 2002. Activin type IIA and IIB receptors mediate Gdf11 signaling in axial vertebral patterning. *Genes Dev* 16:2749–2754.
- Qiu W, Li X, Tang H, Huang AS, Panteleyev AA, Owens DM, Su GH. 2011. Conditional activin receptor type 1B (*Acvr1b*) knockout mice reveal hair loss abnormality. *J Invest Dermatol* 131:1067–1076.

- Roberts VJ, Barth SL. 1994. Expression of messenger ribonucleic acids encoding the inhibin/activin system during mid- and late-gestation rat embryogenesis. *Endocrinology* 134:914-923.
- Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM. 2000. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25:139-140.
- Smith JC, Armes NA, Conlon FL, Tada M, Umbhauer M, Weston KM. 1997. Upstream and downstream from Brachyury, a gene required for vertebrate mesoderm formation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62:337-346.
- Song J, Oh SP, Schrewe H, Nomura M, Lei H, Okano M, Gridley T, Li E. 1999. The type II activin receptors are essential for egg cylinder growth, gastrulation, and rostral head development in mice. *Dev Biol* 213:157-169.
- Su GH, Bansal R, Murphy KM, Montgomery E, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. 2001. ACVR1B (ALK4, activin receptor type1B) gene mutations in pancreatic carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3254.
- Sulyok S, Wankell M, Alzheimer C, Werner S. 2004. Activin: An important regulator of wound repair, fibrosis, and neuroprotection. *Mol Cell Endocrinol* 225:127-132.
- Ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH, Miyazono K. 1993. Activin receptor-like kinases: A novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 8:2879-2887.
- Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T. 2007. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445:661-665.
- Wang J, Kumar RM, Biggs VJ, Lee H, Chen Y, Kagey MH, Young RA, Abate-Shen C. 2011. The Msx1 homeoprotein recruits polycomb to the nuclear periphery during development. *Dev Cell* 21:575-588.
- Windelinckx A, De Mars G, Huygens W, Peeters MW, Vincent B, Wijmenga C, Lambrechts D, Delecluse C, Roth SM, Metter EJ, Ferrucci L, Aerssens J, Vlietinck R, Beunen GP, Thomis MA. 2011. Comprehensive fine mapping of chr12q12-14 and follow-up replication identify activin receptor 1B (ACVR1B) as a muscle strength gene. *Eur J Hum Genet* 19:208-215.
- Xia Y, Schneyer AL. 2009. The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function. *J Endocrinol* 202:1-12.
- Yeo C, Whitman M. 2001. Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. *Mol Cell* 7:949-957.
- Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, Rosenfeld R, Chen Q, Boone T, Simonet WS, Lacey DL, Goldberg AL, Han HQ. 2010. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* 142:531-543.



β ig-h3 represses T cell activation in type 1 diabetes

Journal:	<i>Diabetes</i>
Manuscript ID:	DB15-0638
Manuscript Type:	Brief Report
Date Submitted by the Author:	17-May-2015
Complete List of Authors:	Patry, Maeva; INSERM 1052, Tumor escape Teinturier, Romain; INSERM 1052, Tumor escape Zetu, Cornelia; National Institut for Diabetes, Ripoche, Doriane; INSERM 1052, Tumor escape Bertolino, Philippe; INSERM 1052, Tumor escape Hennino, Ana; INSERM 1052, Tumor escape signaling

SCHOLARONE™
Manuscripts

β ig-h3 represses T cell activation in type 1 diabetes

Maeva Patry^{1,2,3}, Romain Teinturier^{1,2,3}, Cornelia Zetu⁴, Doriane Ripoche^{1,2,3}, Philippe Bertolino^{1,2,3*} and Ana Hennino^{1,2,3*}

Affiliations:

¹Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, F-69373, France.

²Université Lyon 1, Lyon, F-69000, France.

³Centre Léon Bérard, Lyon, F-69008, Lyon, France.

⁴National Institut for Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases "N. Paulescu", Bucarest, Romania

*equally contributed to this work

Correspondence to: AH (ana.hennino@inserm.fr)

Abstract

β igh3/TGF- β i is a secreted protein capable of binding to both extracellular matrix and cells. Human genetic studies recently revealed that in the *tgfb1* gene encoding for β igh3, three single nucleotide polymorphisms (SNPs) were significantly associated with type 1 diabetes (T1D) risk. Pancreatic islets express β igh3 in physiological conditions, but this expression is lost in beta cell insult in T1D. Since the integrity of islets is destroyed by autoimmune T lymphocytes, we thought to investigate the impact of β igh3 on T cell activation. We show here that β igh3 inhibits T cell activation markers as well as cytotoxic molecule production as Granzyme B and IFN γ . Furthermore, β ig-h3 inhibits early TCR signaling by repressing the activation of the early kinase protein Lck. Moreover, β igh3 treated-T cells are unable to induce T1D upon transfer in Rag2KO mice. Our study demonstrates for the first time that T cell-activation is modulated by β igh3, an islet extracellular protein, in order to efficiently avoid auto-immune response.

Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is a polygenic autoimmune disease characterized by smoldering inflammatory response directed against the insulin-producing β islet cells of the pancreas. T1D pathogenesis clearly involves β cell-reactive T cell activation and consequent pancreatic inflammatory response and finally failure of immune regulation of autoreactive response. Both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells are involved in the destruction of β cells (shed by a prior insult). $CD4^+$ T cells are insulin reactive and $CD8^+$ T cells play a major role as β cells killers (1, 2). While both *in vitro* and *in vivo* evidence point a role for regulatory T cells in the T-cell mediated regulation controlling diabetes in mouse models (3), the influence of the inflammatory environment within which they function remains poorly understood. The crosstalk between the inflammatory milieu and the immune response during insulinitis is likely to be communicated in large part through the extracellular matrix (ECM). β ig-h3 (also known as TGF β i) is a gene cloned from TGF- β -stimulated A549 lung adenocarcinoma cells (4, 5). β ig-h3 is a secreted protein found in the ECM and it has an N-terminal secretory signal (aa 1–23), four FAS1 homologous internal domains, and a cell attachment site (RGD) at its C terminus (5). β ig-h3 binds to the ECM through interaction of YH motif in its FAS1 domains with collagens I, II, IV and VI (6, 7). Its FAS1 domain interacts its $\alpha 3\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ integrins on cell surface. Previous studies demonstrated that recombinant β ig-h3 could preserve the integrity and enhance the function of cultured pancreatic islet cells (8). Conversely, β ig-h3 KO islets function was compromised *in vivo* after transplantation in diabetic recipients (9). These studies point out that β ig-h3 might play an active role in the protection of β -cell against T cell cytotoxic insult in T1D. The effect of β ig-h3 on T cell function and activation relative to its roles in islet β -cell–ECM destruction in type 1 diabetes in mice has never been investigated and it's the focus of our project.

Research design and methods

Mice:

Female C57Bl/6, NOD were bred and housed in specific pathogen-free conditions. C57Bl/6 mice were treated i.p with low dose (35 mg/kg per injection for 5 consecutive days) streptozotocin (STZ) to chemically induce diabetes. Blood glucose was monitored from day 14 until sacrifice at day 60. Animals with glycaemia superior to 200 mg/dl were considered diabetic. Female NOD mice developed diabetes starting from 14 weeks. All animals were handled in the accordance with the institutional guidelines. The experimental protocols were approved by the local animal experimentation ethics committee.

Patients

6- μ m sections from paraffin embedded pancreas were provided by C. Zetu (National Institut for Diabetes, Bucharest, Romania). Samples were from cadaveric donor pancreases of type 1 and type 2 diabetes. All experimental procedures were approved by Romanian National Ethics Committee.

Cell culture

Cells extracted from draining lymph nodes were cultured in 96-U-shaped-well plates (300 000 cells/well). Cells were treated or not with 5 μ g/mL of human TGF β i protein (R&D systems) for 24 hours. Cells were activated with different doses of anti-mouse CD3 ϵ antibody (eBioscience) during the indicated times.

Flow cytometry analysis

For extracellular staining, draining lymph nodes cells or perfused pancreata were stained with CD8 V450 rat antibody (BD Bioscience), mouse CD4 V500 rat antibody (BD Bioscience), mouse CD44 A700 rat antibody (BD Bioscience), CD69 FITC (ImmunoTools). For intracellular staining, draining lymph nodes cells were activated with PMA and ionomycin (1 μ g/ml) for 4 hrs at 37°C in 5% CO₂ in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with

10% FCS (Biowest), 10 mM HEPES, 100U/ml penicillin G, 100µg/ml streptomycin, 2mM L-glutamine (Invitrogen) in the presence of Golgi plug (BD Pharmingen). After activation, cells were stained with CD8 V450 rat antibody (BD Bioscience), mouse CD4 V500 rat antibody (BD Bioscience), permeabilized using Cytofix-Cytoperm (BD Pharmingen) and further stained with anti-IFN γ (clone XMG1.2, BD Pharmingen), anti-Granzyme B (clone GB12, Invitrogen) and. Flow cytometry analyses was carried out with BD Fortessa Flow Cytometer (BD Biosciences) and analyzed with either BD FACS Diva software v5.0.1 (BD) or FlowJo (Tree Star, Inc.).

Western Blot

For Western blot analysis, 30 µg of protein was loaded on the gel, then separated by 12% SDS-PAGE (Biorad), and transferred to a Hybond nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech). After transfer, the immunoblots were blocked by incubating with 5% BSA in Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20. Next, the blots were probed overnight with the appropriate dilution of the primary antibodies (anti-Lck, anti-pSrc pY416 which recognizes Lck on pY394, anti-pLck pY505 from Cell Signaling, anti- β actin from Sigma) and revealed with either HRP-conjugated sheep anti-mouse or HRP-conjugated anti-rabbit Ab (Amersham Pharmacia Biotech) for 1 h at room temperature. After washing, the blots were developed using the ECL chemiluminescence method (Pierce Chemical Co.) according to the manufacturer's protocol. Band intensities were analyzed with Image Lab software.

Immunofluorescence and confocal microscopy

Slides with 5 µm sections of mouse pancreas included in paraffin were deparaffined. Sections were unmasked by unmasking solution (Vector H 3300) then saturated with antibody diluent (Dako) during 30 minutes and incubated with primary antibody diluted in antibody diluent over night at 4°C (TGF β i rabbit antibody from Sigma, Insulin guinea pig antibody from Dako and Glucagon mouse antibody from Sigma). For cultured cells, cells were cytopspined on

slides and fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min and then permeabilized in 0.1% TritonX-100 for 10 min. Cells were washed in PBS 0.05% Tween and the blocked with antibody diluent (Dako) 15 min before staining o.n. at 4°C with, anti-TCR β (Becton Dickinson) and phospho-Lck pY505 (Cell signaling). Slides were incubated with species specific anti-Fab'2-Alexa 647 and Alexa 555 (Molecular Probes) and mount with Vectashield Mounting medium with DAPI. Representative images of the localization of each molecule are shown. All confocal analysis were multiple repeats, and at least 20 images were analyzed for each molecule. The method use for colocalization quantifications was previously described (10). Data were rendered and analyzed using Zen software (Zeiss).

Statistical analysis

P values were calculated with Student's *t* test, (GraphPad Prism) as specified in figure legends. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

Results

β ig-h3 inhibits T cell activation

In order to study a direct role of β ig-h3 on T cells *in vitro*, we treated the cells for 24h with human recombinant β ig-h3 and then activate them with different doses of anti-CD3 (Fig. 1). Since TCR avidity modulates T cell activation (11) and that autoreactive T cell respond to low affinity and avidity peptides, we compared the ability of CD8⁺ T cells to respond to high (1000 ng/ml), intermediate (100 ng/ml) and low concentrations (10 ng/ml) of anti-CD3 after treatment or not with recombinant β ig-h3. We show that at high and intermediate concentration of anti-CD3, β ig-h3 did not modulate the activation of CD8⁺ T-cell following TCR engagement as shown by the activation markers CD69 and CD44. In contrast, β ig-h3 was able to inhibit subsequent low dose T cell activation as shown by the significant reduction of CD69 and CD44 expression (Fig. 1 A, B). Next, we tested if in addition to the activation markers, the production of proinflammatory cytokines as IFN γ and cytolytic molecules as Granzyme B were affected by the treatment with β ig-h3. Indeed, T cells treated with β ig-h3 for 24h show reduced production of intracellular IFN γ and Granzyme B as a measure of cytotoxic function (Fig. 1 C, D). Thus, altogether these results point out an important immunomodulatory role for β ig-h3 protein in the activation of T cell to low concentrations of CD3.

β ig-h3 inhibits early TCR signaling

β ig-h3 has been reported to signal from the extracellular environment through the cell surface α v β 3 integrin heterodimer (12). Integrin signaling has been previously reported to share early TCR signaling molecules (13, 14). Therefore, we investigated the effect of β ig-h3 signaling on the activation of early actors of the TCR signaling. Initiation of the TCR signaling pathway relies on the induction of tyrosine protein phosphorylation of the kinase Lck (15, 16). The regulation of the enzymatic activity of this Src family tyrosine kinase is tightly controlled by

conformational changes mainly relying on phosphorylation and dephosphorylation on two regulatory tyrosine residues Y505 and Y394 (17, 18). In resting T cells, as previously reported (19), a larger percentage of Lck was phosphorylated on Y394 and thus was present under its activated conformation (Fig. 2 A). However, in clear contrast, in β ig-h3 treated CD8⁺ T cells were mainly phosphorylated on Y505, implying that β ig-h3 signaling influenced the Lck conformation-equilibrium towards its inactive state (Fig. 2 A, B). After TCR engagement, with low dose of anti-CD3 the ratio of Y505/Y394 was higher in β ig-h3 treated T cells than in non-treated cells (Figure 2 A, B) at all time points (2 and 10 min). These data suggest that β ig-h3 blocks the TCR-signaling pathway by influencing the equilibrium of Lck conformation toward an inactive state characterized by Y505 phosphorylation. Next, we sought for the localization of Lck phosphorylated on inhibitory Y505 in resting and stimulated T cells by confocal microscopy. Lck phosphorylated on Y505 was colocalized with the TCR in high proportion (around 60%) (Supplementary Fig. 1) in resting not-treated T cells (Fig. 2 C). In contrast, after TCR engagement with anti-CD3, pY505 colocalisation with the TCR was significantly diminished (Fig. 2 C and Supplementary Fig. 1). In β ig-h3 treated cell, the colocalisation of the Lck Y505 with the TCR was similar in resting cells and after TCR engagement (around 58%) (Supplementary Fig. 2 and Fig. 2C), suggesting that β ig-h3 signaling interfere with T cell activation.

β ig-h3 expression is lost in pancreatic islet in type 1 diabetes

To investigate the modulation of β ig-h3 expression in pathological conditions, we used chemical-induced (STZ) and genetic (NOD) mouse models of T1D. We also analyzed few number of human pancreas of type 1 (n=2) and type 2 diabetes (T2D) (n=3) patients. Immunofluorescence analysis showed that β ig-h3 was expressed in pancreatic islets in normal mice as well as in normoglycemic non-diabetic NOD mice (Fig. 1A, B) by both α and β cells. In human pancreas, β ig-h3 was expressed only by β cells in T2D (Fig. 1C). In contrast, in

type 1 diabetic islets, β ig-h3 expression was lost at both mRNA (Supplementary Fig. 2) and protein level (Fig. 1 A, B, C). In mice, α cells retained expression of β ig-h3 in diabetic individuals (Fig. 1). In the genetic model, about 80 % of NOD female mice develop diabetes at 6 months (20). Diabetic NOD females showed similar immune infiltration to NOD normoglycemic non diabetic age matched females (data not shown) suggesting that local immunosuppression mechanism might be involved. Together these data reveal that pancreatic beta cells expression of β ig-h3 might play a protecting role against T cell insult.

β ig-h3 affects activation of diabetogenic T cells *in vivo*

In order to investigate the physiological relevance of the repression of the T cell response *in vitro*, we used *in vivo* diabetes transfer model. T cells from pancreas of diabetic mice (STZ-induced T1D) were treated or not for 24h with β ig-h3 and then *iv* injected in wild type immunodeficient Rag2 KO congenic mice. Mice were sacrificed 14 days after T cell injection and the infiltration and activation of T cells was assed by FACS (Fig.4 A). Measurements of glycaemia showed that β ig-h3 pre-treated T cells were unable to induce diabetes as compared to not-treated T cells (Fig. 4 B). Although equivalent percentages of CD45⁺ cells were detected in recipients pancreas (Fig. 4 C), T cells pretreated with β ig-h3 showed lower level of CD69 (Fig. 4 D) and less production of IFN γ and CD107a (Fig. 4 E, F) and Granzyme B (Fig. 4 C) in the pancreas than not treated counterparts. Thus, these results reveal an important role of β ig-h3 in inhibiting diabetogenic T cell activity *in vivo*.

Discussion

A major goal of T1D research is to restore beta cell function while eliminating diabetogenic T cells by immunotherapy in the hope of achieving insulin independence. To develop an effective immunotherapy, there must be a continued effort on defining the molecular basis that underlies T cell response to pancreatic islet antigens in T1D. Therefore, identifying new targets involved in the protection against cytotoxic T lymphocyte attack might be important for defining new therapy hints. We show here that β ig-h3, a protein of the islet ECM, is able to repress diabetogenic T cell activation by interfering with early actors of the TCR signaling pathway, ie Lck. This alteration has major consequences on T cell expression of activation markers (CD69 and CD44) upon TCR engagement, as well as production of IFN γ and Granzyme B. Previous finding identified β ig-h3 as vital trophic factor promoting islet survival, function and regeneration (8). We demonstrate that in addition to its trophic support to pancreatic islet, β ig-h3 plays an active role in inhibiting the activation T cell activation to low concentration of antigen or autoreactive T cells. Signaling through integrins has been described to only facilitate T-cell activation by lowering an activation threshold without qualitatively changing the T-cell response (21). Our results show that β ig-h3 signaling through T cell surface integrins was able to inhibit TCR activation by phosphorylating Lck on inhibitory tyrosine Y505. Previous studies showed that Lck plays an important role in regulating autoimmunity since it has been described that specific deficiency of this kinase in T cells of patients with type 1 diabetes (22) as well as an important role in the CTL function of CD8⁺ T cells in mice (23). Nika et al. showed that the ratio of Y394/Y505 was approximately 1.5 in normal cells (19). Following β ig-h3 treatment, Lck was mostly phosphorylated on inhibiting tyrosine Y505 (ratio Y505/Y394 above 2, Figure 4 A, B) and colocalized with the TCR (Figure 2 C). As a consequence, engagement of the TCR in those β ig-h3 pretreated cells did not lead to delocalization of Y505 away from the TCR compared

to non treated cells. Therefore transfer of β igh3 treated diabetogenic T cells into WT animals led to blunted activation and cytotoxic capacities in recipient pancreas. An interesting finding is that NOD female mice that do not develop diabetes at 6 months (about 20%) express β igh3 in the pancreatic islets (Fig. 3 B) and that the expression is lost in hyperglycemic aged match diabetic NOD mice. Since the immune infiltration is similar, this data suggest that β igh3 expression might contribute as a protective shield against cytotoxic T cell attack. Our experimental findings reconsider the conventional understanding of “cytotoxic” T cell-induced β cell death in T1D in order to take into account β cell “matrix” as critical component of T1D pathogenesis. Studies of the β ig-h3 impact on islet-specific T cell in from human peripheral blood T1D to expression in diabetic human pancreas will further elucidate whether this protein is also a key target of immune tolerance in human T1D.

Figure legends

Figure 1. β ig-h3 inhibits T cell activation. A, B Draining lymph nodes cell from WT C57Bl6 (3×10^5 cells/condition) were treated or not with β ig-h3 (5 μ g/ml) for 24h. Anti-CD3 Ab was further added at the indicated concentration for another 24h. Representative histograms are illustrating the percentage of CD8⁺ T cells expressing CD69 (A) and CD44 (B) at their surface and expressing IFN γ (C) and Granzyme B (B) in their cytoplasm 24h days after cell culture. Graphs are quantifying the percentage of CD8⁺ T cells expressing CD69 (A) and CD44 (B), the percentage of CD8⁺ T cells expressing IFN γ (C) and Granzyme B (D) in 3 individual mice. The results are representative of 3 independent experiments with 3 mice per group.

Figure 2. β ig-h3 signaling affects Lck phosphorylation equilibrium. T cells were treated with or not β ig-h3 (5 μ g/ml) for 24h and further stimulated with 10 ng/ml of anti-CD3 or the indicated times. A, Western Blot analysis of expression levels of pLck Y505, pLck Y394,

total Lck, and β -actin are indicated. **B**, Quantification of the ratio of pLck Y505/ pLck Y394/total Lck mean intensity in different conditions. **C**, Confocal immunofluorescence of resting (0) or stimulated for 2 min (α -CD3 2 min) T cells stained with anti-TCR β , pLck Y505 and DAPI. Results are representative of 3 independent experiments.

Figure 3. Altered expression of β ig-h3 in type 1 diabetes insult in pancreatic islets.

A, B Immunofluorescent costaining for Insulin, Glucagon and β ig-h3 within pancreatic islet in control mice (WT CIT), in STZ-treated mice diabetic mice (T1D STZ), in 6 months old normoglycemic non-diabetic NOD mice (NOD) and diabetic age matched mice (T1D NOD). The results are representative of 3 independent experiments with 3 mice per group.

C Representative immunofluorescent staining of pancreas section from one T1D (2 patients analyzed) patient and one T2D (3 patients analyzed). Insets are magnified views of representative beta cells.

Figure 4. β ig-h3 controls activation of T cells *in vivo*. **A**, Purified T cells from diabetic STZ-treated pancreas were incubated with β ig-h3 (5 μ g/ml) for 24h and i.v transferred in Rag2KO recipient mice (5x10⁵ cells/animal). Graphs show glycaemia measurements (**B**), quantification of the percentage of CD45⁺ cells (**D**), CD8⁺ T cells expressing CD69 (**E**), IFN γ (**F**) and CD107a (**G**) at 14 days after cell transfer in mouse pancreas. **C**, Immunofluorescent staining for Insulin, Granzyme B and DAPI within the pancreas of Rag2KO recipient mice transferred with non treated T cells (control) or β ig-h3 treated T cells (treated). The results are representative of 2 independent experiments with 3 mice per group.

Acknowledgements

MP, FC, RT and DR performed the experiments. CZ provided and analyzed the human samples. AH designed the experiments. AH and MP analysed the data. AH and PB wrote the paper. This work was supported by grant from La Ligue contre le Cancer (AH, PB). RT and

DR were supported by fellowships from the French Ministry of Education and Research. The authors thank ANICAN (CRCL-Lyon) animal staffs for maintenance of mouse strains. AH is the guarantor of the content of the article. None of the authors have conflict of interest.

References

1. T. P. DiLorenzo *et al.*, During the early prediabetic period in NOD mice, the pathogenic CD8(+) T-cell population comprises multiple antigenic specificities. *Clin Immunol* **105**, 332 (Dec, 2002).
2. S. Tsai, A. Shameli, P. Santamaria, CD8+ T cells in type 1 diabetes. *Adv Immunol* **100**, 79 (2008).
3. Z. Chen, A. E. Herman, M. Matos, D. Mathis, C. Benoist, Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine* **202**, 1387 (Nov 21, 2005).
4. J. Skonier *et al.*, cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol* **11**, 511 (Sep, 1992).
5. J. Skonier *et al.*, beta ig-h3: a transforming growth factor-beta-responsive gene encoding a secreted protein that inhibits cell attachment in vitro and suppresses the growth of CHO cells in nude mice. *DNA Cell Biol* **13**, 571 (Jun, 1994).
6. K. Hashimoto *et al.*, Characterization of a cartilage-derived 66-kDa protein (RGD-CAP/beta ig-h3) that binds to collagen. *Biochim Biophys Acta* **1355**, 303 (Mar 1, 1997).
7. E. Hanssen, B. Reinboth, M. A. Gibson, Covalent and non-covalent interactions of betaig-h3 with collagen VI. Beta ig-h3 is covalently attached to the amino-terminal region of collagen VI in tissue microfibrils. *J Biol Chem* **278**, 24334 (Jul 4, 2003).
8. B. Han, S. Qi, B. Hu, H. Luo, J. Wu, TGF-beta i promotes islet beta-cell function and regeneration. *J Immunol* **186**, 5833 (May 15, 2011).
9. K. J. Han *et al.*, Increased risk of diabetes development in subjects with the hypertriglyceridemic waist phenotype: a 4-year longitudinal study. *Endocrinology and metabolism* **29**, 514 (Dec 29, 2014).
10. E. M. M. Manders, F. J. Verbeek, J. A. Aten, Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microscopy* **196**, 375 (1993).
11. P. A. Savage, J. J. Boniface, M. M. Davis, A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response. *Immunity* **10**, 485 (Apr, 1999).
12. D. A. Tumbarello, J. Temple, J. D. Brenton, ss3 integrin modulates transforming growth factor beta induced (TGFBI) function and paclitaxel response in ovarian cancer cells. *Molecular cancer* **11**, 36 (2012).
13. S. Goda, A. C. Quale, M. L. Woods, A. Felthouser, Y. Shimizu, Control of TCR-mediated activation of beta 1 integrins by the ZAP-70 tyrosine kinase interdomain B region and the linker for activation of T cells adapter protein. *J Immunol* **172**, 5379 (May 1, 2004).
14. A. M. Cimo, Z. Ahmed, B. W. McIntyre, D. E. Lewis, J. E. Ladbury, CD25 and CD69 induction by alpha4beta1 outside-in signalling requires TCR early signalling complex proteins. *The Biochemical journal* **454**, 109 (Aug 15, 2013).

15. S. J. Davis, P. A. van der Merwe, Lck and the nature of the T cell receptor trigger. *Trends Immunol* **32**, 1 (Jan, 2011).
16. I. Rhee, A. Veillette, Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nat Immunol* **13**, 439 (May, 2012).
17. H. Yamaguchi, W. A. Hendrickson, Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature* **384**, 484 (Dec 5, 1996).
18. T. J. Boggon, M. J. Eck, Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* **23**, 7918 (Oct 18, 2004).
19. K. Nika *et al.*, Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity* **32**, 766 (Jun 25, 2010).
20. S. Makino *et al.*, Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken dobutsu. Experimental animals* **29**, 1 (Jan, 1980).
21. M. F. Bachmann *et al.*, Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* **7**, 549 (Oct, 1997).
22. S. Nervi *et al.*, Specific deficiency of p56lck expression in T lymphocytes from type 1 diabetic patients. *J Immunol* **165**, 5874 (Nov 15, 2000).
23. O. Milstein *et al.*, CTLs respond with activation and granule secretion when serving as targets for T-cell recognition. *Blood* **117**, 1042 (Jan 20, 2011).

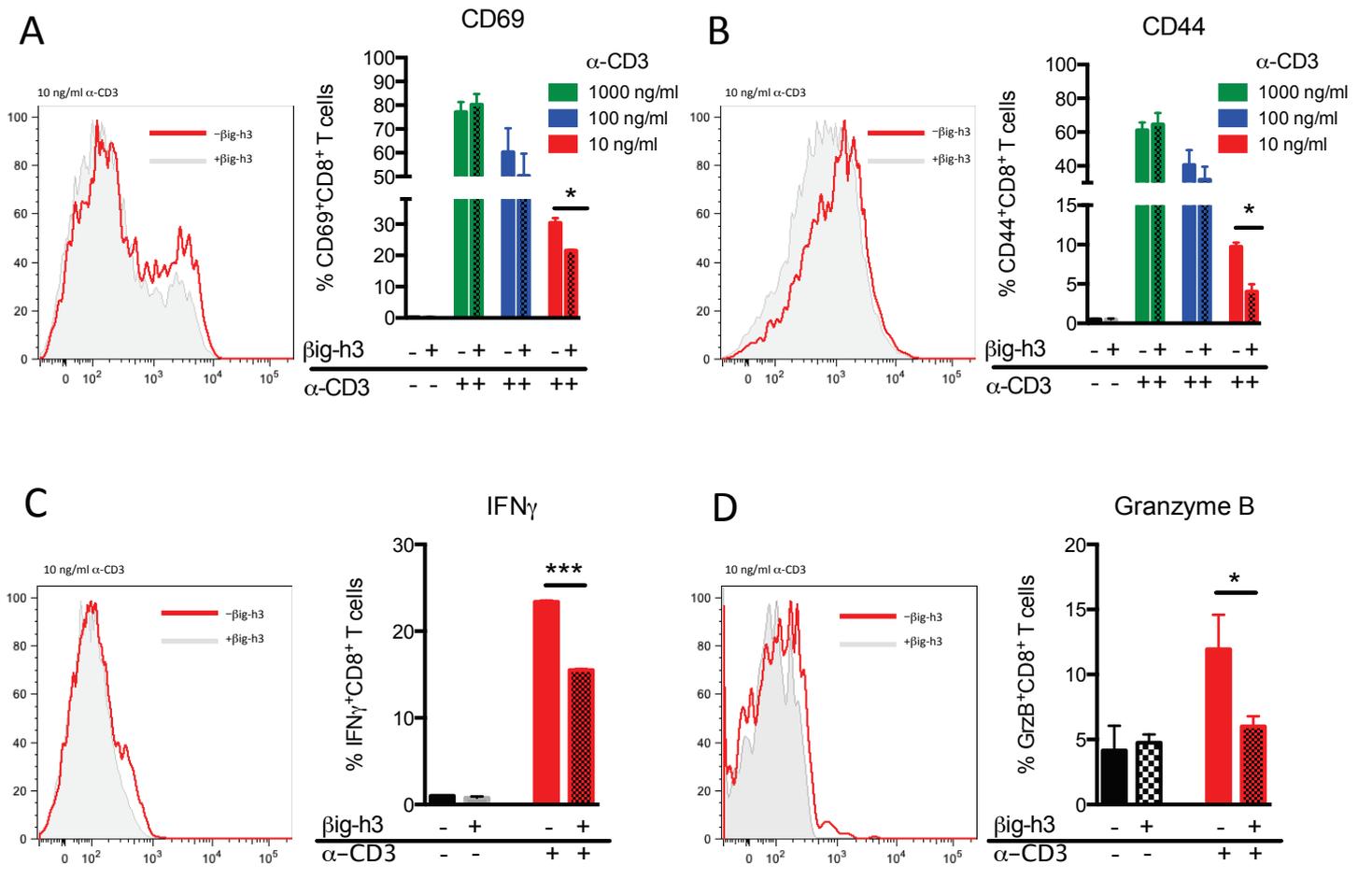


Figure 1

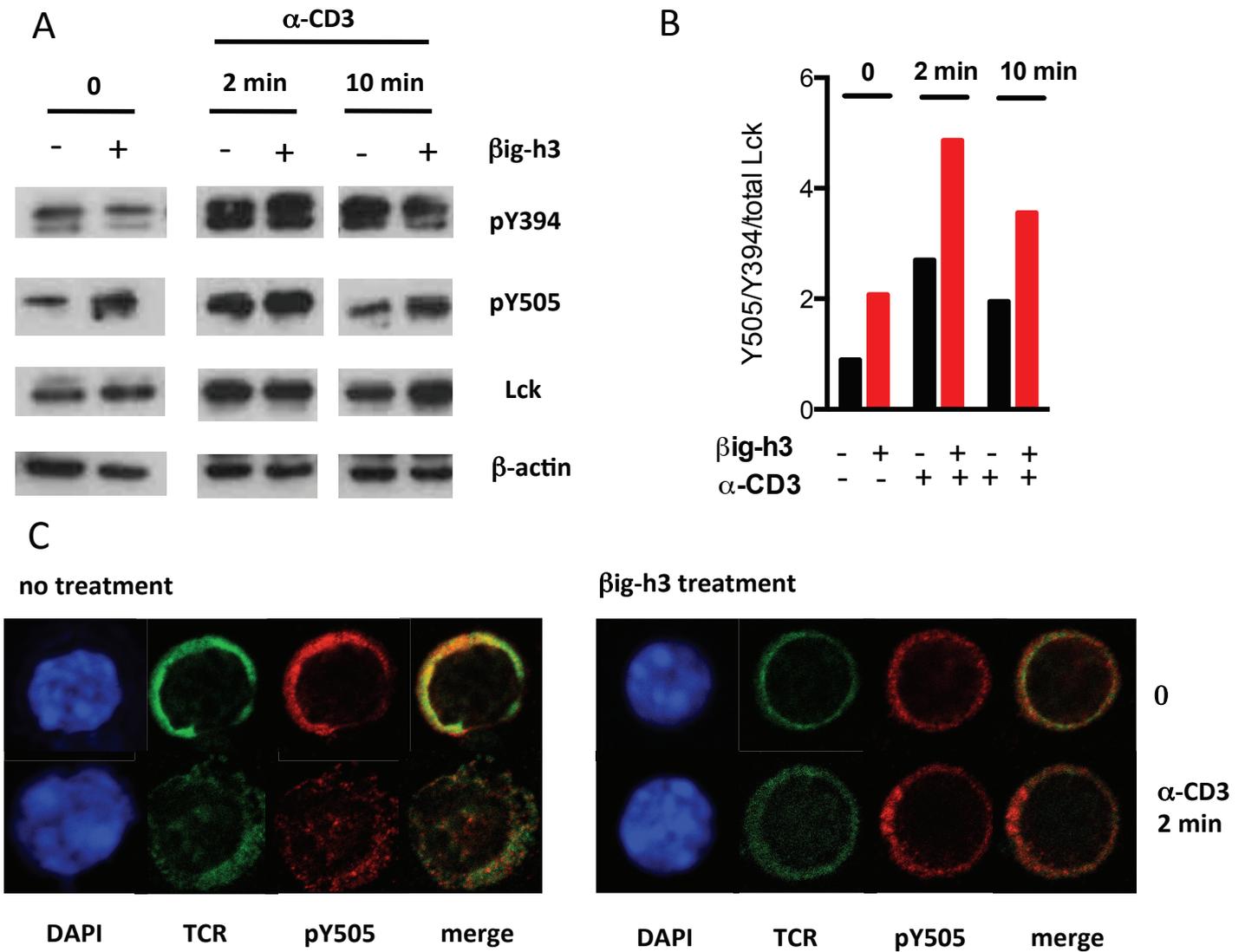


Figure 2

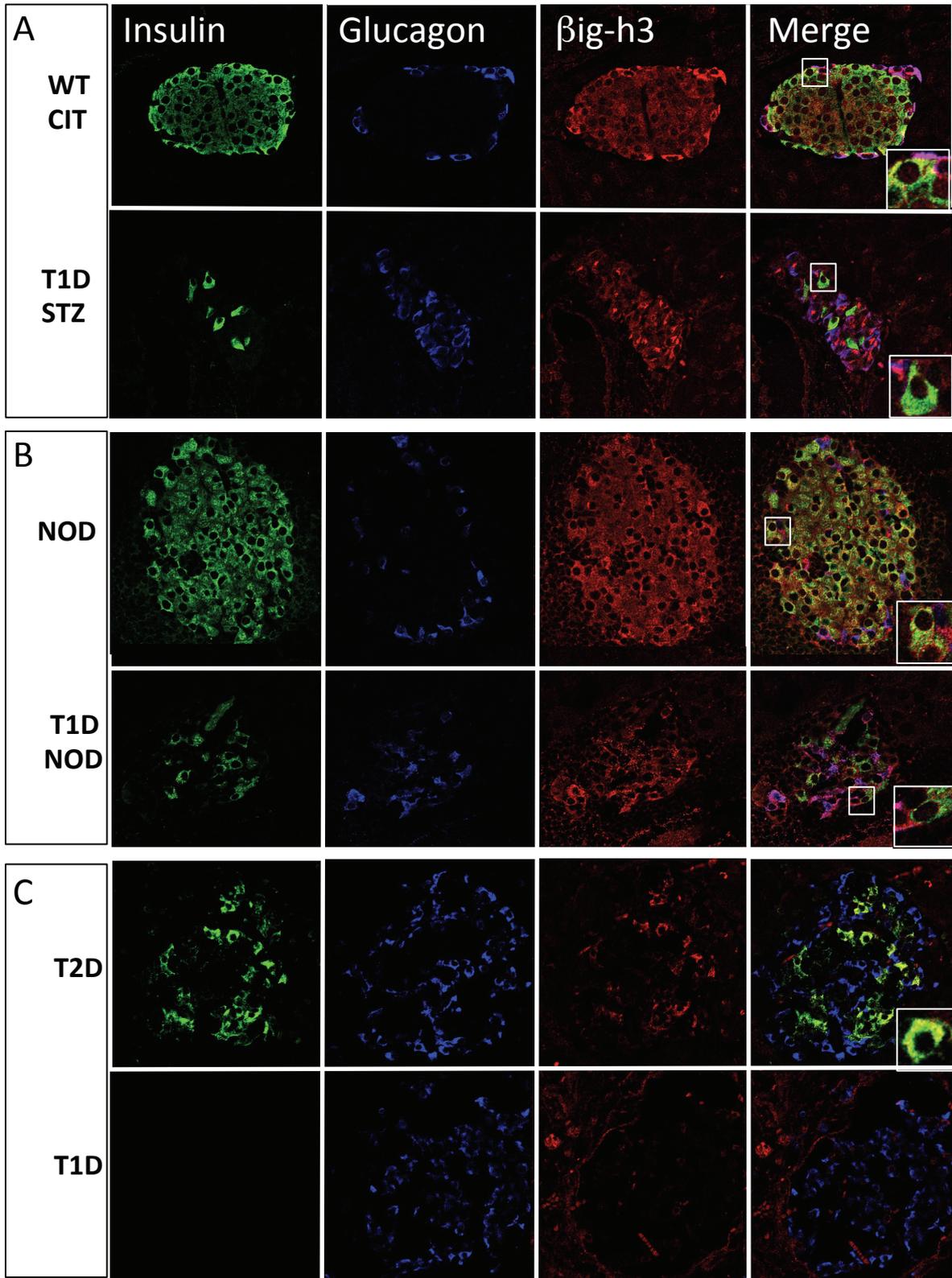


Figure 3

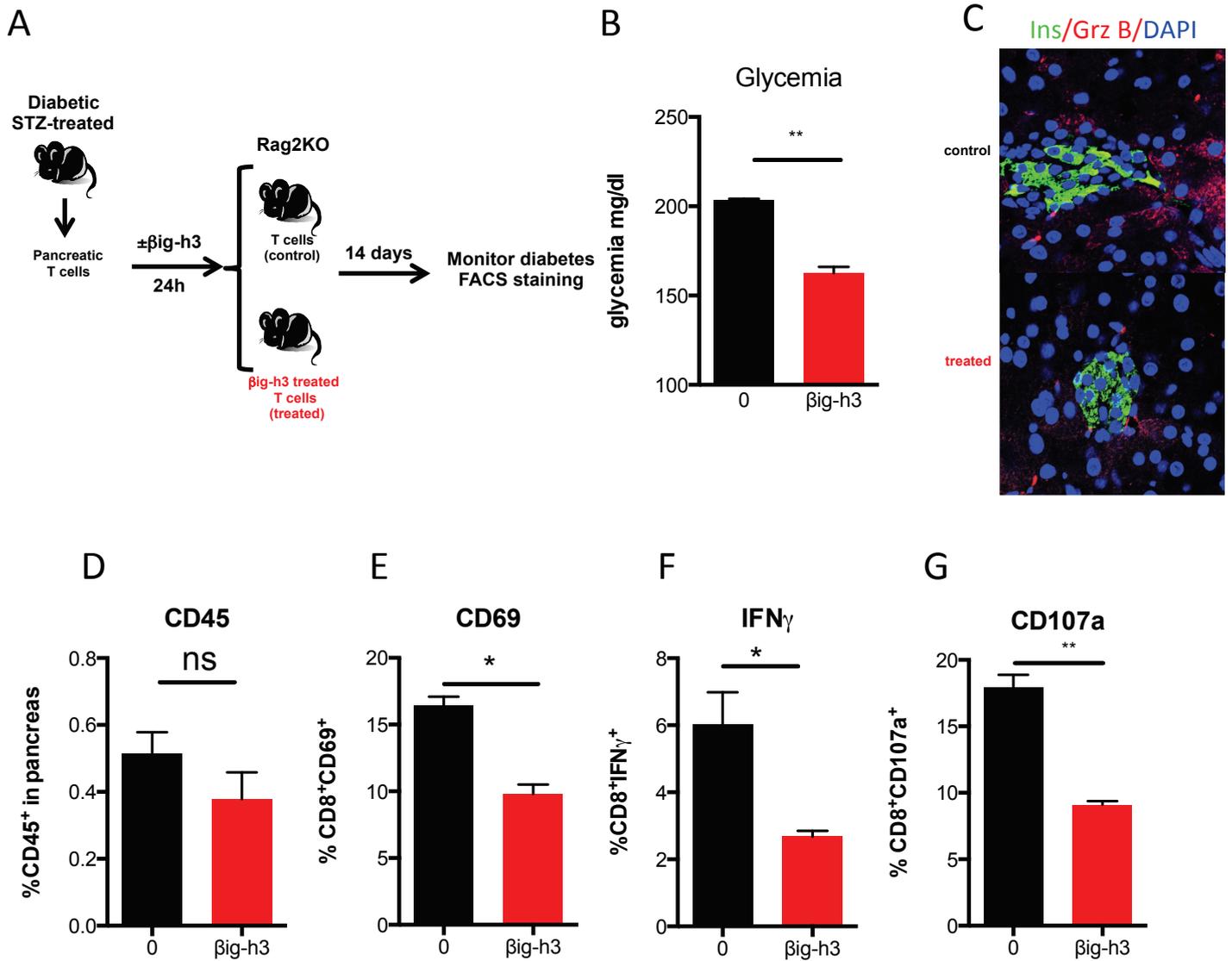


Figure 4

Preparation of pancreatic islets

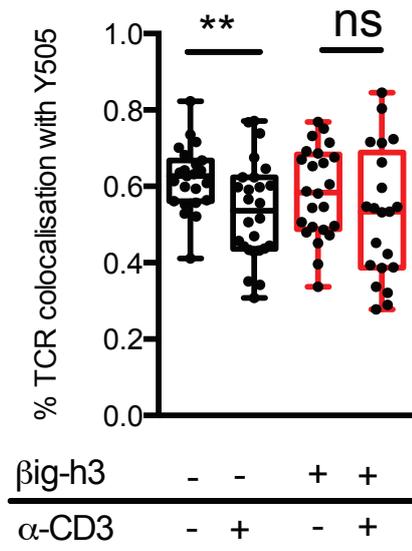
Mice were killed and pancreata were perfused with 2 ml of a solution of collagenase P (1 mg/ml, Roche) then dissected free from the surrounding tissues. Pancreata were then digested at 37°C for 20 min. Digestion was stopped adding culture media 5% FCS followed by extensive washes. Islets were then purified on Histopaque gradient and further hand-picking under magnifying loupe.

Reverse transcription and qPCR

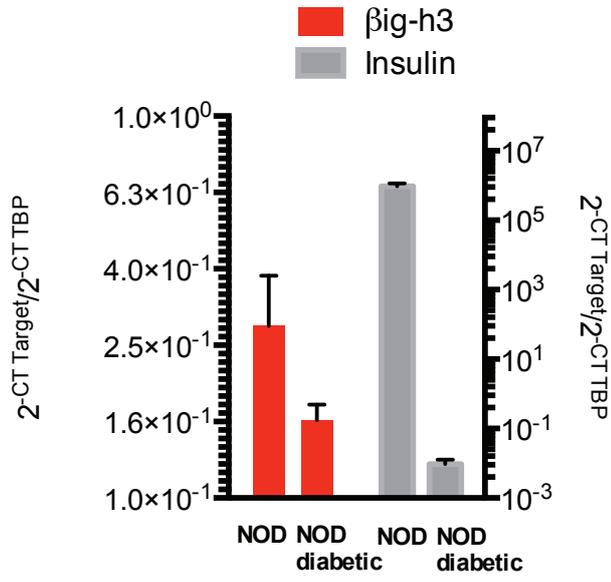
RNAs were extracted by Quiagen kit from pelleted islets according to the manufacturer. RNA concentrations were measured at Nanodrop. Reverse transcription (RT) was made on equivalent quantity of extracted RNAs (superior to 300 ng). From cDNA, quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) was made with Power SYBR® Master Mix (Life technologies) with following primers: Insulin Forward 5' AGG ACC CAC AAG TGG AAC AAC 3', Insuline Reverse 5' GTG CAG CAC TGA TCC ACA ATG 3', TBP Forward 5'-TGGTGTGCACAGGAGCCAAG-3', TBP Reverse 5'-TTCACATCACAGCTCCCCAC-3' and β ig-h3 All-in-one™ qPCR primer from GeneCopoeia.

Supplementary Fig. 1 β igh3 affects early TCR signaling. Confocal colocalisation of TCR β with pLck Y505 was calculated using Zen software according to Manders method. At least 20 images were analyzed for each molecule. The results are representative of 3 independent experiments. **P < 0.01

Supplementary Fig.2 β igh3 expression is diminished diabetic islets. qPCR analysis of β igh3 and Insulin mRNA in freshly isolated pancreatic islets. TATA-binding protein (TBP) was used as house keeping gene. The relative expressing was calculated using the equation $2^{-CT_{Target}}/2^{-CT_{TBP}}$ CT (threshold cycle). The results are representative of 2 independent experiments with 3 mice per group.



Supplementary Fig. 1



Supplementary Fig. 2

1

2 **Islet cells serve as cells of origin of pancreatic gastrin-expressing tumours**

3 **Running title:** Cell-origin of pancreatic gastrin-expressing tumors

4

5 Rémy BONNAVION^{1,2,3,*}, Rami JAAFAR^{1,2,3,§}, Doriane RIPOCHE^{1,2,3}, Emmanuelle
6 LETEURTRE^{4,5}, Yuan-Jia CHEN⁶, Jens F. REHFELD⁷, Florian LEPINASSE⁸, Valérie
7 HERVIEU^{1,2,3,8}, François PATTOU^{5,9}, Marie-Christine VANTYGHM^{5,10}, Jean-Yves
8 SCOAZEC^{1,2,3,8}, Philippe BERTOLINO^{1,2,3} and Chang Xian ZHANG^{1,2,3,11,#}

9 ¹Inserm U1052, Lyon, France;

10 ²CNRS UMR5286, Lyon, France;

11 ³Université de Lyon, Lyon , France;

12 ⁴Institut de Pathologie, CHRU de Lille, Lille, France.

13 ⁵Univ Lille 2, INSERM UMR 859 Lille, France.

14 ⁶Department of Gastroenterology, Peking Union Medical College Hospital, Beijing, China.

15 ⁷Department of Clinical Biochemistry, Rigshospitalet, University of Copenhagen, Denmark.

16 ⁸ Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Service d'Anatomie Pathologique, Lyon,
17 France.

18 ⁹CHRU Lille, Endocrine Surgery, Lille, France.

19 ¹⁰CHRU Lille, Endocrinology, Lille France

20 ¹¹Sino-French Life Science and Genomic Center, Ruijin Hospital, Shanghai, China.

21 **Key words:** gastrin, gastrinoma, MEN1, pancreatic endocrine tumours, histogenesis.

22 **Word count Material and Methods:** 645

23 **Word count Abstract, Introduction, results, discussion, Figure legends:** 3822

24 *Present address, Max-Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim,
25 GERMANY.

26 §Present address, UCSF School of Medicine, Diabetes Center, San Francisco, USA.

27 *#Address correspondence to:*

28 Chang Xian Zhang, chang.zhang@lyon.unicancer.fr

29 ***Disclosure Statement***

30 The authors have nothing to disclose.

31

32 **ABSTRACT**

33 The cells of origin of pancreatic gastrinomas remain an enigma, since no gastrin-expressing cells
34 are found in normal adult pancreas. It was proposed that the cellular origin of pancreatic
35 gastrinoma may come from either the pancreatic cells themselves or gastrin-expressing cells
36 which have migrated from the duodenum. In the current study, we further characterised
37 previously described transient pancreatic gastrin-expressing cells using cell lineage-tracing in a
38 pan-pancreatic progenitor and a pancreatic endocrine progenitor model. We provide evidence
39 showing that pancreatic gastrin-expressing cells, found from E12.5 until P7, are derived from
40 pancreatic $Ptfl1a^+$ - and $Ngn3^+$ -progenitors. Importantly, the majority of them co-express
41 glucagon, with 4% co-expressing insulin, indicating that they are a temporary subpopulation of
42 both alpha and beta cells. Interestingly, *Men1*-disruption in both $Ngn3$ -progenitors, and beta and
43 alpha cells resulted in the development of pancreatic gastrin-expressing tumours, suggesting that
44 the latter developed from islet cells. Finally, we detected gastrin expression using three human
45 cohorts of pancreatic endocrine tumours (pNETs) that have not been diagnosed as glucagonomas,
46 in 9/34 MEN1 pNETs from 6/14 MEN1 patients, in 5/35 sporadic non-functioning pNETs and in
47 2/20 sporadic insulinomas, consistent with observations made in mouse models. Our work
48 provides insight into histogenesis of pancreatic gastrin-expressing tumours.

49

50 INTRODUCTION

51 Gastrinomas are endocrine tumours which secrete the peptide hormone gastrin. They cause
52 Zollinger-Ellison syndrome (ZES), characterised by multiple duodeno-jejunal ulcers, diarrhoea
53 and gastroesophageal reflux (1). Most gastrin-producing cells are found in the adult gastric
54 antrum and, to a lesser extent, in the proximal duodenum in mammals. Intriguingly, most
55 primary gastrinomas are found in the duodenum, the rest mainly in the pancreas, and only rarely
56 in stomach and elsewhere (liver, lung, ovaries) (2). Gastrinomas develop either sporadically or
57 hereditarily as seen in patients with Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1,
58 OMIM131100). MEN1 patients develop multiple tumours in endocrine organs primarily affecting
59 parathyroid glands, the pituitary, the pancreas and the foregut. Gastrinomas are the most common
60 functioning tumours of the gastroenteropancreatic axis in MEN1 patients (3, 4), displaying
61 multiple small lesions in the duodenum and, in rare case, in the pancreas. Sporadic gastrinomas
62 are often solitary tumours occurring both in the duodenum and pancreas, with a poorly
63 understood aetiology. Interestingly, somatic *MEN1* mutations and loss of heterozygosity at the
64 *MEN1* locus have been detected in approximately 30% of both sporadic duodenal and pancreatic
65 gastrinomas (5, 6). In addition, we have previously reported gastrin-expressing pancreatic
66 tumours in about 15% of heterozygous *Men1* mutant mice (7), confirming that *MEN1*
67 inactivation plays a crucial role in the pathogenesis of gastrinomas.

68 Deciphering the cells of origin of tumours is important not only for improved understanding of
69 tumour biology but also for personalised tumour treatment with targeted therapy (8). Determining
70 the cells of origin of pancreatic gastrinomas is of special interest, since gastrin-expressing cells
71 are not found in the normal human and rodent adult pancreas. Several studies have described
72 gastrin expression in developing and neonatal mammal pancreases, which decreases rapidly after

73 birth (9-13). Analyses of extracts from rodent neonatal pancreas established that gastrin was fully
74 processed and active in the pancreas at this stage (10). Consistently, using transgenic mice
75 harbouring the *GFP* gene under the mouse gastrin promoter, Takaishi and colleagues
76 demonstrated that GFP expression could be targeted to pancreatic cells in embryonic and
77 neonatal pancreases until two days after birth (14). Passaro *et al.* postulated that stem cells
78 formed in ventral pancreatic buds could be the cell of origin of pancreatic gastrinomas found in
79 the gastrinoma triangle, based on the clinical features of the tumours (15). Indeed, pancreatic
80 endocrine cells derive from the differentiation of Ngn3 expressing progenitors, while gastric and
81 duodenal gastrin-expressing cells are also derived from endocrine progenitors expressing Ngn3 in
82 the corresponding tissue (16). This suggests that pancreatic gastrin-expressing cells may also
83 arise from Ngn3⁺ pancreatic endocrine progenitors. Recently, Suissa *et al* (17), using different
84 mouse models and cell lineage tracing, reported the existence of embryonic and perinatal gastrin-
85 expressing cell populations in the pancreas, and ascertained that they were a distinct cell lineage
86 derived from pancreatic Ngn3⁺ progenitors. However, their role in pancreatic gastrinoma
87 development has not been addressed.

88 It is worth mentioning that several previous attempts to generate mouse gastrinoma models
89 were unsuccessful. Neither the use of a gastrin promoter-driven SV40 large T Antigen (18), nor
90 that of *Men1*-disruption in Villin-expressing gastrointestinal cells gave rise to gastrinoma
91 development in the mouse (19). Altogether, the above observations prompted us to better study
92 gastrin-expressing cells in the pancreas and search alternative ways to determine the cellular
93 origin of pancreatic gastrinomas.

94

95 **MATERIALS AND METHODS**

96 **Human patient samples**

97 The study was conducted in accordance with the guidelines in the Declaration of Helsinki and
98 the use of all patient tissue specimens was carried out according to French laws and regulations.

99

100 **Animal study approval**

101 All animal maintenance and experiments were performed in accordance with the animal care
102 guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethic
103 Evaluation Committee (Protocol CLB 2010/016).

104

105 **Mouse studies**

106 *Ngn3^{tTA}* knock-in mice were generously provided by Dr Jan. N. Jensen (20). The tetO-cre
107 mouse line (B6.Cg-Tg(tetO-cre)1Jaw/J MGI:2679524) was purchased from Charles River
108 France. *Men1^{F/F}-RIPCre⁺* (β *Men1* KO) (21), *Men1^{F/F}-GluCre⁺* (α *Men1* KO) mice (22) and
109 *R26^{eYFP}* mouse lines have already been described (23). *PtflaCre* knock-in mice (24) were
110 generously provided by Dr Christopher V.E. Wright.

111

112 **Immunohistochemistry and immunofluorescence**

113 Neonate and adult pancreases were fixed in Neutral buffered formalin (Lilly's fixative) for two
114 hours at room-temperature or 18 hours at 4°C respectively, and then embedded in paraffin. Serial
115 sections of 3µM were prepared, mounted on Superfrost Plus glass slides, and subjected to
116 deparaffinization and rehydration. Immunostainings were performed as previously described
117 (25). Briefly, endogenous peroxidases were quenched in 3% H₂O₂ solution for 30 minutes at
118 room-temperature. Heat-induced epitope retrieval was performed by immersion in Antigen

119 Unmasking Solution (H-3300, Vector) in a microwave oven for 15 minutes. After blocking with
120 antibody diluent (DAKO), sections were incubated overnight with a primary antibody. For
121 immunofluorescence, stainings were revealed with Cy-3 or Cy-5 Tyramide amplification kit
122 (PerkinElmer) according to the manufacturer's instructions with prior incubation with appropriate
123 biotinylated secondary antibody, or incubated with appropriate Alexa488-555-or-647 coupled
124 secondary antibodies (Life Technologies) for one hour. For immunohistochemistry (IHC), after
125 1st antibody incubation, biotinylated secondary antibody was applied for one hour and revealed
126 using the ABC-DAB system (Vector Lab). Images were captured either on an epifluorescence
127 microscope Leica DRMB, a TCS-SP5 confocal microscope (Leica-Microsystems) or a Zeiss 780
128 confocal microscope. Cell counting was manually performed with ImageJ cell counter module
129 (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) on multiple channel pictures.
130 Graphs and results of counting are represented as mean±S.E.M.

131

132 **Antibodies**

133 Anti-gastrin (Novocastra Leica Biosystems) antibody recognizing non-sulfated (I) and sulfated
134 (II) gastrin-17 as well as gastrin-34, anti-gastrin antibody (serum 2717, Dr Jens F. Rehfeld), anti-
135 gastrin antibody (Santa Cruz -sc-7783) recognizing gastrin 17, 34 and 71, anti-progastrin (Rabbit
136 polyclonal, a kind gift from Dr Julie Pannequin) anti-Pax4 antibody (a kind gift from Dr Beatriz
137 Sosa-Pineda (26)) were used in the study (see Supplemental Table S1 for a detailed description of
138 all antibodies used in the study). Donkey secondary antibodies coupled with either Alexa 488,
139 555, or 647 were used (Life technologies, Jackson Immunoresearch). For IHC or
140 immunofluorescence with TSA, biotinylated secondary antibodies from horse or donkey were
141 used (Vector Lab). Negative controls were conducted omitting primary antibody incubation. For

142 the gastrin antibody from Santa Cruz, controls were conducted by incubating the antibody with
143 the corresponding peptide (Santa Cruz, sc-7783 P)

144

145 **Serum gastrin measurement**

146 The concentration of gastrin in serum from mice was measured with a highly sensitive gastrin-
147 RIA (27). Due to the small serum volume (<50µl), conventional gastrin-RIAs could not be used.
148 The supersensitive RIA (based on Ab. no. 921325) has a detection limit of 1.0pmol gastrin per
149 15µl sample in the incubation mixture), the cross reactivity with cholecystokinin (CCK) is minor
150 (<10%), with an intra-assay coefficient variation of 8%. Note that CCK circulates at a 10-fold
151 lower concentration than gastrin.

152

153 **PCRs**

154 Mouse islets were purified using standard Collagenase P protocol (Roche). Total RNA was
155 isolated from adult C57BL/6J mouse tissues (Charles River) using RNeasy Mini kit (QIAGEN).
156 Standard RT-PCR were performed (Annealing 60°C, 40 cycles) using the following primers.

157 *Gastrin* Fw: 5'-AACAGCGCCAGTTCAACAAG-3', *Gastrin* Rv: 5'-
158 AAGTCCATCCATCCGTAGGC-3', *CCK* Fw: 5'-TGCTAGCGCGATACATCCAG-3', *CCK*
159 Rv: 5'-ATCCATCCAGCCCATGTAGTC-3', *GIP* Fw: 5'-TTTCCCTGAGATTGCCCTGC-3',
160 *GIP* Rv: 5'-CGCAGAGGGGACTTTCATCA-3', *Insulin 2* Fw: 5'-
161 GCAGCACCTTTGTGGTTCCC-3', *Insulin 2* Rv: 5'- TGCAGTAGTTCTCCAGCTGG-3', *TBP*
162 Fw: 5'- CCCTATCACTCCTGCCACACC-3', *TBP* Rv: 5'-
163 CGAAGTGCAATGGTCTTTAGGTC-3'.

164

165 **RESULTS**

166 **Pancreatic gastrin⁺ cells represent transient subpopulations of alpha and beta cells at birth**

167 We first tried to better characterise the population of mouse neonatal pancreatic gastrin-
168 expressing (NPG) cells. Immunofluorescence (IF) analyses with an anti-gastrin antibody
169 demonstrated that scattered cells with positive cytoplasmic staining could be detected in the
170 pancreas of mouse neonates (Fig. 1A). We quantified the proportion of these NPG cells relative
171 to the total endocrine population at birth by performing double IF staining for gastrin and
172 Chromogranin A, a marker of endocrine cells (Fig. 1A). The NPG population represented
173 $4.3\pm 0.1\%$ of total endocrine cell number at P0, but became undetectable at P7 (data not shown),
174 consistent with previous results reported in the literature (17, 28). We noticed that in normal
175 mouse adult pancreas, weak expression of both gastrin and progastrin was detected in alpha cells
176 with one of the anti-gastrin antibodies used in this study (SCBT, Fig. S1A) and anti-progastrin
177 antibody (Julie Pannequin, Fig. S1B), both antibodies giving rise to positively stained cells in the
178 antrum and proximal duodenum (data not shown). Moreover, *Gastrin* transcript but not
179 *Cholecystikinin* transcript was also detected in RNA isolated from mouse adult pancreas (Fig.
180 S1C). The data supports the existence of either residual gastrin expression or a differently
181 processed gastrin peptide in the adult pancreatic alpha cells. The related peptide hormone CCK
182 was not expressed at P0 in the pancreas but was detectable in the duodenum at birth, as was
183 gastrin (Fig. 1B), confirming that there was no cross-reaction with CCK by the anti-gastrin
184 antibody used in this study. Next, we checked the existence of gastrin⁺ cells in mouse developing
185 pancreas. Gastrin⁺ cells were readily detected but rarely at E12.5 and the population was
186 markedly increased at E14.5 in the wild-type mouse developing pancreas (Fig. 1C).

187 Furukawa and colleagues observed previously that some gastrin⁺ cells were also positive for
188 insulin staining using the restaining method (12). By double-IF staining, we could indeed detect
189 rare cells expressing both gastrin (Novocastra's antibody) and insulin (Fig. 1A and 1D),
190 accounting for $4.4\% \pm 1.8$ of total NPG cells, while most NPG cells were negative for insulin.
191 Since we observed that most NPG cells localised to the periphery of mouse developing endocrine
192 islets, where most alpha cells reside, we sought to determine if these NPG cells could express
193 glucagon. Indeed, a very high proportion, $85.5\% \pm 7.3$, of NPG cells was found to also express
194 glucagon (Fig. 1A and 1D). Thus it appears that NPG cells represent subpopulations of both
195 developing alpha and beta cells. We performed double staining of gastrin with other pancreatic
196 hormones and we found that somatostatin⁺ cells did not express gastrin at P0 (Fig. S2). In order
197 to identify cells only expressing gastrin and none of the other pancreatic hormones, we performed
198 double staining with gastrin antibody and a cocktail of pancreatic hormones (insulin, glucagon,
199 somatostatin, and ghrelin). A very small proportion ($3.3\% \pm 1.3$) of gastrin expressing cells was
200 indeed negative for the hormonal cocktail (Fig. 1D).

201
202 **Pancreatic gastrin⁺ cells originate from pancreatic-progenitors within the developing**
203 **pancreas**

204 Considering that all alpha and beta cells are derived from Ngn3⁺ endocrine progenitors, we
205 suspected that NPG might also be derived from the differentiation of pancreatic progenitors, as
206 virtually all NPG cells expressed either glucagon or insulin. In order to determine if NPG were
207 derived from pancreatic progenitors instead of resulting from the migration of gut progenitors or
208 gut differentiated cells, we performed lineage tracing experiments with *PtflaCre⁺-R26eYFP*
209 mice, since *Ptfla*-expressing cells during development give rise only to pancreatic acinar, ductal

210 and endocrine cells (24) (Fig. 2A). Using double IF staining, $61.3 \pm 4.1\%$ NPG cells were found to
211 also express the YFP reporter in *Ptf1aCre⁺-R26eYFP* mice (n=3 mice) (Fig. 2B), confirming our
212 hypothesis.

213 We next genetically traced the progeny of Ngn3^+ pancreatic endocrine progenitors using
214 *Ngn3^{wt/tTA}-tet-Ocre-R26eYFP* mice (Fig. 2A). As demonstrated in Fig. 2B, YFP expression could
215 be detected in NPG cells from these mice, consistent with Suissa *et al*'s finding. We noticed that,
216 in wild-type neonatal mouse pancreases, all the gastrin⁺ cells expressed menin protein at the same
217 level as that observed in other islet cells (Fig. 2C). We then analysed *Men1^{F/F}-Ngn3^{wt/tTA}-tet-*
218 *Ocre-R26eYFP* mice where the *Men1* gene can be disrupted in Ngn3-expressing cells, referred to
219 as *PancEndoMen1 KO* mice. Menin expression was lost in about 20% of NPG cells ($20.2 \pm 4.7\%$)
220 from *PancEndoMen1 KO* mice (Fig. 2C), further confirming the above cell-tracing data using
221 YFP. Our results indicate that NPG cells are derived from the pan-pancreatic (*Ptf1a*⁺) and
222 pancreatic endocrine (Ngn3^+) progenitors. Taken together, we define, for the first time, NPG cells
223 as temporal subpopulations of either Glu^+ or Ins^+ cells, with pancreatic progenitors as their
224 common cell of origin.

225

226 **Perinatal pancreatic gastrin-expressing cells display a distinct molecular signature**

227 To study the relation between NPG cells and duodenal G cells, we compared the gene
228 expression profile of several factors known to be expressed in these cells. Analyses of
229 transcription factors expressed by NPG cells showed that they displayed high MafB expression
230 and some also expressed low-levels of Pdx1 at P0 whereas they did not express MafA, Pax4,
231 Cdx2 or Ngn3 (Fig. 3A). Interestingly, duodenal G cells at P0 displayed an MafB^- , $\text{Pdx1}^{\text{High/Low}}$,

232 MafA⁻, Pax4⁺, Cdx2^{-/low} expression profile (Fig. 3B), showing that they are a cell population
233 distinct from NPG cells.

234

235 **Mouse pancreatic gastrin-expressing tumours develop upon *Men1*-disruption in both Ngn3⁺**
236 **pancreatic progenitors and insulin- or glucagon-expressing cells**

237 Having identified that NPG cells were derived from pancreatic progenitors, we hypothesised
238 that the pancreatic progenitors and their derivatives, including NPG cells, could be among the
239 cells of origin of pancreatic gastrinomas. To test this hypothesis, we examined aged mice with
240 *Men1*-disruption in Ngn3⁺ progenitors. Histological analyses of pancreas dissected from aged
241 *PancEndoMen1* KO mice showed that 12-month-old mutant mice displayed a high amount of
242 endocrine lesions. Tumour lesions exhibited a complete loss of menin expression as expected
243 (Fig. 4A), due to Ngn3-Cre-mediated gene disruption in pancreatic endocrine progenitors, with
244 most of them positive for insulin staining by IHC (the detailed data concerning the analysis of
245 other islet tumours will be published elsewhere). Interestingly, by using gastrin antibody, several
246 tumours were positively stained (Fig. 4A) compared with other adjacent islet tumours, whereas
247 CCK was not detected with two different antibodies in these gastrin immunoreactive tumour cells
248 (data not shown). The frequency of gastrin⁺ lesions in the *PancEndoMen1* KO mouse model is
249 reported in Table 1.

250 Unexpectedly, we found that gastrin⁺ tumours were also insulin⁺ with a much lower intensity
251 as compared with other insulin⁺ tumours negative for gastrin and other hormones (Fig. 4A and
252 Fig. S3A). Similar results were obtained when studying the occurrence of gastrin⁺ lesions in
253 *PancMen1* KO mice (*Men1^{FF}-PtflaCre⁺*), but with a higher proportion of analysed mice (8/9)
254 displaying pancreatic gastrin⁺ tumours (Fig. 4B and Table 1).

255 Since NPG cells co-express insulin or glucagon at birth, we next sought to determine whether
256 perinatal *Men1*-disruption specifically in insulin⁺ or glucagon⁺ cells led to gastrin⁺ tumour
257 development. Careful analysis of menin deficient lesions from *Men1^{F/F}-RipCre* mice (*βMen1*) at
258 12 months of age revealed the occurrence of gastrin⁺ lesions (Fig. 4B). The cells expressing
259 gastrin in tumours also expressed insulin, but not glucagon, as demonstrated by triple IF staining
260 (Fig. 4C and Fig. S3A). Three out of four analysed mice developed at least one gastrin⁺ tumour
261 with a total of five gastrin⁺ lesions out of 106 lesions analysed (see Table 1). Molecular
262 characterisation of gastrin⁺ tumours from *PancEndoMen1* and *βMen1* KO mice demonstrated that
263 gastrin-expressing tumours were Pdx1⁺, consistent with a beta cell-gastrin⁺ origin of these
264 tumours (Fig. 4D). Nevertheless, Ki67 analyses did not reveal any difference in proliferation as
265 compared to other insulin-expressing tumours (Fig. S3B). In parallel, the same analyses were also
266 carried out in the mutant mice where the *Men1* gene was specifically disrupted in glucagon⁺ cells
267 (*αMen1*). All the glucagon-expressing lesions in 12-18 month-old *αMen1* KO mice were positive
268 for gastrin detection with the anti-gastrin antibody (SCBT), but negative for progastrin detection
269 with Progastrin antibody (homemade). When using other gastrin antibodies, we observed a
270 similar occurrence of gastrin⁺ lesions to that found in *βMen1* KO mice (Table 1). To homogenise
271 the data, only those lesions revealed positive by the gastrin antibody used in clinic (Novocastra)
272 were considered gastrin⁺ lesions and listed in Table 1. We additionally measured the
273 concentration of gastrin in the serum of 12 month-old *PancEndoMen1* and *βMen1* KO mice. We
274 did not detect significant elevated serum gastrin levels in mice presenting with pancreatic gastrin⁺
275 tumours, possibly reflecting the non-functionality of these lesions (Fig. S3C and S3D).

276

277 **Gastrin-expressing cells can be seen in a substantial number of human islet tumours that**
278 **were not diagnosed as gastrinoma**

279 These observations prompted us to examine how frequently gastrin coexpression was found in
280 human islet tumour lesions that were not previously diagnosed as gastrinoma. To this end, we
281 performed gastrin detection by IHC using gastrin antibody (Novocastra) in a panel of 34 pNETs
282 from 14 MEN1 patients, 35 sporadic non-functioning pNETs and another panel of 20 sporadic
283 insulinomas. As shown in Fig. 5A and B, gastrin expression was detected in 9/34 MEN1 pNETs
284 tested (from 6/14 MEN1 patients), in 5/35 sporadic non-functioning pNETs and in 2/20 cases of
285 sporadic insulinomas. Among the five sporadic NF pNETs expressing gastrin, two displayed
286 additional insulin and glucagon expression. Among 34 MEN1 pNETs, only two tumours were
287 positive for insulin, both being negative for gastrin. The remaining MEN1 pNETs were glucagon
288 and/or pancreatic polypeptide (PP) positive. Double staining further demonstrated that gastrin⁺
289 cells in MEN1 pNETs were also coexpressing glucagon or PP (Fig. 5C) in tested tumours, while
290 in the two gastrin-positive sporadic insulinomas, gastrin⁺ cells were negative for glucagon but
291 frequently coexpressed insulin (Fig. 5C).

292

293

294 **DISCUSSION**

295

296 By better defining the pancreatic gastrin-expressing cells, the current work revealed some new
297 features of perinatal pancreatic gastrin⁺ cells. Our data extends the origin of NPG cells further to
298 pancreatic Ptf1a⁺-progenitors. Importantly, the presence of only a few gastrin⁺ cells not co-
299 expressing other islet hormones at the perinatal stage, the period, unfortunately, omitted in Suissa

300 *et al*'s work, adds important information for the definition of NGP cells. The low number of
301 monohormonal gastrin⁺ cells at birth detected in our study suggests that, at birth, the
302 monohormonal population initially described by Suissa *et al* either undergoes cell death, or
303 further differentiates into double positive cells Glu⁺Gastrin⁺ or Ins⁺Gastrin⁺. The future
304 generation of inducible Gastrin⁺-cell-specific Cre driver mouse lines combined with lineage
305 tracing will certainly provide useful answers to this issue. Our data also provide evidence
306 suggesting that adult alpha cells may still express some residual level of gastrin, since adult alpha
307 cells are weakly, yet consistently, positive to both gastrin (SCBT) and progastrin antibodies, and
308 that *Gastrin* transcript can be detected in adult pancreas. The fact that only one of the three
309 gastrin antibodies used in this study displayed positive detection suggests that gastrin detected in
310 adult alpha cells may represent a differently processed peptide form of gastrin. Considering the
311 existence of numerous gastrin peptides reported in the literature (29), more specific tools and
312 approaches would be needed to completely clarify the issue. Taken together, we defined the NPG
313 cells as temporal subpopulations of islet cells, with pancreatic progenitors as their common cell
314 origin.

315 To our knowledge, the attempt to generate a mouse gastrinoma model has been so far
316 unsuccessful, hampering detailed experimental analyses. Interestingly, targeting distinct islet cell
317 lineages, including in particular Ptf1a⁺ and Ngn3⁺ pancreatic progenitors, alpha and beta cells,
318 triggered the development of pancreatic gastrin-expressing tumours in all the different mouse
319 *Men1* models. Importantly, our data showed that these mouse gastrin-expressing tumours do not
320 exactly mimic human pancreatic gastrinoma, giving rise to hormonal symptoms due to
321 hypergastrinemia, which is rarely seen in MEN1 patients according to detailed analyses provided
322 by Pipeleers-Marichal, *et al* (30). Keeping the clinical definition of human pancreatic gastrinoma

323 in mind, we prefer to describe the lesions found in our mouse models as “pancreatic gastrin-
324 expressing tumours” or “pancreatic gastrin⁺ tumours”. Interestingly, we detected gastrin-
325 expressing lesions in a substantial proportion of patients from three cohorts of human islet
326 tumours previously not diagnosed as gastrinoma: MEN1 islet tumours, sporadic non-functioning
327 islet tumours and insulinomas. Our data provide evidence showing that not only do human
328 gastrin-expressing lesions similar to those found in our murine models exist, but also that they
329 may be more frequent than may be expected. These gastrin⁺ cells could have been missed at
330 diagnosis because of the lack of clinical symptom and of specific but sensitive antibodies for
331 gastrin detection. Importantly, the gastrin⁺ tumors that we described here in our mouse models
332 and in human patients may represent pre-lesions of pancreatic gastrinoma and could clinically
333 “awake”, giving rise to gastrinoma. Taken together, the observation made in *Men1*-deficient
334 mouse models, revealing no gastrinoma associated with hypergastrinemia but pancreatic gastrin-
335 expressing tumours, is consistent with the data obtained by analyses of three patient cohorts, and
336 also reminiscent of what has been described by many clinical studies.

337 By direct cell-specific *Men1* ablation, the current work affords, for the first time, strong
338 evidence showing that islet-cells themselves, either progenitors or differentiated cells, serve as
339 the cells of origin of pancreatic gastrin-expressing tumors. Our data may also suggest that the
340 above mentioned NPG cells could also be among the cells of origin of these tumours, considering
341 their ontogeny described in the current study. Remarkably, the frequency of gastrin⁺ tumors
342 found in each of the above models resembles the proportion of gastrin-positive cells found during
343 the late embryonic and neonatal period. Interestingly, a similar situation may occur in humans,
344 since Anlauf and colleagues reported that in two tumour banks comprising a total of 300 NF
345 pNETs, 3% were stained positive for gastrin (9/300) (31). However, we consider that the NPG

346 cells are by no means the unique cell of origin of pancreatic gastrinomas. Other possibilities may
347 also be involved in pancreatic gastrinoma development, such as the ectopic expression or
348 reexpression of gastrin by islet tumour cells. The latter can be tested in the future by disrupting
349 the *Men1* gene uniquely in adult islet cells using an inducible Cre/loxP system.

350 Although pancreatic gastrinomas are described in general as monohormonal tumours, clinical
351 observations often report them displaying co-expression of other islet-hormones (32, 33). The
352 data from our analysis of human islet tumours are consistent with these previous works.
353 Intriguingly, we noticed that the gastrin⁺ islet-lesions observed in our *PancEndoMen1* mutant
354 mice co-express insulin. It may suggest that the gastrin⁺glucagon⁺ subpopulation could be less
355 sensitive to *Men1*-disruption and other tumourigenic stimuli, compared with the gastrin⁺insulin⁺
356 subpopulation. The fact that the transgenic mice carrying SV40 large T Antigen under the control
357 of the gastrin promoter gave rise only to insulinomas but not glucagonoma may support such a
358 hypothesis (18). However, this may not be the case in humans, since many gastrin⁺ MEN1 islet
359 tumours expressed glucagon in our study. Due to the rarity of MEN1 islet tumours, the
360 significance of this will need to be further studied in a larger cohort.

361 In conclusion, the current study provides meaningful insights into both the ontogeny of islet
362 NPG cells and the histogenesis of pancreatic gastrinomas. Our data pave the way for further
363 studies of molecular mechanisms controlling the development of pancreatic gastrinomas. The
364 mouse gastrin-expressing tumour models generated in the current study, the first of their kind,
365 will also be of help for the conception of new strategies for diagnosis and treatment of the
366 disease.

367

368

369

370 **ACKNOWLEDGMENTS**

371 We thank all the members of the animal facilities ALECS-Co, ALECS-SPF and ANICAN. We
372 are also grateful to the staff from the CECIL imaging facility and especially Christophe Vanbelle.
373 We are especially grateful to Dr Jan N. Jensen for providing the *Ngn3^{wt/tTA}* mouse line, Dr
374 Christopher V.E. Wright for providing *PtflaCre* mice, Dr J. Chayvialle and Dr Colette Roche for
375 anti-CCK antibodies, Dr Beatriz Sosa-Pineda for anti-Pax4 antibodies, and Dr Julie Pannequin
376 for anti-Progastrin antibodies. We would like to thank Dr Chloe Tessereau, Dr Ruzzniewski, Dr
377 Gradwohl and Dr Xianxin Hua for stimulating discussions.

378 This study was supported by the Ligue contre le Cancer du Rhône (to CXZ) and de la Loire (to
379 PB); Agence National de Recherche (grant SVSE2 ANR 10 BLAN 1240 04), the CMIRA
380 program of Region Rhône-Alpes (12004959-01); R.B was the recipient of a 4th year doctoral
381 fellowship from the Fondation ARC (DOC20120605135).

382

383 **AUTHORS CONTRIBUTIONS**

384 R.B conducted the experiments, analyzed and interpreted the data, prepared Fig.s and manuscript;
385 R.J and D.R provided technical and material support and participated in interpretation of data;
386 E.L, JY.S, F.L, V.H, YJ.C, F.P and MC.V supervised the development of the tissue banks,
387 performed pathological analyses, provided material support and participated in interpretation of
388 data; JF.R participated in study concept and provided critical revision of the manuscript; P.B
389 participated in study concept, design and supervision, and provided critical revision of the

390 manuscript; C.X.Z conceived and supervised the study and manuscript preparation, and obtained
391 funding.

392

393 REFERENCES

- 394 1. **Zollinger RM.** 1987. Gastrinoma: the Zollinger-Ellison syndrome. *Semin Oncol* **14**:247-252.
- 395 2. **Tartaglia A, Vezzadini C, Bianchini S, Vezzadini P.** 2005. Gastrinoma of the stomach: a case
396 report. *Int J Gastrointest Cancer* **35**:211-216.
- 397 3. **Halfdanarson TR, Rubin J, Farnell MB, Grant CS, Petersen GM.** 2008. Pancreatic endocrine
398 neoplasms: epidemiology and prognosis of pancreatic endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*
399 **15**:409-427.
- 400 4. **Thakker RV.** 2014. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4). *Molecular*
401 *and cellular endocrinology* **386**:2-15.
- 402 5. **Debelenko LV, Zhuang Z, Emmert-Buck MR, Chandrasekharappa SC, Manickam P, Guru SC,**
403 **Marx SJ, Skarulis MC, Spiegel AM, Collins FS, Jensen RT, Liotta LA, Lubensky IA.** 1997. Allelic
404 deletions on chromosome 11q13 in multiple endocrine neoplasia type 1-associated and sporadic
405 gastrinomas and pancreatic endocrine tumors. *Cancer Res* **57**:2238-2243.
- 406 6. **Zhuang Z, Vortmeyer AO, Pack S, Huang S, Pham TA, Wang C, Park WS, Agarwal SK, Debelenko**
407 **LV, Kester M, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Yu F, Heppner C, Crabtree JS, Skarulis MC,**
408 **Venzon DJ, Emmert-Buck MR, Spiegel AM, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Burns AL, Marx**
409 **SJ, Lubensky IA, et al.** 1997. Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in sporadic
410 gastrinomas and insulinomas. *Cancer Res* **57**:4682-4686.
- 411 7. **Bertolino P, Tong WM, Galendo D, Wang ZQ, Zhang CX.** 2003. Heterozygous Men1 mutant mice
412 develop a range of endocrine tumors mimicking multiple endocrine neoplasia type 1. *Mol*
413 *Endocrinol* **17**:1880-1892.
- 414 8. **Blanpain C.** 2013. Tracing the cellular origin of cancer. *Nat Cell Biol* **15**:126-134.
- 415 9. **Larsson LI, Rehfeld JF, Sundler F, Hakanson R.** 1976. Pancreatic gastrin in foetal and neonatal
416 rats. *Nature* **262**:609-610.
- 417 10. **Bardram L, Hilsted L, Rehfeld JF.** 1990. Progastrin expression in mammalian pancreas.
418 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**:298-302.
- 419 11. **Brand SJ, Fuller PJ.** 1988. Differential gastrin gene expression in rat gastrointestinal tract and
420 pancreas during neonatal development. *The Journal of biological chemistry* **263**:5341-5347.
- 421 12. **Furukawa M, Magami Y, Azuma T, Inokuchi H, Nakayama D, Moriyasu F, Kawai K, Hattori T.**
422 2001. Proliferation and functional changes of pancreatic gastrin cells in neonatal rat. *Pancreas*
423 **23**:421-426.
- 424 13. **Gittes GK, Rutter WJ, Debas HT.** 1993. Initiation of gastrin expression during the development of
425 the mouse pancreas. *American journal of surgery* **165**:23-25; discussion 25-26.
- 426 14. **Takaishi S, Shibata W, Tomita H, Jin G, Yang X, Ericksen R, Dubeykovskaya Z, Asfaha S, Quante**
427 **M, Betz KS, Shulkes A, Wang TC.** 2011. In vivo analysis of mouse gastrin gene regulation in
428 enhanced GFP-BAC transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**:G334-344.
- 429 15. **Passaro E, Jr., Howard TJ, Sawicki MP, Watt PC, Stabile BE.** 1998. The origin of sporadic
430 gastrinomas within the gastrinoma triangle: a theory. *Arch Surg* **133**:13-16; discussion 17.

- 431 16. **Jenny M, Uhl C, Roche C, Duluc I, Guillermin V, Guillemot F, Jensen J, Kedinger M, Gradwohl G.** 2002. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J* **21**:6338-6347.
- 432
- 433
- 434 17. **Suissa Y, Magenheim J, Stolovich-Rain M, Hija A, Collombat P, Mansouri A, Sussel L, Sosa-Pineda B, McCracken K, Wells JM, Heller RS, Dor Y, Glaser B.** 2013. Gastrin: a distinct fate of neurogenin3 positive progenitor cells in the embryonic pancreas. *PloS one* **8**:e70397.
- 435
- 436
- 437 18. **Montag AG, Oka T, Baek KH, Choi CS, Jay G, Agarwal K.** 1993. Tumors in hepatobiliary tract and pancreatic islet tissues of transgenic mice harboring gastrin simian virus 40 large tumor antigen fusion gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**:6696-6700.
- 438
- 439
- 440
- 441 19. **Veniaminova NA, Hayes MM, Varney JM, Merchant JL.** 2012. Conditional deletion of menin results in antral G cell hyperplasia and hypergastrinemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **303**:G752-764.
- 442
- 443
- 444 20. **Wang S, Jensen JN, Seymour PA, Hsu W, Dor Y, Sander M, Magnuson MA, Serup P, Gu G.** 2009. Sustained Neurog3 expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:9715-9720.
- 445
- 446
- 447
- 448 21. **Bertolino P, Tong WM, Herrera PL, Casse H, Zhang CX, Wang ZQ.** 2003. Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer research* **63**:4836-4841.
- 449
- 450
- 451 22. **Lu J, Herrera PL, Carreira C, Bonnavion R, Seigne C, Calender A, Bertolino P, Zhang CX.** 2010. Alpha cell-specific Men1 ablation triggers the transdifferentiation of glucagon-expressing cells and insulinoma development. *Gastroenterology* **138**:1954-1965.
- 452
- 453
- 454 23. **Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, William CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F.** 2001. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC developmental biology* **1**:4.
- 455
- 456
- 457 24. **Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV.** 2002. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature genetics* **32**:128-134.
- 458
- 459
- 460 25. **Bonnavion R, Jaafar R, Kerr-Conte J, Assade F, van Stralen E, Leteurtre E, Pouponnot C, Gargani S, Pattou F, Bertolino P, Cordier-Bussat M, Lu J, Zhang CX.** 2013. Both PAX4 and MAFA Are Expressed in a Substantial Proportion of Normal Human Pancreatic Alpha Cells and Deregulated in Patients with Type 2 Diabetes. *PloS one* **8**:e72194.
- 461
- 462
- 463
- 464 26. **Wang Q, Elghazi L, Martin S, Martins I, Srinivasan RS, Geng X, Sleeman M, Collombat P, Houghton J, Sosa-Pineda B.** 2008. Ghrelin is a novel target of Pax4 in endocrine progenitors of the pancreas and duodenum. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **237**:51-61.
- 465
- 466
- 467
- 468 27. **Rehfeld JF, Ericsson P.** 2012. Supersensitive gastrin assay using antibodies raised against a cholecystokinin homolog. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* **72**:175-179.
- 469
- 470
- 471 28. **Shimizu K, Shiratori K, Sakayori N, Kobayashi M, Hayashi N.** 1999. Expression of cholecystokinin in the pancreas during development. *Pancreas* **19**:98-104.
- 472
- 473 29. **Rehfeld JF.** 2006. The endoproteolytic maturation of progastrin and procholecystokinin. *Journal of molecular medicine* **84**:544-550.
- 474
- 475 30. **Pipeleers-Marichal M, Somers G, Willems G, Foulis A, Imrie C, Bishop AE, Polak JM, Hacki WH, Stamm B, Heitz PU, et al.** 1990. Gastrinomas in the duodenum of patients with multiple
- 476

- 477 endocrine neoplasia type 1 and the Zollinger-Ellison syndrome. The New England journal of
478 medicine **322**:723-727.
- 479 31. **Anlauf M, Garbrecht N, Henopp T, Schmitt A, Schlenger R, Raffel A, Krausch M, Gimm O,**
480 **Eisenberger CF, Knoefel WT, Dralle H, Komminoth P, Heitz PU, Perren A, Kloppel G.** 2006.
481 Sporadic versus hereditary gastrinomas of the duodenum and pancreas: distinct clinico-
482 pathological and epidemiological features. World journal of gastroenterology : WJG **12**:5440-
483 5446.
- 484 32. **Kapran Y, Bauersfeld J, Anlauf M, Sipos B, Kloppel G.** 2006. Multihormonality and entrapment
485 of islets in pancreatic endocrine tumors. Virchows Archiv : an international journal of pathology
486 **448**:394-398.
- 487 33. **Larsson LI, Grimelius L, Hakanson R, Rehfeld JF, Stadil F, Holst J, Angervall L, Sundler F.** 1975.
488 Mixed endocrine pancreatic tumors producing several peptide hormones. The American journal
489 of pathology **79**:271-284.

490

491

Table 1 Summary of gastrin expressing lesions in different models of *Men1* disruption

Model	n mouse with gastrin lesion/ n total mice	n gastrin⁺ lesion / n total lesions (%)
<i>PancMen1</i> KO	8/9	14/346 (4.0%)
<i>PancEndoMen1</i> KO	2/4	2/70 (2.9%)
β <i>Men1</i> KO	3/4	5/106 (4.7%)
α <i>Men1</i> KO	1/6	1/34 (2.9%)

FIG. LEGENDS

Fig. 1. Neonatal gastrin-expressing cells represent subsets of alpha and beta cells. (A) Immunofluorescence (IF) colocalisation of gastrin and Chromogranin A, insulin, or glucagon in the pancreas of new-born wild-type mice ($3 \leq n \leq 6$ mice). Scale bars = $20 \mu\text{m}$. (B) Representative IHC stainings for gastrin and CCK in wild-type mouse pancreas and duodenum at birth. Magnified views of the dashed area are showed at the middle panel. Scale bar = $50 \mu\text{M}$. (C) Representative IHC stainings for gastrin in wild-type mouse pancreas at E12.5 and E14.5 ($n = 3$ mice/age). Scale bar = $50 \mu\text{m}$. (D) Graph representing the percentage of glucagon, insulin, or any of the pancreatic hormones (cocktail, see Results)-expressing cells among the gastrin-expressing cells ($3 \leq n \leq 7$ mice) at birth in wild-type mouse pancreas.

Fig. 2. Pancreatic progenitor-tracing and *Men1* disruption in pancreatic progenitors define the derivation of NPG cells. (A) Schematic illustration of the two mouse models used for lineage tracing of pancreatic progenitors and pancreatic endocrine progenitors, respectively. (B) Representative IF staining for gastrin and eYFP in the neonatal pancreas of control *R26^{eYFP}* mice and *Ptf1aCre⁺-Rosa26^{eYFP}* mice or *Ngn3^{wt/tTA}-tet-Ocre-R26^{eYFP}* mice. Gastrin-expressing cells express the genetic tracer eYFP. (C) Immunofluorescence stainings for menin and gastrin in the neonatal pancreas of *PancEndoMen1* KO. Scale bars = $20 \mu\text{m}$.

Fig. 3. Differential molecular expression profiles between perinatal pancreatic gastrin⁺ and perinatal duodenal gastrin⁺ cells. (A) Double IF immunostaining with antibodies against gastrin and the indicated transcription factors in the pancreas of new-born wild-type mice. (B) Double IF immunostaining with antibodies against gastrin and the indicated transcription factors in the duodenum of new-born wild-type mice. Scale bars = 10µm.

Fig. 4. *PancEndoMen1* KO mice, *PancMen1* KO mice and *βMen1* KO mice develop tumours expressing gastrin. (A) IHC stainings for the indicated factors in 12-month-old control and *PancEndoMen1* KO mice. Note that the tumour located on the right expressed gastrin whereas the tumour on the left did not. Scale bars = 50µm. (B) IHC detection of gastrin in 12-month-old control and *βMen1* KO or *PancMen1* KO mice. Gastrin is not expressed in normal islets of control mice. Most lesions in mutant mice do not express gastrin (left), whereas subsets of tumours express gastrin at high, low levels or focally (middle and right panels). Scale bars = 50 µM. (C) Triple IF stainings for insulin, glucagon and gastrin in 12-month-old control and *βMen1* KO mice. Gastrin-expressing cells in tumours from *βMen1* KO mice also expressed insulin. Scale bars = 20µm. (D) Representative IF staining for Pdx1, gastrin and DAPI. The lesion on the right-hand side did not express gastrin but expressed Pdx1, whereas the lesion on the left expressed both gastrin and Pdx1. Scale bar = 25µm.

Fig. 5. Detection of gastrin expressing cells in human non-gastrinoma pancreatic endocrine tumours. (A) Graph representing the number of tumours with gastrin expression among the three pNETs cohorts analysed. (B) Representative IHC stainings from two cohorts (MEN1 or sporadic) of human pancreatic endocrine tumours. (C) IF stainings for the indicated factors in pancreatic

endocrine tumours containing gastrin immunoreactive cells. Arrows depict gastrin-expressing cells co-expressing glucagon (upper panel) or insulin (lower panel). Scale bars = 20 μ m.

Figure 1

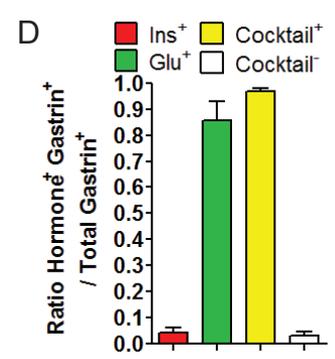
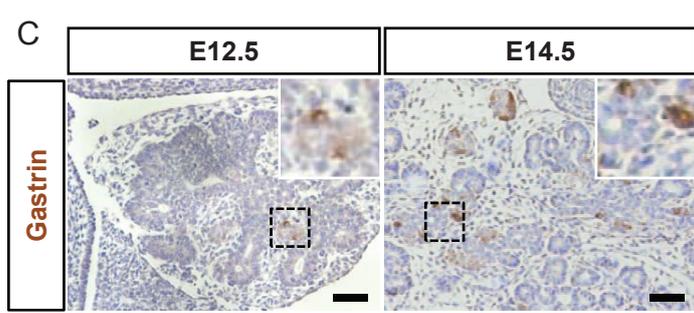
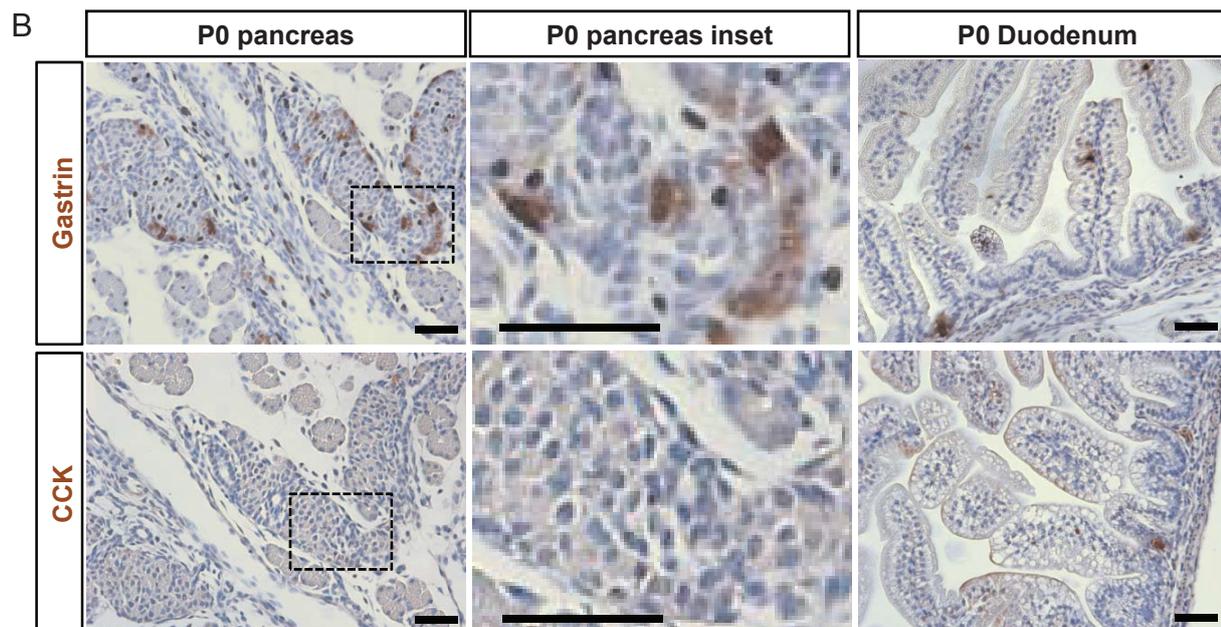
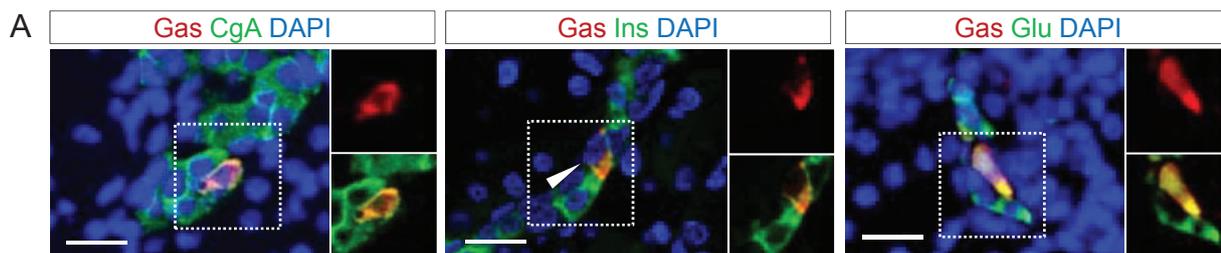
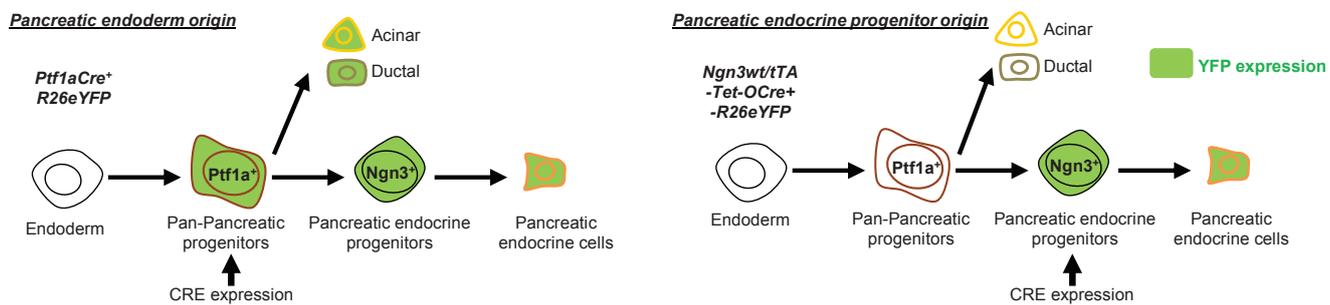
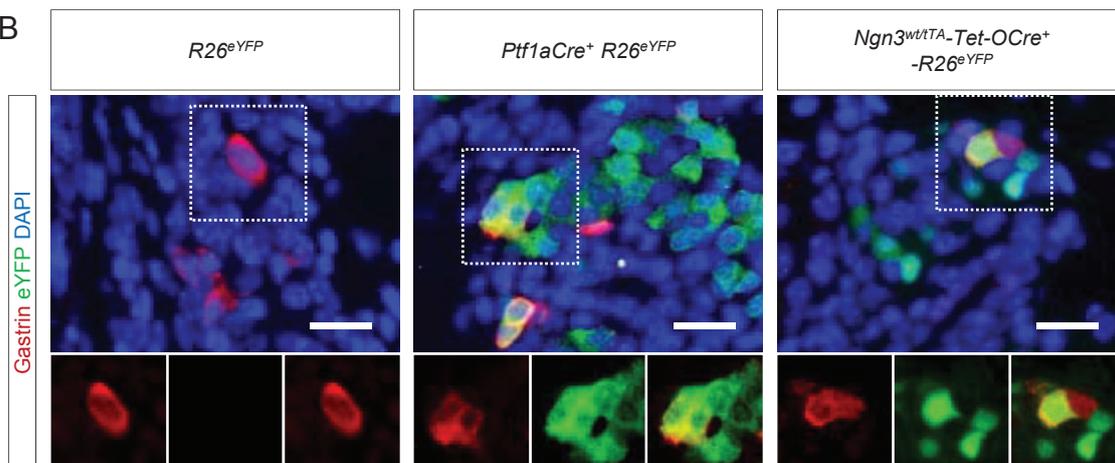


Figure 2

A



B



C

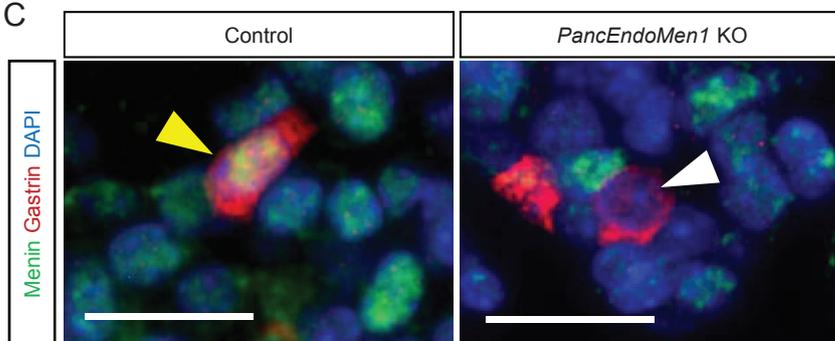


Figure 3

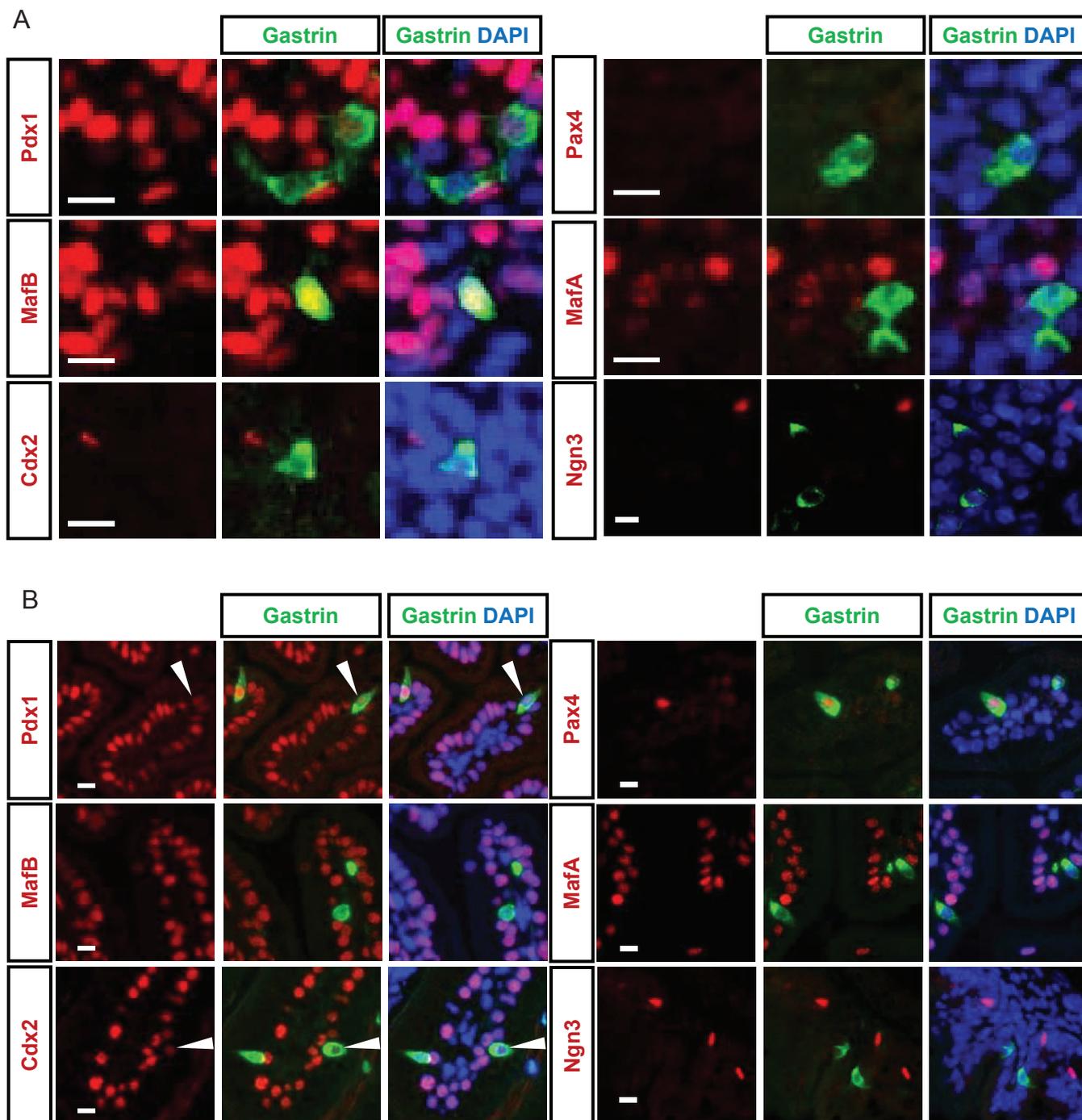


Figure 4

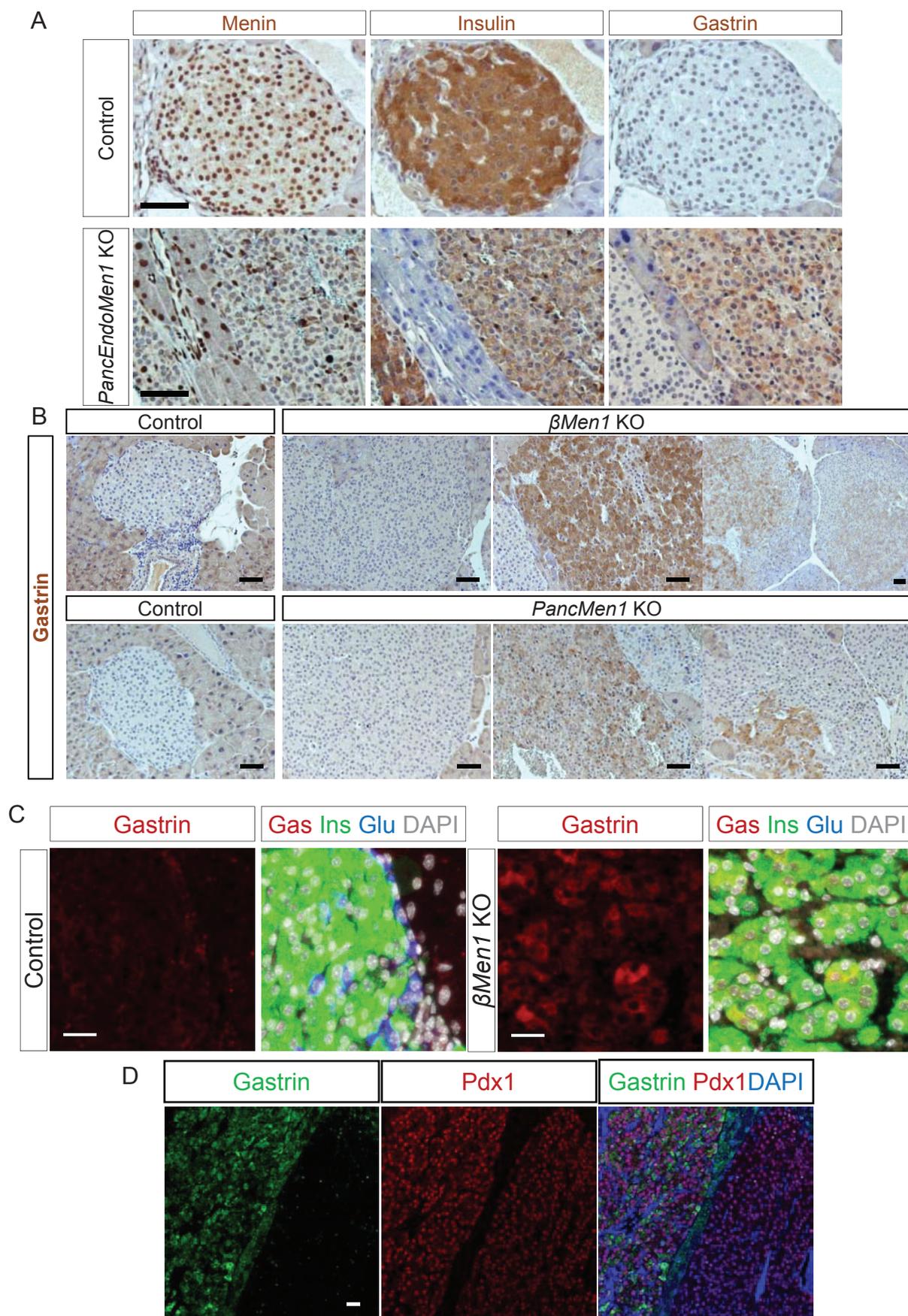
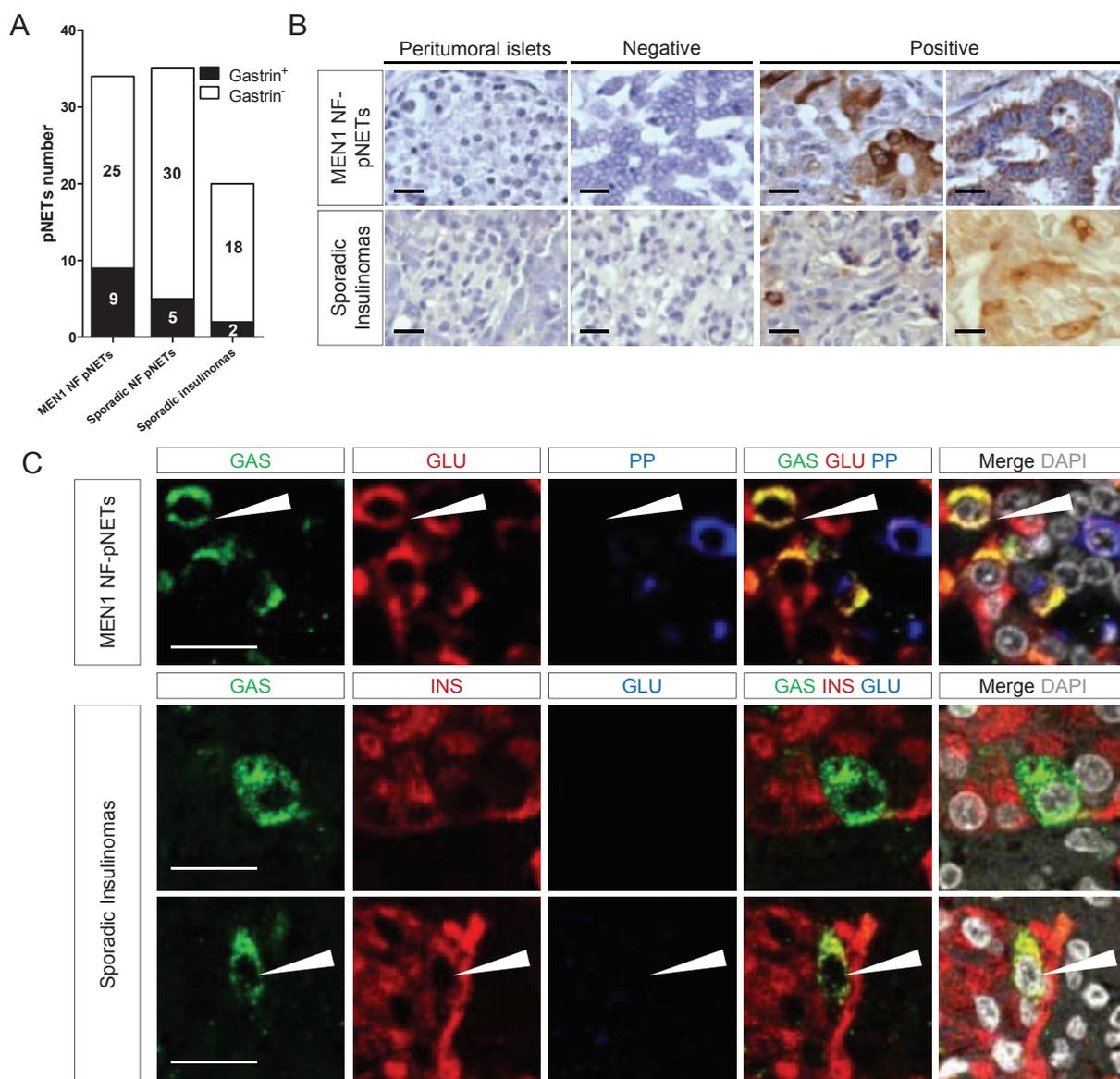
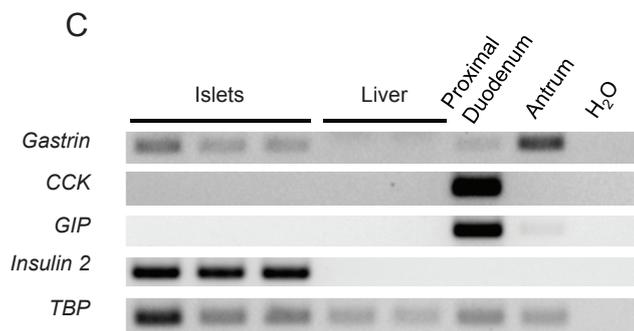
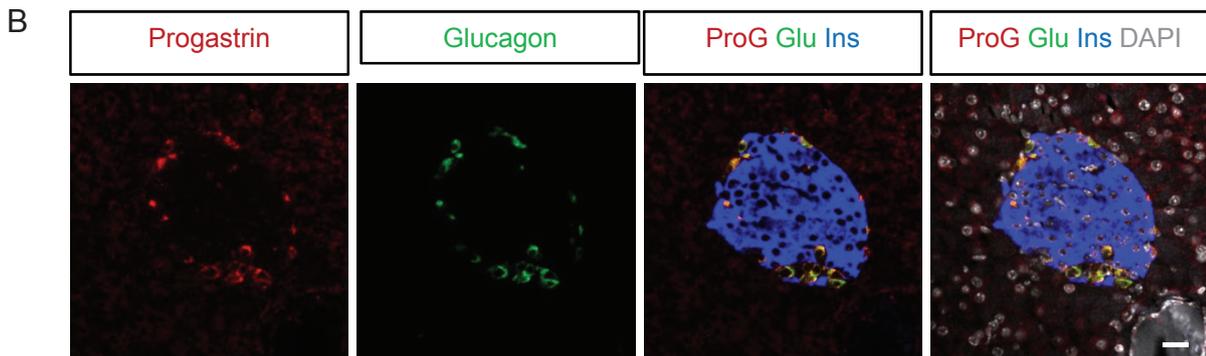
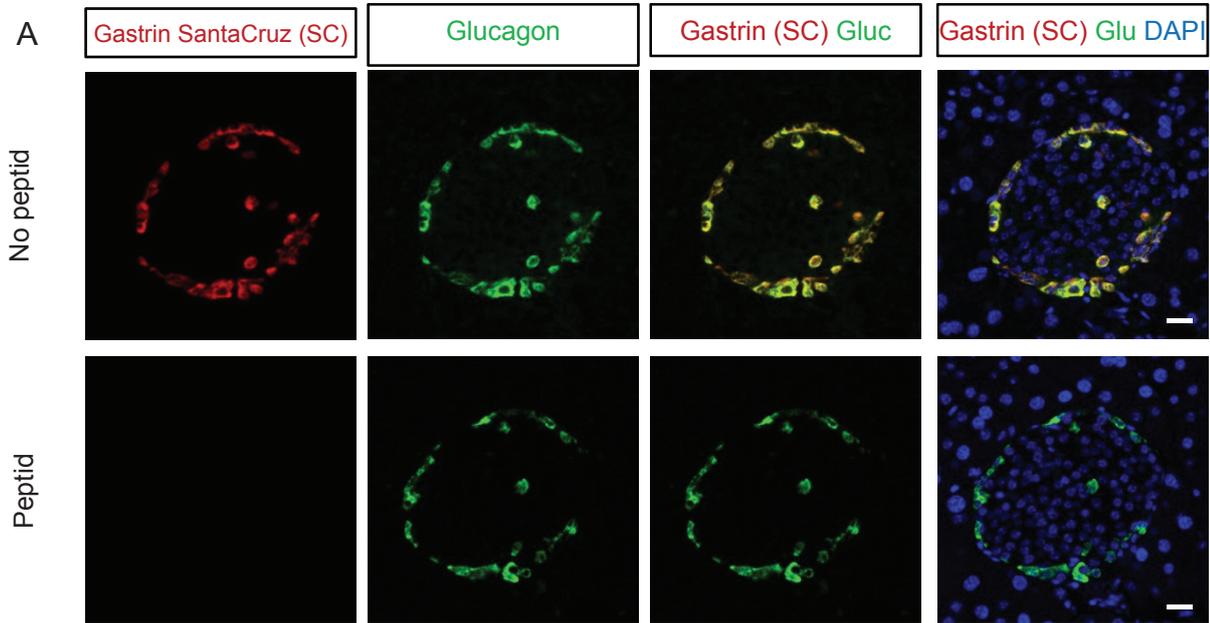
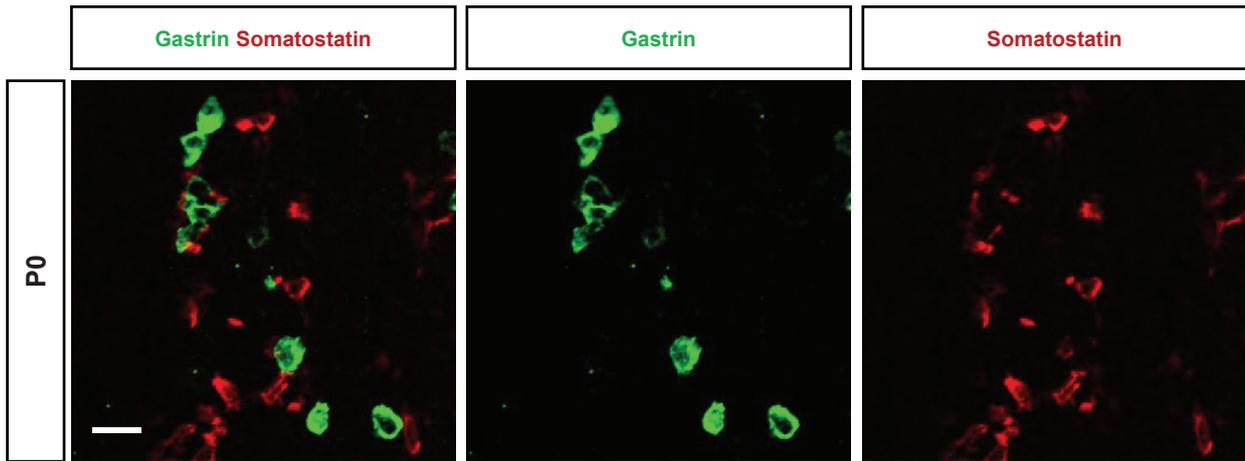


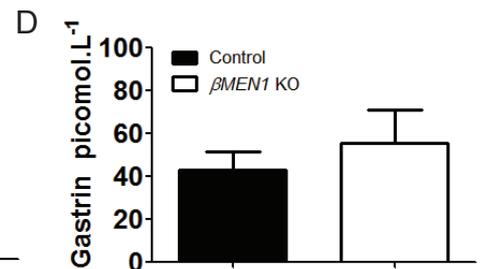
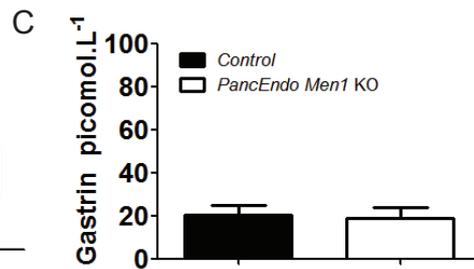
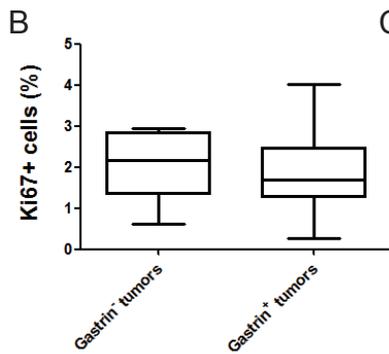
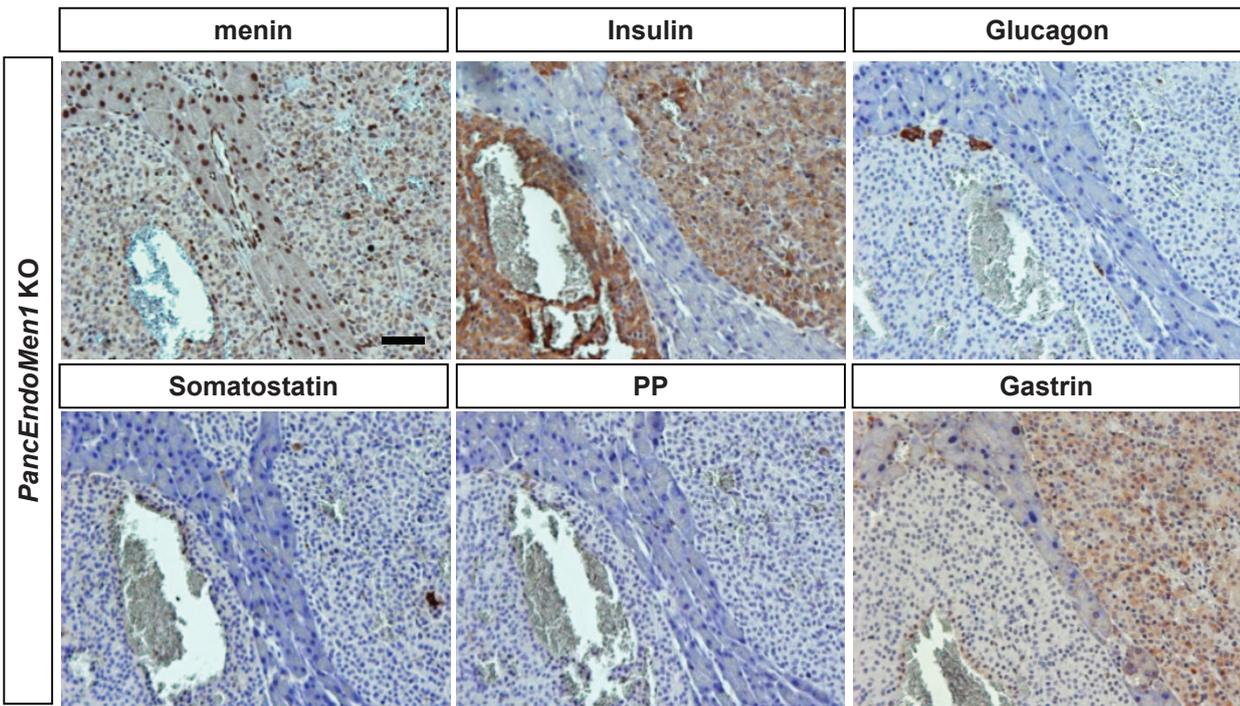
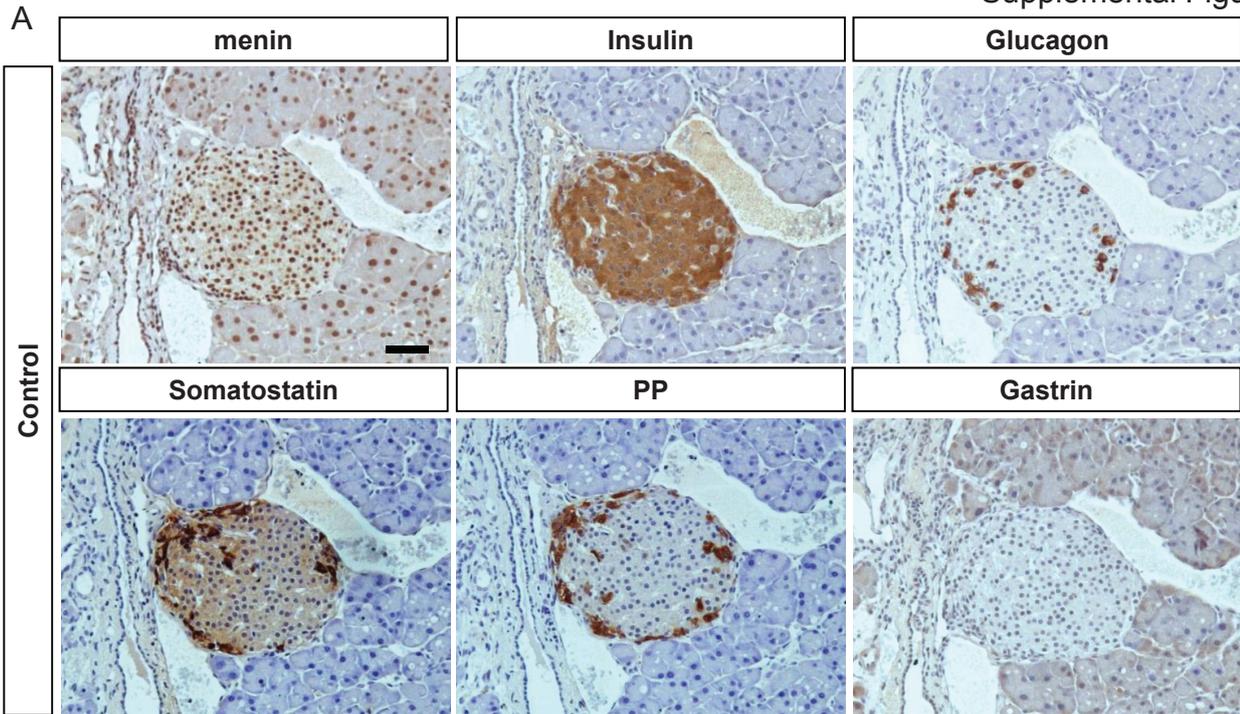
Figure 5





Supplemental Figure S2





Supplemental Table S1. List of primary antibodies used in the study.

Antibody	Host	Reference	Dilution IHC	Dilution IF	Dilution IF with TSA
anti-glucagon	Mouse	G2654, Sigma	1/10000	1/500	N.U
anti-insulin	Guinea Pig	A056401, DAKO	1/10000	1/1000	N.U
anti-somatostatin	Goat	sc-7819, Santa Cruz	1/4000	1/200	N.U
anti-PP	Goat	IMG-3835, Imgenex	1/500	1/100	N.U
anti-GFP	Rabbit	(A-6455, Life Technologies)	N.U	1/250	N.U
anti-GFP	Mouse	11814460001, Roche	N.U	1/250	N.U
anti-Chromogranin A SP	Rabbit	20085-Immuno, Immuno Star	N.U	1/250	N.U
anti-gastrin	Rabbit	NCL-GASp, Novocastra	1/1000 (P0) 1/100 (Adult)	1/100(P0)	1/2000 (P0) 1/200 (Adult)
anti-gastrin antibody	Rabbit	Homemade serum 2717, Dr. Jens F. Rehfeld	1/20000	1/4000	N.U
anti-gastrin antibody	Goat	Sc 7783, Santa Cruz	N.U	1/50	1/500
anti-progastrin	Rabbit	Homemade, Julie Pannequin	N.U	N.U	1/2000
anti-CCK antibody	Rabbit	Homemade serum C ₅ E Dr J. Chayvialle	1/2000	N.U	N.U
anti-CCK antibody	Rabbit	sc-20937, Santa Cruz	1/500	N.U	N.U
anti-menin	Rabbit	A300-105A, Bethyl	1/4000	N.U	1/8000
anti-menin	Goat	A300-106A, Bethyl	1/4000	N.U	1/8000
anti-Ngn3	Goat	AB2774, BCBC AntibodyCore	1/10000	N.U	1/10000
anti-Ki-67	Goat	sc-7846, Santa Cruz	N.U	N.U	1/1000
anti-MAFA	Rabbit	ab26405, Abcam	N.U	N.U	1/8000
anti-Pdx1	Goat	ab47383, Abcam	N.U	1/500	1/20000
anti-MafB	Rabbit	IHC-00351, Bethyl	N.U	N.U	1/2000
anti-Cdx2	Mouse	MU392A-UC, Biogenex	N.U	1/100	N.U
anti-Pax4 antibody	Rabbit	Homemade, Kind gift from Dr Beatriz Sosa-Pineda	N.U	N.U	1/20000

N.U = not used

Supplemental legends

Supplemental Figure S1. Residual gastrin expression in mouse adult alpha cells. (A) Immunofluorescence (IF) colocalisation of gastrin and glucagon (Glu), in the pancreas of adult wild-type mice (n = 3 mice) using the Santa Cruz antibody directed against gastrin without (no peptide) or with (peptide) the corresponding blocking peptide (Santa Cruz, reference sc-7783 P). The incubation of the gastrin antibody with the blocking peptide abrogate the signal raised by the gastrin peptide. Scale bars = 20 μ m. (B) IF colocalisation of Progastrin and glucagon (Glu), in the pancreas of adult wild-type mice (n = 3 mice). Scale bars = 20 μ m. (C) Representative RT-PCR on RNA from wild-type C57BL/6J mouse islet preparation, liver, proximal duodenal mucosa, and stomach antral mucosa (antrum). *Gastrin* mRNA was detected in all islet sample preparation tested (data not shown, n = 10 different mice). CCK: cholecystokinin; GIP: Glucose-dependent insulintropic peptide; TBP: TATA BOX-BINDING PROTEIN.

Supplemental Figure S2. Gastrin is not expressed in somatostatin⁺ cells at P0. Representative IF stainings for gastrin and somatostatin at birth in wild-type mouse pancreas (n = 3 mice). Scale-bar = 25 μ M

Supplemental Figure S3. (A) IHC stainings for the indicated factors in 12-month-old Control and *PancEndoMen1* KO mice (related to figure 3A). Note that the tumor located on the right express gastrin whereas the tumor on the left does not. Scale bars = 50 μ M. (B) Graph representing the percentage of Ki67⁺ tumoral cells in insulin⁺gastrin⁻ and insulin⁺gastrin⁺ tumors counted from both 12-month-old *β Men1* KO and *PancEndoMen1* KO mice. n \geq 5 tumors. (C-D) Results of gastrin measurements from *β Men1* KO (C) or *PancEndoMen1* KO (D) mice \geq 12 months of age, n \geq 3 mice for each group



Rapid communication

The conditional expression of *KRAS*^{G12D} in mouse pancreas induces disorganization of endocrine islets prior the onset of ductal pre-cancerous lesions

Johann Gout^{a,b,c,d,e,f}, Roxane M. Pommier^{a,b,c,d,e,f}, David F. Vincent^{a,b,c,d,e,f},
 Doriane Ripoché^{b,c,d,f}, Sophie Goddard-Léon^f, Amélie Colombe^f, Isabelle Treilleux^f,
 Ulrich Valcourt^{a,b,c,d,e,f}, Richard Tomasini^{g,h,i,j}, Marlène Dufresne^{k,l}, Philippe Bertolino^{b,c,d,f},
 Laurent Bartholin^{a,b,c,d,e,f,*}

^a «TGFβ and Pancreatic Cancer» Laboratory, France

^b INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

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

^d Université de Lyon, F-69000 Lyon, France

^e Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France

^f Centre Léon Bérard, F-69008 Lyon, France

^g INSERM U1068, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, F-13000 Marseille, France

^h CNRS UMR7258, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, F-13000 Marseille, France

ⁱ Université d'Aix-Marseille, F-13000 Marseille, France

^j Institut Paoli-Calmettes, F-13000 Marseille, France

^k INSERM UMR1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, F-31432 Toulouse, France

^l Université de Toulouse III Paul Sabatier, F-31432 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 November 2012

Received in revised form

7 February 2013

Accepted 8 February 2013

Keywords:

Kras

Mouse

Transgenic

Endocrine

Pdx1

ABSTRACT

Background/objectives: *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice develop premalignant pancreatic ductal lesions that can possibly progress spontaneously to pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Although *Pdx1-Cre* is expressed in the embryonic endoderm, which gives rise to all pancreatic lineages, the possible consequences of *KRAS*^{G12D} expression in the endocrine compartment have never been finely explored.

Methods: We examined by histology whether *Pdx1*-driven expression of *KRAS*^{G12D} could induce islets of Langerhans defects.

Results: We observed in *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} early disorganization of the endocrine compartment including i) hyperplasia affecting all the endocrine lineages, ii) ectopic onset of Ck19-positive (ductal-like) structures within the endocrine islets, and iii) the presence of islet cells co-expressing glucagon and insulin, all occurring before the onset of ducts lesions.

Conclusions: This work indicates that expression of *KRAS*^{G12D} in *Pdx1*-expressing cells during embryogenesis affects the endocrine pancreas, and highlights the need to deepen possible consequences on both glucose metabolism and PDAC initiation.

Copyright © 2013, IAP and EPC. Published by Elsevier India, a division of Reed Elsevier India Pvt. Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The exocrine pancreas consists of acinar and ductal cells. The acinar cells constitute the bulk of the pancreatic tissue and produce digestive enzymes that are discharged into the duodenum. The ductal cells add mucous and bicarbonates to the digestive enzyme

mixture. The endocrine pancreas consists of specialized cells organized into compact islets (islets of Langerhans) embedded in the acinar tissue. The α - and β -cells respectively secrete glucagon and insulin, two hormones involved in the control of glycemia. The γ - and PP-cells respectively secrete somatostatin and pancreatic polypeptide, two hormones regulating the secretion of insulin, glucagon, and exocrine enzymes. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), which represents the vast majority of all pancreatic cancers, is a very aggressive tumor [1]. PDAC is characterized by ductal differentiation and believed to arise from precancerous ductal lesions named pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs). *KRAS*-activating

* Corresponding author. INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France.

E-mail address: laurent.bartholin@lyon.unicancer.fr (L. Bartholin).

mutations are found in >90% of PDAC cases. Activation of oncogenic *KRAS*^{G12D} in pancreatic progenitor cells in *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice, results in PanIN lesions that evolve spontaneously to aggressive PDAC at low frequency and not until an advanced age [2,3]. *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice have been extensively used to demonstrate the oncogenic role of *KRAS* in PanINs formation [2]. Although the early pancreatic expression of *Pdx1* during endoderm development from E8.5 [4] suggests that *KRAS*^{G12D} expression might also affect the endocrine lineage, these consequences have never been examined. Therefore, we have sought to determine whether the endocrine compartment was affected in the pancreases of *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice.

2. Results and discussion

We first generated *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice ($n = 25$) that we euthanized between 1 and 9 months of age, together with their matching controls. To visualize PanIN lesions showing ductal differentiation, we performed immunohistochemistry (IHC) experiments to detect Cytokeratin-19 (Ck19), which is expressed at the membrane of the cells lining the ducts. No PanIN lesions were observed in the pancreas of 1-month-old *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice (KC). Scattered PanIN lesions were detectable by the time they reached two months of age, the number and grade of these lesions increasing with age (Fig. 1). We further looked at the β - and α -cell contents of the islets of Langerhans by immunodetection of Insulin and Glucagon (Fig. 2A). We observed an increased proportion of both β - and α -cells in the pancreases of *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice as early as the age of 1 month. It is noteworthy that α -cells were also found scattered within the islets, in contrast to their well-defined localization at the periphery of control islets. To quantify the areas occupied by β - and α -cells, we performed morphometric analyses of the Insulin- and Glucagon-positive regions. In *Pdx1-Cre;*

LSL-KRAS^{G12D} pancreases, we found the areas occupied by β - and α -cells to be increased, respectively, 3.1-fold (Fig. 2B) and 7.2-fold (Fig. 2C) at 1 month of age as compared to wild-type controls. Similar increases were found at 2 and 4 months, but increases were hardly measurable at 9 months because of disorganization of the islets structure. By IHC with antibodies directed against Somatostatin and Pancreatic Polypeptide, we also observed an increase of the γ - and PP-cell populations, respectively, in *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice (data not shown). Taken together, our observations highlight that the composition of the entire endocrine compartment of the pancreas is affected in *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice before any lesions of the exocrine compartment such as PanINs and acinar-ductal metaplasia are detectable.

Unexpectedly, we detected Ck19-positive ectopic cells inside the endocrine compartment of *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice by the time they reached 1 month of age (Fig. 3A). Finally, immunofluorescence experiments revealed the existence of cells expressing both Glucagon and Insulin simultaneously, only in the pancreases of *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice and as early as 1 month of age (Fig. 3B).

The present study represents the first report to detail the alterations that affect the endocrine compartment of the pancreases of *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice. We observed a hyperplasia affecting all the endocrine lineages, the presence of ectopic Ck19-positive “ductal-like” structures within the endocrine islets as well as islet cells co-expressing Glucagon and Insulin. However, it remains to be clarified whether these defects are a direct consequence of a cell-autonomous *KRAS*^{G12D} expression in islets or represent an indirect consequence caused by the expression of *KRAS*^{G12D} in the neighboring exocrine tissues. This uncertainty is a consequence of i) the early expression *Pdx1-Cre* in the embryonic endoderm that will give rise to all epithelial pancreatic lineages, and ii) the transdifferentiation processes between the different

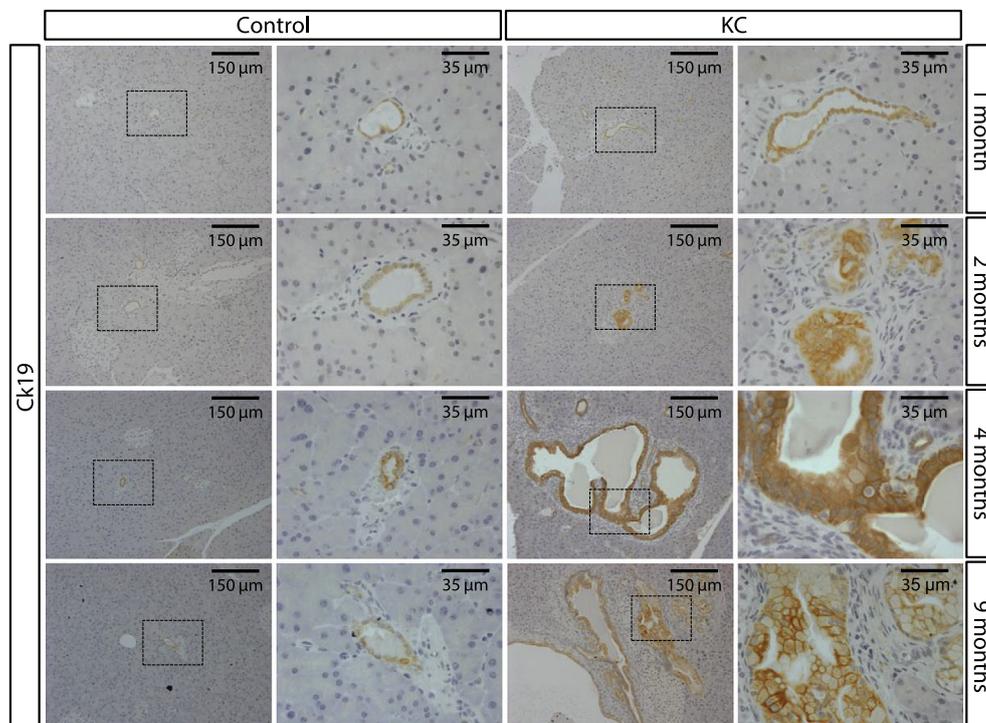


Fig. 1. The *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mouse model recapitulates the full spectrum of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) development. Cytokeratin-19 (Ck19) immunohistochemical analysis of pancreas sections from 1- to 9-months-old *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} (KC) mice. Note the presence of PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) lesions as early as the age of 2 months and their progression to higher grade lesions in older (4- and 9-months-old) *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice. Controls are littermate mice with one of the following genotype: wild-type, *Pdx1-Cre* and *LSL-KRAS*^{G12D} mice.

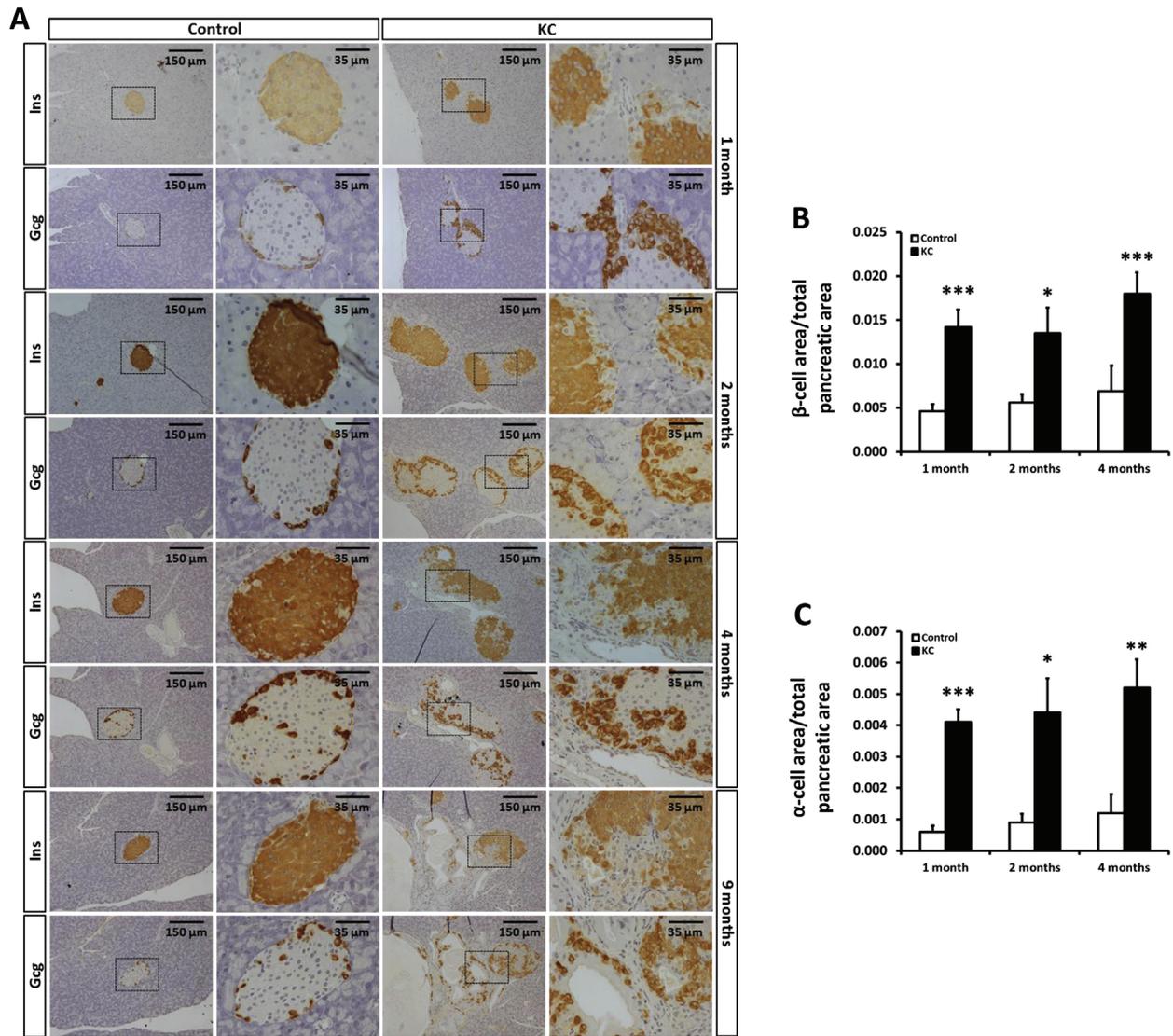


Fig. 2. *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* mice present a β - and α -cell hyperplasia prior to epithelial lesions onset. (A) Insulin (Ins) and Glucagon (Gcg) immunohistochemical analysis of pancreas sections highlight, respectively, β - and α -cell hyperplasias present on the *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* (KC) pancreatic sections, as compared to control mice. Note that these hyperplasias appear to develop prior to the appearance of PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) lesions. (B and C) Morphometric quantification of β - and α -cell areas performed on pancreas sections of 1- to 4-months-old mice confirm the endocrine hyperplasia observed in mutant pancreases, as compared to matched littermate controls. $N \geq 3$, results are shown as mean \pm SEM. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. Controls are littermate mice with one of the following genotype: wild-type, *Pdx1-Cre* and *LSL-KRAS^{G12D}* mice.

pancreatic cells in the adult. For instance, it has been reported that ductal cells are multipotent progenitors that could differentiate in α - or β -cells [5–8]. A significant plasticity also exists between adult pancreatic α - and β -cells themselves, implying a potential route to β -cells generation through α -cells in a murine model that develop α -cells hyperplasia [9,10]. The presence of cells co-expressing Glucagon and Insulin was also reported in humans with pancreatitis [11]. Finally, such plasticity has impeded the clear identification of the cellular origin of PDAC. For instance, it is interesting to underline that transgenic mice using activated KRAS under the control of *Ck19* ductal promoter are largely refractory to KRAS-induced PanIN formation [12,13]. In contrast, mice bearing an activated KRAS mutant allele specifically in their acinar compartment (under the control of *Elastase*, *proCPA1*, *Mist1* promoters) develop spontaneous PanINs [14–17]. More unexpected is the observation according to which *KRAS^{G12D}* expressing Insulin-positive cells of the endocrine lineage (under the control of *Rip* promoter) are refractory to transformation under normal

conditions, but also serve as a cell of origin of PDAC when combined with pancreatic inflammation caused by cerulein injection [18].

3. Conclusion

In conclusion, the alteration of the endocrine compartment we report here before the onset of PanIN lesions in the *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* mice suggests that they do not result from a regenerative response of injured pancreas. Therefore, it represents a new example of the important cell plasticity that exists within pancreatic tissues. This study questions the contribution and role of the endocrine compartment in the diseases that affect the exocrine pancreas such as pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. In this context, further as well as published studies using the *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* mouse model should consider that the endocrine compartment disorganization, and its possible consequences on glucose metabolism, may participate to the observed phenotype.

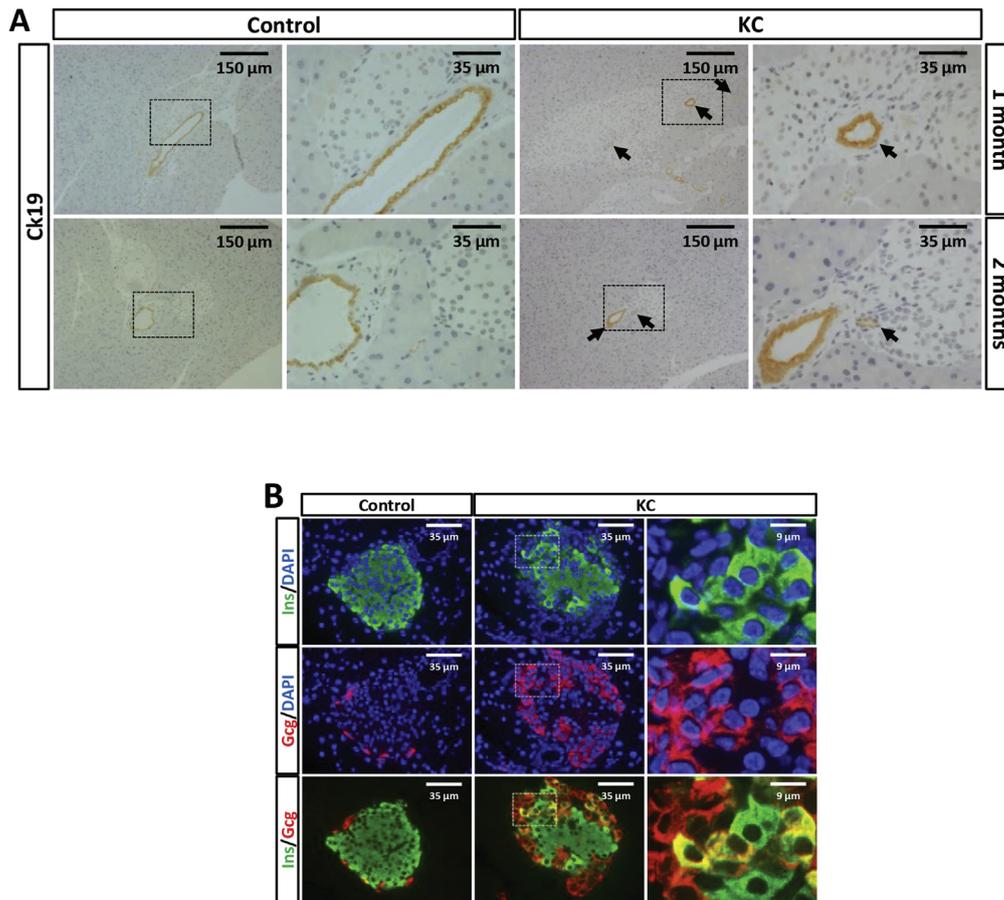


Fig. 3. *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* mice exhibit a progressive and severe pancreatic endocrine disorganization. (A) Immunodetection of Cytokeratin-19 (Ck19) performed on serial pancreatic sections reveal early onset of Ck19-positive cells (black arrows) in the endocrine islets of 1- and 2-months-old *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* (KC) mice. (B) Insulin (Ins, green) and Glucagon (Gcg, red) double-immunofluorescence experiments, performed on 1-month-old pancreas sections of *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* (KC) and control mice, revealed cells co-expressing Ins and Gcg (yellow staining, merge). Cell nuclei are counterstained with DAPI (blue). Right panel shows an enlarged view of the dashed inset. Controls are littermate mice with one of the following genotype: wild-type, *Pdx1-Cre* and *LSL-KRAS^{G12D}* mice.

4. Material and methods

4.1. Mice

The *LSL-KRAS^{G12D}* [19] and *Pdx1-Cre* [20] mice were previously described. Mice were housed and bred in a specific pathogen free animal facility. All experiments were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee (CECCAPP) in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws.

4.2. Histology

Immunohistochemistry and immunofluorescence experiments were performed as previously described [21,22]. Primary antibodies used were as follow: Cytokeratin-19 (rat monoclonal, 1:50; Troma-III-s, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa); Insulin (guinea pig polyclonal, 1:25,000; Dako); Glucagon (mouse monoclonal, 1:50,000; Abcam).

4.3. Morphometric quantifications and statistical analysis

Morphometric analyses were realized on Glucagon- or Insulin-immunostained paraffin-embedded pancreatic sections. Whole sections were scanned using an automated E400 Eclipse microscope (Nikon). Acquired sections were subsequently analyzed using

Histolab (Alphelys). Insulin- or Glucagon-positive areas were normalized to total pancreatic surface to calculate the respective percentage occupied by β - or α -cells per pancreas. All scanned sections were carefully selected to exclude artifacts and false-positive areas. Results were represented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using Student's *t* test. Differences were considered significant when $P < 0.05$ (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

Acknowledgments

We thank the staff of AniCan (CRCL, Lyon) and ALECs-SPF for their technical assistance with animal care. We also thank Christine Carreira (IARC, Lyon) for its assistance and expertise with histological preparation and analysis, AniPath (Université Lyon 1) and more specifically Nicolas Gadot for its help with morphometric analyses. This work was supported by the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM Avenir program), by the Centre National de la Recherche Scientifique, by a grant from IFR62 LYON-EST/CLARA (Projet Transversal 2010) and by fellowships from the Ligue Nationale Contre le Cancer (JG), from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of France (RMP, DFV and DR) and from the Association pour la Recherche sur le Cancer (DFV). We thank Geneviève Fourel for critical reading of the manuscript.

References

- [1] Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2002;2:897–909.
- [2] Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003;4:437–50.
- [3] Aguirre AJ. Activated kras and ink4a/arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2003;17:3112–26.
- [4] Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994;371:606–9.
- [5] O'Reilly LA, Gu D, Sarvetnick N, Edlund H, Phillips JM, Fulford T, et al. Alpha-cell neogenesis in an animal model of iddm. *Diabetes* 1997;46:599–606.
- [6] Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 1993;42:1715–20.
- [7] Wang RN, Kloppel G, Bouwens L. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 1995;38:1405–11.
- [8] Rosenberg L. In vivo cell transformation: Neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells. *Cell Transplant* 1995;4:371–83.
- [9] Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, et al. The ectopic expression of pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell* 2009;138:449–62.
- [10] Lu J, Herrera PL, Carreira C, Bonnnavion R, Seigne C, Calender A, et al. Alpha cell-specific men1 ablation triggers the transdifferentiation of glucagon-expressing cells and insulinoma development. *Gastroenterology* 2010;138:1954–65.
- [11] Chung CH, Levine F. Adult pancreatic alpha-cells: a new source of cells for beta-cell regeneration. *Rev Diabet Stud* 2010;7:124–31.
- [12] Brembeck FH, Schreiber FS, Deramaudt TB, Craig L, Rhoades B, Swain G, et al. The mutant k-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice. *Cancer Res* 2003;63:2005–9.
- [13] Ray KC, Bell KM, Yan J, Gu G, Chung CH, Washington MK, et al. Epithelial tissues have varying degrees of susceptibility to kras (g12d)-initiated tumorigenesis in a mouse model. *PLoS One* 2011;6:e16786.
- [14] Sandgren EP, Luetkeke NC, Palmiter RD, Brinster RL, Lee DC. Overexpression of tgf alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell* 1990;61:1121–35.
- [15] Guerra C, Schuhmacher AJ, Canamero M, Grippo PJ, Verdaguier L, Perez-Gallego L, et al. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by k-ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 2007;11:291–302.
- [16] Tuveson DA. *Mist1-KRAS^{G12D}* knock-in mice develop mixed differentiation metastatic exocrine pancreatic carcinoma and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2006;66:242–7.
- [17] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008;455:627–32.
- [18] Friedlander SYG, Chu GC, Snyder EL, Girnius N, Dibelius G, Crowley D, et al. Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic k-ras. *Cancer Cell* 2009;16:379–89.
- [19] Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, et al. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic k-ras. *Genes Dev* 2001;15:3243–8.
- [20] 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;129:2447–57.
- [21] Vincent DF, Gout J, Chuvin N, Arfi V, Pommier RM, Bertolino P, et al. Tif1-gamma suppresses murine pancreatic tumoral transformation by a smad4-independent pathway. *Am J Pathol* 2012;180:2214–21.
- [22] Vincent DF, Yan KP, Treilleux I, Gay F, Arfi V, Kaniewski B, et al. Inactivation of tif1gamma cooperates with kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet* 2009;5:e1000575.

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.

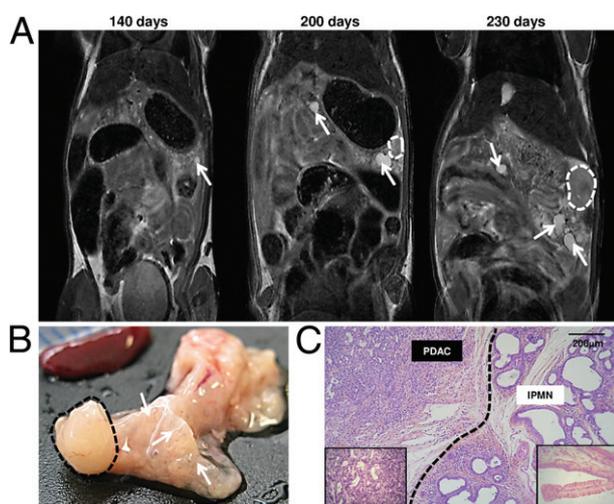


Figure 1. *Tif1 γ* deficiency cooperates with *Kras*^{G12D} to drive an IPMN-PDAC sequence. **A:** Longitudinal magnetic resonance imaging study (from 140 to 230 days) of a KTT mouse. Cystic lesions (hypersignal, **arrow**) and a firm mass (isosignal, **dotted line**) are indicated. **B:** Macroscopic 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

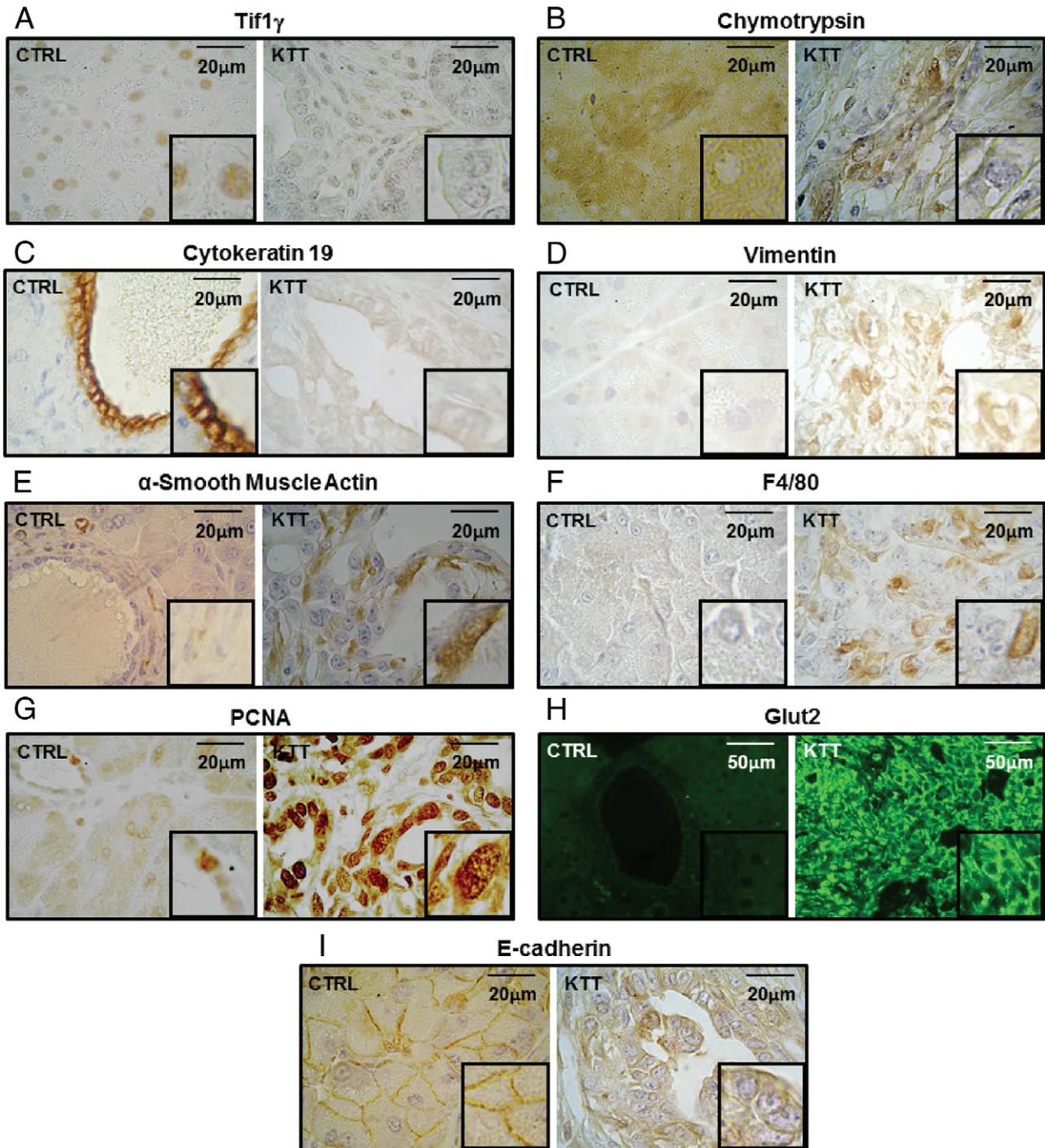


Figure 2. Histological characterization of KTT pancreatic tumors. IHC analysis reveals a complete loss of Tif1 γ expression in the epithelial compartment (A). KTT tumors exhibit an altered differentiation status both in the acinar (chymotrypsin, B) and ductal (cytokeratin-19, C) compartments. Markers 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

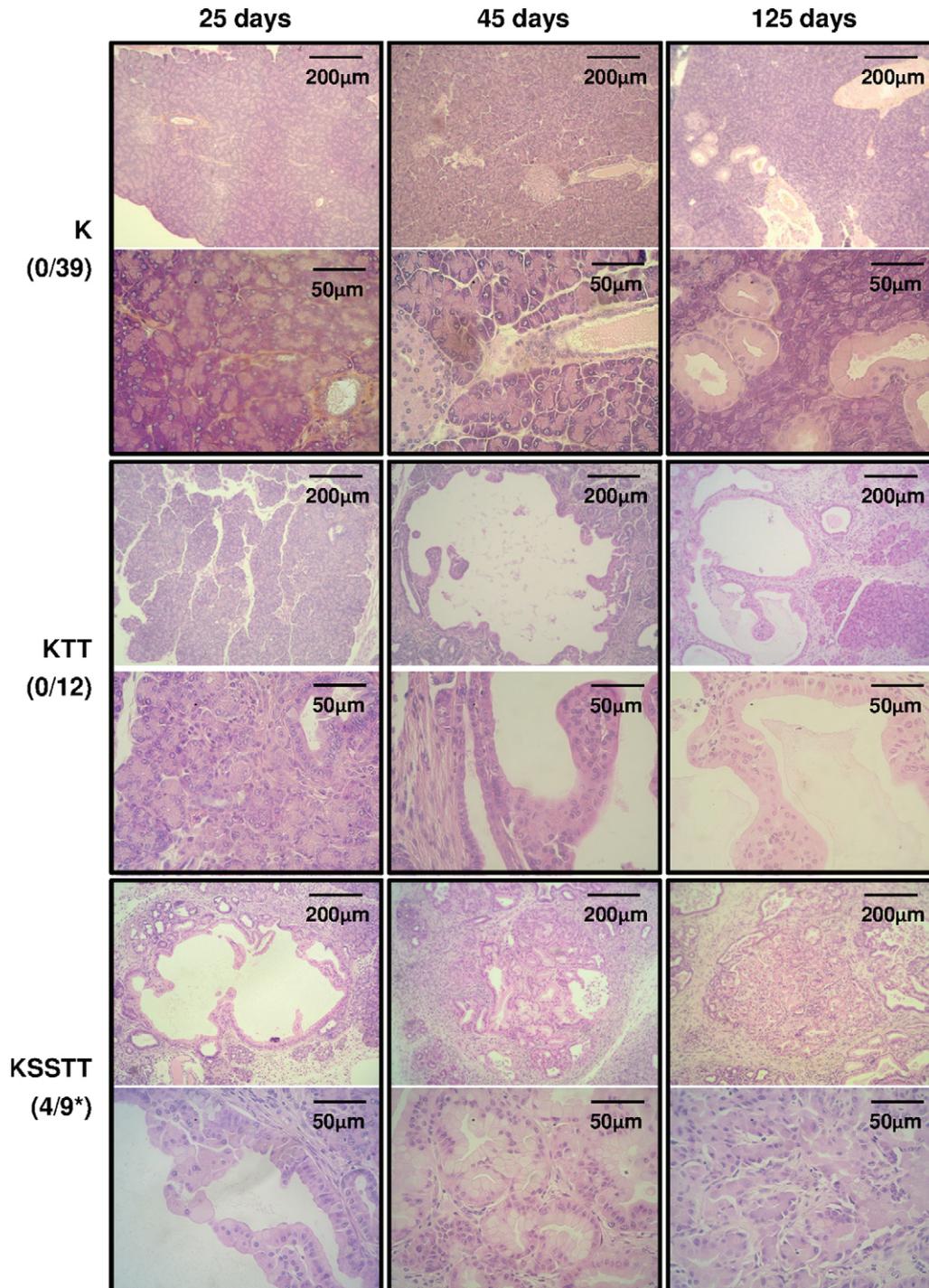


Figure 3. Deletion of *Smad4* in KTT mice accelerates PDAC development. Histological sections of K, KTT, and KSSTT mutant mouse pancreas were stained with hematoxylin-phloxinsaffron from 25 to 125 days. For each panel pair, low (**upper**) and high (**lower**) magnifications are shown. For each genotype, 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 $\gamma^{lox/lox}$* (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 (isignal) 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

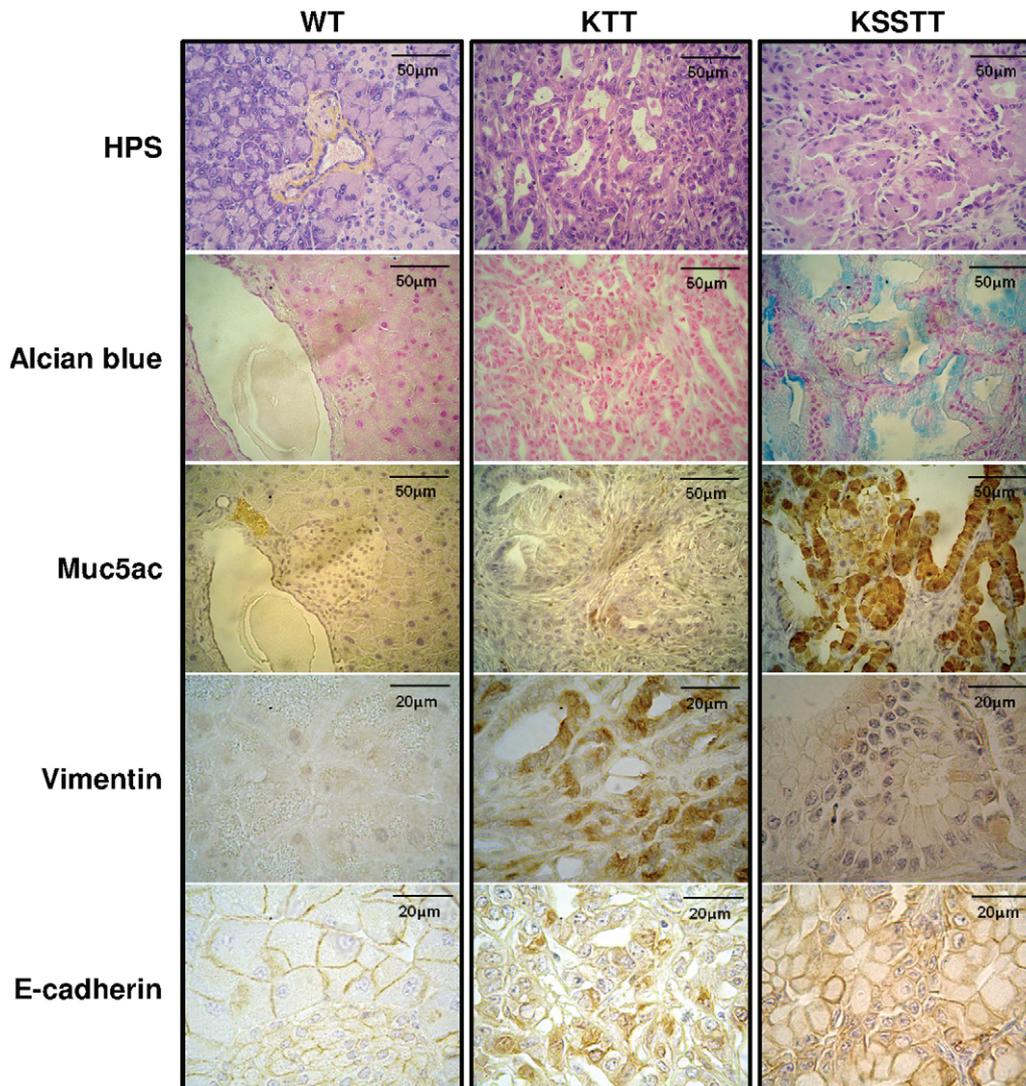


Figure 4. KTT and KSSTT pancreatic tumors display different histological features. Histological sections of 365-day-old control [wild type (WT)], 231-day-old KTT, and 126-day-old KSSTT pancreas samples stained with hematoxylin-phloxinsaffron or Alcian blue (mucin specific) or subjected to IHC for Mucin-5ac (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 KSSST 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, Dellaire G: KAP1 depletion increases PML nuclear body number in concert with ultrastructural changes in chromatin. *Cell Cycle* 2011, 10:308–322

Identification of ActivinB as a novel actor in endocrine β cell plasticity during tumorigenesis of Pancreatic Neuroendocrine Tumors

Pancreatic NeuroEndocrine Tumors (PNETs), which develop from endocrine cells in Langerhans islets, present a wide array of hormonal, functional or molecular characteristics. Their diversity complicates the diagnosis and the treatment of affected patients. In recent years, the cellular plasticity of the endocrine pancreas begins to be well documented in pathologies like diabetes or PNETs. Growth factors of TGF- β family, known for their role in cancer, are involved in the control of β cell identity marker expression. My PhD work was aiming at studying the role of cell plasticity in insulinoma development and identifying the potent contribution of a subset of members of the TGF- β superfamily in this mechanism.

Using mice model, I proved a mechanism of dedifferentiation in tumor endocrine β cells, invalidated for *Men1* gene. Moreover, I identified a TGF- β member, ActivinB, to be overexpressed in insulinomas and responsible of cellular plasticity. Using a combination of studies based on the RipTag2 mice, that also develop insulinomas, and *in cellulo* analyses, I further highlighted the role of Menin in the controlled-expression of ActivinB through an epigenetic mechanism, involving histone mark modifications.

Therefore, my thesis works permitted to demonstrate that ActivinB represents a novel actor of endocrine β cell plasticity. More importantly it highlights the possible use of ActivinB for diagnostic/prognostic purposes for PNETs patients. Finally, my work demonstrates that PNETs diversity is not only restricted to hormonal, functional or proliferative features, but shows that both the cell origin and mechanisms of tumorigenesis may actively contribute to the observed tumor heterogeneity. Thus, further molecular and cellular characterization of PNETs appears essential to refine the classification, diagnosis and therapeutics for patients.

Identification de l'ActivinB comme nouvel acteur de la plasticité des cellules β endocrines au cours de la tumorigenèse des Tumeurs NeuroEndocrines Pancréatiques

Les Tumeurs NeuroEndocrines Pancréatiques (TNEPs), qui se développent à partir des cellules endocrines des îlots de Langerhans, sont des tumeurs de caractéristiques diverses, sur le point hormonal, fonctionnel ou encore moléculaire. Leur diversité complexifie les diagnostics et les traitements pour les patients atteints. Depuis quelques années, la plasticité cellulaire du pancréas endocrine commence à être bien documentée dans des pathologies comme le diabète et les TNEPs. Les facteurs de croissance de la famille TGF- β , connus pour leur rôle en cancérologie, sont impliqués dans le contrôle de l'expression des marqueurs d'identité des cellules β . Mes travaux de thèse ont consisté à étudier la place de la plasticité cellulaire dans le développement d'insulinomes et d'identifier un facteur TGF- β , impliqué dans ce processus.

J'ai ainsi démontré un mécanisme de dédifférenciation des cellules β tumorales, invalidées pour le gène *Men1* chez la souris. De plus, j'ai identifié un ligand de la famille TGF- β , l'ActivinB, surexprimé dans les insulinomes et responsable de la plasticité cellulaire. Des études complémentaires sur le modèle murin RipTag2, développant également des insulinomes, combinées à des analyses *in cellulo*, m'ont enfin permis de montrer le rôle de Menin dans l'expression de ce ligand, grâce à la régulation épigénétique, notamment les modifications d'histones.

Mes travaux ont ainsi permis de mettre en évidence l'ActivinB comme un nouvel acteur dans la plasticité des cellules β endocrines, tumorales ou non. La détection d'ActivinB pourra être utilisée à des fins diagnostiques/pronostiques chez des patients atteints de TNEPs. Enfin, mes travaux démontrent que la diversité des TNEPs ne se restreint pas seulement à leurs caractéristiques hormonales, leur fonctionnalité ou leur capacité de prolifération, mais qu'elle est également due à leur origine cellulaire et les mécanismes de tumorigenèse, qui se mettent en place. Ainsi, une caractérisation moléculaire approfondie de ces tumeurs chez l'homme semble désormais essentielle pour affiner la classification, le diagnostic et enfin les thérapies pour les patients atteints des TNEPs.

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mots-clés : ActivinB-Insulinomes-Dédifférenciation- *Men1*-Epigénétique

Intitulé et Adresse du laboratoire :

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon
INSERM U1052, CNRS UMR5286
Equipe 4, Différenciation endocrine and tumorigenèse
Centre Léon Bérard, Bâtiment Cheney D
28 rue Laënnec, 69008 Lyon, FRANCE