



HAL
open science

Etude de la voie de signalisation Artn/Gfr 3 dans le pancréas

Laure Nivlet

► **To cite this version:**

Laure Nivlet. Etude de la voie de signalisation Artn/Gfr 3 dans le pancréas. Endocrinologie et métabolisme. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ087 . tel-01258653

HAL Id: tel-01258653

<https://theses.hal.science/tel-01258653>

Submitted on 19 Jan 2016

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.

ÉCOLE DOCTORALE ED414

U964

THÈSE présentée par :

Laure Nivlet

soutenue le : 21 Octobre 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie/ Biologie Cellulaire et Développement

**Etude de la voie de signalisation
Artn/Gfr α 3 dans le pancréas.**

THÈSE dirigée par :

Mr Gérard Gradwohl

Dr, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr Ravassard Philippe

Dr, Université Pierre et Marie Curie

Mr Jacquemin Patrick

Dr, Université Catholique de Louvain

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr Vermot Julien

Dr, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Gérard, merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et pour ton aide tout au long de ces années. Tes conseils et ta patience ont été précieux.

Bien évidemment, merci à tous les membres de l'équipe, actuels et passés, pour vos conseils scientifiques et votre aide. Martine, ma chère voisine de paillasse, merci pour toutes les discussions, ton dynamisme et ton sourire. Nos échanges de recettes de cuisine me manquent, je te souhaite tout le bonheur possible pour la suite.

Aline, merci aussi pour tes conseils culinaires et encore félicitations. Je te souhaite aussi tout le bonheur possible à toi et ta famille. Julie, félicitations à toi aussi et bonne chance pour ton nouveau travail. Perrine, bon courage à toi pour ta dernière ligne droite.

Miriam, merci pour ton aide, ta joie de vivre et ton dynamisme. On se revoit bientôt à Barcelone ;)

François, merci pour les discussions, les rigolades et surtout tes conseils et ton aide lors de la rédaction de ma thèse.

Merci à Delia et Joël pour leur aide sur le projet. Je vous souhaite à chacun tout le bonheur ainsi que le succès possibles pour la suite de vos aventures.

Merci aussi aux anciens membres de l'équipe : Anne Hélène, Christopher, Caitlin, Carole, Viviane, Anthony et Georg.

Je tiens à remercier les personnes des différentes plateformes ayant participé à ce projet et qui m'ont donné de précieux conseils tout au long de ces années. Merci à Pascal et Marc, de la plateforme de microscopie, pour votre aide dès que j'avais un souci de microscopie, vos conseils sur les différentes techniques à utiliser et d'analyses et pour votre bonne humeur.

Merci aussi à Marcel pour ta précieuse aide pour l'analyse avec Tubeness et pour toutes les fois où tu es venu à ma rescousse lorsque j'avais un souci au confocal.

Merci à Guy pour tes conseils concernant les colorations au X-Gal.

Merci à Christelle, Fabrice, Muriel et Bernard de la plateforme de Biopuces pour votre aide et vos encouragements.

Merci à Marie-Christine Birling et Sylvie Jacquot des plateformes d'injections et de génotypage de l'ICS pour votre aide avec nos souris PAM.

Olivia, merci pour ton dynamisme, ta bonne humeur et surtout pour ton aide avec les coupes paraffine et le scanneur de lames.

Hafid, Sylvie, Sabine, merci pour votre aide à l'animalerie et surtout pour votre bonne humeur. William, Alex, encore merci d'avoir sauvé Victor, notre unique mâle Gfr α 3LacZ et d'avoir réussi à lancer la lignée et pour votre disponibilité.

Remerciements

Merci aussi à l'équipe Viville, nos anciens voisins, plus particulièrement à Laura, pour nos discussions, et à l'équipe Dollé, notamment Muriel, pour nos discussions à l'animalerie, tes conseils et tes encouragements.

Adèle, merci pour ton sourire, tes conseils, tes encouragements... et les week ends passés ensemble au labo ou à l'animalerie toujours dans la bonne humeur.

Maité, merci pour votre aide pour les recherches bibliographiques et pour l'impression de mon manuscrit de thèse.

Un grand merci à ma famille et mes amis, qui ont vécu de manière indirecte ma thèse. Mes chers parents et Coco, merci pour votre précieux soutien et votre patience.

Merci aux « supergirls » : Charlène, Caro, Gabi, Camille, Sara et bien sûr, Sylvia, pour votre amitié, votre aide, votre soutien surtout lorsque ça n'allait pas et pour toutes les rigolades et bons moments qu'on a partagés durant ces années. D'ailleurs, nous avons toujours un atelier « pâtisserie » à organiser.

Merci aux copains de la Salsa, qui ont été pendant une période de ma thèse, ma bouffée d'oxygène de la semaine.

Sam, chère binôme de Master, bon courage à toi en Californie. Je suis certaine que, comme d'habitude, tu vas cartonner.

François, cher binôme sportif, merci à toi pour les séances de footing, d'escalade et pour ton soutien. Bon courage à toi à Vienne, j'espère pouvoir venir te voir très vite.

Stéphane, merci à toi pour ta patience, tes encouragements, ton relativisme et d'être à mes côtés. J'espère n'avoir pas été trop invivable, surtout ces derniers temps !

I.	INTRODUCTION	11
A.	<i>Le pancréas adulte : anatomie, fonctions et pathologies</i>	13
1.	Anatomie du pancréas adulte	13
2.	Types cellulaires composant le pancréas et leurs fonctions	14
2.1	Les cellules exocrines	14
2.1.1.	Les cellules acinaires	14
2.1.2.	Les cellules canalaies	14
2.2.	Les cellules endocrines.....	14
2.2.1.	Les cellules α	14
2.2.2.	Les cellules δ	15
2.2.3.	Les cellules PP	15
2.2.4.	Les cellules ϵ	15
2.3.	Les cellules β : fonction, sécrétion de l'insuline et prolifération.....	15
2.3.1.	Fonction hypoglycémiant de l'insuline.....	15
2.3.2.	Mécanismes de sécrétion de l'insuline par les cellules β	16
2.3.3.	Prolifération des cellules β adultes.	16
3.	Vascularisation du pancréas adulte et fonctions	17
3.1.	Structure, ligands et récepteur de la vascularisation pancréatique.....	17
3.2.	Fonction de la vascularisation endocrine adulte.....	17
4.	Innervation du pancréas adulte et fonction.....	18
4.1.	Le système nerveux sensitif	18
4.2.	Le système nerveux autonome	18
4.2.1.	Le système nerveux parasympathique.....	18
4.2.2.	Le système nerveux sympathique	19
4.3.	Système nerveux et régulation de la glycémie.....	19
5.	Le diabète.....	20
5.1.	Diabète de type 1.....	20
5.1.1.	Causes	20
5.1.2.	Traitements	21
5.2.	Diabète de type 2.....	21
5.2.1.	Causes	21
5.2.2.	Traitements	22
5.3.	Diabètes Monogéniques	22
5.3.1.	Le diabète néonatal.....	22
5.3.2.	Les MODYs	23
5.3.3.	Les diabètes syndromiques	23
5.3.4.	Les diabètes mitochondriaux	23
5.3.5.	Traitements	23
6.	Axes de recherche visant à générer de nouvelles cellules β fonctionnelles.....	23
6.1.	Réplication des cellules β existantes	24
6.2.	Différenciation de cellules souches ou à pluripotence induite	24
6.3.	Transdifférenciation cellulaire	25

B. Développement du pancréas	26
1. Spécification de l'endoderme et du pancréas	26
1.1. Régulation transcriptionnelle de la différenciation des progéniteurs pancréatiques multipotents (MPC) 26	
1.1.1. Spécification de l'endoderme	26
1.1.2. Spécification du pancréas	26
1.2. Signaux impliqués dans la spécification du pancréas	28
1.2.1. FGF10, Wnt et la détermination de l'endoderme pancréatique	29
1.2.2. Signaux impliqués dans la formation du bourgeon ventral	30
1.2.3. Signaux impliqués dans la formation du bourgeon dorsal.....	31
2. Différenciation des progéniteurs endocrines.....	33
2.1. Spécification des progéniteurs endocrines par Ngn3	33
2.2. Implication de la voie Notch dans la différenciation endocrine	34
3. Différenciation et maturation des différents types cellulaires endocrines du pancréas.....	36
3.1. Régulation transcriptionnelle de la différenciation endocrine pancréatique.....	37
3.1.1. NeuroD	37
3.1.2. Nkx2.2, Nkx6.1 et Nkx6.2.....	37
3.1.3. Rfx3 et Rfx6.....	38
3.1.4. Pax6, Pax4 et la différenciation endocrine	40
3.1.5. Arx et la différenciation des cellules α	41
3.2. Signaux impliqués dans la différenciation endocrine	41
3.2.1. Le mésenchyme : une source de signaux favorisant la différenciation endocrine	41
3.2.2. Shh, Ihh et le maintien des fonctions endocrines ?	42
3.2.3. Le TGF β et la prolifération/maturation des cellules endocrines.....	43
4. Régulation transcriptionnelle de la maturation des cellules α et β	44
4.1. La transition de MafB vers MafA est nécessaire à la maturation des cellules β	44
4.2. Rôle du neuropeptide UcnIII dans la fonction des cellules β et la sécrétion d'insuline.....	45
4.3. Le facteur de transcription Pdx1 active la transcription de gènes nécessaires à la fonction des cellules β et réprime le programme α	45
4.4. Brn4 : un facteur de transcription spécifique des cellules α	46
5. Rôle de la vascularisation dans le développement du pancréas	46
5.1. Vascularisation et formation précoce du pancréas	46
5.2. Vascularisation, arborisation de l'épithélium pancréatique et différenciation endocrine	47
5.3. Mise en place du système vasculaire et innervation pancréatique.....	49
6. Rôle de l'innervation dans le développement du pancréas	49
6.1. Mise en place de l'innervation pancréatique au cours du développement	49
6.2. Innervation pancréatique, maturation des cellules β et organisation des cellules endocrines.....	50
C. La voie de signalisation du Gdnf	51
1. Présentation de la voie de signalisation du Gdnf	51
1.1. Ligands et récepteurs de la famille du Gdnf	51
1.2. Modes d'activation de Ret.....	52
1.3. Maturation des GFL	52

2.	Pathologies humaines associées à la voie de signalisation de la famille du Gdnf	53
2.1.	Cancérologie	53
2.2.	Maladie de Hirschsprung	54
2.3.	NEM2A	54
3.	Fonctions des GFRs et GFLs	54
3.1.	Phénotypes liés aux mutations perte de fonction des GRLs et GFRs	54
3.2.	Action neurotrophique des GFLs	55
3.3.	Gdnf/Gfra1/Ret et la migration du bourgeon rénal	56
3.4.	Gdnf et la différenciation des spermatogonies	56
3.5.	Voie de signalisation du Gdnf et pancréas	57
II.	RESULTATS ET DISCUSSIONS	60
A.	<i>Projet de thèse</i>	60
1.	Contexte	60
2.	Objectifs	61
B.	<i>Papier en préparation</i>	61
C.	<i>Résultats supplémentaires</i>	62
1.	Etude de l'expression d'Artn	62
1.1.	Contexte	62
1.2.	Méthodes	62
1.3.	Résultats	62
2.	Etude de gain de fonction	65
2.1.	Culture d'explants pancréatiques en présence d'Artn recombinant	65
2.1.1.	Contexte	65
2.1.2.	Méthodes	65
2.1.3.	Résultats et discussions	66
2.2.	Test de migration cellulaire	66
2.2.1.	Contexte	66
2.2.2.	Méthodes	67
2.2.3.	Résultats et discussions	67
2.3.	Elaboration d'une lignée de souris transgéniques surexprimant Artn au cours du développement du pancréas (réalisée avec Delia Esteban Martin et Joël Herrmann)	68
2.3.1.	Contexte	68
2.3.2.	Méthodes	69
2.3.3.	Résultats et discussion	69
3.	Etude de l'expression des GFRs	73
3.1.	Contexte	73
3.2.	Méthodes	74
3.3.	Résultats et discussion	74
III.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	78
A.	<i>Autres récepteurs membranaires révélés par Gene Ontology</i>	78
B.	<i>Expression pancréatique du récepteur Gfra3 et de son ligand Artn</i>	79
1.	Le mésenchyme : la source pancréatique d'Artn ?	79

2.	Gfra3, révélateur d'une sous-population de cellules à glucagon ?	79
C.	<i>Modulation de la voie du Gdnf et phénotypes endocrines et nerveux associés.</i>	80
1.	Modulation de la voie de signalisation du Gdnf et phénotypes endocrines	80
1.1.	Cas des pertes de fonction	80
1.2.	Cas des gains de fonction	80
2.	Modulation de la voie de signalisation du Gdnf et phénotypes nerveux	81
3.	Conclusion et perspectives.....	82
D.	<i>Caractérisation de la perte de fonction de Gfra3 dans les cellules Ngn3-positives et phénomène de redondance.</i>	82
1.	Caractérisation transcriptionnelle de la perte de Gfra3 dans les cellules Ngn3-positives	82
2.	Phénomène de redondance	83
2.1.	Phénomène de redondance au sein du lignage endocrine.....	83
2.2.	Phénomène de redondance au sein du système nerveux pancréatique.....	84
2.3.	La perte de Gfra3 peut-elle être compensée par d'autres types de récepteurs ?	84
E.	<i>Perspectives des souris transgéniques surexprimant Artn dans le pancréas embryonnaire</i>	85
1.	Les souris transgéniques PAM expriment et sécrètent le ligand Artn.....	85
2.	Perspectives des études des souris transgéniques surexprimant Artn dans le pancréas	86
F.	<i>Gfra3 : un marqueur pour la purification des cellules endocrines en différenciation ?</i>	87
G.	<i>Conclusion</i>	88

Abréviations

abcc8	ATP-binding cassette transporter sub-family C member 8
ADH	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucéique
ADP	adénosine diphosphate
ALDH	rétinaldéhyde deshydrogénases
Ang	Angiopoietin
AR	acide rétinoïque
ARN	acide ribonucléique
Artn	artemin
Arx	Aristaless homeobox
ATP	adénosine triphosphate
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bHLH	basic helix-loop-helix
BLK	B lymphocyte kinase
BMP	bone morphogenetic protein
Bp	paire de bases
BSA	bovin serum albumin
Cdh	Cadherine
Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
cDNA	complementary DNA
CEL	carboxyde ester lipase
CGRP	calcitonin gene-related polypeptide
CMV	cytomégalovirus
CNTF	ciliary neurotrophic factor
Cre	Cyclization recombination enzyme
CRFR2	corticotropin-releasing factor
Ddr1	Discoidin domain receptor tyrosine kinase 1
Dhh	desert hedgehog
Dll	Delta-like ligand
DMEM	Dubelcco's modified Eagle medium
DN	diabète néonatal
Dner	Delta/Notch-like EGF repeat containing
DNP	diabète neonatal permanent
DNT	diabète neonatal transitoire
DOK4/5	downstream of tyrosine kinase 4/5
DRG	ganglions dorso-rachidiens
E	stade embryonnaire
EGF	epithelial growth factor
EIF2AK3	encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3,
Eph	Ephrin
ER TM ou Cre ^{ER}	Cre inductible au tamoxifène
ESC	Cellule souche embryonnaire
eYFP	enhanced yellow fluorescent protein
FACS	fluorescence activated cell sorting
FGF	fibroblast growth factor
Fgfr	recepteur aux FGFs
Fig	figure
Flk	Fetal liver kinase
Fox	facteur de transcription de la famille forkhead
FOXP3	forkhead box P3
FRS2	fibroblast growth factor receptor substrate 2
Frz	frizzled
FTO	fat-mass and obesity protein
GAB1	Grb2-associated binding protein1
GCK	glucokinase
Gdf11	growth differentiation factor 11
GDNF	glial cell line derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFL	GDNF family of Ligand
GFP	green fluorescent protein

Abréviations

GFR	GDNF family of receptor
Glc	Glucagon
GLI	glioma-associated oncogene
GLIS3	GLI similar protein 3
GLP-1	glucagon like peptide 1
Glp1r	récepteur du GLP-1
Glut	glucose transporter
GPI	glycosyl phosphatidylinositol
GRB	growth factor receptor-bound protein
HBSS	Hank buffer salt solution
Hes	Hairy and Enhancer of Split transcription factor
Hek	human embryonic kidney
hESC	cellules souches pluripotentes humaines
Hey	Hes-related family bHLH transcription factor with YRPW motif 1
Hhg	hedgehog
Hhip	Hhg interacting protein
hiPSC	cellules souches à pluripotence induite humaines
hnf	hepatic nuclear factor
ICS	Institut Clinique de la Souris
Ihh	Indian hedgehog
Ins	insuline
Insm1	insulinoma-associated protein 1
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRS1/2	insulin receptor 1/2
ISH	hybridation <i>in situ</i>
KATP	canal Potassium ATP-dépendant
KCNJ11	sous unité du canal K_{ATP} impliqué dans la sécrétion de l'insuline
KCNQ1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1
kDa	kilo Dalton
Kir6.2	sous unité du canal K_{ATP}
KLF11	Kruppel like factor 11
LacZ	séquence codant pour la β galactosidase
LDL	Low protein lipoprotein
LIRKO	Liver-specific insulin receptor knockout
LRP	LDL-Related Protein
Maf	musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family
MANF	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor
MAPKinase	mitogen-activated protein Kinase
Mnx	motor neuron and pancreas homeobox protein
MODY	maturity onset diabetes of the young
MPC	progéniteur multipotent
NaCl	chlorure de sodium
NDS	Normal Donkey Serum
NeuroD	neurogenic differentiation factor
NGF	nerve growth factor
NGN2KO	souris Nestin-Cre; TH ^{fl/fl}
Ngn3	neurogenin3
NICD	Notch intracellular domain
Nkx	NK homeobox
NEM2A	néoplasie endocrinienne multiple de type 2A
NPY	neuropeptide Y
Nrtn	Neurturin
P	stade postnatal
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
Pak	activated protein kinase
PAM	transgène pPdx1-Artn-2A-mCherry
Pax	paired box gene
PBS	phosphate buffer saline
PC1/3	Protein Convertase 1/3
Pdx1	pancreatic and duodenal homeobox 1

Abréviations

PH	plexin homology
Phox2b	paired like homeobox 2B
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase
PLC	phospholipase C
PP	cellules sécrétant le polypeptide P
Prox1	prospero homeobox 1
Ps	Presenilin
Pspn	persephin
Ptc	patched
Ptf1a	pancreas specific transcription factor 1A
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RALDH	rétinaldéhyde déshydrogénase
RAR	récepteur AR (acide rétinoïque)
RBPJ κ	recombining binding protein suppressor of hairless
RBPJL	Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin κ J region- Like
RDH	retinol deshydrogénase
Ret	rearranged during transcription
Rfx	regulatory factor x
RIP	Rat Insulin Promoter
R-Smad	receptor-regulated Smad
RXR	rétinoïde X
S1P	sphingosine-1-phosphate
SCG	ganglion cervical supérieur
Ser	Serrate
Sey	small eye
Shc	Src homologous and collagen-like protein
Shh	sonic hedgehog
Smo	protéine Smoothened
Sox	sex determining region Y box
SUR1	sulfonylurea receptor
T1D	diabète de type 1
T2D	diabète de type 2
TCF	transcription factor
TCF7L2	transcription factor 7 like 2
TGF β	transforming growth factor β
TH	Tyrosine Hydroxylase
TrkA	neurotrophin tyrosin kinase receptor type 1
Tuj1	Neuronal Class III β -Tubulin
T β R	récepteurs de TGF β
Ucn III	urocortin III
VACht	vesicular acetylcholine transporter
Vdr	récepteur à la vitamin D
VEGF-A	vascular endothelial growth factor a
VEGFR	récepteur VEGF
VIP	vasoactive intestinal peptide
WFS1	wolframin
Wnt	voie Wint
XGal	substrat chromogénique de la β -galactosidase
Znt8	Zinc transporter 8

Introduction

I. Introduction

Le pancréas, via sa sécrétion d'insuline par les cellules β , est l'organe clé pour la régulation de la glycémie. En effet, l'insuline est la seule hormone hypoglycémisante de l'organisme. Ainsi, un défaut dans la production, sécrétion et/ou la sensibilité à cette hormone ou encore la perte des cellules β pancréatiques est à l'origine du diabète (Ashcroft and Rorsman, 2012; Pagliuca and Melton, 2013). Le diabète est une pathologie complexe, ayant des origines aussi bien génétique, qu'environnementales et qui est en pleine expansion, essentiellement à cause du manque de mobilité et de la banalisation des régimes riches en matière grasse ou en glucides pour le diabète de type 2. Cette pathologie peut présenter des complications graves comme des neuropathies, rétinopathies pouvant aller jusqu'à la cécité, néphropathies ou encore des troubles du système cardiovasculaire (Pagliuca and Melton, 2013). Des traitements performants existent pour traiter le diabète. Pour le diabète de type 2, un régime adapté avec prise de médicaments afin de normaliser la glycémie ou encore stimuler la sécrétion d'insuline, peut suffire à aider le patient à contrôler cette maladie chronique. Dans le cas du diabète de type 1, des injections d'insuline quotidiennes sont nécessaires pour permettre au patient de réguler sa glycémie. Dans le cas où les injections d'insuline ne sont plus suffisantes pour réguler la glycémie du patient, la greffe d'îlots est envisagée. La greffe d'îlots est une thérapie efficace, mais ne résout pas forcément les problèmes d'insulino-indépendance sur le long terme (Barton et al., 2012; Lacy and Scharp, 1986). Par ailleurs, à l'heure actuelle, la greffe d'îlots est limitée par la disponibilité de pancréas pour l'isolement des îlots: de nombreuses pertes d'îlots sont constatées lors de leur purification. Pour réaliser une greffe fonctionnelle sur le long terme, au minimum deux pancréas donneurs, prélevés sur des patients en état de mort cérébrale, sont nécessaires. De nombreux projets de Recherche portent sur l'élaboration de nouveaux traitements du diabète, avec notamment dans le domaine des Biotechnologies, le pancréas artificiel, ou encore en Biologie Cellulaire, la génération de cellules sécrétrices d'insuline proches des cellules β pancréatiques. Les travaux portant sur la génération de cellules sécrétrices d'insuline ont pour but d'apporter, aux patients atteints de diabète de type 1, des cellules capables de sécréter de l'insuline qui soient stables, afin d'éviter une prolifération anarchique de ces cellules, sensibles aux variations de glucose et ainsi capables de sécréter de manière glucose-dépendante de l'insuline en réponse à ces variations (Pagliuca and Melton, 2013). Ces travaux visent à récapituler, in vitro, soit par un phénomène de reprogrammation cellulaire, soit en stimulant la prolifération des cellules β restantes, la régénération de cellules sécrétrices d'insuline. Ces travaux se basent sur les connaissances acquises sur les différents mécanismes intervenant pour permettre la formation de cellules β fonctionnelles. Les connaissances fondamentales sur les mécanismes impliqués dans la différenciation, la maturation et le maintien des cellules endocrines du pancréas aideront à l'élaboration de nouvelles thérapies.

Le développement du pancréas est un évènement hautement régulé, faisant intervenir toutes sortes d'interactions non seulement avec les tissus adjacents, mais aussi entre les cellules de

l'épithélium pancréatique. Grâce aux découvertes de ces dernières décennies, nous avons pu apprendre que la différenciation d'une cellule donnée pancréatique est régie non seulement dans le temps, mais aussi dans l'espace. En effet, selon le stade de développement et sa position, cette cellule sera soumise à différents signaux, entraînant l'activation ou la répression de facteurs de transcription impliqués dans une cascade de régulation, afin d'affiner la destinée et l'identité de cette cellule. A l'heure actuelle, de nombreux facteurs de transcription ont été décrits comme étant impliqués dans la différenciation, la prolifération ou encore le maintien des fonctions des cellules pancréatiques. Cependant, les signaux potentiellement impliqués dans la différenciation des différents sous types endocrines restent méconnus. Afin d'identifier de tels signaux, l'équipe du Dr Gradwohl a réalisé chez la souris une analyse par puce Affymetrix sur une population de progéniteurs endocrines Ngn3^+ issue de pancréas au stade embryonnaire (E) 15.5 en comparant leur profil transcriptionnel aux autres types cellulaires de ces pancréas (Soyer et al., 2010). Cette analyse a permis d'identifier des facteurs de transcription, tels que Rfx6 (Soyer et al., 2010)(Piccand et al. en préparation), ou encore des effecteurs intracellulaires, comme Pak3 (Cleveland et al., 2012; Piccand et al., 2013), qui sont enrichis dans les cellules Ngn3^+ par rapport aux cellules Ngn3^- . Cette analyse a aussi permis d'identifier le récepteur membranaire *Glial cell line derived neurotrophic factor family of receptor a 3* (*Gfra3*) comme étant enrichi dans la population de progéniteurs endocrines. Durant ma thèse, je me suis intéressée à i) analyser le patron d'expression de ce récepteur ainsi que celui de son ligand au cours du développement du pancréas et dans le pancréas adulte et ii) à étudier par des études de perte et de gain de fonction le rôle de cette voie de signalisation dans le pancréas embryonnaire et adulte.

A. Le pancréas adulte : anatomie, fonctions et pathologies

1. Anatomie du pancréas adulte

Le pancréas est un organe abdominal, mesurant environ 15cm chez l'Humain, situé sous l'estomac et fixé par le cadre duodénal (Fig 1). C'est une glande amphicrine c'est-à-dire ayant à la fois des fonctions endocrines, par la sécrétion d'hormones clés pour la régulation du métabolisme et une fonction exocrine, par la sécrétion d'enzymes de la digestion.

La partie exocrine du pancréas est composée des cellules acinaires, centro-acinaires et canalaire (Cleveland et al., 2012). Les cellules acinaires sont regroupées en acini (Fig 1) et sécrètent principalement des enzymes protéolytiques et lipolytiques (cf. paragraphe I.A.2.1.1). Les cellules centro-acinaires sont des cellules se positionnant à l'interface entre les structures acinaires et les canaux, composés pour leur part des cellules canalaire (Stanger and Dor, 2006). Ces cellules centro-acinaires sont peu connues. Il n'est pas très clair si ces cellules représentent une population différente des cellules canalaire terminales ou si ces 2 types cellulaires sont équivalents (Cleveland et al., 2012). Les cellules canalaire sont regroupées afin de composer les canaux qui vont permettre d'acheminer les sécrétions du pancréas exocrine jusqu'au duodénum (Fig 1). Ces cellules forment différents canaux qui vont converger vers un canal principal, le canal de Wirsung, rattaché au duodénum par la papille de Vater (Fig 1).

La fonction endocrine du pancréas est assurée par des cellules regroupées en structures bien caractéristiques, nommées îlot de Langerhans, dispersés au sein du pancréas exocrine (Fig 1). Chez l'adulte, le tissu endocrine représente seulement ~ 2% du tissu pancréatique, mais est essentiel à la régulation de la glycémie. On distingue 5 types de cellules insulaires: les cellules α sécrétant le glucagon, représentent 15 à 20% du tissu endocrine ; les cellules β sécrétant l'insuline, représentent 60 à 80% du tissu endocrine ; les cellules δ sécrétant la somatostatine, représentent 5 à 10% du tissu endocrine ; les cellules PP sécrétant le Polypeptide P, représentent moins de 2% du tissu endocrine et enfin les cellules ϵ sécrétant la ghréline, qui représentent moins de 1% du tissu endocrine (Edlund, 2002). Chez la souris adulte, ces types cellulaires sont organisés en une architecture particulière, avec un amas central de cellules β entourées d'une couronne de cellules α . Cette organisation est différente chez l'Humain, où les cellules α et β sont mélangées au sein de l'îlot (Bosco et al., 2010).

Le pancréas, notamment le pancréas endocrine, est richement vascularisé et innervé suggérant une régulation fine, à la fois par le système sanguin et le système nerveux des sécrétions exocrines et hormonales et permettant une adaptation rapide des fonctions endocrines pancréatiques. L'innervation, la vascularisation, ainsi que leurs rôles dans le développement et les fonctions pancréatiques seront développés ultérieurement au cours de cette introduction.

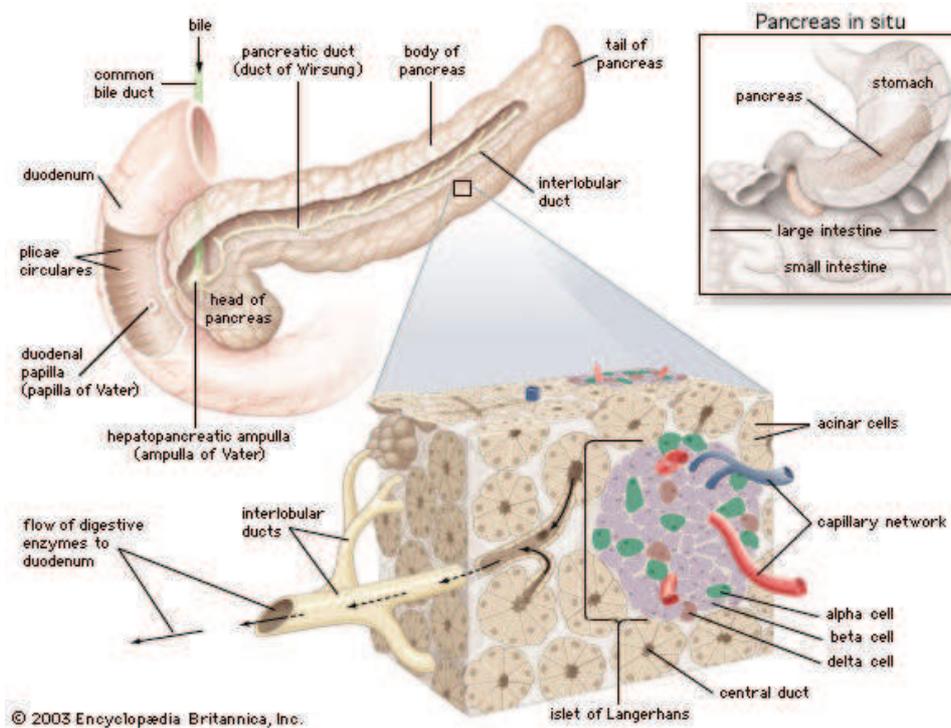


Figure 1 : Organisation du pancréas adulte humain. Les îlots de Langerhans, structures regroupant les cellules endocrines pancréatiques, sont dispersés au sein du tissu acinaire. Une vascularisation dense du pancréas permet une réponse rapide des cellules endocrines aux variations de glucose sanguin. Le canal de Wirsung permet la sécrétion des enzymes digestives produites par le pancréas au niveau du duodénum, afin de participer à la digestion D'après Encyclopedia Britannica. 2003.

2. Types cellulaires composant le pancréas et leurs fonctions

2.1 Les cellules exocrines

La fonction principale des cellules exocrines pancréatiques est de sécréter des enzymes de digestion, ainsi que des ions bicarbonates. La sécrétion des enzymes de digestion par le pancréas est régulée par différentes hormones provenant de l'estomac et de l'intestin, telles que la ghréline, la sécrétine ou encore la cholecystokinine (Murphy and Bloom, 2006).

2.1.1. Les cellules acinaires

Les cellules acinaires synthétisent les enzymes de digestion, telles que l'Amylase, le Trypsinogen, les Lipases et Phospholipases, ainsi que la Carboxypeptidase A. Les cellules acinaires sécrètent aussi un fluide primaire, riche en NaCl, qui permet le maintien et la sécrétion des enzymes de digestion. La composition de ce fluide primaire est ensuite modifiée lors de son passage dans le système canalaire (Cleveland et al., 2012).

2.1.2. Les cellules canalaire

Les cellules canalaire assurent différentes fonctions : fournir un réseau et support aux cellules acinaires, conduire les sécrétions exocrines jusqu'au duodénum et sécréter un fluide riche en bicarbonates qui va permettre de tamponner l'acidité du bol digestif qui arrive de l'estomac, pour permettre ainsi de remonter le pH à un niveau favorable à l'action des enzymes pancréatiques protéolytiques et lipolytiques (Cleveland et al., 2012; Garcia et al., 2008).

2.2. Les cellules endocrines

La fonction principale des cellules endocrines est la régulation de la glycémie avec une balance entre deux hormones principales : l'insuline, hypoglycémisante et le glucagon, hyperglycémisante. La sécrétion de ces deux hormones pancréatiques est notamment régulée par le glucose circulant, mais aussi le système nerveux (Ahren, 2000) ainsi que par les hormones gastro-intestinales (Murphy and Bloom, 2006).

2.2.1. Les cellules α

Les cellules α sécrètent le glucagon, une hormone hyperglycémisante. La sécrétion de glucagon est induite par la moindre baisse de la glycémie, permettant en réponse de maintenir une glycémie normale. L'effet hyperglycémisant du glucagon repose principalement sur la stimulation de la production hépatique du glucose par glycogénolyse et néoglucogénèse au niveau du foie et indirectement par un effet lipolytique et protéolytique (Stephen L. Aronoff, 2004) (Fig 2).

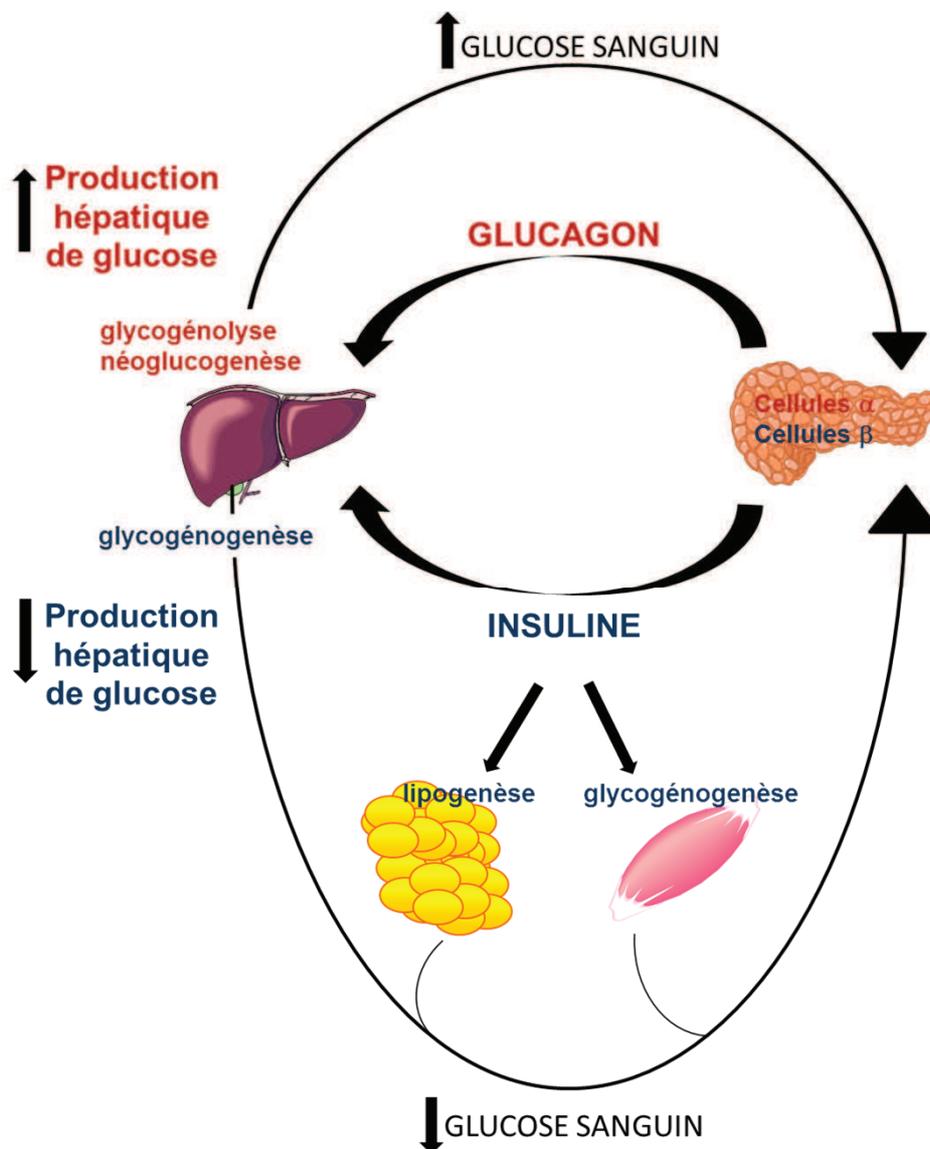


Figure 2 : Régulation de l'homéostasie du glucose. Lors d'une diminution du glucose sanguin, le glucagon, libéré par les cellules α du pancréas va activer la glycogénolyse ainsi que la gluconéogenèse hépatique, permettant d'augmenter le taux de glucose sanguin. Lors d'une hausse du taux de glucose circulant, l'insuline, sécrétée par les cellules β pancréatiques va activer la néoglycogenèse hépatique et musculaire et la formation de triglycérides au niveau du tissu adipeux afin de réduire la glycémie.

2.2.2. Les cellules δ

Les cellules δ sécrètent la somatostatine, considérée comme une hormone « anti-hormone ». Des récepteurs pour la somatostatine sont exprimés par les cellules α ainsi que les cellules β , suggérant que ces deux types de cellules endocrines sont sensibles à l'action inhibitrice de la somatostatine (Youos, 2011). La sécrétion de somatostatine est stimulée par le **Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1)**, une hormone intestinale, via son récepteur GLP-1R. Cette action entraîne l'inhibition de la sécrétion du glucagon par les cellules α (Drucker, 2013).

2.2.3. Les cellules PP

Les cellules PP sécrètent le Polypeptide Pancréatique, dont l'expression est augmentée lors de la prise de nourriture. Le Polypeptide Pancréatique a un effet globalement anorexigène avec majoration de la satiété (Chandra and Liddle, 2014b).

2.2.4. Les cellules ϵ

Les cellules ϵ ainsi que quelques cellules α sécrètent la ghréline. La majorité des cellules ghréline⁺ pancréatiques sont visibles lors du développement du pancréas. Après la naissance, la quantité de cellules pancréatiques ghréline⁺ diminue pour devenir inférieure à 1% de la masse de cellules endocrines. Chez l'adulte, la ghréline est sécrétée par l'estomac et l'intestin, stimule l'appétit et inhibe la sécrétion d'insuline (Chandra and Liddle, 2014a, b; Wierup et al., 2013)

2.3. Les cellules β : fonction, sécrétion de l'insuline et prolifération

Les cellules β représentent la majorité du tissu endocrine pancréatique (~80% du tissu endocrine). Leur fonction est de sécréter l'insuline, la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme.

2.3.1. Fonction hypoglycémiante de l'insuline.

Afin de diminuer le taux de glucose sanguin, l'insuline agit sur différents organes et types cellulaires en différentes étapes. Dans un premier temps, l'insuline va permettre l'absorption du glucose circulant par les muscles squelettique, puis induire la glycogénogenèse au niveau du foie et enfin, inhiber la sécrétion du glucagon par les cellules α , arrêtant ainsi la néoglucogenèse et glycogénolyse hépatiques. L'insuline peut aussi agir sur les cellules graisseuses en favorisant le stockage du glucose sous forme de triglycérides ou encore, au niveau du foie et des muscles, sous la forme de protéines (Stephen L. Aronoff, 2004) (Fig 2).

2.3.2. Mécanismes de sécrétion de l'insuline par les cellules β .

La sécrétion de l'insuline se fait en plusieurs temps : il y a tout d'abord une phase dite céphalique, qui précède la prise de nourriture et prépare l'organisme à répondre à une augmentation de la glycémie. Lorsque le glucose sanguin augmente suite à la prise de nourriture, la sécrétion d'insuline, se fait en deux temps. Tout d'abord, un pic initial de sécrétion de 5 à 7 minutes, suivi par une période prolongée de sécrétion d'insuline, à un niveau plus faible (Fig 3). Cette seconde phase peut durer jusqu'à 4 heures après l'ingestion d'aliments, jusqu'à ce que la glycémie soit revenue à son taux basal (Geloneze et al., 2006).

Dans le cas de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, le glucose est transporté à travers la membrane plasmique par son récepteur : Glut1 ou Glut2 (Fig 4). Il est ensuite phosphorylé par la glucokinase (GCK) et converti en ATP. Cette augmentation en ATP intracellulaire entraîne la fermeture du canal Potassium-ATP dépendant (K_{ATP}), composé des sous-unités SUR1 et Kir6.2, ce qui induit une dépolarisation de la membrane plasmique. Cette dépolarisation entraîne l'ouverture des canaux calciques, permettant une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et l'exocytose des granules intracellulaires contenant l'insuline (Ashcroft and Rorsman, 2012).

2.3.3. Prolifération des cellules β adultes.

Au cours du développement, le processus de néogenèse est à l'origine des nouvelles cellules à insuline. En réalisant un lignage des cellules β adultes grâce à l'administration d'un pulse de tamoxifène à des souris adultes RIP-Cre^{ER}; Z/AP, Dor et al. (2004) ont pu ainsi démontrer que le renouvellement des cellules β adultes se fait par duplication des cellules β existantes plutôt que par un processus de différenciation (Dor et al., 2004). Grâce à des expériences de greffes hétérochroniques de cellules β provenant de souris âgées ou jeunes, Salpeter et al. 2013 ont pu démontrer que l'âge, ainsi que des facteurs systémiques, ont aussi un impact sur la capacité de prolifération des cellules β , qui décline au cours du temps (Eto et al., 2014; Salpeter et al., 2013). L'étude des mécanismes contrôlant la réplication des cellules β adultes a permis d'identifier différents acteurs, tels que des régulateurs du cycle cellulaire (cyclines et cyclines-kinase dépendantes), des signaux (insuline, glucose, prolactine) ou encore des facteurs de transcription tels que MafA (Eto et al., 2014).

Dans de rares cas, comme lors de ligatures partielles du canal pancréatique (Xu et al., 2008), un processus de néogenèse avec réexpression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules β a pu être observé. Ces résultats suggèrent qu'une plasticité subsiste au sein du pancréas adulte, permettant, dans des conditions de stress particulier, de régénérer de nouvelles cellules β .

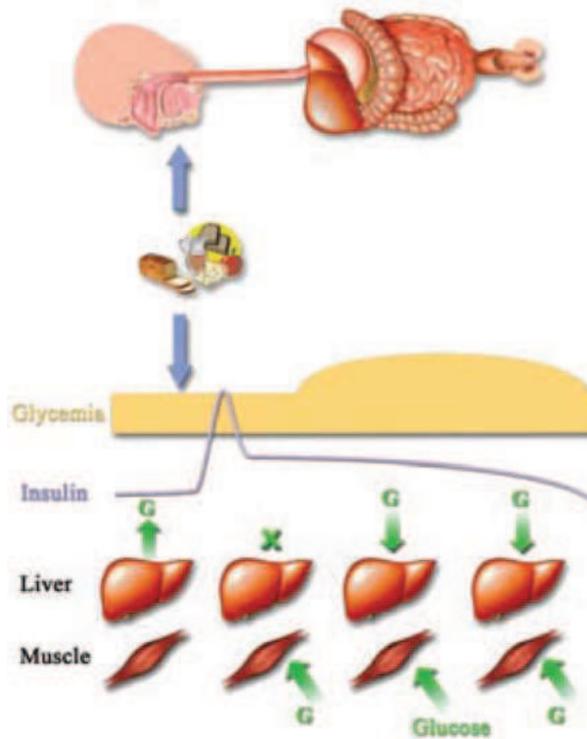


Figure 3: Cinétique de la sécrétion de l'insuline et effet sur le glucose circulant. Afin de maintenir une glycémie constante, en période de jeun, du glucose est généré et relâché par le foie et le taux d'insuline est bas. Peu après la prise de nourriture, la sécrétion d'insuline réalise un pic puis est maintenue à taux plus élevé que le taux basal afin d'induire la prise de glucose par le foie et les muscles, permettant ainsi de diminuer la glycémie (D'après Stephen L. Aronoff, 2004).

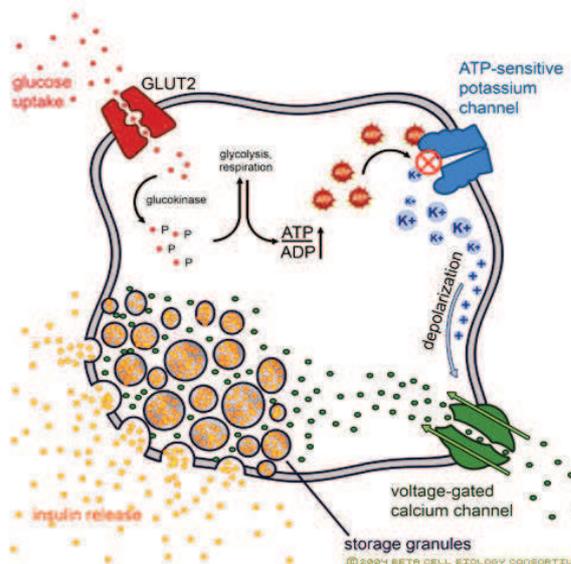


Figure 4 : Mécanisme de sécrétion de l'insuline. Le glucose est transporté à travers la membrane plasmique par son récepteur : Glut1 ou Glut2 pour ensuite être phosphorylé par la Glucokinase en glucose-6-phosphate et injecté dans la voie de la glycolyse dont le but est de le convertir en ATP. Cette augmentation en ATP intracellulaire entraîne la fermeture du canal K_{ATP} , ce qui induit une dépolarisation de la membrane plasmique. Cette dépolarisation entraîne l'ouverture des canaux calciques, permettant une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et l'exocytose des granules de sécrétion intracellulaires contenant l'insuline. D'après Betacellbiologyconsortium.org 2004.

3. Vascularisation du pancréas adulte et fonctions

3.1. Structure, ligands et récepteur de la vascularisation pancréatique

Le système vasculaire pancréatique forme un réseau à travers le pancréas, traversant le pancréas exocrine et se densifiant au niveau des îlots. Au niveau des structures endocrines, les vaisseaux sanguins sont fenêtrés, permettant aux îlots des échanges plus rapides entre ces deux compartiments (Bonner-Weir and Orci, 1982). La proximité entre le système vasculaire et le système endocrine pancréatique permet aux cellules endocrines d'être directement en contact avec le glucose circulant et de répondre directement aux variations de la glycémie.

Les interactions entre le système vasculaire et le système endocrine ne se limitent pas à la formation de structures échangeant des hormones en suivant les variations de la glycémie. Il existe aussi une régulation paracrine entre ces deux compartiments. Différents ligands endothéliaux sont exprimés par le tissu pancréatique : **EphrinA1** (EphA1) et EphB4, **Angiopoietin 1** (Ang1) et Ang2 ainsi que le **Vascular Endothelial Growth Factor A** (VEGF-A). Au niveau du tissu endothélial pancréatique, le récepteur au VEGF principalement exprimé est VEGFR2 (Brissova et al., 2006; Lammert et al., 2001; Pierreux et al., 2010).

3.2. Fonction de la vascularisation endocrine adulte

Les souris VEGF-A^{-/-} ou perte de fonction de VEGF-A dans les cellules insuline⁺ présentent toutes les deux une intolérance au glucose, liée à la diminution de l'endothélium et à l'altération de sa structure qui ne permet pas une sécrétion correcte de l'insuline (Brissova et al., 2006; Lammert et al., 2003), démontrant l'importance de la structure de l'endothélium dans la régulation de la glycémie. Afin de savoir si VEGF-A est nécessaire aux cellules endocrines adultes, la comparaison de l'effet d'une délétion embryonnaire de VEGF-A avec une perte plus tardive (4mois) dans les cellules β a permis de démontrer qu'au cours du développement embryonnaire, VEGF-A est nécessaire à la formation des îlots et à la prolifération des cellules β , tandis qu'une délétion plus tardive entraîne peu d'effets (Fig 5). Ces données démontrent que VEGF-A est nécessaire lors du développement du pancréas, mais n'est pas essentiel au maintien, ni à la fonction des cellules β adultes (Reinert et al., 2013).

Au niveau structural cellulaire, la délétion de VEGF-A au cours du développement du pancréas entraîne une absence de la membrane basale des cellules endocrines au stade adulte (Nikolova et al., 2006). Cette membrane basale a, à son tour, été identifiée comme une source de signaux stimulant l'expression de l'insuline et permettant la maturation des granules de sécrétion de l'insuline (Nikolova et al., 2006). Ainsi, le système vasculaire apparaît comme nécessaire à la mise en place de la lame basale, élément majeur de la fonction des cellules β .

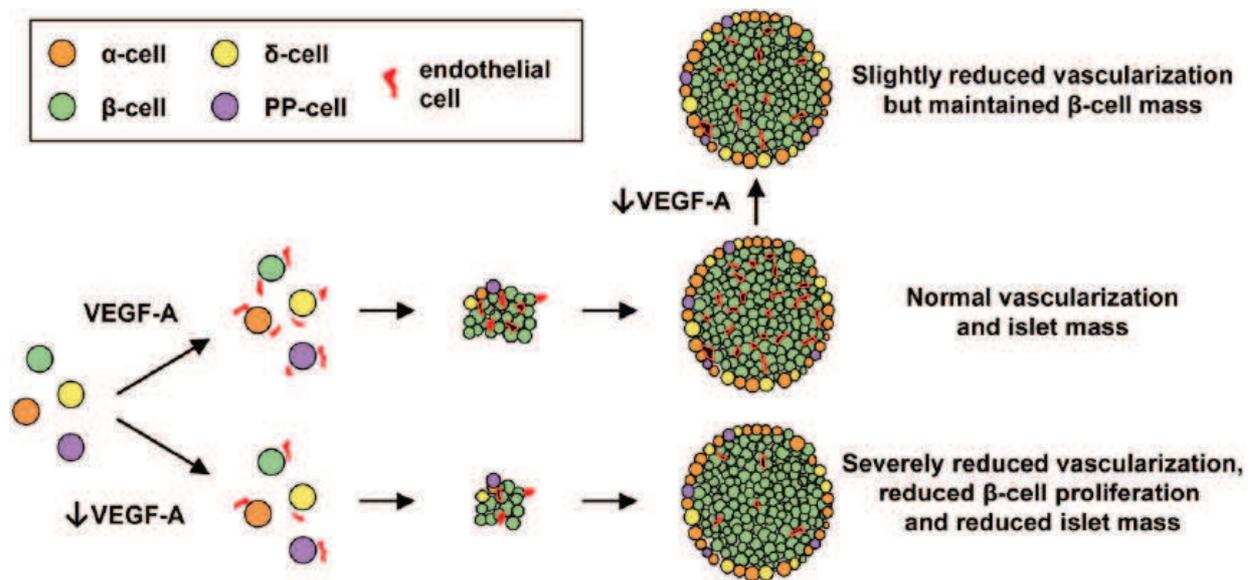


Figure 5: Modèle présentant les différents rôles de VEGF-A au cours du développement du pancréas et au stade adulte. Une perte embryonnaire de VEGF-A entraîne une forte hypovascularisation, ainsi qu'une diminution de la prolifération des cellules β et de la masse des îlots, tandis qu'une perte de VEGF-A dans les cellules β adultes entraîne une légère hypovascularisation, sans impact sur la masse de cellules β . D'après Reinert et al. 2013.

La surexpression de VEGF dans les cellules β à insuline ou encore la modulation de l'expression du VEGF-A humain dans les cellules β matures entraînent tous deux une hypervascularisation des îlots s'accompagnant d'une diminution de la masse de cellules β (Brissova et al., 2014; Cai et al., 2012). Ces résultats suggèrent un effet dose dépendant entre VEGF-A et le niveau de vascularisation au stade adulte pour les îlots. Les cellules β garderaient ainsi la compétence pour répondre au signal VEGF-A, ce signal étant alors délétère pour la masse β cellulaire.

Ces études démontrent qu'au stade adulte, la structure de l'endothélium est essentielle à la bonne régulation de la glycémie. De plus, des interactions réciproques persistent entre le système endocrine, émettant VEGF-A et le système vasculaire au stade adulte.

4. Innervation du pancréas adulte et fonction

En plus des cellules gliales qui viennent entourer les îlots (Burriss and Hebrok, 2007), différents types de cellules nerveuses viennent innover le pancréas. Suivant le type de cellules nerveuses et de neurotransmetteur, le système nerveux a un rôle spécifique quant à la stimulation des hormones pancréatiques.

4.1. Le système nerveux sensitif

Le système nerveux sensitif est caractérisé par l'expression du *Calcitonin Gene-Related Polypeptide* (CGRP) et vient innover essentiellement la périphérie des îlots (Ahren, 2000; Burriss and Hebrok, 2007). Peu de choses sont connues quant au rôle de ce système nerveux dans le développement du pancréas et le pancréas adulte. Différentes études de traitements d'îlots ou d'ablation du système nerveux sensitif par l'utilisation de la capsaïcine (drogue qui entraîne une perte des neurones sensitifs) ont permis de démontrer que le système nerveux sensitif inhibe la sécrétion de l'insuline et active la sécrétion du glucagon (Karlsson et al., 1994).

4.2. Le système nerveux autonome

Le système nerveux autonome se compose du système nerveux parasympathique, cholinergique, et du système nerveux sympathique, adrénérgique. Les deux types de neurones qui constituent ces deux systèmes sont connus pour avoir des actions antagonistes sur la sécrétion de l'insuline et du glucagon (tableau 1) et jouer un rôle central dans l'organisation des îlots au cours du développement (cf. paragraphe I.B.6.2).

4.2.1. Le système nerveux parasympathique

Les neurones du système nerveux parasympathique pancréatique émanent des ganglions pancréatiques, qui reçoivent les afférences vagues. Le système nerveux parasympathique apparaît comme stimulateur global de la sécrétion pancréatique hormonale: de l'insuline par une action directe

Tableau 1 : récapitulatif du rôle du système nerveux autonome dans le pancréas adulte et de leurs marqueurs. Le système nerveux parasympathique, dont les marqueurs principaux sont VAcChT et VIP, stimule la sécrétion de l'insuline et du glucagon. Le système nerveux sympathique, dont le marqueur principal est TH, a un rôle inhibiteur de la sécrétion d'insuline. Le rôle des cellules gliales, marquées par S100 β , n'est pas connu. Ins: insuline; Glc: glucagon; VAcChT: Vesicular Acétylcholine Transporter; VIP: Vasoactive Intestinal Peptide; TH: Tyrosine Hydroxylase

Parasympathetic	Sympathetic	Glial cells
Cholinergic	Cholinergic/adrenergic	Schwann cells
↑Ins ↑Glc	↑Glc ↓Ins	
VAcChT + VIP+	TH+	S100 β +

sur les cellules β , du glucagon, mais aussi du polypeptide P et de la somatostatine (Ahren, 2000). Les acteurs de cet effet sont le neurotransmetteur acétylcholine, mais aussi des neuropeptides, tels Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) ou encore Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) (Ahren, 2006). L'effet stimulant du système parasympathique sur la fonction β cellulaire a une importance physiologique lors de la phase céphalique de sécrétion d'insuline pour la préparation de l'ingestion d'aliments ainsi que lors de phase d'hypoglycémie (Ahren, 2000; Ahren, 2006). Au niveau de la masse β cellulaire, il a récemment été démontré que l'ablation de l'innervation parasympathique chez le rat entraîne une diminution significative de la prolifération des cellules β , s'accompagnant d'une augmentation de la prolifération du tissu acinaire, sans affecter les paramètres métaboliques de ces rats (Lausier et al., 2010), démontrant que chez l'animal adulte, le système nerveux parasympathique participe au maintien de l'homéostasie β cellulaire.

4.2.2. Le système nerveux sympathique

Les neurones du système nerveux sympathique pancréatiques sont postganglioniques. Leurs corps cellulaires sont situés dans le ganglion coeliaque ou dans la chaîne sympathique paravertébrale (Glebova and Ginty, 2005) (Fig 6). L'activation sympathique inhibe la sécrétion de l'insuline et active la sécrétion du glucagon (Ahren, 2000). Le neurotransmetteur principalement impliqué dans l'action du système nerveux sympathique est la norépinéphrine. Cependant, comme pour le système nerveux parasympathique, des neuropeptides tels que le **neuropeptide Y** (NPY) et la galanine, sont également présents au niveau axonal terminal de ces nerfs sympathiques pancréatique et libérés en cas de stimulation, activant la sécrétion du glucagon et inhibant celle de l'insuline (Ahren, 2006). La stimulation des nerfs sympathiques active aussi la sécrétion du polypeptide P et inhibe la sécrétion de la somatostatine (Ahren, 2000). L'inhibition sympathique de l'insulino-sécrétion a une importance physiologique, permettant ainsi en cas de stress ou d'exercice physique, une augmentation de la production hépatique de glucose par la glycogénolyse et la néoglucogenèse (Ahren, 2006)

4.3. Système nerveux et régulation de la glycémie

La stimulation parasympathique de l'insulino-sécrétion est déterminante lors de la phase céphalique de sécrétion d'insuline (forte augmentation de la concentration d'insuline circulante apparaissant lors des 10 premières minutes suivant l'ingestion d'aliments). L'injection par intraveineuse de triméthopane, une drogue inhibitrice du système parasympathique, chez des sujets en bonne santé, réduit d'à peu près 75% cet effet stimulant de l'insulino-sécrétion (Ahren and Holst, 2001), démontrant l'implication du système nerveux parasympathique dans la phase céphalique de sécrétion d'insuline chez l'humain. De plus, cette réduction de l'insulino-sécrétion s'accompagne d'une mauvaise diminution du glucose sanguin, démontrant cette fois-ci que cette phase de sécrétion d'insuline céphalique est essentielle à une bonne régulation de la glycémie (Ahren and Holst, 2001).

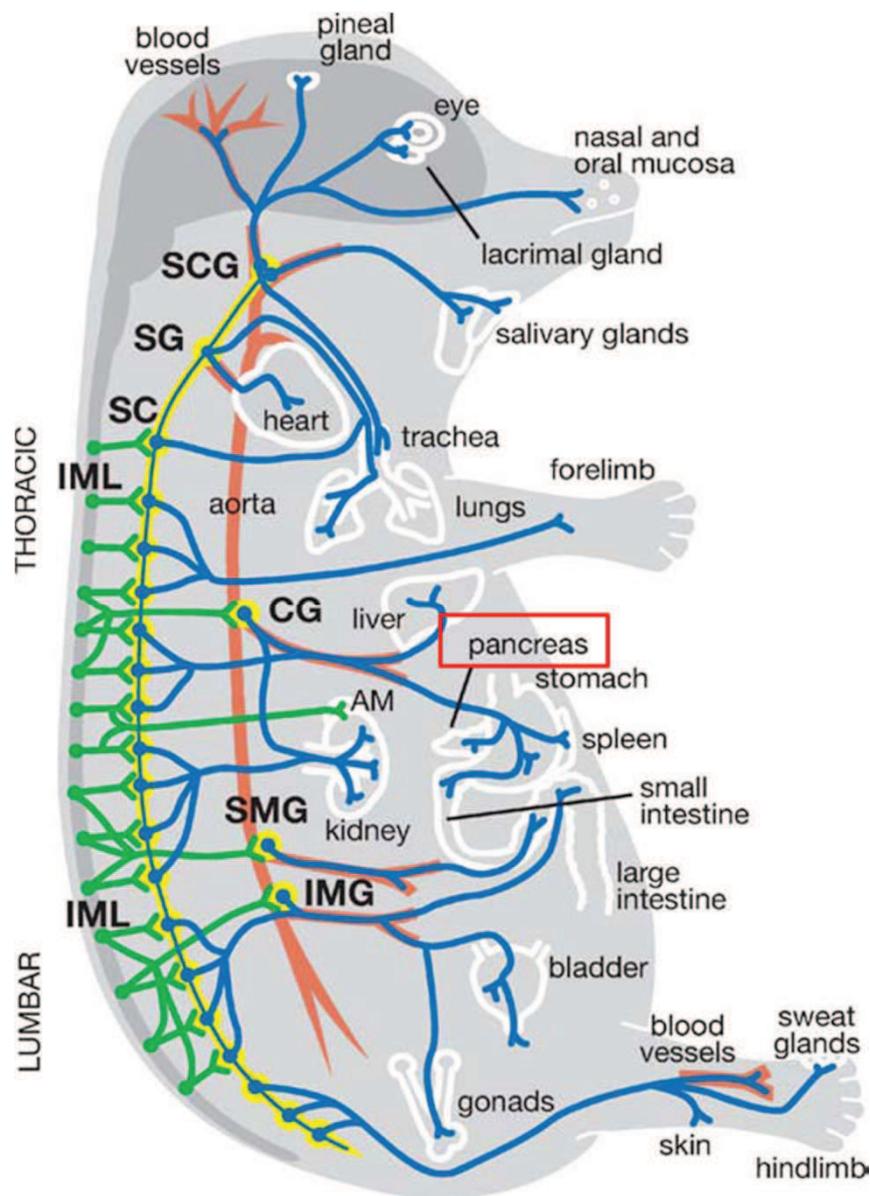


Figure 6 : Schéma représentant l'anatomie de l'innervation sympathique chez la souris. Les neurones sympathiques préganglionnaires sont représentés en vert. Ils réalisent leur connexion synaptique avec les neurones sympathiques postganglionnaires (bleus) au niveau de la chaîne de ganglions sympathiques (jaune). Les neurones postganglionnaires vont ensuite innover les différents organes. AM : adrenal medulla ; CG : ganglion coeliaque ; IMG : ganglion lymphatique inférieur; IML : colonne intermédiolatérale SC : chaîne sympathique SCG : ganglion cervical supérieur ; SG : ganglion stellaire ; SMG : ganglion mésentérique supérieur. D'après Glebova & Ginty, 2005.

En ce qui concerne maintenant le feed back du glucose vers le système nerveux, un modèle récent d'inactivation de Glut2 dans le système nerveux central et périphérique (souris Nestin-Cre ; Glut2^{fl/fl} ou NGN2KO) a permis de démontrer que la sensibilité au glucose du système nerveux participe à l'homéostasie glucidique. En effet, alors que rien n'est observé au niveau du poids, de la masse grasse ou encore de la satiété chez les souris adultes NGN2KO comparé à leurs contrôles sauvages, ces souris deviennent néanmoins progressivement intolérantes au glucose et voient leur masse β cellulaire diminuer. L'activité parasympathique afférente est également réduite chez ces souris (Tarussio et al., 2014). Ce phénotype est accéléré lorsque ces souris NGN2KO sont nourries avec un régime riche en matière grasse. Cette étude est la première à démontrer un lien directe entre la sensibilité neuronale au glucose et l'homéostasie β cellulaire.

L'ensemble de ces données démontrent que le système nerveux, notamment le système nerveux parasympathique, est un acteur essentiel de la régulation de l'homéostasie glucidique.

5. Le diabète

Une déficience de production ou de sécrétion d'insuline, ou encore une insensibilité à cette hormone, entraînant une hyperglycémie, est à l'origine de la principale pathologie liée au pancréas : le diabète. En 2010, 285 millions de personnes ont été diagnostiquées diabétiques et on estime qu'en 2030, 348 millions de personnes seront diabétiques (d'après la Fédération Internationale du Diabète). Cette progression pandémique s'explique pour le diabète de type 2 essentiellement par des facteurs environnementaux tels que la sédentarité et les régimes trop riches en matière grasse et en glucides. A cause du taux de glucose trop élevé dans le sang, cette pathologie présente des complications graves telles que des néphropathies, cécité, neuropathies ou encore des problèmes cardiovasculaires (Pagliuca and Melton, 2013), entraînant aussi des coûts de santé publique élevés.

5.1. Diabète de type 1

5.1.1. Causes

Le diabète de type 1 (T1D) est une maladie complexe résultant de facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux (Fuhlbrigge and Yip, 2014). Au cours de cette maladie, des cellules T du système immunitaire, ayant échappées aux contrôles du thymus, reconnaissent des antigènes des cellules β pancréatiques. Cette interaction conduit à la destruction des cellules, qui sont ensuite phagocytées par les cellules dendritiques et les macrophages (Fuhlbrigge and Yip, 2014). Plusieurs auto-antigènes ont été identifiés : la chaîne B de l'insuline, la glutamic acid decarboxylase, l'islet-specific glucose-6-phosphatase related protein, le facteur de transcription insulinoma-associated protein-2, la chromogranine A ou encore le transporteur zinc-transporter 8 (Fuhlbrigge and Yip, 2014). Chez ces patients, le diabète se déclare tôt, pendant l'enfance, lorsque la perte de la masse de cellules

β correspond à au moins 80% de la masse de cellules β totale (Bouwens et al., 2013). Ce type de diabète représente 5 à 10% des cas de diabètes (Ashcroft and Rorsman, 2012).

5.1.2. Traitements

Chez ces patients, l'apport exogène d'insuline est le principal traitement. Les patients doivent s'injecter quotidiennement de l'insuline, soit par stylo, soit par une pompe. Cependant, ce traitement ne permet pas de remplacer des cellules β fonctionnelles et souvent, la régulation de la glycémie par ce traitement devient insuffisante. Dans ce cas, une greffe de cellules β est envisagée. Lors de cette opération, des cellules β isolées de patients en état de mort cérébrale sont injectées via la veine porte au patient diabétique. Ce traitement est efficace, cependant, il est limité dans le temps et par la disponibilité de pancréas donneurs. Par exemple, pour permettre de réguler la glycémie d'un patient diabétique de type 1 pendant 1 an, 2 millions de cellules β par kg doivent être transplantées, ce qui correspond à 2 voire 3 pancréas donneurs (Bouwens et al., 2013). De plus, l'efficacité des cellules greffées diminue après la première année de greffe. Ainsi, 5 ans après la greffe, seulement 20% des patients insulino-indépendants auront une greffe encore fonctionnelle (Bouwens et al., 2013). Enfin, plusieurs donneurs sont nécessaires car de nombreuses cellules β sont perdues lors de la purification, ainsi que lors de la réaction inflammatoire suivant la greffe (Bouwens et al., 2013).

5.2. Diabète de type 2

5.2.1. Causes

Le diabète de type 2 (T2D) est le diabète le plus fréquent ; il représente 85% des cas de diabète et est généralement associé à l'obésité. L'hyperglycémie constante entraîne une résistance des organes cibles de l'insuline à cette hormone et un épuisement des cellules β à force de sécréter de l'insuline. Ainsi, une perte de 40 à 60% de la masse de cellules β peut être observée (Ashcroft and Rorsman, 2012; Pagliuca and Melton, 2013). Si le mode de vie, la sédentarité et l'obésité sont largement pointés du doigt dans l'expansion de ce type de diabète, l'analyse d'association des génomes à grande échelle (Genome Wide Association Studies) et les études de corrélation ont permis d'identifier une quarantaine de gènes de prédispositions au diabète de type 2 (Ashcroft and Rorsman, 2012; Bonnefond et al., 2010; McCarthy, 2010). Ces analyses ont démontré que ce sont des polymorphismes sur un nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism) de ces gènes qui sont impliqués dans la prédisposition au T2D. Parmi ces gènes, celui présentant la prédisposition la plus importante, avec un impact de prédisposition de 1.7 code pour le facteur de transcription *TCF7L2* (*Transcription Factor 7 Like 2*) (Bonnefond et al., 2010). On retrouve aussi par exemple le gène *FTO* (fat-mass and obesity-related protein), qui prédispose à l'obésité et donc de manière indirecte au T2D, mais aussi des gènes codant pour des facteurs de transcription impliqués dans le développement (*Prox1*), la fonction des cellules β (*Znt8* codant pour un transporteur de Zinc dans les granules de sécrétion de l'insuline ou

encore *KCNQ1* codant pour un canal potassium impliqué dans la sécrétion de l'insuline) ainsi que dans la régulation de la masse des cellules β (gènes du cycle cellulaire) (Ashcroft and Rorsman, 2012; Bonnefond et al., 2010; McCarthy, 2010).

Le T2D comprend aussi le diabète gestationnel, qui selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, est « un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie variable, débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse. » Cette pathologie peut être liée de manière spécifique à la grossesse et s'arrêtera ensuite ou révèle un état diabétique de la mère qui n'avait pas été diagnostiqué auparavant. C'est un marqueur fort de prédisposition au diabète de type 2.

5.2.2. Traitements

Dans le cas du T2D, suivant le patient, il peut y avoir une escalade thérapeutique. Dans un premier temps, un régime adapté et de l'exercice physique, complétés par un traitement médicamenteux comme la metformine, peuvent suffire à réguler la glycémie. La metformine permet de diminuer le taux de glucose sanguin, d'améliorer la sensibilité à l'insuline et limite aussi la prise de nourriture (Pernicova and Korbonits, 2014). Les patients peuvent aussi être traités avec des agents permettant de stimuler la sécrétion de l'insuline. Si ces traitements ne sont pas suffisants, des injections quotidiennes d'insuline sont mises en place.

5.3. Diabètes Monogéniques

Cette classe de diabète comprend des formes relativement rares de diabète et exclusivement d'origine génétique. Une vingtaine de gènes ont été référencés comme étant impliqués dans les diabètes monogéniques (Ashcroft and Rorsman, 2012; Molven and Njolstad, 2011). Dans un cadre non pathologique, les protéines issues de ces gènes sont connues pour être impliquées dans le développement, la différenciation ou encore la physiologie des cellules β (tableau 2).

Les diabètes monogéniques sont divisés en 4 classes, dépendamment du moment où le diabète se déclare et de son origine (Molven and Njolstad, 2011).

5.3.1. Le diabète néonatal

Le **diabète néonatal** (DN) est un diabète insulino-dépendant caractérisé par l'apparition d'un diabète dans les six premiers mois de la vie. Ce diabète peut disparaître, on parle alors de **diabète néonatal transitoire** (DNT), ou devenir **permanent** (DNP). Cependant, même en cas de DNT, le patient peut déclarer un diabète un peu plus tard. Le diabète néonatal touche 1 naissance sur 200 000. Les gènes les plus fréquemment touchés dans le DN sont *abcc8* et *kcnj11*, codant pour les sous-unités du canal potassium ATP-dépendant impliqué dans la sécrétion de l'insuline. Ce diabète est souvent

Tableau 2 : Tableau récapitulatif de gènes identifiés pour être impliqués dans des diabètes monogéniques. DMT : diabète mitochondrial ; MODY : Maturity Onset of the Young ; ND: diabète neonatal; PNDM: diabète neonatal permanent; Synd: diabète syndromique; TNDM: diabète neonatal transitoire. Adapté de Ashcroft & Rorsman, 2012; Molven & Njølstad, 2011.

Gène	Protéine	Fonction cellulaire	Type de diabète	Références
KCNJ11	Kir6.2	Sous unité du canal K_{ATP} impliqué dans la sécrétion de l'insuline	PNDM, TNDM, MODY	Flanagan et al., 2009; Gloyn et al., 2004; Hattersley and Ashcroft, 2005
ABCC8	SUR1	Sous unité du canal K_{ATP} impliqué dans la sécrétion de l'insuline	PNDM, TNDM	Ellard et al., 2007; Hattersley and Ashcroft, 2005
INS	Insuline	Hormone hypoglycémisante	PNDM, MODY10	Støy et al., 2010
GCK	Glucokinase	Enzyme phosphorylant le glucose en glucose-6-phosphate	PNDM, MODY2	Osbak et al., 2009
SLCA2L2	Glut2	Récepteur au glucose	PNDM	Yoo et al., 2002
PDX1	Insulin Promoter Factor 1	Facteur de transcription de type homeodomaine	PNDM, MODY4	Stoffers et al., 1997
GLIS3	GLIS3	Facteur de transcription	Synd	Senée et al., 2006
FOXP3	Forkhead box P3	Facteur de transcription de type winged-hélice	Synd	Bennett et al., 2001
EIF2AK3	Eukaryote translation initiation factor 2 α kinase 3	Enzyme phosphorylant la sous-unité α du facteur de transcription EIF2	Synd	Delépine et al., 2000
PTF1A	Pancreas specific transcription factor 1A	Facteur de transcription de type bHLH	Synd	Sellick et al., 2004
RFX6	Regulatory factor X6	Facteur de transcription de type winged-hélice	Synd	Smith et al., 2010
NGN3	Neurogenin3	Facteur de transcription de type bHLH	ND	Pinney et al. 2011
mutation génétique ou épigénétique du locus 6q24			TNDM	Temple and Shield, 2010
TCF2	Hepatic nuclear factor 1 β	Facteur de transcription de type homeodomaine	TNDM, MODY5	Servitja and Ferrer, 2004
HNF4 α	Hepatic nuclear factor 4 α	Facteur de transcription de type doigt de zinc	MODY1	Servitja and Ferrer, 2004
NEUROD1	Neurogenic differentiation factor D1	Facteur de transcription de type bHLH	MODY6, TNDM	Servitja and Ferrer, 2004
TCF1	Hepatic nuclear factor 1 α	Facteur de transcription de type homeodomaine	MODY3	Servitja and Ferrer, 2004
BLK	B lymphoïde tyrosine kinase	Protéine kinase stimulant la synthèse et la sécrétion de l'insuline	MODY11	Borowiec et al. 2009
CEL	Carboxyl ester lipase	Enzyme lipolytique impliquée dans l'hydrolyse et la l'absorption du cholestérol et des esters	MODY8	Torsvik et al.2010
KLF11	Kruppel-like factor 11	Facteur de transcription de type doigt de zinc	MODY7	Neve et al. 2005
MTTL1,MTTE, MTK		Protéine de transfert des ARNs mitochondriaux	DMT	Maassen et al. 2002
PAX4	Paired box 4	Facteur de transcription de type homeodomaine	MODY9	Hebener et al. 1998
WFS1	Wolframin	Protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique	Synd	Rohavem et al. 2011

associé à un retard de croissance à la naissance, en liaison avec le rôle de facteur de croissance de l'insuline (Ashcroft and Rorsman, 2012; Molven and Njolstad, 2011).

5.3.2. Les MODYs

La classe des **Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY)** décrit un groupe de patients déclarant un diabète avant 40 ans et présentant un contexte familial : 3 membres d'une même famille atteints sur 2 générations, mais sans présenter d'auto-antigènes ou d'obésité. Il existe différentes classes de MODY, suivant le gène touché. Parmi les gènes les plus fréquemment répertoriés dans le cas de MODY, on retrouve le gène codant pour la glucokinase (*gck*) ou encore celui codant pour le facteur de transcription *hnf4 α* (Ashcroft and Rorsman, 2012; Molven and Njolstad, 2011).

5.3.3. Les diabètes syndromiques

Les diabètes syndromiques sont définis comme des diabètes monogéniques qui font partie de pathologies systémiques, se traduisant par d'autres aspects cliniques. Par exemple, des mutations dans le gène codant pour le facteur de transcription *Rfx6* vont présenter un syndrome de Mitchell-Riley, avec un diabète néonatal, une atrésie de l'intestin, une hypoplasie de la rate et du pancréas ainsi que des diarrhées (Molven and Njolstad, 2011; Smith et al., 2010).

5.3.4. Les diabètes mitochondriaux

Les diabètes mitochondriaux concernent des diabètes causés par des mutations au niveau de gènes mitochondriaux. Ces mutations entraînent une dysfonction des mitochondries, impliquées dans le métabolisme du glucose. Ce type de diabète est caractérisé par une transmission exclusivement maternelle, l'ADN mitochondrial étant entièrement transmis par la mère (Molven and Njolstad, 2011).

5.3.5. Traitements

Les traitements des diabètes monogéniques sont souvent les même que pour les T1D, c'est-à-dire des injections d'insuline. Cependant, un diagnostic précis des diabètes monogéniques est nécessaire pour une bonne prise en charge du diabète. En effet, dépendamment de l'origine du diabète, les traitements peuvent varier : dans certains cas, comme pour le T2D, un régime adapté, de l'exercice physique et un traitement médicamenteux peuvent suffire, tandis que pour d'autres types de diabètes monogéniques, un apport en insuline est nécessaire (Molven and Njolstad, 2011).

6. Axes de recherche visant à générer de nouvelles cellules β fonctionnelles

En raison des limites des traitements évoqués précédemment, différents axes de recherche visent à générer des cellules β fonctionnelles. 3 grands axes se distinguent : la réplication des cellules β , la

différenciation de cellules souches embryonnaires (ESC) ou à pluripotence induite (hiPSC) et enfin la reprogrammation d'autres types cellulaires (transdifférenciation cellulaire) (Fig 7).

6.1. Réplication des cellules β existantes

Le premier axe de recherche visant à générer de nouvelles cellules β fonctionnelles consiste *in fine* à stimuler la prolifération des cellules β résiduelles. Ces recherches ont conduit à l'identification de molécules capables de stimuler l'augmentation de la masse de cellules β . Par exemple, l'administration d'exendin-4, un agoniste du récepteur au glucagon-like peptide (Glp1r), à des souris diabétiques ou ayant subi une pancréatectomie partielle, augmente leur masse β cellulaire, augmente l'expression insulaire de Pdx1, la sécrétion d'insuline et réduit le niveau d'hyperglycémie (Stoffers et al., 2000; Xu et al., 1999). Récemment, en utilisant les souris LIRKO, qui sont des souris dont le récepteur à l'insuline a été inactivé au niveau des hépatocytes (Okada et al., 2007), des auteurs ont pu observer que la perte de la sensibilité hépatique à l'insuline entraînait une réplication des cellules β sans affecter les autres types cellulaires (El Ouaamari et al., 2013; Okada et al., 2007). En plus d'identifier de nouvelles molécules pouvant aboutir à de nouvelles thérapies, ces exemples démontrent aussi que la communication entre les différents acteurs de la régulation de la glycémie (pancréas, foie, système entéro-endocrine) est essentielle pour la régulation de la glycémie.

6.2. Différenciation de cellules souches ou à pluripotence induite

Grâce à l'identification d'une part des cellules souches pluripotentes humaines (hESC), se caractérisant par leur capacité à générer des tissus provenant des trois feuilletts embryonnaires (Thomson et al., 1998) et d'autre part, des cellules à pluripotence induites humaines (hiPSC) (Takahashi et al., 2007), les stratégies visant à générer de nouvelles cellules sécrétrices d'insuline ont connu un nouvel essor. Ainsi, en élaborant un protocole récapitulant *in vitro* en 5 grandes étapes le développement des cellules endocrines, des cellules ESC ont pu être différenciées en cellules sécrétrice d'insuline (D'Amour et al., 2006). Cependant, ces cellules ne sont pas tout à fait fonctionnelles. Ce n'est qu'après l'implantation de ces cellules au stade progéniteurs endocrines chez des souris rendues diabétiques par un traitement à la streptozotocine, que ces cellules sont devenues totalement fonctionnelles (Kroon et al., 2008), suggérant que des facteurs intervenant *in vivo* encore non identifiés sont essentiels pour permettre une maturation de ces cellules *in vitro* (Fig 8). La principale limite jusqu'à présent, de ces cellules sécrétrices d'insuline générées *in vitro* reste l'absence de réponse correcte aux variations de glucose et la non expression de marqueurs de maturité fonctionnelle (Pagliuca and Melton, 2013; Xie et al., 2013).

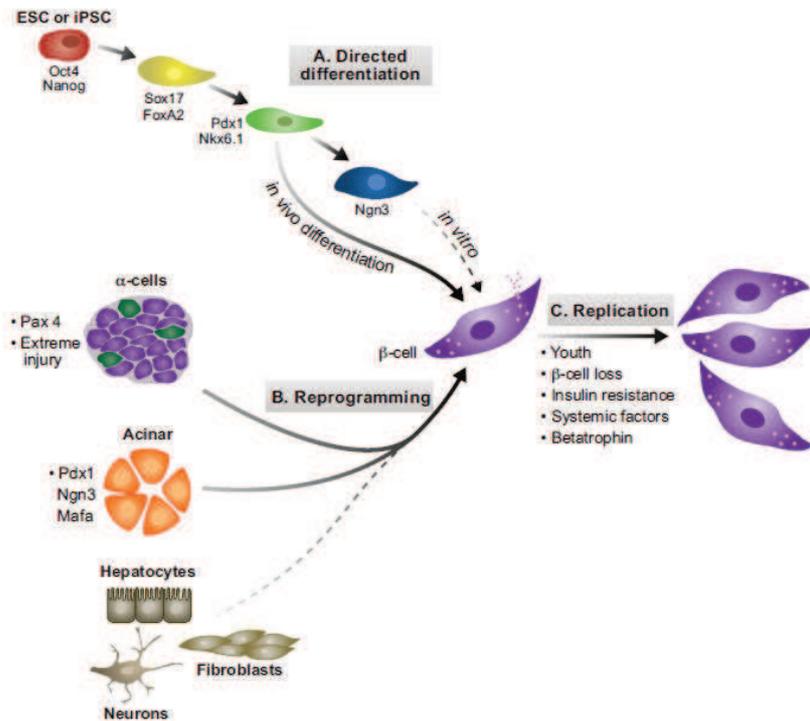


Figure 7 : Schéma résumant les différentes stratégies pour générer de nouvelles cellules sécrétrices d'insuline. La première stratégie (A) consiste à différencier des cellules souches (ESC) ou à pluripotence induite (iPSC) en cellules β , en utilisant des facteurs de croissance et en induisant l'expression de facteurs de transcription. Afin de générer des cellules β fonctionnelles, ces cellules pluripotentes doivent passer par une étape de transplantation chez la souris. La seconde stratégie (B) vise la reprogrammation de cellules différenciées en cellules β . Des cellules β ont pu être générées à partir de cellules α et acinaires, mais pas encore à partir de cellules non pancréatiques. La troisième stratégie (C) consiste à induire la prolifération des cellules β existantes. D'après Pagliuca & Melton, 2013.

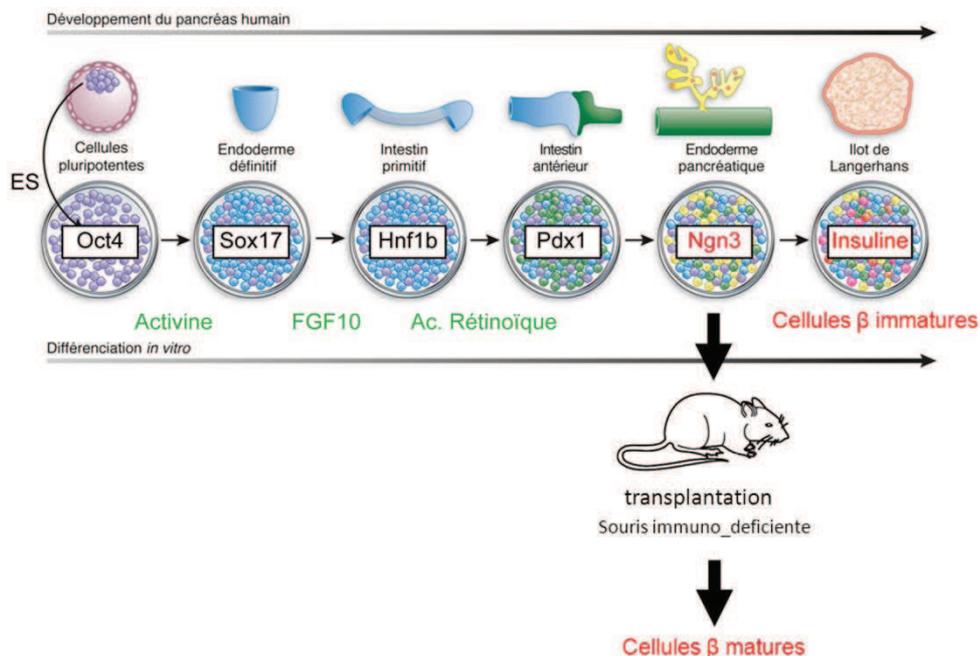


Figure 8: Génération de cellules β *in vitro*. Les grandes étapes du développement du pancréas à partir de cellules souches pluripotentes ont pu être récapitulées *in vitro*, générant des cellules β immatures. C'est en implantant ces cellules au stade correspondant aux progéniteurs endocrines chez des souris immunodéficientes que des cellules β matures ont pu être générées. D'après Madsen and Serup, 2006, D'amour et al., 2006 et Kroon et al., 2008.

6.3. Transdifférenciation cellulaire

Le dernier axe consiste à reprogrammer d'autres types cellulaires en cellules β fonctionnelles. Des études ont réussi, en infectant le tissu exocrine avec un cocktail d'adénovirus codant pour *Pdx1*, *Ngn3* et *Mafa* à reprogrammer ces cellules en cellules similaires aux cellules β (Zhou et al., 2008). Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont observé que l'infection des cellules exocrines par un ou deux de ces adénovirus reprogrammait ces cellules en cellules α ou encore δ (Li et al., 2014), ce qui nous indique que même à l'état adulte, une plasticité subsiste, du moins au niveau du tissu acinaire. Enfin, d'autres études ont réussi à reprogrammer des cellules intestinales en cellules sécrétrices d'insuline, notamment grâce à la délétion du gène codant pour le facteur de transcription Foxo1 (Talchai et al., 2012). La délétion de Foxo1 dans les cellules Ngn3^+ génère l'augmentation de l'expression de *Ngn3* et l'apparition, au niveau de l'intestin, de cellules insuline⁺ ainsi que de quelques cellules glucagon⁺. Ces cellules entéroendocrines insuline⁺ expriment certains marqueurs de cellules β et sont sensibles au glucose de manière dose dépendante (Talchai et al., 2012).

Les études *in vivo* présentées jusqu'à présent concernaient la reprogrammation de cellules non-insuline⁺ en cellules β fonctionnelles par des modifications génétiques (infection via des adénovirus, délétion). Grâce à l'injection, via une pompe, d'un cocktail d'Epithelial Growth Factor (EGF) et de Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), des auteurs ont ainsi pu observer que leur système stimulait *in vivo* la conversion de cellules acinaires matures en cellules β fonctionnelles (Baeyens et al., 2014).

Ces exemples démontrent qu'une plasticité cellulaire subsiste au sein du pancréas adulte, qui, en cas de stress ou de modulation génique ou pharmacologique, peut permettre la formation de nouvelles cellules sécrétrices d'insuline.

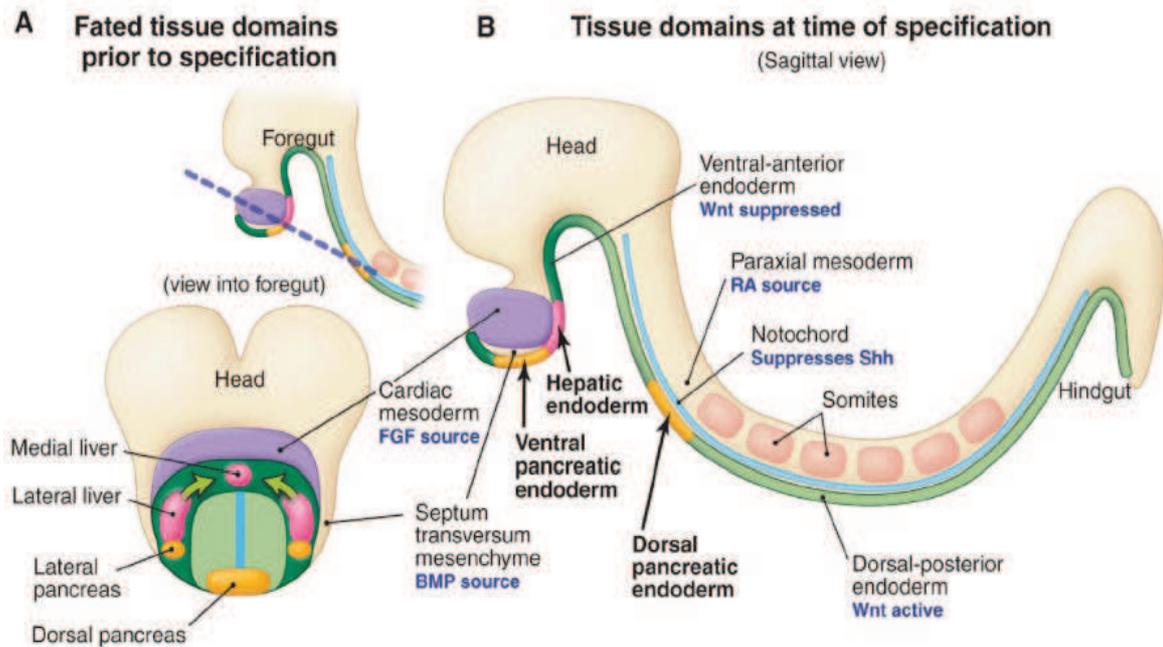


Figure 9 : Schéma récapitulatif des signaux et domaines cellulaires permettant la spécification du foie et du pancréas. (A) Vue à E8.25 des domaines présomptifs du foie et du pancréas. Les flèches vertes indiquent le sens de migration des progéniteurs latéraux vers la zone médio-ventrale. La ligne pointillée bleue indique le plan de coupe. (B) Vue sagittale d'un embryon de souris quelques heures après le stade A représentant les nouvelles positions de l'endoderme hépatique et des bourgeons pancréatiques ainsi que les signaux impliqués dans leur spécification et leur source. D'après Zaret & Grompe, 2008

B. Développement du pancréas

1. Spécification de l'endoderme et du pancréas

Les premiers signes du développement du pancréas sont visibles à partir du stade embryonnaire (E) 8.5 par l'apparition de deux bourgeons (un ventral et un dorsal) dans la région antérieure de l'endoderme. Le développement du pancréas se déroule en trois phases, dites « transitions ». La première transition s'étend du stade E8.5 à E12.5. Au cours de cette période, les deux bourgeons pancréatiques apparaissent, d'abord le ventral (vers E8.5) puis le dorsal (vers E8.75). Les premières cellules glucagon⁺ sont visibles dès le stade E9.5. Le développement du pancréas puis la différenciation des cellules pancréatiques (endocrines, acinaires et canalaire) sont finement régulés par différentes voies de signalisation (Fig 9) ainsi que par l'activation/répression d'une cascade de facteurs de transcription (Fig 10).

1.1. Régulation transcriptionnelle de la différenciation des progéniteurs pancréatiques multipotents (MPC)

1.1.1. Spécification de l'endoderme

Le pancréas se développe à partir de l'endoderme dont la spécification requière les facteurs de transcription Sox17 et FoxA2.

L'expression de Sox17 (Sex-determining region Y-box (Sry-box) containing gene 17) se retrouve dans l'endoderme dès le stade gastrula et les embryons dont l'expression de Sox17 a été abolie présentent une absence de développement de l'endoderme (Kanai-Azuma et al., 2002).

FoxA2 (Forkhead A2, aussi appelé Hnf3β) est aussi exprimé par l'endoderme définitif, ainsi que par la notochorde. La perte de fonction de ce facteur de transcription entraîne la perte de la notochorde ainsi que des dérivés endodermiques (Ang and Rossant, 1994; Weinstein et al., 1994). Ainsi, avant la spécification du pancréas, ces deux facteurs de transcription apparaissent comme essentiels à la détermination de l'endoderme.

1.1.2. Spécification du pancréas

La spécification du pancréas et la différenciation des progéniteurs pancréatiques multipotents (MPC) requièrent de nombreux facteurs de transcription, tels que Pdx1, Ptf1a, Sox9, HB9, Gata4, Gata6, hnf6.

La détermination des MPC fait intervenir deux facteurs de transcription principaux: Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1) et Ptf1a (Pancreas specific transcription factor 1a). Ces deux facteurs de transcription sont exprimés par l'épithélium pancréatique dès E8.0. Pdx1 est aussi exprimé par le canal biliaire, l'estomac, les glandes de Brunner et l'épithélium duodéal (Jorgensen et al.,

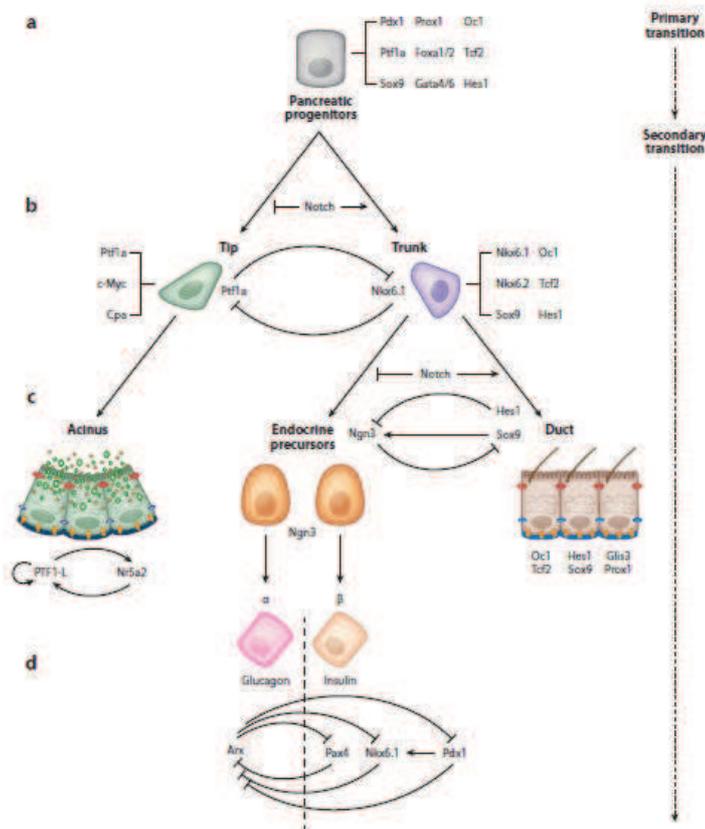


Figure 10: Principaux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules pancréatiques. (A) Lors de la première transition, les facteurs de transcription Pdx1, Ptf1a, Sox9, Prox1, Foxa1 et 2, Gata4 et 6, Oc1, Td2 et Hes1 permettent de définir l'endoderme pancréatique ainsi que les progéniteurs multipotents pancréatiques à l'origine des différents types cellulaires pancréatiques. (B) Au cours de la seconde transition, les progéniteurs pancréatiques adoptent soit un caractère « Tip » regroupant les progéniteurs acinaires, soit un caractère « Trunk », regroupant les progéniteurs canaux et endocrines. Chaque type est caractérisé par l'expression de facteurs de transcription bien spécifiques : Ptf1a, Cpa et c-myc pour les « Tips », Sox9 ; Nkx6.1 ; Nkx6.2 ; Oc1 ; Tcf2 ; Hes1 pour les « Trunks ». (C) Les progéniteurs « Tips » se différencient en cellules acinaires, tandis que les progéniteurs « Trunks » s'engagent vers une destinée endocrine ou canalaire. Le choix est influencé par la voie de signalisation Notch, qui inhibe le programme endocrine, favorisant la destinée canalaire. (D) Ngn3 est le facteur déterminant pour la spécification des progéniteurs unipotents endocrines, à l'origine des cellules endocrines pancréatiques. La différenciation des cellules insuline et glucagon est régulée par des interactions inhibitrices entre le facteur de transcription Arx, activateur du programme α et Pax4, Nkx6.1 et Pdx1, activateurs du programme β . D'après Shih et al. 2013.

2007) (Fig 11). Au niveau pancréatique, l'expression de *Pdx1* diminue, au cours de l'organogenèse, dans les cellules acinaires tandis que les cellules β ainsi qu'une sous population de cellules δ et PP maintiennent un niveau d'expression élevé de *Pdx1* (Guz et al., 1995). *Pdx1* est un facteur clé pour la formation du pancréas : les souris perte de fonction pour *Pdx1* meurent quelques jours après la naissance et présentent une agénésie du pancréas (Jonsson et al., 1995; Offield et al., 1996). L'étude plus précise de ces mutants a pourtant révélé que des rudiments de bourgeons pancréatiques étaient bien présents, ceux-ci contenant quelques cellules à insuline et glucagon, indiquant que *Pdx1* n'est pas nécessaire à l'initiation des bourgeons pancréatiques, mais à leur croissance. Des expériences de lignage via l'utilisation de souris transgéniques rapportrices ont permis de démontrer que les cellules *Pdx1*⁺ sont des progéniteurs multipotents (MPC) à l'origine des différents types cellulaires pancréatiques : les cellules acinaires, canalaire et endocrines (Gu et al., 2002).

Ptfla est un facteur de transcription de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix), faisant partie du complexe hétéroooligomérique PTF1, composé des sous unités *Ptfla* associé à un bHLH de classe A ainsi que de RBPJL (Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin κ J region- Like). L'expression de *Ptfla* se retrouve aussi au niveau de l'épithélium pancréatique, mais devient restreinte au cours de l'organogenèse aux cellules acinaires (Krapp et al., 1998). Des expériences de lignage ont permis de démontrer que *Ptfla* est aussi exprimé par les MPC, à l'origine des cellules endocrines, acinaires et canalaire (Kawaguchi et al., 2002), puis devient essentiel à l'activation du programme acinaire (Rose et al., 2001). Les souris mutantes pour *Ptfla* présentent aussi une agénésie du pancréas (Krapp et al., 1998), démontrant que ce facteur de transcription est nécessaire à la prolifération et la différenciation de l'épithélium pancréatique. Cependant, cette agénésie est partielle, puisqu'un rudiment du pancréas dorsal est présent chez ces souris (Burlison et al., 2008), indiquant que ce facteur de transcription est nécessaire à la prolifération et la différenciation de l'épithélium pancréatique.

Certains facteurs de transcription ont été identifiés comme agissant en amont de *Pdx1* et régulant son expression. Ainsi, le facteur de transcription *hnf6*, dont l'expression précède celle de *Pdx1*, a été identifié comme un régulateur de l'expression de *Pdx1* en se fixant à des séquences régulatrices de *Pdx1* et en activant sa transcription (Jacquemin et al., 2003). *Hnf6* apparait comme essentiel au développement du pancréas puisque la perte de fonction d'*hnf6* chez la souris entraîne une hypoplasie du pancréas avec diminution du nombre de cellules endocrines (Jacquemin et al., 2000; Jacquemin et al., 2003).

Les facteurs de transcription de type doigt de zinc de la famille des Gata, *Gata4* et *Gata6* ont aussi été identifiés comme se liant à des séquences régulatrices de *Pdx1*. Plus particulièrement, au niveau de ses régions conservées (sites G1 et G2 de l'aire III). Leur fixation est nécessaire à l'activation du promoteur de *Pdx1* (Carrasco et al., 2012).

L'expression du facteur de transcription *Sox9*, est détectée dès E9.0 dans les MPC *Pdx1*⁺ (Seymour et al., 2007), pour ensuite se retrouver, au cours du développement, aux cellules canalaire (Furuyama et al., 2011) Différentes expériences de lignages utilisant des souris transgéniques BAC

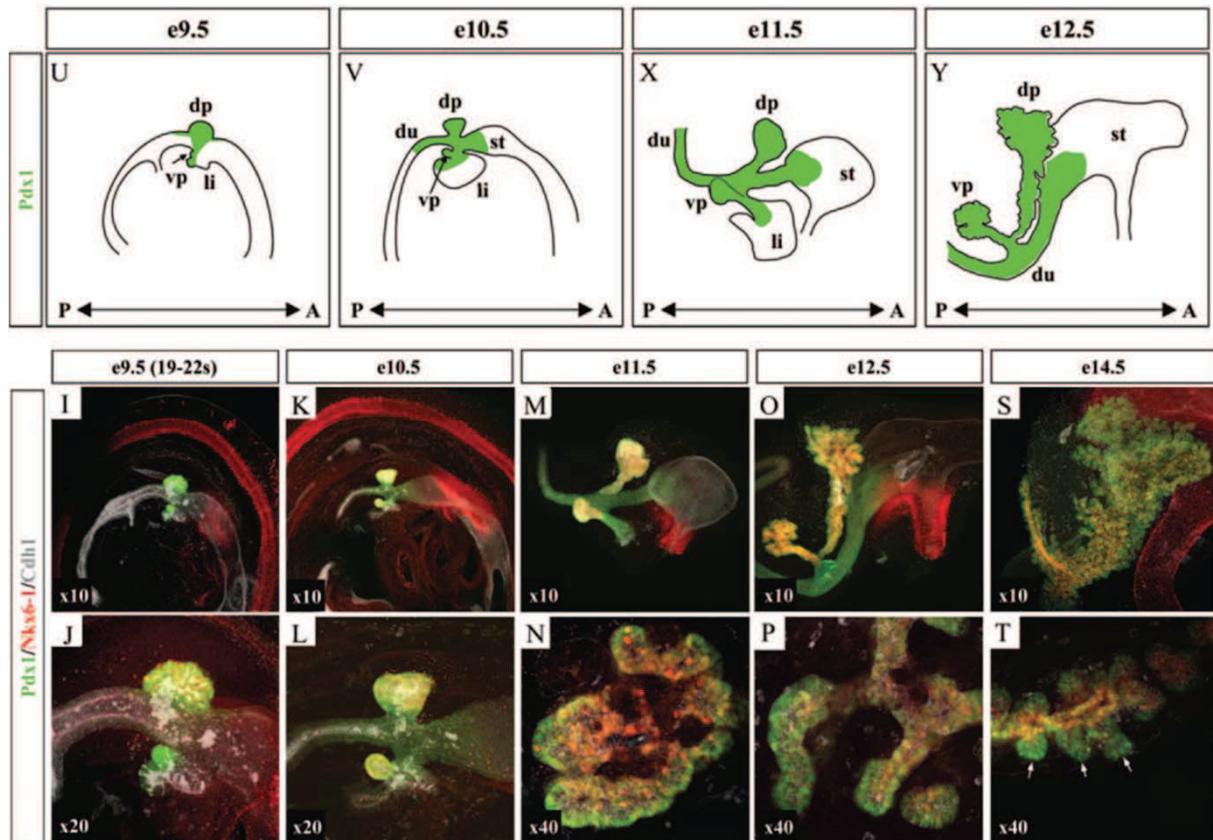


Figure 11 : Expression du facteur de transcription Pdx1 au cours du développement du pancréas. Schéma (panneau du haut) et immunofluorescence (panneau du bas) récapitulant l'expression du facteur de transcription Pdx1 au cours du développement. Pdx1 est visible dans les bourgeons pancréatiques (jaune sur le panneau du bas) dès E9.5 et persiste dans l'épithélium pancréatique au cours du développement embryonnaire. Pdx1 est aussi exprimé au niveau de l'estomac et du duodenum (vert). D'après Jørgensen et al. 2007.

Sox9-Cre^{ER} (Kopp et al., 2011), des souris possédant l'insertion Sox9-IRES- Cre^{ER} (Furuyama et al., 2011) ou encore des souris transgéniques Sox9-eYFP (Seymour et al., 2008) ont permis de démontrer que les cellules Sox9⁺ définissent aussi progéniteurs multipotents à l'origine des différents types cellulaires pancréatiques.

Enfin, le facteur de transcription de type homeobox Mnx1 (**M**otor **N**euron and pancreas homeobox protein, aussi appelé HB9 ou Hlxb9), dont l'expression est observée dès E9.0 à la fois dans le bourgeon pancréatique ventral et dorsal, a été identifié comme essentiel au développement du bourgeon dorsal (Harrison et al., 1999; Li et al., 1999). En effet, les souris perte de fonction pour ce facteur de transcription présentent une agénésie du bourgeon dorsal, sans affecter la formation du bourgeon ventral. Cependant, les îlots de ce bourgeon apparaissent plus petits, avec moins de cellules β et une organisation altérée (Harrison et al., 1999; Li et al., 1999).

1.2. Signaux impliqués dans la spécification du pancréas

Dès 1962, Golosow et al. démontraient, grâce à des expériences de cultures d'explants pancréatiques avec et sans mésenchyme, que le développement du pancréas est soumis à des interactions endoderme-mésenchyme, via des molécules sécrétées par ce dernier (Golosow and Grobstein, 1962). Outre le mésenchyme, différentes structures ont été identifiées comme étant des acteurs essentiels au développement du pancréas. Ainsi, des expériences de délétion de la notochorde chez l'embryon de poulet ont permis d'identifier cette structure comme essentielle à l'induction de l'expression des facteurs de transcription nécessaires au développement du pancréas (*Pdx1*, *Pax6* ainsi que le *glucagon* et l'*insuline* par exemple) (Kim et al., 1997). De manière surprenante, les auteurs ont observé que l'effet de la délétion de la notochorde était spécifique au bourgeon pancréatique dorsal, sans affecter le bourgeon ventral, suggérant que d'autres structures ou mécanismes de régulation sont impliqués dans le développement du bourgeon ventral (Kim et al., 1997). En isolant des portions d'endoderme ventral, Deutsh et al. (2001) ont pu démontrer que des signaux provenant du mésoderme cardiaque inhibaient l'expression de gènes pancréatiques (*Pdx1*, *Ngn3*). C'est donc leur absence ou inhibition qui est à l'origine du bourgeon pancréatique ventral (Deutsch et al., 2001). Plus précisément, les auteurs ont pu définir que le pancréas, comme le foie, se développe à partir de progéniteurs endodermiques bipotents, dont la destinée va être définie par les signaux émis par le mésoderme cardiaque. C'est ainsi que plusieurs voies de signalisation ont pu être identifiées comme nécessaires au développement du pancréas. On retrouve ainsi la voie du **F**ibroblast **G**rowth **F**actor (FGF), de l'**A**cide **R**étinoïque (AR), la voie **W**int (Wnt), la voie du **T**ransforming **G**rowth **F**actor β (TGF β) ou encore les ligands de la voie **H**edgehog (Hhg).

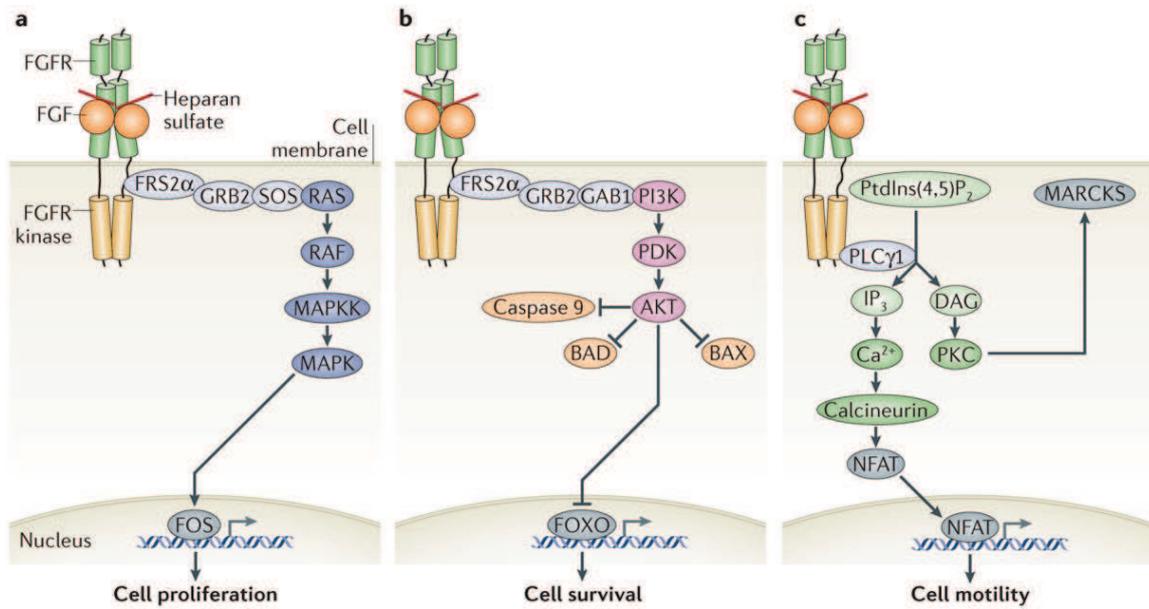
1.2.1. FGF10, Wnt et la détermination de l'endoderme pancréatique

Deux voies de signalisation ont été identifiées dans la détermination de l'endoderme pancréatique : FGF10 et Wnt.

La voie de signalisation du FGF regroupe chez la souris une vingtaine de ligands solubles venant se fixer, de manière spécifique à un récepteur (Fgfr) de type tyrosine kinase. Quatre Fgfrs ont été identifiés chez les mammifères, Fgfr1-4. Chaque récepteur possède différentes isoformes, chacune possédant une affinité particulière pour un des Fgf. L'activation de cette voie de signalisation se fait par la fixation d'un ligand FGF sous forme homodimère avec son récepteur, homodimérisé lui aussi. Cette interaction conduit à un changement de conformation permettant la phosphorylation des résidus tyrosines intracellulaires qui activent différentes voies de signalisation intracellulaires telles que la voie de la Protéine kinase C, Ras/ERK ou encore Akt (Fig 12).

Au cours du développement du pancréas, Fgf10 est exprimé de manière transitoire (E9.5 à E12.5) par le mésenchyme au contact des bourgeons pancréatiques (Bhushan et al., 2001). Les embryons perte de fonction pour ce ligand (Fgf10^{-/-}) présentent, malgré l'initiation des bourgeons pancréatiques, une hypoplasie du pancréas (à E17.5) et une absence de tissu endocrine. Ce phénotype est lié à l'absence de maintien et de prolifération des progéniteurs pancréatiques Pdx1⁺ dès les premiers stades du développement du pancréas (Bhushan et al., 2001), démontrant ainsi que FGF10 n'est pas nécessaire à l'induction du programme pancréatique mais à sa prolifération. Le récepteur principal de Fgf10 est Fgfr2b. Des délétions conditionnelles de Sox9 dans l'épithélium pancréatique (Sox9^{ff}; Pdx1-Cre et Sox9^{ff}; Ptf1a-Cre) ont permis de mettre en lumière une boucle de régulation entre Sox9-Fgfr2b et Fgf10 (Seymour et al.). Ainsi, Fgf10 sécrété par le mésenchyme viendrait interagir avec son récepteur épithélial, Fgfr2b. Cette interaction permettrait d'activer l'expression du facteur de transcription Sox9, qui à son tour, activerait l'expression de *Fgfr2b*. Cette boucle de régulation permettrait de maintenir l'identité des progéniteurs pancréatiques et de participer à la régulation de la prolifération de ces cellules (Fig 13).

La voie canonique de Wnt influe sur la stabilité de la protéine intracellulaire β caténine. Cette protéine, constituante des jonctions adhérentes et participant ainsi à l'adhésion intercellulaire, peut aussi se retrouver sous forme cytosolique. Sans activation de la voie Wnt canonique, la β caténine cytosolique est instable : phosphorylée au niveau de son site Nterminal par un complexe protéique comprenant Apc, l'axine et la serine/thréonine kinase Gsk3 β , elle est ensuite dégradée par le protéasome. L'activation du récepteur Frz (Frizzled) et de son co récepteur LRP (LDL-Related Protein) par la fixation de son ligand Wnt va empêcher la phosphorylation de la β caténine qui va alors s'accumuler dans le cytoplasme et pouvoir entrer dans le noyau afin de réguler, en tant que facteur de transcription, l'expression de ses gènes cibles (Fig 14). Au cours du développement du pancréas, les membres de la voie Wnt sont exprimés par l'endoderme antérieur. Pour permettre le développement



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 12 : La voie de signalisation du FGF. Les ligands FGF viennent se fixer sur leur récepteur FGFR. Cette interaction entraîne un changement de conformation permettant l'activation des cascades d'interacteurs intracellulaires responsables de la transduction du signal, conduisant soit à la prolifération des cellules, à leur maintien ou à leur mobilité. D'après Goetz and Mohammadi, 2013.

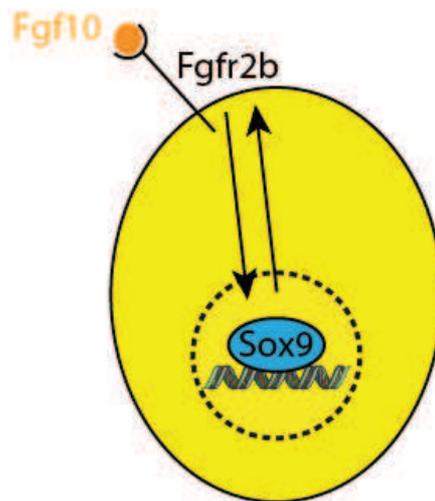


Figure 13: L'activation de la voie du Fgf par Fgf10 active une boucle d'auto-régulation entre Fgfr2b et Sox9. Source : la molécule d'ADN vient de Medical Art

du pancréas (et du foie), la voie Wnt doit être réprimée (McLin et al., 2007) afin de permettre l'initiation du développement du pancréas (Fig 9).

Ces études ont permis de mettre en évidence le rôle de la voie FGF10 ainsi que de la voie Wnt dans la détermination de l'endoderme pancréatique. Comme précisé précédemment, les expériences de recombinaison d'explants ont permis de démontrer que la formation du bourgeon dorsal est régulée par des mécanismes différents que celle du bourgeon ventral (Deutsch et al., 2001; Kim et al., 1997), suggérant l'intervention de signaux différents pour la spécification et la prolifération de ces deux bourgeons pancréatiques.

1.2.2. Signaux impliqués dans la formation du bourgeon ventral

Au niveau du bourgeon pancréatique ventral, le mésoderme cardiaque ainsi que le mésenchyme du septum transversum ont pu être identifiés comme des sources de FGF et de BMP respectivement.

Par des expériences d'isolation d'endoderme ventral et de recombinaison avec le mésoderme cardiaque, FGF1, 2, 8 et 8b émis par le mésoderme cardiaque, ont été identifiés comme nécessaires à l'expression de gènes de la morphogénèse hépatique (Deutsch et al., 2001; Jung et al., 1999), démontrant que c'est l'absence de FGF au niveau du bourgeon pancréatique ventral qui permet l'expression de gènes pancréatiques. Le programme pancréatique est le programme « par défaut » des progéniteurs bipotents endodermiques (Fig 9).

Les BMP (**B**one **M**orphogenetic **P**rotein) font partie de la famille du TGF β . En plus des BMP, cette famille comprend les ligands TGF β ainsi que les ligands de la famille de l'Activin (Fig 15). Les ligands de la famille du TGF β exercent leur effet soit de manière autocrine, soit de manière paracrine, en se fixant sur leurs récepteurs (type I et II, nommés T β RI et T β RII). La fixation du ligand entraîne la transphosphorylation et l'activation de T β RI par T β RII, point de départ de la transduction du signal du TGF- β , avec le recrutement et la phosphorylation (entraînant l'action) des protéines régulés par ces récepteurs, les Smads (R-Smads), qui vont former un complexe hétérotrimérique avec Smad4. Ce complexe va alors se déplacer vers le noyau afin de réguler l'expression de ses gènes cibles. R-Smad1/5/8 transmettent le signal provenant des BMP, tandis que R-Smad2 et 3 sont en charge de celui des TGF β et de l'Activin. Smad6 et 7 sont des inhibiteurs de la signalisation du TGF β , quel que soit le type de ligand, en inhibant la phosphorylation des R-Smads. Différents membres de la famille du TGF β sont exprimés dans le pancréas en développement, dans l'épithélium pancréatique, le mésenchyme, ainsi que les cellules endocrines et acinaires : TGF β 1, 2 et 3, Activin β b, BMP4, 5 et 7 ainsi que les différents récepteurs, T β RI et T β RII (Crisera et al., 1999; Dichmann et al., 2003).

En utilisant la souris rapportrice Bmp4^{LacZ}, Rossi et al. (2009) ont pu observer que ce ligand est exprimé au niveau du mésenchyme du septum transversum. Grâce à l'utilisation de la lignée de souris Bmp4^{+/-} ainsi que des systèmes de cultures d'endoderme ventral, les auteurs ont démontré que Bmp4

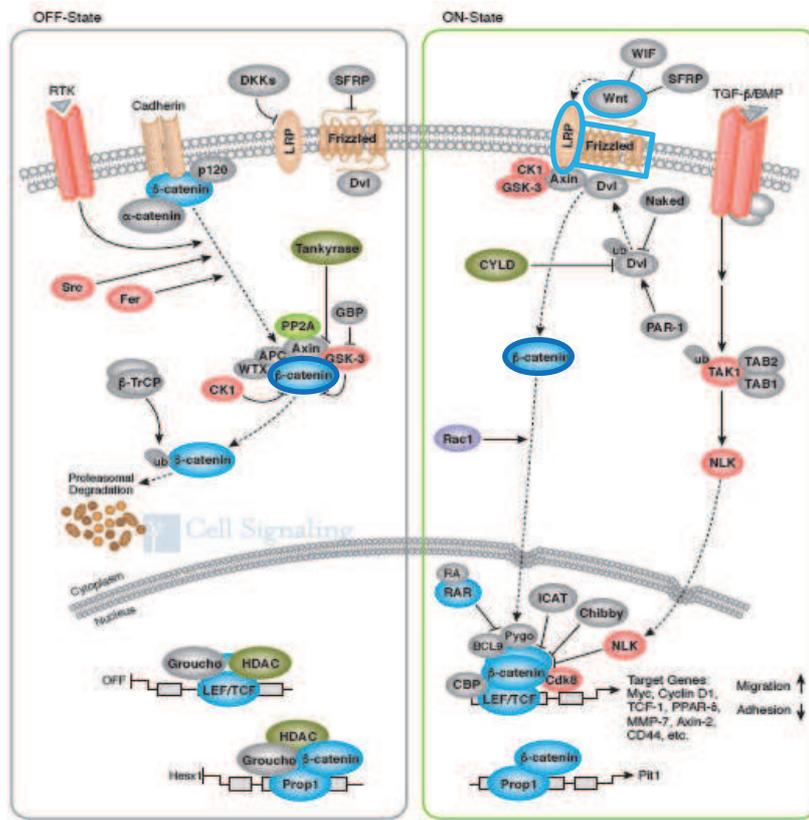


Figure 14: la voie Wnt. L'interaction du ligand Wnt avec son récepteur Frizzled et son co-récepteur LRP entraîne l'inhibition du complexe responsable de la dégradation de la β-caténine, permettant à cette dernière d'entrer dans le noyau pour y accomplir son rôle d'activateur de la transcription de ses gènes cibles. Source : Cell Signaling.

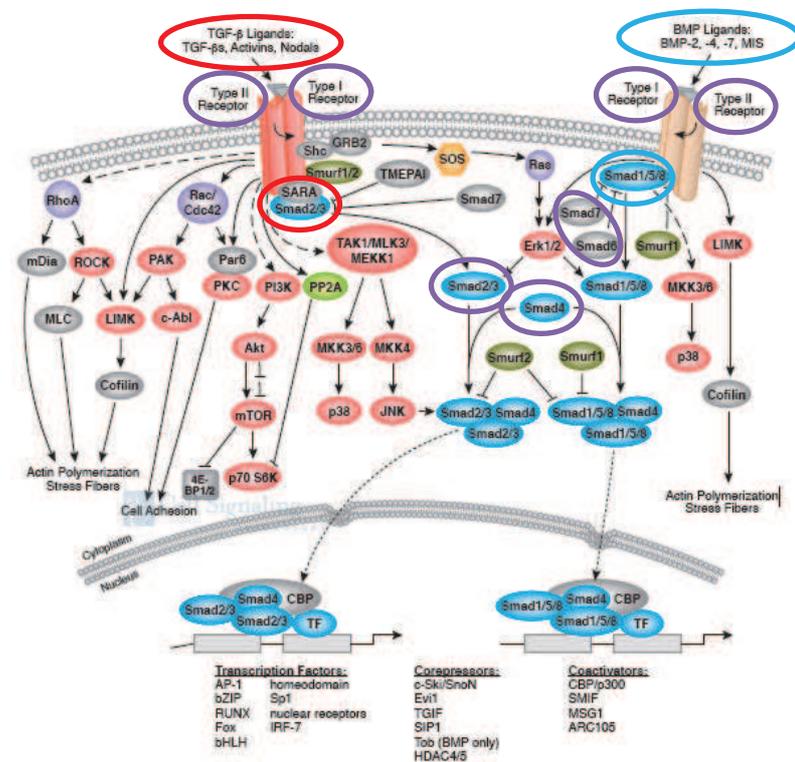


Figure 15: la voie du TGF-β. Les ligands TGF-β, Activins ou BMPs viennent se fixer sur leurs récepteurs entraînant l'activation des effecteurs intracellulaires : Smad2/3 pour les TGF-β et Activins (spécifiés en rouge), Smad1/5/8 pour les BMPs (spécifiés en bleu). Certaines Smads sont communes à tous les ligands (spécifiés en violet) : Smad4 et les inhibitrices, Smad6/7. Source : Cell signaling .

était nécessaire (avec FGF émis par le mésoderme cardiaque ; Jung et al 1999) à l'induction de gènes hépatiques (*Albumin*) et à la morphogenèse du foie. Ils ont, de plus, constaté que l'expression de *Pdx1* était activée lorsque des explants endodermiques ventraux étaient cultivés avec un inhibiteur de BMP (noggin) (Rossi et al., 2009), démontrant ainsi, qu'au niveau du bourgeon ventral, c'est l'absence de BMP et de FGF qui va permettre l'expression des gènes du développement pancréatique et définir l'expansion de l'épithélium pancréatique.

1.2.3. Signaux impliqués dans la formation du bourgeon dorsal

Le développement du bourgeon pancréatique dorsal fait intervenir le mésoderme paraxial, source d'Acide Rétinoïque (AR), la notochorde, source d'Activin et de FGF2 et l'endoderme, source de Shh (Sonic Hedgehog).

L'AR est le dérivé actif de la vitamine A ou rétinol, le principal rétinoïde circulant chez les mammifères (Rhinn and Dolle, 2012). Le rétinol n'est pas synthétisé par l'organisme, il est donc apporté par la nourriture. Une fois absorbé par la cellule, le rétinol est oxydé en rétinaldéhyde par une alcool déshydrogénase (ADH) ou rétinol déshydrogénase (RDH). La dernière étape de synthèse de l'AR est l'oxydation de la rétinaldéhyde en AR par l'une des trois rétinaldéhyde deshydrogénases (RALDH1/2/3, aussi appelées ALDH1A1/2/3). Une fois synthétisé, l'AR peut être sécrété ou entrer directement dans le noyau de la cellule dans laquelle il a été synthétisé. Une fois dans le noyau, l'AR peut alors se lier à des dimères de récepteurs à l'AR (nommé RAR) et aux rétinoïdes X (nommé RXR). Sa fixation sur ses récepteurs nucléaires va entraîner, par une modification de la conformation et des interactions entre protéines, le recrutement du complexe de transcription permettant l'expression des gènes cibles (Fig 16).

Chez la souris, l'expression au niveau du mésenchyme pancréatique de *Raldh2* et *RARs* a été observée dès E11.5 (Tulachan et al., 2003). *Raldh2* est la principale enzyme de maturation de l'AR exprimée au niveau du mésenchyme dorsal pancréatique (Martin et al., 2005). Des souris *Raldh2*^{-/-} présentent une agénésie du bourgeon pancréatique dorsal et aucune expression du facteur de transcription *Pdx1*, démontrant ainsi que l'AR est essentiel à la formation du bourgeon dorsal pancréatique (Martin et al., 2005; Molotkov et al., 2005)..

Shh est l'un des trois ligands composant la famille des **Hedgehog** (Hhg), avec **Indian Hedgehog** (Ihh) et **Desert Hedgehog** (Dhh). Ces trois ligands se lient avec une affinité similaire à leur récepteur, Patched 1 ou 2 (Ptc1/2). Sans activation de la voie Hhg par la fixation du ligand sur son récepteur, Ptc inhibe l'activité de la protéine Smoothened (Smo), une protéine G transmembranaire couplées aux récepteurs. La fixation d'un Hhg sur Ptc lève l'inhibition de Smo, permettant l'activation de la voie Hhg aboutissant à la translocation dans le noyau du facteur de transcription Gli (dont trois

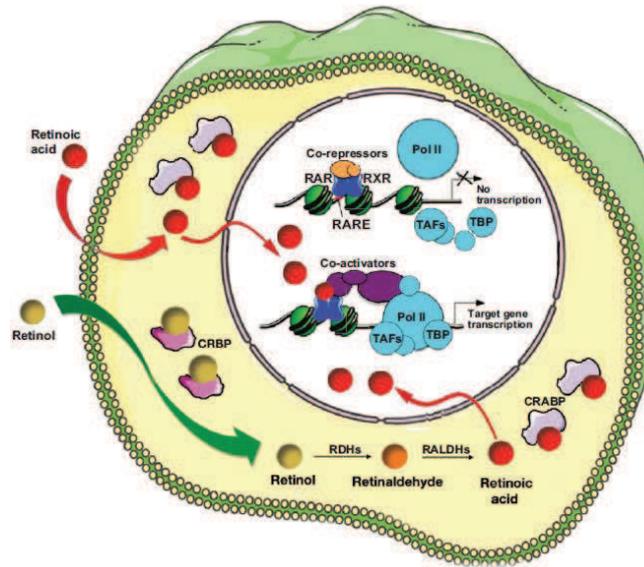


Figure 16: Schéma de la voie de l'Acide Rétinoïque. L'Acide Rétinoïque déjà synthétisé ou provenant du métabolisme du rétinoïde entre dans le noyau afin de se fixer à ses récepteurs nucléaires et activer la transcription de ses gènes cibles. D'après Rhinn and Dolle, 2012.

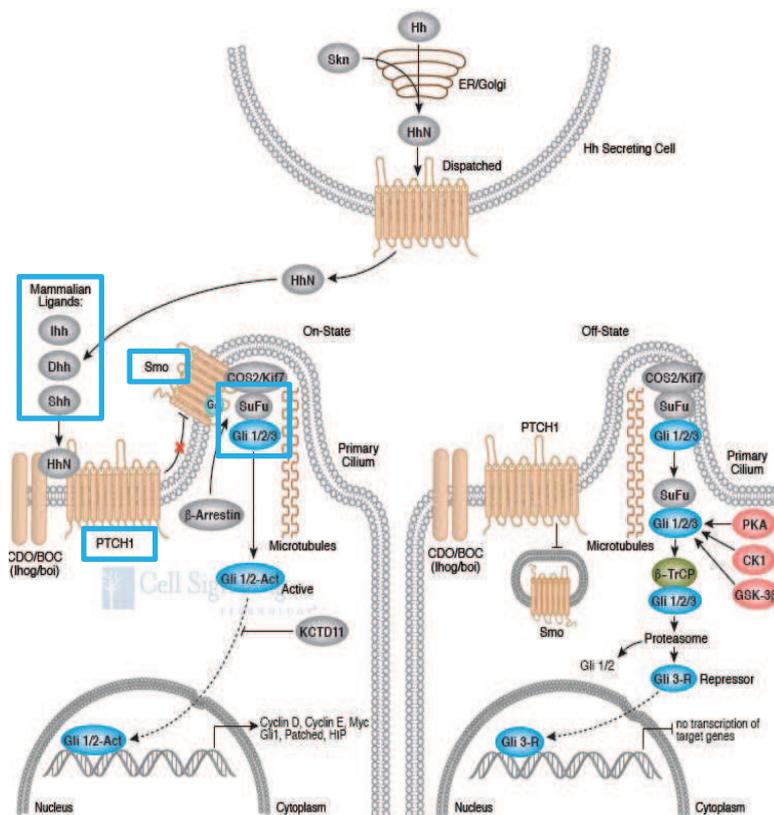


Figure 17: schéma de la voie de signalisation Hh. Les ligands Ihh, Shh ou DhH viennent se fixer sur leur récepteur Ptch1, levant ainsi l'inhibition de Smo, permettant la libération du facteur de transcription Gli. D'après Cell Signaling.

formes ont été répertoriées chez les mammifères) qui va alors pouvoir entrer dans le noyau pour réguler l'expression de ses gènes cibles (Fig 17).

Au cours du développement, *Shh*, *Ihh* et *Dhh* sont exprimés dans l'ensemble de l'endoderme digestif, sauf au niveau de l'endoderme à l'origine des bourgeons pancréatiques, indiquant qu'aux stades précoces du développement du pancréas, l'absence de la voie de signalisation Hhg est nécessaire au développement du pancréas (Apelqvist et al., 1997; Hebrok et al., 1998; Hebrok et al., 2000). Cependant, à E13.5, l'épithélium pancréatique exprime plusieurs composants de cette voie de signalisation, tels que *Shh*, *Ihh* ou encore *Ptc1*, indiquant une réactivation de cette voie de signalisation. Au stade adulte, l'expression de différents membres de la voie Hhg a été observée au niveau des îlots et des cellules canalaire, suggérant un rôle dans la fonction et/ou le maintien des cellules endocrines (Apelqvist et al., 1997; Hebrok et al., 1998; Hebrok et al., 2000).

Une expansion de l'expression de *Shh* ainsi qu'une absence de l'expression de *Pdx1* a été observée en absence de notochorde chez l'embryon de poulet (Hebrok et al., 1998), démontrant que l'inhibition de l'expression de *Shh* par la notochorde est essentielle pour permettre le développement du pancréas. Cette même étude a permis d'identifier *Fgf2* ainsi que l'activin- β b, ligand de la famille du TGF β , comme deux signaux émis par la notochorde inhibant *Shh*. La surexpression de *Shh*, par l'élaboration d'une souris transgénique *Px1-Shh*, entraîne une désorganisation complète du tractus digestif avec une conversion du mésoderme pancréatique en mésenchyme intestinal, plus particulièrement, en cellules musculaires intestinales (Apelqvist et al., 1997). De plus, l'expression ectopique de *Shh* ou *Ihh* sous l'induction du promoteur de *Pax4* (souris *Pax4-Hhg*) entraîne une altération de la morphologie du pancréas, une diminution de la taille du pancréas avec une réduction significative du nombre de cellules acinaires et endocrines, mais une augmentation du mésenchyme (démontrant ainsi que les deux compartiments sont sensibles aux ligands Hhgs) (Kawahira et al., 2005). La voie de signalisation des Hhg apparaît donc comme inhibitrice du développement du pancréas.

Les souris mutantes pour *Shh* (*Shh*^{-/-}), ou *Shh*^{-/-}; *Ihh*^{+/-} sont plus petites que leur contrôle mais possèdent un pancréas de taille similaire aux souris sauvages, indiquant que cette voie de signalisation n'est pas nécessaire au développement et à la différenciation des cellules pancréatiques. Cependant, certaines de ces souris mutantes (42%) présentent une extension annulaire du pancréas ventral (Hebrok et al., 2000), une pathologie également décrite chez l'humain (Hill, 1993), suggérant que la perte de fonction de la voie Hhg pourrait être associée à cette pathologie. Comme souligné dans la review (Lau et al., 2006), ces mutants étant des mutants totaux, il ne peut pas être exclu que cette pathologie soit la conséquence d'un effet non pancréatique de la voie Hhg, telle que la rotation du tractus par exemple. Ces deux études démontrent l'importance de la régulation de la voie de signalisation Hhg afin de permettre une délimitation correcte du territoire pancréatique. Il est à noter que *Shh* est inhibé dans les deux bourgeons pancréatiques. Cependant, *Fgf2* et Activin- β b émis par la notochorde n'atteignent que

le bourgeon dorsal, suggérant un mode de régulation similaire, mais avec d'autres structures et/ou voies de signalisation pour le bourgeon ventral.

2. Différenciation des progéniteurs endocrines

2.1. Spécification des progéniteurs endocrines par Ngn3

La seconde transition, qui s'étend de E13.5 à E16.5, est caractérisée par une vague de prolifération et de différenciation cellulaire. Durant cette période, l'épithélium pancréatique va croître et former une structure branchée avec une organisation bien particulière : les « tips » et « trunks » (Zhou et al., 2007). Ces deux termes désignent des régions bien définies de l'épithélium pancréatique, avec pour chaque branche, le tronc ou « trunk » regroupant les progéniteurs endocrines et canaux et les extrémités ou « tips » regroupant les progéniteurs exocrines (Zhou et al., 2007) (Fig 18).

A nouveau, l'activation, comme la répression, de nombreux facteurs de transcription sont impliquées lors de cette période, toujours dans le but de déterminer la destinée de chaque cellule (endocrine, acinaire ou canalaire). Le facteur clé pour la détermination de la destinée endocrine est le facteur de transcription de type bHLH Neurogenin3 (Ngn3) (Ravassard et al., 1997; Sommer et al., 1996). L'expression de *Ngn3* est détectée dans le pancréas à partir de E9.5, réalise un pic d'expression à E15.5 puis diminue, pour devenir nulle au stade prénatal et adulte. Son expression est détectée dans l'épithélium pancréatique, dans des cellules regroupées sous forme de clusters proches des cellules canaux. Ni les cellules exocrines, ni les cellules endocrines différenciées glucagon⁺ et insuline⁺ ne l'expriment. Cependant, *Ngn3* est coexprimé avec des gènes impliqués dans la différenciation des cellules endocrines, tels que *Nkx6.1* ou *Nkx2.2* (Gradwohl et al., 2000; Schwitzgebel et al., 2000), suggérant que *Ngn3* est exprimé dans des progéniteurs endocrines en différenciation et les cellules endocrines.

La fonction de Ngn3 a pu être révélée par la perte de fonction de ce facteur de transcription, ainsi que par des expériences de lignage. Les souris *Ngn3*^{-/-} présentent un diabète post-natal et léthal. L'analyse histologique de leur pancréas a révélé une absence complète de cellules endocrine. De plus, des expériences de lignage ont révélé que les cellules *Ngn3*⁺ sont des progéniteurs unipotents, à l'origine des différents types cellulaires endocrines (Desgraz and Herrera, 2009; Gradwohl et al., 2000; Gu et al., 2002). Ces lignages ont aussi permis de constater que, contrairement aux MPC *Pdx1*⁺ qui prolifèrent de manière très active au cours du développement du pancréas (Bonal et al., 2009), les progéniteurs *Ngn3*⁺ prolifèrent peu (Desgraz and Herrera, 2009; Gu et al., 2002). L'un des mécanismes de régulation de la prolifération des progéniteurs *Ngn3*⁺ est la fixation de Ngn3 sur les séquences régulatrices de *Cdkn1a* (Miyatsuka et al., 2011), codant pour l'inhibiteur de cycline-dépendante kinase p21/CIP. Ainsi, Ngn3 induit lui-même la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs

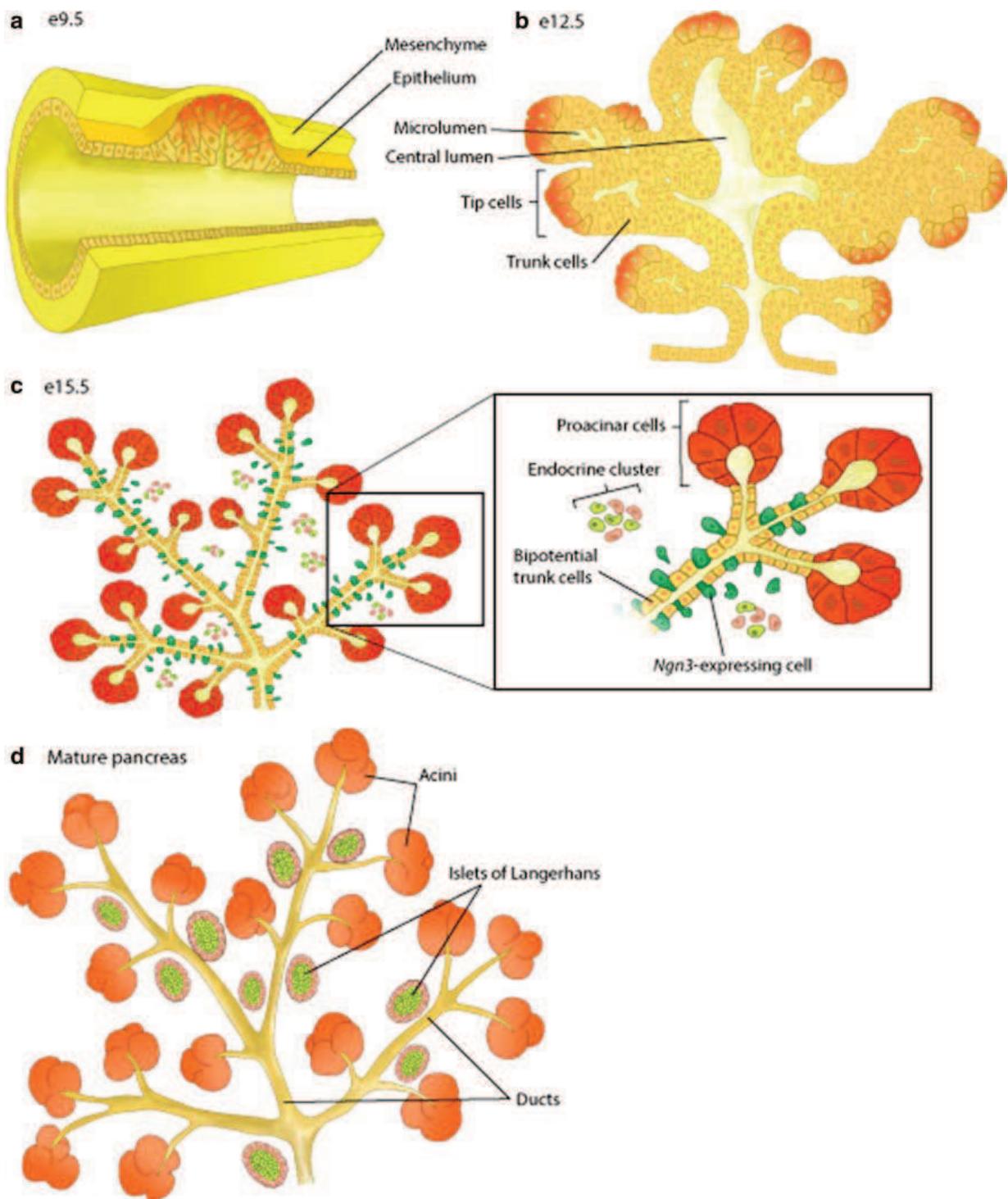


Figure 18: Le développement du pancréas. (A) La formation des bourgeons pancréatiques est visible vers E9.5. (B) A E12.5, l'épithélium pancréatique subit une vague de prolifération et de ramification, au cours de laquelle la ségrégation des progéniteurs acinaires (tip cells), endocrines et canaux (trunk cells) commencent. (C) A E14.5, les cellules situées aux extrémités se différencient en cellules acinaires, tandis que les progéniteurs endocrines $Ngn3^+$ en différenciation délaminent et migrent de l'épithélium pancréatique pour former des amas de cellules endocrines. (D) Trois types cellulaires pancréatiques sont formés dans le pancréas adulte: les cellules acinaires, canaux et endocrines. Les cellules endocrines sont regroupées dans des structures formant les îlots de Langerhans. D'après Cano et al., 2013.

endocrines. De plus, au sein de notre laboratoire, la comparaison du profil transcriptomique de cellules eYFP⁺ provenant de pancréas Ngn3^{eYFP/+} (Soyer et al., 2010), a permis d'identifier un enrichissement de l'expression de la kinase Pak3 au sein des cellules Ngn3⁺/eYFP⁺. L'analyse de la fonction de Pak3 a révélé qu'au cours du développement embryonnaire, Pak3 permet la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs Ngn3⁺ (Piccand et al., 2013).

La modulation de l'expression de *Ngn3* dans l'épithélium pancréatique a révélé qu'il existe une fenêtre de compétence de l'épithélium pancréatique qui régit la différenciation des progéniteurs Ngn3⁺ (Johansson et al., 2007). Ainsi, dès E8.5, les progéniteurs endocrines Ngn3⁺ se différencient en cellules à glucagon. À partir d'E12.5, la compétence des progéniteurs Ngn3⁺ se modifie et ces progéniteurs vont plutôt se différencier en cellules à insuline et à somatostatine. Récemment, deux études ont permis de préciser cette notion de compétence des progéniteurs Ngn3⁺. Ainsi, la modulation de l'expression de *Ngn3* a permis de démontrer qu'il existe un seuil nécessaire d'expression de *Ngn3* afin que les cellules Ngn3⁺ s'engage vers une destinée endocrine (Wang et al., 2010). Si ce seuil n'est pas atteint, les progéniteurs Ngn3⁺ s'engagent vers une destinée exocrine ou canalaire (Fig 19). De plus, la modulation au cours du développement embryonnaire de la délétion de *Ngn3* et le suivi des cellules délétées de *Ngn3* ont permis de découvrir qu'au cours du développement, la capacité de différenciation des progéniteurs Ngn3⁺ évoluent (Beucher et al., 2011). Ainsi, les cellules délétées de *Ngn3* avant E12.5 vont s'engager vers une destinée acinaire ou canalaire, tandis qu'après E12.5, ces cellules s'engagent vers une destinée canalaire (Fig 19), démontrant ainsi que la potentialité des progéniteurs Ngn3⁺ est modulée au cours du développement du pancréas.

L'ensemble de ces travaux a permis de démontrer que les cellules Ngn3⁺ déterminent une population de progéniteurs endocrines quiescents à l'origine des différents types cellulaires endocrines pancréatiques, dont la compétence et la potentialité sont modulées dans le temps.

2.2. Implication de la voie Notch dans la différenciation endocrine

L'expression de *Ngn3* est à son tour très finement régulée, afin d'éviter une expansion trop importante des progéniteurs endocrines, ou au contraire, une population de progéniteurs insuffisante, ce qui n'engendrerait pas suffisamment de cellules endocrines pour permettre une régulation adéquat de la glycémie. Différents acteurs sont connus pour réguler l'expression ou la stabilité de la protéine *Ngn3* : *Ngn3*, en synergie avec *Foxa2* (Ejarque et al., 2013), *Sox9*, qui régule de manière positive *Ngn3* et tout un réseau de facteurs de transcription impliqués dans la promotion du lignage endocrine (Lynn et al., 2007) et la voie Notch, qui possède un rôle inhibiteur de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs endocrines.

La voie de signalisation Notch est une voie de signalisation de type juxtacrine, qui implique l'interaction entre un ligand membranaire Delta (*Dll*) ou Serrate (*Ser*), avec un récepteur membranaire de la famille Notch d'une cellule adjacente (Fig 20). Cette interaction permet le clivage de la partie

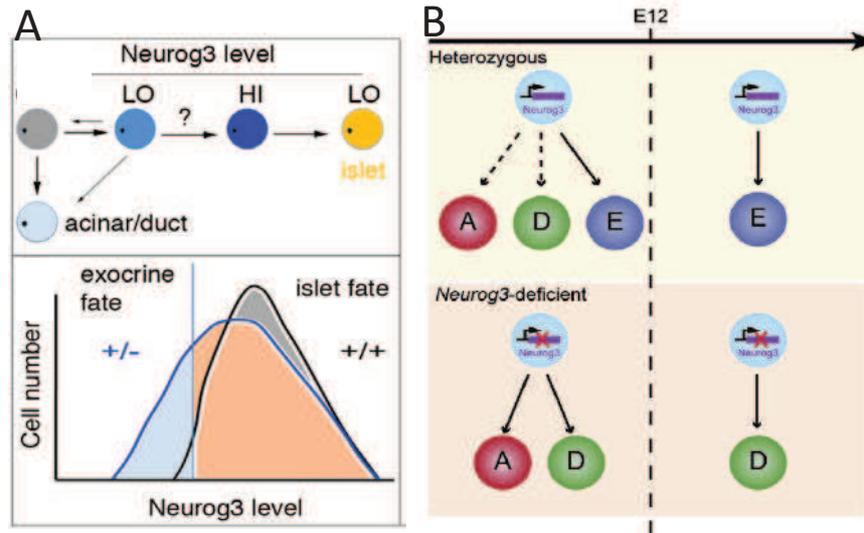


Figure 19: la potentialité des progéniteurs $Ngn3^+$ est dépendante du taux d'expression de $Ngn3$ ainsi que du stade embryonnaire. A : schéma récapitulatif présentant les données de Wang et al., 2010 démontrant que pour se différencier en cellules endocrines, un certain taux d'expression de $Ngn3$ doit être atteint. Si ce seuil n'est pas atteint, ces progéniteurs se différencient en cellules canalaire ou acinaires. D'après Wang et al., 2010. B : schéma récapitulatif présentant les données de Beucher et al., 2011, démontrant que la différenciation des progéniteurs $Ngn3^+$ est aussi régulée dans le temps. Jusqu'au stade E12.5, ces progéniteurs sont capables de se différencier en cellules acinaire, canalaire ou endocrine. Passé ce stade, ces progéniteurs ne peuvent se différencier qu'en cellules endocrines. D'après Beucher et al., 2011.

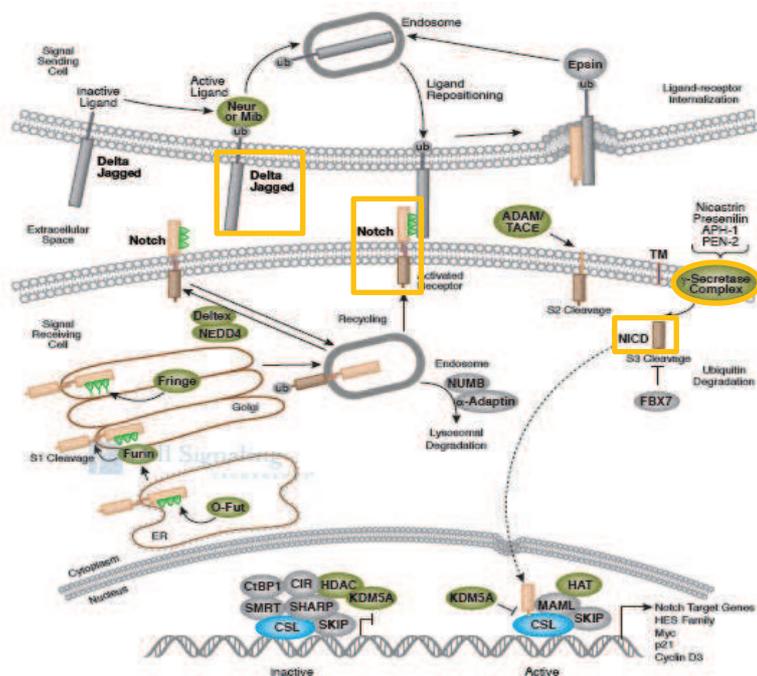


Figure 20: La voie de signalisation Notch. L'interaction du récepteur Notch avec un de ses ligands membranaires Delta ou Jagged d'une cellule adjacente entraîne le clivage du domaine intracellulaire de Notch (NICD) par l'enzyme γ -secretase. Le NICD ainsi libéré peut alors entrer dans le noyau pour activer, via son interaction avec le complexe RBPJ κ , l'expression de ses gènes cibles. Source : Cell Signaling.

intracellulaire du récepteur Notch (NICD) par la γ -secretase et sa translocation jusqu'au noyau. Le peptide nucléaire NICD peut alors interagir avec le complexe de facteurs de transcription *Recombining binding protein suppressor of hairless* (RBPJ κ) pour activer l'expression de gènes cibles de la famille des *hairy enhancers of split* (Hes). Ces facteurs de transcription sont essentiellement connus pour être des répresseurs de transcription.

Chaque composant de cette famille présente un patron d'expression bien spécifique. Ainsi, sur les quatre récepteurs Notch connus chez les mammifères, *Notch1*, ainsi que *Notch2* sont exprimés par l'épithélium pancréatique. Au cours du développement du pancréas, *Notch2* devient spécifique des cellules canalaire. *Notch3* et *Notch4* sont exprimés par le mésenchyme et les cellules endothéliales. Le ligand *Dll-1* est exprimé par des cellules canalaire, tandis que les ligands *Ser1* et *Ser2* sont aussi exprimés par les cellules endothéliales (Lammert et al., 2000).

L'étude du rôle dans le développement du pancréas de cette voie de signalisation a permis de découvrir que Notch intervient à différentes étapes, essentiellement lors de la seconde transition, afin de permettre le développement correct du pancréas et la prolifération ou différenciation des différents progéniteurs. Ainsi, la perte de fonction de Notch, entraîne, au stade embryonnaire, une hypoplasie du pancréas, lié à une augmentation du nombre de progéniteurs Ngn3⁺ et de leur différenciation en cellules endocrines. Ce phénotype s'accompagne d'une large diminution des cellules exocrines (Apelqvist et al., 1999), démontrant l'effet inhibiteur de la voie Notch sur la prolifération et la différenciation endocrine des progéniteurs Ngn3⁺ et ceci, par un mécanisme d'inhibition latérale (Fig 21). Plus récemment, Hes1 a été caractérisé non seulement pour réprimer l'expression de Ngn3, mais aussi pour agir directement sur la stabilité de la protéine Ngn3 (Ahnfelt-Ronne et al., 2007; Qu et al., 2013). Des expériences de gain de fonction, par électroporation du NICD chez le poulet, l'élaboration de souris transgéniques Pdx1-Cre ; Rosa^{Notch/+} ou encore de souris transgéniques pPdx1-Notch^{ICD}, ont permis de confirmer que Notch inhibe la différenciation endocrine (Ahnfelt-Ronne et al., 2007; Hald et al., 2003; Murtaugh et al., 2003).

Murtaugh et al. (2003) ainsi que Hald et al. (2003) soulignaient déjà que la surexpression de Notch dans l'épithélium pancréatique inhibait aussi la formation du tissu acinaire, en plus des cellules endocrines (Hald et al., 2003; Murtaugh et al., 2003), démontrant que l'action de la voie Notch n'est pas restreinte à la différenciation du lignage endocrine. Plusieurs études ont permis de démontrer que le rôle de Notch dans le développement du pancréas est complexe. Grâce à des souris transgéniques permettant l'excision de RBPJ κ dans le pancréas (souris Pdx1-Cre ; RBPJ κ ^{f/f}), le rôle de Notch dans la détermination de la destinée endocrine ou canalaire a pu être révélé. Les auteurs ont pu constater qu'à E11.5, les embryons présentaient une accélération de la différenciation des cellules α et PP, mais pas des cellules β , δ ni ϵ , mais aussi, à E15.5, une augmentation des structures tubulaires, indiquant que Notch serait aussi impliqué dans le « choix » des progéniteurs Pdx1⁺ vers la destinée canalaire. Ces mêmes auteurs ont aussi pu démontrer que la perte de RBPJ κ dans les îlots adultes n'engendrait pas de

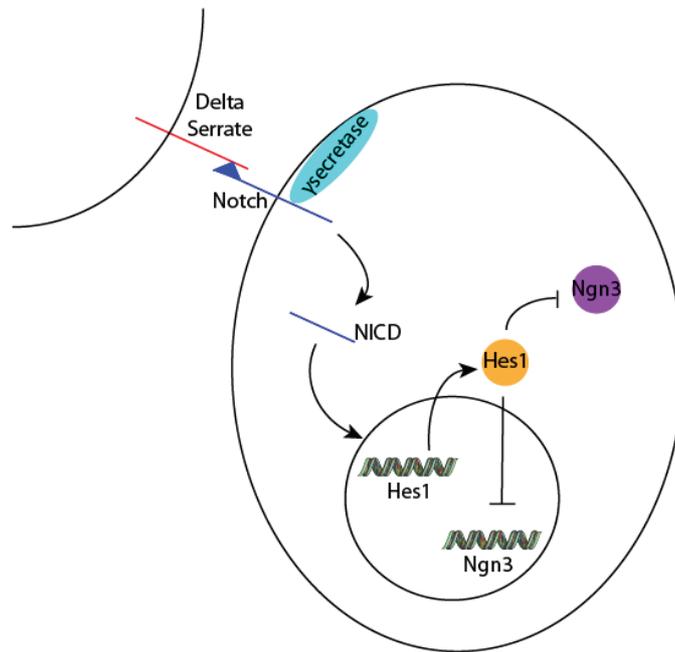


Figure 21: Le mécanisme d'inhibition latérale par la voie Notch.

L'activation de la voie Notch par l'interaction du récepteur Notch avec un de ses ligands membranaires d'une cellule adjacente, entraîne l'expression de Hes1, cible de cette voie, qui inhibe l'expression de *Ngn3* et agit aussi sur la stabilité de la protéine Ngn3. NICD : Notch Intracellular Domain. Source : les molécules d'ADN viennent de Medical Art.

phénotype majeur, soulignant ainsi que Notch n'est pas impliqué dans la fonction, ni dans le maintien des cellules endocrines adultes (Fujikura et al., 2006). Cependant, ces mêmes auteurs ont démontré que la délétion de RBPJ κ dans les progéniteurs Ptf1a⁺ (souris transgénique Ptf1a-Cre ; RBPJ κ ^{fl/fl}) entraînait une hypoplasie du pancréas, une prolifération de l'épithélium altérée, qui ne formait pas la structure arborisée avec l'organisation des Tip/Trunk, ainsi qu'une augmentation de la différenciation exocrine (Fujikura et al., 2007), démontrant ainsi que Notch est aussi impliqué dans la régulation de la différenciation exocrine. En modulant la quantité de Presenilin1 et Presenilin2 (sous-unités de la γ secretase) dans les cellules Ngn3⁺ (souris Ngn3-Cre ; Ps1^{fl/fl} ; ps2^{-/-}), les auteurs ont pu démontrer que les progéniteurs Ngn3⁺ pouvaient se différencier en cellules acinaires dans une fenêtre de temps bien déterminée (avant l'expression de Pax6), démontrant ainsi que l'activité de la γ -sécrétase participe à la différenciation des progéniteurs Ngn3⁺ (Cras-Meneur et al., 2009). Grâce à l'élaboration d'une souris transgénique exprimant un dominant-négatif de la voie Notch, Afélik et al. (2012) ont réussi à démontrer, *in vivo*, que Notch est impliqué dans la morphogenèse du pancréas, plus particulièrement sur la formation des Tip/Trunk en activant directement l'expression du facteur de transcription Nkx6.1 (présenté au paragraphe I.B.3.1.1.) et donc, sur la différenciation des différents types cellulaires pancréatiques (Afélik et al., 2012). Une autre étude a permis d'éclaircir le lien entre Sox9, Ngn3 et Notch. En modulant la concentration d'un inhibiteur de la γ -sécrétase, Shih et al. (2012) ont pu confirmer que l'activité de cette enzyme est déterminante pour le choix de la différenciation canalaire vs endocrine des progéniteurs endocrines, mais aussi que cette régulation passait par l'activation de l'expression du facteur de transcription Sox9 (Fig 22) (Shih et al., 2012).

Ainsi, l'ensemble des données publiées concernant Notch dans le développement du pancréas démontrent que cette voie de signalisation est un acteur majeur de la morphogenèse du pancréas et de la différenciation des cellules pancréatiques.

3. Différenciation et maturation des différents types cellulaires endocrines du pancréas

De nombreux facteurs de transcription agissent ensuite en aval de Ngn3 afin de définir les différents types de cellules endocrines, tels que les facteurs de transcription de la famille des GATA, des Forkhead (Foxa1 et Foxa2), de la famille des NK homeobox (Nkx), NeuroD, Insm1, des Paired box gene (Pax), Aristaless homeobox (Arx), V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family (Maf). Par contre, contrairement à ce que nous avons décrit préalablement pour le développement précoce du pancréas, peu de signaux régulateurs de la différenciation des cellules endocrines ont été identifiés.

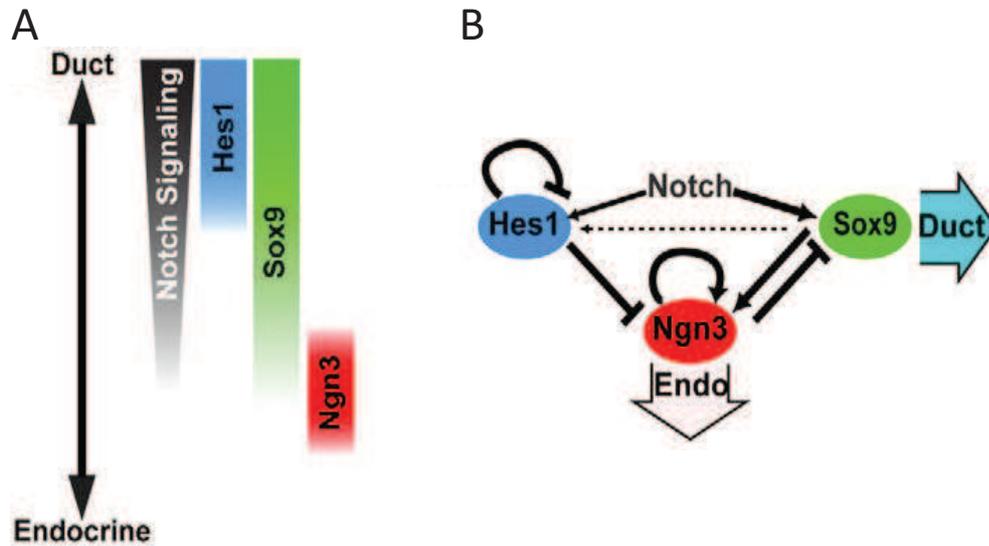


Figure 22: Schémas récapitulatif du rôle de la voie Notch dans la différenciation cellulaire pancréatique. A : le taux d'activation de la voie Notch est déterminant dans la régulation de la différenciation des cellules pancréatiques. Plus Notch est actif, plus la protéine Hes1 inhibe Ngn3 favorisant la différenciation canalaire. Lorsque Notch est moins actif, la protéine Ngn3 est présente en plus grande quantité permettant la différenciation endocrine. B : résumé des interactions entre Notch, Hes1, Ngn3 et Sox9, permettant de réguler la différenciation des cellules endocrines et canalaire. D'après Shih et al., 2012.

3.1. Régulation transcriptionnelle de la différenciation endocrine pancréatique

3.1.1. NeuroD

Le facteur de transcription de type bHLH NeuroD (ou Beta2) est une cible directe de Ngn3 (Huang et al., 2000) et se fixe sur des séquences promotrices de l'insuline (Naya et al., 1995), afin d'activer son expression. L'expression de NeuroD est retrouvée dans une population de cellules Ngn3-positives (Huang et al., 2000), ainsi que dans les cellules endocrines, démontrant le rôle spécifique de NeuroD dans ce lignage (Naya et al., 1997). Les souris NeuroD^{-/-} présentent, comme les souris Ngn3^{-/-}, un diabète néonatal sévère et léthal, suggérant que NeuroD est essentiel à la mise en place du lignage endocrine et à l'homéostasie du glucose. L'analyse histologique de coupes pancréatiques de souris NeuroD^{-/-} a révélé que NeuroD est essentiel à l'expansion des cellules endocrines embryonnaires et au maintien de ces cellules après la naissance (Naya et al., 1997).

NeuroD apparait ainsi comme un facteur de transcription essentiel à la mise en place du lignage endocrine et à son maintien.

3.1.2. Nkx2.2, Nkx6.1 et Nkx6.2

Les facteurs de transcription à homéodomains Nkx2.2 ; Nkx6.1 et Nkx6.2 ont été mis en évidence pour leur rôle dans la différenciation endocrine du pancréas.

L'expression de Nkx2.2 est visible dans le bourgeon pancréatique dès E9.5 et persiste dans l'épithélium pancréatique au cours de sa prolifération. Puis, à partir du stade E15.5, l'expression de Nkx2.2 est restreinte aux cellules endocrines. Son expression est maintenue jusqu'au stade adulte dans le tissu endocrine, où il est exprimé dans toutes les cellules β , ~80% des cellules α ainsi qu'une partie des cellules PP. Son expression n'est par contre pas observée au niveau des cellules δ (Sussel et al., 1998). Les souris mutantes pour Nkx2.2 meurent ~1 semaine après la naissance en présentant un retard de croissance ainsi qu'un diabète. Une diminution importante du tissu endocrine, sans défaut de formation du tissu exocrine est alors constatée histologiquement (Sussel et al., 1998). Cette étude a permis de démontrer que la mutation de Nkx2.2 affecte particulièrement la différenciation des cellules β , montrant que Nkx2.2 est un facteur de transcription majeur de la différenciation des cellules β . Plus récemment, Wang et al. ont permis de démontrer que Nkx2.2 collaborait avec le facteur de transcription Pax4 (présenté ultérieurement) dans l'initiation de la différenciation des cellules β (Wang et al., 2004).

Le facteur de transcription Nkx6.1 présente un patron d'expression similaire à Nkx2.2 : exprimé dès E10.5 dans les cellules Pdx1⁺, il se restreint vers E13.5 aux cellules Ngn3⁺ et devient vers E15.5 spécifique des cellules à insuline dans lesquelles son expression est maintenue au stade adulte (Henseleit et al., 2005; Sander et al., 2000). Les embryons mutants pour Nkx6.1 présentent un défaut de formation des cellules β qui apparaît lors de la seconde transition, vers E13.5 (Sander et al. 2000). Des modèles transgéniques Pdx1- Nkx6.1 et Ngn3- Nkx6.1 ont permis de démontrer que l'action de ce facteur de transcription dans la différenciation des cellules β est requise au niveau des progéniteurs Pdx1⁺ (Schaffer et al., 2013). Nkx6.1 est un activateur de la transcription de gènes nécessaire à la différenciation et au maintien des cellules β (Schaffer et al., 2013; Taylor et al., 2013) et un répresseur de gènes impliqués dans la différenciation acinaire (Schaffer et al., 2010), mais aussi du gène Arx (présenté ultérieurement), qui est un des acteurs essentiel pour la différenciation des cellules α.

Enfin, Nkx6.2 présente un profil d'expression différent de Nkx2.2 et Nkx6.1. Son expression est transitoire au cours du développement du pancréas. Ce facteur de transcription est exprimé dès E9.5 à la fois dans le bourgeon dorsal et ventral. Puis à E15.5, son expression, qui ne concerne alors que quelques cellules Pdx1⁺ et Glucagon⁺ décroît dans le bourgeon ventral tout en se maintenant dans le bourgeon dorsal (Henseleit et al., 2005; Pedersen et al., 2005). Les souris mutantes pour ce facteur de transcription ne présentent pas de défaut majeur de formation d'organisation tissulaire du pancréas. Lorsque Nkx6.1 est muté, une augmentation de l'expression de Nkx6.2 est constatée (Henseleit et al., 2005), suggérant que Nkx6.2 est régulé par Nkx6.1. Les double mutants Nkx6.1^{-/-}; Nkx6.2^{-/-} présentent un phénotype similaire aux mutants Nkx6.1^{-/-} (Henseleit et al., 2005), suggérant que la modification de l'expression de Nkx6.2 observée chez les mutants pour Nkx6.1 ne permet pas une restauration d'un phénotype sauvage. Cependant, lorsque Nkx6.2 est exprimé sous le contrôle du promoteur Pdx1, dans un modèle de souris transgénique Pdx1- Nkx6.2, sur un fond génétique Nkx6.1^{-/-}, une restauration de l'expression de l'insuline est constatée, due à la différenciation et la maturation de cellules β (Nelson et al., 2007), démontrant ainsi qu'un phénomène de redondance au niveau des progéniteurs multipotents Pdx1⁺ est observée.

3.1.3. Rfx3 et Rfx6

Le rôle dans la différenciation des cellules endocrines a été mis en évidence pour deux facteurs de transcription de la famille des Regulatory factors X (Rfx), qui se lient à l'ADN par un domaine de type winged-helix: Rfx3 et Rfx6.

Rfx3 est une protéine impliquée dans la ciliogenèse permettant la mise en place de la symétrie Droite-Gauche. Chez la souris, une mutation perte de fonction d'Rfx3 entraîne un situs inversus chez les survivants, cette mutation menant dans la plupart des cas à une mort embryonnaire (Bonnafe et al., 2004). Au niveau pancréatique, Rfx3 est exprimé dès E13.5 par les progéniteurs endocrines Ngn3⁺. Son expression est observée tout au long du développement du pancréas ainsi que dans le pancréas

adulte dans les différents types cellulaires endocrines (Bonnafe et al., 2004), démontrant ainsi la spécificité d'Rfx3 pour ce lignage. Chez les souris sauvages, les cellules endocrines, ainsi que les cellules canalaies sont ciliées. Les embryons E19.5 mutants pour Rfx3 présentent une diminution du nombre de cellules endocrines avec une réduction significative du volume des îlots. Au niveau cellulaire, le nombre de cils des cellules endocrines est diminué, ceux persistants étant plus petits. Les quelques souris adultes mutantes pour Rfx3 présentent une diminution d'environ 50% de la surface des îlots avec un défaut architectural des îlots (Ait-Lounis et al., 2007). La délétion d'Rfx3 spécifiquement dans les cellules pancréatiques, par l'utilisation de modèles murins Pdx1-Cre ; Rfx3^{ff} entraîne un phénotype pancréatique similaire à la délétion globale d'Rfx3, démontrant ainsi que le phénotype observé chez les souris Rfx3^{-/-} est bien lié au rôle spécifique de ce facteur de transcription dans le pancréas (Ait-Lounis et al., 2010). Par ailleurs, cette même étude a permis de démontrer qu'Rfx3 se lie à des séquences régulatrices de la glucokinase. Ainsi, l'ensemble de ces études a permis d'identifier Rfx3 comme l'un des acteurs clé pour la ciliogenèse, la différenciation des cellules endocrines mais aussi de la maturation fonctionnelle des cellules β .

L'expression de Rfx6 est observée dans l'endoderme dès E9.0 (Smith et al., 2010; Soyer et al., 2010). A E9.5, l'expression de Rfx6 est constatée au niveau des progéniteurs multipotents Pdx1⁺ puis se restreint ensuite au lignage endocrine. Son expression dans les îlots est maintenue jusqu'au stade adulte (Smith et al., 2010; Soyer et al., 2010). Les animaux déficients pour Rfx6 meurent environ 2 jours après la naissance par incapacité à s'alimenter. L'analyse histologique de leur pancréas (à E17.5) a permis d'observer une diminution drastique de l'expression et du nombre de cellules endocrines différenciées, à l'exception du Polypeptide Pancréatique (Smith et al., 2010). Par contre, contrairement à ce que nous avons précédemment décrit pour l'inactivation de Rfx3, aucune dérégulation des gènes impliqués dans la ciliogenèse n'a été constatée (Smith et al., 2010). De manière similaire à la souris, l'expression de Rfx6 chez le poisson zèbre est aussi retrouvée au niveau des progéniteurs endocrines ainsi qu'au niveau des cellules endocrines matures. La perte de fonction de Rfx6 chez le poisson zèbre, obtenue à l'aide de morpholinos, a permis de constater un phénotype en partie similaire au phénotype murin avec une diminution du nombre de cellules endocrines. Par contre, une augmentation du nombre de progéniteurs endocrines est observée chez le poisson zèbre. Ce phénotype s'explique par le fait que la perte de Rfx6 n'impacte pas sur la formation des progéniteurs endocrines mais sur leur différenciation qui est alors bloquée. Les progéniteurs endocrines ne se différenciant pas entraîne leur augmentation et la diminution des cellules endocrines (Soyer et al., 2010). L'ensemble de ces données ont permis d'identifier Rfx6 comme un acteur majeur de la différenciation et de la maturation des cellules endocrines.

3.1.4. Pax6, Pax4 et la différenciation endocrine

Deux membres de la famille des facteurs de transcriptions de la famille des *Paired-box*, Pax4 et Pax6, ont été identifiés pour leur rôle dans la mise en place du lignage endocrine pancréatique.

L'expression de Pax6 est spécifique des cellules endocrines depuis le stade embryonnaire E9.0 jusqu'au stade adulte (Sander et al., 1997; St-Onge et al., 1997). Les souris mutantes pour Pax6, mutation dite *Small eye* (Sey), présentent une létalité post-natale immédiate et une agénésie oculaire et du bulbe olfactif (Sander et al., 1997). Au niveau pancréatique, l'analyse histologique de leur pancréas a permis de révéler que la masse de cellules endocrines était diminuée, que les îlots présents contenaient très peu voire aucune cellule α , que l'organisation de ces îlots était affectée et que la sécrétion de l'insuline et du glucagon était diminuée (Sander et al., 1997; St-Onge et al., 1997), démontrant ainsi que Pax6 est essentiel à la différenciation endocrine, la sécrétion des hormones et l'organisation des îlots. La délétion conditionnelle de Pax6 dans les cellules endocrines prolonge de quelques jours la vie de ces mutants, qui meurent environ 7 jours post-natal d'un diabète (Ashery-Padan et al., 2004). Cette étude a permis de démontrer que Pax6 est plutôt impliqué dans la différenciation et le maintien des cellules β que dans leur néogenèse, en se liant à des séquences régulatrices de l'*insuline*, du *glucagon* ainsi que de la *somatostatine*, permettant ainsi de réguler leur production (Sander et al., 1997).

Au cours du développement du pancréas, l'expression de Pax4 se retrouve essentiellement dans les cellules β (Fig 23A) (Wang et al., 2004). Les souris homozygotes mutantes pour ce facteur de transcription meurent quelques jours après la naissance en présentant un retard de croissance et des problèmes de déshydratation (Sosa-Pineda et al., 1997). L'analyse histologique des pancréas Pax4^{-/-} a permis de révéler une perte des cellules β et δ matures (Fig 23B), contrastant avec une augmentation des cellules α (Sosa-Pineda et al., 1997; Wang et al., 2004). L'expression ectopique de Pax4 dans l'épithélium pancréatique ou dans le tissu endocrine entraîne une augmentation de la taille des îlots ainsi qu'une diminution du nombre de cellules α , δ et PP mais une augmentation du nombre de cellules β (Collombat et al., 2009). De plus, l'expression forcée de Pax4 dans les cellules α induit une conversion de ces cellules α en cellules β (Collombat et al., 2009). Dans ce modèle de souris transgénique, une néogenèse de cellules α a lieu afin de compenser la perte des cellules sécrétrices de glucagon converties en cellules β . Cependant, les nouvelles cellules α sont à leur tour converties en cellules β , induisant la formation de méga îlots (Collombat et al., 2009), démontrant ainsi que Pax4 est nécessaire et suffisant à l'induction de la destinée en cellule β . L'ensemble de ces travaux ont permis d'identifier Pax4 comme étant un facteur essentiel pour la différenciation endocrine et plus particulièrement, pour la définition de l'identité des cellules β .

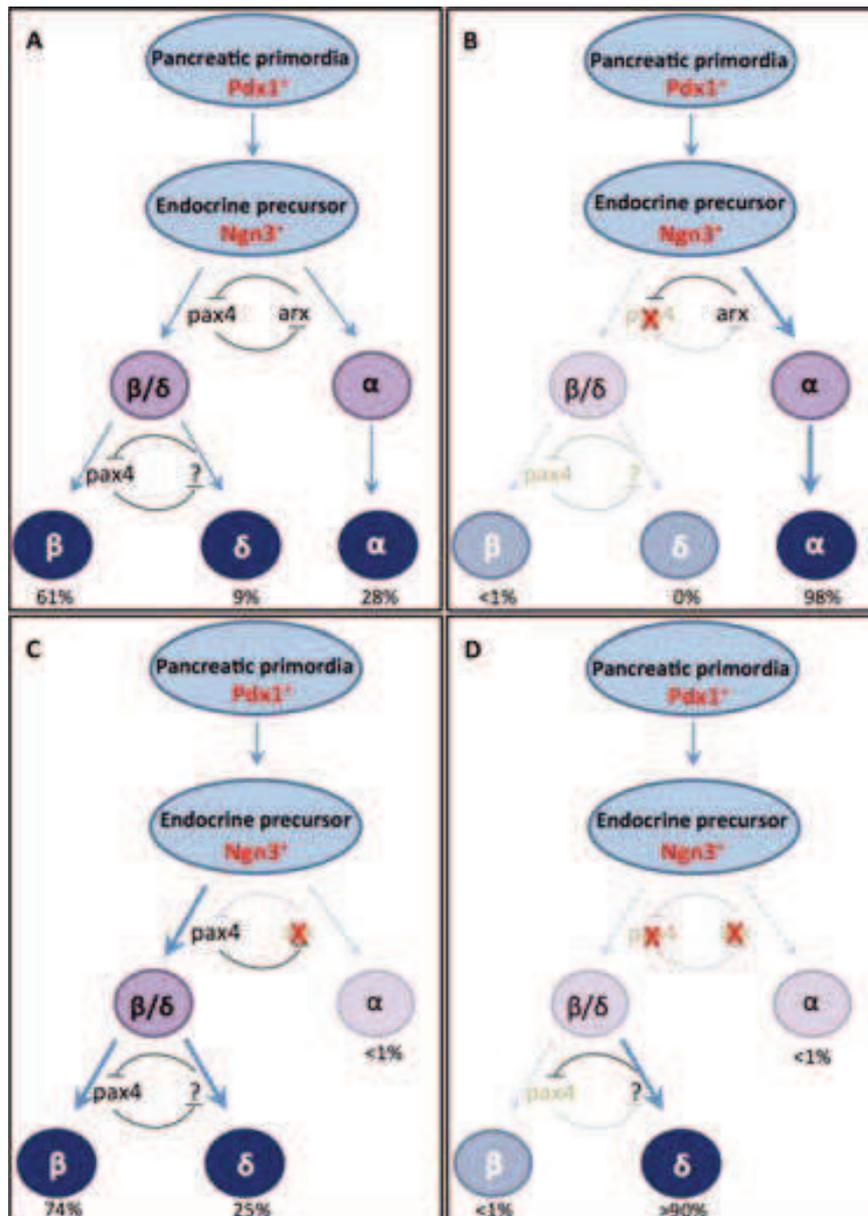


Figure 23: Schéma représentant la spécification des sous types endocrines au cours du développement pancréatique. (A) Les cellules Pdx1⁺ s'engagent vers une destinée pancréatique. Au cours du développement, les cellules qui exprimeront Ngn3 s'engageront vers une destinée endocrine. Ces cellules Ngn3⁺ auront le potentiel de devenir soit des cellules α, soit des cellules β ou δ. Ces cellules co-expriment les facteurs de transcription Pax4, qui active le programme dirigeant les cellules vers une destinée β ou δ, et Arx, qui active le programme dirigeant les cellules vers une destinée α. Ces deux facteurs de transcription s'inhibent mutuellement, créant un équilibre précaire transcriptionnel qui finira par pencher d'un côté ou de l'autre, permettant ainsi de réguler la destinée des cellules Ngn3⁺. Pour la destinée δ, un inhibiteur potentiel de l'expression de Pax4 interviendrait plus tardivement. Dans le cas de la délétion de Pax4 (B), Arx (C) ou de Pax4 et Arx (D), la destinée des cellules Ngn3⁺ sera modulée. D'après Courtney et al. 2011.

3.1.5. Arx et la différenciation des cellules α

En miroir à Pax4, le facteur de transcription *Aristaless homeobox* (Arx) présente une expression spécifique aux cellules α (Fig 23A). Les souris déficientes pour ce facteur de transcription présentent une absence de cellules matures α ainsi qu'une augmentation proportionnelle du nombre de cellules β et δ (Fig 23C), démontrant que le facteur de transcription Arx est nécessaire à la mise en place des cellules α (Collombat et al., 2003). Ce phénotype est le phénotype opposé à celui observé pour les souris Pax4^{-/-}, suggérant une régulation transcriptionnelle entre ces deux facteurs de transcription. Arx est capable de se lier à des séquences régulatrices de Pax4 et d'inhiber sa transcription, permettant ainsi l'engagement de la cellule vers une destinée de type α (Collombat et al., 2005). Pax4, quant à lui, se lie à des séquences régulatrices d'Arx, inhibant ainsi le programme α et induisant le programme β . Cette même étude a aussi permis de démontrer que lorsque les gènes codants pour ces deux facteurs de transcription sont mutés, une absence de cellules insuline⁺ et glucagon⁺ est constatée, tandis que le nombre de cellules somatostatine⁺ et PP⁺ est largement augmenté à P2 (Fig 23D). L'expression ectopique du facteur de transcription Arx aussi bien dans l'épithélium pancréatique que dans les progéniteurs endocrines induit une augmentation du nombre de cellules glucagon⁺ et PP⁺ au détriment des cellules insuline⁺ et somatostatine⁺ par la différenciation préférentielle des progéniteurs endocrines en cellules α et PP (Collombat et al., 2007). De plus, l'expression d'Arx dans les cellules β matures induit leur conversion en cellules productrices de glucagon ou de Polypeptide P (Collombat et al., 2007), démontrant ainsi qu'Arx est suffisant à l'induction du programme α (et PP). De manière complémentaire, l'inactivation d'Arx dans les cellules α pancréatiques a permis de démontrer que les cellules Arx⁺, à l'origine glucagon⁺, sont alors converties en cellules insuline⁺ (Courtney et al., 2013). Parallèlement à la dédifférenciation des cellules α dans ces modèles murins transgéniques, la ré-expression de facteur de transcription tels que Ngn3 est encore observée, indiquant un potentiel de différenciation toujours actif chez ces souris, expliquant le phénomène d'hypertrophie des îlots par génération de nouvelles cellules à glucagon, elles aussi converties en cellules à insuline (Courtney et al., 2013). L'ensemble de ces données a permis d'identifier le facteur de transcription Arx comme un acteur majeur de la différenciation des cellules α .

3.2. Signaux impliqués dans la différenciation endocrine

3.2.1. Le mésenchyme : une source de signaux favorisant la différenciation endocrine

Contrairement aux stades de développement précoce du pancréas, peu de signaux ont été identifiés pour leur rôle dans la différenciation des cellules endocrines. En 1996, Gittes et al. ont pu montrer, grâce à des expériences de culture d'explants pancréatiques, que le mésenchyme était une source de signaux impliqués dans le ratio de cellules endocrines sur exocrines (Gittes et al., 1996). En

effet, quel que soit le support utilisé (filtres, culture en 3 dimensions ou sous la capsule rénale), des explants pancréatiques E11.5 sans mésenchyme présentent un ratio de cellules endocrines sur acinaires et canaux altéré par rapport aux explants pancréatiques cultivés avec mésenchyme. De manière intéressante, les bourgeons pancréatiques cultivés sans mésenchyme, sur filtre ou en 3 dimensions ne présentent quasiment pas de différenciation cellulaire contrairement aux explants cultivés sous la capsule rénale qui eux, présentent une très forte différenciation endocrine par rapport aux autres types cellulaires pancréatiques, démontrant que des signaux exogènes provenant de l'environnement proche permettent la différenciation des cellules endocrines. Ces observations ont été confirmées pour la culture d'explants pancréatiques de rat (Miralles et al., 1998). Par ailleurs, cette étude a identifié la follistatin, molécule inhibitrice de la voie de signalisation du TGF β , comme étant sécrétée par le mésenchyme et agissant comme activateur de la différenciation acinaire et inhibiteur de la différenciation endocrine. Des explants pancréatiques de rat cultivés sur matrice de collagène ont permis de démontrer que le mésenchyme agit en amont de Ngn3 en retardant son expression et en aval en inhibant la différenciation des cellules β (Duvillie et al., 2006), régulant ainsi la différenciation endocrine dans le temps. Par ailleurs, un système de culture d'explants pancréatiques de rat sur Millicell (Millipore) a permis de démontrer qu'en l'absence de mésenchyme, les explants présentent une augmentation de la prolifération des cellules Pdx1⁺, du nombre de cellules Ngn3⁺ et une surface plus importante de cellules β (Attali et al., 2007). Cette dernière étude démontre par ailleurs que des explants pancréatiques sans mésenchyme mais cultivés en présence de ligand FGF10, sécrété *in vivo* par le mésenchyme, présentent un phénotype similaire aux explants pancréatiques cultivés avec mésenchyme (Attali et al., 2007). Ces résultats suggèrent que le ligand FGF10 est un signal mésenchymateux majeur, agissant sur la prolifération des progéniteurs Pdx1⁺. Ces dernières données corroborent les données concernant la perte de fonction de Fgf10 chez la souris, démontrant que ce facteur mésenchymateux est essentiel pour la prolifération de l'épithélium pancréatique (Bhushan et al., 2001).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontrent que le mésenchyme est une source de signaux impliqués dans la régulation de la prolifération des progéniteurs Pdx1⁺ et de la différenciation des différents types cellulaires pancréatiques.

3.2.2. Shh, Ihh et le maintien des fonctions endocrines ?

L'expression des ligands Shh et Ihh, ainsi que de leur récepteurs Ptc a été observée au niveau des îlots pancréatiques de souris adultes (Thomas et al., 2000), suggérant que cette voie de signalisation est encore active à ce stade et a un rôle dans la fonction ou le maintien des cellules endocrines adultes. Dans la lignée β cellulaire INS-1, Thomas et al. ont pu démontrer que l'activation de la voie des Hhgs permettait la sécrétion de l'insuline via une régulation de PDX1 (Thomas et al., 2001), démontrant que la voie des Hhgs participerait à la sécrétion de l'insuline par les îlots adultes, mais restent à confirmer

in vivo. *In vivo*, mais dans une situation inverse de délétion de Hh μ , via la délétion de *Hh μ interacting protein* (Hhip), protéine cytoplasmique de la voie de signalisation Hh μ , une augmentation de la masse insulaire et de la prolifération des cellules β est observée (Kawahira et al., 2003).

Ces deux études démontrent que la voie de signalisation Hh μ a un rôle dans le maintien des fonctions des cellules β , cependant, ce rôle n'a pas été clairement défini pour le moment.

3.2.3. Le TGF β et la prolifération/maturation des cellules endocrines

L'analyse de cultures d'explants pancréatiques au stade E12.5 en présence de TGF β 1 a permis de démontrer que TGF β 1 favoriserait la différenciation endocrine et inhiberait, en induisant un mécanisme de mort cellulaire, la formation du tissu exocrine (Sanvito et al., 1994).

In vivo, le rôle de la voie de signalisation du TGF β dans la différenciation, la maturation et la fonction des cellules endocrines a pu être approché grâce aux souris mutantes pour le *Growth differentiation factor 11* (Gdf11, aussi appelé BMP11). Chez les souris sauvages, Gdf11 est exprimé par les cellules épithéliales dès E11.5. L'analyse des souris Gdf11^{-/-} a démontré que Gdf11 permet la formation du tissu acinaire et la régulation de la différenciation du tissu endocrine en régulant de manière négative la prolifération des progéniteurs Ngn3⁺, ainsi que la maturation des cellules β (Dichmann et al., 2006; Harmon et al., 2004). Ainsi, la voie de signalisation du TGF- β inhiberait la différenciation des cellules β . Un exemple de surexpression de TGF β 1 dans les cellules β adultes entraînant une pancréatite chronique ainsi qu'un diabète insulino-dépendant (Sanvito et al., 1995), vient corroborer cette hypothèse.

Cependant, la modulation de l'expression de Smad7 (l'une des Smads inhibitrices de la voie du TGF- β) dans les cellules Pdx1 au cours du développement du pancréas ainsi que chez des souris adultes a permis de découvrir que l'expression de Smad7 et en corolaire l'inhibition de la voie du TGF β entraîne un défaut de maturation des cellules β au stade embryonnaire, ainsi qu'une perte des cellules β et un diabète au stade adulte (Smart et al., 2006), démontrant ainsi que la voie de signalisation est un acteur de l'intégrité des cellules β .

Ainsi, la voie de signalisation du TGF- β apparait comme un acteur essentiel dans la différenciation des cellules endocrines et la fonction des cellules β . Cependant, des données contradictoires ont été observées, démontrant que l'action de la voie de signalisation du TGF- β peut dépendre du stade de développement, ainsi que du ligand activant cette voie.

4. Régulation transcriptionnelle de la maturation des cellules α et β

4.1. La transition de MafB vers MafA est nécessaire à la maturation des cellules β

Une cellule β mature est caractérisée par l'expression mais aussi par la sécrétion d'insuline en réponse au glucose de manière dose dépendant. Ainsi, les cellules insuline⁺ embryonnaires et périnatales ne sont pas définies comme matures car leur insulino-sécrétion est non sensible au glucose (Kroon et al., 2008). Cette maturation va se faire en post-natal. Ces dernières années, un certain nombre de facteurs de transcription ont été identifiés pour leur rôle dans la maturation des cellules β . Parmi ces facteurs de transcription, les facteurs de type basic-leucine-zipper V- Maf *Musculuaponeurotic fibrosarcome oncogene family* (Maf) ont été identifiés pour leur rôle dans la différenciation ainsi que dans la maturation et le maintien des cellules β . Trois membres de cette famille sont exprimés au niveau du pancréas : MafA, MafB et cMaf. Ces 3 facteurs de transcriptions présentent chacun une expression bien spécifique au niveau du pancréas. Ainsi, MafA a été démontré pour être spécifique des cellules β (Matsuoka et al., 2004; Nishimura et al., 2006; Zhang et al., 2005), tandis que MafB est plutôt exprimé dans les cellules α et cMaf dans ces deux types cellulaires (Nishimura et al., 2006).

L'expression de MafA dans le pancréas est visible vers E12.5 et exclusivement dans des cellules insuline⁺, suggérant un rôle plutôt tardif de MafA dans ces cellules (Nishimura et al., 2006). Les souris mutantes pour MafA sont viables sans phénotype néonatal particulier mais développent un diabète au cours du temps, avec un défaut de sécrétion d'insuline. L'architecture insulaire est alors modifiée avec un ratio de cellules β/α largement diminué lorsque MafA est absent (Zhang et al., 2005). Ces résultats démontrent que MafA a un rôle au niveau de la maturation, le maintien de la masse et de la fonction des cellules β , notamment par la régulation de la sécrétion d'insuline, ce facteur de transcription se fixant à la séquence régulatrice RIPE3b de l'insuline (Olbrot et al., 2002).

MafB est exprimé plus tôt que MafA au cours du développement du pancréas : dès E10.5, les premières cellules MafB⁺ sont observables. Les souris mutantes pour MafB meurent à la naissance (Blanchi et al., 2003), limitant l'étude de ces mutants aux stades embryonnaires. Ces souris mutantes pour MafB présentent une diminution du nombre de cellules glucagon⁺ et insuline⁺, sans pour autant affecter le nombre global de cellules endocrines (Artnier et al., 2007). Cette même étude a démontré que la perte de MafB n'affectait pas l'identité des cellules hormones⁺ embryonnaires (par le maintien de l'expression de facteurs de transcription spécifiques au lignage endocrine) mais que la maturation de ces cellules, notamment des cellules β , était affectée. Au cours du développement du pancréas, MafB est exprimé dans les cellules à glucagon, mais aussi dans les cellules insuline⁺ (Nishimura et al., 2006). C'est aux alentours de 3 semaines après la naissance que l'expression de MafB dans les cellules β est perdue pour devenir spécifique des cellules α . Cette étude a permis de démontrer qu'au cours du

développement du pancréas, une transition a lieu dans les cellules à insuline de MafB vers MafA. Il a ainsi été démontré que MafB puis MafA régulent tous deux des gènes nécessaires à la maturation des cellules β (Artner et al., 2010).

4.2. Rôle du neuropeptide UcnIII dans la fonction des cellules β et la sécrétion d'insuline

Le neuropeptide *Urocortin III* (Ucn III) ou stresscopin, est un ligand du *récepteur de type 2 des corticotropin-releasing factor* (CRFR2). L'expression d'Ucn III a été observée au niveau des cellules β d'îlots murins, ainsi que dans la lignée cellulaire insulaire Min6 (Li et al., 2003), démontrant que ce neuropeptide est exprimé par les cellules β adultes. L'injection d'Ucn III a permis de démontrer que ce facteur est impliqué dans la sécrétion d'insuline, ainsi que du glucagon, via CRFR2 (Li et al. 2003). Des modèles de rongeurs diabétiques tels que des souris obèses ob/ob ou des rats nourris sous régime riche en matière grasse, ont démontré que la sécrétion d'Ucn III était associée à un contexte hyperglycémique et hyperinsulinémiant, afin de permettre la sécrétion d'insuline via CRFR2 (Li et al., 2007). Les souris mutantes pour Ucn III sont viables et ne présentent pas de phénotype très différent comparé à des souris sauvages sous un régime normal (Li et al., 2007). Par contre, ces souris présentent un taux basal d'insuline plus bas que les souris sauvages et leurs îlots présentent une sécrétion d'insuline moins importante en présence de forte concentration de glucose, confirmant l'importance de ce neuropeptide pour la sécrétion d'insuline en contexte hyperinsulinémiant. Sous un régime riche en matière grasse, les souris mutantes pour Ucn III prennent du poids, comme les souris sauvages, mais à l'instar de leurs contrôles, ne développent pas de résistance à l'insuline ni de stéatose hépatique. L'ensemble de ces résultats ont permis de démontrer qu'Ucn III est un acteur important pour la sécrétion d'insuline des cellules β matures.

4.3. Le facteur de transcription Pdx1 active la transcription de gènes nécessaires à la fonction des cellules β et réprime le programme α .

Au cours du développement du pancréas, l'expression du facteur de transcription Pdx1 se restreint aux cellules β et est maintenue dans les cellules β adultes (Ohlsson et al., 1993). La délétion de Pdx1 dans les cellules β embryonnaires et adultes conduit à une diminution de l'expression de l'insuline, ainsi que de Nkx6.1 et Glut2, une intolérance au glucose et à une augmentation du nombre de cellules à glucagon (Ahlgren et al., 1998; Gannon et al., 2008) au stade adulte. Si les délétions embryonnaires et adultes de Pdx1 mènent à un phénotype similaire, la comparaison de la délétion de Pdx1 dans les cellules à insuline embryonnaires (Gannon et al., 2008) avec la délétion de Pdx1 dans les cellules β adultes a révélé un potentiel rôle différentiel de Pdx1 dans les cellules à insuline au cours de la maturation des cellules β . Ainsi, les cellules β adultes délétées de Pdx1 perdent leurs caractéristiques de cellules β pour acquérir celles de cellules α (Gao et al., 2014), suggérant un phénomène de

transdifférenciation des cellules β déléetées de Pdx1 en cellules α . Pdx1 a ainsi été identifié comme nécessaire à la répression de l'expression du facteur de transcription spécifique aux cellules α MafB (Gao et al., 2014) et activateur de la transcription de l'insuline (Ohlsson et al., 1993), de la Glucokinase, de Pax4 et de lui-même (Chakrabarti et al., 2002). Dans le cas de la délétion embryonnaire de Pdx1, la hausse du nombre de cellules à glucagon n'est pas liée à un phénomène de transdifférenciation des cellules β déléetées de Pdx1 en cellules α (Gannon et al., 2008).

Ainsi, Pdx1, dont l'action semble évoluer au cours de la maturation des cellules sécrétrices d'insuline, apparaît comme un facteur de transcription essentiel au maintien de l'intégrité des fonctions et de l'identité des cellules β .

4.4. Brn4 : un facteur de transcription spécifique des cellules α

Le facteur de transcription Pou3f4, ou *Brain 4* (Brn4), à l'origine identifié comme étant un facteur de transcription impliqué dans la formation des oreilles (de Kok et al., 1995), a été identifié comme étant spécifique des cellules α matures et plus particulièrement, un activateur de la transcription du pro-glucagon, par sa fixation sur sa séquence régulatrice G1 (Hussain et al., 1997). Dès E10.5, l'expression de *Brn4* est observée dans les premières cellules à glucagon (Heller et al., 2004). Son expression dans les cellules de type α perdure jusqu'à l'âge adulte. L'expression ectopique de Brn4 dans les progéniteurs pancréatiques a permis d'observer une expression ectopique du glucagon dans les cellules insuline⁺ matures, mais sans aller jusqu'à un phénotype α complet (Hussain et al., 2002), démontrant l'action de ce facteur de transcription dans l'induction du programme de différenciation α cellulaire.

5. Rôle de la vascularisation dans le développement du pancréas

5.1. Vascularisation et formation précoce du pancréas

L'analyse de cultures d'explants pancréatiques en l'absence de l'aorte dorsale ont permis d'identifier cette dernière comme une source de signaux permettant l'expression de l'insuline (Lammert et al., 2001). De plus, lorsque la formation de l'aorte dorsale est inhibée (Jacquemin et al., 2006; Yoshitomi and Zaret, 2004), les embryons n'expriment plus *Ptfla* au niveau du bourgeon dorsal et présentent une agénésie du bourgeon pancréatique dorsal. L'inhibition de la formation de l'aorte dorsale a aussi permis de révéler que les signaux issus de l'aorte dorsale permettent le maintien des cellules mésenchymateuses à proximité de l'épithélium pancréatique (Jacquemin et al., 2006). Ces <rec-number>8865</rec-ses sont une source de FGF10 qui permet l'expression de *Ptfla* au niveau de l'épithélium pancréatique (Jacquemin et al., 2006). Ces expériences ont permis de mettre en lumière des interactions entre le mésenchyme pancréatique et l'aorte dorsale et d'identifier l'aorte dorsale

comme une source de signaux nécessaires à la formation des bourgeons pancréatiques lors des stades précoces du développement du pancréas.

D'autres études corroborent ces résultats et démontrent aussi qu'un dialogue existe non seulement avec les cellules endothéliales, mais aussi avec des facteurs circulants. Par exemple, des embryons perte de fonction pour la protéine d'adhésion cellulaire N-Cadhérine (embryons $Cdh2^{-/-}$), meurent vers E9.5 suite à des défauts d'adhésion cellulaire cardiaque. Ces embryons présentent aussi des défauts de vascularisation et une agénésie du bourgeon pancréatique dorsal (Esni et al., 2001). L'ajout, à des cultures d'explants pancréatiques d'embryons E9.5 $Cdh2^{-/-}$ de Sphingosine-1-Phosphatase (S1P), un médiateur lipidique présent dans la circulation sanguine, permet de rétablir la formation du bourgeon pancréatique dorsal (Edsbagge et al., 2005). De plus, grâce à l'élaboration d'une technique de microscopie permettant de suivre l'afflux de sang, l'oxygène apporté par l'afflux sanguin a aussi pu être identifié comme nécessaire au développement du pancréas et à la différenciation endocrine (Shah et al., 2011). Ainsi, grâce à ces observations et des expériences de cultures d'explants pancréatiques de rat en conditions hyper- ou hypoxygéniques, les auteurs ont démontré qu'il existe une corrélation entre le flux sanguin, l'oxygénation du pancréas et les vagues de prolifération/différenciation observées au cours du développement du pancréas (Heinis et al., 2011; Shah et al., 2011).

Ainsi, les interactions entre les cellules épithéliales, les facteurs circulants et l'épithélium pancréatique sont essentiels à la régulation du développement précoce du pancréas. Lors des premiers stades de développement du pancréas, le système vasculaire apparaît comme nécessaire à l'induction du développement pancréatique.

5.2. Vascularisation, arborisation de l'épithélium pancréatique et différenciation endocrine

Les études démontrant l'impact de l'oxygénation sur la prolifération et la différenciation endocrine suggèrent un rôle inducteur de la prolifération et de la différenciation cellulaire au cours du développement du pancréas. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), sécrété par l'épithélium pancréatique (Pierreux et al., 2010), apparaît comme la molécule clé de la communication entre les cellules endothéliales et l'épithélium pancréatique. Par exemple, un modèle de souris transgéniques Pdx1-VEGF démontre que la surexpression de VEGF dans l'épithélium pancréatique entraîne une hypervascularisation du pancréas, une augmentation du nombre d'îlots pancréatiques ainsi que de leur taille et une expression ectopique de l'insuline (Lammert et al., 2001). A contrario, la perte de VEGF-A au stade précoce de développement du pancréas entraîne une hypovascularisation et une diminution de la masse de cellules β (Reinert et al., 2013). Ces résultats démontrent ainsi que la vascularisation favoriserait la prolifération et la différenciation des cellules β .

La perte de VEGF-A dans l'épithélium pancréatique induit une hypovascularisation du pancréas qui s'accompagne d'une hausse de la différenciation acinaire au niveau des extrémités de l'épithélium

pancréatique (Pierreux et al., 2010). De manière similaire, le traitement d'explants pancréatiques E12.5 par un inhibiteur de la vascularisation entraîne une hausse du nombre de cellules acinaires et de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation acinaire. Ce traitement entraîne aussi une diminution du nombre de cellules $Ngn3^+$ et $Pax6^+$, démontrant qu'au cours du développement du pancréas, la vascularisation inhibe la différenciation acinaire et favorise la différenciation endocrine. A contrario, la surexpression de VEGF-A dans l'épithélium pancréatique et plus particulièrement au niveau des cellules de l'extrémité de l'épithélium pancréatique (embryons Ptf1a-5'enh-pEla-VEGFA) ou encore le traitement d'explants pancréatiques E12.5 avec du VEGF-A entraîne une diminution des cellules acinaires. VEGF-A apparaît alors comme un inhibiteur de la différenciation exocrine. Cette étude démontre aussi que VEGF-A, exprimé par l'épithélium pancréatique permet le recrutement des cellules endothéliales, exprimant le récepteur *Vegfr2*. Les cellules endothéliales inhibent en retour la différenciation acinaire.

Une autre étude, utilisant un autre modèle de souris transgénique surexprimant VEGF dans l'épithélium pancréatique sous induction à la doxycycline, confirme que l'hypervascularisation du pancréas entraîne une réduction de la taille du pancréas (Magenheim et al., 2011). De plus, les auteurs ont observé que dans leur modèle de souris transgénique, l'hypervascularisation du pancréas entraîne aussi une diminution de l'arborisation de l'épithélium pancréatique et de la différenciation endocrine, suggérant que la vascularisation inhibe la formation du tissu exocrine et endocrine. Cependant, aucun effet sur la prolifération ou la différenciation endocrine n'avait été observé lors des études de gain de fonction réalisées par Pierreux et al. 2010. Enfin, en répétant les expériences de culture d'explants pancréatiques traités avec un inhibiteur de vascularisation différent de celui utilisé par Pierreux et al. 2010, les auteurs ont aussi constaté une augmentation du tissu acinaire, de l'arborisation de l'épithélium pancréatique ainsi que de l'expression de *Ngn3*, confirmant ainsi l'hypothèse selon laquelle la vascularisation inhibe la différenciation acinaire et endocrine au cours du développement du pancréas amenée par Pierreux et al. 2011 (Fig 24).

L'ensemble de ces résultats démontre que le rôle de la vascularisation dans le développement du pancréas évolue au cours du développement. Inducteur aux stades précoces, la vascularisation joue ensuite un rôle dans la régulation de l'expansion du pancréas embryonnaire en inhibant à la fois la formation du tissu exocrine et endocrine. Les mécanismes à l'origine de la modification de la compétence des cellules épithéliales pancréatiques à répondre aux signaux endothéliaux ne sont pas vraiment connus. Magenheim et al. (2011) ainsi que Pierreux et al. (2010) démontrent que la modulation de la vascularisation impacte aussi l'expression la voie Notch : dans le cas d'une hypovascularisation, l'expression de *Hey-1* et *Hey-2*, cibles de la voie Notch, diminue, tandis que dans le cas d'une hypervascularisation, elle augmente (Pierreux et al., 2010). Le traitement d'explants pancréatiques provenant d'embryons de souris transgéniques surexprimant VEGF dans l'épithélium pancréatique par un inhibiteur de la γ -secretase, inhibant l'activation de la voie Notch, permet de

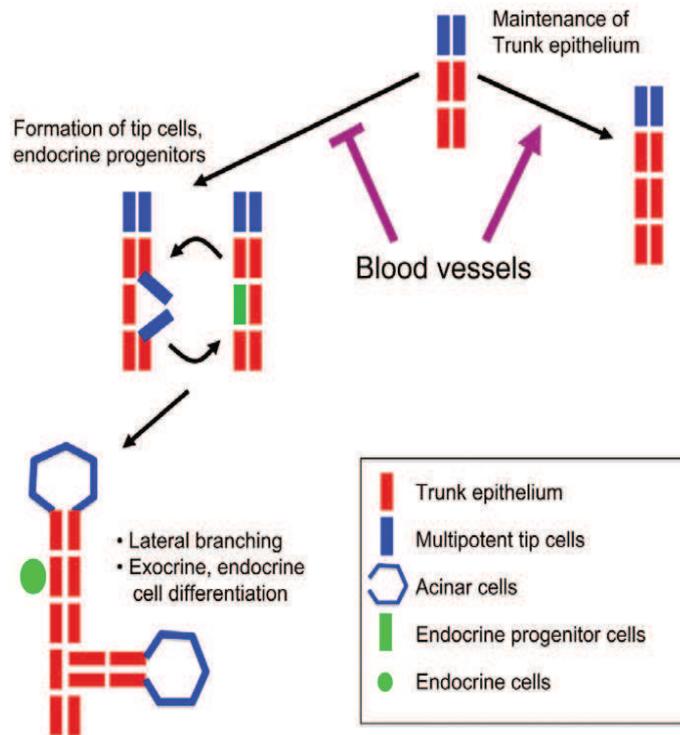


Figure 24: les cellules endothéliales inhibent la différenciation endocrine et exocrine. Schéma récapitulatif des résultats de Magenheim et al. (2011), démontrant que les vaisseaux inhibent la différenciation endocrine et exocrine pour maintenir le stade progéniteur. D'après Magenheim et al., 211.

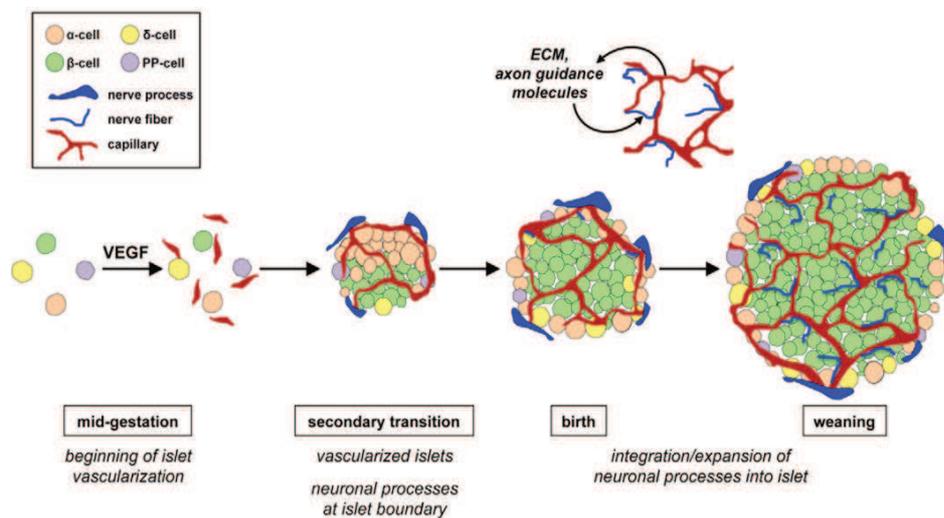


Figure 25: Crosstalk entre la mise en place de la vascularisation, le développement du pancréas et la mise en place de l'innervation endocrine. Schéma récapitulatif expliquant la cinétique de la vascularisation avec la différenciation des cellules endocrines pancréatiques et leur innervation : les cellules de l'épithélium pancréatique attirent, par la sécrétion de VEGF, les cellules endothéliales. Ces dernières vont ensuite guider les cellules neuronales par la sécrétion de molécules attractives et via leur lame basale. D'après Reinert et al., 2014.

restaurer un phénotype proche des explants sauvages (Magenheim et al., 2011). Ces résultats suggèrent que la régulation de la différenciation pancréatique par la vascularisation se fait certainement via la voie Notch. Cette dernière pourrait aussi être à l'origine de la modification de la compétence des cellules épithéliales pancréatiques en réponse aux signaux endothéliaux.

5.3. Mise en place du système vasculaire et innervation pancréatique

Nous avons vu qu'au cours du développement du pancréas, les cellules épithéliales sécrètent du VEGF afin d'attirer les cellules endothéliales, permettant ainsi la mise en place du système vasculaire pancréatique. La modulation de l'expression de VEGF dans le pancréas au cours du développement a révélé que la vascularisation est aussi un acteur majeur de l'innervation du pancréas (Reinert et al., 2014). Il existe une corrélation directe entre la formation du système vasculaire et l'innervation du pancréas endocrine. Ainsi, une hypervascularisation ou hypovascularisation induites au stade embryonnaire entraînent respectivement une hyperinnervation ou une hypoinnervation des îlots, qui ont lieu dès l'embryogenèse et persistent dans le pancréas adulte, suggérant que les interactions entre le système vasculaire et nerveux persistent au stade adulte. D'après les résultats des auteurs, la vascularisation permet l'innervation des îlots à la fois par le système nerveux sympathique et le système nerveux parasympathique. Au cours du développement du pancréas, les cellules neuronales proviennent des crêtes neurales qui migrent de manière dorso-latérale pour coloniser l'épithélium pancréatique et se différencient en cellules neuronales (Nekrep et al., 2008; Plank et al., 2011). Les cellules des crêtes neurales n'expriment pas de récepteur au VEGF, c'est par la sécrétion de molécules de guidage d'axones, telles que les sémaphorines ou encore les nétrines, et via la lame basale que les cellules endothéliales guident les cellules neuronales jusqu'aux îlots (Reinert et al., 2014)(Fig 25).

Cette étude est la première à proposer un mécanisme expliquant l'innervation des îlots. Elle permet aussi de mettre en lumière les interactions entre l'épithélium pancréatique, attirant les cellules endothéliales, qui elles-mêmes guident le système nerveux.

6. Rôle de l'innervation dans le développement du pancréas

6.1. Mise en place de l'innervation pancréatique au cours du développement

Le système nerveux pancréatique se forme par la colonisation de l'épithélium pancréatique par les cellules des crêtes neurales, précurseurs des neurones (Kirchgessner et al., 1992; Plank et al., 2011). Parmi les signaux impliqués dans l'innervation du pancréas, le Nerve Growth Factor (NGF) a été identifié comme étant essentiel à l'innervation pancréatique (Edwards et al., 1989; Glebova and Ginty, 2004). Ainsi, la surexpression de NGF dans les cellules β (souris RIP-NGF) entraîne une hyperinnervation uniquement des îlots (Edwards et al., 1989), tandis que sa mutation entraîne un

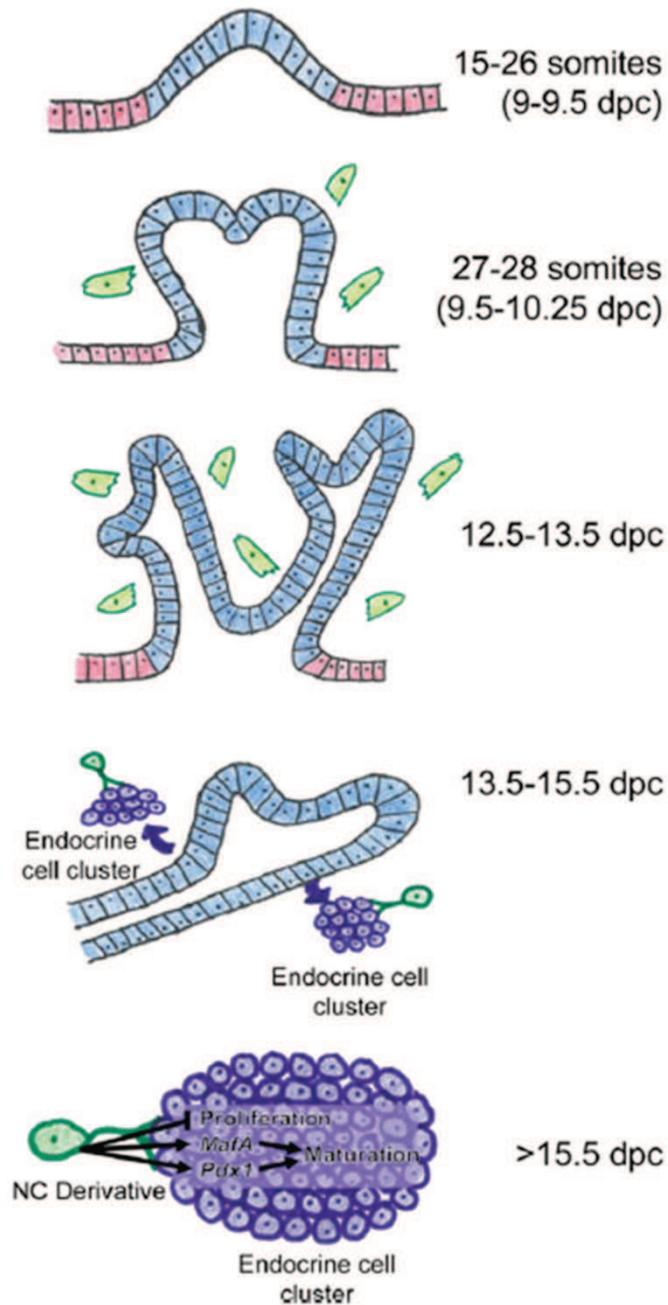


Figure 26: Cinétique de la migration des cellules des crêtes neurales et de l'innervation endocrine au cours du développement du pancréas. Schéma expliquant la cinétique de migration des cellules des crêtes neurales (cellules vertes claires) vers l'endoderme pancréatique (cellules bleues) et formation de l'innervation (cellules vert foncé) des cellules endocrines (cellules violettes). D'après Plank et al., 2011.

défaut d'innervation des muscles cardiaques, de l'estomac, du rein et du tractus intestinal (Glebova and Ginty, 2004). La cinétique de formation du système nerveux est plutôt bien caractérisée. Les premières cellules des crêtes neurales arrivent au niveau du primordium pancréatique vers E10 et migrent ensuite dans les bourgeons (d'abord le dorsal puis le ventral) pour venir directement au contact des cellules de l'épithélium pancréatique (Fig 26) (Plank et al., 2011). Les premiers neurones sympathiques et sensitifs différenciés sont visibles au niveau du bourgeon pancréatique dorsal vers E10.5 avant de progresser dans l'ensemble du pancréas en formation. Lors de la maturation postnatale des cellules endocrines, les neurones sympathiques et sensitifs migrent à proximité et au niveau des îlots alors que les cellules gliales, visibles à partir du stade postnatal (P) 6, viennent encapsuler les îlots (Burris and Hebrok, 2007).

6.2. Innervation pancréatique, maturation des cellules β et organisation des cellules endocrines

Le système nerveux constitue aussi une source de signaux agissant directement sur le développement du pancréas. L'étude du blocage de la migration des crêtes neurales a permis d'identifier ces cellules comme étant une source de signaux participant à la prolifération et la maturation des cellules β (Nekrep et al., 2008; Plank et al., 2011). De plus, l'étude de la perte de fonction de *Phox2b*, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des cellules gliales et des neurones à partir des crêtes neurales, a démontré que les dérivés des crêtes neurales inhibent la prolifération des cellules β en agissant directement sur la régulation de l'expression de *Nkx2.2* (Nekrep et al., 2008) (Fig 27).

Récemment, grâce à l'inactivation du récepteur adrénergique TrkA dans le système nerveux sympathique (souris TH-Cre ; TrkA^{ff}), entraînant l'ablation générale du système nerveux sympathique, Borden et al. (2013) ont pu observer une désorganisation des îlots, qui ne présentent pas de couronne de cellules α entourant les cellules β , ainsi qu'une intolérance au glucose chez les souris mutantes. Ces phénotypes sont liés à des problèmes de migration des cellules endocrines lors du développement du pancréas et à de mauvaises jonctions entre les cellules endocrines, qui ne permettent pas de sécréter de manière optimale les hormones pancréatiques. Les auteurs ont identifié la noradrénaline, neurotransmetteur émis par le système nerveux sympathique, comme permettant la migration des cellules β au cours du développement (Fig 28) (Borden et al., 2013). Cette étude est la première démontrant l'implication directe d'un neurotransmetteur sur le développement du pancréas, plus particulièrement sur l'organisation des îlots.

L'ensemble de ces résultats ont permis d'identifier le système nerveux comme un agent essentiel à l'organisation du système endocrine pancréatique et la maturation des cellules β .

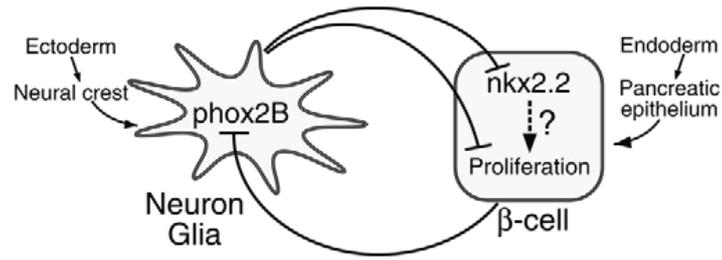


Figure 27: Régulation de la prolifération et de la maturation des cellules β par les cellules Phox2b^+ . Schéma expliquant les interactions entre les cellules neuronales Phx2b^+ et les cellules β afin de permettre une régulation de la masse de cellules β et leur maturation. D'après Nekrep et al., 2008.

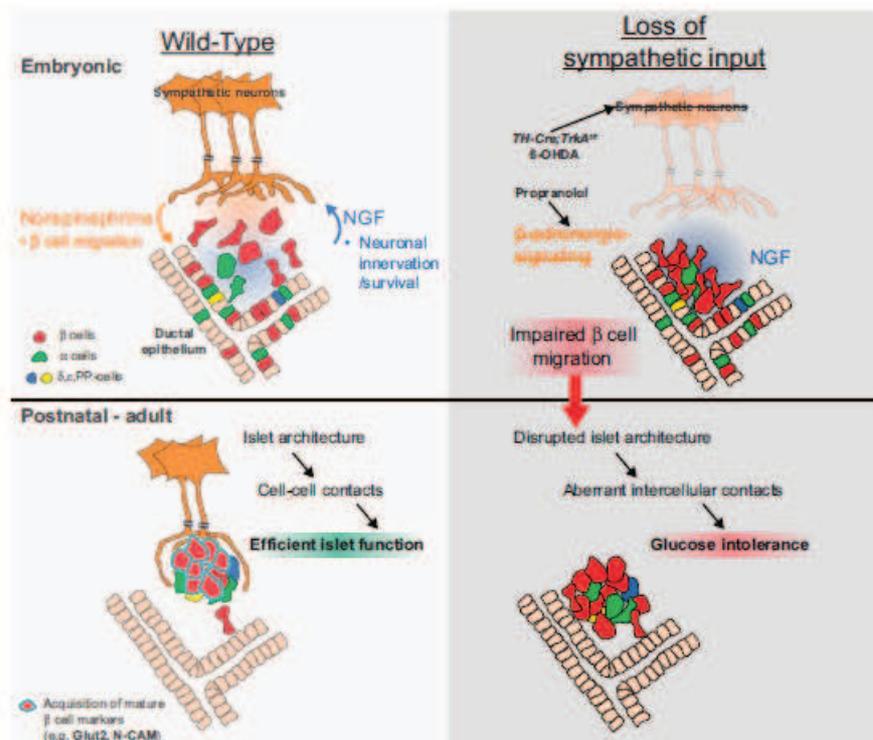


Figure 28: Régulation de l'organisation des îlots par l'innervation sympathique. Schéma présentant les interactions entre le système nerveux sympathique et les îlots en formation permettant la bonne organisation et le maintien des cellules endocrines. Au cours du développement, la noradrénaline, sécrétée par le système nerveux sympathique permet la migration des cellules endocrines et la formation d'îlots fonctionnels. D'après Borden et al., 2013.

C. La voie de signalisation du Gdnf

La famille de ligands et récepteurs du *Glial cell line Derived Neurotrophic Factor* (GDNF) est connue pour être une famille de facteurs neurotrophiques, essentiellement impliquée dans la différenciation, la migration et le maintien de neurones du système nerveux (Airaksinen and Saarma, 2002). Cependant, le ligand Gdnf ainsi que son récepteur Gfra1 et le co-récepteur Ret sont aussi connus pour leur fonction dans la formation du rein et la différenciation des spermatogonies. Après avoir présenté la voie de signalisation du Gdnf, je présenterai des exemples de pathologies humaines associées aux membres de cette famille, puis leur fonction, notamment celles, non neuronales, concernant Gdnf/ Gfra1 et Ret dans le rein et les spermatogonies. Je ferai ensuite un bilan de ce qui est connu pour cette voie de signalisation dans le pancréas.

1. Présentation de la voie de signalisation du Gdnf

1.1. Ligands et récepteurs de la famille du Gdnf

Cette famille comprend quatre ligands les *GDNF Family of Ligands* (GFLs), possédant chacun dans leur structure sept résidus cystéine caractéristiques des ligands de la famille du TGF β et fonctionne sous forme d'homodimère (Lin et al., 1993). Chaque ligand se lie de manière spécifique à un récepteur, nommé *GDNF Family of Receptors* (GFR). Ainsi, le ligand GDNF se fixe sur Gfra1, Neurturin (Nrtn) sur Gfra2, Artemin (Artn) sur Gfra3 et Persephin (Pspn) sur Gfra4 (Fig 29) (Airaksinen and Saarma, 2002). Nrtn ainsi qu'Artn (aussi connu sous le nom d'enovin (Masure et al., 1999) ou neublastin (Rosenblad et al., 2000)) sont aussi capables de se lier à Gfra1 (Baloh et al., 1998). La comparaison des séquences protéiques murines des GFLs a révélé un pourcentage d'homologie entre chaque séquence d'environ 40% (Baloh et al., 1998; Kotzbauer et al., 1996; Milbrandt et al., 1998).

Les GFRs sont liés à la membrane par une ancre *glycosyl phosphatidylinositol* (GPI) au niveau de radeaux lipidiques membranaires, qui sont des assemblages de cholestérols et de sphingolipides du côté extracellulaire de la membrane cellulaire (Simons and Toomre, 2000). Ces récepteurs possèdent au niveau de leur domaine extracellulaire, trois domaines globulaires riches en cystéines (Airaksinen and Saarma, 2002), sauf Gfra4, qui n'en possède que deux (Lindahl et al., 2000). Gfra1 et Gfra2 possède 42% d'homologie ; Gfra3 est un peu plus éloigné : il présente 33 et 36% d'homologie avec Gfra1 et Gfra2 respectivement (Worby et al., 1998). Gfra4 possède 40% d'homologie avec les autres GFRs (Lindahl et al., 2000).

Les GFRs ne possèdent pas de domaine intracellulaire. La transduction des ligands de la voie du GDNF se fait suite à l'hétérodimérisation du GFR homodimérisé, lié à son ligand, avec un autre récepteur homodimérisé nommé *Rearranged during transfection* (Ret). Cette interaction va permettre une modification de la structure tridimensionnelle de Ret, induisant une autophosphorylation de son

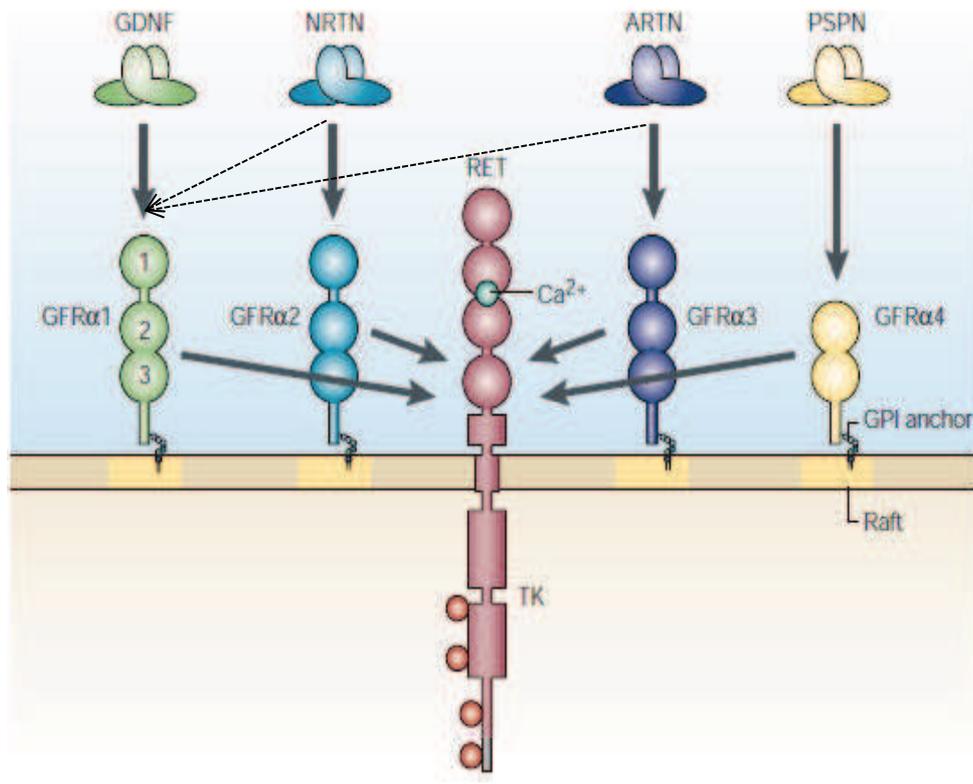


Figure 29: La voie de signalisation du Gdnf. Quatre ligands composent cette voie de signalisation : GDNF, Nrtn, Artn et Pspn. Chaque ligand vient se lier de manière spécifique à un GFR (flèches pleines), cependant Nrtn et Artn peuvent aussi se lier à Gfra1. Les GFRs sont liés à la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). L'activation des effecteurs intracellulaires permettant la transduction du signal se fait par l'hétérodimérisation des récepteurs avec le co-récepteur Ret, portant les domaines intracellulaires Tyrosine Kinase (TK). Les domaines extracellulaires globulaires (1,2,3) des GFRs représentent les domaines riches en cystéines. La liaison d'ions calciques (Ca^{2+}) à l'un des quatre domaines de type Cadherine de Ret est essentielle à son activation. Artn: Artemin; GDNF: Glial cell line derived neurotrophic factor; Nrtn: Neurturin; Pspn: Persephin; GFR: GDNF family of receptor. D'après Airaksinen & Saarma. (2002).

domaine tyrosine kinase intracellulaire (Fig 30). Suivant le résidu tyrosine phosphorylé, différentes molécules sont recrutées. Ainsi, la phosphorylation des résidus tyrosine 905, 1015 et 1096 permet le recrutement de Grb7/Grb10, de la Phospholipase C γ et Grb2 respectivement. La phosphorylation du résidu 1062 permet le recrutement de Shc ou encore Enigma (Manie et al., 2001).

Les membres de la famille du Gdnf présentent une expression essentiellement restreinte au système nerveux embryonnaire et mature (Golden et al., 1998; Hellmich et al., 1996). Cependant, Ret, ainsi que Gfra1 et Gdnf présentent aussi une expression au niveau du bourgeon rénal (Golden et al., 1998; Pachnis et al., 1993) ainsi qu'au niveau des testicules en formation et adulte (Golden et al., 1998; Naughton et al., 2006).

1.2. Modes d'activation de Ret

Différents modèles d'interactions existent pour expliquer le mode d'action des GFLs ainsi que les différentes cascades d'effecteurs intracellulaires qui peuvent être activées (Fig 31) (Airaksinen and Saarma, 2002). Dans un premier modèle, le GFL homodimérisé vient interagir avec son GFR positionné au niveau d'un radeau lipidique. Cette interaction entraîne le recrutement, au niveau du radeau lipidique de Ret (le plus souvent positionné en dehors des radeaux lipidiques), son homodimérisation, ce qui entraîne une auto-phosphorylation en *cis* des domaines tyrosine kinase intracellulaires de Ret. Ce type d'interaction entraîne l'activation de la voie des MAPKinases (Tansey et al., 2000).

Il arrive que les GFR se retrouvent sous forme soluble, suite au clivage de l'ancre GPI (Paratcha et al., 2001). Dans ce cas, le GFR homodimérisé, déjà fixé à son GFL homodimérisé lui aussi, vient recruter Ret au niveau des radeaux lipidiques et entraîne la phosphorylation des domaines tyrosine kinases intracellulaires de Ret en *trans*. Dans ce cas, la voie de signalisation Akt est préférentiellement activée (Paratcha et al., 2001). L'activation en *trans* de Ret est aussi possible suite à l'interaction de Ret avec un GFR complexé avec son GFL sur une cellule adjacente (Paratcha et al., 2001).

1.3. Maturation des GFL

Les GFL sont des molécules sécrétées qui subissent des modifications post-traductionnelles afin d'acquérir leur conformation active. L'analyse de la séquence protéique des GFL a permis d'identifier deux sites de clivages par la protéase Furin, conservés entre les séquences murines et humaines (Baloh et al., 1998; Kotzbauer et al., 1996; Rosenblad et al., 2000). Ainsi, les GFL seraient synthétisés sous forme de prépropeptides d'environ 20kDa (Lin et al., 1993), clivés en propeptides puis à nouveau clivés pour devenir un peptide de forme active d'environ 10kDa (Lin et al., 1993), capables de s'homodimériser (Fig 32). Cependant, les mécanismes d'activation et de sécrétion des GFL ne sont

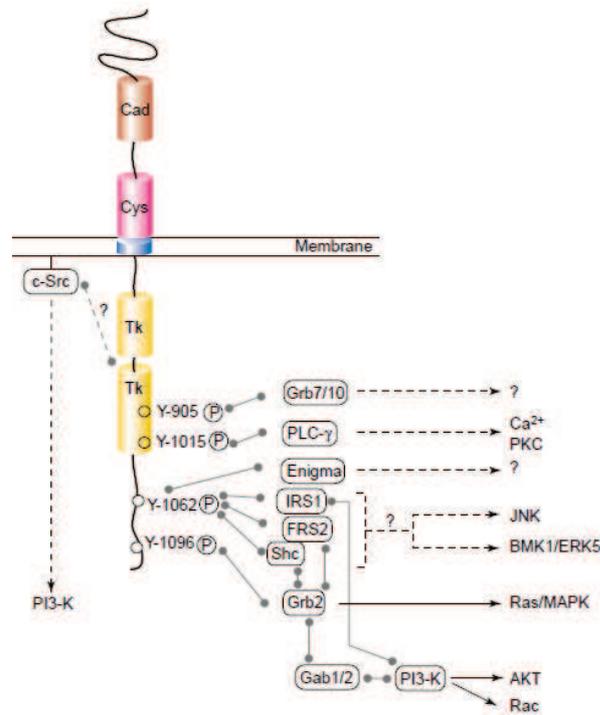


Figure 30: Structure du co-récepteur Ret et voies de signalisation. Le domaine extracellulaire de Ret comprend un domaine Cadhérine (brun) et un domaine riche en résidus cystéines (rose). Le domaine transmembranire de Ret est représenté en bleu. Les domaines tyrosine kinase (jaune) intracellulaire comprennent différents résidus tyrosine, qui une fois phosphorylés (Y-(P)) interagissent avec différents adaptateurs intracellulaires. Les lignes grises pleines indiquent les interactions directes. Le mécanisme d'activation de Src par Ret n'est pas clairement identifié. Cad: domaine cadhérine; Cys: domaine riche en cystéines; Tk: domaine tyrosine kinase; FRS2: fibroblast growth factor receptor substrate 2; Gab1/2: Grb2-associated binding protein1/2; Grb: growth factor receptor-bound protein IRS1: insulin receptor 1 ; PLC: phospholipase C; Shc: Src homologous and collagen-like protein. D'après Manie et al., 2001.

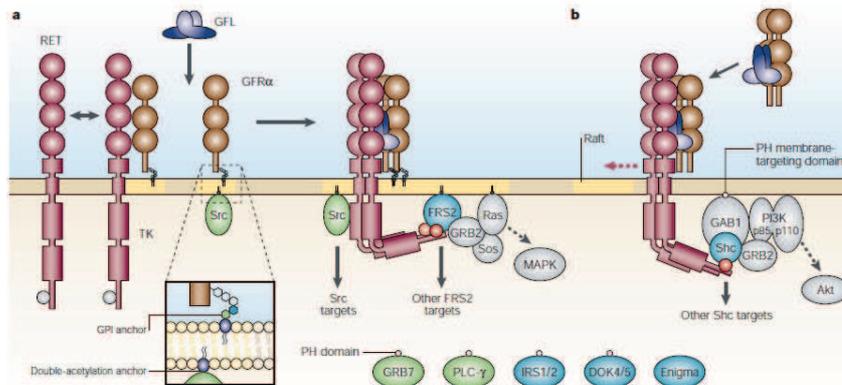


Figure 31: Schéma représentant les différents mode d'interaction des complexes GFLs-GFRs- avec Ret. Le schéma présente les différentes molécules intracellulaires (bleu) pouvant interagir avec Ret et activer les différentes voies de signalisation intracellulaires (gris) lorsque (A) Ret est activé en cis. Dans ce modèle d'interaction, le GFL homodimérisé vient se complexer avec son GFR fixé au niveau d'un radeau lipidique (jaune). Cette interaction permet le recrutement au niveau du radeau lipidique de Ret. (B) L'activation de Ret en trans en dehors d'un radeau lipidique par un complexe GFL-GFR soluble (ou fixé à une membrane adjacente), entraîne le recrutement d'adaptateurs solubles tels que Shc. Si Ret se trouve au niveau d'un radeau lipidique lors de son activation par un complexe GFL-GFR soluble (flèche), le recrutement d'adaptateurs liés à la membrane tels que FRS2 et Src (vert) a lieu. D'autres adaptateurs intracellulaires peuvent se lier au même résidu Tyrosine 1062 phosphorylé (point rouge), tels que DOK4/5, IRS1/2 ou Enigma. Shc: Src homologous and collagen-like protein; FRS2: fibroblast growth factor receptor substrate 2; DOK4/5: downstream of tyrosine kinase 4/5; IRS1/2: insulin receptor 1/2; GAB1: Grb2-associated binding protein1; GRB: growth factor receptor-bound protein; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; PH: plexin homology; PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase; PLC: phospholipase C. D'après Airaksinen & Saarma. 2002.

pas totalement connus et plusieurs études rapportent que les formes prépropeptides ou propeptides seraient aussi actives (Jankowski et al., 2010; Lee et al., 2001; Lucini et al., 2004).

2. Pathologies humaines associées à la voie de signalisation de la famille du Gdnf

2.1. Cancérologie

Les membres de la voie de signalisation du Gdnf ont été associés à de nombreux types de cancer. Tout d'abord, Ret, a été identifié comme étant un proto-oncogène suite à la transfection de cellules NIH3T3 avec de l'ADN provenant d'un lymphome humain (Takahashi et al., 1985). Différents types de mutations ont été identifiées au sein du gène Ret, entraînant soit l'hyperactivité de Ret, soit la perte de son activité ou encore la fusion de son domaine tyrosine kinase intracellulaire à la séquence N-terminale de différentes protéines. Ainsi, des mutations de type perte de fonctions ont été identifiées dans le cas de cancers médullaires de la thyroïde, tandis que des mutations de type gain de fonction ont été observées dans le cas de cancer du sein, ainsi que dans le cas de cancer du pancréas et de la prostate (Plaza-Menacho et al., 2014). Enfin, des mutations entraînant la fusion du domaine tyrosine kinase de Ret ont été identifiées dans le cas de cancers papillaires de la thyroïde et de cancers du poumon non à petites cellules (Plaza-Menacho et al., 2014).

En plus de Ret, les autres membres de la voie de signalisation du Gdnf ont été caractérisés dans des cas de cancers ou pour leur action dans la migration de cellules tumorales *in vitro*. Par exemple, l'expression de *Gfra1*, *Gfra3*, *Syndecan-3* et *Artn* augmente dans le cas de carcinome mammaire et son expression forcée dans des cellules de carcinome mammaire entraîne une augmentation du pouvoir invasif de ces cellules (Kang et al., 2009; Wu et al., 2013). *In vivo*, Artn, ainsi exprimé par les cellules de carcinome permettrait la migration de cellules endothéliales et ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau du carcinome (Banerjee et al., 2010).

Dans le cas de cancers pancréatiques, l'expression de *Nrtn* et de *Gfra2* augmente au niveau des cellules neuronales, endocrines et de la matrice extracellulaire (Wang et al., 2013). Ce couple a pu être incriminé dans la douleur ressentie dans le cas de cancer du pancréas (Wang et al., 2013). *In vitro*, Artn promeut la prolifération ainsi que le caractère migratoire de cellules pancréatiques cancérogènes (Meng et al., 2013) et *in vivo*, l'expression d'*Artn* augmente dans des tissus pancréatiques cancérogènes. Il serait un acteur de la neuropathie observée dans le cas de cancers du pancréas (Ceyhan et al., 2010).

Ainsi, cette famille de ligands et récepteurs de la voie du Gdnf apparaît comme des acteurs majeurs dans les processus de cancérisation.

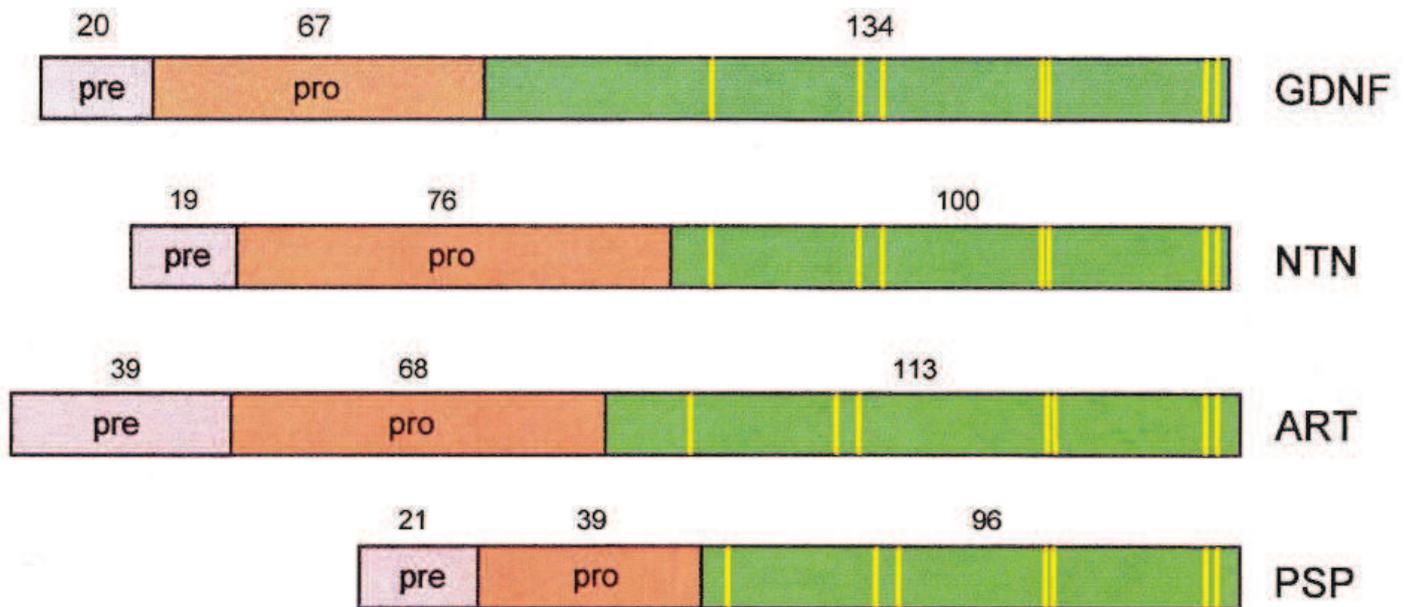


Figure 32: Schéma représentant la structure protéique des GFL. La longueur relative ainsi que le nombre d'acide aminés pour chaque domaine sont indiqués, ainsi que la position des sept résidus cystéines (barre jaune). Chaque ligand est synthétisé sous forme d'un précurseur. Les domaines pré (rose) et pro (rouge) des précurseurs sont clivés afin de ne garder que le domaine correspondant à la forme mature (vert) du ligand. D'après Airaksinen et al., 1999.

2.2. Maladie de Hirschsprung

La maladie de Hirschsprung est une maladie congénitale, caractérisée par l'absence de ganglions au niveau des plexi myentérique et submucosal intestinaux des patients. Cette pathologie entraîne une occlusion intestinale et touche environ 1 nouveau-né sur 5000, le plus souvent des garçons (ratio 4/1) (Ishii et al., 2012). Des mutations ponctuelles de type faux-sens, non-sens ou encore des délétions génomiques au niveau du locus du gène Ret, menant à la perte de Ret ou de son activité, ont été mises en évidence dans 15 à 20% des cas sporadiques de maladie de Hirschsprung et 50% des cas familiaux (Margraf et al., 2009; Serra et al., 2009). Une étude récente démontre que la sévérité de la maladie de Hirschsprung dépend du type, ainsi que du nombre, de mutations du gène Ret (Ishii et al., 2012). Ret apparait ainsi comme un facteur de prédisposition à la maladie de Hirschsprung.

2.3. NEM2A

La néoplasie endocrinienne multiple de type 2A (NEM2A) ou syndrome de Sipple est une maladie héréditaire, touchant une personne sur 30 000 et caractérisée par un cancer médullaire de la thyroïde, un phéochromocytome (tumeur des glandes surrénales) dans 20 à 50% des cas et une hyperparathyroïdie primaire dans 5 à 20% des cas (P. Niccoli-Sire, 2007). A l'instar de la maladie de Hirschsprung qui est caractérisée par la perte de fonction de Ret, la NEM2A résulte d'une hyperactivité de Ret (Margraf et al., 2009). De nombreuses mutations au sein du gène Ret ont été identifiées, essentiellement de type faux-sens et touchant particulièrement les exons 10, 11, 13 à 16 (Margraf et al., 2009).

3. Fonctions des GFRs et GFLs

3.1. Phénotypes liés aux mutations perte de fonction des GRLs et GFRs

C'est l'analyse des mutations perte de fonction chez la souris qui a permis de révéler les rôles de ces différents ligands et récepteurs (résumé dans le tableau 3). Les mutants pour les ligands présentent généralement des phénotypes similaires aux mutants pour leur récepteur. Ainsi, les souris déficientes pour Ret meurent quelques jours après la naissance et présentent une agénésie du rein, du système urinaire, ainsi qu'une absence d'innervation entérique (Schuchardt et al., 1994). De manière similaire, les souris perte de fonction pour Gfr α 1 (Cacalano et al., 1998; Enomoto et al., 1998) ou Gdnf (Pichel et al., 1996; Sanchez et al., 1996) meurent aussi quelques jours après la naissance par agénésie du rein, du système urinaire et absence d'innervation entérique.

Les souris perte de fonction pour Nrtn présentent un pseudo-ptosis, lié à une diminution de l'innervation de la glande lacrymale et une endophtalmie. Ces souris présentent aussi une diminution de l'innervation cholinergique des glandes salivaires et une mauvaise motilité au niveau de l'intestin

Tableau 3: Résumé des phénotypes des mutants pour les membres de la famille du Gdnf.

Gène déléte	phénotypes	Références
Ret	Non viable; absence de rein; défauts d'innervation	Schuchardt et al., 1994
Gfra1	Non viable; absence de rein; défauts d'innervation	Cacalano et al., 1998 Enomoto et al., 1998
Gfra2	Fertile ; pseudo-ptosis; Défauts de migration parasymphatique et entérique; Retard de croissance	Rossi et al. 2003 Rossi et al. 2005 Lahteenmaki et al., 2007
Gfra3	Viable; fertile; ptosis avec défaut de migration et de projection axonale des neurones de la chaîne sympathique	Nishino et al. 1999 Honma et al. 2002
Gfra4	Pas de phénotype particulier	Lindfors et al., 2006
Gdnf	Non viable; absence de rein; défauts d'innervation; Dégénérescence testiculaire	Pichel et al., 1996 Sanchez et al., 1996
Nrtn	Fertile ; pseudo-ptosis; Défauts de migration parasymphatique et entérique	Heuckeroth et al. 1999
Artn	Viable; fertile; ptosis avec défaut de migration et de projection axonale des neurones de la chaîne sympathique	Honma et al. 2002
Pspn	Pas de phénotype particulier	Tomac et al., 2002

(Heuckeroth et al., 1999). Les souris déficientes pour *Gfra2* présentent un phénotype similaire aux souris *Nrtn*^{-/-} (Rossi et al., 1999), auquel vient s'ajouter un retard de croissance (Rossi et al., 2003). La diminution de l'innervation cholinergique pancréatique observée chez les souris *Gfra2*^{-/-} (Rossi et al., 2005) est due à l'augmentation de la mort cellulaire programmée de ces neurones parasympathiques à partir de E16.5 et au stade P0 (Lahteenmaki et al., 2007).

Les souris *Gfra3*^{-/-}, *Artn*^{LacZ/LacZ} et *Gfra3*^{tLacZ/tLacZ} sont viables, fertiles et présentent un ptosis uni ou bilatéral. Ce phénotype est lié à une mauvaise innervation sympathique de la paupière par les neurones sympathiques du Ganglion Cervical Supérieur (SCG) (Fig 33). L'analyse des souris *Gfra3*^{-/-} et *Gfra3*^{tLacZ/tLacZ} a révélé que le SCG de ces souris était plus petit, mal positionné voire absent (Honma et al., 2002; Nishino et al., 1999). De plus, les auteurs ont constaté une dégénérescence des neurones sympathiques à proximité du SCG, démontrant que *Gfra3* est nécessaire à la survie des neurones sympathiques chez la souris adulte. L'analyse des embryons *Gfra3*^{-/-} a permis de démontrer que *Gfra3* est nécessaire pour la migration du SCG (Nishino et al. 1999). De plus, les souris *Gfra3*^{tLacZ/tLacZ} et *Artn*^{LacZ/LacZ} possèdent des défauts de projection axonale des neurones issus du SCG ainsi que des problèmes de migration des ganglions dorso-rachidiens (DRG) et de leur projection axonale (Honma et al., 2002).

Enfin, les souris délétées de *Pspn* ou *Gfra4* sont viables, fertiles et ne présentent pas de malformations, de dystrophie, ni de troubles de l'innervation particuliers (Lindfors et al., 2006; Tomac et al., 2002). Les souris mutantes pour *Pspn* présentent une tendance plus importante à développer un infarctus cérébral ischémique (Tomac et al., 2002), tandis que les souris perte de fonction pour *Gfra4* présentent une diminution de la production de la calcitonine par la thyroïde (Lindfors et al., 2006).

3.2. Action neurotrophique des GFLs

Les GFLs ont été identifiés comme étant des facteurs neurotrophiques, agissant sur différents types de neurones du système nerveux. Ainsi, *Gdnf* et *Nrtn* partagent des propriétés similaires pour le maintien de neurones sympathiques (Kotzbauer et al., 1996), des neurones des ganglions dorso-rachidiens et sensitifs (Buj-Bello et al., 1995; Molliver et al., 1997), de neurones dopaminergiques (Horger et al., 1998; Lin et al., 1993) et du système nerveux entérique (Hearn et al., 1998; Heuckeroth et al., 1998). *Gdnf* a aussi été identifié comme étant un facteur mésenchymateux au niveau du système entérique en développement, permettant l'attraction des cellules des crêtes neurales, participant ainsi à la mise en place du système nerveux entérique (Young et al., 2001).

Des cultures de neurones sympathiques ont permis de révéler qu'*Artn* permet aussi le maintien des neurones des ganglions dorso-rachidiens, du ganglion trigéminal, du SCG et de neurones dopaminergiques (Baloh et al., 1998). L'implantation de billes imprégnées de ligand *Artn* à proximité

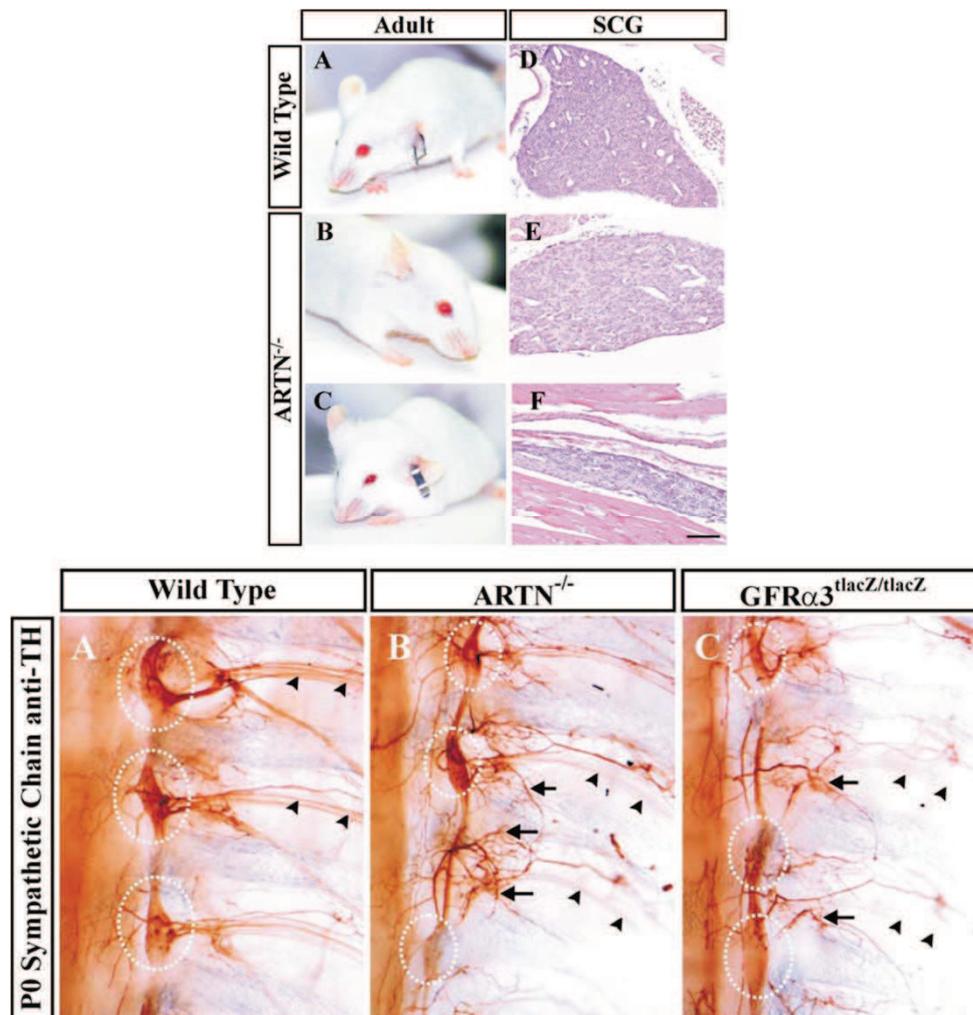


Figure 33: Les souris mutantes pour *Artn* ou *Gfra3* présentent des défauts d'innervation sympathique. Panneau du haut : les souris déficientes pour *Artn* présentent un ptosis (comparer A et B avec C) et un Ganglion Cervical Supérieur (SCG) réduit du côté de l'œil affecté (photos D à F). Panneau du bas : les souris mutantes pour *Artn* ou *Gfra3* présentent des problèmes de migration des ganglions de la chaîne sympathique (cercles pointillés blancs) et de projections axonales (flèches). D'après Honma et al. 2002.

de la chaîne latérale sympathique d'embryons E11.5 sauvages et $Artn^{LacZ/LacZ}$ a permis de démontrer l'effet chemoattractant de ce ligand exprimé par le système vasculaire sur l'innervation sympathique (Honma et al., 2002), en restaurant les projections axonales sympathiques qui n'ont pas lieu, normalement, chez les embryons $Artn^{LacZ/LacZ}$. *In vitro*, grâce à un système de culture cellulaire de cellules neuronales sympathiques, cet effet chemoattractif d' $Artn$, a été confirmé, identifiant $Artn$ comme étant un facteur vasculaire permettant l'innervation sympathique des cellules endothéliales (Damon et al., 2007).

Enfin, il semble que $Pspn$ permette la survie, *in vitro*, de neurones moteurs, dopaminergiques, (Milbrandt et al., 1998).

3.3. Gdnf/Gfra1/Ret et la migration du bourgeon rénal

Le rein se développe à partir du mésoderme, sous la forme d'un bourgeon urétérique qui va croître, et se ramifier au sein du mésenchyme environnant (Fig 34). Le développement du rein se fait en 3 parties successives, avec des structures intermédiaires transitoires. On distingue ainsi le pronephros, première structure éphémère qui va permettre de mettre en place le canal collecteur, du mésonéphros, qui est déjà un rein transitoire, du métanéphros, qui correspond au rein définitif (Dressler, 2006). L'épithélium rénal en développement se distingue par deux zones, les « tips » and « trunks » (Dressler, 2006), définis par l'expression spécifique de gènes et Ret est exprimé vers E11.5 le long du canal rénal en formation (Pachnis et al., 1993) puis son expression se restreint aux cellules « tips » de l'épithélium rénal nouvellement formées (Pachnis et al., 1993; Shakya et al., 2005). GDNF est exprimé au niveau du mésenchyme rénal (Shakya et al., 2005) et $Gfra1$ est exprimé à la fois par l'épithélium rénal et le mésenchyme rénal (Keefe Davis et al., 2014). Au cours du développement du rein, la voie de signalisation $Gdnf/Ret/Gfra1$ permet de guider l'invasion du mésenchyme par l'épithélium rénal et permet aussi la prolifération des cellules du bourgeon rénal à travers le mésenchyme (Dressler, 2006).

3.4. Gdnf et la différenciation des spermatogonies

La spermatogenèse a lieu au niveau des tubes séminifères, à proximité des cellules de Sertoli à partir des spermatogonies de type A. Ces cellules sont immobiles, fixées au niveau de la lame basale du tube séminifère et correspondent aux cellules souches. Après un cycle de mitose, l'une des spermatogonies filles restera en type A tandis que l'autre va s'engager dans le processus de différenciation et de maturation en devenant une spermatogonie de type B qui va s'amplifier par mitose, subir un cycle de méiose pour donner des spermatocytes, puis acquérir, au stade spermatides, les fonctions du spermatozoïde. Jusqu'à présent, toutes les entités étaient rattachées entre elles par un pont cytoplasmique et se rapprochaient de la lumière, au fur et à mesure de leur différenciation. La

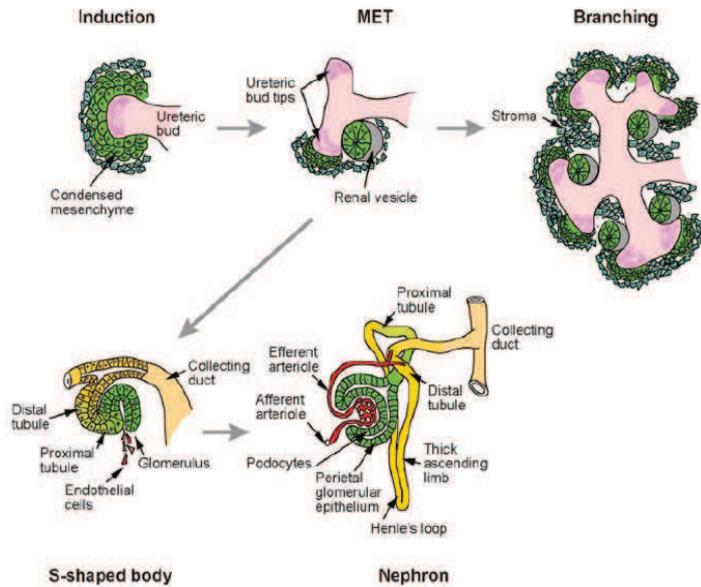


Figure 34: Développement du rein. Schéma du développement du rein. Le bourgeon rénal prolifère et envahit le mésenchyme. En parallèle, les vésicules rénales se forment et se déposent. D'après Dressler (2006).

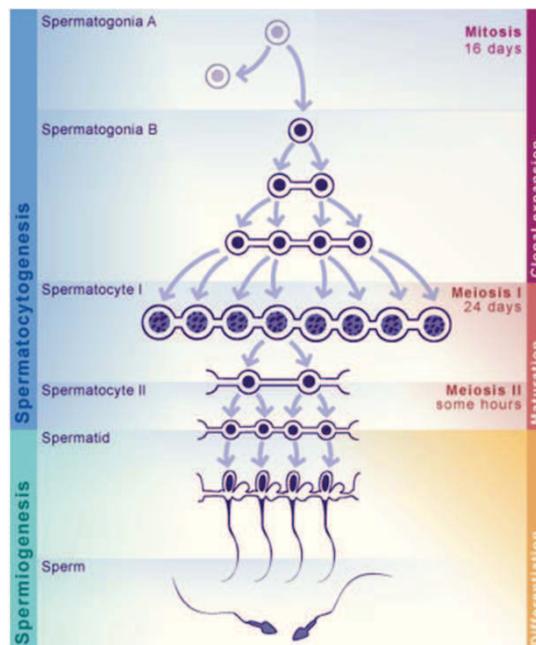


Figure 35: La différenciation des spermatogonies. La formation des spermatozoides se fait en différentes étapes. Les spermatogonies de type A correspondent aux cellules souches. Lors d'une division asymétrique d'une spermatogonie de type A, l'une des deux cellules filles va s'engager dans la voie de différenciation. Elle devient alors une spermatogonie de type B, qui va se diviser tout en maintenant un pont cytoplasmique entre les cellules filles. Après un cycle de méiose, correspondant au stade spermatocyte, les cellules entrent dans la phase de spermiogénèse, avec la formation de précurseurs des spermatozoides, les spermatides, qui vont se différencier en spermatozoides. Source : Embryology.

dernière étape correspond à la maturation et l'individualisation des spermatides en spermatozoïdes adultes excrétés dans la lumière du tube séminifère (Mark et al., 2014) (Fig 35).

Gdnf est exprimé par les cellules de Sertoli, tandis que son récepteur Gfra1 et Ret sont exprimés au niveau des spermatogonies (Naughton et al., 2006; Viglietto et al., 2000). Dans ce système, la voie de signalisation du Gdnf inhibe la différenciation des spermatogonies et permet de maintenir le pool de cellules souches spermatogoniales (Meng et al., 2000).

3.5. Voie de signalisation du Gdnf et pancréas

Nous avons vu que la voie de signalisation du Gdnf présente de multiples rôles et agit dans de nombreux systèmes : facteur neurotrophique au niveau du système nerveux, migration des cellules du bourgeon rénal et des cellules des crêtes neurales ou encore, inhibiteur de la différenciation cellulaire dans le cas de la spermatogenèse.

Récemment, quelques études ont permis d'élucider la fonction de Gdnf au cours du développement du pancréas. Grâce à une souris transgénique surexprimant *Gdnf* dans les cellules gliales (souris GFAP-Gdnf), Mwangi et al. ont observé que cette surexpression entraînait une augmentation de la masse de cellules β et une insulino-sécrétion induite par le glucose plus importante que leurs contrôles sauvages (Mwangi et al., 2008). Au cours du développement du pancréas, ces souris transgéniques présentent une augmentation du nombre de cellules Pdx1⁺, Ngn3⁺, ainsi qu'une plus forte prolifération des cellules insuline⁺ et une augmentation de la masse de cellules β (Mwangi et al., 2010). Ces résultats suggèrent que Gdnf agirait directement sur la prolifération des cellules β , illustrant ainsi le rôle clé du système nerveux dans l'homéostasie β cellulaire. Cependant, au cours de ces études, aucune information n'est donnée sur le patron d'expression de Gdnf dans le pancréas en développement ou adulte, ni sur l'impact potentiel de cette surexpression sur les autres types de cellules insulaires, le tissu acinaire ou encore l'innervation et la vascularisation du pancréas. Ces études sont limitées par le caractère transgénique de leur modèle ne reflétant pas forcément l'action *in vivo* de Gdnf.

Ce sont les travaux de Muñoz-Bravo et al. qui vont nous éclairer sur l'expression pancréatique de Gdnf. Grâce à la souris Gdnf^{fl/LacZ} (Sanchez et al., 1996), l'expression de Gdnf a pu être détectée de manière transitoire au niveau de l'épithélium pancréatique, essentiellement au niveau des progéniteurs endocrines et canaux, au cours du développement du pancréas (Munoz-Bravo et al., 2013). De plus, grâce à l'utilisation des souris Pdx1-Cre ; Gdnf^{fl/f} ou Gdnf^{LacZ/LacZ}, les auteurs ont pu démontrer que Gdnf, sécrété par l'épithélium pancréatique, est essentiel à l'innervation endocrine parasymphatique et à la mise en place des cellules gliales, en promouvant la migration ainsi que la différenciation des progéniteurs neuronaux. Les auteurs n'ont pas observé d'impact de la perte de Gdnf sur la différenciation des cellules endocrines, mais observent une augmentation de la prolifération des progéniteurs Pdx1 dans des explants sauvages cultivés en présence de ligand GDNF. Cette étude

démontre le rôle essentiel du ligand Gdnf dans la mise en place de l'innervation parasymphathique pancréatique.

L'expression du récepteur Gfr α 2 a aussi été caractérisé dans le pancréas. Ce récepteur est exprimé par les cellules gliales pancréatiques ainsi que par les neurones du système nerveux parasymphathique (Rossi et al., 2003; Rossi et al., 2005). La perte de fonction de Gfr α 2 entraîne une diminution de l'innervation parasymphathique, et en conséquence une perte de la stimulation vagale des hormones pancréatiques, sans entraîner néanmoins de troubles de la tolérance glucidique (Rossi et al., 2003; Rossi et al., 2005). Des analyses aux stades E16.5, E17.5 et P0 chez des souris Gfr α 2^{-/-} ont permis de découvrir que les neurones parasymphathiques pancréatiques meurent par mort cellulaire programmée à ces stades (Lahteenmaki et al., 2007), démontrant le rôle essentiel de Gfr α 2 pour le maintien de l'innervation parasymphathique pancréatique.

Les données publiées pour Gdnf et Gfr α 2 dans le pancréas ont démontré un rôle essentiel dans la formation du système nerveux parasymphathique pancréatique. Ces deux peptides présentent chacun un patron d'expression bien particulier et nous démontrerons que Gfr α 3 présente à son tour un patron d'expression totalement différent de celui rapporté pour Gdnf et Gfr α 2.

Résultats et discussions

II. Résultats et discussions

A. Projet de thèse

1. Contexte

La différenciation des types cellulaires pancréatiques à partir des progéniteurs multipotents $Pdx1^+$ est un processus très finement régulé par une cascade de facteurs de transcription ainsi que par des signaux provenant de l'environnement proche du pancréas. Ainsi, le facteur de transcription de type bHLH Ngn3 apparaît comme le facteur clé permettant la détermination des progéniteurs unipotents endocrines, à l'origine des cellules endocrines pancréatiques (Desgraz and Herrera, 2009; Gradwohl et al., 2000; Gu et al., 2002). En aval de Ngn3, l'activité de facteurs de transcription tels que NeuroD (Naya et al., 1997; Naya et al., 1995), Pax6 (Sander et al., 1997; St-Onge et al., 1997), Pax4 (Sosa-Pineda et al., 1997; Wang et al., 2004) ou encore Arx (Collombat et al., 2003) participent à la différenciation des différents types cellulaires endocrines. Le développement du pancréas fait intervenir différentes voies de signalisation, telles que la voie de l'acide rétinolique (Martin et al., 2005; Molotkov et al., 2005), des FGFs (Bhushan et al., 2001) ou la voie Notch (Apelqvist et al., 1999). Leurs rôles dans la spécification de l'endoderme pancréatique et la différenciation des grands types cellulaires pancréatiques (endocrines, acinaires et canalaire) ont été déterminés, mais peu de choses sont connues concernant l'implication de signaux extracellulaires dans la spécification des sous types endocrines pancréatiques.

Afin d'identifier de nouvelles voies de signalisation impliquées dans la mise en place du lignage endocrine, le laboratoire a recherché par bioinformatique des récepteurs dont l'expression est spécifique des progéniteurs endocrines à E15.5 (tableau 4). L'identification de récepteurs spécifiques aux progéniteurs endocrines ouvre de nouvelles perspectives quant à la caractérisation des sous types endocrines en cours de différenciation et pourrait permettre d'élaborer de nouveaux protocoles visant à purifier les progéniteurs endocrines par FACS pour les mettre en culture et diriger leur différenciation en cellules sécrétrices d'insuline. Quelques études rapportent ainsi l'identification de protéines membranaires, telles que Ddr1 (**D**iscoidin **d**omain **r**eceptor tyrosine kinase 1), Dner (**D**elta/**N**otch-like **E**GF **r**epeat containing), Prominin-1 ou encore $\alpha 6$ -intégrine (Hald et al., 2012; Sugiyama et al., 2007), dont les perspectives pourraient s'appliquer à la purification de progéniteurs endocrines par cytométrie en flux. Afin d'identifier de nouveaux récepteurs spécifiques au lignage endocrine, des puces Affymetrix (Soyer et al., 2010) ont été réalisées au sein du laboratoire à partir de cellules pancréatiques E15.5 provenant de souris Ngn3-eYFP (Mellitzer et al., 2004). Cette analyse a révélé que l'expression du récepteur membranaire GFR α 3 (Glial cell line derived neurotrophic factor Family Receptor α 3) est enrichie dans les progéniteurs $Ngn3^+$ (FC33,12 ; FDR 0,025) (tableau 4).

Tableau 4: Recherche de récepteurs membranaires par Gene Ontology Molecular function sur les extraits pancréatiques E15.5 Ngn3+ (YFP+) et Ngn3- (YFP-).

affylD	Gene Symbol	Gene Title	FC	fdr	average YFP+	average YFP-
1418304_at	Pcdh21	protocadherin 21	177,41	0,01058182	1470,672	8,289
1457066_at	Abcc8	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	115,55	1,27E-06	779,377	6,745
1423983_at	Sez6l2	seizure related 6 homolog like 2	101,53	0,01123431	520,167	5,123
1434641_x_at	Sez6l2	seizure related 6 homolog like 2	67,52	0,01132146	584,189	8,652
1435968_at	Ptpn2	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	60,31	0,01186159	5698,56	94,495
1455765_a_at	Abcc8	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	58,59	0,01166944	6622,152	113,017
1418176_at	Vdr	vitamin D receptor	51,53	0,01188242	441,577	8,569
1433536_at	Lrp11	low density lipoprotein receptor-related protein 11	49,81	0,01110982	1967,934	39,512
1433652_at	Igsf1	immunoglobulin superfamily, member 1	47,33	0,01167423	277,662	5,867
1459726_at	Ptpn2	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	44,64	0,03655138	211,04	4,728
1439489_at	Gpr120	G protein-coupled receptor 120	40,15	0,01167153	536,091	13,351
1449245_at	Grin2c	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2C (epsilon 3)	36,37	0,01187525	193,985	5,334
1441429_at	Irs4	insulin receptor substrate 4	33,91	0,03061036	560,23	16,52
1418880_at	Gfra3	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 3	33,25	0,02538119	429,784	12,926
1442347_at	Lrp8	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein	22,87	0,02061813	242,98	10,622
1418175_at	Vdr	vitamin D receptor	20,72	0,01262957	138,675	6,694
1425067_at	Celsr3	cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	19,46	0,02598911	166,956	8,579
1433600_at	Adra2a	adrenergic receptor, alpha 2a	19	0,02078347	1080,871	56,893
1416588_at	Ptpn /// LOC669	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N /// similar to Rec	16,84	0,03183048	131,58	7,814
1417408_at	F3	coagulation factor III	16,44	0,01252375	302,592	18,41
1440882_at	Lrp8	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein	15,26	0,03026401	206,867	13,557
1456379_x_at	Dner	delta/notch-like EGF-related receptor	14,26	0,03596158	297,376	20,856
1450127_a_at	Gcgr	glucagon receptor	14,21	0,01746762	107,149	7,541
1438654_x_at	Mmd2	monocyte to macrophage differentiation-associated 2	14,02	0,0183352	924,801	65,986
1441603_at	Sstr3	somatostatin receptor 3	12,01	0,03802402	237,571	19,775
1424613_at	Gprc5b	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	11,18	0,01303463	205,537	18,391
1423671_at	Dner	delta/notch-like EGF-related receptor	10,9	0,01216309	353,758	32,46
1443225_at	Acvr1c	activin A receptor, type IC	9,89	0,01309451	108,267	10,946
1424534_at	Mmd2	monocyte to macrophage differentiation-associated 2	9,74	0,0125501	80,37	8,254
1429269_at	BC068157	cDNA sequence BC068157	9,46	0,0411331	187,854	19,848
1419820_at	Pkhd1	polycystic kidney and hepatic disease 1	8,82	0,04082998	131,524	14,911
1451407_at	Jam4	junction adhesion molecule 4	8,2	0,03998779	613,799	74,819
1451411_at	Gprc5b	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	6,93	0,04879318	136,367	19,672
1417279_at	Itpr1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1	6,79	0,0477818	155,485	22,903
1428370_at	1500011B03Rik	RIKEN cDNA 1500011B03 gene	6,72	0,01722888	388,634	57,851
1433485_x_at	Gpr56	G protein-coupled receptor 56	6,68	0,0440474	280,821	42,017
1422256_at	Sstr2	somatostatin receptor 2	6,48	0,01340167	46,597	7,194
1421970_a_at	Gria2	glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2)	6,19	0,04605013	55,947	9,041
1448380_at	Lgals3bp	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	6,13	0,04761928	192,843	31,454
1421456_at	P2ry1	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 1	6,06	0,03502239	33,843	5,588
1423276_at	Ildr1	immunoglobulin-like domain containing receptor 1	6,06	0,01420542	68,557	11,306
1436428_at	Chrb2	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal)	5,79	0,04395195	204,674	35,35
1422012_at	Crhr2	corticotropin releasing hormone receptor 2	5,73	0,0442904	86,374	15,064
1435254_at	Plxnb1	plexin B1	4,88	0,04885532	367,143	75,226
1425314_at	Gpr98	G protein-coupled receptor 98	3,98	0,037062	33,88	8,515

2. Objectifs

Les objectifs de ma thèse étaient tout d'abord de i) caractériser l'expression de Gfr α 3 et de son ligand Artn au cours du développement du pancréas ainsi que dans le pancréas adulte et ii) d'identifier la fonction de cette voie de signalisation dans le pancréas embryonnaire et adulte en utilisant des techniques de perte et de gain de fonction.

Je présenterai dans un premier temps une partie des résultats sous la forme d'un article, que nous sommes en train de préparer puis les résultats supplémentaires qui ne sont pas intégrés dans le papier.

B. Papier en préparation

GDNF family receptor-alpha3 (Gfr α 3) is expressed in developing endocrine cells and neurons in the pancreas but is dispensable for islet cell differentiation and innervation

Laure Nivlet¹, Joel Herrmann^{†1}, Delia Esteban Martin^{†1}, Aline Meunier¹ and Gérard Gradwohl^{1*}

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U964, Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) UMR 7104; Université de Strasbourg (UdS), 67404 Illkirch, France.

* Corresponding author: Gérard Gradwohl, 1 Rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France, Phone: 0033 3 88 65 33 12, Fax: 0033 3 88 65 32 01, email: gradwohl@igbmc.fr.

[†] these authors contributed equally to this work

Running title: GDNF family receptor-alpha3 (Gfr α 3) is expressed in developing endocrine cells and neurons in the pancreas but is dispensable for islet cell differentiation and function

Word count: Abstract: 266 words – Main text: 6085 words

Tables:1; Figures: 13

Suggested category: Islet studies

ABSTRACT

Aim/hypothesis: The generation of therapeutic β -cell from human embryonic stem cells relies on the identification of growth factors that faithfully mimic pancreatic β -cell development *in vitro*. In this context, the aim of the study was to determine the expression and function of a novel endocrine progenitor surface marker, the *Glial cell line derived neurotrophic factor receptor α 3* (*Gfra3*) and its ligand Artemin in islet cell development and function.

Methods: RT-PCR, In situ hybridization and immunohistochemistry were used to characterize the expression of *Gfra3* and *Artn* mRNAs and proteins as well as of other members of the GDNF receptor and ligand family. We used *Gfra3*-deficient mice to study *Gfra3* function and generated a transgenic mice overexpressing *Artn* in the embryonic pancreas to study *Artn* function.

Results: We found that *Gfra3* is expressed at the surface of a subset of *Ngn3*-positive endocrine progenitors as well as of embryonic α - and β -cells, while *Artn* is found in the pancreatic mesenchyme. Adult β -cell lack *Gfra3*, but rare α cell express the receptor. *Gfra3* is also found in parasympathetic and sympathetic intra islets neurons as well as in glial cell in the embryonic and adult pancreas. The loss of *Gfra3* or overexpression of *Artn* has no impact on *Ngn3*-and islet cell formation and maintenance in the embryo. Islet organisation and innervation as well as glucose homeostasis is normal in *Gfra3*-deficient mice.

Conclusion/interpretation

Our data show that *Gfra3* is dispensable for islet cell differentiation and innervation suggesting functional redundancy. *Gfra3* could be instrumental as a surface marker for antibody-mediated sorting and characterization of relevant cell population during islet cell differentiation.

INTRODUCTION

Development of the pancreas is a very highly regulated process. Many transcription factors have been identified for their role in differentiation of pancreatic cell types (endocrine, acinar, ductal), describing a cascade of activation of transcription factors (for review, see (Cano et al., 2013)). Thus, Pdx1 (Jonsson et al., 1994) and Ptf1a (Krapp et al., 1996; Krapp et al., 1998) are key transcription factors defining pancreatic progenitors, which will give rise to all pancreatic cell types (Gu et al., 2002). Later, the bHLH transcription factor Ngn3 is essential to determine monopotent progenitors at the origin of the different endocrine cell types (α , β , δ , ϵ and PP) (Desgraz and Herrera, 2009; Gradwohl et al., 2000; Gu et al., 2002). These transcriptional regulatory cascades are initiated by signals from adjacent tissues controlling various stages of the development of the pancreatic epithelium (see for a review (Lodh et al., 2014; Mastracci and Sussel, 2012))

While a series of growth factors controlling early steps of pancreas organogenesis have been identified we currently lack information on the nature of signals that would control later steps of islet differentiation including survival of endocrine progenitors, islet cell fate decision or maturation. Such information could be instrumental to generate glucose responsive β -cells from hESC in vitro.

In order to identify signals that would control the biology of endocrine progenitors we performed Affymetrix microarrays on EYFP⁺ cells sorted from Ngn3^{EYFP/+} E15.5 pancreas (Soyer et al., 2010). Bioinformatics search for islet specific cell surface markers revealed the expression of *Glial cell line derived neurotrophic factor receptor α 3* (*Gfra3*). *Gfra3* belong to the Glial cell line Derived Neurotrophic Factor (GDNF) family of receptors and is a part of the TGF β superfamily. GDNF family of ligands is composed of four ligands: GDNF, Neurturin (NrtN), Artemin (Artn) and Persephin (Pspn) and are mainly neurotrophic factors. Each ligand has a high affinity for one specific membrane receptors, called GDNF Family of Receptor α (*Gfra*). Thus, four receptors have been identified: *Gfra1* which will interact with GDNF, *Gfra2* which will interact with NrtN, *Gfra3* which will interact with Artn and *Gfra4* which will interact with Pspn. Activation of GDNF pathway is realised by heterodimerisation of the ligand and its receptor with the proto oncogene Ret, leading to activation of intracellular pathways through its intracellular tyrosine kinase domain (Airaksinen and Saarma, 2002).

In the pancreas, two members of this family of ligands and receptors have been identified for their role mainly in parasympathetic innervation and maintenance. Gfr α 2 is expressed in pancreatic glial cells and parasympathetic neurons (Rossi et al., 2003; Rossi et al., 2005) and is essential for parasympathetic neurons maintenance (Lahteenmaki et al., 2007). Recently, Gdnf has been described to be expressed in pancreatic epithelium during pancreas development and to be essential for migration of neuronal progenitors, allowing pancreatic parasympathetic innervation (Munoz-Bravo et al., 2013). Moreover, a transgenic mouse model overexpressing Gdnf in glial cells presents increases of expression of genes involved in endocrine cell differentiation (Mwangi et al., 2010) and an increase in β cell mass (Mwangi et al., 2008). Altogether, these data suggest a potential role of Gdnf family of ligands and receptors in pancreatic innervation, as well as pancreatic endocrine cells differentiation. However, expression and function of endogenous Gfr α 3 has not been explored yet. In this study, we describe the expression pattern of Gfr α 3 in the developping and adult pancreas. Then, we studied its function by using loss- and gain of function approaches.

MATERIALS AND METHODS

Mouse strains and genotyping

Ngn3^{eYFP/+} mouse line was generated in the lab (Mellitzer et al., 2004). The Gfra3tLacZ mouse line was generously provided by Jeffrey Milbrandt and have been described previously (Honma et al. 2002). The promPdx1-Artn-2A-mCherry (PAM) transgenic mouse line was generated thanks to the help from the Mouse Clinical Institute (ICS; Illkirch). All mouse lines were kept on CD1 or C56BL6 backgrounds and experiments were approved by veterinary services.

PAM mice were genotyped by using 5' GCCACTGCCTGCGGCTGTCT 3' and 5' CTTGGCGGTCTGGGTGCCCT 3' primers.

Real time PCR

Total RNA was isolated from pancreatic buds at E15.5 using Tri Reagent (Invitrogen). 1µg of RNA was used for DNaseI (Roche) treatment and cDNA synthesis with the Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche). Taqman probes were used to realise real time PCR.

RNA from Ngn3 sorted cells at E15.5 or explants was isolated by using the RNeasy Micro kit (Qiagen, Valencia, CA). 200ng of RNA were used for DNaseI treatment and cDNA was synthesised using the Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche). Quantitative PCR were used by using Taqman probes.

In situ hybridisation

Embryos were harvested, fixed on 4% paraformaldehyde in 1X Phosphate Buffer Saline (PBS) without Ca²⁺ and Mg²⁺, immersed in 20% sucrose and embedded in OCT. 10µm sections are realised with a Leica cryostat CM3050S. Slides were incubated with hybridisation buffer (NaCl 11,4g.L⁻¹; Tris HCl pH 7.5 1,404g.L⁻¹; Tris base 0,134g.L⁻¹; Na₂PO₄ 2H₂O 0,78g.L⁻¹; Na₂HPO₄ 0,71g.L⁻¹; 0,05M EDTA; 50% formamide; 10% dextran sulfate; 1mg.mL⁻¹ tRNA; 0,02% BSA; 0,02% Ficoll; 0,02% PVP), rinsed and incubated in blocking solution (MAB Tween; MAB Boehringer Blocking Reagent 1%; goat serum heat inactivated 20%). Slides were then incubated with digoxygénine antibody coupled to alcalin phosphatase diluted in blocking solution. Samples were then rinsed in (NaCl 100mM; MgCl₂ 50mM; Tris pH9.5 100mM; Tween 0,1%; Levamisole 0,5mg.mL⁻¹) and incubated with revealing solution (3,5µl.mL⁻¹ NBT; 3,5µl.mL⁻¹ BCIP dans du tampon phosphate).

If followed by immunohistochemistry, *in situ* hybridisation was stopped by water bathes and incubated in blocking solution (PBS1X; Triton 0,1%; NDS 20%). Ngn3 (Guinea Pig, IGBMC, 1/500)

antibody diluted in blocking solution. Endogenous peroxydases were then inactivated by incubating slides in 0,5% H₂O₂ in methanol. After washes, secondary antibody coupled to Horse radish peroxidase diluted in PBS1X; Triton 0,1% was applied. Slides were then revealed using a diaminobenzine solution.

Immunohistofluorescence

Embryos or dissected adult pancreas were harvested, fixed on 4% paraformaldehyde in 1X Phosphate Buffer Saline (PBS) without Ca²⁺ and Mg²⁺, immersed in 20% sucrose and embedded in OCT. 10µm sections are realised with a Leica cryostat CM3050S. First antibodies were diluted in PBS1S; triton 0,01%; NDS20%. First antibodies used: Gfra3 (goat, R&D Systems, 1/500), Pdx1 (rabbit, Chris Wright Vanderbilt University USA, 1/2000), Ngn3 (Guinea Pig, IGBMC, 1/500), Insulin (Guinea Pig, Linco, 1/1000 or mouse, Sigma, 1/1000), Glucagon (Guinea Pig, Linco, 1/2000 or mouse, Sigma, 1/2000), Artn (Goat, R&D Systems, 1/100). Secondary antibodies conjugated to DyLight488, DyLight 549 or DyLight 649 (Jackson ImmunoResearch, 1/500) were diluted in PBS1X; triton0,01%.

Cell counting

To quantify Ngn3 number of cells and insulin/glucagon areas on E15.5 Gfra3^{Z/Z} or E13.5 PAM pancreas, embryos were harvested and prepared as described for immunohistofluoresences. 7µm of cryosections were cut and each 5 sections were stained for Ngn3, insulin or glucagon. Ngn3 quantification is expressed as the Ngn3 number of cells per pancreas. Insulin and Glucagon areas were rationalised to the pancreatic area (DAPI staining). Analyses were performed using ImageJ Software.

To measure endocrine innervation at P0, one section each 60µm was stained for hormones and TUJ1. Pictures were taken using a slides scanner Nanozoomer 2.OHT (Hamamatsu) and analysed by using Image J software. Briefly, Tubeness plugin were used to detect neuritis, then skeletonized to obtain neuritis length. Results are expressed as total innervation length rationalised to endocrine area.

For measurement of endocrine innervation at P21, one section each 60µm was stained for hormones and TH or VIP. Randomly chosen 50 islets from each pancreas were analysed. Due to the weak signal obtained for insulin, islets were manually defined and thresholded using Image J software, in order to obtain total islets area. Sympathetic innervation (TH) is expressed as TH⁺ area on endocrine area and parasympathetic innervation is expressed as VIP⁺ puncta on endocrine area.

Explants culture

E12.5 pancreas were harvested from WT embryos and cultured for 48h on filters (Millipore 0,45µm FHLC ; FHLC01300), laid on medium (DMEM / Ham-F12 (1:1); 1% FCS ; Penicilline ; Streptomycine ; glucose 3,15g/L final concentration ; glutamine 2mM) with or without 5µm SU5416 (VEGFR2 kinase inhibitor III, Calbiochem 676487). Then, explants were harvested and RNA prepared to perform real time PCR analyses.

Metabolic studies

Mice of more than 10weeks were fed for 16h. For Oral Glucose Tolerance Test (OGTT), mice received glucose by intragastric gavage (1g/kg glucose 15%). For Intraperitoneal Glucose Tolerance Test (IPGTT), mice were injected with the glucose solution (2g/kg glucose 15%). Circulating blood glucose was measured using Glucofix Sensor (A Menarini Diagnostics) at 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes.

Preparation of single cell suspension for FACS sorting

Pancreas from E15.5 pancreas were dissected, mechanically and enzymatically dissociated by a trypsin treatment (0,05%) 5 to 10minutes at 37°C. Trypsin action was stopped by adding DMEM/F12; FCS10%; 3,15g/l glucose; gentamycine. Cells were filtered a first time on 80µm filters (SEFAR, 3A03-0080-102-11), spinned 5minutes at 900rpm, resuspended in DMEM/F12; FCS10%; 3,15g/l glucose; gentamycine and filtered a second time on 50µm filtered (Wipak Medical R40, 050-47S) for FACS sorting. Cells were sorted by using a FACS Vantage SE (Becton Dickinson), with a Diva 5.0.3 software. Once sorted, cells were spinned for 5minutes at 900rpm and RNA extraction performed.

Statistics

Values are presented as mean of SD or SEM. p-values were determined using the 2-tailed Student t-test with unequal variance. $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

RESULTS

***GDNF receptor alpha 3 Gfra3* is expressed in the endocrine lineage in the embryonic pancreas**

In order to identify novel signalling pathways that might control islet cell development we searched for membrane receptors specifically expressed in endocrine progenitors during pancreas development. We thus took advantage of previous gene expression profiling experiments performed with isolated islet progenitors purified from Ngn3^{EYFP/+} embryonic (E15.5) pancreas (Soyer et al., 2010). We screened the Affymetrix data based on Gene Ontology using transmembrane receptor protein and receptor activity as a key words (Fold Change >2, FDR <0.05). Surprisingly we found that the mRNA of the GDNF family receptor-alpha3 (*Gfra3*) was strongly and specifically enriched in EYFP⁺ cells versus EYFP⁻ cells (FC=33.25 ; FDR=0.003) (Fig.1A). Due to the stability of the EYFP protein and the transient expression of Ngn3 transcription factor (Beucher et al., 2012; Miyatsuka et al., 2011), EYFP⁺ cells encompass essentially cells of the islet lineage, including Ngn3-positive progenitors as well as developing islet cells (Ngn3-negative/hormone –positive). In contrast, EYFP⁻ cells are essentially non-endocrine pancreatic cells. RT-QPCR experiments confirmed the strong enrichment of *Gfra3* in the islet lineage compared to other pancreatic cells (Fig. 1B). It is thought that Artemin, a secreted peptide of the GDNF ligand family, binds to the co-receptor *Gfra3* and thereby activates the Receptor Tyrosine kinase RET. We thus examined whether *Artn* and *Ret*, as well as other members of the GDNF Receptor (Gfrs) and Ligands (GFLs) families are expressed in the embryonic pancreas (Fig. 1A,B). As suggested by the Affymetrix data, and confirmed by RT-qPCR, *Artn* is enriched in the non-endocrine (EYFP⁺) cell population (Fig. 1A,B) while *Ret* transcripts are higher in EYFP⁺ cells (FDR: 0.06). None of the other Gfrs (*Gfra1*, *Gfra2*) are differentially expressed in EYFP-positive cells like *Gfra3*, although they are expressed in the embryonic pancreas (except *Gfra4*). Of note, *Gfra2* is enriched in the EYFP- non endocrine cell population. Taken together these expression data suggest that Artn/*Gfra3* signalling might control islet cell development.

Gfr α 3 is expressed in subsets of Ngn3-positive endocrine progenitors and in developing but not in adult islet cells

To determine Gfr α 3 expression during pancreas development we performed *in situ* hybridization and immunofluorescence experiments on pancreas cryosections. We found that Gfr α 3 mRNA (Supplementary figure 1), but importantly also Gfr α 3 protein, are expressed in Ngn3-positive pancreatic cells at E15.5 and at E12.5 (Fig. 2). Gfr α 3 immuno-signal is concentrated at the cell periphery suggesting cytoplasmic membrane localization as expected (see panels I,K in Figure 2). However, only a subset of Ngn3 cells expresses Gfr α 3 (Fig. 2E-K yellow arrows point to Gfr α 3⁺/Ngn3⁺ cells whereas red arrows point to Gfr α 3⁻/Ngn3⁺ cells). Similarly not all Gfr α 3-positive cells express Ngn3 (Fig. 2I-K white arrow). Double immuno-stainings for insulin or glucagon suggest that Gfr α 3-positive/ngn3-negative cells represent developing α - and β -cells that can be detected as early as E10.5 (Fig. 2A-D blue arrows) and until E15 (Fig. 3A-F, yellow arrows). After E15.5 Gfr α 3 labeling in embryonic islet cells progressively vanishes and only few α - and β -cells remain positives for Gfr α 3 at P0 (Fig. 3G-L, yellow arrows and not shown). In the adult pancreas, β -cells are devoid of Gfr α 3 (Fig.3M-O) while only rare α -cells are positive (Fig. 3P-R). We also observed that islets are always surrounded by Gfr α 3-positive cells in a pattern reminiscent of glial cells (Fig. 3P-R) (see below). Thus, Gfr α 3 is found at the surface of a subset of islets progenitors and persists in embryonic islet cells suggesting these endocrine cells can receive and integrate Artn signals during pancreas ontogenesis. In contrast, most adult α -cells and β -cells do not express Gfr α 3.

***Artn* transcripts are detected in the pancreatic mesenchyme**

To further characterize Artn/Gfr α 3 signaling in the embryonic pancreas we next decided to identify the cellular origin of Artn ligand. Unfortunately *in situ* hybridisation as well as immunofluorescence experiments fail to detect any expression in the pancreas of mouse embryos (data not shown). We then thought to take advantage of the Artn^{LacZ/+} mouse (Honma et al., 2002) to reveal β -galactosidase activity in *Artn*-expressing cells in whole mount embryos. Again, we could not observe any staining in the embryonic pancreas although labelled cells were readily detected in sclerotomes as expected (data not shown). We concluded that Artn expression must be too low to be detected with the above tools. However real time PCR clearly indicated an enrichment of *Artn* transcripts in non-endocrine cells (Fig. 1B) suggesting pancreatic expression of Artn ligand. To determine whether *Artn* is expressed by other, non-endocrine, pancreatic epithelial or mesenchymal cells, we performed real time

PCR at E12.5 (a stage when many *Gfra3*-cells are detected) in pancreatic epithelia and their surrounding mesenchyme that were enzymatically dissociated. Significant enrichment of *Pdx1* expression in epithelia confirmed the purity of our samples (Fig. 4A). Similarly *Gfra3* and *Ret* are found in the epithelium fraction in agreement with the Affymetrix and/or expression data. Importantly *Artn* transcripts were 5X higher in the mesenchymal tissue. Of note *Gfra2* is mesenchymal as well, while *Gfra1* expression was observed in both epithelia and mesenchyme. *Gdnf* expression was enriched in epithelia, which is coherent with published data (Muñoz-Bravo et al., 2013). Together our results suggest that mesenchymal *Artn* signals to developing *Gfra3*-positive endocrine cells located in the epithelium at E12.5.

***Artn* is not expressed in developing vasculature**

Artn has been described to be expressed by along blood vessels in smooth muscles cells of the developing vasculature cells where the ligand acts as a chemoattractant to allow sympathetic innervation of blood vessels (Damon et al., 2007; Honma et al., 2002). A large network of developing blood vessels, located in the pancreatic mesenchyme, and surrounding the epithelium, can be detected in the pancreatic buds as early as E10.5-E11.5 (Pierreux et al., 2010). We thus tested the hypothesis that *Artn* is a vascular derived factor by destroying endothelial cells and thus blocking blood vessel formation. Briefly, intact dorsal pancreatic bud (E12.5) were grown for two days in the presence of 5 μ M of the VEGFR2 kinase inhibitor III, SU5416 (Calbiochem/VWR, Leuven, Belgium) described to rapidly and completely ablate endothelial cells (Pierreux et al., 2010). Analyses by real time PCR (Fig. 4B) revealed a decrease of the endothelial cadherin *Cdh5* expression compared with controls, reflecting the efficient inhibition of blood vessels formation. Furthermore *Ngn3* and *Ins1* expression were decreased in agreement with the previously reported inhibition of endocrine differentiation by SU5415 (Pierreux et al., 2010). In the same line, *Gfra3* and *Ret* transcripts were reduced confirming their predominant expression in developing endocrine cells. Surprisingly however, in contrast to the observation of Pierreux and colleagues, we did not detect any excessive acinar tissue (no changes in *Amylase* transcripts) when endothelial development is inhibited. Nevertheless *Artn* expression was not affected by blood vessels ablation suggesting that developing vasculature is not the source of *Artn* in the embryonic pancreas.

Gfr α 3 is expressed in pancreatic neuronal and glial cells

To determine whether *Gfr α 3* mRNA is restricted to the endocrine lineage, we examined *Gfr α 3* expression in Ngn3-deficient mice which lack islet cells (Gradwohl et al., 2000). Analyses by real time PCR revealed that while *Gfr α 3* transcripts were reduced by 70% in Ngn3^{-/-} E15.5 pancreata (due to the absence of the endocrine cells), a significant level of *Gfr α 3* expression persists suggesting expression outside the endocrine lineage (Fig. 5A). Of note, no significant variation of expression of the other members of Gdnf family of ligands and receptors was observed (data not shown). We next performed immunofluorescence experiments to identify Gfr α 3-positive cells in Ngn3-deficient pancreas. Gfr α 3-immunostaining could not be detected in the pancreatic epithelium of Ngn3-deficient pancreas (Fig. 5E-G), compared to its epithelial expression observed in WT pancreas (Fig. 5B-D, yellow arrow). In contrast, Gfr α 3-positive cells were found surrounding acini and co-stained for the neuronal marker TUJ1 (Fig. 5K-M, yellow arrows) suggesting that Gfr α 3 is expressed in developing pancreatic neurons. Close observation of immunofluorescence experiments for Gfr α 3 and TUJ1 revealed that Gfr α 3/TUJ1 double positive neuronal fibers (Fig. 6A-C, yellow arrows) are also found close to clusters of Gfr α 3-positive/TUJ1-negative cells (likely developing islet cells) suggesting that Gfr α 3 marks also neurons innervating endocrine cells

Different types of neuronal cells innervate the adult pancreas including sensitive neuronal cells, as well as neurons from the autonomous nervous system. The autonomous nervous system is involved in pancreatic hormones secretion regulation and is composed of neurons from the parasympathetic nervous system and the sympathetic nervous system (Ahren, 2000). Both types of neurons act antagonistically on insulin and glucagon secretion. Stimulation of parasympathetic neurons will activate insulin secretion, while sympathetic neurons secretion will activate glucagon secretion and inhibits insulin secretion (Ahren, 2000). We observed Gfr α 3-positive sympathetic neurons (labelled by the enzyme Tyrosine hydroxylase, TH) both in the endocrine (Fig. 6D-F, yellow arrows) and exocrine tissues (Fig. 6G-I, yellow arrows). Gfr α 3 labelling was rather surrounding the islets while intra-islet TH-positive clusters were Gfr α 3-negative (Fig.6 D-F, yellow arrows). Concerning parasympathetic neurons (labelled by the Vasoactive Intestinal Peptide, VIP), we observed punctuated Gfr α 3 signals within the islets (Fig. 6J-L, yellow arrows) as well as in the acinar tissue (Fig. 6M-O, yellow arrows), sometimes lining blood vessels (to be confirmed). Finally Gfr α 3 also marks peri-insular Schwann cells (labelled by the calcium binding protein S100 β)

(Fig. 6P-R, yellow arrows). Altogether we found that *Gfra3* is expressed in developing pancreatic neurons and persist in the adult where both the sympathetic and parasympathetic are labelled as well as glial cells. These results suggest that *Gfra3* signalling could be involved in pancreatic innervation and maintenance.

***Gfra3*-deficient mice do not present any defect in islet cell development and glucose homeostasis**

Expression of *Gfra3* in both the embryonic endocrine lineage and the nervous system suggest different roles of *Artn/Gfra3* signalling in these two systems. In order to decipher the role of this pathway in the pancreas, we took advantage of *Artn*- and *Gfra3*-deficient mice in which LacZ and Tau-LacZ have been knocked in the *Artn* and *Gfra3* locus respectively generating null allele (Honma et al.,2002). *Gfra3*^{tLacZ/tLacZ} and *Artn*^{LacZ/LacZ} are viable and fertile and blood glucose analysis did not reveal overt diabetes in adult mice. However these mice could be glucose intolerant or exhibit impaired islet cell development that resumes at postnatal stages. As mentioned above the study of *Artn*^{LacZ/+} embryos was not helpful to determine the expression pattern of *Artn* in the pancreas and furthermore we could only partially recapitulate the previously described *Artn* expression suggesting that this mice have somehow derived from the original model. Therefore and also to specifically abolish *Gfra3* signalling, we decided to focus our loss of function studies on *Gfra3*-deficient mice. To determine whether islet cell development was impaired we first performed immunofluorescence on E15.5 pancreas against *Ngn3*. As expected *Gfra3* immunostaining is lost in knock out mice (Fig. 7 compare A-C and D-F) confirming that signalling through this receptor cannot occur. *Ngn3* expression pattern observed in *Gfra3*^{tLacZtLacZ} and control wild type embryos were similar (Fig. 7A-F). Furthermore, quantification of *Ngn3* cell number did not reveal any significant variation between these two genotypes (Fig. 7G). Thus *Gfra3* does not seem essential for the generation and/or maintenance of islet progenitor cells. We next explored the formation of hormone-expressing cells, which like *Ngn3*-cells also harbour *Gfra3* receptor at their cell surface. Immunofluorescence analyses (Fig. 7H-M) and quantification of glucagon and insulin hormones area (Fig. 7N) did not revealed any significant defect in α - or β -cell development suggesting that *Gfra3* is not essential for α/β subtype specification or maintenance. To identify any clue that could point to a possible function of *Gfra3*-signaling in the embryonic pancreas we compared gene expression profiles of wild-type and *Gfra3* deficient pancreata using Agilent microarrays. Analyses of results

revealed that 3 genes (table 1) were mildly affected by the absence of $Gfra3$ (table 1): $Nphp3$ (FC= -1,43395, Ttest= 0,047); $Pkd2l2$ (FC= -1,89411, Ttest= 0,000378) and $Pou3f2$ (FC= 1,56061, Ttest= 0,030803). Unfortunately, real time PCR on the same samples failed to confirm these gene expression changes (not shown, see discussion). We verified whether $Gfra3$ -loss had an impact later on islet formation. At P0, signals for both insulin (Fig. 8A-F) and glucagon (Fig. 8G-L) were present in P0 pancreas. Quantification of hormones areas (Fig. 8M) did not reveal any variation of both insulin and glucagon areas, suggesting that $Gfra3$ signalling is not essential for α - or β - cell formation during embryogenesis. We did not assess for $Gfra3$ expression in somatostatin and PP cells in embryonic and P0 pancreas yet. For the moment, we only know that $Gfra3$ is not expressed by adult somatostatin and PP cells (Supplementary figure 2). Studies concerning $Gfra3$ loss impact on somatostatin and PP cells remained to be done.

Because the loss of $Gfra3$ could impair pancreatic innervation which has been shown to impact islet architecture and function (Borden et al., 2013), we next examined adult mice. Adult $Gfra3$ deficient-mice do not present any obvious defect in islet organization (Fig. 9A-F), with insulin-positive β -cells properly surrounded by glucagon-positive α cells. Furthermore both oral and intraperitoneal glucose tolerance tests were normal in $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ mice compared with control demonstrating that glucose clearance was not affected (Fig. 9G-H). Taken together our loss of function studies demonstrate that $Gfra3$ signalling is not essential for endocrine cell differentiation, islet cells formation and function.

Islet innervation is normal in $Gfra3\alpha$ -deficient mice

As $Gfra2$ has been shown to be required for proper parasympathetic innervation of the endocrine pancreas (Rossi et al., 2005) and because $Gfra3$ expression is expressed in developing and adult pancreatic neurons (and glial cells) we assessed for innervation in $Gfra3$ -deficient mice. We hypothesized that a mild islet innervation defect could eventually not have been detected in classical IPGTT tests, an hypothesis supported by the observation that while vagal stimulation of insulin secretion is lost in $Gfra2$ KO mice systemic glucose tolerance is normal (Rossi et al., 2005). Endocrine innervation matures postnatally (Burriss and Hebrok, 2007), thus, we examined endocrine innervation at P0 and P21. Immunofluorescence experiments revealed the presence of TUJ1⁺ neuronal cells in $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ mice at P0 (Fig. 10A-F). Careful quantification of total innervation length (normalized to endocrine cells) at this stage did not reveal any significant variation (Fig. 10G), suggesting that $Gfra3$ is not

essential for pancreas innervation during embryogenesis and at early postnatal stages. At P21, sympathetic neuronal cells were present in both islets and exocrine cells in $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ mice (Fig. 11A-F, white arrows), and quantification of intra- islet sympathetic fibers did not show any difference between control and mutant mice. (Fig. 11G). The same conclusion was reached for the parasympathetic innervation (Fig. 11H-N). Finally, P21 $Gfra3$ -deficient islets were properly surrounded by glial cells (Fig. 11O-T). Thus $Gfra3$ is not required for islet cell innervation neither for the formation of glial cells

Artn overexpression has no impact on islet cell development

To circumvent a potential functional redundancy among GDNF family of Receptors that could account for the lack of endocrine phenotype in $Gfra3$ loss of function mice, we thought to determine the consequences of Artn gain of function on islet cell development. Therefore we decided to generate a mouse model overexpressing Artn ligand. As we did not know the precise pancreatic source of endogenous Artn, we decided to express *Artn* in pancreatic progenitors (Pdx1 promoter) expecting that Artn will be secreted and signal to Ngn3- and hormone-positive endocrine cells which express $Gfra3$. Artn was cloned downstream of Pdx1 regulatory sequences and in fusion with the autoclivable 2A peptide and mCherry fluorescent protein (to follow transgene expression) resulting into pPdx1-Artn-2A-mCherry construct or PAM (Fig. 12A). One founder mice expressed mCherry in the embryonic pancreas (Fig. 12B-D) in Pdx1-expressing cells as expected (compare overlapping Pdx1 immunostaining and mCherry fluorescence in Fig 12H-J). Immunofluorescence experiments to detect Artn revealed that Artn was specifically expressed in E13.5 transgenic embryos following the mCherry pattern (Fig. 12K-P) while no Artn protein was detected in wild-type embryo as described above. Careful examination of Artn immunostaining showed that Artn is located both in mCherry⁺ cells (Fig. 12K-M, yellow arrows) and in adjacent mCherry⁻ cells (Fig. 12K-M, green arrows). Interestingly in mCherry⁺ cells, Artn expression is cytoplasmic and membranar (Fig. 12K-M; yellow arrows), contrasting with the polarised and membranar signal of Artn observed in mCherry⁻ cells (Fig. 12K-M; green arrows). These results could suggest that Artn is properly produced by mCherry⁺ cells and secreted and binds to cells expressing the receptor explaining the polarized signal. Due to incompatibilities of Artn and $Gfra3$ antibodies this hypothesis could not be tested.

We next tested whether Artn overexpression had an impact on endocrine differentiation at E13.5. Transgenic mice displayed a normal pattern of Ngn3-positive cells (Fig. 13A-F) and quantification did not reveal any variation of Ngn3 cell numbers in Artn-

overexpressing embryos (Fig. 13G). Similarly, clusters of α -cells and more scattered β -cells were observed as expected (Fig. 13H-M) at this developmental stage in controls as well as in PAM transgenic mice and their number did not vary (Fig. 13N). Thus, at E13.5 we did not observe any obvious change in islet cell development in embryos overexpressing Artn.

DISCUSSION

We provide here the first description of the expression of the GDNF receptor family *Gfra3* in the pancreas. We found that this receptor is expressed by endocrine progenitors and developing α - and β -cells in the embryo but not in adult islets. Furthermore, *Gfra3* is found in embryonic and adult pancreatic neurons and glial cells. This expression pattern suggested that *Gfra3* and its ligand *Artn* control islet and pancreatic nervous system development and function. However, both loss and gain of function studies did not reveal any role of this signalling pathway in pancreatic endocrine differentiation. Furthermore, glucose clearance and islet innervation is unaltered in *Gfra3*-deficient mice. Taken together these results might reflect functional redundancies of GDNF family of ligands and receptors in the embryonic and adult pancreas.

Expression of *Gfra3* in the endocrine pancreas

During pancreas development, *Gfra3* is expressed in a subset of *Ngn3*-expressing cells suggesting that some islet progenitors could receive and integrate *Artn* signalling. It is not clear why only a subpopulation of *Ngn3* cells express the receptor. Different hypothesis can explain this pattern. We believe that *Gfra3* is not expressed (or not at detectable levels) in nascent *Ngn3*-positive islet progenitors but only in more mature *Ngn3* cells, an hypothesis supported by the fact that the receptor persists in developing α - and β -cells. Because *Gfra3* is found in developing islet cells we do not believe that *Gfra3*/*Ngn3* double positive cells represent cells that have adopted a particular islet sub-type fate. Thus this specific expression pattern could reflect a role of *Artn*/*Gfra3* signalling in the maintenance/survival of islet progenitors during embryogenesis. Alternatively this pathway could be a mechanisms to shut off *Ngn3* expression in the endocrine lineage which would be consistent with the absence of *Gfra3* in adult islet cells (where *Ngn3* is not expressed) although we did not reveal an increased expression of *Ngn3* in the gene expression profiling of *Gfra3*-deficient pancreas at E15.5. To gain further insight into the reasons of this specific expression of *Gfra3* in subsets of islet progenitors we plan to perform single cell gene expression profiling on purified *Ngn3* cells (from *Ngn3*^{EYFP/+} mice) and identify genes expressed in *Ngn3*⁺/*Gfra3*⁺ versus *Ngn3*⁺/*Gfra3*⁻ cells. In the adult endocrine pancreas, *Gfra3* expression is found only in rare glucagon-expressing cells. These cells, although they can be confused with peri-insular *Gfra3*-positive glial cells, are clearly *Gfra3* labeled α -cells. To our knowledge different types of α -cells have not been reported previously it is thus unclear why few α -cell express *Gfra3*.

One hypothesis would be that they represent newly formed α -cells with embryonic features. As it has been recently shown that α -cell regenerate through replication (Thorel et al Diabetes 2011) we could verify this hypothesis and verify whether Gfr α 3-positive α -cells are dividing.

Source of Artn-expressing cells

Our attempts to identify the source of Artn expressing cells in the embryonic and adult pancreas by in situ-hybridization, immunofluorescence or β galactosidase stainings failed. Only quantitative RT-PCR revealed *Artn* expression in the pancreatic mesenchyme at E12.5 suggesting that *Artn* is expressed at very low levels in the pancreas. Interestingly a mesenchymal expression of *Artn2* has also been described in mesenchymal cell in the vicinity of developing opercular muscle cells in zebrafish (Knight Development 2012). Gdnf is expressed by mesenchymal cells of the gastrointestinal tract and mesenchymal cells close to the ureteric bud (Hellmich et al., 1996). Otherwise, Artn expression has been reported in preimplantation embryos and early pregnant oviduct where it acts as a survival factor for preimplantation embryos (Li et al., 2009). Later in mouse development, the vasculature has been described to be a source of Artn. Indeed, Artn is known to be expressed by endothelial smooth cells, to act as a chemoattractant to allow vascular sympathetic innervation (Honma et al. 2002; Damon et al. 2007). Our endothelial cell ablation experiments suggest that the developing vasculature is not the source of Artn in the embryonic pancreas between E12-E14. However we did not explore more advanced stages but we clearly detected *Artn* transcripts in non endocrine pancreatic cells at E15.5 (Fig. 1B). Thus we cannot exclude that after the secondary transition, Artn is secreted by pancreatic blood vessels and/or by the nearby mesenteric arteries, reported to express Artn (Baloh et al. 1998)(Honma 2002), and signal to developing endocrine cells expressing Gfr α 3. Alternatively developing pancreatic neurons could also be a source of Artemin. One of our working hypothesis was that potential vascular or neuronal Artn would act as a chemoattractant and stimulate the migration and clustering of developing islet cells expressing Gfr α 3. However, using embryonic pancreas explant cultures and Artn soaked bead, we failed to demonstrate that Artn controls endocrine cell migration (data not shown).

Functional redundancy in Gfr α 3 loss of function studies

In mouse Gfr α 3 has been described to be required for sympathetic neurons migration and survival (Nishino, Honma). A function in cell differentiation has been described for this

receptor as well in zebrafish embryos where Gfr α 3 is required for myogenesis (but not muscle specification), Gfr α 3 loss of function resulting in reduced expression of myogenic factors including the bHLH transcription factor MyoD (Shimada et al Dev Biol 2012). Analysis of Gfr α 3-deficient embryonic pancreas indicated that Gfr α 3 is dispensable for endocrine cell formation and survival. Thus either Gfr α 3 has no function in these processes or another Gfr replaces Gfr α 3. As it has been shown that Gfr α 1 can also transduce Artn signal (Saarma and Sariola, 1999), we thought that this receptor could eventually compensate for the absence of Gfr α 3. In our hands, although Gfr α 1 immunostaining is clearly observed in developing neurons in E15.5 pancreas, we do not see any expression of this receptor in Pdx1-positive pancreatic progenitors or Ngn3-positive islet progenitors (data not shown). In similar experiments Munoz-Bravo and colleagues described Gfr α 1 expression in Cpa⁺ multipotent progenitor TIP cells at E13.5 as well as in developing Cpa⁺ acinar cells at E15.5. Thus there are no strong data supporting expression of Gfr α 1 in developing islet cells therefore we believe it is unlikely that Gfr α 1 compensate the loss of Gfr α 3 but we cannot completely exclude it. Of note, transgenic mice overexpressing GDNF (which binds Gfr α 1) displayed a higher number of Ngn3 cells (Mwangi et al 2010). We think, as supported by data from Munoz-Bravo and colleagues, that this does not result from a direct trophic effect of GDNF on Ngn3 cells but rather from the proliferation of Pdx1-pancreatic progenitors from which Ngn3-cells derive ((Gu et al., 2002)). Similarly, we have no clear evidence that Gfr α 2 is expressed outside the neuronal lineage in the embryonic pancreas (data not shown) and thus unlikely replaces Gfr α 3 and finally we could not detect any pancreatic expression of Gfr α 4. Interestingly Artn, as well as Gdnf and Nrtn, are able to bind to other receptors, such as Syndecan-3 (Bespalov et al., 2011) but it is unknown whether this receptor is expressed in developing islet cells. We showed above that islet cell development in transgenic mice overexpressing Artemin was unaltered at E13.5 likely because endogenous Artn is sufficient or because Artn has no effect on endocrine cell differentiation or survival. However, we cannot exclude that Artn overexpression has an impact on endocrine lineage later during pancreas development or in the adult, an hypothesis that we are currently testing.

Gfr α 3 is expressed in pancreatic neurons and glial cells in the embryo and in the adult. Sensitive neurons were not investigated. Both parasympathetic and sympathetic fibers express the receptor but parasympathetic and sympathetic islet innervation were not affected in Gfr α 3 KO mice, neither was glial cell differentiation or survival impaired. Gfr α 2 is

expressed by glial cells as well as by parasympathetic nervous system in the pancreas and islet parasympathetic innervation is reduced severely in *Gfra2*-deficient mice (Rossi et al. 2003; Rossi et al. 2005). Thus *Gfra2* could compensate *Gfra3* deficiency in parasympathetic neurons but also in glial cell where the role of *Gfra2* is unknown. Whether *Gfra1* is redundant with *Gfra3* in sympathetic fibers remains to be studied. Furthermore additional experiments need to be performed to determine whether *Artn* overexpression has any impact on islet innervation in adult transgenic mice. Finally vagal stimulation of insulin and glucagon secretion should be tested in adult *Gfra3* mice since this experiment could reveal a potential defect in parasympathetic nerve function that might have been missed by simply quantifying islet innervation.

Taken together the role of *Artn/Gfra3* signaling in islet cell development remains elusive. The generation of *Artn*^{LacZ/LacZ}; *Gfra3*^{LacZ/LacZ} double knock out could result in a stronger phenotype and thus help to decipher the function of this pathway in the pancreas. In the same line, it could be of interest to generate a conditional knock out of the co-receptor *Ret* in the islet lineage thereby potential redundant function of the *Gfra* receptor family could be overcome since they all signal through the *Ret* Receptor Tyrosine Kinase. To gain insight into the function of *Artn/Gfra3* in the embryonic pancreas we performed microarray experiments in *Gfra3* KO embryos to identify downstream target genes. Interestingly, one of the three *Gfra3* regulated genes identified is *nphp3* coding for a protein involved in ciliogenesis (Fliegauf et al., 2006). Thus *Gfra3* could promote together with the winged-helix transcription factor *Rfx3* (Ait-Lounis et al., 2007) the formation of primary cilia on islet cells.

In conclusion, this study revealed a novel receptor expressed at the surface of developing islet cells. However we did not yet elucidate the precise function of *Artn/Gfra3* in islet cell development. Thus there is no clear evidence that adding *Artn* growth factor in hES cell differentiation protocols would somehow improve the differentiation and functionality of the derived insulin-producing cells. Nevertheless we could take advantage of the expression of *Gfra3* at the surface of *Ngn3*-cells (provided this is the case in human as well) to FACS purify and study specific population of endocrine precursors cells as it has been shown for other receptors such as *Ddr1*, *Disp2* (Hald et al., 2012) or *CD133* (Prominin-1) and *CD49f* (or $\alpha 6$ -integrin) (Sugiyama et al., 2007). The combination of such purification tools could be very

useful to isolate bona fide endocrine precursors in a mixed cell population, a step that might promote the maturation, or increase the yield of hES derived β -cells in vitro.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Enomoto and Dr Milbrandt for the generous gift of allowing us to obtain Artn and Gfra3 KO mice. We thank the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France) for the generation of PAM transgenic mice and the members of IGBMC imaging platform and animal facility for their great help and advices, members of the lab for their support and scientific discussions.

FUNDINGS

This project has been supported by the Beta Cell Biology Consortium and the Fondation pour la Recherche Médicale. L.N was a recipient of a fellowship from INSERM, the Région Alsace and from the Fondation pour la Recherche Médicale (file number FDT20130928131).

REFERENCES

- Ahren, B. (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* 43, 393-410.
- Airaksinen, M.S., and Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3, 383-394.
- Ait-Lounis, A., Baas, D., Barras, E., Benadiba, C., Charollais, A., Nlend Nlend, R., Liegeois, D., Meda, P., Durand, B., and Reith, W. (2007). Novel function of the ciliogenic transcription factor RFX3 in development of the endocrine pancreas. *Diabetes* 56, 950-959.
- Bespalov, M.M., Sidorova, Y.A., Tumova, S., Ahonen-Bishopp, A., Magalhaes, A.C., Kuleskiy, E., Paveliev, M., Rivera, C., Rauvala, H., and Saarma, M. (2011). Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *J Cell Biol* 192, 153-169.
- Beucher, A., Martin, M., Spenle, C., Poulet, M., Collin, C., and Gradwohl, G. (2012). Competence of failed endocrine progenitors to give rise to acinar but not ductal cells is restricted to early pancreas development. *Dev Biol* 361, 277-285.
- Borden, P., Houtz, J., Leach, S.D., and Kuruvilla, R. (2013). Sympathetic innervation during development is necessary for pancreatic islet architecture and functional maturation. *Cell Rep* 4, 287-301.
- Burris, R.E., and Hebrok, M. (2007). Pancreatic innervation in mouse development and beta-cell regeneration. *Neuroscience* 150, 592-602.
- Cano, D.A., Soria, B., Martin, F., and Rojas, A. (2013). Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis. *Cell Mol Life Sci* 71, 2383-2402.
- Damon, D.H., Teriele, J.A., and Marko, S.B. (2007). Vascular-derived artemin: a determinant of vascular sympathetic innervation? *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 293, H266-273.
- Desgraz, R., and Herrera, P.L. (2009). Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors. *Development* 136, 3567-3574.
- Fliegauf, M., Horvath, J., von Schnakenburg, C., Olbrich, H., Muller, D., Thumfart, J., Schermer, B., Pazour, G.J., Neumann, H.P., Zentgraf, H., Benzing, T., and Omran, H. (2006). Nephrocystin specifically localizes to the transition zone of renal and respiratory cilia and photoreceptor connecting cilia. *J Am Soc Nephrol* 17, 2424-2433.
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., and 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.
- Gu, G., Dubauskaite, J., and Melton, D.A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129, 2447-2457.
- Hald, J., Galbo, T., Rescan, C., Radzikowski, L., Sprinkel, A.E., Heimberg, H., Ahnfelt-Ronne, J., Jensen, J., Scharfmann, R., Gradwohl, G., Kaestner, K.H., Stoeckert, C., Jr., Jensen, J.N., and Madsen, O.D. (2012). Pancreatic islet and progenitor cell surface markers with cell sorting potential. *Diabetologia* 55, 154-165.
- Hellmich, H.L., Kos, L., Cho, E.S., Mahon, K.A., and Zimmer, A. (1996). Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech Dev* 54, 95-105.
- Honma, Y., Araki, T., Gianino, S., Bruce, A., Heuckeroth, R., Johnson, E., and Milbrandt, J. (2002). Artemin is a vascular-derived neurotropic factor for developing sympathetic neurons. *Neuron* 35, 267-282.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., and Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606-609.
- Krapp, A., Knofler, M., Frutiger, S., Hughes, G.J., Hagenbuchle, O., and Wellauer, P.K. (1996). The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *EMBO J* 15, 4317-4329.

- Krapp, A., Knofler, M., Ledermann, B., Burki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbuchle, O., and Wellauer, P.K. (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* 12, 3752-3763.
- Lahteenmaki, M., Kupari, J., and Airaksinen, M.S. (2007). Increased apoptosis of parasympathetic but not enteric neurons in mice lacking GFRalpha2. *Dev Biol* 305, 325-332.
- Li, J., Klein, C., Liang, C., Rauch, R., Kawamura, K., and Hsueh, A.J. (2009). Autocrine regulation of early embryonic development by the artemin-GFRA3 (GDNF family receptor-alpha 3) signaling system in mice. *FEBS Lett* 583, 2479-2485.
- Lodh, S., O'Hare, E.A., and Zaghoul, N.A. (2014). Primary cilia in pancreatic development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 102, 139-158.
- Mastracci, T.L., and Sussel, L. (2012). The Endocrine Pancreas: insights into development, differentiation and diabetes. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 1, 609-628.
- Mellitzer, G., Martin, M., Sidhoum-Jenny, M., Orvain, C., Barths, J., Seymour, P.A., Sander, M., and Gradwohl, G. (2004). Pancreatic islet progenitor cells in neurogenin 3-yellow fluorescent protein knock-add-on mice. *Mol Endocrinol* 18, 2765-2776.
- Miyatsuka, T., Kosaka, Y., Kim, H., and German, M.S. (2011). Neurogenin3 inhibits proliferation in endocrine progenitors by inducing Cdkn1a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 185-190.
- Munoz-Bravo, J.L., Hidalgo-Figueroa, M., Pascual, A., Lopez-Barneo, J., Leal-Cerro, A., and Cano, D.A. (2013). GDNF is required for neural colonization of the pancreas. *Development* 140, 3669-3679.
- Munoz-Bravo, J.L., Hidalgo-Figueroa, M., Pascual, A., López-Barneo, J., Leal-Cerro, A., and Cano, D.A. (2013). GDNF is required for neural colonization of the pancreas. In *Development*, pp. 3669-3679.
- Mwangi, S., Anitha, M., Mallikarjun, C., Ding, X., Hara, M., Parsadarian, A., Larsen, C.P., Thule, P., Sitaraman, S.V., Anania, F., and Srinivasan, S. (2008). Glial cell line-derived neurotrophic factor increases beta-cell mass and improves glucose tolerance. *Gastroenterology* 134, 727-737.
- Mwangi, S.M., Usta, Y., Raja, S.M., Anitha, M., Chandrasekharan, B., Parsadarian, A., Sitaraman, S.V., and Srinivasan, S. (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances neurogenin3 gene expression and beta-cell proliferation in the developing mouse pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G283-292.
- Pierreux, C.E., Cordi, S., Hick, A.C., Achouri, Y., Ruiz de Almodovar, C., Prevot, P.P., Courtoy, P.J., Carmeliet, P., and Lemaigre, F.P. (2010). Epithelial: Endothelial cross-talk regulates exocrine differentiation in developing pancreas. *Dev Biol* 347, 216-227.
- Rossi, J., Herzig, K.H., Voikar, V., Hiltunen, P.H., Segerstrale, M., and Airaksinen, M.S. (2003). Alimentary tract innervation deficits and dysfunction in mice lacking GDNF family receptor alpha2. *J Clin Invest* 112, 707-716.
- Rossi, J., Santamaki, P., Airaksinen, M.S., and Herzig, K.H. (2005). Parasympathetic innervation and function of endocrine pancreas requires the glial cell line-derived factor family receptor alpha2 (GFRalpha2). *Diabetes* 54, 1324-1330.
- Saarma, M., and Sariola, H. (1999). Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech* 45, 292-302.
- Soyer, J., Flasse, L., Raffelsberger, W., Beucher, A., Orvain, C., Peers, B., Ravassard, P., Vermot, J., Voz, M.L., Mellitzer, G., and Gradwohl, G. (2010). Rfx6 is an Ngn3-dependent winged helix transcription factor required for pancreatic islet cell development. *Development* 137, 203-212.
- Sugiyama, T., Rodriguez, R.T., McLean, G.W., and Kim, S.K. (2007). Conserved markers of fetal pancreatic epithelium permit prospective isolation of islet progenitor cells by FACS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 175-180.

LEGEND TO FIGURES

Fig.1: *Gfra3* expression is strongly enriched in Ngn3-positive islet progenitor cells.

(A) Affymetrix gene expression profiles of *GFR* and *GFLs* in sorted EYFP⁺ and EYFP⁻ cells from Ngn3^{EYFP/+} embryonic pancreas (E15.5). *Gfra3* is highly expressed in EYFP⁺ islet progenitors (B). RT-QPCR on purified EYFP⁺ and EYFP⁻ cells from E15.5 pancreas. *Gfra3* expression in *Ngn3* expressing-cells has been confirmed by real time PCR while *Artn* and *Gfra2* mRNAs are significantly enriched in the EYFP⁻/*Ngn3*⁻ population. *Gdnf* is enriched in Ngn3⁺ cells. Data are summarized as mean ± standard error of the mean (SEM); n≥4 for each conditions; *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

Fig.2: *Gfra3* is expressed in subsets of endocrine progenitors in the embryonic pancreas.

Immunolocalisation on cryosections revealed that (A to D) at E10.5 *Gfra3* is expressed in pancreatic buds in developing islets cells (blue arrows). Few Pdx1⁺ (multipotent progenitors or developing β-cells) also express *Gfra3* (orange arrows). (E-H') At E12.5 and (I-K) E15.5 *Gfra3* is expressed in a subpopulation of Ngn3⁺ cells. In (E-K), yellow and red arrow point to *Gfra3*⁺/*Ngn3*⁺ and *Ngn3*⁺/*Gfra3*⁻ cells respectively. In (I-K), white arrow point to *Gfra3*⁺/*Ngn3*⁻ cell. E' to H' are magnifications of inset in H. Scale bar in (A-D) is 160 pixels, 80µm in (E-H) and 160µm applied to the rest of panels.

Fig.3: *Gfra3* is expressed in insulin- and glucagon expressing cell in the embryos but not in adult beta cells

Immunolocalisation on cryosections. At E15.5, *Gfra3* (red) is expressed by (A-C) insulin (green) expressing cells and by (D-F) glucagon (green) expressing cells. (G-I) At P0, *Gfra3*

expression decreases in insulin⁺ cells and (J-L) is maintained in glucagon⁺ cells. (M-O) In the adult pancreas, *Gfra3* is not expressed by insulin⁺ cells and (P-R) is expressed in some glucagon⁺ cells. Yellow arrows point to insulin⁺ or glucagon⁺/*Gfra3*⁺ cells; red arrows point to *Gfra3*⁺/insulin⁻ or glucagon⁻ cells and green arrows point to insulin⁺ or glucagon⁺ cells/*Gfra3*⁻. Scale bar is 80µm in (G-L) and 160µm applied to the rest of panels.

Fig.4: Inhibition of vasculature formation in the embryonic pancreas does not affect mesenchymal expression of *Artn* at E12.5.

(A) Real time PCR on E12.5 pancreatic epithelia and mesenchyme revealed enrichments of *Pdx1* (control), *Ret*, *Gfra3* and *Gdnf* in epithelia and of *Gfra2* and *Artn* in mesenchyme. *Gfra1* is expressed both in the epithelium and mesenchyme (B) E12.5 pancreas explants treated for 2 days with 5µM of SU5416 presented a decrease of expression of the endothelial cadherin *Cdh5* (reflecting ablation of endothelial cells), *Ngn3*, *Ins*, *Gdnf*, *Gfra3* and *Ret*, but not of *Artn*. Data are summarized as mean ± standard error of the mean (SEM); n≥10 for epithelia and mesenchyme; *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

Fig.5: Analysis of *Gfra3* in the pancreas of *Ngn3*-deficient embryos revealed neuronal expression

(A) Relative expression of *Gfra3* in E15.5 pancreas lacking *Ngn3* showed a reduction of *Gfra3* expression suggesting that the receptor is expressed outside the endocrine lineage. (B-G) Immunofluorescences on E15.5 cryosections from WT and *Ngn3*^{-/-} embryos showed no expression of *Gfra3* (red) in the pancreatic epithelium (*Pdx1*⁺, green) in *Ngn3*^{-/-} embryos (E-G) in contrast to wild-type embryos (B-D). (H-M) *Gfra3* is expressed in neuronal cells, labelled with *Tuj1* (green) in both WT (H-J) and *Ngn3*^{-/-} (K-M) pancreas. Yellow arrows

point to $Pdx1^+$ or $Tuj1^+/Gfra3^+$; red arrows point to $Gfra3^+/Pdx1^-$ or $TUJ1^-$ cells and green arrows point to $Pdx1^+/Gfra3^-$. Scale bar in (B-D) is $160\mu\text{m}$ and is applied to all panels. Data are summarized as mean \pm standard error of the mean (SEM); $n=3$ for each conditions; $**P\leq 0,01$.

Fig.6: Neuronal and glial cells in the embryonic and adult pancreas express Gfra3

Immunolocalisations on cryosections revealed that $Gfra3$ (red) is expressed (A-C) by neuronal cells (labelled by $TUJ1$ in green) in E15.5 pancreas, and (D-I) in the adult pancreas by sympathetic neuronal cells (labelled by TH in green) in both (D-F) endocrine and (G-I) exocrine tissues, by (J-O) parasympathetic neuronal cells (labelled by VIP in green) in both (J-L) endocrine and (M-O) exocrine tissues, and by (P-R) glial cells (labelled by $S100\beta$ in green), (H-J). Yellow arrows point to neuronal cells expressing $Gfra3$; red arrows point to $Gfra3^+/TH^-$, VIP^- or $S100\beta^-$ cells and green arrows point to neuronal cells $Gfra3^-$. Islets are delimited by white circles. Scale bar in (J-L) is $160\mu\text{m}$ and $80\mu\text{m}$ in (A-C) applied to the rest of panels.

Fig.7: Ngn3 cell number and endocrine differentiation are not affected in E15.5 $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ pancreas.

(A-F) Immunostainings on E15.5 pancreas display a complete loss of $Gfra3$ (red) protein in $Gfra3$ deficient embryos (D-F) compared to WT embryos (A-C). In both WT and $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ embryos, $Ngn3$ (green) cells are observed (A-F). (G) Quantification of $Ngn3$ cell number per pancreas in WT and $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ E15.5 pancreas did not display any significant variation of endocrine progenitors between these two genotypes. (H-M) No variation of insulin (green) and glucagon (red) stainings are observed between WT (H-J) and

$Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ (K-M) E15.5 pancreas. (N) Quantifications of insulin and glucagon areas in E15.5 pancreas from WT and $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ embryos rationalised to DAPI staining do not display any significant variation of endocrine cells between these two genotypes (N). Yellow arrows point to $Ngn3^+/Gfra3^+$ cells; red arrows point to $Gfra3^+/Ngn3^-$ cells and green arrows point to $Ngn3^+/Gfra3^-$ cells. Scale bar in (A-C) is 80 μ m, applied to all panels. For quantification, n=4 for each genotype.

Fig.8: Differentiation of α - and β -cells is unaffected in $Gfra3$ KO mice at birth

(A-L) No variation is observed in insulin staining (green) in WT (A to C) and $Gfra3$ -deficient (D to F) P0 pancreas. Same results are observed concerning glucagon staining (green) at P0 (G-L). (M) Quantification of insulin and glucagon (hormones) areas in P0 pancreas from WT and $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ mice rationalised to DAPI staining do not display any significant variation of endocrine cells between these two genotypes. Scale bar in (A-C) is 80 μ m, applied to all panels. For quantification, n=4 for each genotype.

Fig.9: Adult $Gfra3$ deficient mice do not display any islets and metabolism defects.

Immunostainings on adult pancreas from WT (A-C) and $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ (D-F) mice for insulin (red) and glucagon (green) revealed no defect in islet organisation. OGTT (G) and IPGTT (H) performed on adult WT and $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ mice do not display any glucose intolerance in $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ mice compared to WT mice. For metabolism experiments, n=6 for each genotype. Scale bar in (A to C) is 80 μ m and is applied to all panels.

Fig.10: Endocrine innervation is not impacted in P0 Gfra3-deficient mice.

(A-F) Immunostainings for neurons (labelled with TUJ1 in green) and hormones (insulin and glucagon in red) on WT (A to C) and $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ (D-F) P0 pancreas revealed no defect in endocrine innervation in $Gfra3$ P0 mice. (G) Quantification of total length of $TUJ1^+$ fibers rationalised to hormones area demonstrated no effect of $Gfra3$ loss in endocrine innervation. For quantification, $n=4$ for each genotype. Scale bar in (A-C) is $80\mu\text{m}$ and applied to all panels

Fig.11: Parasympathetic and sympathetic innervation of islets as well as glial cell formation are not impaired by Gfra3 loss in juvenile mice.

(A-F) Immunostainings for sympathetic neuronal cells (labelled with TH in green) and hormones (insulin and glucagon in red) in P21 pancreas from WT (A-C) and $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ (D-F) mice revealed no defect in sympathetic endocrine innervation. White arrows point to TH^+ cells. (G) Quantification of sympathetic innervation, expressed as TH area rationalised to hormones area, in P21 pancreas from WT and $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ mice, showed no variation of sympathetic endocrine innervation. (H-M) Immunostainings for parasympathetic neurons (labelled with VIP in green) and hormones (insulin and glucagon in red) in P21 pancreas from WT (H-J) and $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ (K-M) mice, revealed no impact of $Gfra3$ loss in parasympathetic endocrine innervation. (N) Quantification of parasympathetic innervation, expressed as VIP^+ puncta rationalised to hormones area, in P21 pancreas from WT and $Gfra3^{Z/Z}$ mice showed no difference of endocrine parasympathetic innervation between these two genotypes. (O-T) Immunostainings for glial cells (labelled with $S100\beta$ in green) and hormones (insulin and glucagon in red) in P21 pancreas from WT (O-Q) and $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$

(R-T) mice didn't display any defects in glial cell formation. Scale bar in (A-C) is 80 μ m and is applied to all panels. For quantification, n=4 for each genotype.

Fig.12: Generation of transgenic mice overexpressing Artn in the embryonic pancreas

(A) Schematic of the transgene construction (PAM) allowing Artn overexpression in Pdx1⁺ pancreatic progenitors. (B-D) E13.5 tracts from PAM embryos displayed mCherry fluorescence in the pancreatic epithelium. (E-J) Pdx1 staining (green) in WT (E-G) and PAM (H-J) E13.5 embryos displaying mCherry fluorescence only in Pdx1⁺ cells in transgenic PAM embryos. (K-P) Immunostainings for Artn (green) in WT (K-M) and PAM (N-P) E13.5 embryos showed Artn signal only in PAM pancreatic epithelium of transgenic embryos. Yellow arrows point to mCherry⁺/Artn⁺ cells and green arrows point to mCherry⁻/Artn⁺. Magnification of macroscopic picture is 20X and scale bar in (E-G) is 80 μ m and is applied to all confocal panels.

Fig.13: Overexpression of Artn does not impact islet cell development in transgenic embryos.

(A-F) Immunostainings on E13.5 pancreas from WT (A-C) and PAM (D-F) embryos for Ngn3 (green) didn't display any variation of signal for Ngn3 in PAM embryos. (G) Quantification of Ngn3 number of cells per pancreas in WT and PAM E13.5 pancreas did not display any significant variation of endocrine progenitors between these two genotypes. (H-M) Insulin (green) and glucagon (grey) cells are observed in WT (H-J) and PAM (K-M) E13.5 pancreas. (N) Quantifications of insulin and glucagon areas in E13.5 pancreas from WT and PAM embryos rationalised to DAPI staining did not display any significant variation of endocrine cells between these two genotypes. For quantifications of Ngn3 number of cells,

n=3 embryos for each genotype and n=4 embryos of each genotype for quantification of endocrine area; scale bar in (A to C) is 80µm and is applied to all panels.

Table1: Agilent data from E15.5 $Gfra3^{tLacZ/tLacZ}$ and $Gfra3^{+/+}$ embryos

Suppl fig. 1: $Gfra3$ is expressed in Ngn3 cells at E15.5.

In situ hybridisation on E15.5 WT pancreas for $Gfra3$ (blue) and immunohistochemistry for Ngn3 (brown) demonstrate that $Gfra3$ is expressed in a subset of Ngn3 cells. Black arrows point to Ngn3 cells expressing $Gfra3$, while red arrows point to Ngn3 cells not expressing $Gfra3$. Magnification is 20X.

Suppl fig. 2: Adult PP and somatostatin cells do not express $Gfra3$.

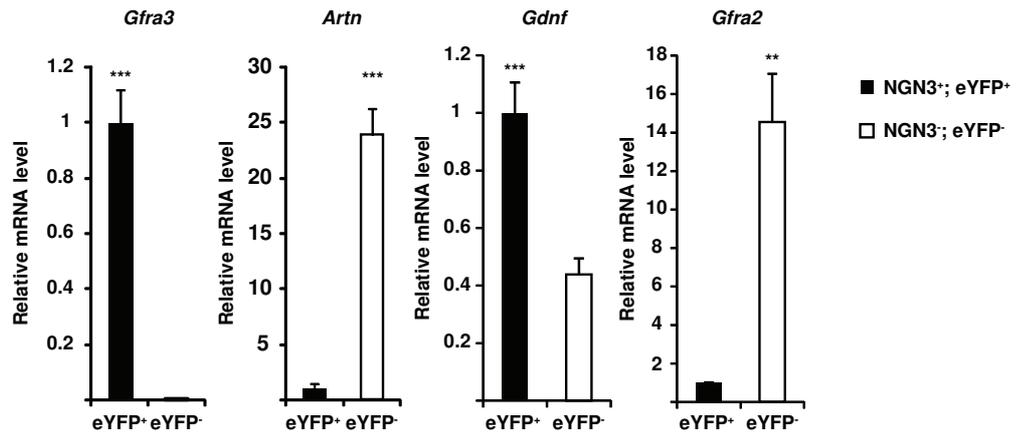
(A-F) Immunostainings on WT adult pancreas demonstrate that $Gfra3$ (red) is not expressed by (A-F) PP cells (in green), neither by (G-L) somatostatin cells. Red arrows point to $Gfra3^+$ /PP⁻ or somatostatin⁻ cells and green arrows point to PP⁺ or somatostatin⁺ / $Gfra3^-$ cells. D to F are magnifications of inset in C and J to L' are magnifications of inset in I. Scale bar is 80µm in (A-C) and (G-I), and 320µm in (D-F) and (J-L).

Nivlet_Figure 1

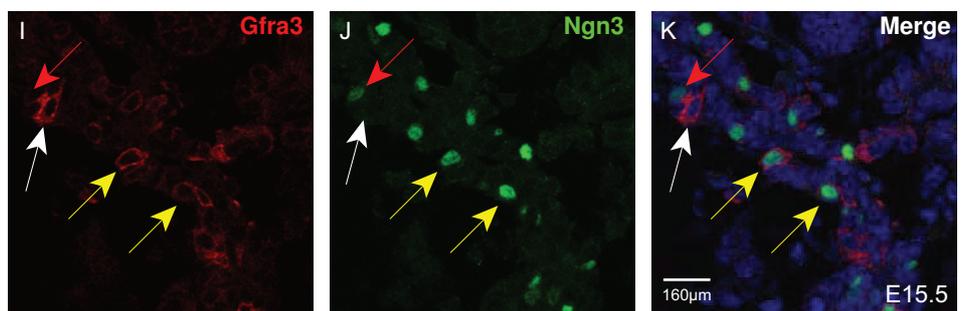
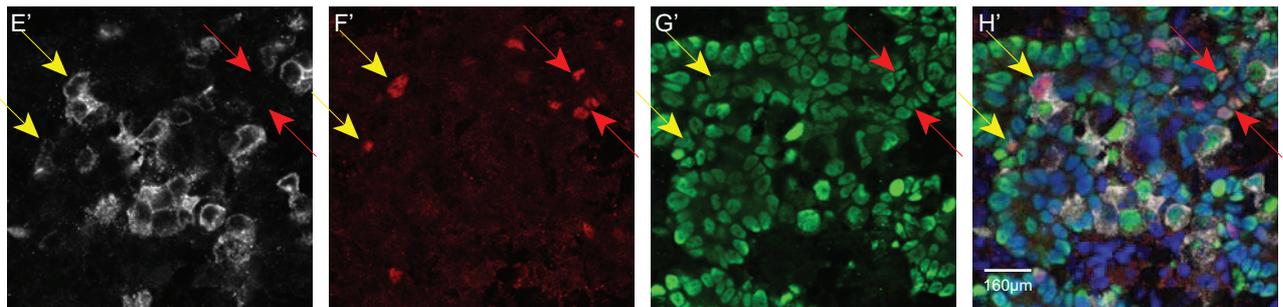
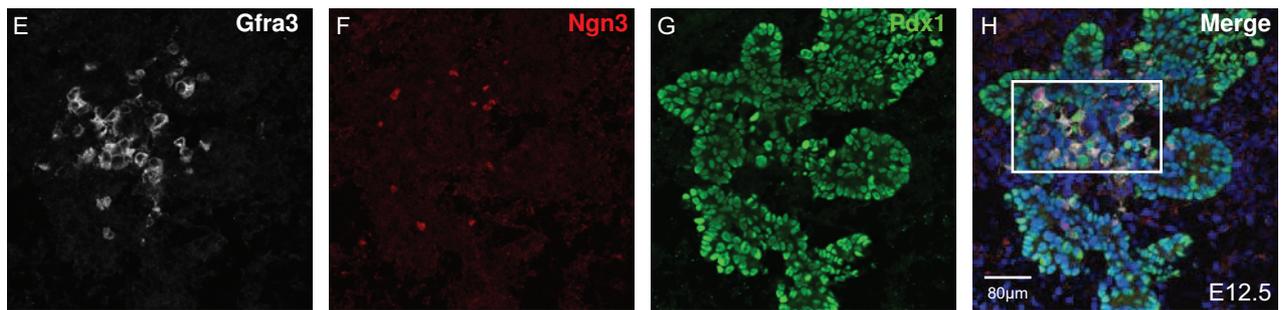
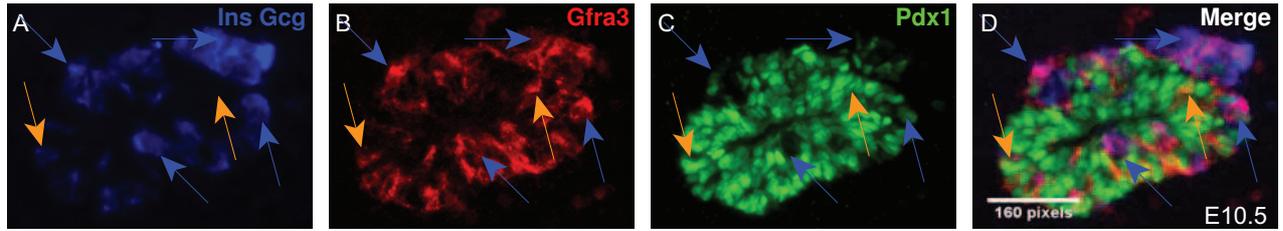
A

microarray	gene name	NGN3 ⁺ ; eYFP ⁺	NGN3 ⁺ ; eYFP ⁻	FC	FDR
1439015_at	Gfra1	68,886	92,718	-1,35	0,21993965
1433716_x_at	Gfra2	29,072	191,259	-6,58	0,05565779
1418880_at	Gfra3	429,784	12,926	33,25	0,02538119
1419080_at	Gdnf	44,439	30,786	1,44	0,23239403
1432032_a_at	Artn	13,583	48,642	-3,58	0,11314563
1449281_at	Nrtn	71,527	59,561	1,2	0,23752136
1436359_at	Ret	655,352	194,695	3,37	0,06548774

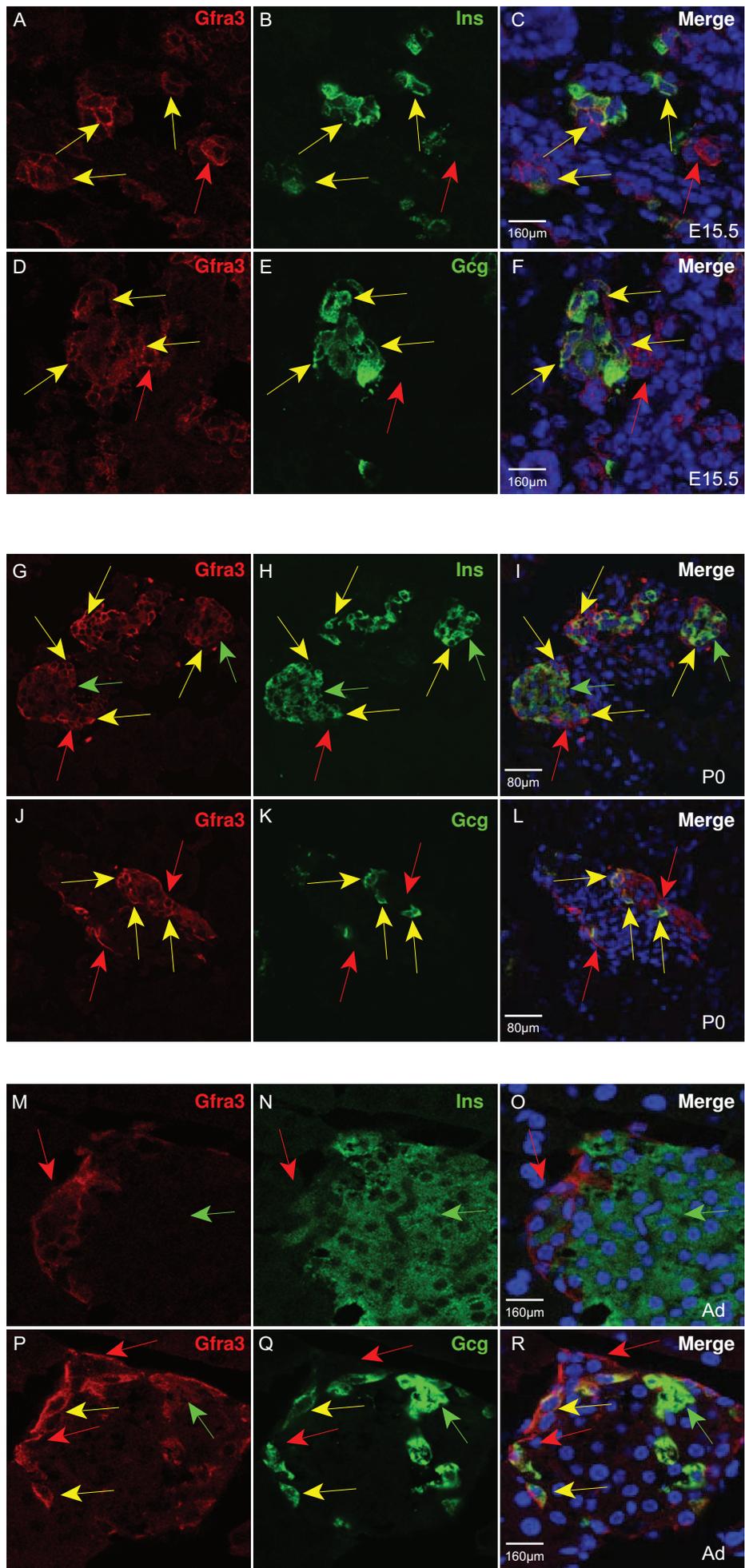
B



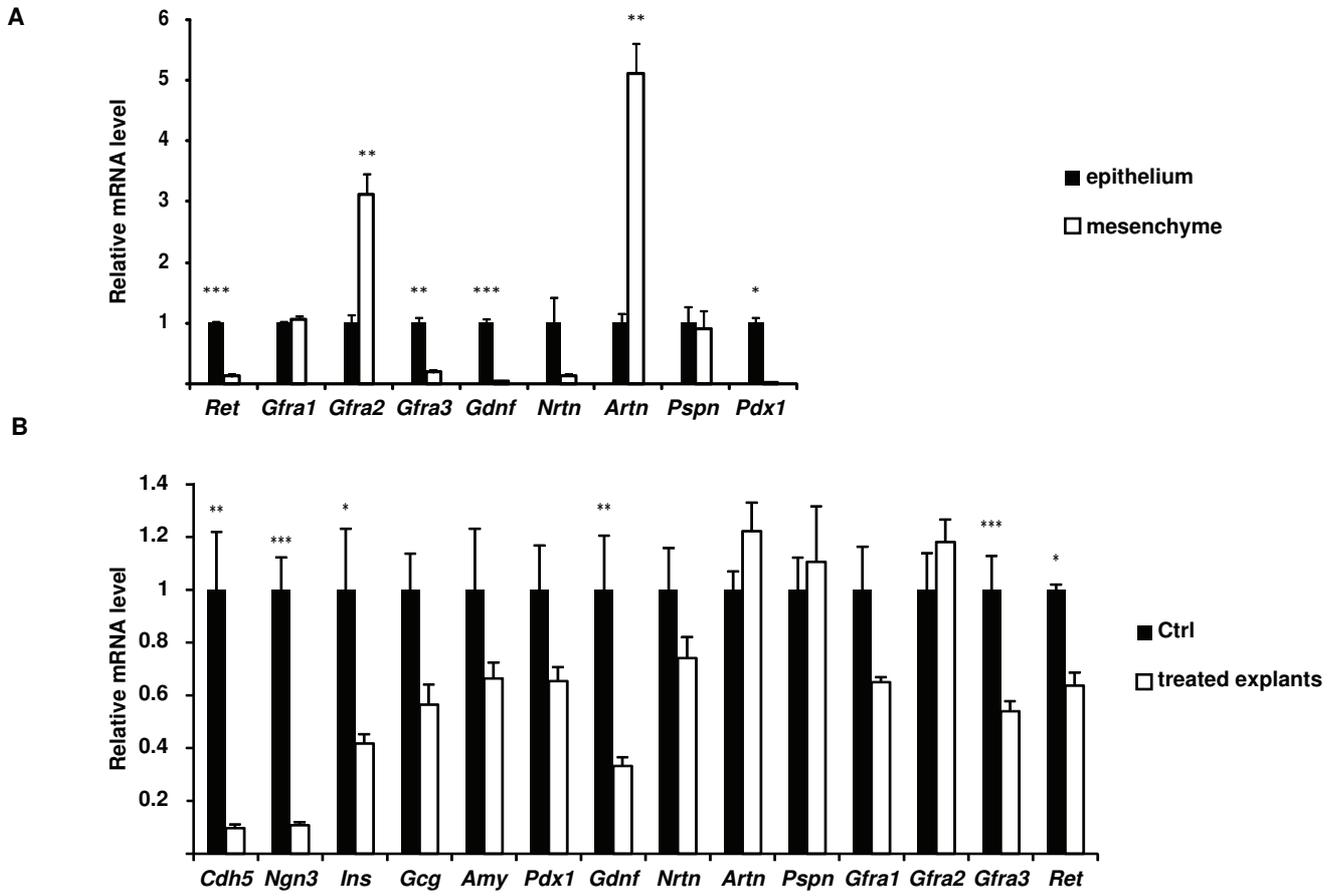
Nivlet_Figure 2

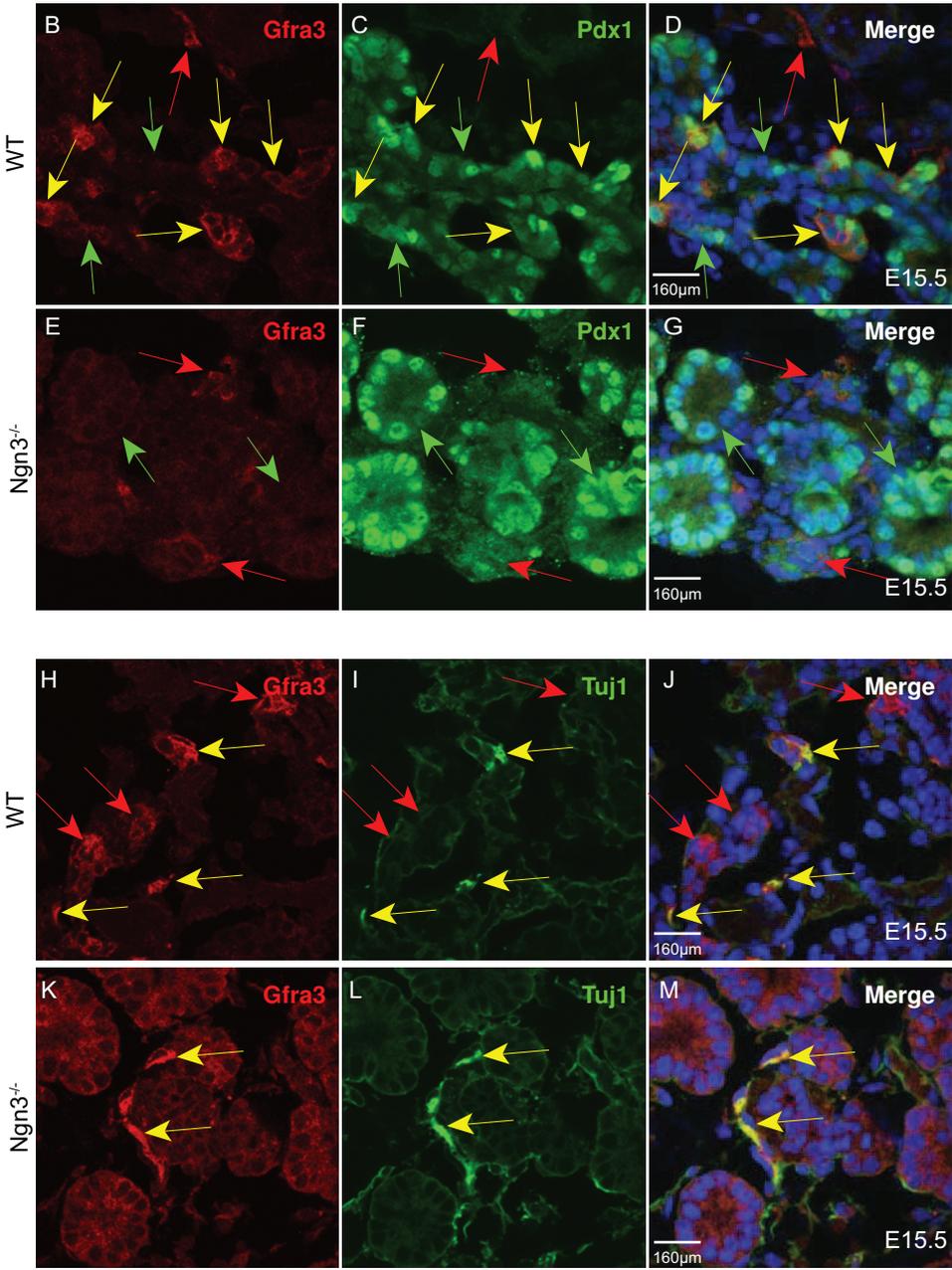
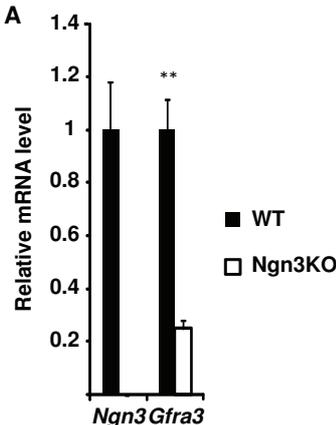


Nivlet_Figure 3

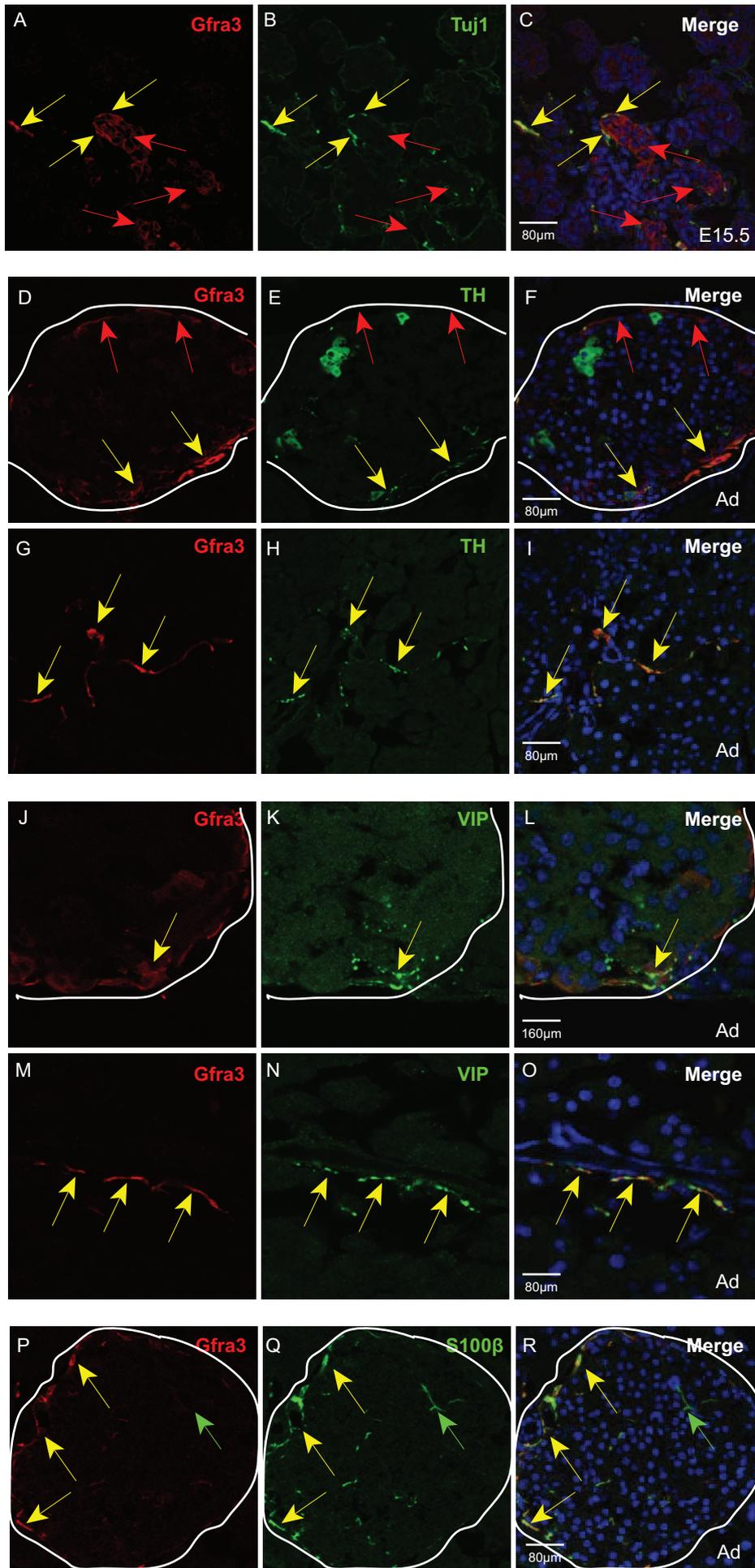


Nivlet_Figure 4

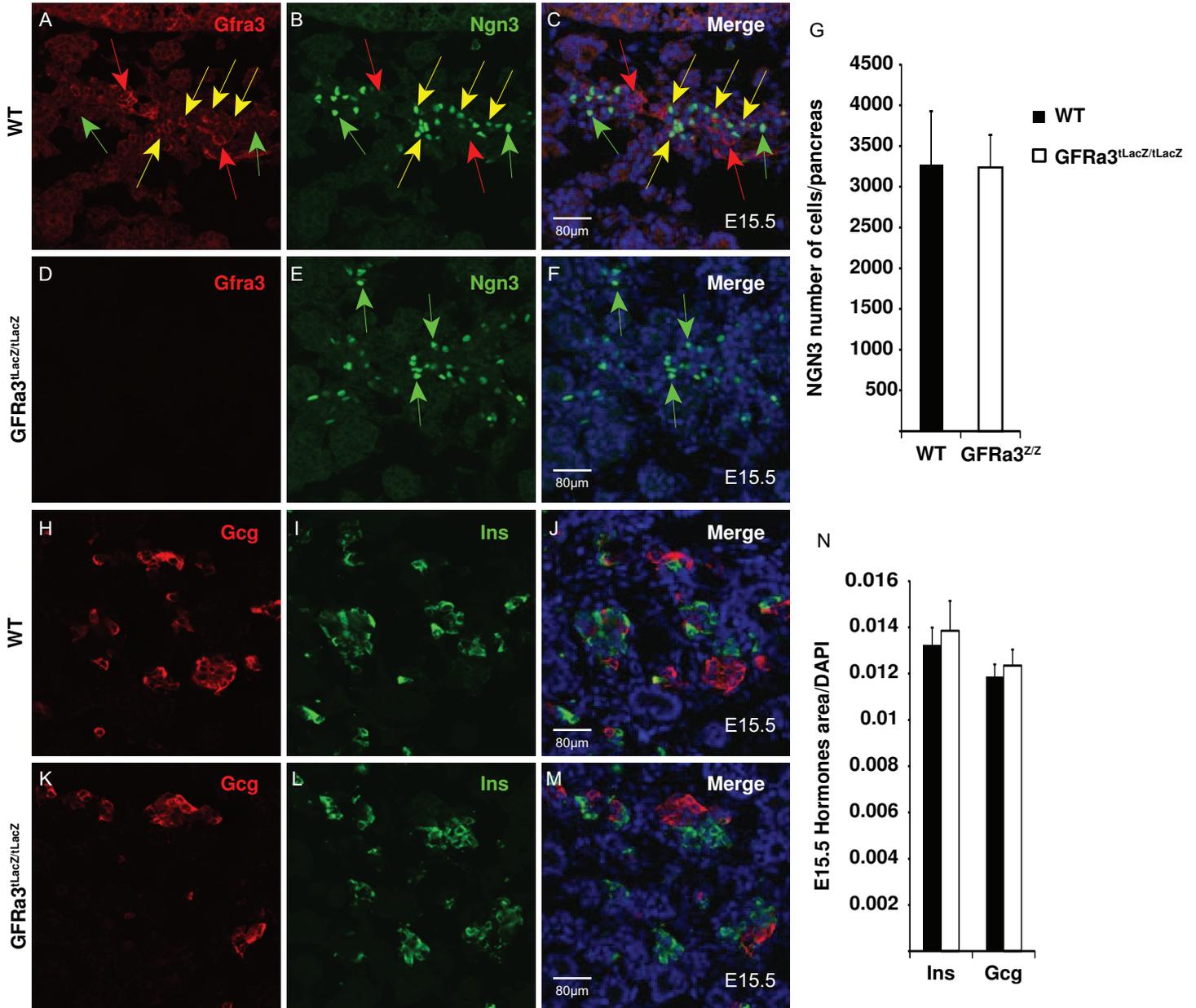




Nivlet_Figure 6



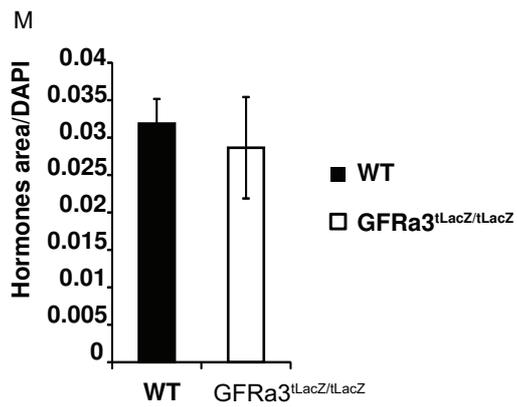
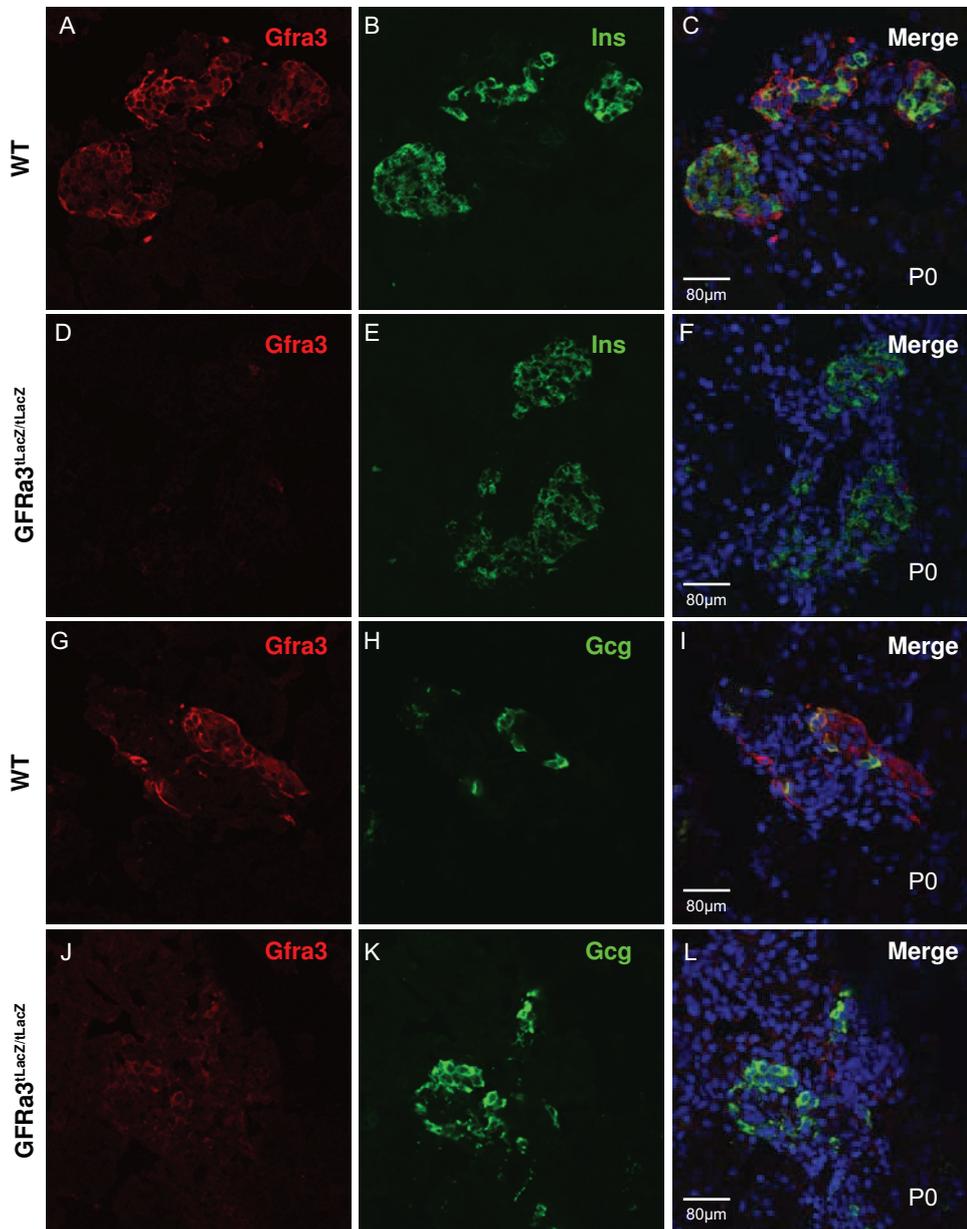
Nivlet_Figure 7

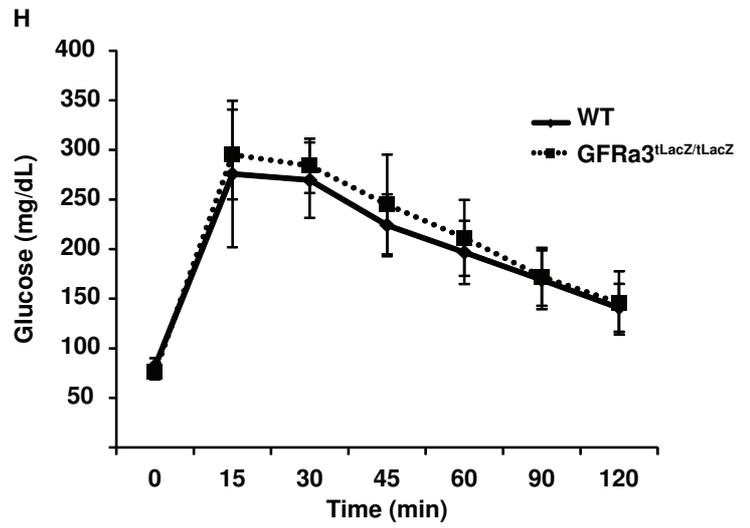
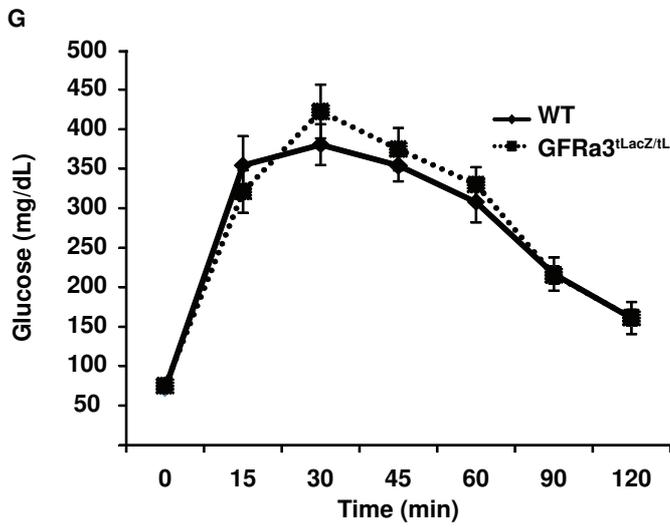
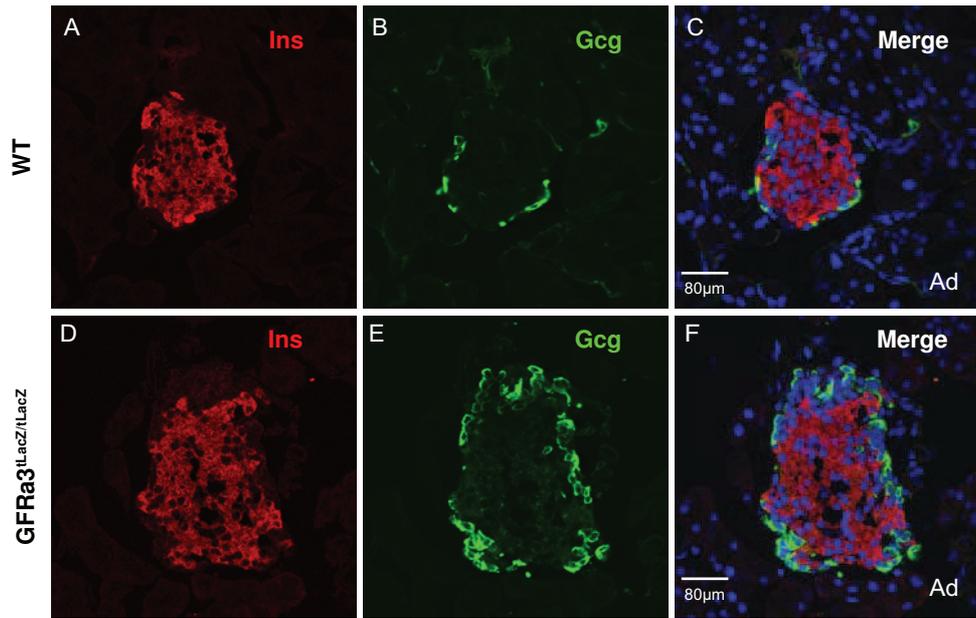


Nivlet_Table 1

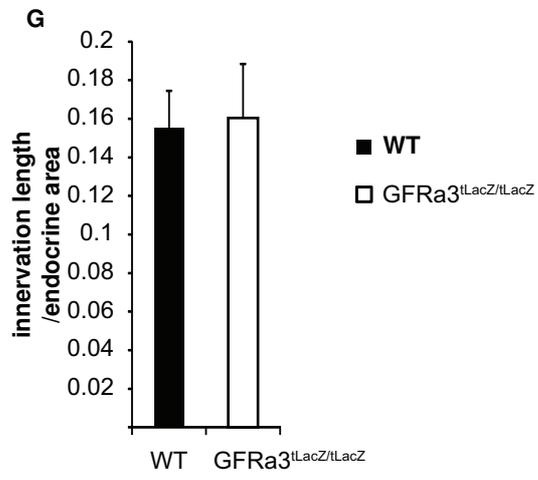
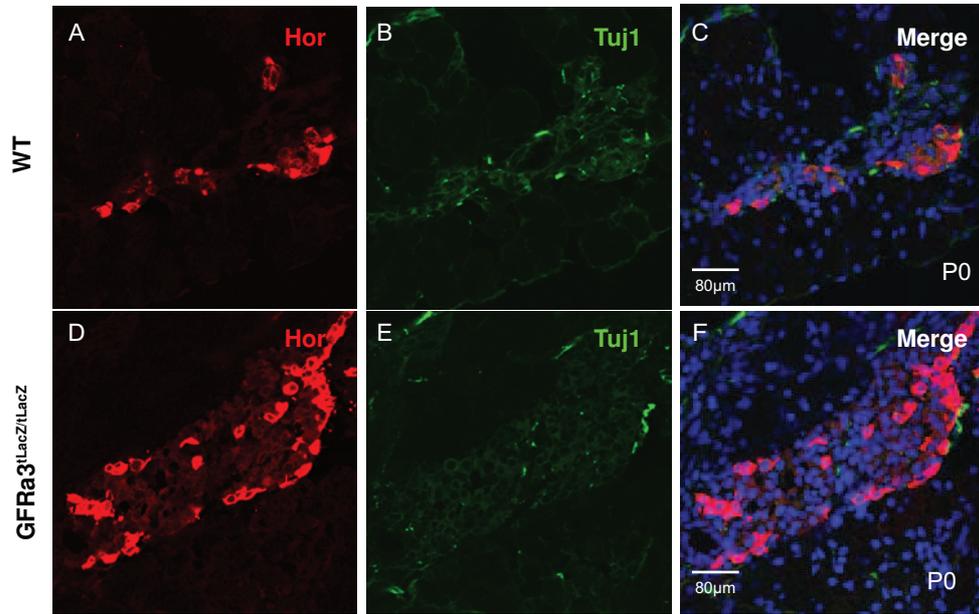
microarray	gene name	FC Gfra3KO/WT	FDR
A_51_P228892	Pkd2l2	-1,894112448	0,000377675
A_55_P2137576	Nphp3	-1,433948512	0,047098035
A_55_P2103132	Pou3f4	1,560609911	0,030802803

Nivlet_Figure 8

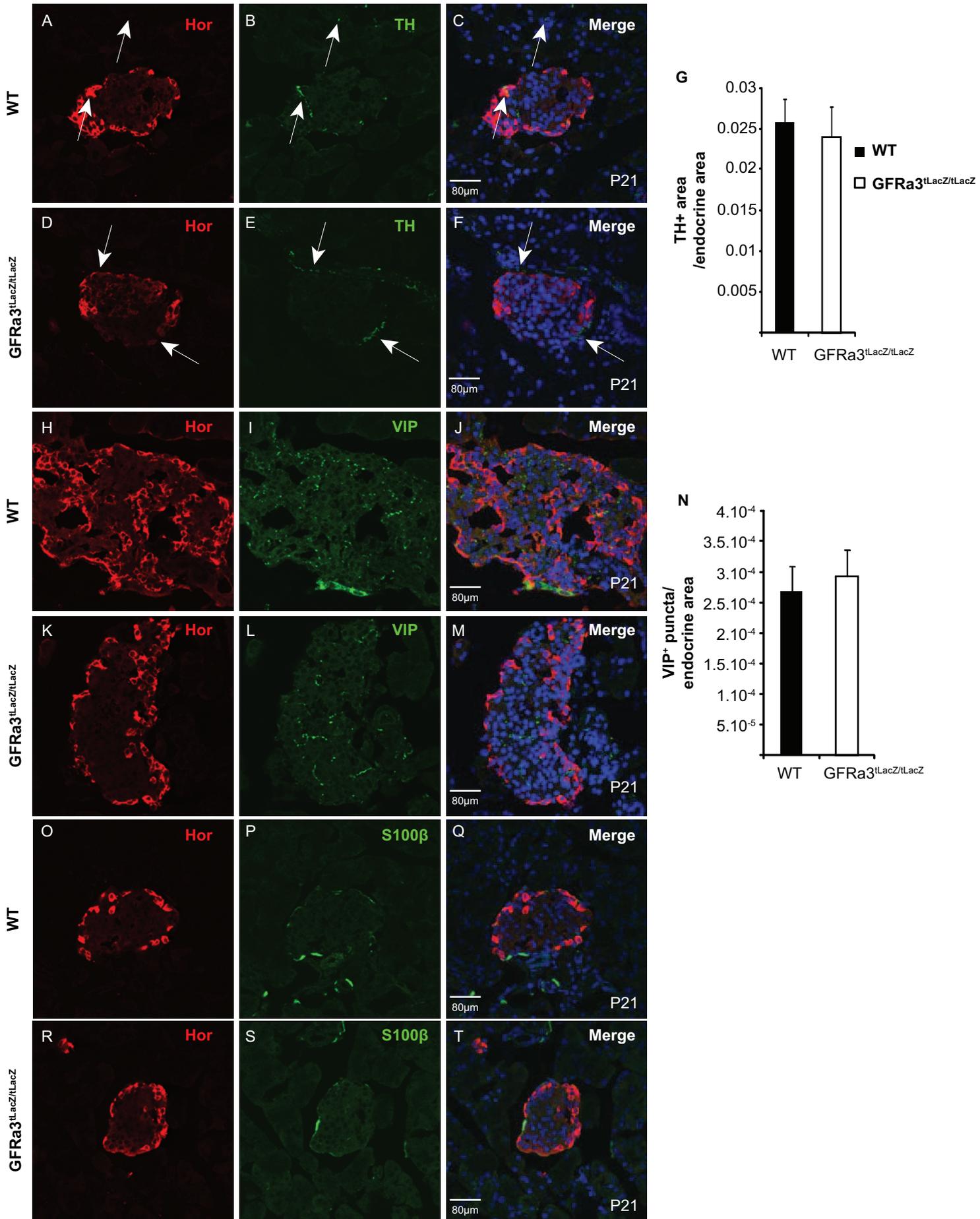




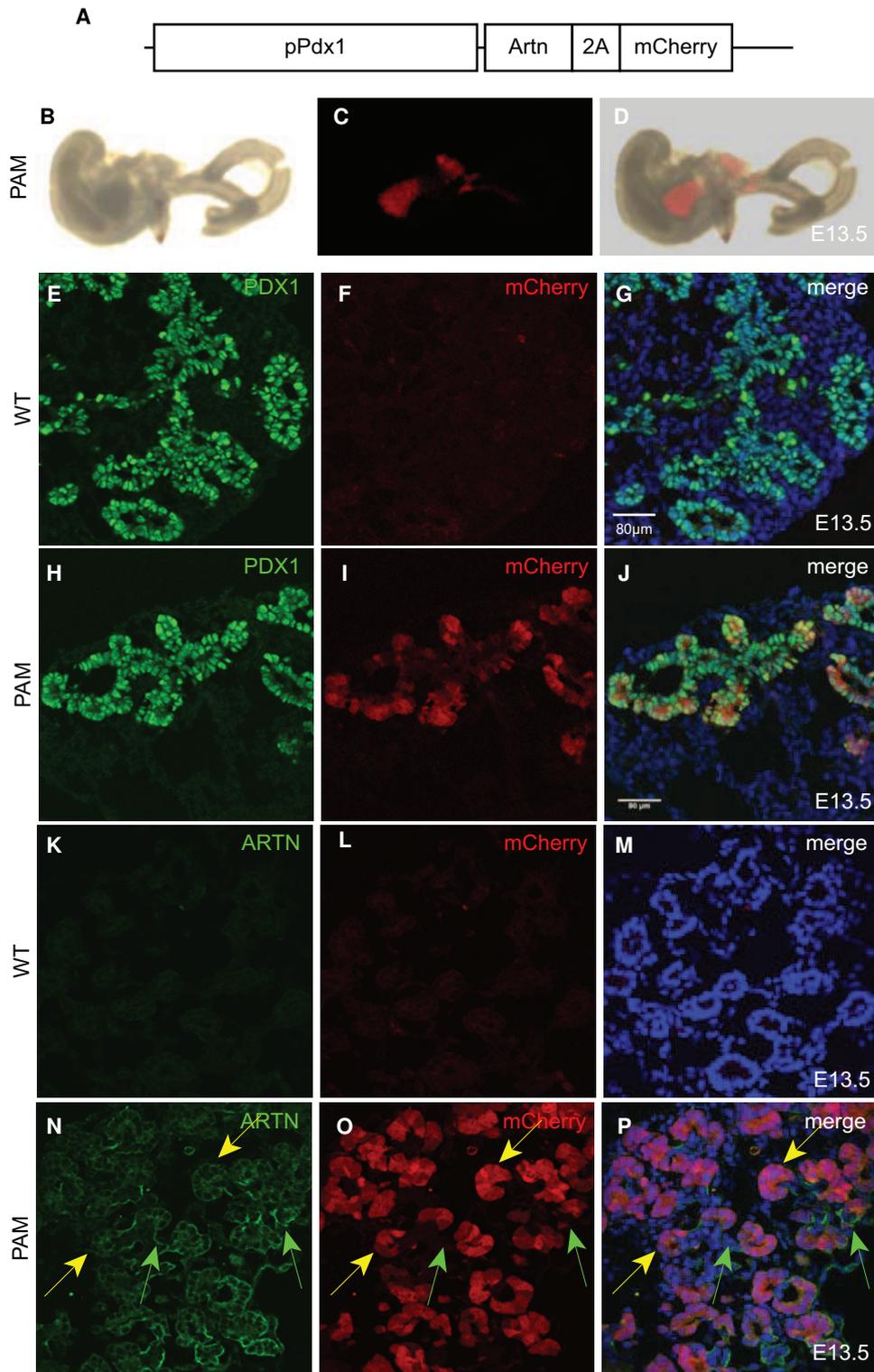
Nivlet_Figure 10



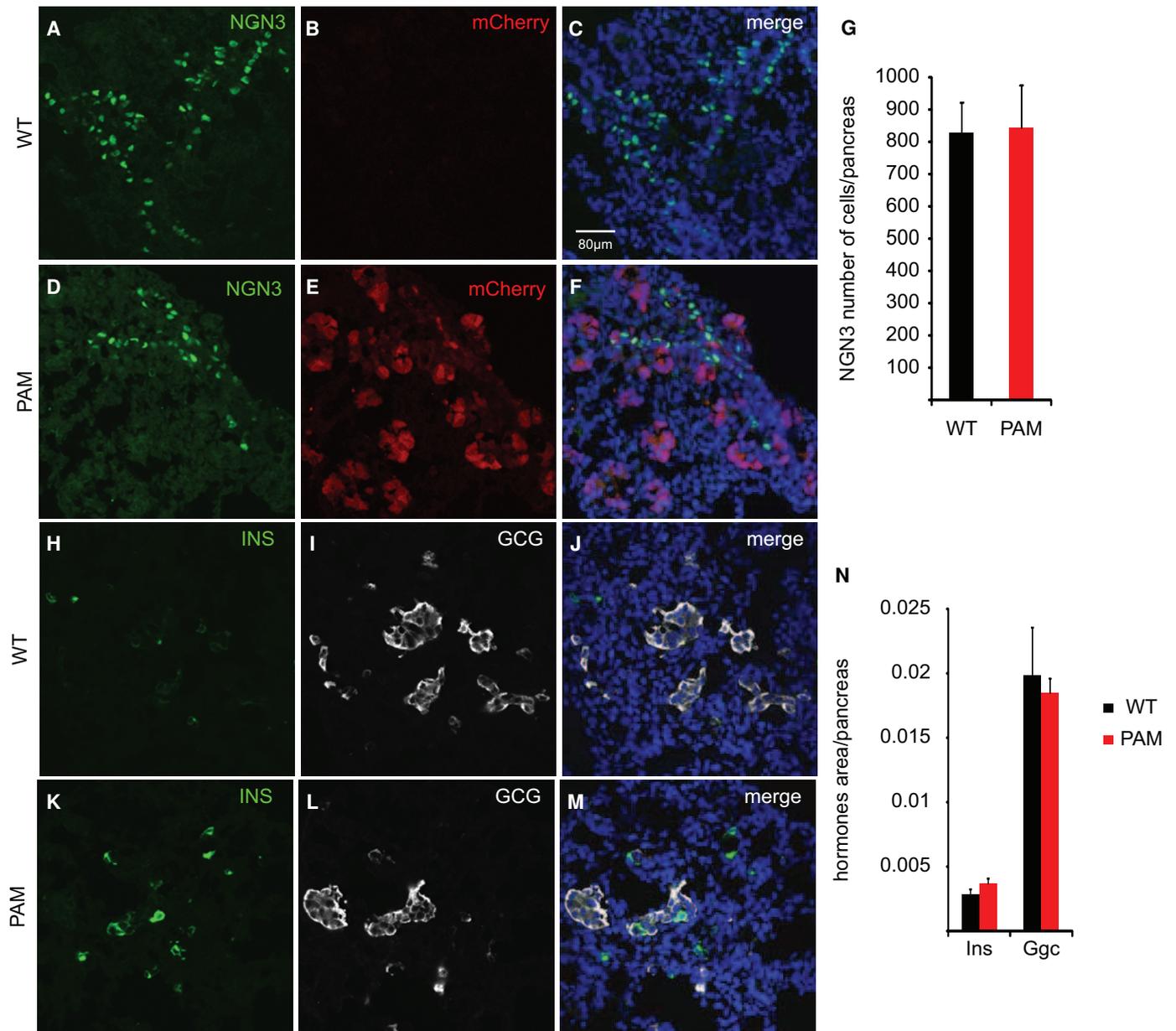
Nivlet_Figure 11

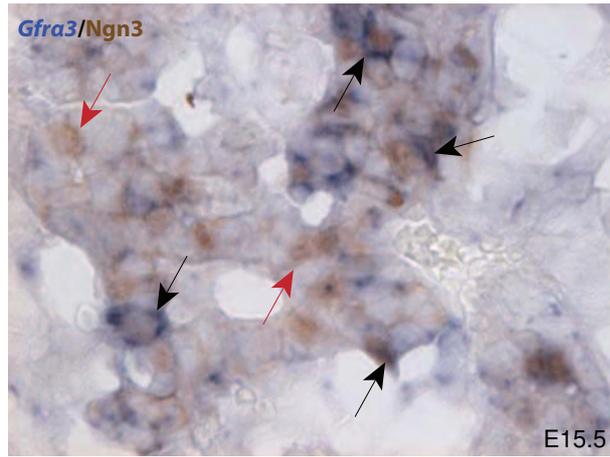


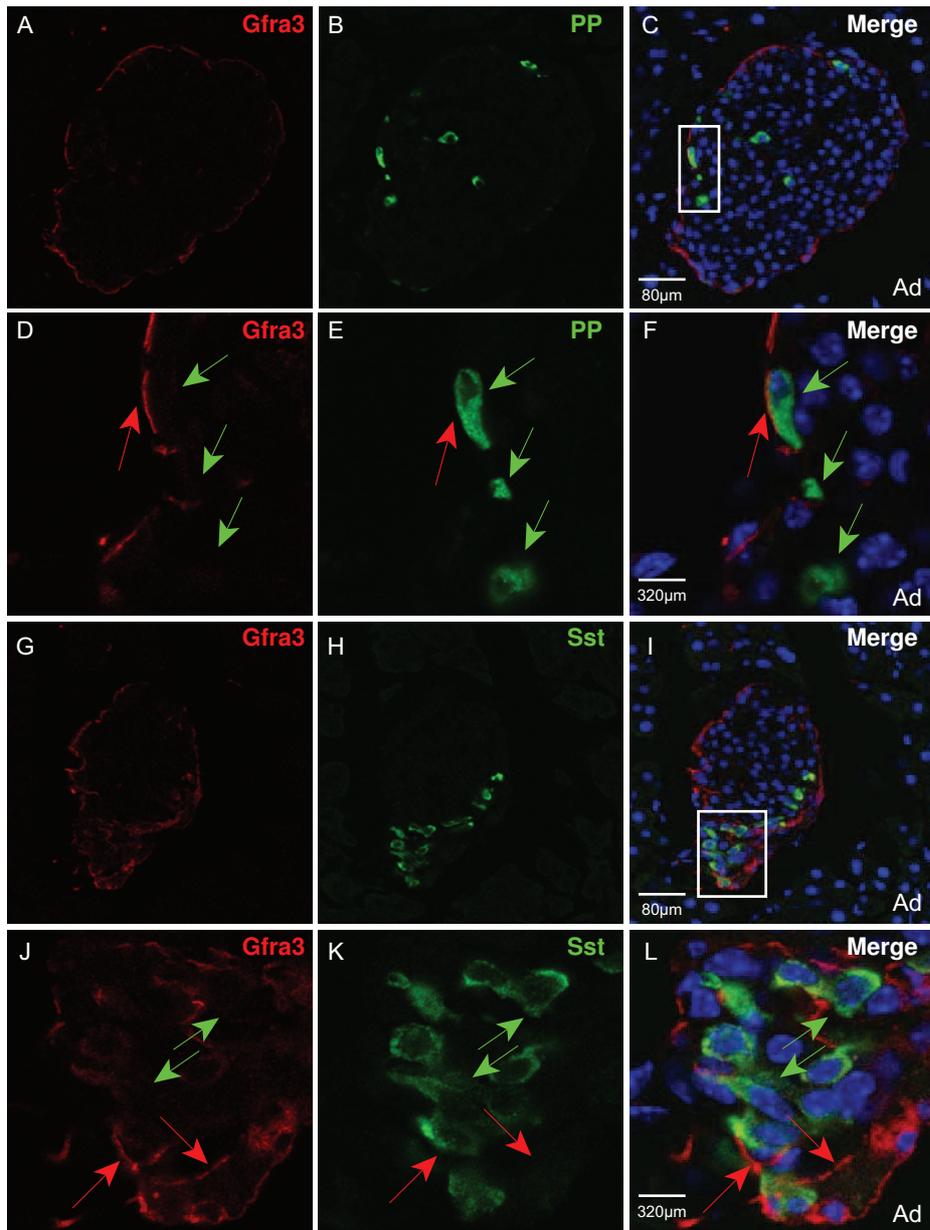
Nivlet_Figure 12



Nivlet_Figure 13







C. Résultats supplémentaires

1. Etude de l'expression d'Artn.

1.1. Contexte

Comme présenté dans le papier en préparation, l'expression de Gfr α 3 dans le pancréas embryonnaire et adulte a pu être caractérisée. Afin de compléter la caractérisation de l'expression des membres de la voie de signalisation Artn/Gfr α 3 et d'apporter de nouveaux éléments relatifs à sa fonction, nous avons aussi cherché à connaître le patron d'expression de son ligand Artn. Grâce aux PCR quantitatives réalisées sur les épithélia et mésenchymes à E12.5, nous savons qu'Artn est exprimé par le mésenchyme pancréatique (Fig 4A du papier). Nous avons alors cherché à identifier plus précisément la source pancréatique d'Artn.

1.2. Méthodes

Plusieurs méthodes ont été utilisées afin d'étudier l'expression d'Artn. Les hybridations *in situ* pour Artn ont été réalisées avec une sonde générée à partir d'une portion du cDNA d'Artn correspondant aux exons 3 à 5 clonés dans un plasmide pCRII TOPO. Une transcription *in vitro* avec la SP6 Polymérase permet de générer la sonde s'hybridant à l'ARN d'*Artn*.

Pour les immunofluorescences, trois anticorps ont été testés : chèvre anti-Artn (R&D System AF1085), lapin anti-Artn (Abcam ab91009) et lapin anti-Artn (Abcam ab1136) (tableau 7).

Enfin, pour la détection de l'activité de la β galactosidase sur des embryons de la lignée de souris Artn^{+LacZ} et Gfr α 3^{+tLacZ}, deux protocoles ont été testés : la coloration au XGal et la coloration au Salmon Gal. Lors du protocole de XGal, les échantillons sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde 0,2%, rincés et incubés avec la solution de XGal. La vérification de l'apparition du signal se fait sous une loupe Leica MZ6. Le protocole de coloration au Salmon Gal (don du Dr Collombat) est basé sur l'article de (Sundararajan et al., 2012). Brièvement, les échantillons sont fixés dans une solution de fixation contenant de la formaldéhyde 1% et du glutaraldéhyde 0,2% puis sont post fixés dans une solution de glutaraldéhyde 0,2%. Les échantillons sont ensuite rincés et incubés avec la solution de Salmon Gal. La vérification de l'apparition du signal se fait sous une loupe Leica MZ6.

1.3. Résultats

Nous avons tout d'abord procédé à des hybridations *in situ* (ISH), sur des coupes d'embryons à différents stades. Un signal pour Artn a été observé au niveau des sclérotomes à E12.5 (Fig 36A), ce qui est cohérent avec les données publiées par Honma et al. 2002, montrant l'expression d'Artn dans

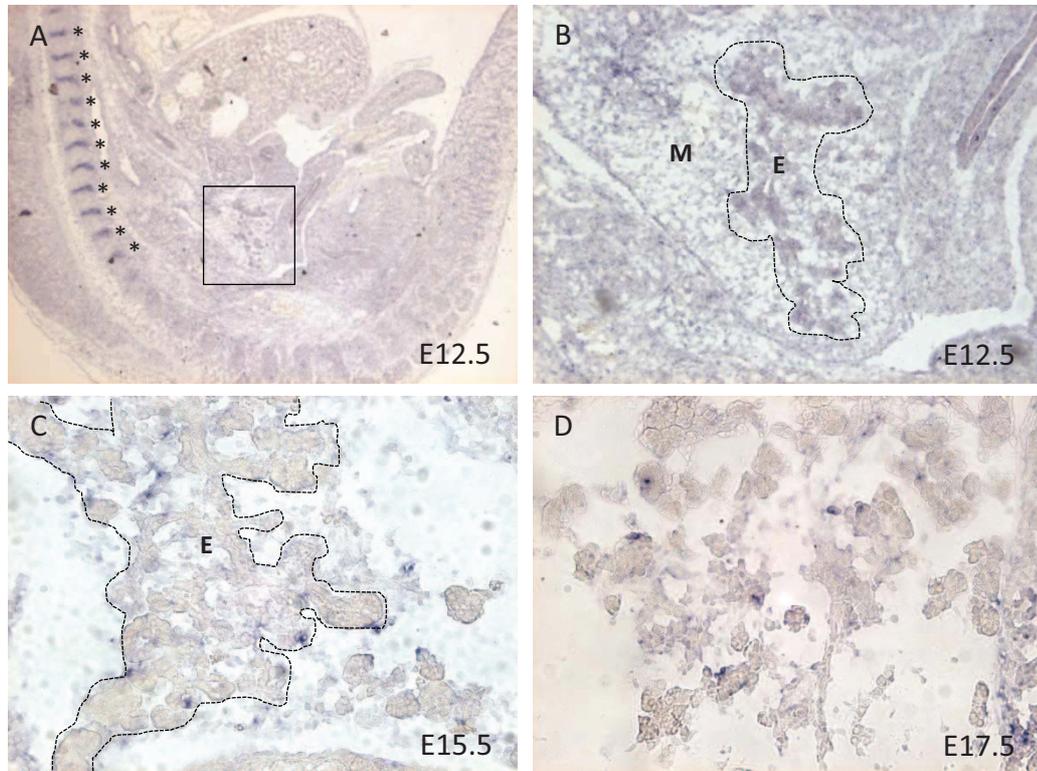


Figure 36: L'expression d'Artn dans le pancréas embryonnaire n'est pas détectée par hybridation *in situ*. Hybridation *in situ* sur cryocoupes d'embryons à différents stades. L'expression d'Artn est détectée au niveau des sclérotomes (*) au stade E12.5 (A), mais pas au niveau du pancréas embryonnaire à ce même stade (B). L'expression d'Artn n'est pas détectée dans le pancréas embryonnaire à 15.5 (C), ni à E17.5 (D). E: épithélium pancréatique; M: mésenchyme pancréatique; la photo B est le grossissement de la photo A délimité par un carré; l'épithélium pancréatique est délimité par une ligne noire en pointillées. Grossissement en A: 2,5X; Grossissement en B: 10X; Grossissement en C et D: 20X.

les sclérotomes en utilisant une coloration au XGal sur des embryons E13.5 $Artn^{+/LacZ}$ (Fig 38D). Ces premiers résultats démontrent que la sonde que nous avons synthétisée est spécifique à l'expression d'*Artn*. Au niveau du pancréas, aucun signal n'a pu être observé pour *Artn* dans le mésenchyme ou l'épithélium pancréatique à E12.5 (Fig 36B), E15.5 (Fig 36C) et E17.5 (Fig 36D), suggérant qu'*Artn* n'est pas ou est très faiblement exprimé dans le pancréas embryonnaire.

Malgré l'absence de signal lors des ISH, nous avons quand même voulu savoir si nous pouvions détecter la protéine *Artn*. Nous avons testés trois anticorps en immunofluorescence sur des coupes de tissus pancréatiques adultes (tableau 7) : un chèvre anti-*Artn* (R&D System AF1085), un lapin anti-*Artn* (Abcam ab91009) et un autre lapin anti-*Artn* (Abcam ab1136). L'un des anticorps de lapin (abcam 91009) a donné un signal similaire pour *Artn* lors d'immunofluorescences pour détecter la protéine *Artn* sur des coupes de pancréas adultes sauvages (Fig 37A) et provenant de souris $Artn^{LacZ/LacZ}$ (Fig 37B). Les souris $Artn^{LacZ/LacZ}$ ne produisant pas la protéine *Artn* (Honma et al., 2002), nous avons conclu que cet anticorps était aspécifique. Les deux autres anticorps n'ont pas permis d'observer un signal pour *Artn* sur des coupes de pancréas de souris adultes sauvages.

Nous avons alors voulu tester un autre mode de détection de l'expression d'*Artn* : la coloration au XGal sur des embryons de souris $Artn^{LacZ/+}$. Cette lignée possède la séquence codante pour la β Galactosidase insérée au niveau de la séquence génomique d'*Artn*, conduisant à la perte de l'expression d'*Artn* (Honma et al., 2002). Grâce à des colorations au XGal réalisées sur des embryons entiers de souris $Artn^{LacZ/+}$ à différents stades, Honma et al. 2002 ont réussi à identifier différentes sources d'expression d'*Artn* (Honma et al., 2002). Ainsi, à E11.5 et E12.5, *Artn* est exprimé par le SCG et son innervation (Fig 38A-B). A E13.5, *Artn* est détecté au niveau des sclérotomes (Fig 38D) et à partir de E14.5 l'expression d'*Artn* est aussi détectée au niveau de l'artère mésentérique supérieure (Fig 38E-F) et des artères intercostales (Fig 38C). Nous avons alors cherché à répéter ces données sur des embryons entiers de souris provenant aussi de la lignée de souris $Artn^{+/LacZ}$ publiées par Honma et al. 2002. A E10.5, nous avons observé un signal au niveau du SCG (Fig 39A) ; ce signal est similaire à celui obtenu par Honma et al. 2002 à E11.5 sur embryon entier (Fig 38A), suggérant qu'à ce stade, la lignée de souris $Artn^{+/LacZ}$ permet de répéter les données de Honma et al. 2002. Par contre, à E12.5, mis à part du bruit de fond, aucun signal n'a été observé (Fig 39B). A ce stade, Honma et al. 2002 observent un signal au niveau du SCG et de son innervation (Fig 38B). Nous avons aussi réalisé des colorations au XGal sur des embryons entiers $Gfra3^{+/tLacZ}$ afin de savoir si notre lignée de souris $Gfra3^{+/tLacZ}$ permettait de répéter le patron d'expression présenté par Honma et al. 2002. Nous avons alors pu observer, sur des embryons E15.5, un signal correspondant aux données de Honma et al. 2002, au niveau de la chaîne latérale sympathique et de ses projections (Fig 39C), démontrant que notre lignée de souris $Gfra3^{+/tLacZ}$ correspond à celle publiée par Honma et al. 2002, mais aussi que notre protocole de coloration au XGal permet bien de détecter l'activité de la β galactosidase. Par

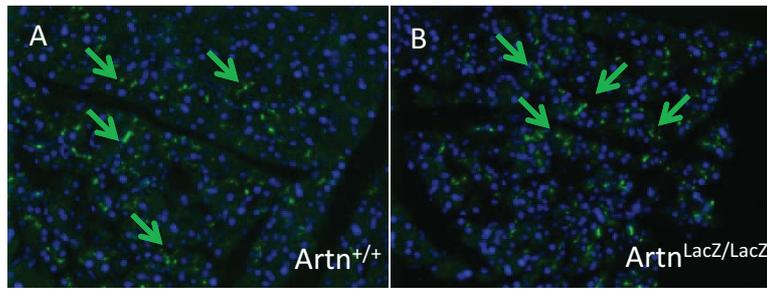


Figure 37: L'anticorps dirigé contre Artn Abcam ab91009 a donné un signal aspécifique dans le pancréas adulte. L'incubation avec l'anticorps anti-Artn ab91009 de cryocoupes de pancréas adultes de souris sauvages (A) et mutantes pour Artn (B) a conduit à observer un signal similaire pour Artn (flèches vertes) entre ces deux génotypes. Grossissement : 20X.

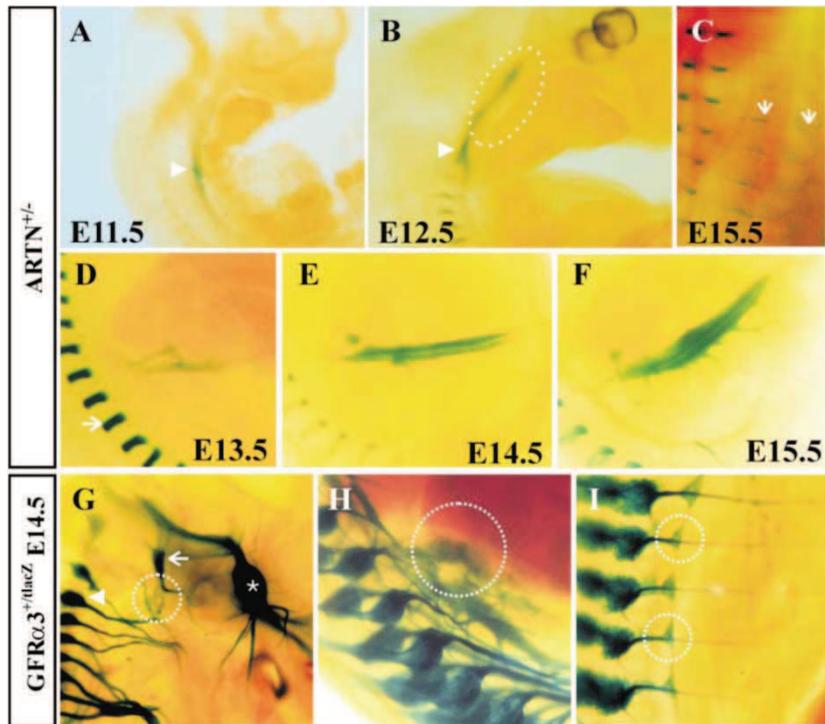


Figure 38: Expression de Gfra3 et Artn au cours du développement chez l'embryon de souris. A et B : Artn est exprimé aux alentours du SCG à E11.5 et E12.5 (flèche blanche) et par l'innervation du SCG (cercle pointillé). C : à E15.5, Artn est exprimé au niveau des artères intercostales (flèches blanches). D à F : Artn est exprimé par l'artère mésentérique supérieure et les sclérotomes (flèche blanche). G à I : Gfra3 est exprimé par le SCG (cercle pointillé en G), les ganglions prévertébraux (cercle pointillé en H), les ganglions de la chaîne sympathique (cercles pointillés en I) ainsi que par les ganglions sensitifs périphériques (flèches et * en G). D'après Honma et al., 2002.

contre, la même technique de coloration au XGal appliquée à des coupes d'embryons $Gfra3^{+/tLacZ}$ n'a pas permis d'observer de signal pancréatique pour $Gfra3$ (Fig 39D). Ces dernières données sont surprenantes, compte tenu des données que nous avons collectées concernant l'expression de $Gfra3$. En effet, par coloration au XGal nous observons un signal pour $Gfra3$ sur des embryons entiers $Gfra3^{+/tLacZ}$ cohérent avec les données publiées (Fig 39C). Sur des coupes d'embryons sauvages nous avons détecté le transcrit de $Gfra3$ par ISH à E15.5 (cf. paragraphe II. C. 3.3 avec la Fig 51E) ainsi que la protéine par immunofluorescence (Fig 2I-K du papier), démontrant que $Gfra3$ est bien exprimé par le pancréas embryonnaire. En théorie, nous devrions donc observer un signal lors de nos colorations XGal correspondant au patron d'expression de $Gfra3$. L'absence de signal observé est difficile à expliquer. Il est probable que ce résultat soit lié à un défaut technique, tel que la qualité de la fixation du tissu, des coupes réalisées ou encore du temps de coloration.

Concernant l'expression d'**Artn** par des colorations au XGal, nous avons réalisé de multiples essais et tenté aussi le protocole de Salmon Gal, décrit pour être plus rapide et plus sensible (Sundararajan et al., 2012) que la technique au XGal, mais nous n'avons jamais observé de signal sur nos embryons ou coupes embryonnaires $Artn^{+/LacZ}$. Nous nous sommes alors interrogés sur l'identité et la fiabilité de notre lignée de souris $Artn^{+/LacZ}$. Pour géotyper cette lignée, l'oligonucléotide sens est placé dans la partie de la séquence d'**Artn** non affectée par l'insertion de la séquence **LacZ**. Les oligonucléotides réverses, interrogeant la présence de l'allèle sauvage ou codant pour la β Galactosidase sont positionnés dans la partie délétée en cas d'insertion de la séquence **LacZ** (Fig 40). Ainsi, la réaction de PCR amplifie une séquence spécifique à la lignée $Artn^{+/LacZ}$. Les géotypages réalisés indiquent bien la présence de l'allèle **LacZ** au niveau de la séquence génomique d'**Artn**. Par ailleurs, les souris adultes géotypées $Artn^{LacZ/LacZ}$ présentent bien un ptosis uni- quelques fois bilatéral. Ces données confirment bien que nous possédons une lignée de souris $Artn^{+/LacZ}$. Les colorations au XGal montrent un signal au niveau du SCG à E10.5 mais aucun signal à des stades plus tardifs. Ces données résultent peut être d'une extinction du transgène au cours du développement de la souris. Il est possible que suite à un évènement de recombinaison, des séquences essentielles à l'expression de **Artn** se déclare et de son origine □ ADDIN EN.CITE <EndNote><Cite><Author>Molven</

En résumé, les seules données que nous ayons, concernant l'expression d'**Artn** au cours du développement du pancréas sont les PCR quantitatives réalisées sur les épithélia et mésenchymes à E12.5 (Fig 4A du papier), dans lesquelles l'expression d'**Artn** est détectée au niveau du mésenchyme pancréatique. Ces données, ainsi que l'absence de signaux obtenue lors des ISH et des immunofluorescences suggèrent qu'**Artn** est faiblement exprimé dans le pancréas en développement. La seule expérience qui nous a permis d'observer un signal pour **Artn** sont les immunofluorescences dirigées contre **Artn**, sur des coupes de pancréas à E13.5 provenant de souris transgéniques surexprimant **Artn** dans l'épithélium pancréatique (Fig 12K-P du papier). Le fait d'obtenir un signal

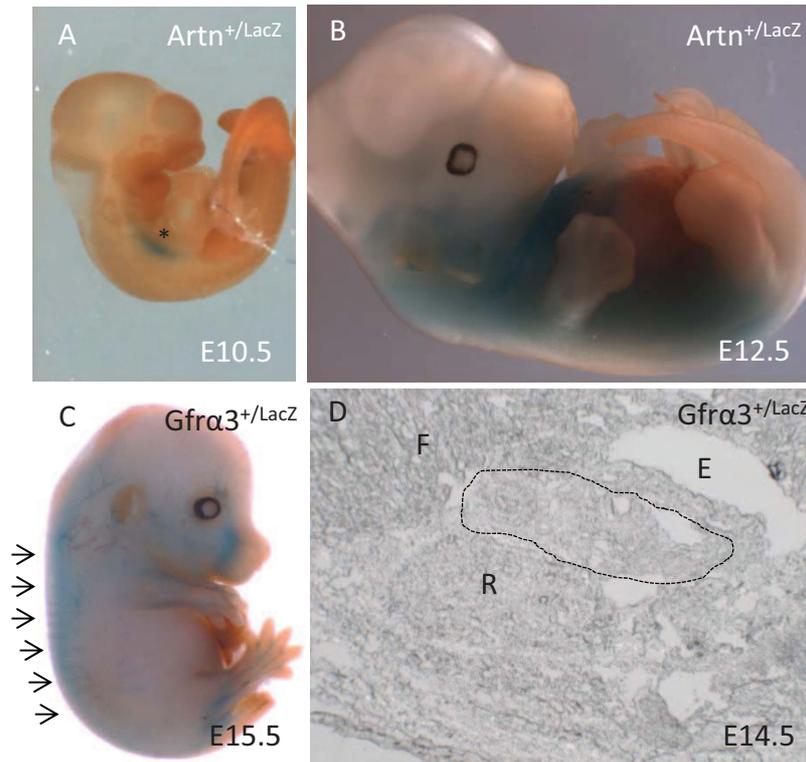


Figure 39: Etude de l'expression d'Artn et Gfra3 par coloration au X-Gal sur embryons entiers et coupes embryonnares $Artn^{+/LacZ}$ et $Gfra3^{+/LacZ}$. (A et B) Colorations au X-Gal sur embryons $Artn^{+/LacZ}$. Un signal, similaire à celui observé par Honma et al. 2002 au niveau du SCG (*) à E11.5, est observé à E10.5 (A). A E12.5, seulement du bruit de fond a été obtenu (B) et aucun signal similaire à celui publié par Honma et al. 2002 n'a été obtenu. (C et D) Colorations au X-Gal sur des embryons entiers et des coupes embryonnares $Gfra3^{+/LacZ}$ (C) à E15.5 un signal pour Gfra3 le long de la chaîne latérale sympathique (flèches) a été observée, mais (D) la même technique sur des coupes d'embryons E14.5 n'a pas permis d'observer de signal pancréatique. E: estomac; F: foie; R: rein; le pancréas est délimité par la ligne noire pointillée.

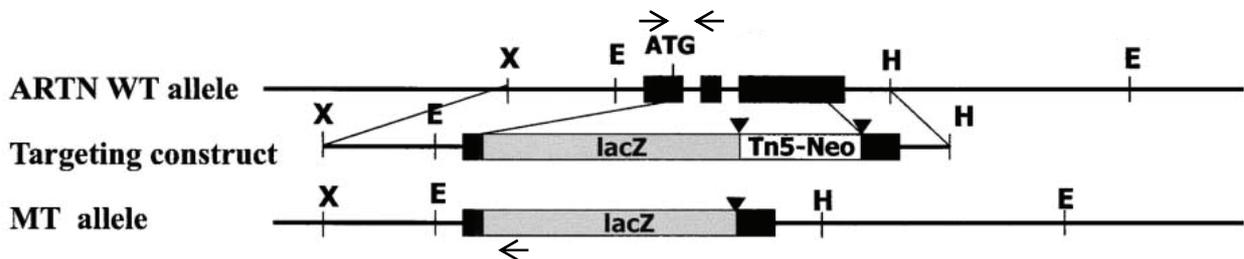


Figure 40: Construction ayant permis la perte de la production d'Artn par l'insertion de la séquence codante pour le β Galactosidase dans le gène d'Artn. Les flèches représentent la position des oligonucléotides pour le génotypage. D'après Honma et al. 2002.

pancréatique pour la protéine Artn uniquement dans un modèle surexprimant cette protéine confirme notre hypothèse selon laquelle Artn est très faiblement exprimée dans le pancréas de souris sauvages.

2. Etude de gain de fonction.

2.1. Culture d'explants pancréatiques en présence d'Artn recombinant.

2.1.1. Contexte

La culture d'explants pancréatiques est un système connu pour récapituler *in vitro* le développement du pancréas (Attali et al., 2007; Duvillie et al., 2006; Mellitzer et al., 2004). Nous avons utilisé ce système afin de savoir si Artn a un effet sur la différenciation des cellules endocrines.

2.1.2. Méthodes

Nous avons choisi de prélever des bourgeons pancréatiques au stade E11.5, pour des raisons techniques de dissection, mais aussi car nous savons que Gfra3, le récepteur d'Artn, est déjà exprimé dans l'épithélium pancréatique (Fig 2A-D du papier) à ce stade, ce qui suggère qu'Artn est déjà actif. De plus, ce stade nous permet de caractériser l'effet de l'ajout d'Artn dans le milieu de culture lors de ce qui correspond à la période de seconde transition du développement du pancréas, période caractérisée par une vague de prolifération et de différenciation cellulaire. Ainsi, les bourgeons pancréatiques d'embryons CD1 à E11.5 ont été disséqués dans de l'**Hank Buffer Salt Solution** (HBSS), puis cultivés dans une étuve à 37°C, 5%CO₂ sur des filtres (Millipore 0,45µm FHLC ; FHLC01300), déposés sur du milieu DMEM / Ham-F12 (1:1) ; 1% FCS ; Penicilline ; Streptomycine ; glucose 3,15g/L concentration finale ; glutamine 2mM final. Comme la concentration optimale d'Artn dans le pancréas embryonnaire n'est pas connue, nous avons testé différentes concentrations, 0, 20, 50 ou 100ng.mL⁻¹ d'Artn recombinant (R&D Systems ; 1085-AR) en nous basant sur les concentrations utilisées lors de cultures de neurones ou de lignées cellulaires neuronales (Andres et al., 2001; Baloh et al., 1998; Masure et al., 1999). Le milieu de culture était changé tous les deux jours.

Les différentes conditions testées sont résumées dans le tableau 5. Dans un premier temps, seul l'épithélium pancréatique était cultivé, afin d'éviter toute interférence de notre culture en présence d'Artn avec des signaux provenant du mésenchyme. Le mésenchyme était dissocié de l'épithélium suite à une digestion à la collagénase 0,5mg.mL⁻¹ (C9722 Sigma aldrich).

Dans un second temps, nous avons cultivé les épithélia pancréatiques en présence de leur mésenchyme afin de savoir si cette structure est essentielle à l'effet d'Artn.

Différents temps d'incubation (1, 2, 4 ou 7 jours de culture) ainsi que différents types de culture ont été testés (sur filtre (Millipore FHLC01300), en Matrigel (BD Biosciences 356234) ou en collagène (27µg.mL⁻¹ Sigma Aldrich C7661), afin d'optimiser les conditions dans lesquelles Artn agit

Tableau 5: tableau récapitulatif des conditions de culture d'explants pancréatiques testées. Lors des cultures d'explants pancréatiques à E11.5 en présence de ligand Artn, différents protocoles ont été testés. Avec ou sans mésenchyme, afin de s'affranchir des signaux provenant de ce tissu, ainsi que sur différents supports : sur filtres, en collagène et en matrigel. Les données ont été analysées soit par PCR quantitative, soit par immunofluorescence. L'ensemble des analyses réalisées n'a pas permis d'observer de variation de l'expression de *Ngn3*, de l'*insuline* ou du *glucagon*, ou du nombre de cellules Ngn3⁺, de l'aire de l'insuline et de l'aire du glucagon

Mode de culture	Temps d'incubation (jours)	mésenchyme	Type d'analyse	Résultats
Filtres	1;2;4;7	oui	PCR quantitatives Immunofluorescence	Pas de variation de l'expression de <i>Ngn3</i> , de l' <i>insuline</i> , ni du <i>glucagon</i> ; pas de variation du nombre de cellules Ngn3 ⁺ , ni de la différenciation endocrine
Filtres	1;2;4;7	non	PCR quantitatives Immunofluorescence	
Matrigel	1;4;7	non	PCR quantitatives	
Collagène	1;4;7	non	PCR quantitatives	

sur le développement du pancréas. L'analyse des résultats était réalisée soit par qPCR, afin de savoir si l'ajout d'Artn dans le milieu a un impact sur l'expression de *Ngn3*, de l'*Insuline* et du *Glucagon*, soit par immunofluorescence pour savoir si l'ajout d'Artn au milieu impacte sur le nombre de cellules *Ngn3*⁺ et/ou la différenciation endocrine.

2.1.3. Résultats et discussions

L'analyse par qPCR de l'expression des gènes *Ngn3*, *insuline* et *glucagon* (Fig 41A) n'a pas montré de différences significatives de l'expression de ces gènes entre les explants traités et les explants non traités, quel que soit les conditions de culture utilisées. Un résultat similaire a été obtenu par quantification en immunofluorescence (Fig 41B) concernant le nombre de cellules *Ngn3* et l'aire de l'insuline et du glucagon.

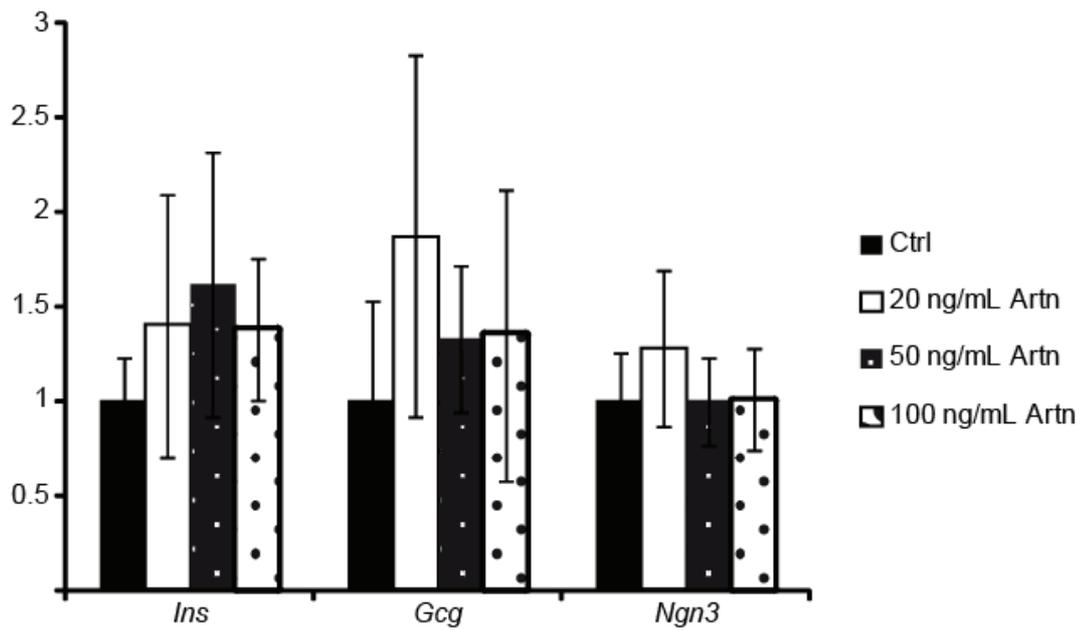
En conclusion, l'ajout d'Artn recombinant à des cultures d'explants pancréatiques n'a pas permis d'observer d'effet sur la différenciation endocrine. Ces résultats suggèrent, soit qu'Artn n'est pas impliqué dans la différenciation endocrine au cours du développement du pancréas, soit que notre système de culture d'explants n'est pas adapté pour étudier le rôle d'Artn au cours du développement du pancréas. En effet, il est possible que les concentrations utilisées ne correspondent pas à la concentration optimale d'effet d'Artn, qui chez l'embryon sauvage, est très faible et que de ce fait, il soit inutile de rajouter de l'Artn dans le milieu. Il est aussi possible que le stade ne soit pas adapté. En effet, d'après la Figure 2 du papier en préparation, *Gfra3* est exprimé à E10.5, suggérant que la voie de signalisation Artn/*Gfra3* est déjà active à ce stade. Il est possible que l'effet d'Artn soit concentré à ce stade, ce qui ne permettrait pas d'observer un effet de l'ajout d'Artn à un stade plus tardif.

2.2. Test de migration cellulaire

2.2.1. Contexte

Au cours du développement du rein, la voie de signalisation *Gdnf*, exprimé par le mésenchyme, *Ret*, exprimé par les cellules épithéliales du bourgeon hépatique et *Gfra1*, exprimé à la fois par l'épithélium et le mésenchyme pancréatique, permettent la migration des cellules du bourgeon rénal à travers le mésenchyme et leur prolifération (Dressler, 2006). Chez l'embryon de poulet, *Nrtn*, exprimé par les cellules endothéliales du ductus venosus et *Gfra2*, exprimés par les cellules épithéliales du bourgeon hépatique, permettent la migration du foie en formation le long du ductus venosus (Tatsumi et al., 2007). Ainsi, la famille des ligands et récepteurs du *Gdnf* agissent aussi comme des chemoattractants dans des processus de migration cellulaire non neuronaux. Or, au cours du développement du pancréas, les cellules endocrines en différenciation délaminent de l'épithélium pancréatique et migrent à travers le mésenchyme pour s'agréger et former les prémisses des îlots adultes (Gouzi et al., 2011). Afin de savoir si la voie de signalisation Artn/*Gfra3* a un rôle dans ce

A



B

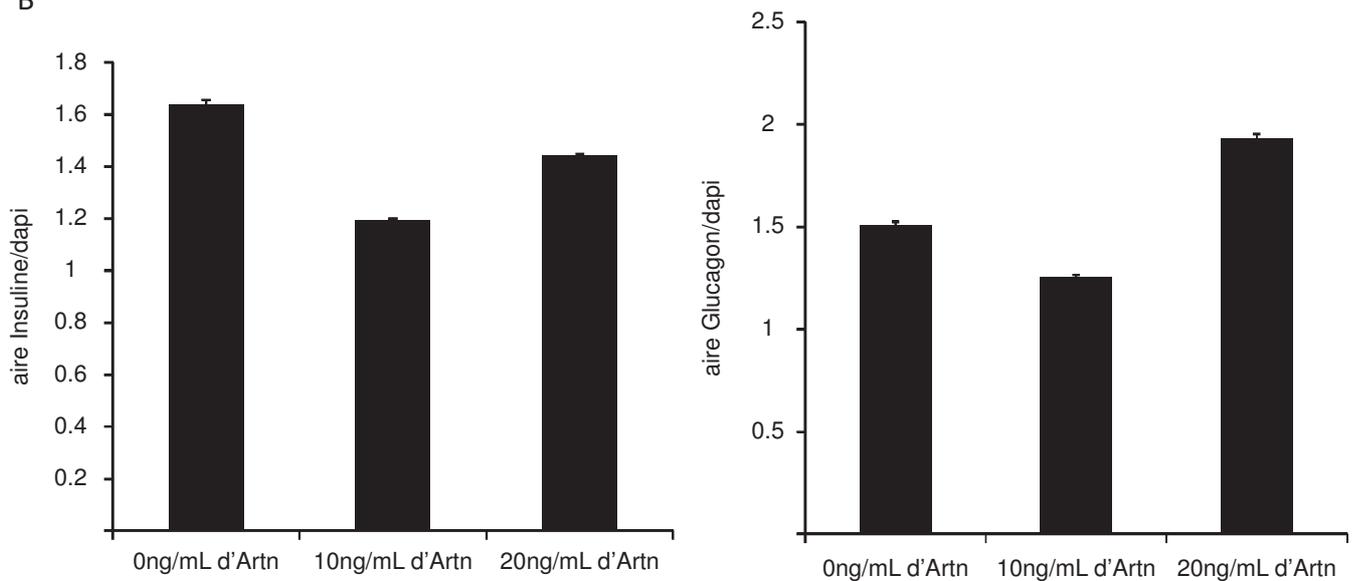


Figure 41: Exemples de résultats obtenus lors de culture d'explants pancréatiques en présence de différentes concentrations de ligand Artn. Résultats de PCR quantitatives sur des explants cultivés avec leur mésenchyme pendant 7 jours, sur filtres, en présence de différentes concentrations de ligand Artn (A). Résultats de quantification par immunofluorescence de la différenciation endocrine sur des explants cultivés avec mésenchyme pendant 7 jours, sur filtres, en présence de différentes concentrations d'Artn (B). Dans les deux cas, aucune variation significative de l'expression de l'*insuline*, du *glucagon*, de *Ngn3* ou de la différenciation endocrine n'a été observée.

processus de délamination des progéniteurs endocrines au cours du développement du pancréas, nous avons voulu élaborer un système simple, nous permettant de tester *in vitro* la migration de cellules sécrétrices d'insuline en présence d'une source d'Artn en utilisant une lignée de cellules à insuline : les cellules Min6.

2.2.2. Méthodes

Dans premier temps, des billes d'héparine (Adar Biotech 6024-5/10/25) étaient incubées avec 10ng.mL^{-1} d'Artn recombinant (R&D Systems ; 1085-AR) ou de la BSA (0,1%, MP 160069), dilué dans le milieu d'incubation des cellules Min6 pendant 1h sous agitation.

Puis, ces billes imprégnées de ligand ou de BSA étaient placées dans des gouttes de collagène ($27\mu\text{g.mL}^{-1}$ Sigma Aldrich C7661), déposées à la micropipette dans un puits de plaque 6 puits (Falcon 353046). Les plaques étaient ensuite placées pendant 1h à 37°C afin de laisser le collagène polymériser. Ensuite, 2.10^5 cellules Min6 étaient déposées par puits et incubées dans une étuve à 37°C , 5% CO_2 .

2.2.3. Résultats et discussions

Afin de savoir si les cellules Min6, qui dérivent d'insulinome de souris adulte (Lilla et al., 2003; Miyazaki et al., 1990), peuvent répondre au ligand Artn, nous avons testé par immunofluorescence la présence de Gfra3 dans ces cellules. L'analyse de ces immunofluorescences a permis d'observer l'expression du récepteur Gfra3 au niveau de la membrane d'~40% de ces cellules (Fig 42A à C, flèches jaunes), ce qui suggère que les cellules Min6 sont potentiellement capables de répondre au signal donné par le ligand Artn.

Au cours des expériences de tests de migration, aucune tendance à la migration des cellules Min6 n'a été constatée en direction de billes imprégnées d'Artn recombinant (Fig 43A), comparé aux billes imprégnées de BSA (Fig 43B).

En réalité, l'utilisation de cellules Min6 n'est pas du tout adapté à notre étude. Les cellules Min6 poussent généralement en agrégat, elles n'ont pas de caractère migratoire et la potentielle influence d'un gradient d'Artn généré par les billes sur l'orientation de la prolifération des cellules en direction des billes imprégnées d'Artn reste une grande incertitude.

Un système de culture d'explants pancréatiques similaire à celui réalisé par Muñoz-Bravo et al. 2013 pourrait nous permettre de savoir si la voie de signalisation Artn/ Gfra3 a en effet un rôle lors de la délamination des cellules endocrines embryonnaires. Dans leur système, des explants pancréatiques E12.5 cultivés pendant 4 jours avec des billes imprégnées de Gdnf présentent une extension des prolongations neuronales ainsi qu'une migration des progéniteurs neuronaux au sein des explants en direction des billes imprégnées de Gdnf. Nous pourrions commencer par essayer de répéter ces expériences, afin de nous assurer que nous maîtrisons la culture d'explants en présence de billes

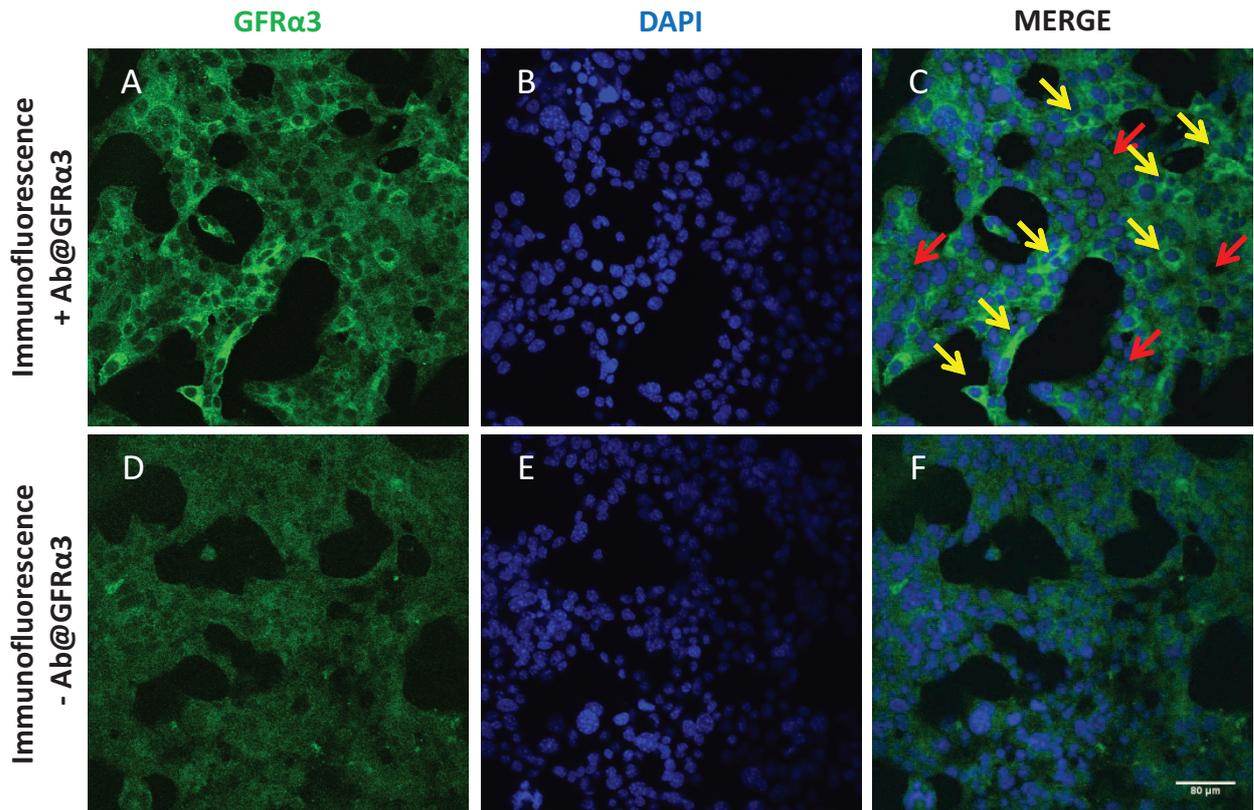


Figure 42: Une population de cellules Min6 exprime Gfr α 3. A à C: Immunofluorescence anti- Gfr α 3 sur cellules Min6. D à F : Immunofluorescence contrôle (sans anticorps dirigé contre Gfr α 3) sur cellules Min6. Flèches jaunes : cellules Min6 Gfr α 3⁺. Flèches rouges: cellules Min6 Gfr α 3⁻. Ab@ Gfr α 3: anticorps dirigé contre Gfr α 3. Barre d'échelle : 80 μ m appliquées à toutes les photos.

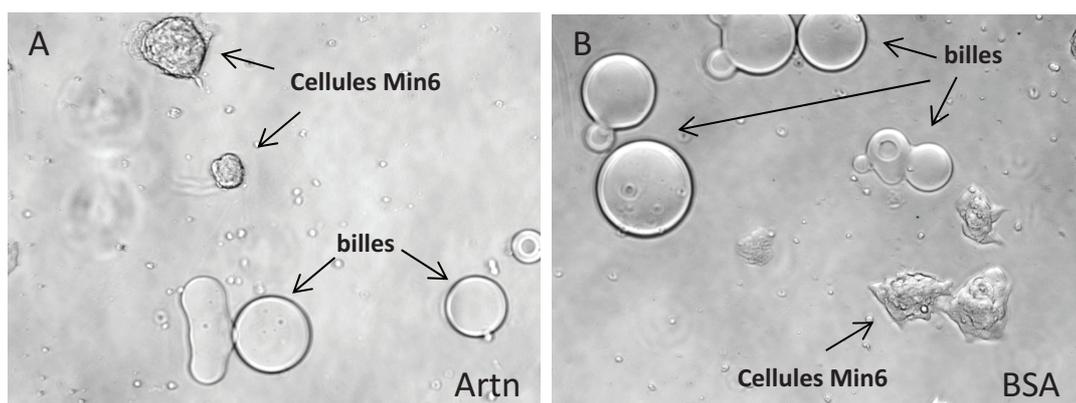


Figure 43: les cellules Min6 cultivées en présence de billes imprégnées d'Artin ne présentent pas de tendance à migrer vers les billes. A: cellules Min6 cultivées en présence de billes imprégnées d'Artin. B : cellules Min6 cultivées en présence de billes imprégnées de BSA. Grossissement : X10

imprégnées de ligands. Ensuite, nous pourrions tester l'effet de l'ajout de billes imprégnées d'Artn dans des cultures d'explants pancréatiques à E12.5 et ainsi savoir si Artn peut agir aussi sur la migration des cellules glucagon⁺ et/ou insuline⁺, contenues dans ces explants. Ce système nous permettrait aussi de tester l'effet sur la migration et la formation du système nerveux au sein des explants.

2.3. [Elaboration d'une lignée de souris transgéniques surexprimant Artn au cours du développement du pancréas \(réalisée avec Delia Esteban Martin et Joël Herrmann\)](#)

2.3.1. Contexte

Les expériences de gain de fonction avec les cultures d'explants n'ont pas permis de tirer de conclusion quant au rôle de la voie de signalisation Artn/Gfra3 au cours du développement du pancréas. Les cultures d'explants pancréatiques peuvent présenter plusieurs points limites : tout d'abord, la qualité des dissections. Il est possible que tout le mésenchyme n'ait pas été correctement retiré sur certains de nos explants lorsque nous faisons nos cultures d'épithélia pancréatiques sans mésenchymes ou encore, que tout le bourgeon pancréatique n'ait pas été correctement disséqué sur certains des explants. Il est aussi possible que tous les embryons n'aient pas été exactement au même stade lors de nos dissections, ce qui peut aussi induire des variations dans l'expression de *Ngn3*, de l'*insuline* et du *glucagon* entre les explants. Afin de nous affranchir des limites imposées par l'étude de gain de fonction *in vitro*, nous avons décidé de créer un modèle de gain de fonction qui nous permettrait d'étudier le rôle de cette voie de signalisation *in vivo* au cours du développement du pancréas : une souris transgénique exprimant la séquence codante pour Artn sous l'induction des séquences promotrices de Pdx1. Nous avons choisi le promoteur du facteur de transcription Pdx1 afin de surexprimer Artn dans l'épithélium pancréatique dès les premiers stades du développement du pancréas. La séquence codante pour la protéine totale Artn est suivie de la séquence codante pour le peptide autoclivable 2A (Provost et al., 2007; Trichas et al., 2008), puis de la séquence codante pour le fluorophore mCherry. Ainsi, nous pourrions produire un ARN polycystronique, qui lorsqu'il sera traduit en protéines, génèrera une protéine Artn qui sera séparée de la mCherry suite à l'autoclivage du peptide 2A. L'utilisation de la mCherry nous permettra de vérifier et de suivre l'expression de notre transgène. La présence de la mCherry nous permet aussi d'envisager des expériences de tri au FACS, si par exemple, nous voulons croiser nos souris transgéniques pPdx1-Artn-2A-mCherry (aussi appelées PAM) avec la lignée de souris *Ngn3*-eYFP et savoir si le pourcentage de cellules YFP⁺ est impacté par la surexpression d'Artn.

2.3.2. Méthodes

La stratégie élaborée afin de vérifier l'expression de la construction pPdx1-Artn-2A-mCherry dans des modèles cellulaires *in vitro*, puis la génération des souris transgéniques surexprimant Artn dans l'épithélium pancréatique est résumée dans la Fig 44.

La séquence codante pour l'insert Artn-2A-mCherry (séquence d'ADN synthétique commandée auprès de Genscript, ref 190300_1) est arrivée clonée dans le plasmide pUC57. Cette séquence est flanquée de séquences reconnues par l'enzyme de restriction XbaI. Par ailleurs, le plasmide pUC57 possède plusieurs sites de restriction pour l'enzyme PvuI. Ainsi, le plasmide pUC57 a été digéré avec les enzymes de restriction XbaI, afin de sortir l'insert Artn-2A-mCherry, et PvuI afin de digérer le reste du plasmide.

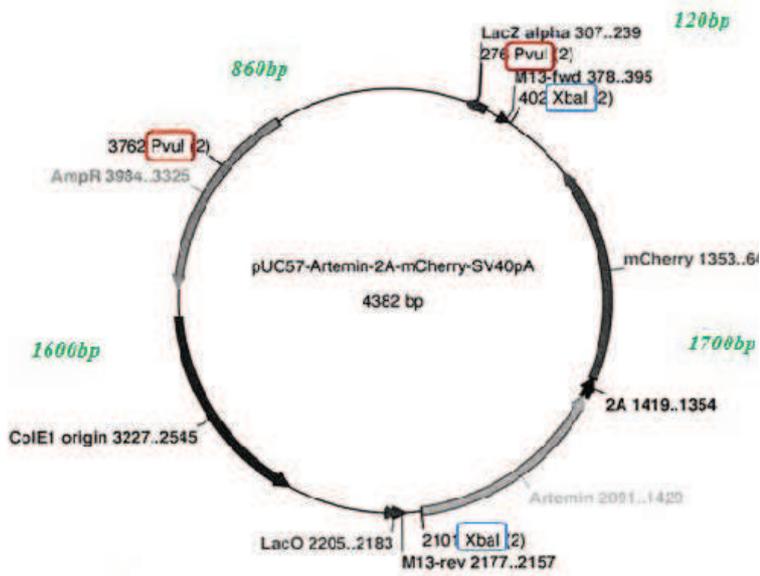
En parallèle, le plasmide pCRII-pPdx1 (don du laboratoire d'Anne Grapin-Botton, Copenhague, (Johansson et al., 2007)) comportant la séquence reconnue par l'enzyme de restriction XbaI en aval des séquences promotrices de Pdx1 a été digéré par XbaI. L'insert Artn-2A-mCherry a ainsi pu être ligué dans le plasmide pCRII-pPdx1 grâce aux extrémités cohésives générées par les digestions XbaI de l'insert et du plasmide pCRII-pPdx1. Le plasmide pCRII-pPdx1-Artn-2A-mCherry comporte deux sites de restriction EcoRV, situés de part et d'autre de la séquence pPdx1-Artn-2A-mCherry, ce qui a permis, suite à une digestion par EcoRV, de générer la séquence d'ADN linéaire comportant les séquences régulatrices de Pdx1 et l'insert Artn-2A-mCherry afin de générer des souris transgéniques.

Nous avons vérifié l'expression du transgène Artn-2A-mCherry dans les cellules Min6 transfectées grâce à la Lipofectamine 2000[®] avec le plasmide pCRII-pPdx1-Artn-2A-mCherry, car nous avons besoin d'un système dans lequel le promoteur Pdx1 est actif (Szabat et al., 2009). L'expression de la construction pCRII-pPdx1-Artn-2A-mCherry a été testée par Western blot.

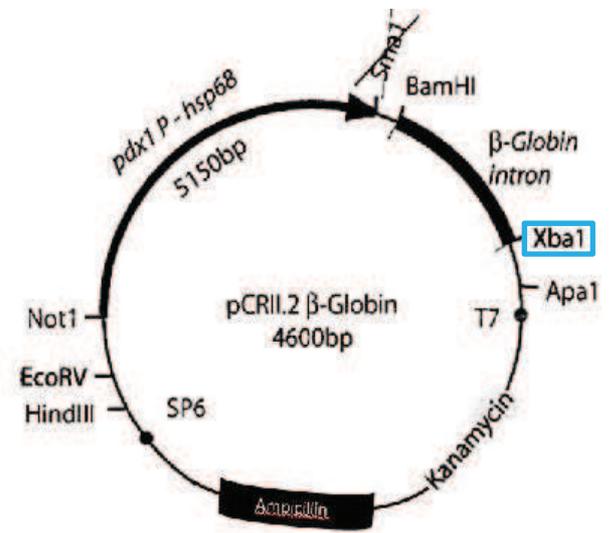
Nous avons aussi testé l'expression de notre transgène avec les cellules Hek (Human Embryonic Kidney), dans lesquelles le promoteur Pdx1 n'est pas actif. Nous avons alors cloné l'insert Artn-2A-mCherry dans un plasmide pCDN3 possédant le promoteur fort CMV, générant ainsi le plasmide pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry. L'expression du transgène Artn-2A-mCherry a été testée par Western blot sur les cellules Hek293T transfectées grâce à la Lipofectamine 2000[®] avec le plasmide pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry. Pour nous assurer de la bioactivité de l'Artn produit par les cellules Hek293T transfectées avec le plasmide pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry, des tests de différenciation et de prolifération sur des neuroblastomes (lignée SH-SY-5Y) ont été réalisés.

2.3.3. Résultats et discussion

Après avoir cloné l'insert Artn-2A-mCherry dans le vecteur pCRII-pPdx1, nous avons voulu vérifier que le plasmide **pCRII-pPdx1-Artn-2A-mCherry** ainsi généré exprimait les protéines Artn



Digestion par XbaI et PvuI



Digestion par XbaI

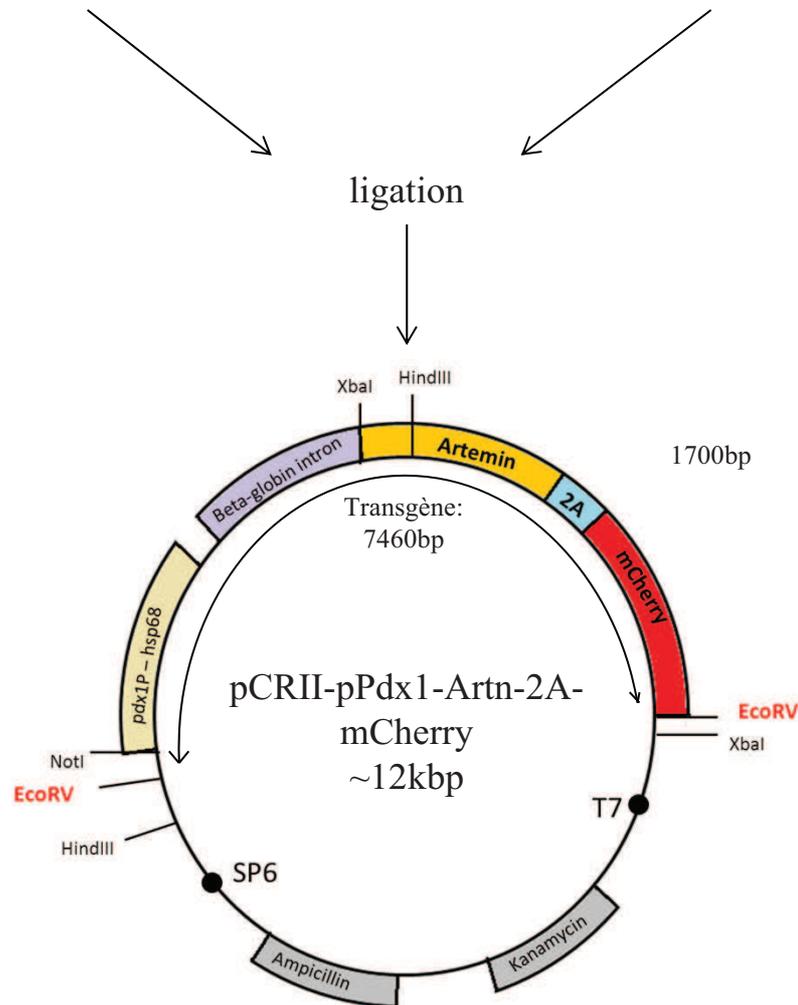


Figure 44: Stratégie de clonage afin d'élaborer le plasmide pCRII-pPdx1-Artn-2A-mCherry dont la linéarisation par EcoRV a généré le fragment pPdx1-Artn-2A-mCherry afin de générer une lignée de souris transgénique surexprimant Artn dans l'épithélium pancréatique. L'insert Artn-2A-mCherry a été sorti du plasmide pUC57-Artn-2A-mCherry et cloné dans le vecteur pCRII-pPdx1 digéré par XbaI.

et mCherry en utilisant un système cellulaire dérivé de cellules endocrines pancréatiques et dans lequel le promoteur Pdx1 est encore actif (Szabat et al., 2009). Ainsi, nous avons transfecté des cellules Min6 avec le plasmide pCII-pPdx1-Artn-2A-mCherry. Ces cellules ont aussi été transfectées avec un plasmide contrôle, le plasmide CMV-GFP afin de nous assurer que les conditions de transfection utilisées permettaient bien la transfection des cellules Min6. L'observation de la fluorescence directe pour la GFP (Fig 45A) nous a permis d'observer une efficacité de transfection de ~20% des cellules Min6. De plus, nous avons pu observer la fluorescence directe de la mCherry dans les boîtes correspondant aux cellules Min6 transfectées avec le plasmide CMV-GFP et le plasmide pCII-pPdx1-Artn-2A-mCherry (Fig 45B, flèches jaunes), signifiant que le plasmide pCII-pPdx1-Artn-2A-mCherry permet bien l'expression du transgène Artn-2A-mCherry.

Nous avons alors voulu vérifier la **présence** de la protéine Artn par Western blot dans les extraits protéiques des cellules transfectées avec le plasmide pCII-pPdx1-Artn-2A-mCherry, ainsi que dans leur milieu de culture, afin de savoir si Artn est aussi sécrété (Fig 45C). Par Western blot, nous avons pu observer une bande à 12kDa dans la piste correspondant à notre contrôle positif (Fig 45C piste 7, rectangle rouge), qui est de l'Artn recombinant provenant de R&D Systems. La taille de 12kDa correspond à la taille annoncée par le fournisseur, ce qui nous indique que l'anticorps utilisé pour ces Western blots est bien spécifique. Cependant, nous n'avons observé aucune bande pour Artn dans les pistes correspondant aux extraits cellulaires (Fig 45C piste 3), ni aux milieux de culture (Fig 45C piste 6) des cellules Min6 transfectées avec le plasmide pCII-pPdx1-Artn-2A-mCherry. Par ailleurs, par Western blot, nous avons aussi voulu confirmer la présence de la protéine mCherry, suggérée par l'observation de la fluorescence directe lors des transfections cellulaires. La taille attendue pour la protéine mCherry est de ~30kDa. L'analyse par Western blot des extraits cellulaires et des milieux de culture provenant de cellules Min6 transfectées avec le plasmide pCII-pPdx1-Artn-2A-mCherry (Fig 45D) a permis d'observer une bande de 30kDa uniquement dans la piste correspondant aux extraits protéiques des cellules Min6 transfectées avec le plasmide pCII-pPdx1-Artn-2A-mCherry (Fig 45D piste 3). Ce résultat nous indique que la protéine mCherry est bel et bien exprimée par le plasmide pCII-pPdx1-Artn-2A-mCherry, que l'anticorps utilisé permet bien la visualisation de la protéine mCherry et que les autres bandes qui peuvent être observées à d'autres tailles dans les extraits protéiques cellulaires (20, 25, 50 ou 70kDa ; Fig 45 pistes 1 à 3) résultent d'une réaction aspécifique de l'anticorps dirigé contre la mCherry. De plus, l'observation d'une bande à 30kDa pour la protéine mCherry, qui correspond à sa taille attendue, indique que le clivage du peptide s'est bien effectué, suite à la traduction de l'ARN polycystronique Artn-2A-mCherry, générant des protéines bien distinctes.

Le fait que la protéine mCherry soit présente dans les extraits protéiques de cellules Min6 transfectées avec le plasmide pCII-pPdx1-Artn-2A-mCherry signifie que notre construction permet l'expression du transgène pPdx1-Artn-2A-mCherry. D'après cette construction, Artn et mCherry font

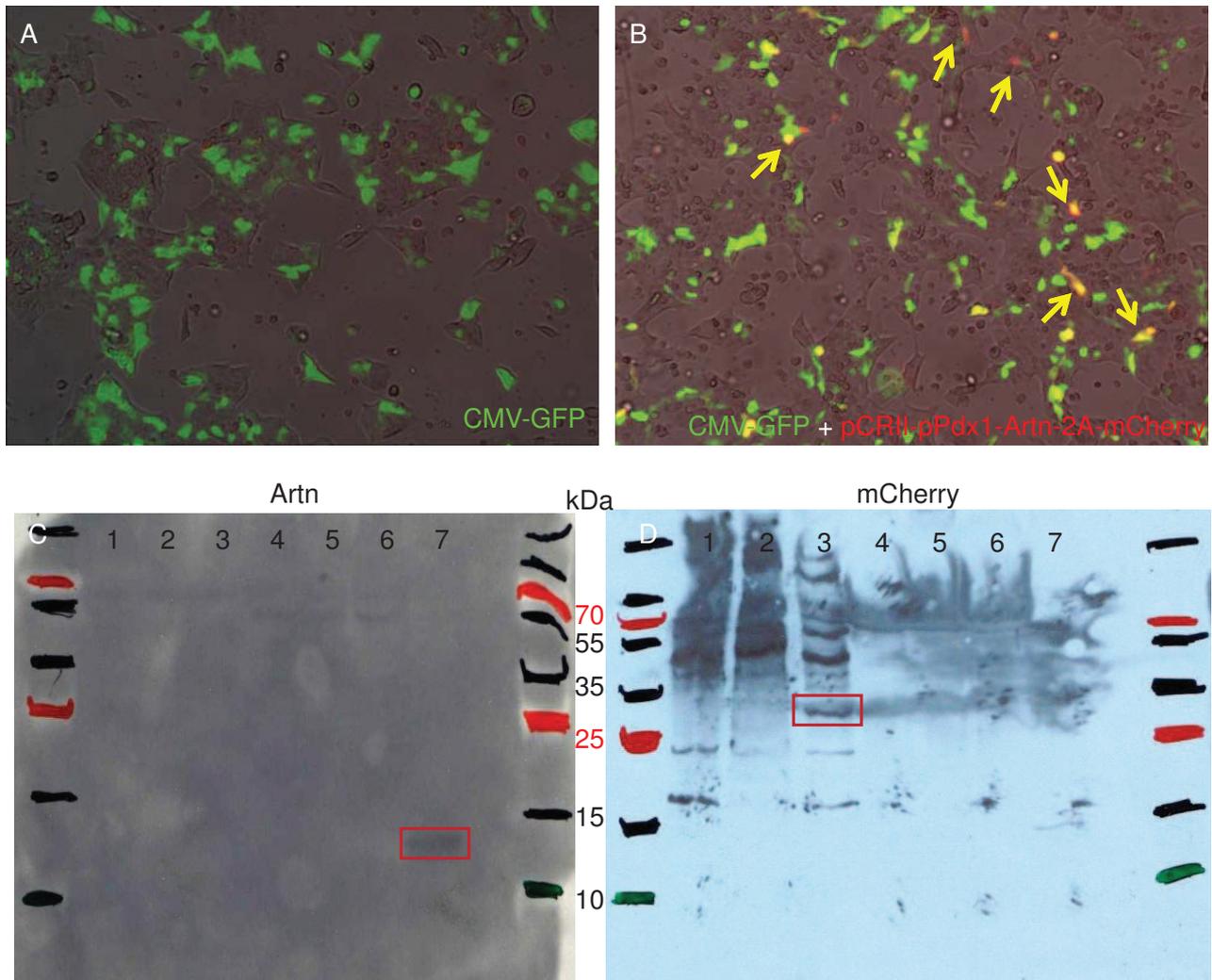


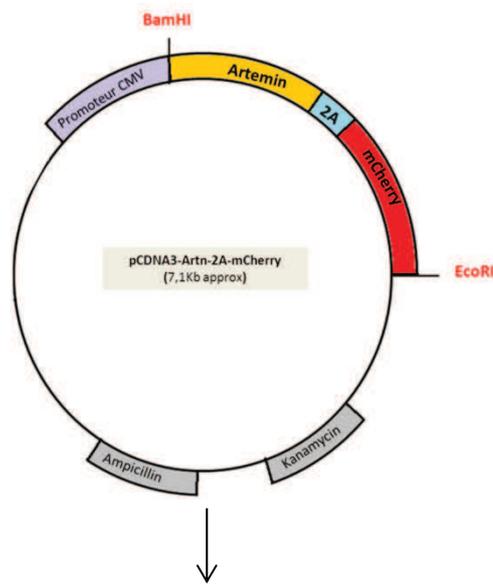
Figure 45: Des cellules Min6 transfectées avec le plasmide pCII-pPdx1-Artn-2A-mCherry produisent la protéine mCherry. Fluorescence directe observée sur des cellules Min6 transfectées avec le plasmide CMV-GFP (A) ou avec les plasmides CMV-GFP et pCII-Pdx1-Artn-2A-mCherry (B). Western blot anti Artn (C) et anti mCherry sur 100µg de protéines (D): extraits protéiques de cellules Min6 non transfectées (1), transfectées avec le plasmide CMV-GFP (2), transfectées avec les plasmides CMV-GFP et pCII-pPdx1-Artn-2A-mCherry (3), milieu de culture de cellules Min6 non transfectées (4), de cellules transfectées avec le plasmide CMV-GFP (5), de cellules transfectées avec les plasmides CMV-GFP et pCII-pPdx1-Artn-2A-mCherry (6), Artn recombinant (R&D Systems) (7). Flèches jaunes: cellules Min6 mCherry⁺.

partie du même transcrit. Nous devrions donc, en théorie, avoir la même quantité de protéine Artn que de protéine mCherry. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence de bande pour la protéine Artn : i) Artn est correctement traduite mais dégradée ensuite au sein de la cellule ou ii) le niveau d'expression d'Artn n'est pas suffisant pour permettre sa détection par notre anticorps.

Afin de savoir si l'absence de détection d'Artn provient d'une insuffisance de son niveau d'expression, nous avons à nouveau cloné la séquence Artn-2A-mCherry, dans un plasmide pCDNA3 contenant un promoteur fort CMV, générant ainsi le plasmide **pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry** (Fig 46). Nous avons choisi d'utiliser un promoteur fort afin d'augmenter la quantité de protéine Artn produite et de pouvoir tester l'expression de l'insert Artn-2A-mCherry dans un autre type cellulaire, qui potentiellement, ne dégraderait pas Artn. Ainsi, des cellules humaines de reins embryonnaires (Hek293T) ont été transfectées avec le plasmide CMV-GFP, donnant une efficacité de transfection d'~60% (Fig 47A). La transfection des cellules Hek293T avec le plasmide CMV-GFP et le plasmide pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry nous a, à nouveau, permis d'observer la fluorescence directe de la mCherry (Fig 47B), signifiant que l'insert Artn-2A-mCherry est exprimé par les cellules Hek293T transfectées avec le plasmide pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry.

Nous avons alors réalisé des Western blots sur des extraits protéiques de cellules transfectées ainsi que sur leur milieu afin de savoir si la protéine Artn était **produite et sécrétée** par les cellules Hek293T transfectées avec le plasmide CMV-Artn-2A-mCherry. La protéine Artn a ainsi pu être détectée uniquement dans les extraits protéiques des cellules Hek293T transfectées avec le plasmide pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry (Fig 47C pistes 5 et 6, rectangle rouge). De plus, la protéine Artn a aussi pu être détectée dans le milieu de ces mêmes cellules transfectées (Fig 47C pistes 1 et 2, rectangle rouge), démontrant ainsi que les cellules Hek293T transfectées avec le plasmide pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry produisent et sécrètent la protéine Artn.

Nous étions surpris par la taille à laquelle nous observons Artn (24kDa). En effet, notre contrôle positif, de l'Artn recombinant (R&D systems), produit et purifié à partir de bactéries, indique une taille de 12kDa pour la protéine active. D'après les données connues sur la séquence d'Artn, cette protéine (ainsi que les autres ligands de sa famille) est sécrétée sous forme de prépropeptide (Baloh et al., 1998). La séquence murine possède deux sites de clivages potentiels pour la furin, une enzyme localisée au niveau du Trans Golgi et impliquée dans la maturation des molécules sécrétées (Nakayama, 1997). En théorie, suite à ce double clivage par la furin, Artn devrait être sécrétée sous une forme mature de 12kDa et s'homodimériser pour induire son action. L'observation d'une bande à 24kDa dans nos cellules transfectées peut signifier, soit, qu'Artn est bien produit à partir de la construction pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry mais non mûré (et donc potentiellement inactif), soit que notre gel n'est pas assez dénaturant et nous observons alors un dimère. Dans la littérature, Artn a été observé par Western blot à 12kDa comme à 24kDa (Bruinzeel and Masure, 2012; Jankowski et al.,



Transfection de cellules Hek293T pour vérifier l'expression de la protéine Artn.

Figure 46: Carte du plasmide pDNA3-Artn-2A-mCherry ayant servi à vérifier l'expression ainsi que la bioactivité de la protéine Artn produite à partir de cellules Hek293T transfectées avec ce plasmide .

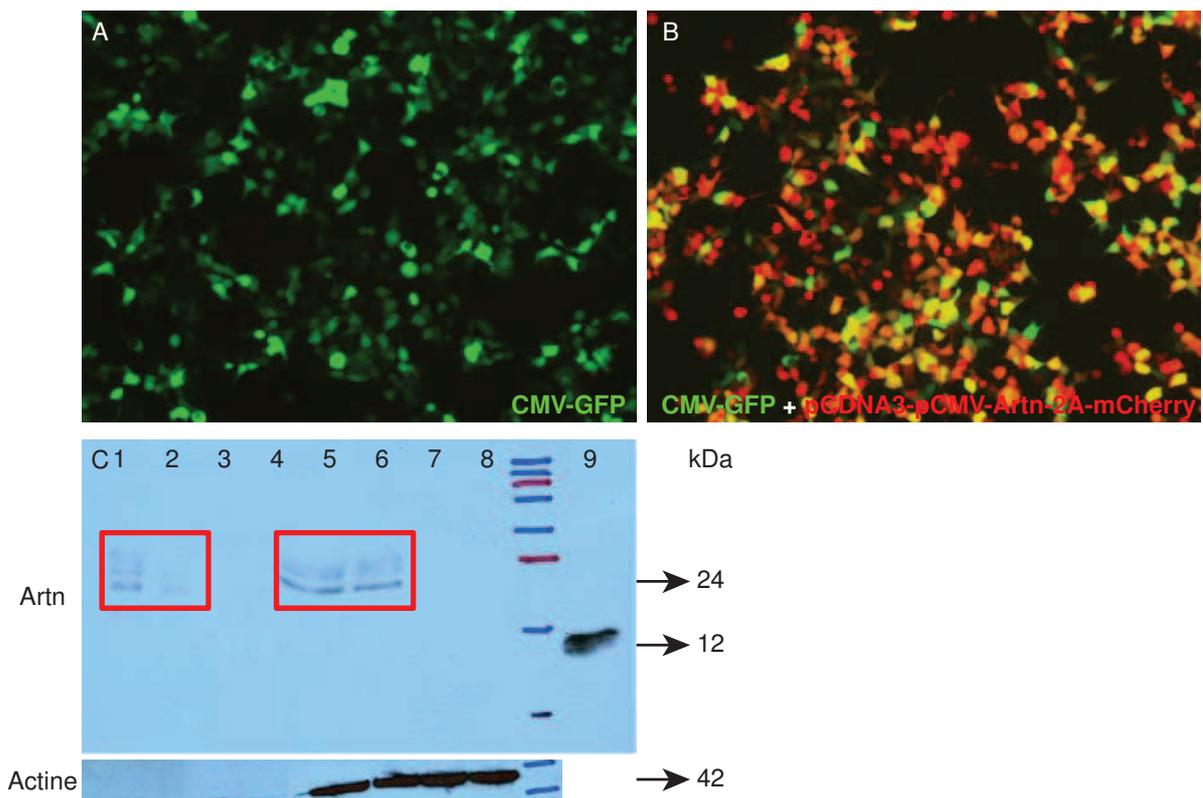


Figure 47: Les cellules Hek293T transfectées avec le plasmide pCDNA3-pCMV-Artn-2A-mCherry produisent et sécrètent la protéine Artn. Fluorescence directe observée sur des cellules Hek293T transfectées avec le plasmide CMV-GFP (A) ou CMV-GFP et pCDNA3-pCMV-Artn-2A-mCherry (B). Western blot anti Artn (C, gel du haut) et anti actine (C, gel du bas): milieux de culture de cellules Hek293T transfectées avec les plasmides CMV-GFP et pCDNA3-pCMV-Artn-2A-mCherry (1 et 2), de cellules Hek293T transfectées avec le plasmide CMV-GFP (3), de cellules Hek293T non transfectées (4), extraits protéiques de cellules Hek293T transfectées avec les plasmides CMV-GFP et pCDNA3-pCMV-Artn-2A-mCherry (5 et 6), de cellules transfectées avec le plasmide CMV-GFP (7), de cellules non transfectées (8), Artn recombinant (R&D Systems) (9).

2010; Lucini et al., 2004). Il semble que la maturation de ce ligand ne soit pas encore tout à fait comprise et que son clivage ne soit pas forcément nécessaire pour son activité (Lee et al., 2001).

Nous avons ensuite voulu nous assurer de la **bioactivité** de notre ligand Artn en testant la différenciation et la prolifération de neuroblastomes humains (lignée SH-SY5Y) en présence d'Artn produit à partir de la construction pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry. Pour ceci, nous avons incubé des neuroblastomes en présence de milieu conditionné, dans lequel nous avons ajouté soit 10 μ M d'acide rétinoïque, soit 50ng.mL⁻¹ d'Artn recombinant, soit 50 μ L de milieu de cellules Hek293T non transfectées, soit 50 μ L de milieu de cellules Hek293T transfectées avec le plasmide CMV-GFP et le plasmide pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry (Fig 48). Ces tests sont basés sur la publication de Baloh et al. 1998, dans laquelle l'ajout de 50ng.mL⁻¹ d'Artn dans le milieu de culture des neuroblastomes induit leur différenciation et prolifération. La différenciation des neuroblastomes s'observent par le changement de la forme des neuroblastomes, qui s'allongent, et par la formation d'extensions cytoplasmiques. Le test de prolifération est le test réalisé par R&D Systems pour tester l'Artn recombinant qu'ils commercialisent. Nous avons utilisé comme contrôle l'acide rétinoïque, qui est aussi le contrôle utilisé par Baloh et al. 1998, afin de nous assurer que les neuroblastomes utilisés sont bien capables de se différencier. Nous avons aussi utilisé, comme second contrôle, l'Artn recombinant commercialisé par R&D Systems, afin de nous assurer que le ligand Artn a un effet sur les

le milieu conditionné dans lequel 50 μ L de milieu de cellules Hek293T transfectées avec le plasmide CMV-GFP présentent une différenciation d'une partie de leur population (~5%), suggérant que les neuroblastomes peuvent se différencier spontanément (Fig 49 A et D). Cependant, l'observation des neuroblastomes en présence de milieu conditionné avec de l'acide rétinoïque ou de l'Artn recombinant a permis d'observer une différenciation plus importante des neuroblastomes : ~50% pour l'acide rétinoïque et ~30% pour l'Artn recombinant (Fig 49 B et C). L'observation des neuroblastomes en présence de milieu conditionné avec 50 μ L de milieu de cellules Hek293T transfectées avec le plasmide CMV-GFP et le plasmide pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry a permis d'observer une différenciation de l'ordre de 10% (Fig 49E). Ce faible pourcentage, même s'il est supérieur à celui observé pour les conditions de cultures correspondant aux témoins négatifs, ne permet pas de tirer de conclusion quant à la capacité de l'Artn produit par les cellules Hek293T à différencier les neuroblastomes. Ainsi, les tests de **différenciation** de neuroblastomes n'ont pas permis de tirer de conclusion quant à la bioactivité du ligand Artn produit à partir des transfections de cellules Hek293T avec le plasmide pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry. Par contre, la quantification de la **prolifération** des neuroblastomes en présence d'Artn recombinant et de milieu conditionné avec 50 μ L de milieu de cellules Hek293T transfectées avec le plasmide pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry a permis d'observer une augmentation significative de la prolifération des neuroblastomes (Fig 49F), suggérant que l'Artn produit à partir des transfections de cellules Hek293T avec le plasmide pCDNA3-CMV-Artn-2A-mCherry est actif.

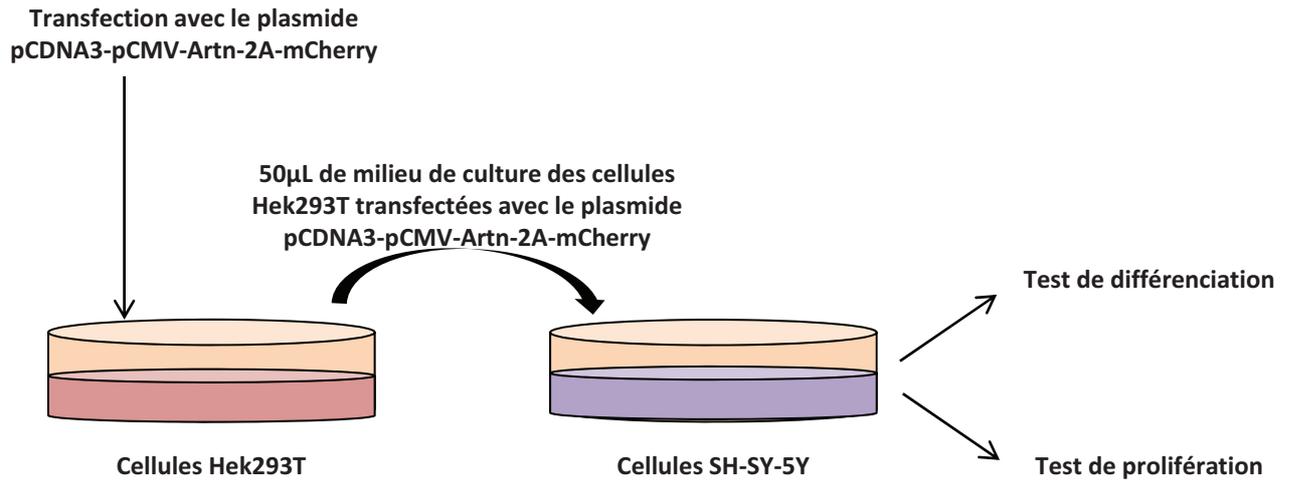


Figure 48: Schéma récapitulatif des tests de différenciation et de prolifération de neuroblastomes (lignée de cellules SH-SY-5Y) en présence de milieu conditionné à partir de milieu de cellules Hek293T transfectées avec le plasmide pCDNA3-pCMV-Artn-2A-mCherry.

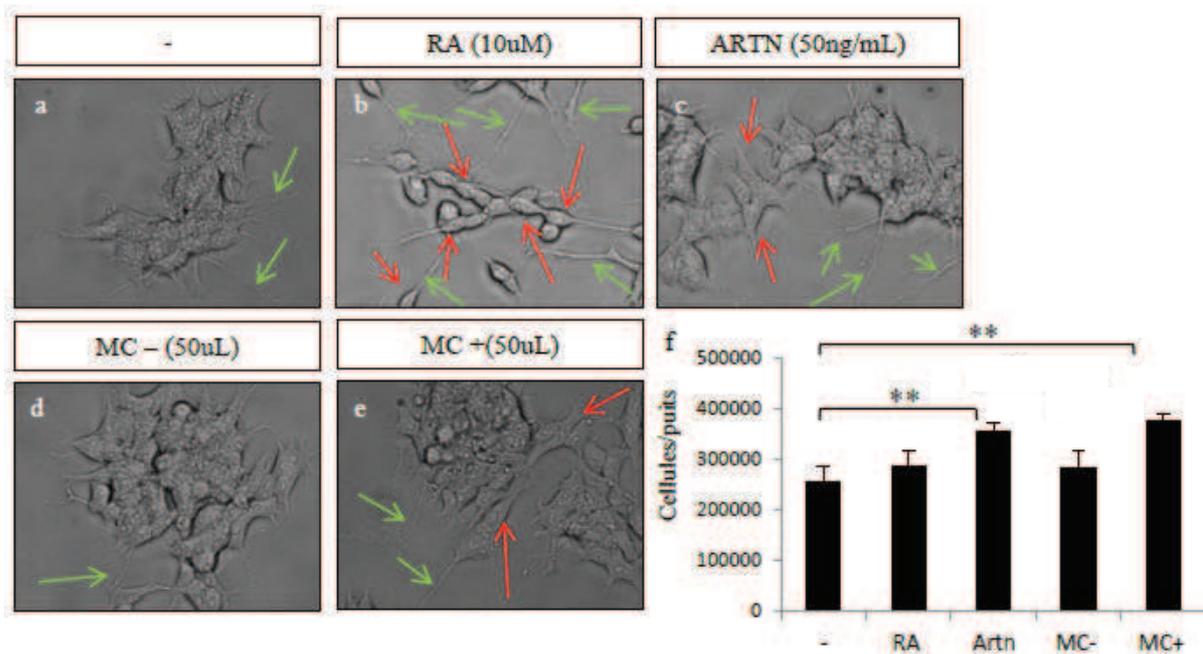


Figure 49: Artin produit par les cellules Hek293T transfectées est actif. Test de différenciation et de prolifération réalisés sur des cultures de neuroblastomes. (A) Neuroblastomes incubés sans milieu conditionné, (B) neuroblastomes incubés avec 10µM d'acide rétinoïque, (C) neuroblastomes incubés avec 50ng/mL d'Artin recombinant (R&D System), (D) neuroblastomes incubés avec 50µL de milieu de culture provenant de cellules Hek293T non transfectées, (E) neuroblastomes incubés avec 50µL de milieu de culture provenant de cellules Hek293T transfectées avec le plasmide pCDNA3-pCMV-Artn-2A-mCherry; (F) quantification de la prolifération des neuroblastomes dans les différents milieux conditionnés. MC: milieu de culture; flèches vertes : neuroblastomes différenciés (extension cytoplasmique et forme aplatie); flèches rouges : neuroblastomes non différenciés ;MC-: neuroblastomes en présence de 50µL de milieu de cellules Hek293T non transfectées; MC+: neuroblastomes en présence de 50µL de milieu de cellules Hek293T transfectées avec le pCDNA3-pCMV-Artn-2A-mCherry; *P≤0,05, **P≤0,01 ; grossissement : X20.

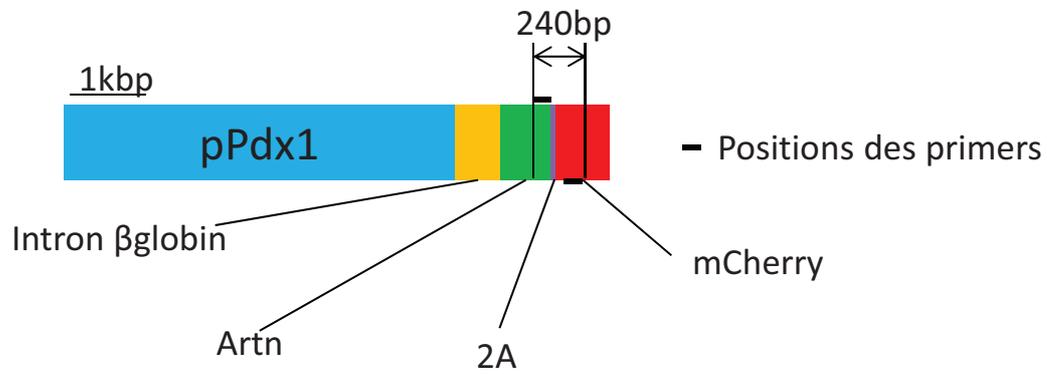
Nous nous sommes ainsi assurés *in vitro* que l'insert Artn-2A-mCherry permet bien la production et la sécrétion de la protéine Artn active. Grâce à l'aide de l'Institut Clinique de la Souris (ICS), la séquence **pPdx1-Artn-2A-mCherry** (issue du plasmide pCRII-pPdx1-Artn-2A-mCherry) a été injectée au sein de pronucléi mâles d'oocytes fécondés afin d'obtenir des fondateurs pour la lignée de souris transgéniques surexprimant Artn dans le pancréas. De ces injections, 87 nouveaux nés ont été génotypés par l'ICS et nous-même, grâce à des oligonucléotides spécifiques à la construction pPdx1-Artn-2A-mCherry (Fig 50A). Sur l'ensemble de ces nouveaux nés, 10 fondateurs ont été testés positifs pour le transgène pPdx1-Artn-2A-mCherry (aussi appelées souris PAM): 7 femelles (les n° 2, 5, 54, 57, 58, 73, 74) et 3 mâles (les n°66, 78 et 81) (Fig 50B). Nous avons décidé de focaliser l'étude de la descendance aux femelles 5 et 57, qui présentaient des bandes dont l'intensité était très forte au génotypage, ainsi qu'aux mâles 66, 78 et 81. La descendance de ces fondateurs a été analysée par visualisation de la fluorescence directe de la mCherry dans l'épithélium pancréatique et par immunofluorescence pour savoir si la mCherry était détectée dans les cellules Pdx1⁺, afin de savoir si le fondateur (ou la fondatrice) transmettait le transgène et si sa descendance exprimait au niveau du pancréas et dans les cellules pdx1⁺ la construction pPdx1-Artn-2A-mCherry. Sur ces 10 fondateurs, 1 femelle transgénique, la n°5, transmettait le transgène à sa descendance, qui, à son tour exprimait de la fluorescence mCherry au niveau du pancréas et dans les cellules Pdx1⁺ (résultats présentés dans la Fig 12 du papier). L'ensemble des données obtenues pour l'étude *in vivo* du gain de fonction pancréatique d'Artn proviennent donc de cette femelle fondatrice n°5. Les analyses réalisées sur la descendance des autres fondateurs n'ont démontré aucune transmission à la descendance.

3. Etude de l'expression des GFRs.

3.1. Contexte

Les résultats obtenus lors de l'analyse des embryons et souris mutantes pour *Gfra3* ainsi que les données sur les études par gain de fonction (cultures d'explants en présence d'Artn ainsi que les embryons transgéniques surexprimant Artn dans le pancréas) nous amènent à conclure que la voie de signalisation Artn/*Gfra3* n'est pas nécessaire pour la différenciation des cellules endocrines pancréatiques. Cependant, nous ne pouvons exclure un phénomène de redondance avec d'autres membres de la famille de ligands et de récepteurs du GDNF. Lors de la perte de *Gfra3*, une redondance pourrait avoir lieu si un autre récepteur, exprimé par les cellules normalement *Gfra3*⁺, remplace la fonction de *Gfra3*. Comme décrit auparavant dans l'article en préparation, l'expression de *Gfra1* dans l'épithélium et le mésenchyme a été observée par qPCR à E12.5 (Fig 4 du papier). Lors de cette même expérience, l'expression de *Gfra2* a été observée dans le mésenchyme et l'expression de *Gdnf*, le ligand de *Gfra1*, a été constatée dans l'épithélium pancréatique. Les résultats concernant l'expression épithéliale de *Gdnf* sont cohérents avec les données publiées par Muñoz-Bravo et al.

A



B

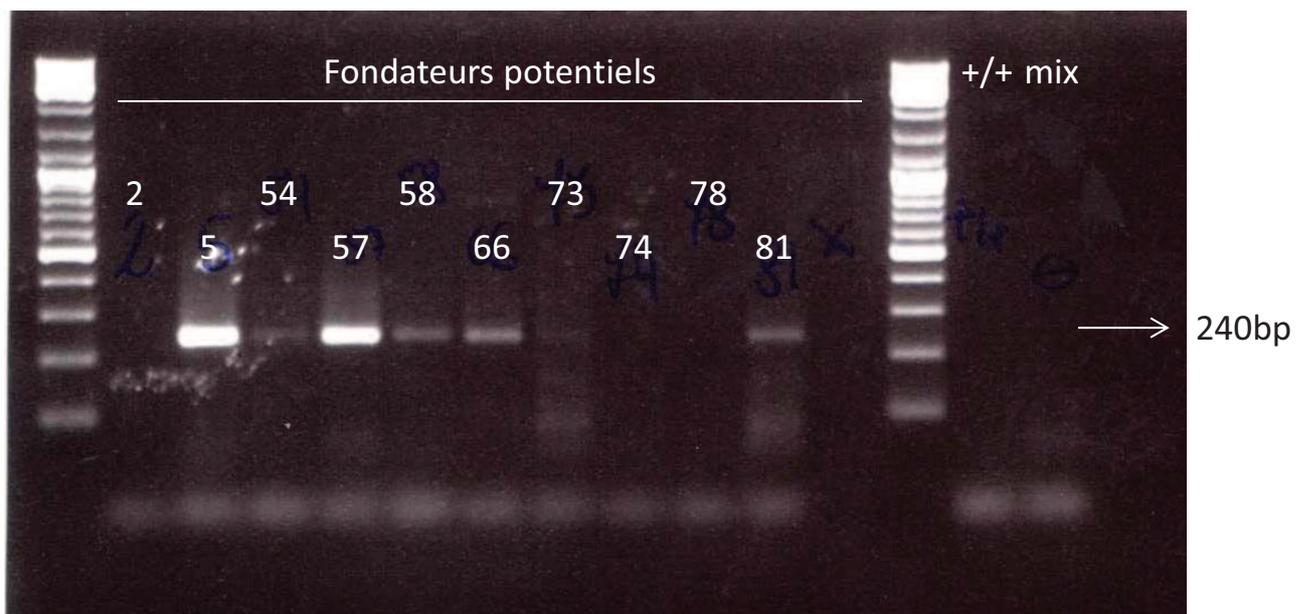


Figure 50: Génomage des souris issues de l'injection de la construction pPdx1-Artn-2A-mCherry. (A) schéma de la séquence injectée et de la position des oligonucléotides utilisés pour le génotypage (séquence amplifiée de 240bp). (B) génotypage des fondateurs issus de l'injection de la construction pPdx1-Artn-2A-mCherry. La bande attendue est visible à 240bp.

2013, décrivant l'expression de *Gdnf* dans l'épithélium pancréatique au cours du développement grâce à la souris *Gdnf^{lacZ/+}*. Rossi et al. 2005 ont démontré que *Gfra2* est exprimé par le système nerveux parasymphatique et les cellules gliales dans le pancréas murin adulte. Ainsi, l'expression mésenchymateuse de *Gfra2* observée lors des PCR quantitatives sur les épithélia et mésenchymes à E12.5 pourraient correspondre à une expression neuronale de *Gfra2*. Nous avons alors voulu connaître le patron d'expression des GFLs et GFRs dans le pancréas embryonnaire et adulte, afin de savoir si un autre GFR pouvait remplacer la perte de *Gfra3* dans notre modèle de souris perte de fonction pour *Gfra3*.

3.2. Méthodes

Dans un premier temps, les sondes pour ISH ont été synthétisées à partir de clones Images (tableau 6). Le clone Image reçu pour *Artn* possédait une séquence recombinée d'*Artn*, qui n'aurait pas permis l'hybridation de la sonde. Nous avons donc cloné la sonde *Artn* comme décrit dans le paragraphe II.C.1.2. Concernant les immunofluorescences, l'ensemble des anticorps utilisés et leurs utilisations sont résumés dans le tableau 7.

Pour les PCR quantitatives, l'ARN de pancréas totaux était extrait en utilisant une extraction au trizol, suivie d'une purification à l'isopropanol. 2µg d'ARN étaient utilisés afin de réaliser un traitement à DNase I (15U, Roche 04716728001) puis une Reverse Transcription à l'aide de la Transcriptase reverse transcriptase (25U, Roche 3531287001).

3.3. Résultats et discussion

Nous avons commencé par réaliser des ISH à E15.5 pour les différents GFRs et GFLs. Les ISH pour *Gfra1* ont donné un signal pancréatique faible difficile à distinguer de bruit de fond, comparé à son signal obtenu dans l'intestin (Fig 51A). L'expression de son ligand *Gdnf* est détectée dans l'épithélium pancréatique, ainsi que dans le rein et l'intestin (Fig 51B). L'expression de *Gfra2* se retrouve au niveau du mésenchyme pancréatique (Fig 51C), tandis que le signal obtenu pour son ligand *Nrtn* n'est pas suffisamment fort pour tirer de conclusion (Fig 51D). L'expression de *Gfra3* est observée au niveau de l'épithélium (Fig 51E). Comme pour *Nrtn* et présenté au paragraphe II.C.1.3, l'ISH pour *Artn* n'a pas donné de signal pancréatique (Fig 51F). Les sondes pour *Gfra4* et *Pspn* n'ont pas donné de signal pancréatique. L'ensemble de ces résultats démontrent que *Gfra1* et *Gfra2* sont aussi exprimés dans le pancréas embryonnaire au côté de *Gfra3* et pourraient potentiellement assurer sa fonction dans le cas de la perte de *Gfra3*.

Nous avons alors voulu savoir si la perte de *Gfra3* avait un impact sur l'expression de *Gfra1* et *Gfra2*, ce qui pourrait éventuellement traduire une modulation de l'expression de ces récepteurs en réponse à la perte de *Gfra3* pour assurer la fonction de *Gfra3*. L'analyse par PCR quantitative de l'expression de *Gfra1*, *Gfra2* et *Gfra4* n'a pas révélé de variation d'expression pour *Gfra1* et *Gfra2*

Tableau 6: Tableau récapitulatif des clones Images utilisés pour la synthèse de sondes ISH.

Nom de la sonde	Référence du clone Image	ARN polymérase pour synthétiser la sonde
Gfra1	IRAVp968E07103D	T7 Polymérase
Gfra2	IRCKp5014H0510Q	T3 Polymérase
Gfra3	IRAVp968H03109D	SP6 Polymérase
Gfra4	IRAMp995A1315Q	SP6 Polymérase
Gdnf	IRCLp5011E075D	T3 Polymérase
Nrtn	IRAVp968C0897D	T7 Polymérase
Pspn	IRCLp5011C0434D	T7 Polymérase

Tableau 7: Tableau récapitulatif des anticorps utilisés. IF: immunofluorescence; WB: Western blot

Antigène	Espèce	Dilution	Fournisseur	Référence	Applications
Artemin	chèvre	1/100	R&D systems	AF1085	IF; WB
Artemin	lapin	1/100	Abcam	ab91009	aspécifique
Artemin	lapin	1/100	Abcam		Pas de signal en IF
Glucagon	hamster	1/2000	Linco	4031-01F	IF
Artemin	souris	1/2000	Sigma	G-2654	IF
Gfra1	chèvre	1/500	R&D systems	AF560	IF
Gfra2	chèvre	1/500	R&D systems	AF429	IF
Gfra3	chèvre	1/500	R&D systems	AF2645	IF
Insuline	hamster	1/1000	Linco	4011 01F	IF
Insuline	souris	1/1000	Sigma	I-2018	IF
mCherry	lapin	1/500	Abcys SA	VPA3216	WB
Ngn3	hamster	1/500	IGBMC		IF
Pdx1	lapin	1/2000	don		IF
S100 β	lapin	1/500	Millipore	04-1054	IF
TH	lapin	1/500	Millipore	AB152	IF
TUJ1	souris	1/500	Covalence		IF
VIP	lapin	1/500	Phoenix pharma	H-064-16	IF

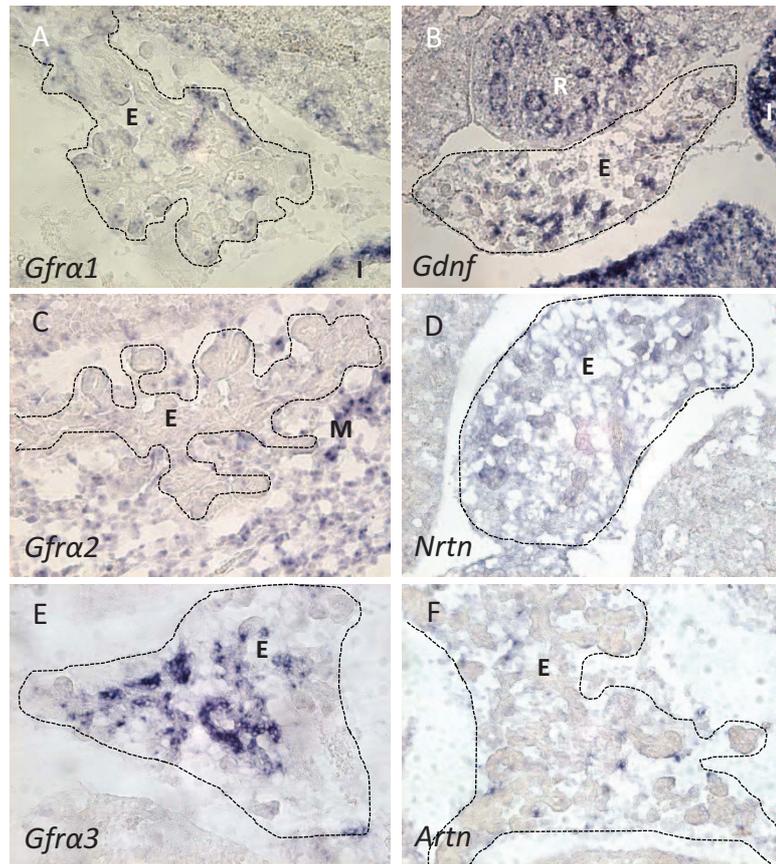


Figure 51: Expression des GFRs et de leurs ligands. Hybridation in situ sur des cryocoupes d'embryons à E15.5. (A) Signal pour *Gfra1*; (B) Signal pour *Gdnf*; (C) Signal pour *Gfra2*; (D) Signal pour *Nrtn*; (E) Signal pour *Gfra3*; (F) Signal pour *Artn*; E: épithélium pancréatique; I: intestins; M: mésenchyme; R: rein; Grossissement : X20.

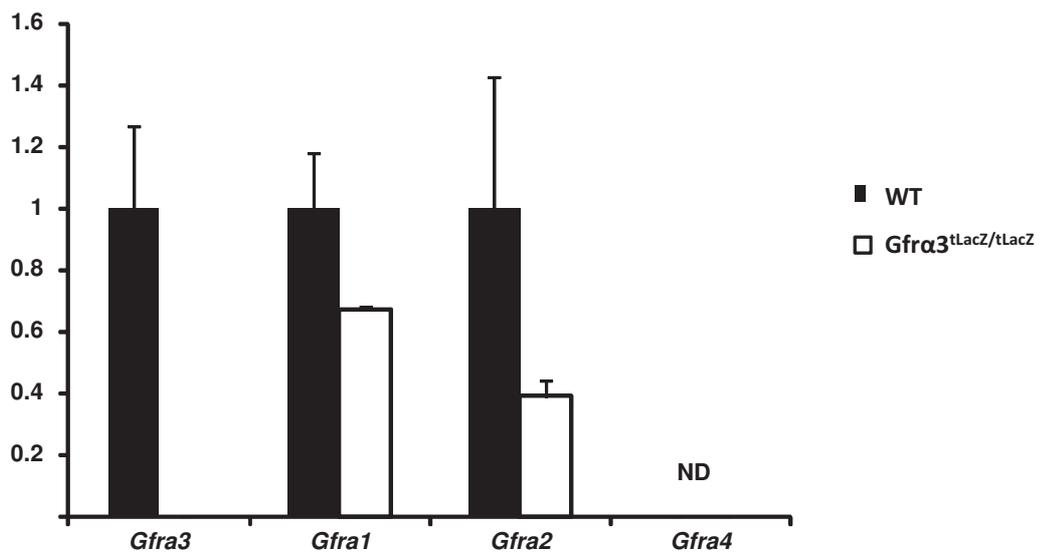


Figure 52: L'expression de *Gfra1* et *Gfra2* n'est pas affectée à E15.5 par la perte de *Gfra3*. PCR quantitative sur des pancréas E15.5 provenant de souris sauvages et mutantes pour *Gfra3*. ND: non détecté.

(Fig 52). L'expression de *Gfra4* n'a été détectée ni dans les pancréas sauvages, ni dans les mutants pour *Gfra3*. Ces résultats indiquent que la perte de *Gfra3* n'entraîne pas de modification de l'expression de ces GFRs.

Afin d'approfondir les connaissances sur l'expression de *Gfra1* et *Gfra2* au cours du développement du pancréas et dans le pancréas adulte, nous avons ensuite réalisé des immunofluorescences pour connaître l'expression de ces deux récepteurs dans les lignages endocrine et nerveux.

A E15.5, le signal obtenu lors des immunofluorescences Pdx1 et Ngn3 pour ces deux facteurs de transcription est faible voire cytoplasmique, indiquant que la réaction d'immunofluorescence n'a pas fonctionné de manière optimale suite peut être un problème de fixation du tissu (Fig 53A à F). Cependant, d'après les Fig 53A et F, *Gfra1* ne semble pas être exprimé par les cellules de l'épithélium pancréatique (flèches vertes pour les cellules de l'épithélium et rouges pour *Gfra1*). Le signal pour *Gfra1* se retrouve en dehors de l'épithélium. Par ailleurs, l'expression de *Gfra1* dans les cellules à glucagon et à insuline n'est pas observée au stade E15.5 (Fig 53G à L, flèches vertes pour les hormones et rouges pour *Gfra1*). Dans le pancréas adulte, *Gfra1* n'est pas exprimé par les cellules à insuline, mais est exprimé par les cellules à glucagon (Fig 53M à R, flèches vertes pour les cellules hormone⁺ *Gfra1*⁻, rouges pour les cellules hormone⁻ *Gfra1*⁺ et jaunes pour les cellules hormone⁺ *Gfra1*⁺), suggérant de ce récepteur dans le maintien et/ou la fonction des cellules α .

L'immunofluorescence pour *Gfra1* pour connaître son expression par les cellules neuronales a donné un signal plus faible que lors des immunofluorescences pour tester son expression dans les progéniteurs et cellules endocrines (Fig 54). Cependant, d'après le signal que nous pouvons observer, à E15.5, *Gfra1* est exprimé par des cellules neuronales (Fig 54A à C, flèches jaunes) et au stade adulte par les cellules gliales (Fig 54D à F, flèches jaunes). Par contre, les neurones des systèmes nerveux sympathique et parasympathique n'expriment pas *Gfra1* (Fig 54G à L, flèches vertes pour les cellules neuronales et rouges pour *Gfra1*). Ces résultats suggèrent que *Gfra1* n'est pas impliqué dans la différenciation des cellules endocrines mais peut être dans le maintien ou la fonction des cellules à glucagon adultes ainsi que dans la mise en place du système nerveux et le maintien des cellules gliales.

Comme pour *Gfra1*, *Gfra2* ne semble pas exprimé à E15.5 dans l'épithélium pancréatique: ni dans les cellules Pdx1 (Fig 55A à C, flèches vertes pour les cellules Pdx1 et rouges pour *Gfra2*), ni dans les cellules Ngn3 (Fig 55D à F, flèches vertes pour les cellules Ngn3 et rouges pour *Gfra2*). *Gfra2* n'est pas exprimé dans des cellules à insuline et à glucagon à E15.5 (Fig 55G à L, flèches vertes pour les hormones et rouges pour *Gfra2*) ainsi qu'au stade adulte (Fig 55M à R), suggérant que *Gfra2* n'est pas impliqué dans la différenciation et le maintien des cellules endocrines.

Concernant l'expression de *Gfra2* dans les cellules du système nerveux embryonnaire et adulte, l'expression de *Gfra2* est observée dans les cellules neuronales à E15.5 (Fig 56A à C, flèches

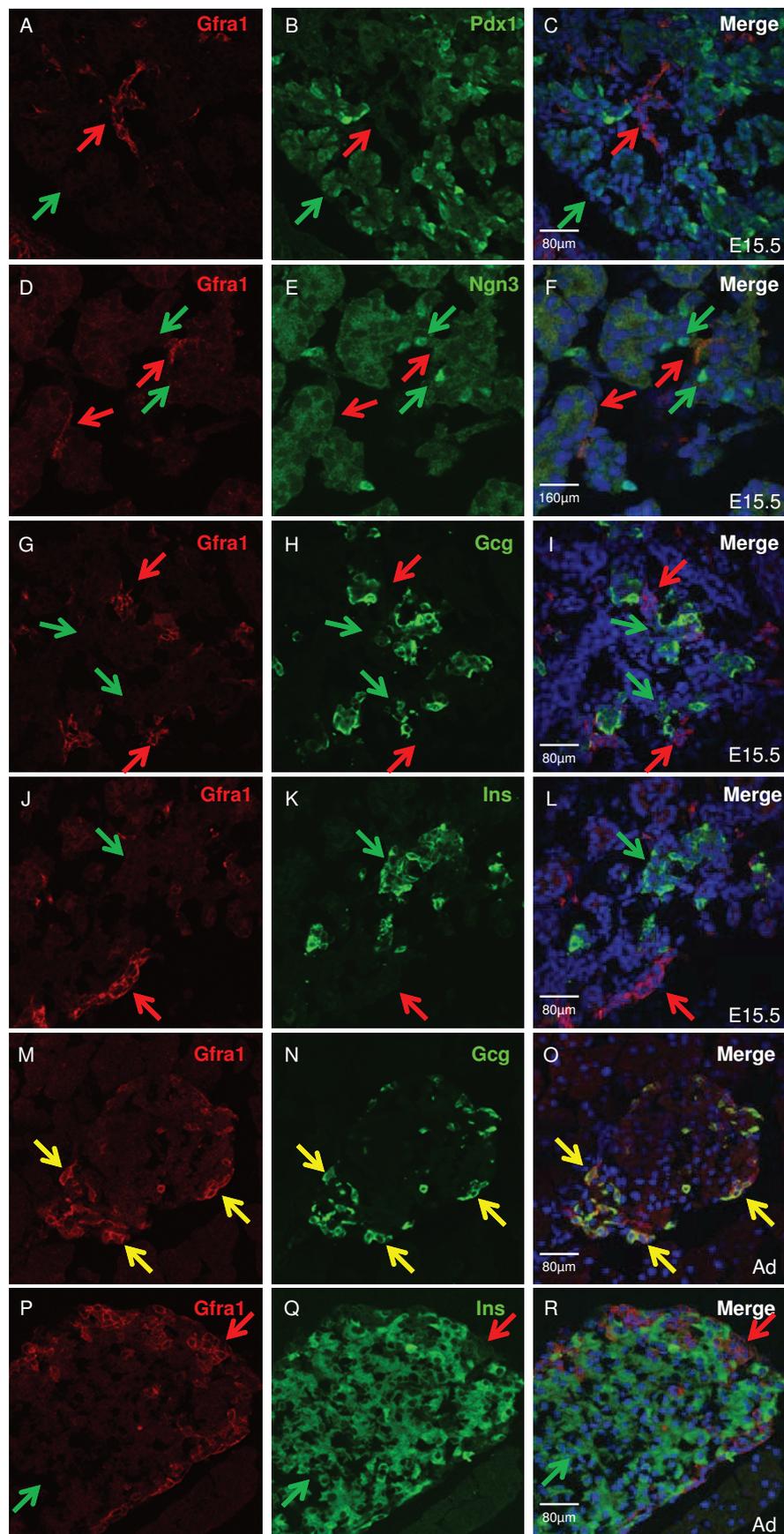


Figure 53: *Gfra1* n'est pas exprimé dans l'épithélium pancréatique à E15.5, ni dans les cellules endocrines embryonnaires et adultes. A E15.5, *Gfra1* (rouge) n'est pas exprimé par les cellules de l'épithélium pancréatique (vert) *Pdx1*⁺ (A-C) ou *Ngn3*⁺ (D-F), ni les cellules glucagon⁺ (vert) (G-I) et insuline⁺ (vert) (J-L). Au stade adulte, les cellules glucagon⁺ (vert) expriment *Gfra1* (M-O), tandis que les cellules insuline⁺ (vert) ne l'expriment pas (P-R). Flèches jaunes : cellules glucagon⁺ exprimant *Gfra1*, flèches rouges: cellules *Gfra1*⁺ /*Pdx1*⁻, *Ngn3*⁻ ou hormones⁻, flèches vertes: cellules *Pdx1*⁺, *Ngn3*⁺ ou hormones⁺ /*Gfra1*⁻; Barre d'échelle : 80µm appliquées à toutes les photos.

jaunes). Au stade adulte *Gfra2* est exprimé par les cellules gliales (Fig 56D à F, flèches jaunes) et les neurones parasymphatiques (Fig 56G à I, flèches jaunes) dans le pancréas de souris adultes. Ces résultats sont cohérents avec les données publiées par Rossi et al. montrant que *Gfra2* est exprimé par le système nerveux parasymphatique et les cellules gliales adultes (Rossi et al., 2005). Concernant l'expression de *Gfra2* par les neurones sympathiques (Fig 56J à L), contrairement aux données publiées par (Rossi et al., 2005), nous avons observé que *Gfra2* est exprimé par quelques neurones sympathiques (flèches vertes pour les cellules TH⁺ *Gfra2*⁻, rouges pour TH⁺*Gfra2*⁺ et jaunes pour TH⁺ *Gfra2*⁺).

Cet autre GFR présente encore un autre patron d'expression, différent de *Gfra1* et *Gfra3*. L'ensemble de ces résultats démontre que d'autres GFRs sont exprimés au côté de *Gfra3* dans le pancréas embryonnaire et adulte et pourraient assurer la fonction de *Gfra3* dans le cas de la non-expression de *Gfra3*

En conclusion, *Gfra1* et *Gfra2* sont aussi exprimés dans le pancréas embryonnaire et adulte (tableau 8). Cependant, d'après nos données, ni *Gfra1*, ni *Gfra2* ne sont exprimés dans le lignage endocrine embryonnaire et *Gfra3* est le seul GFR à être exprimé par le système nerveux sympathique. Aucune variation de l'expression de ces deux récepteurs n'a été détectée dans des pancréas E15.5 *Gfra3*^{tLacZ/tLacZ}, suggérant que *Gfra1* et *Gfra2* n'assurent pas de redondance dans le cas de la perte de *Gfra3* dans le lignage endocrine et le système nerveux sympathique. Cependant, il est possible qu'une faible expression de l'un de ces deux récepteurs ait lieu dans le cas de la perte de *Gfra3*, qui ne se traduirait pas par une variation d'expression mais qui pourrait être détectable par immunofluorescences. Des immunofluorescences contre *Gfra1* et *Gfra2* dans des pancréas *Gfra3*^{tLacZ/tLacZ} E15.5 et adultes pourraient nous informer quant à la potentielle expression de *Gfra1* et *Gfra2* dans le lignage endocrine et le système nerveux sympathique.

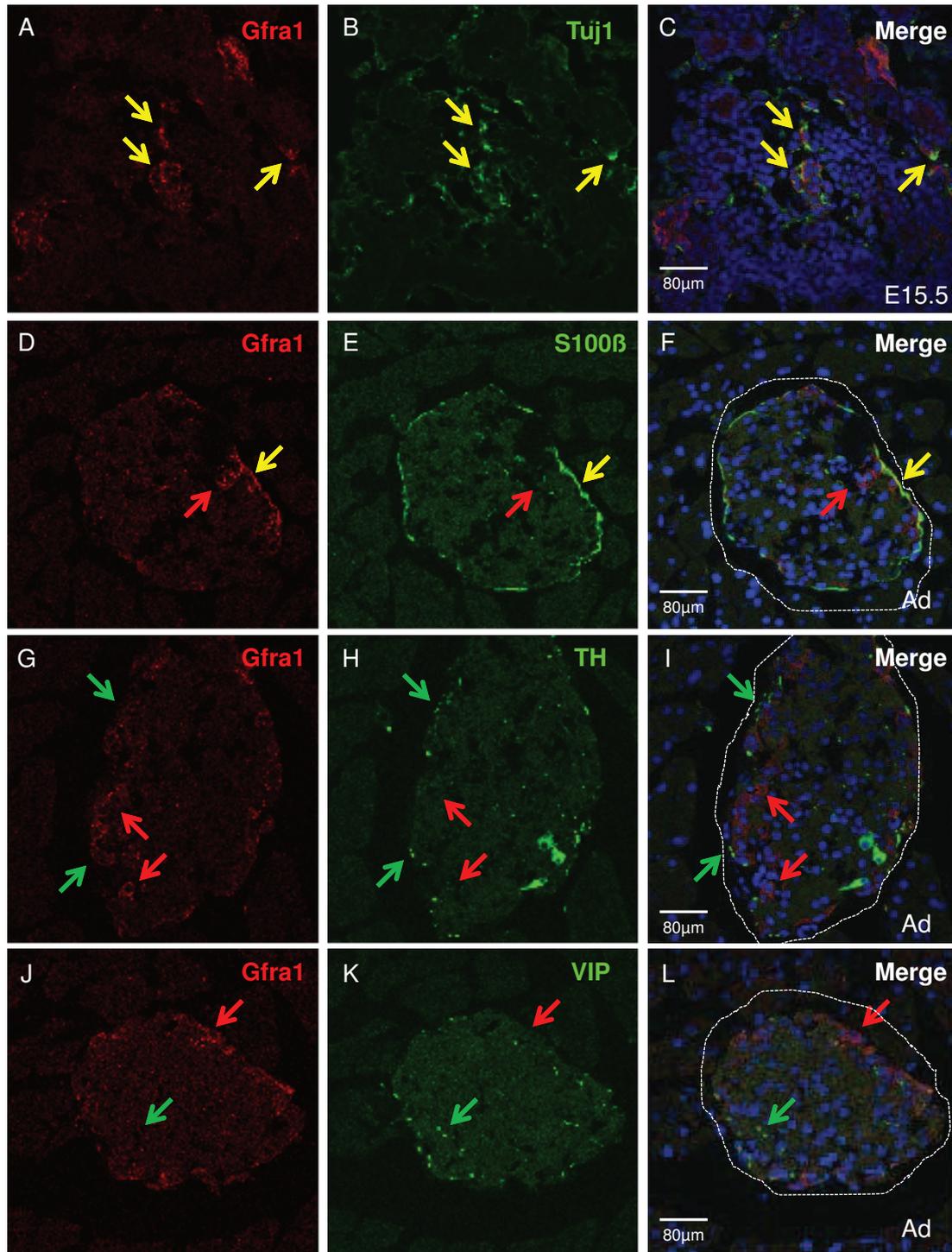


Figure 54: Expression de Gfra1 dans le système nerveux pancréatique à E15.5 et au stade adulte. A E15.5, Gfra1 (rouge) est exprimé par les cellules neuronales TUJ1⁺ (vert) (A-C). Au stade adulte, les cellules gliales S100β⁺ (vert) (D-F) expriment Gfra1 tandis que les neurones TH⁺ (vert) du système nerveux sympathique (G-I) et les neurones VIP⁺ (vert) du système nerveux parasympathique (J-L) n'expriment pas Gfra1. Flèches jaunes : cellules TUJ1⁺ ou S100β⁺ /Gfra1⁺, flèches rouges: cellules Gfra1⁺ /TH⁺ ou VIP⁺; flèches vertes: cellules TH⁺ ou VIP⁺ /Gfra1⁻. Les cercles blancs pointillés délimitent les îlots. Barre d'échelle : 80μm appliquées à toutes les photos.

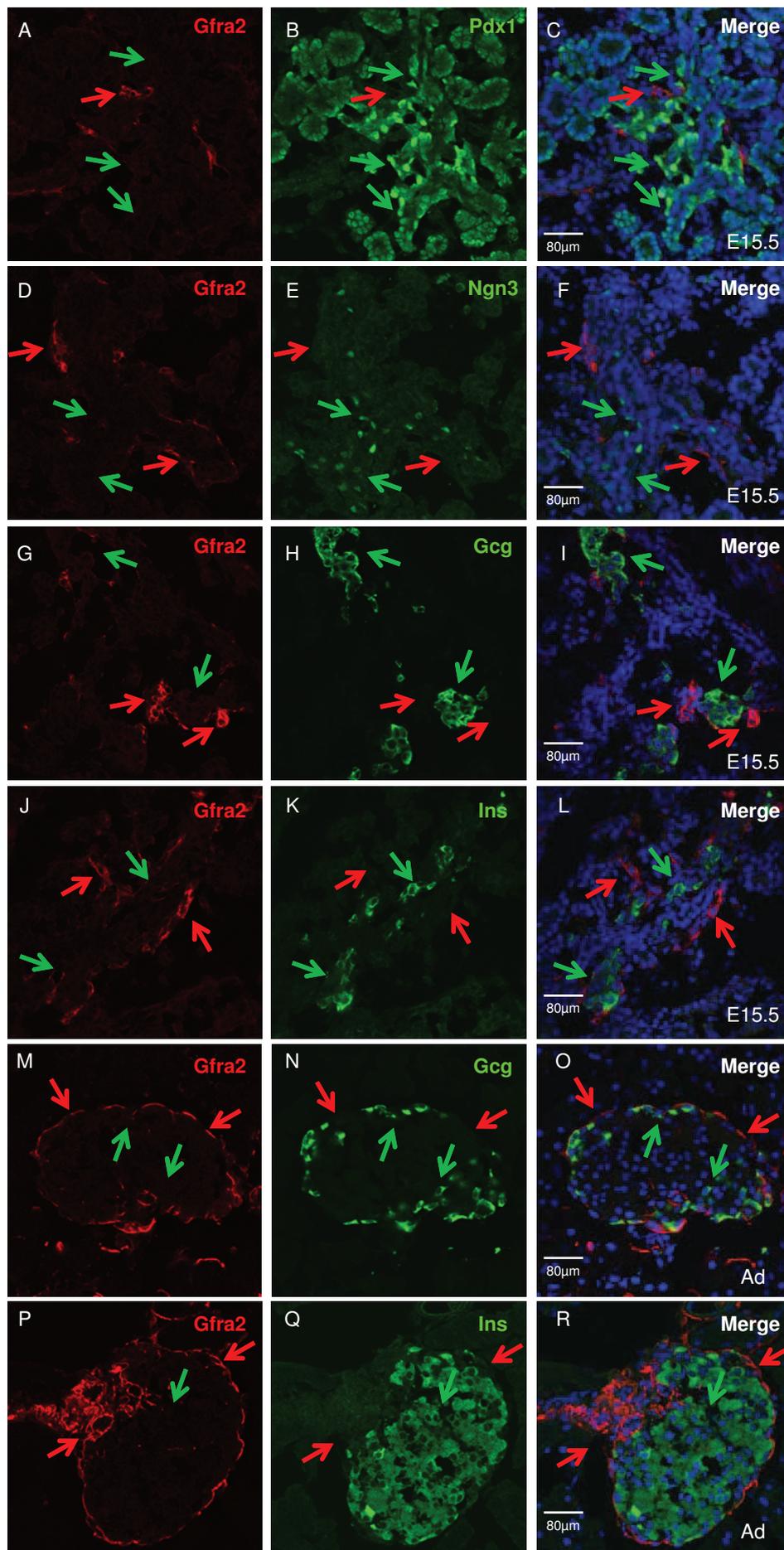


Figure 55: *Gfra2* n'est pas exprimé dans le lignage endocrine à E15.5 et au stade adulte. A E15.5, *Gfra2* (rouge) n'est pas exprimé par les cellules $Pdx1^+$ (vert) (A-C), ni les cellules $Ngn3^+$ (vert) (D-F), ni les cellules endocrines glucagon $^+$ (vert) (G-I) et insuline $^+$ (vert) (J-L). Au stade adulte, *Gfra2* n'est exprimé ni par les cellules glucagon $^+$ (M-O), ni par les cellules insuline $^+$ (P-R). flèches rouges: cellules $Gfra2^+$ / $Pdx1^-$, $Ngn3^-$ ou hormones $^-$, flèches vertes: cellules $Pdx1^-$, $Ngn3^+$ ou hormones $^+$ / $Gfra2^-$; Barre d'échelle : 80µm appliquées à toutes les photos.

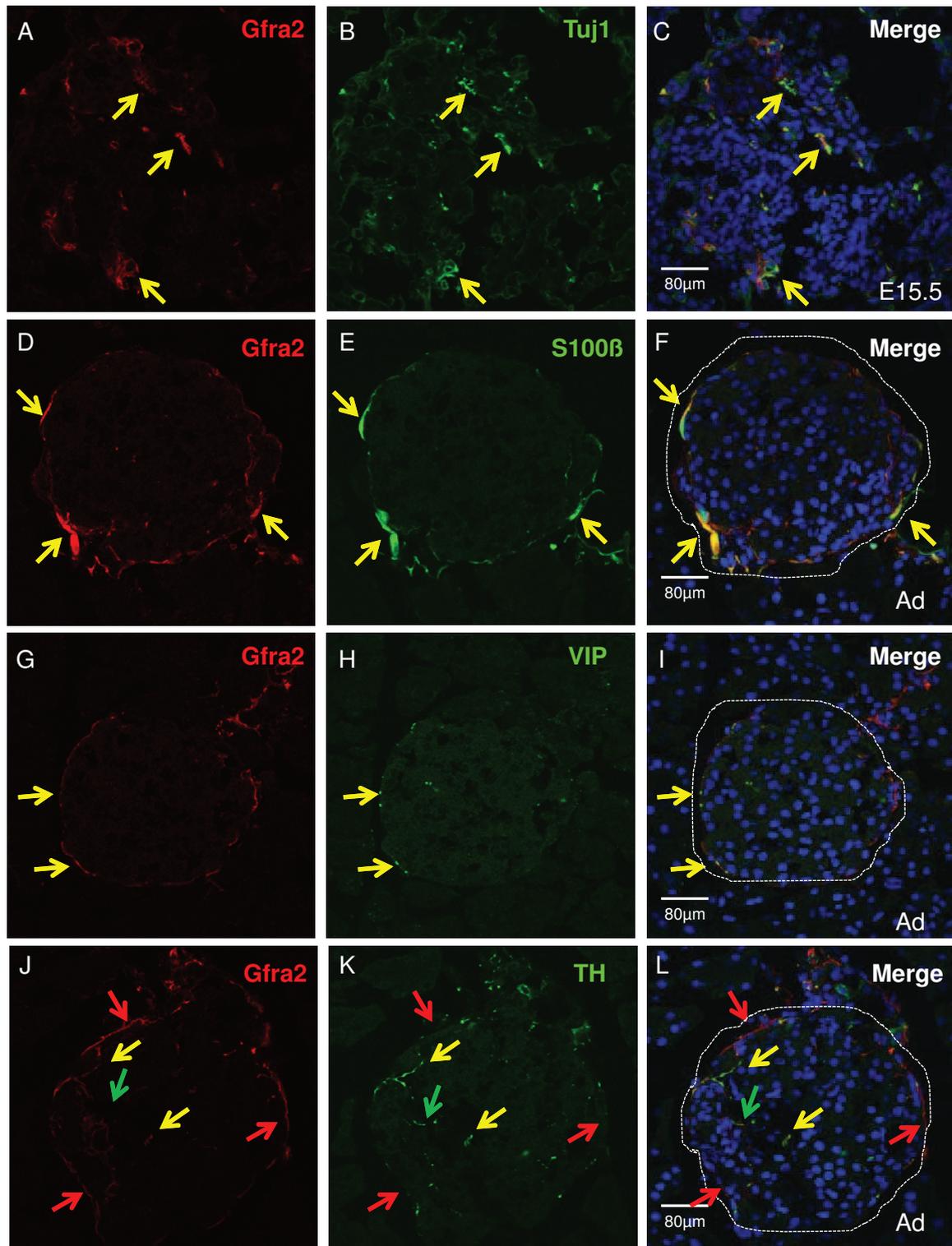


Figure 56: Expression de Gfra2 dans le système nerveux pancréatique à E15.5 et au stade adulte. A E15.5, Gfra2 (rouge) est exprimé par les cellules neuronales TUJ1⁺ (vert) (A-C). Au stade adulte, les cellules gliales S100β⁺ (vert) (D-F) expriment Gfra1 ainsi que les neurones VIP⁺ (vert) du système nerveux parasympathique (G-I). Les neurones TH⁺ du système nerveux sympathique n'expriment pas Gfra2 (vert) (J-L). Flèches jaunes : cellules TUJ1⁺, S100β⁺, VIP⁺ ou TH⁺/Gfra2⁺; flèches vertes: cellules TH⁺/Gfra2⁻; flèches rouges: cellules Gfra2⁺/TH⁻. Les cercles blancs pointillés délimitent les îlots. Barre d'échelle : 80μm appliquées à toutes les photos.

Tableau 8: tableau récapitulatif de l'expression des GFRs dans les lignages endocrines et nerveux dans le pancréas E15.5 et adulte. « Oui » signifie que le GFR est exprimé par le type cellulaire désigné par la colonne, tandis que « non » signifie qu'il n'est pas exprimé par ce type cellulaire.

stades	GFR	Pdx1	Ngn3	insuline	glucagon	TUJ1	S100 β	TH	VIP
E15.5	GFR α 1	Non	Non	Non	Non	Oui			
	GFR α 2	Non	Non	Non	Non	Oui			
	GFR α 3	Oui/non	Oui	Oui	Oui	Oui			
Adulte	GFR α 1			Non	Oui		Oui	Non	Non
	GFR α 2			Non	Non		Oui	Oui/non	Oui
	GFR α 3			Non	Oui/non		Oui	Oui	Oui

Discussion générale et perspectives

III. Discussion et perspectives

A. Autres récepteurs membranaires révélés par Gene Ontology

La recherche par Gene Ontology de récepteurs membranaires sur les résultats de puces Affymetrix à partir d'extraits pancréatiques $\text{Ngn3}^+/\text{eYFP}^+$ et $\text{Ngn3}^-/\text{eYFP}^-$ (Soyer et al., 2010) a révélé que d'autres récepteurs membranaires présentaient une expression enrichie dans les cellules $\text{Ngn3}^+/\text{eYFP}^+$ (tableau 4). Parmi ceux-ci, la Protocadherine 21 (FC=177,41 ; fdr=0,011), qui est une protéine de la famille des cadhérines impliquée dans l'adhésion cellulaire (Sano et al., 1993), est la protéine démontrant l'enrichissement le plus important dans les cellules $\text{Ngn3}^+/\text{eYFP}^+$. A ma connaissance, rien n'a été décrit concernant Protocadherine 21 dans le pancréas. Chez l'humain, une mutation bi-allélique du gène codant pour cette protéine dans le cas de maladies causant la dégénération de la rétine a été mise en évidence (Henderson et al., 2010). Cette protéine étant une protéine d'adhésion cellulaire, elle ne témoigne pas forcément d'une voie de signalisation exogène impliquée dans la régulation des progéniteurs endocrines. Cependant, l'enrichissement de la Protocadherine 21 dans les cellules $\text{Ngn3}^+/\text{eYFP}^+$ peut témoigner de l'importance des contacts cellulaires dans le processus de différenciation endocrine. Rappelons que les progéniteurs endocrines délaminent au cours de leur différenciation pour migrer à travers le mésenchyme et former les premiers groupes de cellules endocrines. Ainsi, observer l'enrichissement d'une molécule d'adhésion cellulaire comme très fortement enrichie dans les cellules exprimant Ngn3 peut sembler surprenante. L'analyse de l'expression et de la perte de fonction de Protocadherine 21 pourrait nous indiquer si cette protéine est essentielle à la différenciation des progéniteurs endocrines.

Un autre récepteur membranaire d'intérêt a été révélé par cette recherche par Gene Ontology, le récepteur à la vitamine D (Vdr) qui apparaît à deux endroits dans le tableau 4 (FC= 51,53 ; fdr=0,012 et FC=20,72 ; fdr= 0,013). La vitamine D, qui doit être métabolisée en $25(\text{OH})\text{D}_3$ pour être bioactive, agit à la fois sur le système nerveux et le système endocrinien (Norman, 2008). Le pancréas exprime des récepteurs à la vitamine D et cette dernière inhibe la sécrétion de l'insuline (Norman et al., 1980). Depuis quelques années, plusieurs études rapportent que le polymorphisme observé au niveau de gènes du métabolisme de la vitamine D ou encore de gènes codant pour ses récepteurs est directement lié au diabète de type 1 ou de type 2 et à la résistance à l'insuline (Palomer et al., 2008; Sung et al., 2012). Par ailleurs, une étude récente démontre que chez des patients atteints d'adénocarcinome canalaire pancréatique, le métabolisme de la vitamine D pancréatique est affecté (Hummel et al., 2014). Ainsi, la vitamine D apparaît comme un acteur majeur de la régulation de l'homéostasie du glucose. Le fait que l'expression de son récepteur soit enrichi dans les cellules $\text{Ngn3}^+/\text{eYFP}^+$ suggère un rôle de la vitamine D au cours du développement du pancréas, plus particulièrement dans la différenciation endocrine. Ainsi, Vdr apparaît comme un autre récepteur dont le rôle dans la différenciation des cellules endocrines pancréatiques est à étudier.

Nous avons choisi de focaliser notre étude sur *Gfra3* car ce récepteur, dont l'expression est aussi fortement enrichie dans les cellules *Ngn3⁺/eYFP⁺* (FC=33,25 ; fdr=0,025 ; tableau 4) démontre une action de la voie de signalisation de *Gfra3* dans la différenciation des cellules endocrines. Le rôle joué par *Gdnf* dans la régulation de la différenciation des spermatogonies ainsi que l'action neurotrophique de cette famille de ligands nous ont poussés à nous interroger sur le rôle d'un récepteur à un facteur neurotrophique dans le lignage endocrine et sa potentielle interaction avec le système nerveux.

B. Expression pancréatique du récepteur *Gfra3* et de son ligand *Artn*

1. Le mésenchyme : la source pancréatique d'*Artn* ?

D'après nos résultats de PCR quantitatives sur les épithélia et mésenchymes à E12.5, *Artn* serait exprimé par le mésenchyme pancréatique.

Pendant, *Artn* est essentiellement connu pour être un facteur neurotrophique sécrété par les cellules des muscles lisses du système vasculaire au cours du développement (Damon et al., 2007; Honma et al., 2002). D'après nos PCR quantitatives sur les explants E12.5 traités au SU5416 (inhibant la formation du système vasculaire) aucune variation d'*Artn* n'est observée dans les explants délétés de leur système vasculaire, suggérant ainsi qu'*Artn* n'est pas exprimé par le système vasculaire pancréatique, mais bien par le mésenchyme pancréatique. Récemment, une étude démontrant l'implication de la voie de signalisation *Ret/Artn2/Gfra3* dans la formation du muscle operculaire chez le poisson zèbre (Knight et al., 2011) a identifié le mésenchyme comme étant une source d'*Artn*. Un autre GFL, *Gdnf* est exprimé par le mésenchyme du tractus digestif et le mésenchyme entourant le bourgeon rénal et reste ensuite exprimé par les tissus dérivant du mésenchyme (Hellmich et al., 1996). Ainsi, le mésenchyme peut aussi être une source de GFL, notamment d'*Artn*, ce qui est cohérent avec notre hypothèse.

L'artère mésentérique supérieure, qui est à proximité du pancréas en développement, est une source importante d'*Artn* (Honma et al., 2002). Ainsi, nous pouvons aussi imaginer un système dans lequel la source primaire d'*Artn* est le mésenchyme et l'artère mésentérique une source secondaire.

2. *Gfra3*, révélateur d'une sous-population de cellules à glucagon ?

Au stade adulte, *Gfra3* est exprimé par le système nerveux, ainsi que par quelques cellules à glucagon. Une quantification du nombre de cellules insulaires adultes glucagon⁺ *Gfra3*⁺ est nécessaire, afin d'avoir une idée précise de la population de cellules à glucagon exprimant *Gfra3*.

Le maintien de l'expression de *Gfra3* dans une sous population de cellules à glucagon signifie peut-être qu'il existe en fait 2 populations de cellules à glucagon, les *Gfra3*⁺ et les *Gfra3*⁻. A ma connaissance, aucune étude publiée ne distingue deux populations de cellules à glucagon. Il est possible que l'expression de *Gfra3* dans les cellules à glucagon dépende de l'état de maturation des

cellules à glucagon, auquel cas, il faudrait aussi regarder les marqueurs de maturation des cellules α , tels que Brn4. Il est aussi possible que Gfra3 soit exprimé dans les cellules α nouvellement formées par réplication (Thorel et al., 2011). En réalisant un lignage, en utilisant par exemple la lignée de souris Gfra3LacZ (Honma et al., 2002), nous pourrions essayer de connaître la proportion de cellules α ayant exprimée Gfra3. A plus long terme, il serait intéressant de purifier ces deux populations de cellules, à l'aide par exemple d'une souris Glucagon-mCherry et de l'anticorps dirigé contre Gfra3 pour comparer leur profil transcriptomique afin de savoir si l'expression de Gfra3 est bien spécifique d'une sous population de cellules α .

C. Modulation de la voie du Gdnf et phénotypes endocrines et nerveux associés.

1. Modulation de la voie de signalisation du Gdnf et phénotypes endocrines

1.1. Cas des pertes de fonction

D'après nos données, Gfra3 est exprimé au cours du développement du pancréas par une population de cellules Ngn3-positives, ainsi que par les cellules insuline- et glucagon-positives. Au stade adulte, Gfra3 n'est pas exprimé par les cellules β mais est exprimé par quelques cellules à glucagon. Lorsque nous avons étudié la perte de Gfra3 sur la différenciation endocrine au cours du développement du pancréas, nous n'avons pas observé de différences significatives du nombre de progéniteurs Ngn3, ni de la différenciation des cellules endocrines. Les souris Gfra3^{tLacZ/tLacZ} adultes ne présentent pas d'intolérance au glucose, ni de défaut architectural des îlots, indiquant que la perte de fonction de Gfra3 n'a pas de conséquence majeure sur la différenciation endocrine. Ces données rejoignent les données de (Munoz-Bravo et al., 2013), qui n'observent pas d'impact de la perte de Gdnf sur la différenciation endocrine, alors qu'ils observent un signal pour Gfra1 dans les cellules Pdx1-positives au niveau des tips à E13.5. Ainsi, les voies de signalisation du Gdnf et de Gfra3 n'apparaissent pas comme essentielles à la mise en place du développement endocrine.

1.2. Cas des gains de fonction

En contraste avec leurs résultats de perte de fonction de Gdnf, lorsque des explants pancréatiques E12.5 sont cultivés en présence de Gdnf, une hausse de la prolifération des progéniteurs Pdx1 est observée (Munoz-Bravo et al., 2013). Dans un autre système de gain de fonction de Gdnf, la surexpression de Gdnf par les cellules gliales, chez des souris transgéniques GFAP-Gdnf, entraîne au stade embryonnaire E18.5 une augmentation du nombre de cellules Ngn3-positives, ainsi qu'une augmentation de la prolifération des cellules β (Mwangi et al., 2010) qui peut s'expliquer par l'augmentation de la prolifération des cellules Pdx1-positives pour Gfra1 observée par (Munoz-Bravo et al., 2013). L'ensemble de résultats de gain de fonction de Gdnf démontre que la voie de signalisation du Gdnf favorise la prolifération des progéniteurs endocrines. Nous avons réalisé

différents types d'études de gain de fonction. Dans un premier temps, nous avons réalisé des cultures d'explants pancréatiques E12.5 en présence d'Artn recombinant. Nous n'avons alors observé aucune variation significative concernant la différenciation endocrine dans les explants traités avec Artn par rapport à leurs contrôles. Nous avons aussi étudié la différenciation endocrine à E13.5 dans un modèle de souris transgénique surexprimant Artn dans les cellules Pdx1-positives. Cet autre modèle de gain de fonction pour Artn n'a montré aucune différence significative de la différenciation du lignage endocrine à E13.5. Il semble donc que les ligands Gdnf et Artn n'aient pas le même rôle au cours du développement du pancréas.

Au stade adulte, la surexpression de Gdnf par les cellules gliales entraîne une augmentation de la masse de cellules β et une meilleure tolérance au glucose que les souris sauvages (Mwangi et al., 2008). Par ailleurs, les souris transgéniques GFAP-Gdnf présentent aussi une meilleure résistance que leurs confrères sauvages dans le cas de traitement à la streptozotocine, drogue qui induit la perte des cellules β , en limitant la mort des cellules β et en favorisant leur prolifération (Mwangi et al., 2008). Ainsi, le facteur neurotrophique Gdnf agirait comme un facteur de survie sur les cellules β . Récemment, un autre facteur neurotrophique, le Mesencephalic astrocyte-derived-neurotrophic factor (MANF) a été identifié pour son rôle essentiel dans la prolifération et le maintien des cellules β (Lindahl et al., 2014). Il semble donc que les facteurs neurotrophiques soient aussi des acteurs majeurs du maintien et de la prolifération des cellules β . Nous n'avons pas encore regardé l'impact de la surexpression d'Artn chez les souris adultes dans notre modèle transgénique de gain de fonction, afin de savoir si Artn peut aussi agir sur le maintien et la fonction des cellules endocrines.

2. Modulation de la voie de signalisation du Gdnf et phénotypes nerveux

Gfra3 est exprimé par le système nerveux embryonnaire et adulte, ainsi que par les cellules gliales adultes. Lorsque nous avons étudié l'effet de la perte de Gfra3 sur l'innervation endocrine à P0 et P21 chez les souris Gfra3^{tLacZ/tLacZ}, nous n'avons observé aucune différence significative entre les souris pertes de fonction pour Gfra3 et leurs contrôles. Ces résultats contrastent avec les résultats publiés chez les souris pertes de fonction pour Gdnf ou Gfra2. Ces deux modèles démontrent que la perte de Gdnf ou Gfra2 entraîne, au niveau du pancréas, une diminution importante de l'innervation parasympathique (Munoz-Bravo et al., 2013; Rossi et al., 2005). Cependant, la cause de cette dé-innervation n'est pas la même dans les deux cas. La perte pancréatique de Gdnf a permis de révéler que ce ligand est essentiel pour la **migration** des progéniteurs neuronaux en différenciation à travers le bourgeon pancréatique, ainsi que pour leur prolifération (Munoz-Bravo et al., 2013). La perte du récepteur Gfra2 a permis de démontrer que ce récepteur est nécessaire à la **survie** des neurones parasympathiques. En l'absence de Gfra2, les neurones parasympathiques meurent par mort cellulaire programmée à partir de E16 (Lahteenmaki et al., 2007). Ainsi, les différents membres de la famille du

Gdnf semblent avoir des rôles différentiels au cours du développement du pancréas et dans le pancréas adulte.

3. Conclusion et perspectives

Notre étude semble démontrer que la voie de signalisation Artn/Gfr α 3 n'a pas la même action que les voies de signalisation du Gdnf et de Gfr α 2. La perte de Gfr α 3 n'entraîne pas de phénotype nerveux drastique, comme observé pour Gdnf ou Gfr α 2 et le gain de fonction d'Artn n'entraîne pas d'impact sur la prolifération des progéniteurs endocrines, comme observé pour le gain de fonction de Gdnf dans les cellules gliales. Ces résultats peuvent signifier, soit que la voie de signalisation de Gfr α 3 n'est pas essentiel au cours du développement du pancréas et dans le pancréas adulte pour la mise en place, la différenciation et le maintien des cellules endocrines et nerveuses, soit que l'action de Gfr α 3 est très spécifique à un type cellulaire et/ou à un moment bien précis. D'après les données de (Munoz-Bravo et al., 2013) et (Lahteenmaki et al., 2007), il semble qu'il y ait un phénomène de relais entre la voie de signalisation de Gdnf et celle de Gfr α 2. Ainsi, peut être que Gfr α 3 agit avant Gdnf, nous pourrions alors étudier l'effet de la délétion de Gfr α 3 à un stade plus précoce (E8-E9) sur la formation des bourgeons pancréatiques. Il est aussi possible que la délétion de Gfr α 3 n'entraîne pas de phénotype évident sous un régime normal, mais que sous un régime riche en matière grasse, les souris Gfr α 3^{tLacZ/tLacZ} présentent un défaut de régulation de l'homéostasie du glucose, qui pourrait être couplé à un défaut d'innervation. Ainsi, différentes hypothèses restent encore à tester concernant l'impact de la perte de Gfr α 3 dans le pancréas.

D. Caractérisation de la perte de fonction de Gfr α 3 dans les cellules Ngn3-positives et phénomène de redondance.

1. Caractérisation transcriptionnelle de la perte de Gfr α 3 dans les cellules Ngn3-positives

L'analyse des souris perte de fonction pour Gfr α 3 n'a pas permis de mettre en évidence un phénotype nous révélant le rôle de cette voie de signalisation dans le pancréas. Les souris mutantes ne présentent pas de problèmes évidents lors du développement du pancréas, ni dans l'organisation des îlots au stade adulte et ne présentent pas d'intolérance au glucose. L'analyse par bioinformatique de puces Agilent sur des pancréas E15.5 Gfr α 3^{+/+} et Gfr α 3^{tLacZ/tLacZ} n'a pas permis de mettre en lumière de classes de gènes, indicateurs de la fonction de Gfr α 3, particulièrement affectées par l'absence du récepteur. Cependant, à ce stade, l'expression de *Gfra3* se trouve dans les progéniteurs endocrines et les cellules insuline⁺ et glucagon⁺, ce qui représente un pourcentage faible des cellules pancréatiques à E15.5. Ainsi, il est possible que de faibles variations aient lieu dans le lignage endocrine, mais que

celles-ci soit diluées par l'absence de variations observées dans le reste du tissu. Afin de savoir si la perte de *Gfra3* affecte une ou des classe(s) de gènes spécifiquement dans le lignage endocrine, nous sommes actuellement en train de générer des souris *Gfra3*^{+tLacZ}; *Ngn3*^{+eYFP} afin de comparer le profil transcriptomique des cellules *Ngn3*-positives provenant de pancréas embryonnaires E15.5 *Gfra3*^{+/+} et *Gfra3*^{tLacZ/tLacZ}.

2. Phénomène de redondance

L'absence de phénotype observé dans nos études concernant la différenciation endocrine et l'innervation dans les embryons et souris *Gfra3*^{tLacZ/tLacZ} peut être le fait d'un phénomène de redondance. Ce phénomène n'est possible que si les cellules délétées de *Gfra3* expriment un autre récepteur capable de transduire le signal d'Artn.

2.1. Phénomène de redondance au sein du lignage endocrine.

D'après les données publiées par (Munoz-Bravo et al., 2013), le récepteur *Gfra1*, qui peut aussi être un récepteur d'Artn (Saarma and Sariola, 1999), est exprimé à E13.5 par les cellules *Pdx1*-positives au niveau des « tips ». Le signal présenté par les auteurs pour *Gfra1* dans les cellules *Pdx1* est plutôt faible par rapport au signal qu'ils obtiennent dans le système nerveux, ce qui peut laisser un doute quant à l'expression de *Gfra1* dans ces cellules « tips » *Pdx1*-positives. Pourtant, lorsque les auteurs cultivent des explants pancréatiques E12.5 en présence de ligand *Gdnf*, une hausse de la prolifération des progéniteurs pancréatiques est observée. De plus, dans un modèle de souris transgénique surexprimant *Gdnf* dans les cellules gliales par l'utilisation du promoteur *GFAP*, une augmentation du nombre de cellules *Ngn3*-positives est observée à E18.5 (Mwangi et al., 2010). L'ensemble de ces données suggère que le signal émis par *Gdnf* est bien intégré par les cellules épithéliales, certainement par *Gfra1*. Cependant, (Munoz-Bravo et al., 2013) présentent une expression au niveau des « tips » à E13.5, structure caractérisée par la présence de progéniteurs acinaires (Zhou et al., 2007). (Mwangi et al., 2008) constatent une augmentation des cellules *Ngn3* dans leur modèle de souris transgénique, qui peut s'expliquer par l'augmentation de la prolifération des cellules *Pdx1*-positives exprimant *Gfra1* observées par (Munoz-Bravo et al., 2013). Cependant, les progéniteurs *Ngn3* se trouvent normalement au niveau des « trunks » (Zhou et al., 2007). Ainsi, si ces deux études démontrent que le signal émis par *Gdnf* est bien intégré par les cellules de l'épithélium pancréatique, il semble que suivant l'étude, la population de cellules intégrant le signal ne soit pas la même.

A E15.5, nous n'avons pas observé de signal épithélial pour *Gfra1*, nous avons seulement observé une expression de *Gfra1* par les cellules neuronales. Cependant, la réaction d'immunofluorescence pour *Pdx1* et *Ngn3* n'avait pas fonctionné de manière optimale. Nous allons refaire des immunofluorescences à E15.5, ainsi qu'à des stades plus précoces tels que E13.5 afin de détecter

Gfr α 1 dans l'épithélium pancréatique. Si Gfr α 1 est bien exprimé dans l'épithélium pancréatique, il est possible qu'il y compense la perte de Gfr α 3. Cependant, nous devons affiner notre patron d'expression afin de déterminer quelle population de progéniteurs (pancréatiques, endocrines ou acinaires) exprime effectivement Gfr α 1.

2.2. Phénomène de redondance au sein du système nerveux pancréatique

Concernant l'expression neuronale d'autres Gfrs dans le pancréas embryonnaire, nous savons que les précurseurs neuronaux ainsi que les cellules neuronales expriment Gfr α 1 (Munoz-Bravo et al., 2013). Nous avons aussi observé une expression neuronale de Gfr α 1 à E15.5, confirmant les données publiées par (Munoz-Bravo et al., 2013). Ainsi, au cours du développement du pancréas, Gfr α 1 pourrait compenser la perte neuronale de Gfr α 3.

Au stade adulte, nous avons observé que Gfr α 1 est exprimé seulement par les cellules gliales, tandis que Gfr α 3 est exprimé par les cellules gliales, les neurones sympathiques et parasympathiques. Ainsi, la perte de Gfr α 3 ne pourrait être compensée par Gfr α 1 que dans les cellules gliales. Le fait que nous n'ayons pas observé d'expression de Gfr α 1 par les neurones parasympathiques contraste avec la perte de fonction pancréatique de GDNF, qui entraîne une diminution de l'innervation parasympathique endocrine. Si la perte de Gdnf a un impact sur l'innervation parasympathique, cela signifie que son signal est intégré par ces neurones et que potentiellement, ils expriment Gfr α 1.

Gfr α 2 est exprimé par les cellules gliales et par les neurones parasympathiques pancréatiques (Rossi et al., 2005), ce qui est cohérent avec l'expression de Gfr α 2 que nous avons observée par immunofluorescence au stade adulte. Cependant, Gfr α 2 n'est pas connu pour être un récepteur d'Artn (Airaksinen and Saarma, 2002), ainsi, même si Gfr α 2 est exprimé par des cellules qui expriment aussi, en temps normal, Gfr α 3, il est peu probable que Gfr α 2 puisse compenser la perte de Gfr α 3 dans les cellules gliales et les neurones parasympathiques. Ou alors, cette action passe par l'action de Nrtn.

2.3. La perte de Gfr α 3 peut-elle être compensée par d'autres types de récepteurs ?

Gfr α 3 n'est pas le seul récepteur connu pour Artn. Gfr α 1 peut aussi interagir avec Artn (Airaksinen and Saarma, 2002), mais d'autres molécules ont aussi été identifiées comme étant des récepteurs des ligands de la famille du Gdnf. Tout d'abord, les ligands de la famille du Gdnf possèdent dans leur structure des sites d'affinité avec l'héparine (Lin et al., 1993), molécule de la matrice extracellulaire. *In vitro*, des cultures de neuroblastomes ont permis de démontrer que l'héparine permet la transduction du signal de Gdnf et Nrtn (Tanaka et al., 2002). Ainsi, il est possible que l'héparine puisse aussi transmettre le signal d'Artn, même en l'absence de Gfr α 3.

De plus, le récepteur transmembranaire de type heparan-sulfate proteoglycan Syndecan-3 est capable de se lier et d'activer la voie des ligands Gdnf, Nrtn et Artn, sans interaction avec un Gfr, dans un contexte où le ligand se trouve sous une forme non soluble (Bespalov et al., 2011). Ainsi, il est possible que la perte de Gfr α 3 soit compensée par Syndecan-3 si celui-ci est exprimé par les cellules normalement Gfr α 3-positives, ce qui est à vérifier.

Enfin, les cellules neuronales et gliales expriment la molécule d'adhésion neuronale NCAM. Cette molécule a aussi été démontrée comme se liant aux GFLs et capable d'agir en tant que corécepteur de Gfr α 1 dans un système de signalisation indépendant de Ret (Paratcha et al., 2003).

Il est ainsi possible que la perte de fonction de Gfr α 3 chez les souris Gfr α 3^{tLacZ/tLacZ} soit compensée par l'une de ces molécules. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions tout d'abord vérifier l'expression de ces molécules dans le pancréas puis essayer d'élaborer un système *in vitro*. Artn est connu pour induire la prolifération et la migration des cellules MIA Paca-2 (Meng et al., 2013), qui sont des cellules pancréatiques dérivant de carcinome pancréatique humain. Ainsi, si ces cellules expriment Gfr α 3, nous pourrions éteindre l'expression de Gfr α 3 et tester en présence d'Artn et d'héparine la prolifération et la migration de ces cellules. Si ces cellules n'expriment pas Gfr α 3, alors nous pourrions tester l'expression de Syndecan3 et savoir si les phénomènes de prolifération et de migration observés peuvent s'expliquer par l'activation de la voie de signalisation Artn via Syndecan-3. Afin de savoir si l'absence de Gfr α 3 est compensée par NCAM au niveau des cellules gliales et neuronales, il nous faudrait un système cellulaire pancréatique neuronal exprimant à la fois Gfr α 3 et NCAM. Il faudrait alors induire la perte de Gfr α 3, s'assurer qu'il n'y a pas de phénotype pour mimer ce que nous observons *in vivo* et induire la perte de NCAM. Si NCAM compense la perte de Gfr α 3, alors il est possible qu'un phénotype soit observé. Pour s'assurer que le phénotype observé est bien lié à la perte de compensation de Gfr α 3 par NCAM et non à la perte de NCAM directement, il faudrait alors réaliser un sauvetage des cellules perte de fonction pour Gfr α 3 et NCAM en induisant l'expression de Gfr α 3.

E. Perspectives des souris transgéniques surexprimant Artn dans le pancréas embryonnaire

1. Les souris transgéniques PAM expriment et sécrètent le ligand Artn

Les analyses réalisées sur des pancréas embryonnaires E13.5 et E15.5 révèlent que la mCherry est bien exprimée par les cellules Pdx1⁺ et non par d'autres types cellulaires. Ces premiers résultats démontrent que notre construction pPdx1-Artn-2A-mCherry permet bien d'exprimer notre transgène de manière fidèle à Pdx1. De plus, les immunofluorescences Artn réalisées sur des coupes de pancréas embryonnaires sont les seules à nous avoir permis d'observer un signal pour Artn, ce qui est cohérent

avec notre hypothèse selon laquelle en condition sauvage, Artn est très peu exprimé dans le pancréas. Le signal observé pour Artn sur des coupes de souris transgéniques est particulier : on retrouve un faible signal cytoplasmique ainsi qu'un signal membranaire dans les cellules mCherry-positives, mais aussi un signal membranaire dans des cellules adjacentes mCherry-négatives. Ce résultat peut être interprété comme le fait qu'Artn est correctement synthétisé au niveau des cellules mCherry⁺, puis sécrété par ces cellules, ce qui serait cohérent avec son activité de ligand. Par ailleurs, le signal pour Artn est membranaire ce qui est cohérent avec sa fixation sur son récepteur membranaire Gfr α 3. Enfin, le signal pour Artn apparaît comme étant polarisé, notamment au niveau des cellules mCherry⁻, ce qui contraste avec le signal observé pour Gfr α 3 qui suit la totalité de la membrane cellulaire. Ces observations suggèrent que l'action d'Artn est spécifique d'un pôle cellulaire ou que la sécrétion d'Artn est polarisée, ce qui, à ma connaissance, n'est pas connu dans la littérature.

2. Perspectives des études des souris transgéniques surexprimant Artn dans le pancréas

L'analyse à E13.5 de l'effet de la surexpression d'Artn dans le pancréas embryonnaire n'a pas montré d'impact de cette surexpression sur le lignage endocrine. Il est possible que la surexpression pancréatique d'Artn ait un effet plus tardif, c'est pourquoi, nous voulons aussi réaliser des quantifications des progéniteurs endocrines et de l'aire des hormones à E15.5, P0 et au stade adulte. Nous souhaitons aussi connaître l'effet de la surexpression sur le système nerveux. Pour ceci, nous souhaitons quantifier l'innervation endocrine pancréatique de souris transgéniques pPdx1-Artn-2A-mCherry (souris PAM) à P0 et P21.

L'absence d'effet observée peut aussi être due au caractère transgénique de notre construction : Artn est normalement exprimé par le mésenchyme (Fig 4 du papier). Ici, nous avons une expression ectopique d'Artn dans l'épithélium pancréatique, ce qui ne reflète la situation *in vivo*. De plus, les données récoltées sur des échantillons de pancréas sauvages démontrent qu'Artn est très faiblement exprimé en temps normal dans le pancréas. Il est possible que ce taux d'Artn soit nécessaire et suffisant à son action. Dans ce cas, ajouter encore plus d'Artn avec notre modèle transgénique ne mènerait pas forcément à un phénotype particulier. Enfin, il est aussi possible que l'Artn produit par nos souris PAM ne soit tout simplement pas actif, car mal processé ou encore que la séquence que nous avons clonée ne permette pas l'expression d'une protéine Artn pancréatique active, car une séquence essentielle à son activité pancréatique a été omise. Auquel cas, aucun phénotype ne sera observé.

En conclusion, des analyses à des stades plus tardifs de la différenciation et de la fonction endocrine et du maintien du système nerveux sur des souris surexprimant Artn dans le pancréas sont nécessaires afin de connaître l'impact de la surexpression d'Artn dans le pancréas et identifier ainsi le rôle d'Artn dans le pancréas.

F. Gfra3 : un marqueur pour la purification des cellules endocrines en différenciation ?

L'identification de récepteurs membranaires exprimés de manière spécifique par les progéniteurs endocrines et les cellules endocrines en différenciation permettrait d'apporter de nouvelles connaissances sur la compréhension des mécanismes régissant la différenciation des sous types endocrines. Par exemple, Gfra3 est exprimé par une sous population de cellules Ngn3 (qui reste à quantifier), ainsi que par les cellules insuline-positives et glucagon-positives embryonnaires. Il est possible que Gfra3 soit un marqueur d'un certain stade de différenciation des progéniteurs Ngn3, en train de s'engager vers une voie hormonale (Fig 57). Afin d'étayer cette possibilité, nous sommes actuellement en train de réaliser des essais afin de purifier les cellules Gfra3⁺ par FACS à partir de pancréas E15.5 provenant d'embryons de souris Ngn3^{+/eYFP}. Cette expérience nous permettrait de caractériser les cellules Ngn3⁺ Gfra3⁺ et Ngn3⁺ Gfra3⁻ par PCR quantitative dans un premier temps en interrogeant des gènes de différenciation et de maturation des cellules endocrines, puis éventuellement par une analyse transcriptomique.

Ces connaissances ouvrent aussi de nouvelles perspectives pour la génération de cellules sécrétrices d'insuline fonctionnelles *in vitro*. Comme présenté dans le paragraphe I.A.6.2, les tentatives de génération de cellules sécrétrices d'insuline *in vitro* à partir de cellules souches ou à pluripotence induite n'ont pas permis d'aboutir à des cellules fonctionnelles. Les seules cellules sécrétrices d'insuline fonctionnelles générées par ces protocoles font intervenir une étape de transplantation au stade progéniteur endocrine chez la souris, démontrant qu'il nous manque des connaissances quant aux signaux provenant de l'environnement permettant de réaliser les étapes de maturation des cellules β . Grâce à l'identification de récepteurs spécifiques aux progéniteurs endocrines et cellules endocrines en différenciation, il deviendrait envisageable de purifier par FACS la population de cellules d'intérêt (soit au stade progéniteurs, soit au stade de cellules endocrines en différenciation), de les amplifier puis différencier *in vitro* avant de les greffer à un patient diabétique. Ainsi, la découverte des biomarqueurs CD133 (ou Prominine-1) et CD49f (ou $\alpha 6$ -intégrine) a permis de purifier par FACS, en se servant d'anticorps dirigés contre ces protéines, une population de cellules Ngn3⁺ provenant de pancréas embryonnaire murin, mais aussi de pancréas fœtal humain (Sugiyama et al., 2007). Une autre étude présente l'expression de biomarqueurs membranaires, tels que Ddr-1, exprimé par les cellules endocrines et les progéniteurs canaux, Dner, exprimé par les progéniteurs endocrines ou encore Disp2, exprimé par les cellules hormonales (Hald et al., 2012). Ces deux études ouvrent la possibilité de purification par FACS, sur la base de la fluorescence de ces biomarqueurs, de différentes populations de cellules endocrines en vue de leur caractérisation.

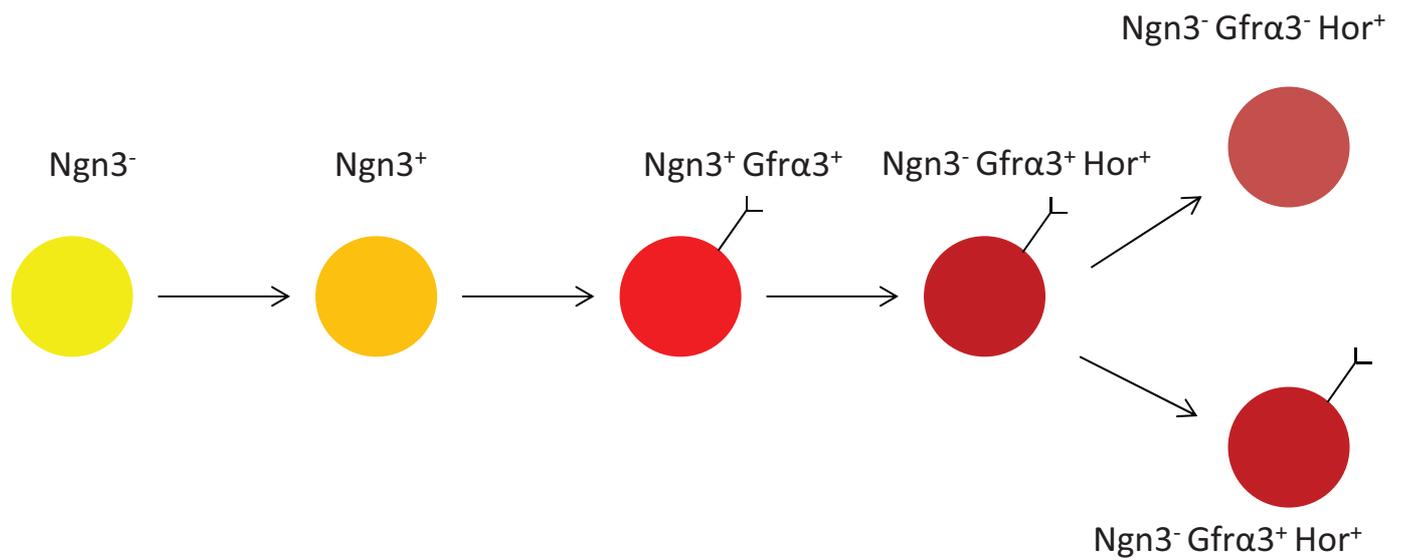


Figure 57: Modèle de l'expression de Gfra3 au cours de la différenciation des cellules endocrines pancréatiques. Au cours de la différenciation des progéniteurs endocrines, Gfra3 pourrait être exprimé à un certain stade de différenciation et/ou être spécifique d'un certain type cellulaire endocrine.

L'analyse par PCR quantitatives des tris réalisés sur des pancréas E15.5 $\text{Ngn3}^{+/e\text{YFP}}$ afin de confirmer nos données de puces Affymetrix (Fig 1 du papier) ont démontré un fort enrichissement de Gfra3 dans les cellules Ngn3^+ . Ces résultats sont surprenants puisque d'après nos résultats de PCR quantitatives sur des pancréas E15.5 sauvages et déficients pour Ngn3 et d'après le patron d'expression de Gfra3 , ce récepteur est aussi exprimé par le système nerveux. Nous devrions donc aussi observé un signal pour Gfra3 dans les cellules Ngn3^- , correspondant aux cellules neuronales. Nous pensons qu'au cours du protocole de préparation des cellules en vue du tri au FACS, nous perdons cette population de cellules neuronales. Ainsi, il ne nous resterait que les cellules provenant du lignage endocrine. En réalisant des tris et en récupérant les populations de cellules Gfra3 -positives vs Gfra3 -négatives provenant d'embryons $\text{Ngn3}^{+/e\text{YFP}}$, nous espérons pouvoir caractériser les cellules $\text{Gfra3}^+\text{Ngn3}^+$ et $\text{Gfra3}^+\text{Ngn3}^-$ en analysant leur profil transcriptomique. Nous souhaitons aussi caractériser les différents types de cellules ainsi triés par des analyses transcriptomiques à partir de cellules isolées (One Cell RNA seq). Nous espérons que les résultats de ces expériences nous permettront d'apporter de nouvelles connaissances quant au profil transcriptomique des sous types endocrines, nous aiguillant ainsi sur les mécanismes moléculaires régissant la spécification de chaque type cellulaire endocrine pancréatique.

G. Conclusion

Nous avons découvert une nouvelle voie de signalisation, $\text{Artn}/\text{Gfra3}$, dont le patron d'expression du récepteur Gfra3 est totalement inédit. Cette voie de signalisation apparait comme non essentielle à la différenciation endocrine ainsi qu'à la mise en place et au maintien de l'innervation. Cependant, l'identification de Gfra3 comme étant un récepteur membranaire exprimé par le lignage endocrine ouvre de nouvelles perspectives quant à la caractérisation de ces cellules au cours du développement.

Références

- Afelik, S., Qu, X., Hasrouni, E., Bukys, M.A., Deering, T., Nieuwoudt, S., Rogers, W., Macdonald, R.J., and Jensen, J. (2012). Notch-mediated patterning and cell fate allocation of pancreatic progenitor cells. *Development* 139, 1744-1753.
- Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K., and 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., Hald, J., Bodker, A., Yassin, H., Serup, P., and Hecksher-Sorensen, J. (2007). Preservation of proliferating pancreatic progenitor cells by Delta-Notch signaling in the embryonic chicken pancreas. *BMC Dev Biol* 7, 63.
- Ahren, B. (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* 43, 393-410.
- Ahren, B. (2006). Neuropeptides and the Regulation of Islet Function. In *Diabetes*, pp. 10.
- Ahren, B., and Holst, J.J. (2001). The cephalic insulin response to meal ingestion in humans is dependent on both cholinergic and noncholinergic mechanisms and is important for postprandial glycemia. *Diabetes* 50, 1030-1038.
- Airaksinen, M.S., and Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3, 383-394.
- Airaksinen, M.S., Titievsky, A., and Saarma, M. (1999). GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 13, 313-325.
- Ait-Lounis, A., Baas, D., Barras, E., Benadiba, C., Charollais, A., Nlend Nlend, R., Liegeois, D., Meda, P., Durand, B., and Reith, W. (2007). Novel function of the ciliogenic transcription factor RFX3 in development of the endocrine pancreas. *Diabetes* 56, 950-959.
- Ait-Lounis, A., Bonal, C., Seguin-Estevez, Q., Schmid, C.D., Bucher, P., Herrera, P.L., Durand, B., Meda, P., and Reith, W. (2010). The transcription factor Rfx3 regulates beta-cell differentiation, function, and glucokinase expression. *Diabetes* 59, 1674-1685.
- Andres, R., Forgie, A., Wyatt, S., Chen, Q., de Sauvage, F.J., and Davies, A.M. (2001). Multiple effects of artemin on sympathetic neurone generation, survival and growth. *Development* 128, 3685-3695.
- Ang, S.L., and Rossant, J. (1994). HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 78, 561-574.
- Apelqvist, A., Ahlgren, U., and Edlund, H. (1997). Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol* 7, 801-804.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D.J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U., and Edlund, H. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400, 877-881.
- Artner, I., Bianchi, B., Raum, J.C., Guo, M., Kaneko, T., Cordes, S., Sieweke, M., and Stein, R. (2007). MafB is required for islet beta cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3853-3858.
- Artner, I., Hang, Y., Mazur, M., Yamamoto, T., Guo, M., Lindner, J., Magnuson, M.A., and Stein, R. (2010). MafA and MafB regulate genes critical to beta-cells in a unique temporal manner. *Diabetes* 59, 2530-2539.
- Ashcroft, F.M., and Rorsman, P. (2012). Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. *Cell* 148, 1160-1171.
- Ashery-Padan, R., Zhou, X., Marquardt, T., Herrera, P., Toubé, L., Berry, A., and Gruss, P. (2004). Conditional inactivation of Pax6 in the pancreas causes early onset of diabetes. *Dev Biol* 269, 479-488.
- Attali, M., Stetsyuk, V., Basmaciogullari, A., Aiello, V., Zanta-Boussif, M.A., Duvillie, B., and Scharfmann, R. (2007). Control of beta-cell differentiation by the pancreatic mesenchyme. *Diabetes* 56, 1248-1258.
- Baeyens, L., Lemper, M., Leuckx, G., De Groef, S., Bonfanti, P., Stange, G., Shemer, R., Nord, C., Scheel, D.W., Pan, F.C., *et al.* (2014). Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice. *Nat Biotechnol* 32, 76-83.
- Baloh, R.H., Tansey, M.G., Lampe, P.A., Fahrner, T.J., Enomoto, H., Simburger, K.S., Leitner, M.L., Araki, T., Johnson, E.M., Jr., and Milbrandt, J. (1998). Artemin, a novel member of the GDNF

- ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* *21*, 1291-1302.
- Banerjee, A., Wu, Z.S., Qian, P.X., Kang, J., Liu, D.X., Zhu, T., and Lobie, P.E. (2010). ARTEMIN promotes de novo angiogenesis in ER negative mammary carcinoma through activation of TWIST1-VEGF-A signalling. *PLoS One* *7*, e50098.
- Barton, F.B., Rickels, M.R., Alejandro, R., Hering, B.J., Wease, S., Naziruddin, B., Oberholzer, J., Odorico, J.S., Garfinkel, M.R., Levy, M., *et al.* (2012). Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care* *35*, 1436-1445.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* *27*, 20-21.
- Bespalov, M.M., Sidorova, Y.A., Tumova, S., Ahonen-Bishopp, A., Magalhaes, A.C., Kuleskiy, E., Paveliev, M., Rivera, C., Rauvala, H., and Saarma, M. (2011). Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *J Cell Biol* *192*, 153-169.
- Beucher, A., Martin, M., Spenle, C., Poulet, M., Collin, C., and Gradwohl, G. (2011). Competence of failed endocrine progenitors to give rise to acinar but not ductal cells is restricted to early pancreas development. *Dev Biol* *361*, 277-285.
- Bhushan, A., Itoh, N., Kato, S., Thiery, J.P., Czernichow, P., Bellusci, S., and Scharfmann, R. (2001). Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development* *128*, 5109-5117.
- Blanchi, B., Kelly, L.M., Viemari, J.C., Lafon, I., Burnet, H., Bevengut, M., Tillmanns, S., Daniel, L., Graf, T., Hilaire, G., *et al.* (2003). MafB deficiency causes defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth. *Nat Neurosci* *6*, 1091-1100.
- Bonal, C., Thorel, F., Ait-Lounis, A., Reith, W., Trumpp, A., and Herrera, P.L. (2009). Pancreatic inactivation of c-Myc decreases acinar mass and transdifferentiates acinar cells into adipocytes in mice. *Gastroenterology* *136*, 309-319 e309.
- Bonnafe, E., Touka, M., AitLounis, A., Baas, D., Barras, E., Ucla, C., Moreau, A., Flamant, F., Dubruille, R., Couble, P., *et al.* (2004). The transcription factor RFX3 directs nodal cilium development and left-right asymmetry specification. *Mol Cell Biol* *24*, 4417-4427.
- Bonnefond, A., Froguel, P., and Vaxillaire, M. (2010). The emerging genetics of type 2 diabetes. *Trends Mol Med* *16*, 407-416.
- Bonner-Weir, S., and Orci, L. (1982). New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* *31*, 883-889.
- Borden, P., Houtz, J., Leach, S.D., and Kuruvilla, R. (2013). Sympathetic innervation during development is necessary for pancreatic islet architecture and functional maturation. *Cell Rep* *4*, 287-301.
- Borowiec, M., Liew, C.W., Thompson, R., Boonyasrisawat, W., Hu, J., Mlynarski, W.M., El Khattabi, I., Kim, S.H., Marselli, L., Rich, S.S., *et al.* (2009). Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 14460-14465.
- Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y.D., Giovannoni, L., Parnaud, G., and Berney, T. (2010). Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* *59*, 1202-1210.
- Bouwens, L., Houbracken, I., and Mfopou, J.K. (2013). The use of stem cells for pancreatic regeneration in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* *9*, 598-606.
- Brissova, M., Aamodt, K., Brahmachary, P., Prasad, N., Hong, J.Y., Dai, C., Mellati, M., Shostak, A., Poffenberger, G., Aramandla, R., *et al.* (2014). Islet microenvironment, modulated by vascular endothelial growth factor-A signaling, promotes beta cell regeneration. *Cell Metab* *19*, 498-511.
- Brissova, M., Shostak, A., Shiota, M., Wiebe, P.O., Poffenberger, G., Kantz, J., Chen, Z., Carr, C., Jerome, W.G., Chen, J., *et al.* (2006). Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor--a is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes* *55*, 2974-2985.
- Bruinzeel, W., and Masure, S. (2012). Recombinant expression, purification and dimerization of the neurotrophic growth factor Artemin for in vitro and in vivo use. *Protein Expr Purif* *81*, 25-32.

- Buj-Bello, A., Buchman, V.L., Horton, A., Rosenthal, A., and Davies, A.M. (1995). GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron* *15*, 821-828.
- Burlison, J.S., Long, Q., Fujitani, Y., Wright, C.V., and Magnuson, M.A. (2008). Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells. *Dev Biol* *316*, 74-86.
- Burris, R.E., and Hebrok, M. (2007). Pancreatic innervation in mouse development and beta-cell regeneration. *Neuroscience* *150*, 592-602.
- Cacalano, G., Farinas, I., Wang, L.C., Hagler, K., Forgie, A., Moore, M., Armanini, M., Phillips, H., Ryan, A.M., Reichardt, L.F., *et al.* (1998). GFR α 1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron* *21*, 53-62.
- Cai, Q., Brissova, M., Reinert, R.B., Pan, F.C., Brahmachary, P., Jeansson, M., Shostak, A., Radhika, A., Poffenberger, G., Quaggin, S.E., *et al.* (2012). Enhanced expression of VEGF-A in beta cells increases endothelial cell number but impairs islet morphogenesis and beta cell proliferation. *Dev Biol* *367*, 40-54.
- Cano, D.A., Soria, B., Martin, F., and Rojas, A. (2013). Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis. *Cell Mol Life Sci* *71*, 2383-2402.
- Carrasco, M., Delgado, I., Soria, B., Martin, F., and Rojas, A. (2012). GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis. *J Clin Invest* *122*, 3504-3515.
- Ceyhan, G.O., Schafer, K.H., Kerscher, A.G., Rauch, U., Demir, I.E., Kadihasanoglu, M., Bohm, C., Muller, M.W., Buchler, M.W., Giese, N.A., *et al.* (2010). Nerve growth factor and artemin are paracrine mediators of pancreatic neuropathy in pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg* *251*, 923-931.
- Chakrabarti, S.K., James, J.C., and Mirmira, R.G. (2002). Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor, Pdx1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding. *J Biol Chem* *277*, 13286-13293.
- Chandra, R., and Liddle, R.A. (2014a). Modulation of pancreatic exocrine and endocrine secretion. *Curr Opin Gastroenterol* *29*, 517-522.
- Chandra, R., and Liddle, R.A. (2014b). Recent advances in the regulation of pancreatic secretion. *Curr Opin Gastroenterol* *30*, 490-494.
- Cleveland, M.H., Sawyer, J.M., Afelik, S., Jensen, J., and Leach, S.D. (2012). Exocrine ontogenies: on the development of pancreatic acinar, ductal and centroacinar cells. *Semin Cell Dev Biol* *23*, 711-719.
- Collombat, P., Hecksher-Sorensen, J., Broccoli, V., Krull, J., Ponte, I., Mundiger, T., Smith, J., Gruss, P., Serup, P., and Mansouri, A. (2005). The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development* *132*, 2969-2980.
- Collombat, P., Hecksher-Sorensen, J., Krull, J., Berger, J., Riedel, D., Herrera, P.L., Serup, P., and 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., and 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, O.D., Serup, P., Heimberg, H., and 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.
- Courtney, M., Gjernes, E., Druelle, N., Ravaud, C., Vieira, A., Ben-Othman, N., Pfeifer, A., Avolio, F., Leuckx, G., Lacas-Gervais, S., *et al.* (2013). The inactivation of Arx in pancreatic alpha-cells triggers their neogenesis and conversion into functional beta-like cells. *PLoS Genet* *9*, e1003934.
- Courtney, M., Pfeifer, A., Al-Hasani, K., Gjernes, E., Vieira, A., Ben-Othman, N., and Collombat, P. (2011). In vivo conversion of adult alpha-cells into beta-like cells: a new research avenue in the context of type 1 diabetes. *Diabetes Obes Metab* *13 Suppl 1*, 47-52.
- Cras-Meneur, C., Li, L., Kopan, R., and Permutt, M.A. (2009). Presenilins, Notch dose control the fate of pancreatic endocrine progenitors during a narrow developmental window. *Genes Dev* *23*, 2088-2101.

- Crisera, C.A., Rose, M.I., Connelly, P.R., Li, M., Colen, K.L., Longaker, M.T., and Gittes, G.K. (1999). The ontogeny of TGF-beta1, -beta2, -beta3, and TGF-beta receptor-II expression in the pancreas: implications for regulation of growth and differentiation. *J Pediatr Surg* 34, 689-693; discussion 693-684.
- D'Amour, K.A., Bang, A.G., Eliazer, S., Kelly, O.G., Agulnick, A.D., Smart, N.G., Moorman, M.A., Kroon, E., Carpenter, M.K., and Baetge, E.E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24, 1392-1401.
- Damon, D.H., Teriele, J.A., and Marko, S.B. (2007). Vascular-derived artemin: a determinant of vascular sympathetic innervation? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H266-273.
- de Kok, Y.J., van der Maarel, S.M., Bitner-Glindzicz, M., Huber, I., Monaco, A.P., Malcolm, S., Pembrey, M.E., Ropers, H.H., and Cremers, F.P. (1995). Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science* 267, 685-688.
- Delepine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Lathrop, G.M., and Julier, C. (2000). EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet* 25, 406-409.
- Desgraz, R., and Herrera, P.L. (2009). Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors. *Development* 136, 3567-3574.
- Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lora, J., and Zaret, K.S. (2001). A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 128, 871-881.
- Dichmann, D.S., Miller, C.P., Jensen, J., Scott Heller, R., and 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, D.S., Yassin, H., and Serup, P. (2006). Analysis of pancreatic endocrine development in GDF11-deficient mice. *Dev Dyn* 235, 3016-3025.
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., and Melton, D.A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41-46.
- Dressler, G.R. (2006). The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 509-529.
- Drucker, D.J. (2013). Incretin action in the pancreas: potential promise, possible perils, and pathological pitfalls. *Diabetes* 62, 3316-3323.
- Duvillie, B., Attali, M., Bounacer, A., Ravassard, P., Basmaciogullari, A., and Scharfmann, R. (2006). The mesenchyme controls the timing of pancreatic beta-cell differentiation. *Diabetes* 55, 582-589.
- Edlund, H. (2002). Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 3, 524-532.
- Edsbacke, J., Johansson, J.K., Esni, F., Luo, Y., Radice, G.L., and Semb, H. (2005). Vascular function and sphingosine-1-phosphate regulate development of the dorsal pancreatic mesenchyme. *Development* 132, 1085-1092.
- Edwards, R.H., Rutter, W.J., and Hanahan, D. (1989). Directed expression of NGF to pancreatic beta cells in transgenic mice leads to selective hyperinnervation of the islets. *Cell* 58, 161-170.
- Ejarque, M., Cervantes, S., Pujadas, G., Tutusaus, A., Sanchez, L., and Gasa, R. (2013). Neurogenin3 cooperates with Foxa2 to autoactivate its own expression. *J Biol Chem* 288, 11705-11717.
- El Ouaamari, A., Kawamori, D., Dirice, E., Liew, C.W., Shadrach, J.L., Hu, J., Katsuta, H., Hollister-Lock, J., Qian, W.J., Wagers, A.J., *et al.* (2013). Liver-derived systemic factors drive beta cell hyperplasia in insulin-resistant states. *Cell Rep* 3, 401-410.
- Enomoto, H., Araki, T., Jackman, A., Heuckeroth, R.O., Snider, W.D., Johnson, E.M., Jr., and Milbrandt, J. (1998). GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* 21, 317-324.
- Esni, F., Johansson, B.R., Radice, G.L., and Semb, H. (2001). Dorsal pancreas agenesis in N-cadherin-deficient mice. *Dev Biol* 238, 202-212.
- Eto, K., Nishimura, W., Oishi, H., Udagawa, H., Kawaguchi, M., Hiramoto, M., Fujiwara, T., Takahashi, S., and Yasuda, K. (2014). MafA Is Required for Postnatal Proliferation of Pancreatic beta-Cells. *PLoS One* 9, e104184.
- Flanagan, S.E., Clauin, S., Bellanne-Chantelot, C., de Lonlay, P., Harries, L.W., Gloyn, A.L., and Ellard, S. (2009). Update of mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell K(ATP)

- channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and sulfonylurea receptor 1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. *Hum Mutat* 30, 170-180.
- Fuhlbrigge, R., and Yip, L. (2014). Self-antigen expression in the peripheral immune system: roles in self-tolerance and type 1 diabetes pathogenesis. *Curr Diab Rep* 14, 525.
- Fujikura, J., Hosoda, K., Iwakura, H., Tomita, T., Noguchi, M., Masuzaki, H., Tanigaki, K., Yabe, D., Honjo, T., and Nakao, K. (2006). Notch/Rbp-j signaling prevents premature endocrine and ductal cell differentiation in the pancreas. *Cell Metab* 3, 59-65.
- Fujikura, J., Hosoda, K., Kawaguchi, Y., Noguchi, M., Iwakura, H., Odori, S., Mori, E., Tomita, T., Hirata, M., Ebihara, K., *et al.* (2007). Rbp-j regulates expansion of pancreatic epithelial cells and their differentiation into exocrine cells during mouse development. *Dev Dyn* 236, 2779-2791.
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., *et al.* (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 43, 34-41.
- Gannon, M., Ables, E.T., Crawford, L., Lowe, D., Offield, M.F., Magnuson, M.A., and Wright, C.V. (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, T., McKenna, B., Li, C., Reichert, M., Nguyen, J., Singh, T., Yang, C., Pannikar, A., Doliba, N., Zhang, T., *et al.* (2014). *Pdx1* maintains beta cell identity and function by repressing an alpha cell program. *Cell Metab* 19, 259-271.
- Garcia, M., Hernandez-Lorenzo, P., San Roman, J.I., and Calvo, J.J. (2008). Pancreatic duct secretion: experimental methods, ion transport mechanisms and regulation. *J Physiol Biochem* 64, 243-257.
- Geloneze, B., Lamounier, R.N., and Coelho, O.R. (2006). Postprandial hyperglycemia: treating its atherogenic potential. *Arq Bras Cardiol* 87, 660-670.
- Gittes, G.K., Galante, P.E., Hanahan, D., Rutter, W.J., and Debase, H.T. (1996). Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* 122, 439-447.
- Glebova, N.O., and Ginty, D.D. (2004). Heterogeneous requirement of NGF for sympathetic target innervation in vivo. *J Neurosci* 24, 743-751.
- Glebova, N.O., and Ginty, D.D. (2005). Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 28, 191-222.
- Gloyn, A.L., Pearson, E.R., Antcliff, J.F., Proks, P., Bruining, G.J., Slingerland, A.S., Howard, N., Srinivasan, S., Silva, J.M., Molnes, J., *et al.* (2004). Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med* 350, 1838-1849.
- Goetz, R., and Mohammadi, M. (2013). Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 166-180.
- Golden, J.P., Baloh, R.H., Kotzbauer, P.T., Lampe, P.A., Osborne, P.A., Milbrandt, J., and Johnson, E.M., Jr. (1998). Expression of neurturin, GDNF, and their receptors in the adult mouse CNS. *J Comp Neurol* 398, 139-150.
- Golosow, N., and Grobstein, C. (1962). Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis. *Dev Biol* 4, 242-255.
- Gouzi, M., Kim, Y.H., Katsumoto, K., Johansson, K., and Grapin-Botton, A. (2011). Neurogenin3 initiates stepwise delamination of differentiating endocrine cells during pancreas development. *Dev Dyn* 240, 589-604.
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., and 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.
- Gu, G., Dubauskaite, J., and Melton, D.A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129, 2447-2457.
- Guz, Y., Montminy, M.R., Stein, R., Leonard, J., Gamer, L.W., Wright, C.V., and Teitelman, G. (1995). Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 121, 11-18.

- Habener, J.F., and Stoffers, D.A. (1998). A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians* 110, 12-21.
- Hald, J., Galbo, T., Rescan, C., Radzikowski, L., Sprinkel, A.E., Heimberg, H., Ahnfelt-Ronne, J., Jensen, J., Scharfmann, R., Gradwohl, G., *et al.* (2012). Pancreatic islet and progenitor cell surface markers with cell sorting potential. *Diabetologia* 55, 154-165.
- Hald, J., Hjorth, J.P., German, M.S., Madsen, O.D., Serup, P., and Jensen, J. (2003). Activated Notch1 prevents differentiation of pancreatic acinar cells and attenuate endocrine development. *Dev Biol* 260, 426-437.
- Harmon, E.B., Apelqvist, A.A., Smart, N.G., Gu, X., Osborne, D.H., and Kim, S.K. (2004). GDF11 modulates NGN3+ islet progenitor cell number and promotes beta-cell differentiation in pancreas development. *Development* 131, 6163-6174.
- Harrison, K.A., Thaler, J., Pfaff, S.L., Gu, H., and Kehrl, J.H. (1999). Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlx9-deficient mice. *Nat Genet* 23, 71-75.
- Hattersley, A.T., and Ashcroft, F.M. (2005). Activating mutations in Kir6.2 and neonatal diabetes: new clinical syndromes, new scientific insights, and new therapy. *Diabetes* 54, 2503-2513.
- Hearn, C.J., Murphy, M., and Newgreen, D. (1998). GDNF and ET-3 differentially modulate the numbers of avian enteric neural crest cells and enteric neurons in vitro. *Dev Biol* 197, 93-105.
- Hebrok, M., Kim, S.K., and Melton, D.A. (1998). Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* 12, 1705-1713.
- Hebrok, M., Kim, S.K., St Jacques, B., McMahon, A.P., and Melton, D.A. (2000). Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development* 127, 4905-4913.
- Heinis, M., Simon, M.T., Ilc, K., Mazure, N.M., Pouyssegur, J., Scharfmann, R., and Duvillie, B. (2011). Oxygen tension regulates pancreatic beta-cell differentiation through hypoxia-inducible factor 1alpha. *Diabetes* 59, 662-669.
- Heller, R.S., Stoffers, D.A., Liu, A., Schedl, A., Crenshaw, E.B., 3rd, Madsen, O.D., and Serup, P. (2004). The role of Brn4/Pou3f4 and Pax6 in forming the pancreatic glucagon cell identity. *Dev Biol* 268, 123-134.
- Hellmich, H.L., Kos, L., Cho, E.S., Mahon, K.A., and Zimmer, A. (1996). Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech Dev* 54, 95-105.
- Henderson, R.H., Li, Z., Abd El Aziz, M.M., Mackay, D.S., Eljinini, M.A., Zeidan, M., Moore, A.T., Bhattacharya, S.S., and Webster, A.R. (2010). Biallelic mutation of protocadherin-21 (PCDH21) causes retinal degeneration in humans. *Mol Vis* 16, 46-52.
- Henseleit, K.D., Nelson, S.B., Kuhlbrodt, K., Hennings, J.C., Ericson, J., and Sander, M. (2005). NKX6 transcription factor activity is required for alpha- and beta-cell development in the pancreas. *Development* 132, 3139-3149.
- Heuckeroth, R.O., Enomoto, H., Grider, J.R., Golden, J.P., Hanke, J.A., Jackman, A., Molliver, D.C., Bardgett, M.E., Snider, W.D., Johnson, E.M., Jr., *et al.* (1999). Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* 22, 253-263.
- Heuckeroth, R.O., Lampe, P.A., Johnson, E.M., and Milbrandt, J. (1998). Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro. *Dev Biol* 200, 116-129.
- Hill, D.L., E (1993). Congenital abnormalities of the exocrine pancreas. *Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease*.
- Honma, Y., Araki, T., Gianino, S., Bruce, A., Heuckeroth, R., Johnson, E., and Milbrandt, J. (2002). Artemin is a vascular-derived neurotropic factor for developing sympathetic neurons. *Neuron* 35, 267-282.
- Horger, B.A., Nishimura, M.C., Armanini, M.P., Wang, L.C., Poulsen, K.T., Rosenblad, C., Kirik, D., Moffat, B., Simmons, L., Johnson, E., Jr., *et al.* (1998). Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 18, 4929-4937.
- Huang, H.P., Liu, M., El-Hodiri, H.M., Chu, K., Jamrich, M., and Tsai, M.J. (2000). Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol* 20, 3292-3307.

- Hummel, D., Aggarwal, A., Borka, K., Bajna, E., Kallay, E., and Horvath, H.C. (2014). The vitamin D system is deregulated in pancreatic diseases. *J Steroid Biochem Mol Biol* *144PB*, 402-409.
- Hussain, M.A., Lee, J., Miller, C.P., and Habener, J.F. (1997). POU domain transcription factor brain 4 confers pancreatic alpha-cell-specific expression of the proglucagon gene through interaction with a novel proximal promoter G1 element. *Mol Cell Biol* *17*, 7186-7194.
- Hussain, M.A., Miller, C.P., and Habener, J.F. (2002). Brn-4 transcription factor expression targeted to the early developing mouse pancreas induces ectopic glucagon gene expression in insulin-producing beta cells. *J Biol Chem* *277*, 16028-16032.
- Ishii, K., Doi, T., Inoue, K., Okawada, M., Lane, G.J., Yamataka, A., and Akazawa, C. (2012). Correlation between multiple RET mutations and severity of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* *29*, 157-163.
- Jacquemin, P., Durviaux, S.M., Jensen, J., Godfraind, C., Gradwohl, G., Guillemot, F., Madsen, O.D., Carmeliet, P., Dewerchin, M., Collen, D., *et al.* (2000). Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene *ngn3*. *Mol Cell Biol* *20*, 4445-4454.
- Jacquemin, P., Lemaigre, F.P., and Rousseau, G.G. (2003). The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade. *Dev Biol* *258*, 105-116.
- Jacquemin, P., Yoshitomi, H., Kashima, Y., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P., and Zaret, K.S. (2006). An endothelial-mesenchymal relay pathway regulates early phases of pancreas development. *Dev Biol* *290*, 189-199.
- Jankowski, M.P., Rau, K.K., Soneji, D.J., Anderson, C.E., and Koerber, H.R. (2010). Enhanced artemin/GFRalpha3 levels regulate mechanically insensitive, heat-sensitive C-fiber recruitment after axotomy and regeneration. *J Neurosci* *30*, 16272-16283.
- Johansson, K.A., Dursun, U., Jordan, N., Gu, G., Beermann, F., Gradwohl, G., and 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., Ahlgren, U., Edlund, T., and Edlund, H. (1995). IPF1, a homeodomain protein with a dual function in pancreas development. *Int J Dev Biol* *39*, 789-798.
- Jorgensen, M.C., Ahnfelt-Ronne, J., Hald, J., Madsen, O.D., Serup, P., and Hecksher-Sorensen, J. (2007). An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev* *28*, 685-705.
- Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M., and Zaret, K.S. (1999). Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* *284*, 1998-2003.
- Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J.M., Tajima, Y., Taya, C., Kurohmaru, M., Sanai, Y., Yonekawa, H., Yazaki, K., Tam, P.P., *et al.* (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development* *129*, 2367-2379.
- Kang, J., Perry, J.K., Pandey, V., Fielder, G.C., Mei, B., Qian, P.X., Wu, Z.S., Zhu, T., Liu, D.X., and Lobie, P.E. (2009). Artemin is oncogenic for human mammary carcinoma cells. *Oncogene* *28*, 2034-2045.
- Karlsson, S., Scheurink, A.J., Steffens, A.B., and Ahren, B. (1994). Involvement of capsaicin-sensitive nerves in regulation of insulin secretion and glucose tolerance in conscious mice. *Am J Physiol* *267*, R1071-1077.
- Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R.J., and Wright, C.V. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* *32*, 128-134.
- Kawahira, H., Ma, N.H., Tzanakakis, E.S., McMahon, A.P., Chuang, P.T., and Hebrok, M. (2003). Combined activities of hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development. *Development* *130*, 4871-4879.
- Kawahira, H., Scheel, D.W., Smith, S.B., German, M.S., and Hebrok, M. (2005). Hedgehog signaling regulates expansion of pancreatic epithelial cells. *Dev Biol* *280*, 111-121.
- Keefe Davis, T., Hoshi, M., and Jain, S. (2014). Stage specific requirement of Gfralpha1 in the ureteric epithelium during kidney development. *Mech Dev* *130*, 506-518.
- Kim, S.K., Hebrok, M., and Melton, D.A. (1997). Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. *Development* *124*, 4243-4252.

- Kirchgessner, A.L., Adlersberg, M.A., and Gershon, M.D. (1992). Colonization of the developing pancreas by neural precursors from the bowel. *Dev Dyn* 194, 142-154.
- Knight, R.D., Mebus, K., d'Angelo, A., Yokoya, K., Heanue, T., and Roehl, H. (2011). Ret signalling integrates a craniofacial muscle module during development. *Development* 138, 2015-2024.
- Kopp, J.L., Dubois, C.L., Schaffer, A.E., Hao, E., Shih, H.P., Seymour, P.A., Ma, J., and Sander, M. (2011). 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.
- Kotzbauer, P.T., Lampe, P.A., Heuckeroth, R.O., Golden, J.P., Creedon, D.J., Johnson, E.M., Jr., and Milbrandt, J. (1996). Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384, 467-470.
- Krapp, A., Knofler, M., Ledermann, B., Burki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbuchle, O., and Wellauer, P.K. (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* 12, 3752-3763.
- Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazar, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., Cunningham, J., *et al.* (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26, 443-452.
- Lacy, P.E., and Scharp, D.W. (1986). Islet transplantation in treating diabetes. *Annu Rev Med* 37, 33-40.
- Lahteenmaki, M., Kupari, J., and Airaksinen, M.S. (2007). Increased apoptosis of parasympathetic but not enteric neurons in mice lacking GFRalpha2. *Dev Biol* 305, 325-332.
- Lammert, E., Brown, J., and Melton, D.A. (2000). Notch gene expression during pancreatic organogenesis. *Mech Dev* 94, 199-203.
- Lammert, E., Cleaver, O., and Melton, D. (2001). Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294, 564-567.
- Lammert, E., Gu, G., McLaughlin, M., Brown, D., Brekken, R., Murtaugh, L.C., Gerber, H.P., Ferrara, N., and Melton, D.A. (2003). Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Curr Biol* 13, 1070-1074.
- Lau, J., Kawahira, H., and Hebrok, M. (2006). Hedgehog signaling in pancreas development and disease. *Cell Mol Life Sci* 63, 642-652.
- Lausier, J., Diaz, W.C., Roskens, V., LaRock, K., Herzer, K., Fong, C.G., Latour, M.G., Peshavaria, M., and Jetton, T.L. (2010). Vagal control of pancreatic ss-cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299, E786-793.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945-1948.
- Li, C., Chen, P., Vaughan, J., Blount, A., Chen, A., Jamieson, P.M., Rivier, J., Smith, M.S., and Vale, W. (2003). Urocortin III is expressed in pancreatic beta-cells and stimulates insulin and glucagon secretion. *Endocrinology* 144, 3216-3224.
- Li, C., Chen, P., Vaughan, J., Lee, K.F., and Vale, W. (2007). Urocortin 3 regulates glucose-stimulated insulin secretion and energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4206-4211.
- Li, H., Arber, S., Jessell, T.M., and Edlund, H. (1999). Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat Genet* 23, 67-70.
- Li, W., Nakanishi, M., Zumsteg, A., Shear, M., Wright, C., Melton, D.A., and Zhou, Q. (2014). In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine subtypes. *Elife* 3, e01846.
- Lilla, V., Webb, G., Rickenbach, K., Maturana, A., Steiner, D.F., Halban, P.A., and Irminger, J.C. (2003). Differential gene expression in well-regulated and dysregulated pancreatic beta-cell (MIN6) sublines. *Endocrinology* 144, 1368-1379.
- Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S., and Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130-1132.
- Lindhahl, M., Danilova, T., Palm, E., Lindholm, P., Voikar, V., Hakonen, E., Ustinov, J., Andressoo, J.O., Harvey, B.K., Otonkoski, T., *et al.* (2014). MANF is indispensable for the proliferation and survival of pancreatic beta cells. *Cell Rep* 7, 366-375.

- Lindhahl, M., Timmusk, T., Rossi, J., Saarma, M., and Airaksinen, M.S. (2000). Expression and alternative splicing of mouse *Gfra4* suggest roles in endocrine cell development. *Mol Cell Neurosci* *15*, 522-533.
- Lindfors, P.H., Lindahl, M., Rossi, J., Saarma, M., and Airaksinen, M.S. (2006). Ablation of persephin receptor glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor $\alpha 4$ impairs thyroid calcitonin production in young mice. *Endocrinology* *147*, 2237-2244.
- Lucini, C., Maruccio, L., Tafuri, S., Staiano, N., and Castaldo, L. (2004). Artemin-like immunoreactivity in the zebrafish, *Danio rerio*. *Anat Embryol (Berl)* *208*, 403-410.
- Lynn, F.C., Smith, S.B., Wilson, M.E., Yang, K.Y., Nekrep, N., and German, M.S. (2007). Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 10500-10505.
- Maassen, J.A. (2002). Mitochondrial diabetes: pathophysiology, clinical presentation, and genetic analysis. *Am J Med Genet* *115*, 66-70.
- Madsen, O.D., and Serup, P. (2006). Towards cell therapy for diabetes. *Nat Biotechnol* *24*, 1481-1483.
- Magenheim, J., Ilovich, O., Lazarus, A., Klochendler, A., Ziv, O., Werman, R., Hija, A., Cleaver, O., Mishani, E., Keshet, E., *et al.* (2011). Blood vessels restrain pancreas branching, differentiation and growth. *Development* *138*, 4743-4752.
- Manie, S., Santoro, M., Fusco, A., and Billaud, M. (2001). The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet* *17*, 580-589.
- Margraf, R.L., Crockett, D.K., Krautscheid, P.M., Seamons, R., Calderon, F.R., Wittwer, C.T., and Mao, R. (2009). Multiple endocrine neoplasia type 2 RET protooncogene database: repository of MEN2-associated RET sequence variation and reference for genotype/phenotype correlations. *Hum Mutat* *30*, 548-556.
- Mark, M., Teletin, M., Vernet, N., and Ghyselinck, N.B. (2014). Role of retinoic acid receptor (RAR) signaling in post-natal male germ cell differentiation. *Biochim Biophys Acta*.
- Martin, M., Gallego-Llamas, J., Ribes, V., Kedinger, M., Niederreither, K., Chambon, P., Dolle, P., and Gradwohl, G. (2005). Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient *Raldh2* mutant mice. *Dev Biol* *284*, 399-411.
- Masure, S., Geerts, H., Cik, M., Hoefnagel, E., Van Den Kieboom, G., Tuytelaars, A., Harris, S., Lesage, A.S., Leysen, J.E., Van Der Helm, L., *et al.* (1999). Enovin, a member of the glial cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) family with growth promoting activity on neuronal cells. Existence and tissue-specific expression of different splice variants. *Eur J Biochem* *266*, 892-902.
- Matsuoka, T.A., Artner, I., Henderson, E., Means, A., Sander, M., and Stein, R. (2004). The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 2930-2933.
- McCarthy, M.I. (2010). Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *N Engl J Med* *363*, 2339-2350.
- McLin, V.A., Rankin, S.A., and Zorn, A.M. (2007). Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development* *134*, 2207-2217.
- Mellitzer, G., Martin, M., Sidhoum-Jenny, M., Orvain, C., Barths, J., Seymour, P.A., Sander, M., and Gradwohl, G. (2004). Pancreatic islet progenitor cells in neurogenin 3-yellow fluorescent protein knock-add-on mice. *Mol Endocrinol* *18*, 2765-2776.
- Meng, L.X., Chi, Y.H., Wang, X.X., Ding, Z.J., Fei, L.C., Zhang, H., Mou, L., Cui, W., and Xue, Y.J. (2013). Neurotrophic artemin promotes motility and invasiveness of MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* *13*, 1793-1797.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvonen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., *et al.* (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* *287*, 1489-1493.
- Milbrandt, J., de Sauvage, F.J., Fahrner, T.J., Baloh, R.H., Leitner, M.L., Tansey, M.G., Lampe, P.A., Heuckeroth, R.O., Kotzbauer, P.T., Simburger, K.S., *et al.* (1998). Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* *20*, 245-253.
- Miralles, F., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (1998). Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development* *125*, 1017-1024.

- Miyatsuka, T., Kosaka, Y., Kim, H., and German, M.S. (2011). Neurogenin3 inhibits proliferation in endocrine progenitors by inducing Cdkn1a. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 185-190.
- Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., and Yamamura, K. (1990). Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* *127*, 126-132.
- Molliver, D.C., Wright, D.E., Leitner, M.L., Parsadanian, A.S., Doster, K., Wen, D., Yan, Q., and Snider, W.D. (1997). IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* *19*, 849-861.
- Molotkov, A., Molotkova, N., and Duester, G. (2005). Retinoic acid generated by Raldh2 in mesoderm is required for mouse dorsal endodermal pancreas development. *Dev Dyn* *232*, 950-957.
- Molven, A., and Njolstad, P.R. (2011). Role of molecular genetics in transforming diagnosis of diabetes mellitus. *Expert Rev Mol Diagn* *11*, 313-320.
- Munoz-Bravo, J.L., Hidalgo-Figueroa, M., Pascual, A., Lopez-Barneo, J., Leal-Cerro, A., and Cano, D.A. (2013). GDNF is required for neural colonization of the pancreas. *Development* *140*, 3669-3679.
- Murphy, K.G., and Bloom, S.R. (2006). Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* *444*, 854-859.
- Murtaugh, L.C., Stanger, B.Z., Kwan, K.M., and Melton, D.A. (2003). Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 14920-14925.
- Mwangi, S., Anitha, M., Mallikarjun, C., Ding, X., Hara, M., Parsadanian, A., Larsen, C.P., Thule, P., Sitaraman, S.V., Anania, F., *et al.* (2008). Glial cell line-derived neurotrophic factor increases beta-cell mass and improves glucose tolerance. *Gastroenterology* *134*, 727-737.
- Mwangi, S.M., Usta, Y., Raja, S.M., Anitha, M., Chandrasekharan, B., Parsadanian, A., Sitaraman, S.V., and Srinivasan, S. (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances neurogenin3 gene expression and beta-cell proliferation in the developing mouse pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *299*, G283-292.
- Nakayama, K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* *327 (Pt 3)*, 625-635.
- Naughton, C.K., Jain, S., Strickland, A.M., Gupta, A., and Milbrandt, J. (2006). Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol Reprod* *74*, 314-321.
- Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F.J., Leiter, A.B., and Tsai, M.J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* *11*, 2323-2334.
- Naya, F.J., Stellrecht, C.M., and Tsai, M.J. (1995). Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev* *9*, 1009-1019.
- Nekrep, N., Wang, J., Miyatsuka, T., and German, M.S. (2008). Signals from the neural crest regulate beta-cell mass in the pancreas. *Development* *135*, 2151-2160.
- Nelson, S.B., Schaffer, A.E., and Sander, M. (2007). The transcription factors Nkx6.1 and Nkx6.2 possess equivalent activities in promoting beta-cell fate specification in Pdx1+ pancreatic progenitor cells. *Development* *134*, 2491-2500.
- Nikolova, G., Jabs, N., Konstantinova, I., Domogatskaya, A., Tryggvason, K., Sorokin, L., Fassler, R., Gu, G., Gerber, H.P., Ferrara, N., *et al.* (2006). The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and Beta cell proliferation. *Dev Cell* *10*, 397-405.
- Nishimura, W., Kondo, T., Salameh, T., El Khattabi, I., Dodge, R., Bonner-Weir, S., and Sharma, A. (2006). A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic beta-cells. *Dev Biol* *293*, 526-539.
- Nishino, J., Mochida, K., Ohfuji, Y., Shimazaki, T., Meno, C., Ohishi, S., Matsuda, Y., Fujii, H., Saijoh, Y., and Hamada, H. (1999). GFR alpha3, a component of the artemin receptor, is required for migration and survival of the superior cervical ganglion. *Neuron* *23*, 725-736.
- Norman, A.W. (2008). From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* *88*, 491S-499S.

- Norman, A.W., Frankel, J.B., Heldt, A.M., and Grodsky, G.M. (1980). Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* *209*, 823-825.
- Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L., and Wright, C.V. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* *122*, 983-995.
- Ohlsson, H., Karlsson, K., and Edlund, T. (1993). IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J* *12*, 4251-4259.
- Okada, T., Liew, C.W., Hu, J., Hinault, C., Michael, M.D., Krtzfeldt, J., Yin, C., Holzenberger, M., Stoffel, M., and Kulkarni, R.N. (2007). Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 8977-8982.
- Olbrot, M., Rud, J., Moss, L.G., and Sharma, A. (2002). Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 6737-6742.
- Osbak, K.K., Colclough, K., Saint-Martin, C., Beer, N.L., Bellanne-Chantelot, C., Ellard, S., and Gloyn, A.L. (2009). Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat* *30*, 1512-1526.
- P. Niccoli-Sire, B.C.-D. (2007). Néoplasies endocriniennes multiples de type 2. *Annales d'Endocrinologie*, 1-12.
- Pachnis, V., Mankoo, B., and Costantini, F. (1993). Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development* *119*, 1005-1017.
- Pagliuca, F.W., and Melton, D.A. (2013). How to make a functional beta-cell. *Development* *140*, 2472-2483.
- Palomer, X., Gonzalez-Clemente, J.M., Blanco-Vaca, F., and Mauricio, D. (2008). Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* *10*, 185-197.
- Paratcha, G., Ledda, F., Baars, L., Couplier, M., Besset, V., Anders, J., Scott, R., and Ibanez, C.F. (2001). Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron* *29*, 171-184.
- Paratcha, G., Ledda, F., and Ibanez, C.F. (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* *113*, 867-879.
- Pedersen, J.K., Nelson, S.B., Jorgensen, M.C., Henseleit, K.D., Fujitani, Y., Wright, C.V., Sander, M., and Serup, P. (2005). Endodermal expression of Nkx6 genes depends differentially on Pdx1. *Dev Biol* *288*, 487-501.
- Pernicova, I., and Korbonits, M. (2014). Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol* *10*, 143-156.
- Piccand, J., Meunier, A., Merle, C., Jia, Z., Barnier, J.V., and Gradwohl, G. (2013). Pak3 promotes cell cycle exit and differentiation of beta-cells in the embryonic pancreas and is necessary to maintain glucose homeostasis in adult mice. *Diabetes* *63*, 203-215.
- Pichel, J.G., Shen, L., Sheng, H.Z., Granholm, A.C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E.J., Huang, S.P., Saarma, M., Hoffer, B.J., *et al.* (1996). Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* *382*, 73-76.
- Pierreux, C.E., Cordi, S., Hick, A.C., Achouri, Y., Ruiz de Almodovar, C., Prevot, P.P., Courtoy, P.J., Carmeliet, P., and Lemaigre, F.P. (2010). Epithelial: Endothelial cross-talk regulates exocrine differentiation in developing pancreas. *Dev Biol* *347*, 216-227.
- Pinney, S.E., Oliver-Krasinski, J., Ernst, L., Hughes, N., Patel, P., Stoffers, D.A., Russo, P., and De Leon, D.D. (2011). Neonatal diabetes and congenital malabsorptive diarrhea attributable to a novel mutation in the human neurogenin-3 gene coding sequence. *J Clin Endocrinol Metab* *96*, 1960-1965.
- Plank, J.L., Mundell, N.A., Frist, A.Y., LeGrone, A.W., Kim, T., Musser, M.A., Walter, T.J., and Labosky, P.A. (2011). Influence and timing of arrival of murine neural crest on pancreatic beta cell development and maturation. *Dev Biol* *349*, 321-330.
- Plaza-Menacho, I., Mologni, L., and McDonald, N.Q. (2014). Mechanisms of RET signaling in cancer: current and future implications for targeted therapy. *Cell Signal* *26*, 1743-1752.
- Provost, E., Rhee, J., and Leach, S.D. (2007). Viral 2A peptides allow expression of multiple proteins from a single ORF in transgenic zebrafish embryos. *Genesis* *45*, 625-629.

- Qu, X., Afelik, S., Jensen, J.N., Bukys, M.A., Kobberup, S., Schmerr, M., Xiao, F., Nyeng, P., Veronica Albertoni, M., Grapin-Botton, A., *et al.* (2013). Notch-mediated post-translational control of Ngn3 protein stability regulates pancreatic patterning and cell fate commitment. *Dev Biol* 376, 1-12.
- Ravassard, P., Chatail, F., Mallet, J., and Icard-Liepkalns, C. (1997). Relax, a novel rat bHLH transcriptional regulator transiently expressed in the ventricular proliferating zone of the developing central nervous system. *J Neurosci Res* 48, 146-158.
- Reinert, R.B., Brissova, M., Shostak, A., Pan, F.C., Poffenberger, G., Cai, Q., Hundemer, G.L., Kantz, J., Thompson, C.S., Dai, C., *et al.* (2013). Vascular endothelial growth factor-a and islet vascularization are necessary in developing, but not adult, pancreatic islets. *Diabetes* 62, 4154-4164.
- Reinert, R.B., Cai, Q., Hong, J.Y., Plank, J.L., Aamodt, K., Prasad, N., Aramandla, R., Dai, C., Levy, S.E., Pozzi, A., *et al.* (2014). Vascular endothelial growth factor coordinates islet innervation via vascular scaffolding. *Development* 141, 1480-1491.
- Rhinn, M., and Dolle, P. (2012). Retinoic acid signalling during development. *Development* 139, 843-858.
- Rohayem, J., Ehlers, C., Wiedemann, B., Holl, R., Oexle, K., Kordonouri, O., Salzano, G., Meissner, T., Burger, W., Schober, E., *et al.* Diabetes and neurodegeneration in Wolfram syndrome: a multicenter study of phenotype and genotype. *Diabetes Care* 34, 1503-1510.
- Rose, S.D., Swift, G.H., Peyton, M.J., Hammer, R.E., and MacDonald, R.J. (2001). The role of PTF1-P48 in pancreatic acinar gene expression. *J Biol Chem* 276, 44018-44026.
- Rosenblad, C., Gronborg, M., Hansen, C., Blom, N., Meyer, M., Johansen, J., Dago, L., Kirik, D., Patel, U.A., Lundberg, C., *et al.* (2000). In vivo protection of nigral dopamine neurons by lentiviral gene transfer of the novel GDNF-family member neublastin/artemin. *Mol Cell Neurosci* 15, 199-214.
- Rossi, J., Herzig, K.H., Voikar, V., Hiltunen, P.H., Segerstrale, M., and Airaksinen, M.S. (2003). Alimentary tract innervation deficits and dysfunction in mice lacking GDNF family receptor alpha2. *J Clin Invest* 112, 707-716.
- Rossi, J., Luukko, K., Poteryaev, D., Laurikainen, A., Sun, Y.F., Laakso, T., Erikainen, S., Tuominen, R., Lakso, M., Rauvala, H., *et al.* (1999). Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2, a functional neurturin receptor. *Neuron* 22, 243-252.
- Rossi, J., Santamaki, P., Airaksinen, M.S., and Herzig, K.H. (2005). Parasympathetic innervation and function of endocrine pancreas requires the glial cell line-derived factor family receptor alpha2 (GFRalpha2). *Diabetes* 54, 1324-1330.
- Rossi, J.M., Dunn, N.R., Hogan, B.L., and Zaret, K.S. (2009). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 15, 1998-2009.
- Saarma, M., and Sariola, H. (1999). Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech* 45, 292-302.
- Salpeter, S.J., Khalaileh, A., Weinberg-Corem, N., Ziv, O., Glaser, B., and Dor, Y. (2013). Systemic regulation of the age-related decline of pancreatic beta-cell replication. *Diabetes* 62, 2843-2848.
- Sanchez, M.P., Silos-Santiago, I., Frisen, J., He, B., Lira, S.A., and Barbacid, M. (1996). Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 70-73.
- Sander, M., Neubuser, A., Kalamaras, J., Ee, H.C., Martin, G.R., and German, M.S. (1997). Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* 11, 1662-1673.
- Sander, M., Sussel, L., Connors, J., Scheel, D., Kalamaras, J., Dela Cruz, F., Schwitzgebel, V., Hayes-Jordan, A., and German, M. (2000). Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 127, 5533-5540.
- Sano, K., Tanihara, H., Heimark, R.L., Obata, S., Davidson, M., St John, T., Taketani, S., and Suzuki, S. (1993). Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J* 12, 2249-2256.

- Sanvito, F., Herrera, P.L., Huarte, J., Nichols, A., Montesano, R., Orci, L., and Vassalli, J.D. (1994). TGF-beta 1 influences the relative development of the exocrine and endocrine pancreas in vitro. *Development* *120*, 3451-3462.
- Sanvito, F., Nichols, A., Herrera, P.L., Huarte, J., Wohlwend, A., Vassalli, J.D., and Orci, L. (1995). TGF-beta 1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNF-alpha, triggers insulin-dependent diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* *217*, 1279-1286.
- Schaffer, A.E., Freude, K.K., Nelson, S.B., and Sander, M. (2010). Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors. *Dev Cell* *18*, 1022-1029.
- Schaffer, A.E., Taylor, B.L., Benthuyesen, J.R., Liu, J., Thorel, F., Yuan, W., Jiao, Y., Kaestner, K.H., Herrera, P.L., Magnuson, M.A., *et al.* (2013). Nkx6.1 controls a gene regulatory network required for establishing and maintaining pancreatic Beta cell identity. *PLoS Genet* *9*, e1003274.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., and Pachnis, V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* *367*, 380-383.
- Schwitzgebel, V.M., Scheel, D.W., Connors, J.R., Kalamaras, J., Lee, J.E., Anderson, D.J., Sussel, L., Johnson, J.D., and German, M.S. (2000). Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* *127*, 3533-3542.
- Sellick, G.S., Barker, K.T., Stolte-Dijkstra, I., Fleischmann, C., Coleman, R.J., Garrett, C., Gloyn, A.L., Edghill, E.L., Hattersley, A.T., Wellauer, P.K., *et al.* (2004). Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis. *Nat Genet* *36*, 1301-1305.
- Senee, V., Chelala, C., Duchatelet, S., Feng, D., Blanc, H., Cossec, J.C., Charon, C., Nicolino, M., Boileau, P., Cavener, D.R., *et al.* (2006). Mutations in GLIS3 are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital hypothyroidism. *Nat Genet* *38*, 682-687.
- Serra, A., Gorgens, H., Alhadad, K., Ziegler, A., Fitze, G., and Schackert, H.K. (2009). Analysis of RET, ZEB2, EDN3 and GDNF genomic rearrangements in 80 patients with Hirschsprung disease (using multiplex ligation-dependent probe amplification). *Ann Hum Genet* *73*, 147-151.
- Servitja, J.M., and Ferrer, J. (2004). Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia* *47*, 597-613.
- Seymour, P.A., Freude, K.K., Dubois, C.L., Shih, H.P., Patel, N.A., and Sander, M. (2008). A dosage-dependent requirement for Sox9 in pancreatic endocrine cell formation. *Dev Biol* *323*, 19-30.
- Seymour, P.A., Freude, K.K., Tran, M.N., Mayes, E.E., Jensen, J., Kist, R., Scherer, G., and Sander, M. (2007). SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 1865-1870.
- Seymour, P.A., Shih, H.P., Patel, N.A., Freude, K.K., Xie, R., Lim, C.J., and Sander, M. A Sox9/Fgf feed-forward loop maintains pancreatic organ identity. *Development* *139*, 3363-3372.
- Shah, S.R., Esni, F., Jakub, A., Paredes, J., Lath, N., Malek, M., Potoka, D.A., Prasad, K., Mastroberardino, P.G., Shiota, C., *et al.* (2011). Embryonic mouse blood flow and oxygen correlate with early pancreatic differentiation. *Dev Biol* *349*, 342-349.
- Shakya, R., Watanabe, T., and Costantini, F. (2005). The role of GDNF/Ret signaling in ureteric bud cell fate and branching morphogenesis. *Dev Cell* *8*, 65-74.
- Shih, H.P., Kopp, J.L., Sandhu, M., Dubois, C.L., Seymour, P.A., Grapin-Botton, A., and Sander, M. (2012). A Notch-dependent molecular circuitry initiates pancreatic endocrine and ductal cell differentiation. *Development* *139*, 2488-2499.
- Shih, H.P., Wang, A., and Sander, M. Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* *29*, 81-105.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* *1*, 31-39.
- Smart, N.G., Apelqvist, A.A., Gu, X., Harmon, E.B., Topper, J.N., MacDonald, R.J., and Kim, S.K. (2006). Conditional expression of Smad7 in pancreatic beta cells disrupts TGF-beta signaling and induces reversible diabetes mellitus. *PLoS Biol* *4*, e39.

- Smith, S.B., Qu, H.Q., Taleb, N., Kishimoto, N.Y., Scheel, D.W., Lu, Y., Patch, A.M., Grabs, R., Wang, J., Lynn, F.C., *et al.* (2010). Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans. *Nature* *463*, 775-780.
- Sommer, L., Ma, Q., and Anderson, D.J. (1996). neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci* *8*, 221-241.
- Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G., and Gruss, P. (1997). The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* *386*, 399-402.
- Soyer, J., Flasse, L., Raffelsberger, W., Beucher, A., Orvain, C., Peers, B., Ravassard, P., Vermot, J., Voz, M.L., Mellitzer, G., *et al.* (2010). Rfx6 is an Ngn3-dependent winged helix transcription factor required for pancreatic islet cell development. *Development* *137*, 203-212.
- St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A., and Gruss, P. (1997). Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* *387*, 406-409.
- Stanger, B.Z., and Dor, Y. (2006). Dissecting the cellular origins of pancreatic cancer. *Cell Cycle* *5*, 43-46.
- Stephen L. Aronoff, K.B., Barb Shreiner and Laura Want (2004). *Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon*. *Diabetes Spectrum* *17*, 8.
- Stoffers, D.A., Kieffer, T.J., Hussain, M.A., Drucker, D.J., Bonner-Weir, S., Habener, J.F., and Egan, J.M. (2000). Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* *49*, 741-748.
- Stoffers, D.A., Zinkin, N.T., Stanojevic, V., Clarke, W.L., and Habener, J.F. (1997). Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* *15*, 106-110.
- Stoy, J., Steiner, D.F., Park, S.Y., Ye, H., Philipson, L.H., and Bell, G.I. (2010). Clinical and molecular genetics of neonatal diabetes due to mutations in the insulin gene. *Rev Endocr Metab Disord* *11*, 205-215.
- Sugiyama, T., Rodriguez, R.T., McLean, G.W., and Kim, S.K. (2007). Conserved markers of fetal pancreatic epithelium permit prospective isolation of islet progenitor cells by FACS. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 175-180.
- Sundararajan, S., Wakamiya, M., Behringer, R.R., and Rivera-Perez, J.A. (2012). A fast and sensitive alternative for beta-galactosidase detection in mouse embryos. *Development* *139*, 4484-4490.
- Sung, C.C., Liao, M.T., Lu, K.C., and Wu, C.C. (2012). Role of vitamin D in insulin resistance. *J Biomed Biotechnol* *2012*, 634195.
- Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, D.J., Meneses, J.J., Pedersen, R.A., Rubenstein, J.L., and German, M.S. (1998). Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* *125*, 2213-2221.
- Szabat, M., Luciani, D.S., Piret, J.M., and Johnson, J.D. (2009). Maturation of adult beta-cells revealed using a Pdx1/insulin dual-reporter lentivirus. *Endocrinology* *150*, 1627-1635.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861-872.
- Takahashi, M., Ritz, J., and Cooper, G.M. (1985). Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* *42*, 581-588.
- Talchai, C., Xuan, S., Kitamura, T., DePinho, R.A., and Accili, D. (2012). Generation of functional insulin-producing cells in the gut by Foxo1 ablation. *Nat Genet* *44*, 406-412, S401.
- Tanaka, M., Xiao, H., and Kiuchi, K. (2002). Heparin facilitates glial cell line-derived neurotrophic factor signal transduction. *Neuroreport* *13*, 1913-1916.
- Tansey, M.G., Baloh, R.H., Milbrandt, J., and Johnson, E.M., Jr. (2000). GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron* *25*, 611-623.
- Tarussio, D., Metref, S., Seyer, P., Mounien, L., Vallois, D., Magnan, C., Foretz, M., and Thorens, B. (2014). Nervous glucose sensing regulates postnatal beta cell proliferation and glucose homeostasis. *J Clin Invest* *124*, 413-424.

- Tatsumi, N., Miki, R., Katsu, K., and Yokouchi, Y. (2007). Neurturin-GFRalpha2 signaling controls liver bud migration along the ductus venosus in the chick embryo. *Dev Biol* 307, 14-28.
- Taylor, B.L., Liu, F.F., and Sander, M. (2013). Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. *Cell Rep* 4, 1262-1275.
- Temple, I.K., and Shield, J.P. 6q24 transient neonatal diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 11, 199-204.
- Thomas, M.K., Lee, J.H., Rastalsky, N., and Habener, J.F. (2001). Hedgehog signaling regulation of homeodomain protein islet duodenum homeobox-1 expression in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 142, 1033-1040.
- Thomas, M.K., Rastalsky, N., Lee, J.H., and Habener, J.F. (2000). Hedgehog signaling regulation of insulin production by pancreatic beta-cells. *Diabetes* 49, 2039-2047.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Thorel, F., Damond, N., Chera, S., Wiederkehr, A., Thorens, B., Meda, P., Wollheim, C.B., and Herrera, P.L. (2011). Normal glucagon signaling and beta-cell function after near-total alpha-cell ablation in adult mice. *Diabetes* 60, 2872-2882.
- Tomac, A.C., Agulnick, A.D., Haughey, N., Chang, C.F., Zhang, Y., Backman, C., Morales, M., Mattson, M.P., Wang, Y., Westphal, H., *et al.* (2002). Effects of cerebral ischemia in mice deficient in Persephin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9521-9526.
- Trichas, G., Begbie, J., and Srinivas, S. (2008). Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC Biol* 6, 40.
- Tulachan, S.S., Doi, R., Kawaguchi, Y., Tsuji, S., Nakajima, S., Masui, T., Koizumi, M., Toyoda, E., Mori, T., Ito, D., *et al.* (2003). All-trans retinoic acid induces differentiation of ducts and endocrine cells by mesenchymal/epithelial interactions in embryonic pancreas. *Diabetes* 52, 76-84.
- Viglietto, G., Dolci, S., Bruni, P., Baldassarre, G., Chiariotti, L., Melillo, R.M., Salvatore, G., Chiappetta, G., Sferratore, F., Fusco, A., *et al.* (2000). Glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin can act as paracrine growth factors stimulating DNA synthesis of Ret-expressing spermatogonia. *Int J Oncol* 16, 689-694.
- Wang, J., Elghazi, L., Parker, S.E., Kizilocak, H., Asano, M., Sussel, L., and Sosa-Pineda, B. (2004). The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta-cell differentiation. *Dev Biol* 266, 178-189.
- Wang, K., Demir, I.E., D'Haese, J.G., Tieftrunk, E., Kujundzic, K., Schorn, S., Xing, B., Kehl, T., Friess, H., and Ceyhan, G.O. (2013). The neurotrophic factor neurturin contributes toward an aggressive cancer cell phenotype, neuropathic pain and neuronal plasticity in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 35, 103-113.
- Wang, S., Yan, J., Anderson, D.A., Xu, Y., Kanal, M.C., Cao, Z., Wright, C.V., and Gu, G. (2010). Neurog3 gene dosage regulates allocation of endocrine and exocrine cell fates in the developing mouse pancreas. *Dev Biol* 339, 26-37.
- Weinstein, D.C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W.S., Hoodless, P., Prezioso, V.R., Jessell, T.M., and Darnell, J.E., Jr. (1994). The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 78, 575-588.
- Wierup, N., Sundler, F., and Heller, R.S. (2013). The islet ghrelin cell. *J Mol Endocrinol* 52, R35-49.
- Worby, C.A., Vega, Q.C., Chao, H.H., Seasholtz, A.F., Thompson, R.C., and Dixon, J.E. (1998). Identification and characterization of GFRalpha-3, a novel Co-receptor belonging to the glial cell line-derived neurotrophic receptor family. *J Biol Chem* 273, 3502-3508.
- Wu, Z.S., Pandey, V., Wu, W.Y., Ye, S., Zhu, T., and Lobie, P.E. (2013). Prognostic significance of the expression of GFRalpha1, GFRalpha3 and syndecan-3, proteins binding ARTEMISIN, in mammary carcinoma. *BMC Cancer* 13, 34.
- Xie, R., Everett, L.J., Lim, H.W., Patel, N.A., Schug, J., Kroon, E., Kelly, O.G., Wang, A., D'Amour, K.A., Robins, A.J., *et al.* (2013). Dynamic chromatin remodeling mediated by polycomb proteins orchestrates pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 12, 224-237.

- Xu, G., Stoffers, D.A., Habener, J.F., and Bonner-Weir, S. (1999). Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48, 2270-2276.
- Xu, X., D'Hoker, J., Stange, G., Bonne, S., De Leu, N., Xiao, X., Van de Casteele, M., Mellitzer, G., Ling, Z., Pipeleers, D., *et al.* (2008). Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132, 197-207.
- Yoo, H.W., Shin, Y.L., Seo, E.J., and Kim, G.H. (2002). Identification of a novel mutation in the GLUT2 gene in a patient with Fanconi-Bickel syndrome presenting with neonatal diabetes mellitus and galactosaemia. *Eur J Pediatr* 161, 351-353.
- Yoshitomi, H., and Zaret, K.S. (2004). Endothelial cell interactions initiate dorsal pancreas development by selectively inducing the transcription factor Ptf1a. *Development* 131, 807-817.
- Young, H.M., Hearn, C.J., Farlie, P.G., Canty, A.J., Thomas, P.Q., and Newgreen, D.F. (2001). GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. *Dev Biol* 229, 503-516.
- Youos, J.G. (2011). The role of alpha-, delta- and F cells in insulin secretion and action. *Diabetes Res Clin Pract* 93 Suppl 1, S25-26.
- Zaret, K.S., and Grompe, M. (2008). Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 322, 1490-1494.
- Zhang, C., Moriguchi, T., Kajihara, M., Esaki, R., Harada, A., Shimohata, H., Oishi, H., Hamada, M., Morito, N., Hasegawa, K., *et al.* (2005). MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* 25, 4969-4976.
- Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., and Melton, D.A. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455, 627-632.
- Zhou, Q., Law, A.C., Rajagopal, J., Anderson, W.J., Gray, P.A., and Melton, D.A. (2007). A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell* 13, 103-114.

Etude de la voie de signalisation Artn/Gfra α 3 dans le pancréas

L'identification de signaux impliqués dans la formation des cellules endocrines pancréatiques permettra d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes régissant la différenciation des cellules endocrines et de nouvelles applications dans le domaine de la génération de cellules sécrétrices d'insuline afin de traiter des patients atteints de diabète. C'est dans ce contexte que nous avons étudié l'expression et la fonction du récepteur membranaire *Glial cell line derived neurotrophic factor Family Receptor α 3 (Gfra3)* et de son ligand Artn au cours du développement du pancréas et dans le pancréas adulte chez la souris. Des techniques de PCR quantitatives, d'hybridations *in situ* et d'immunofluorescences nous ont permis de caractériser l'expression de Gfra3, d'Artn mais aussi d'autres ligands et récepteurs de cette famille. Nous avons aussi utilisé un modèle de souris perte de fonction et générer un modèle de souris transgénique surexprimant Artn dans le pancréas afin d'étudier la fonction de la voie de signalisation Artn/ Gfra3 dans le pancréas. Nous avons ainsi découvert que le récepteur Gfra3 est exprimé au cours du développement du pancréas par les progéniteurs endocrines, les cellules insulines-positives et glucagon-positives ainsi que les cellules embryonnaires neuronales. Au stade adulte, Gfra3 n'est pas exprimé par les cellules à insuline et est exprimé par quelques cellules à glucagon. A ce stade, son expression est aussi observée au niveau des cellules gliales, ainsi que des neurones du système nerveux sympathique et parasympathique. Les différentes expériences de perte et de gain de fonction réalisées afin de comprendre le rôle pancréatique de Gfra3, ont révélé que ce récepteur n'est pas essentiel à la différenciation et au maintien des cellules endocrines, ni à la formation et au maintien de l'innervation endocrine. En conclusion, nous avons découvert et caractérisé un nouveau marqueur de surface exprimé dans les cellules endocrines pancréatiques en développement. Cette caractéristique pourrait s'avérer utile pour purifier par cytométrie en flux et étudier des sous populations cellulaires générées au cours des protocoles de différenciation *in vitro* visant à générer de nouvelles cellules sécrétrices d'insuline pour une thérapie cellulaire du diabète.

Mots clé : Gfra3, voie de signalisation, progéniteurs, différenciation, innervation

The generation of therapeutic β -cell from human embryonic stem cells relies on the identification of growth factors that faithfully mimic pancreatic β -cell development *in vitro*. In this context, the aim of the study was to determine the expression and function of a novel endocrine progenitor surface marker, the *Glial cell line derived neurotrophic factor receptor α 3 (Gfra3)* and its ligand Artn in islet cell development and function. RT-PCR, In situ hybridization and immunochemistry were used to characterize the expression of Gfra3 and Artn mRNAs and proteins as well as of other members of the GDNF receptor and ligand family. We used Gfra3-deficient mice to study Gfra3 function and generated a transgenic mice overexpressing Artn in the embryonic pancreas to study Artn function. We found that Gfra3 is expressed at the surface of a subset of Ngn3-positive endocrine progenitors as well as of embryonic α - and β -cells, while Artn is found in the pancreatic mesenchyme. Adult β -cell lack Gfra3, but rare α cell express the receptor. Gfra3 is also found in parasympathetic and sympathetic intra islets neurons as well as in glial cell in the embryonic and adult pancreas. The loss of Gfra3 or overexpression of Artn has no impact on Ngn3-and islet cell formation and maintenance in the embryo. Islet organisation and innervation as well as glucose homeostasis is normal in Gfra3-deficient mice. Our data show that Gfra3 is dispensable for islet cell differentiation and innervation suggesting functional redundancy. Gfra3 could be instrumental as a surface marker for antibody-mediated sorting and characterization of relevant cell population during islet cell differentiation.

Keywords: Gfra3, signalling pathway, progenitors, differentiation, innervation