



HAL
open science

Étude des fonctions biologiques et oncosuppressives du gène MEN1 dans le cancer de la prostate et du sein, et son implication dans la régulation de l'expression des récepteurs nucléaires

Romain Teinturier

► To cite this version:

Romain Teinturier. Étude des fonctions biologiques et oncosuppressives du gène MEN1 dans le cancer de la prostate et du sein, et son implication dans la régulation de l'expression des récepteurs nucléaires. Cancer. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1082 . tel-01578564

HAL Id: tel-01578564

<https://theses.hal.science/tel-01578564>

Submitted on 29 Aug 2017

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

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

N°d'ordre NNT : 2017LYSE1082



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie moléculaire, Intégrative et Cellulaire
Spécialité de doctorat :
Discipline : Cancérologie

Soutenue publiquement le 30/05/2017, par :
Romain Teinturier

Etude des fonctions biologiques et oncosuppressives du gène *MEN1* dans les cancers de la prostate et du sein, et son implication dans la régulation de l'expression des récepteurs nucléaires

Devant le jury composé de :

Germain Gillet, PU-PH, Université de Lyon	Président
Françoise Lenfant, DR2, INSERM, Toulouse	Rapporteur
Sylvère Baron, MCU, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrant	Rapporteur
Virginie Vlaeminck Guillem, MCU-PH, Université de Lyon	Examinatrice
Raphael Métivier, CR1, CNRS, Rennes	Examineur
Chang Xian Zhang, DR2, INSERM, Lyon	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier les membres du jury, Françoise Lenfant, Virginie Vlaeminck-Guillem, Silvère Baron, Raphaël Métivier et Germain Gillet, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, le Dr Vincent Cavailles et le Dr Muriel Le Romancer pour les conseils qu'ils ont pu m'apporter concernant mon projet de thèse, pendant ces 4 années.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, le Dr Chang Zhang, avec qui j'ai passé 4 années très enrichissantes tant du point de vue scientifique, que du point de vue humain. Je tiens à insister sur tes qualités humaines qui font de toi un chef disponible, à l'écoute et compréhensif. Tout au long de ces années, tu as dû supporter par moment mon caractère peu enthousiaste (c'est ma nature), malgré cela tu as su m'encourager et surtout me faire confiance pour aller de l'avant. Merci de m'avoir fait en confiance en Master 2 pour passer le concours MRT, et de m'avoir montré que la voie du doctorat m'était accessible. Je te souhaite le meilleur pour les toutes dernières années de ta carrière déjà bien remplie. Merci pour tous !!!!!

Bien évidemment, je remercie aussi Muriel et Laura pour l'accueil chaleureux que vous avez pu nous accorder au sein de votre équipe, suite aux évaluations quinquennals du CRCL. Muriel, je te souhaite tout le meilleur pour la suite de ta carrière. Laura, il n'y a je pense qu'une chose à te dire : « Ti auguro un felice pensionamento ». Je remercie également tous les membres de l'équipe, pour la bonne ambiance de travail et stimulante qu'ils font régner dans le laboratoire. Avec un clin d'œil tout particulier à Samuele et Lucie, qui sont devenus pour moi plus que des collègues de travail.

Résumé en Français

Les mutations du gène suppresseur de tumeur *MEN1* sont connues depuis de nombreuses années, pour être à l'origine du syndrome des Néoplasies endocriniennes multiples de type 1 (Syndrome des NEM1). Ce syndrome constitue une maladie héréditaire associée à une perte d'hétérozygotie du gène *MEN1*, affectant principalement les organes endocrines. Plus récemment, l'implication du gène *MEN1* a émergé dans la tumorigénèse d'autres organes, et plus particulièrement dans les glandes mammaires et prostatiques, où son rôle reste encore très controversé.

Pour mieux déterminer le rôle joué par menin dans les cellules prostatiques (oncogène ou gène suppresseur), mon projet de thèse avait donc pour but de caractériser un nouveau modèle murin d'inactivation du gène *Men1* spécifiquement dans les cellules luminales de la glande prostatique déficientes pour *Nkx3.1*, le modèle *Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2+/-}*. Les examens anatomopathologiques réalisés sur ce nouveau modèle murin ont montré que la perte d'expression du gène *Men1* conduisait à une accélération de la tumorigénèse dans la glande prostatique, par rapport aux souris contrôles. D'autre part, les analyses moléculaires ont montré que l'expression du récepteur aux androgènes (RA) était diminuée dans les cellules déficientes pour le gène *Men1*. Enfin, mes analyses ont également montré que la protéine menin, codée par le gène *MEN1*, joue le rôle de régulateur transcriptionnel du RA.

De la même manière, mes travaux ont mis en évidence que la protéine menin régule l'expression du récepteur aux estrogènes alpha (RE α), en occupant la région promotrice proximale du gène codant pour ce dernier, dans des lignées cellulaires du cancer du sein. De plus, nos analyses ont révélé que l'expression réduite de menin corrélée avec la survenue du sous type luminal B du cancer du sein, connue pour exprimer faiblement le RE α .

Ainsi mes travaux de thèse ont permis de conforter notre hypothèse sur le rôle oncosuppresseur du gène *MEN1* dans la glande prostatique. D'autre part, nous avons mis en évidence l'implication de la protéine menin dans la régulation de l'expression des récepteurs nucléaires RA et RE, et son rôle dans le cancer du sein et de la prostate.

Résumé en Anglais

Mutations of the *MEN1* gene have been known for many years to be responsible for the Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1 syndrome), a hereditary disease affecting mainly endocrine organs. Recent advances highlighted the involvement of the *MEN1* gene in the development of the breast cancer and prostate cancers. Nevertheless, the role played by the *MEN1* gene in prostate cancer still remains controversial, described as an oncogene by some studies, or as a tumor suppressor by others.

To further address this issue, we generated a novel and inducible mouse model, *Men1^{F/F}-Nkx3.1Cre^{-/+}*, in which the *Men1* gene can be specifically disrupted in *Nkx3.1*-deficient luminal prostatic cells upon tamoxifen injection. Anatomopathologic examinations performed on our model showed that *Men1*-disruption accelerated the tumorigenesis in the prostatic gland compared to the control mice. Moreover, molecular analyses showed that the expression of androgen receptor (AR) was decreased in *Men1*-deficient cells. The analyses carried out in prostate cancer cell lines showed that menin protein, encoded by the *Men1* gene, is involved in the transcriptional regulation of AR.

In parallel, my work showed that menin is also involved in the transcriptional regulation of the estrogen receptor alpha (ER α) expression, through its binding on the proximal promoter of the ER α gene. Moreover, our study revealed that the decrease in menin expression correlates with the occurrence of luminal B subtype of breast cancer, where ER α expression is known to be reduced.

My thesis work, therefore, allowed to determine precisely, for the first time, the oncosuppressive role of the *Men1* gene in the prostatic gland. This work also highlighted the involvement of menin in the regulation of AR and ER expression, and its role in prostate and breast cancers.

Liste des abréviations

ARE : Androgen Response Elements
Bcl2 : B-cell lymphoma 2
BPH : benign prostatic hypertrophy
CD44 : cluster of differentiation 44
CD117 : cluster of differentiation 117
CD133 : cluster of differentiation 133 (Prominin 1)
CDK : cyclin dependent kinase
ChrA : Chromogranin A
CKs : cytokératines
CK5 : cytokératine 5
CK7 : cytokératine 7
CK8 : cytokératine 8
CK14 : cytokératine 14
CK17 : cytokératine 17
CK18 : cytokératine 18
CK19 : cytokératine 19
COMPASS : complex proteins associated with Set1
CRPC : castration resistant prostate cancer
CSCs : cancer stem cells
DBD : DNA-binding domain
DCIS : ductal carcinoma *in situ*
DHT : dihydrotestostérone
DNMT : DNA methyltransferase
EGF : Epidermal growth factor
ER : estrogen receptor
ERE : estrogen response element
ERG : ETS-related gene

ETS : E twenty six

EZH2 : enhancer of zest homolog 2

FKBP5 : FK506 binding protein 5

GEM : genetically engineered mouse models

GEM PCa : genetically engineered mouse models of prostate cancer

GR : glucocorticoid receptor

HAT : histone acetyltransferase

HER2 : Human epidermal growth factor receptor 2

HDACs : Histone deacetylase

HGPIN : High grade prostatic intraepithelial neoplasia

HMT : histone méthyl transférase

HPC : hereditary prostate cancer

IDC : invasive ductal carcinoma

ILC : invasive lobular carcinoma

IGF : insulin growth factor

KMTs : lysine methyltransferase

LBD : ligand-binding domain

LCIS : lobular carcinoma *in situ*

LH : Luteinizing hormone

LHRH : Luteinizing hormone releasing hormone

LGPIN : low grade intraepithelial neoplasia

LOH : loss of heterozygosity

MEF : murine embryonic fibroblasts

MLL : mixed-lineage leukemia

MLL-FPs : mixed lineage leukemia fusion proteins

MTA1 : metastasis associated protein 1

NEM1 : néoplasies endocriniennes multiples de type 1

NKX3.1 : Homeobox protein Nkx3.1

NTD : N-terminal domain

PDX : patients derived xenograft
PIN : prostatic intraepithelial neoplasia
p63 : tumor protein p63
PB : probasin
PCSCs : prostate cancer stem cells
PR : progesteron receptor
pRb : retinoblastoma protein
PRC2 : polycomb repressive complex 2
PSA : prostate-specific antigen
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PI3KCA : Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit A
PI3KCB : Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit B
PTEN : phosphatase and tensin homolog
RA : récepteur aux androgènes
RE : récepteur aux estrogènes
RE α : récepteur aux estrogènes alpha
rPB : rat probasin
SBR : Scarff-Bloom-Richardson
SERD : selective estrogen receptor downregulator
SERM : selective estrogen receptor modulator
SV40 : simian virus 40
TAC : transient-amplifying cells
Tag : large T antigen
Tag : small t antigen
TGF β : Transforming growth factor β
TBP : TATA-binding protein
TFIIF : Transcription factor IIF
TMPRSS2 : Transmembrane protease serine 2
TNM : tumor node metastase

TRAMP : transgenic adenocarcinoma mouse prostate

TSA : trichostatin A

Table des matières

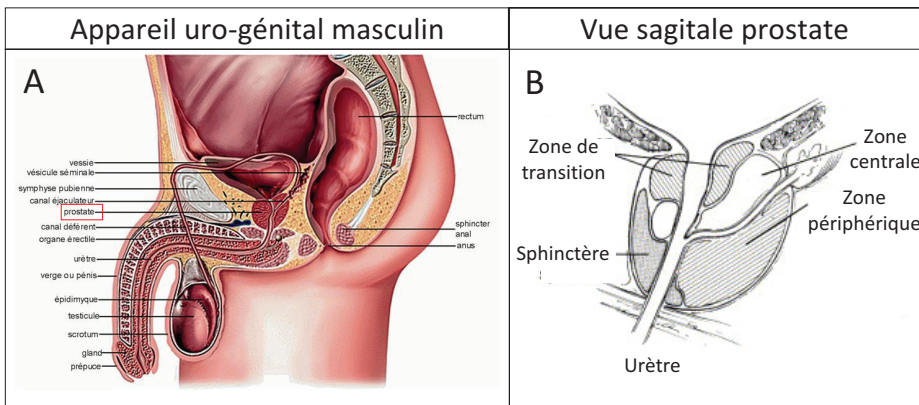
INTRODUCTION.....	5
I) La prostate.....	5
I.A) Anatomie et fonction de la glande prostatique.....	5
I.B) Histologie de la glande prostatique.....	6
I.B.1) Cellules luminales et basales.....	6
I.B.2) Cellules épithéliales intermédiaires.....	7
I.B.3) Cellules souches épithéliales prostatiques.....	8
I.B.4) Le stroma fibro-musculaire et son rôle dans la différenciation cellulaire.....	10
I.C) Récepteurs aux androgènes et signalisation androgénique dans la glande prostatique	10
I.C.1) Rôle physiologique de la signalisation androgénique.....	10
I.C.2) Récepteur aux androgènes : du gène à la protéine.....	11
I.C.3) Mode d'action génomique du récepteur aux androgènes.....	12
I.D) Le cancer de la prostate.....	12
I.D.1) Généralités.....	12
I.D.2) Diagnostic du cancer de la prostate.....	13
I.D.3) Facteurs de risque du cancer de la prostate.....	14
I.D.3.a) Âge.....	14
I.D.3.b) Les antécédents familiaux.....	15
I.D.3.c) Alimentation.....	16
I.D.4) Notions d'histologie des lésions de la glande prostatique : Souris VS Homme.....	16
I.D.4.a) Hyperplasie Bénigne de l'épithélium prostatique.....	17
I.D.4.b) Néoplasie intraépithéliale prostatique.....	18
I.D.4.c) Carcinome microinvasif.....	19
I.D.4.d) Carcinome invasif.....	19
I.D.4.e) Cancer métastatique de la prostate.....	20
I.D.5) Altérations génétiques et moléculaires dans le cancer de la prostate.....	20
I.D.5.a) TMPRSS2 : fusion de gènes.....	21
I.D.5.b) Mutations de PTEN, PI3K : conséquence de la sur-activation de la voie PI3K/AKT.....	22
I.D.5.c) Diminution d'expression de NKX3.1.....	23
I.D.5.d) Altérations génétiques du RA et signalisation androgénique.....	24
I.D.5.e) Autres gènes fréquemment mutés.....	26
I.D.6) Altérations épigénétiques dans les cancers de la prostate : un nouveau constat.....	27
I.D.6.a) EZH2 : un oncogène dans le cancer de la prostate.....	27
I.D.6.b) Le complexe COMPASS : un rôle émergent dans le cancer de la prostate.....	28
I.D.7) Les modèles murins d'étude du cancer de la prostate.....	29
I.D.7.a) La première génération : les modèles murins du cancer de la prostate surexprimant l'antigène T du SV40.....	30
I.D.7.a.1) Le modèle TRAMP.....	30
I.D.7.a.2) Le modèle LADY.....	31
I.D.7.b) La seconde génération : modèles murins basés sur les altérations génétiques humaines.....	32
I.D.7.b.1) Les modèles d'inactivation du gène suppresseur de tumeur <i>Nkx3.1</i>	32
I.D.7.b.2) Les modèles d'inactivation du gène suppresseur de tumeur <i>Pten</i>	33
I.D.7.b.3) Les modèles d'inactivation combinée des gènes suppresseurs de tumeurs <i>Nkx3.1</i> et <i>Pten</i>	34
I.D.7.b.4) Les modèles murins transgéniques de surexpression de l'oncogène <i>Myc</i>	35

I.D.7.b.5) Les modèles murins d'invalidation et de suexpression du récepteur aux androgènes (RA)	36
I.D.h) Traitement du cancer de la prostate	37
I.D.h.1) Hormonothérapie : ciblage thérapeutique du récepteur aux androgènes	37
I.D.h.2) Mécanismes de résistance à l'hormonothérapie	39
I.D.i) Origine cellulaire du cancer de la prostate	41
I.D.i.1) La double origine luminale et basale du cancer de la prostate	41
I.D.i.2) Le modèle des cellules souches cancéreuses de la prostate	42
I.D.i.3) Rôle central du récepteur aux androgènes dans les cellules souche cancéreuses de la prostate	43
II) Cancer du sein et récepteurs aux estrogènes	44
II.A) Cancer du sein	44
II.A.1) Généralités	44
II.A.2) Facteurs de risque	45
II.A.2.a) Âge	45
II.A.2.b) Facteurs hormonaux endogènes	45
II.A.2.c) Facteurs génétiques	45
II.A.2.d) Obésité	46
II.A.3) Notions anatomiques et histologiques de la glande mammaire	46
II.A.3.a) Les sous-types histologiques du cancer du sein et leur classification	47
II.A.3.a.1) Classification anatomopathologique classique	47
II.A.3.a.2) Classification TNM	47
II.A.3.a.3) Classification SBR	48
II.A.3.b) Classification moléculaire du cancer du sein	48
II.A.3.b.1) Les tumeurs luminales A/B	49
II.A.3.b.2) Les tumeurs HER2 positives et basal-like	49
II.B) Récepteur aux estrogènes alpha (REα) : structure, fonctions et rôle dans le cancer du sein	50
II.B.1) Généralités	50
II.B.2) Récepteur aux estrogènes : du gène à la protéine	50
II.B.2.a) Structure du gène ESR1	50
II.B.2.b) Structure protéique et localisation subcellulaire du récepteur aux estrogènes α	51
II.B.2.c) Les isoformes du récepteur aux estrogènes α	52
II.B.3) Mécanismes d'action du RE	52
II.B.3.a) Voie génomique classique dépendante du ligand	52
II.B.3.b) Voie génomique indépendante des séquences ERE	53
II.B.3.c) Voie génomique indépendante du ligand	53
II.B.3.d) Voie non génomique	53
II.B.4) Hormonothérapie : ciblage du RE dans le traitement du cancer du sein	54
II.C) Régulation de l'expression du récepteur aux estrogènes α	56
II.C.1) Organisation génomique du promoteur du gènes ESR1	56
II.C.2) Régulation épigénétique de l'expression du RE α	57
II.C.3) Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression du RE α	58
III) Gène MEN1 et Syndrome des Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1	60
III.A) Généralités	60
III.B) Atteintes cliniques : les tumeurs endocrines	61
III.B.1) Tumeurs des glandes parathyroïdes	61
III.B.2) Tumeurs hypophysaires	61
III.B.3) Tumeurs gastro-entéro-pancréatiques	61

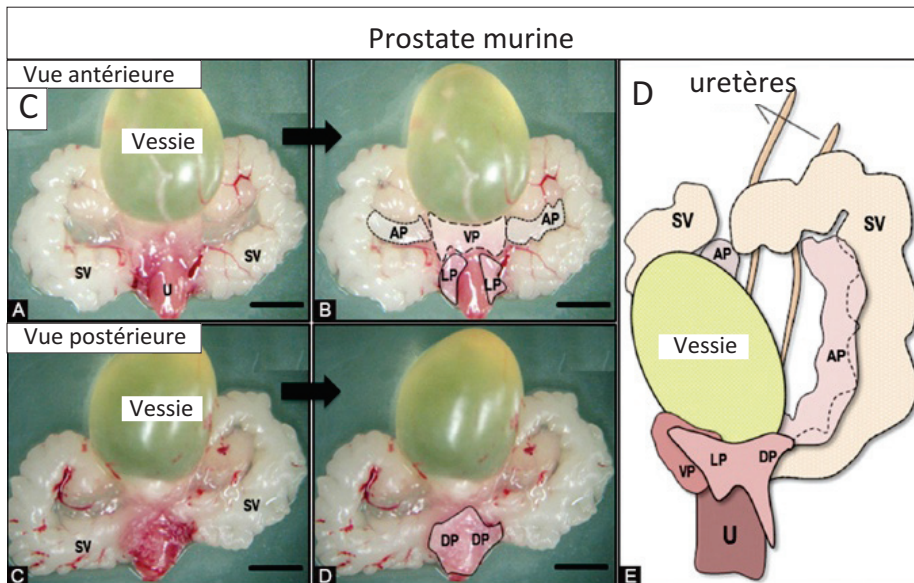
III.C) Le gène <i>MEN1</i>	62
III.C.1) Evolution et conservation entre les espèces	62
III.C.2) Les transcrits du gène <i>MEN1</i>	63
III.C.3) Les mutations du gène <i>MEN1</i>	63
III.D) Implication du gène <i>MEN1</i> dans les tissus hormono-dépendants	64
III.D.1) Syndrome NEM1 et prédisposition au cancer du sein.....	64
III.D.2) Emergence du rôle du gène <i>MEN1</i> dans le cancer de la prostate.....	64
III.E) La protéine Menin	65
III.E.1) Généralités.....	65
III.E.2) Structure de la protéine.....	66
III.E.3) Menin au cœur de la régulation transcriptionnelle	67
III.E.3.a) Menin : un acteur majeur du complexe MLL/COMPASS-like	67
III.E.3.b) Interaction entre menin et les récepteurs nucléaires : son rôle dans la signalisation hormonale	69
III.E.3.c) Autres partenaires de menin impliqué dans la régulation transcriptionnelle	71
III.E.4) Menin à l'interface des grandes voies de signalisation.....	73
III.E.4.a) Interaction entre menin les voies canoniques et non canoniques du TGFβ	74
III.E.4.b) Interaction entre menin et la voie de signalisation Wnt/β-catenin	74
III.E.4.c) Interaction entre menin et la voie de signalisation PI3K/AKT/FOXO	75
RESULTATS	77
Article 1 : <i>Men1</i>-disruption in <i>Nkx3.1</i>-deficient prostatic cells accelerates tumour development and results in early AR^{low} and late AR^{low}/CD44⁺ lesions	77
Article 2 : <i>Reduced menin expression leads to diminished ERα and Gata3 expression in mammary cells and correlates with the occurrence of human luminal B subtype breast cancer</i> .	80
DISCUSSION	82
Partie I : Implication du gène <i>MEN1</i> dans la tumorigénèse de la glande prostatique	82
Comment considérer le rôle oncosuppressif du gène <i>Men1</i> dans la tumorigénèse de la glande prostatique ?	83
- Un suppresseur de tumeur ? Oui, mais aux effets néanmoins modérés !	83
- Comment expliquer cette initiation tumorale précoce dans les souris <i>Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}</i> ?	85
Comment interpréter la diminution d'expression du RA dans les lésions PIN développées au sein de notre modèle <i>Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}</i> ?	87
- Une balance entre prolifération et différenciation ?	87
- La perte d'expression du gène <i>MEN1</i> pourrait-elle jouer un rôle dans l'acquisition de la résistance à l'hormonothérapie ?	88
- Un rôle peu probable de la perte de menin dans l'acquisition d'un phénotype neuroendocrine	89
- Comment intégrer les données contradictoires de la littérature sur le rôle de l'interaction physique et fonctionnelle entre menin et le RA ?	90
Comment interpréter l'augmentation d'expression du marqueur de surface CD44, et quel rôle joue-t-il dans le processus de tumorigénèse de notre modèle ?	91
- Une conséquence fonctionnelle de la perte du RA ?.....	91
- Est-ce que l'augmentation d'expression de CD44 pourrait conduire à l'acquisition d'un phénotype stem-like dans les cellules déficientes pour le gène <i>Men1</i> ?	92
- Quel rôle pour CD44 dans la tumorigénèse ?	93
<i>MEN1</i> est-il aussi un gène de prédisposition au cancer de la prostate chez l'homme ?	94
- Association du syndrome NEM1 avec le cancer de la prostate ?.....	94

- Comment considérer le rôle oncosuppressif du gène MEN1 dans les cancers de la prostate sporadiques chez l'homme, lié à la fréquence faible des mutations?	94
Partie II : Implication du gène <i>MEN1</i> dans la tumorigénèse de la glande mammaire, et son rôle dans la régulation de l'expression du récepteur aux estrogènes α	96
Par quels mécanismes menin pourrait réguler positivement l'expression du REα?	96
Est-ce encore utile de débattre sur le rôle oncogénique ou oncosuppressif du gène <i>MEN1</i> dans le cancer du sein ? Ne serait-ce pas dépendant du contexte cellulaire ?	98
Comment corrélérer cette diminution d'expression de menin avec le statut mutationnel de ce dernier dans les cancers du sein ?	100
CONCLUSION	102
ANNEXES.....	104
<i>Article 1 : Foxa2, a novel protein partner of the tumour suppressor menin, is deregulated in mouse and human MEN1 glucagonomas.</i>	104
<i>Article 2 : Islet Cells Serve as Cells of Origin of Pancreatic Gastrin-Positive Endocrine Tumors</i>	104
<i>Article 3 : ActivinB Is Induced in Insulinoma To Promote Tumor Plasticity through a β-Cell-Induced Dedifferentiation.....</i>	105
<i>Article 4 : Menin regulates Inhb expression through an Akt/Ezh2-mediated H3K27 histone modification</i>	105
<i>Article 5 : big-h3 Represses T-Cell Activation in Type 1 Diabetes</i>	106
REFERENCES	107

Figure 1 : Anatomie de la prostate humaine et murine



Coupe sagittale médiane du petit bassin et du périnée chez l'homme montrant l'anatomie de l'appareil urogénitale masculin (Larousse) (A). Anatomie zonale schématique de la prostate selon McNeal en coupe sagittale de la prostate humaine montrant les 3 zones principales : Zone de transition, zone centrale et zone périphérique (B). *Modifié à partir de Abate shen et al.*



Vue macroscopique antérieure et postérieure (C) et Vue schématique antéro-latérale (D) de l'appareil urogénitale murin, montrant la vessie ainsi que les différents lobes prostatiques caractéristiques de la souris. (U) urètre, (SV) Vésicules Sémianles, (AP) Lobes Antérieurs, (LP) Lobes Latérales, (DP) Lobes Dorsaux, (VP) Lobes Ventraux. *Modifié d'après Oliveira et al.*

INTRODUCTION

D) La prostate

I.A) Anatomie et fonction de la glande prostatique

La prostate est un organe glandulaire appartenant au système reproducteur et urinaire masculin, dont la fonction principale est de produire une partie des sécrétions composant le liquide séminal. Sa localisation au croisement de l'urètre et des canaux éjaculateurs semble être à l'origine de cette double fonction urinaire et génitale. La prostate est intimement liée aux vésicules séminales, et participe donc à la sécrétion ainsi qu'à l'émission du liquide spermatique. Il s'agit de la glande la plus volumineuse du système uro-génitale masculin, dont la taille varie d'un homme à l'autre.

Depuis 1968 et les travaux de Mac Neal et al, la description anatomique de la prostate ne fait plus débat, suite à l'acceptation de leur modèle comme modèle anatomique de référence (McNeal 1968) (Selman 2011). Chez l'Homme, la prostate est située sous la vessie et en avant du rectum, formant une structure glandulaire qui va entourer la base de l'urètre. Elle est traversée par les canaux éjaculateurs provenant des vésicules séminales, qui aboutissent directement dans l'urètre prostatique à la base de la prostate (Figure 1A). La prostate est composée, d'une part de tissu glandulaire tubulo-alvéolaire constituant la partie sécrétrice de cet organe, et d'autre part de fibres musculaires lisses constituant la partie motrice et contractile. Cette composante musculaire assure les fonctions essentielles de miction et de continence de l'appareil urinaire. L'ensemble de ces tissus est défini en 4 zones principales, qui sont : la zone de transition, la zone périphérique, la zone centrale et enfin la zone du stroma fibromusculaire antérieure (Figure 1B). La zone de transition, située au milieu de la prostate, entoure l'urètre prostatique proximal. La zone centrale située en arrière de la zone de transition, constitue la base de la prostate et entoure les canaux éjaculateurs. La zone périphérique représentant 80% de la masse glandulaire prostatique, constitue la partie la plus postérieure de la prostate, directement au contact du rectum. C'est dans cette zone postérieure que la plupart des tumeurs malignes de la prostate se développent. La dernière zone du stroma fibromusculaire se situe en avant de l'urètre prostatique et ne présente aucune composante glandulaire à la différence des trois zones précédemment décrites (Seisen et al., 2012).

Même s'il existe de fortes analogies dans la morphogénèse et les caractéristiques développementales de la prostate entre les différentes espèces, la structure anatomique de la prostate peut être très différente chez les mammifères, à l'âge adulte. (Timms et al., 1994). Chez la souris et le rat, la prostate est caractérisée par la présence de 4 lobes anatomiquement séparés. Défini sur la base de leur orientation spatiale, on retrouve parmi eux les lobes antérieurs, dorsaux, latéraux et ventraux (Shappell et al. 2004). Ces lobes se forment par paire (droite et gauche) et présentent pour chacun d'entre eux des caractéristiques anatomiques et histologiques différentes (Figure 1C/1D). Même si l'anatomie de la prostate humaine et murine diverge, elles présentent néanmoins des similarités au niveau histologique. C'est une des raisons pour lesquelles les modèles murins du cancer de la prostate constituent des outils majeurs dans l'étude des lésions cancéreuses de la prostate.

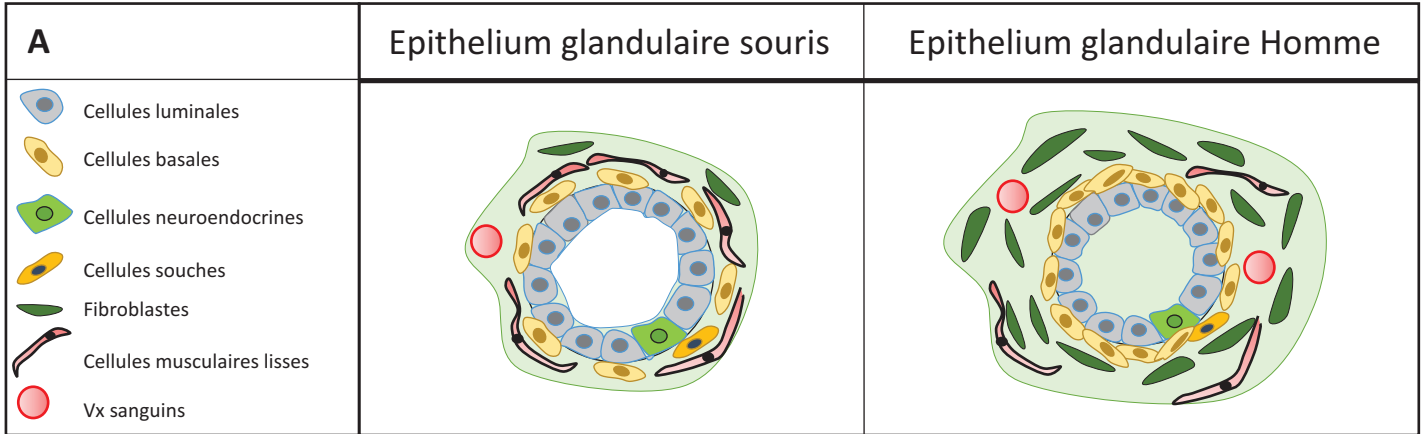
I.B) Histologie de la glande prostatique

Chez l'homme, comme chez la souris, la prostate est composée de lobules glandulaires, aussi appelés acini, qui sont bordés par un épithélium bi-stratifié. Cet épithélium prostatique va assurer la production et la sécrétion du liquide prostatique dans la lumière des glandes, qui va ensuite être drainé dans l'urètre via un réseau de canalicules prostatiques. Ces lobules glandulaires sont entourés d'un tissu conjonctif, connu sous le terme de stroma fibromusculaire. Celui-ci est majoritairement composé de fibroblastes, de nerf, de vaisseaux sanguins, de cellules infiltrantes (lymphocytes et macrophages), et d'une couche de cellules musculaires lisses.

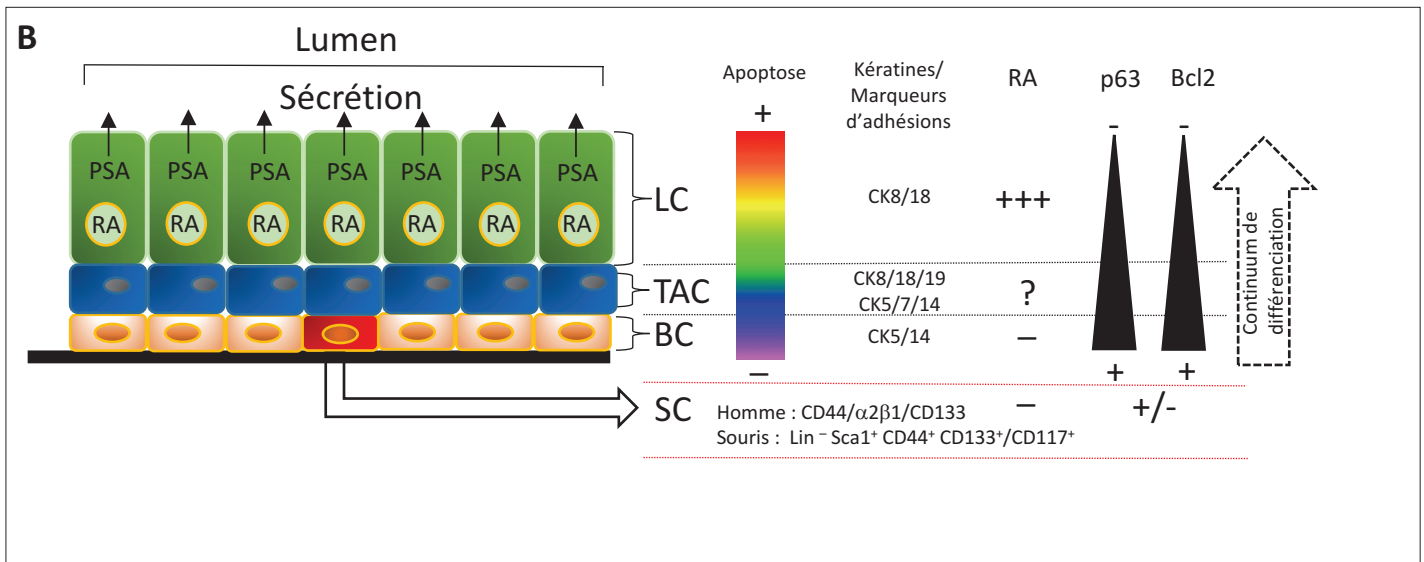
I.B.1) Cellules luminales et basales

L'épithélium glandulaire est composé de deux couches de cellules, que sont les cellules luminales et les cellules basales. Les cellules luminales sécrétoires recouvrent la surface interne de l'épithélium glandulaire formant une monocouche de cellules épithéliales en colonnes, au contact de la lumière des glandes. Ces cellules luminales sont soutenues par une couche de cellules basales sous-jacente. Cette dernière est elle-même soutenue par une membrane basale qui sépare l'épithélium glandulaire du compartiment stromal. Chez la souris, cette couche de cellules basales est discontinue, tandis que chez l'homme elle va former un continuum entourant la couche de cellules luminales. On retrouve également au

Figure 2 : Histologie et différenciation de l'épithélium glandulaire de la prostate chez l'homme et la souris



Histologie de la glande prostatique : Vue schématique représentant l'architecture d'un acinus de la glande prostatique, ainsi que les différents types de cellules composant l'épithélium glandulaire de la prostate, chez la souris et chez l'homme. La couche de cellules basales discontinue chez la souris, et continue chez l'homme, borde la couche de cellules lumineuses en contact avec la lumière de la glande. Le stroma plus important chez l'homme, entoure l'acinus constituant un tissu de soutien riche en fibroblastes, cellules musculaires lisses et vaisseaux sanguins.



Structure histologique détaillée et processus de différenciation de l'épithélium glandulaire de la prostate : représentation schématique des différents sous-types cellulaires de l'épithélium prostatique humain, basée sur l'hypothèse de la différenciation cellulaire linéaire. Parmi ces différents sous-types cellulaires, on retrouve les cellules lumineuses (LC), Cellules amplificantes transitoires (TAC), Cellules basales (BC), Cellules souches (SC), ainsi que les marqueurs moléculaires communs et spécifiques à ces différentes populations de cellules. *Inspiré de Collins Maitland et al.*

sein de cet épithélium glandulaire une population cellulaire rare et isolée, les cellules épithéliales neuroendocrines (Elo & Visakorpi 2001) (Shen & Abate-Shen 2010) (Figure 2A).

Au niveau moléculaire, chez l'homme comme chez la souris, les cellules luminales expriment plusieurs marqueurs spécifiques comme les cytokératines de faible poids moléculaire (cytokératine 8 et 18), le facteur de transcription Nkx3.1, l'antigène spécifique prostatique (PSA), le marqueur de surface cellulaire CD57, ainsi qu'un niveau élevé de récepteurs aux androgènes (RA) (Sherwood et al. 1991)(Liu et al. 1997)(Long et al., 2005). Ces cellules luminales sont fortement dépendantes de la signalisation androgénique pour leur survie. Les cellules basales n'expriment qu'un faible niveau de RA, mais expriment certains marqueurs spécifiques comme les cytokératines de haut poids moléculaire (cytokératine 5 et 14), les protéines p63 et Bcl2 (Sherwood et al. 1991)(Long et al., 2005). Les rares cellules neuroendocrines expriment des marqueurs spécifiques des cellules neuronales, comme la chromogranine A (ChrA) ou la synaptophysine. En revanche, elles n'expriment pas le RA (Bonkhoff et al., 1995) (Figure 2B).

I.B.2) Cellules épithéliales intermédiaires

Même si cette compartimentalisation cellulaire, basée sur l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques (CKs), ainsi que sur les caractéristiques histologiques des cellules semble bien établie, le processus de différenciation de l'épithélium prostatique est dynamique et complexe.

Dans l'épithélium prostatique, comme au sein de tout épithélium, les cellules peu différenciées du compartiment basal vont transiter vers le compartiment luminal. Ces cellules basales vont se différencier au cours de ce transit afin de maintenir un pool de cellules luminales bien différenciées, nécessaires au maintien des fonctions sécrétrices de la prostate. Il a été décrit que cette amplification cellulaire va donner lieu à différentes sous populations cellulaires présentant des caractéristiques moléculaires hétérogènes. Ces cellules sont appelées les cellules intermédiaires amplifiantes (TAC : transit-amplifying cells). Ces cellules peuvent exprimer une combinaison de marqueurs qui vont être communs aux cellules luminales et basales (Long et al., 2005). Il a notamment été montré *in-vivo*, par des analyses immuno-histochimiques sur des coupes de tissus prostatique humaines, qu'il existe deux populations de cellules intermédiaires majoritaires (van Leenders et al. 2003) (Hudson et al.

2001). L'une de ces populations exprime les cytokératines 5, 14, et 18, et l'autre population exprime les cytokératines 5 et 18. Ces deux populations de cellules intermédiaires semblent être présentes dans les couches basales et luminales, laissant suggérer un processus de différenciation progressif de la couche basale vers la couche luminale. Il s'agit du modèle de différenciation linéaire (Lawson & Witte 2007). D'autres marqueurs CKs, tel que CK7, CK17 et CK19 sont considérés comme des marqueurs spécifiques de ces cellules intermédiaires (Hudson et al. 2001) (Figure 2B).

I.B.3) Cellules souches épithéliales prostatiques

Il est connu depuis longtemps que les cellules souches sont abondantes dans les tissus qui ont un « turnover » cellulaire important, comme dans la moelle osseuse, la peau et le tractus gastrointestinal. Par la suite, l'existence de cellules souches a également été considérée dans des tissus moins dynamiques, notamment dans la prostate (Lawson & Witte 2007)(Maitland & Collins 2008).

Deux études publiées il y a plus de 20 ans, ont mise en évidence l'existence de cellules capables d'auto renouvellement dans l'épithélium glandulaire de la prostate chez le rat (English et al., 1987) (Walensky et al., 1993). Chez le rat, la castration conduit à une involution rapide des cellules de la glande prostatique, plus particulièrement des cellules luminales dépendantes des androgènes. De manière intéressante, il a été montré que la ré-administration d'androgènes chez des rats ayant été castrés au préalable, conduit à la restauration d'un compartiment luminale pleinement fonctionnel (English et al.,1987). Ces cycles d'involution et de régénération de l'épithélium prostatique peuvent être répétés plusieurs fois, suggérant que parmi les cellules basales, il existe des cellules souches progénitrices capables de survivre et proliférer indépendamment des androgènes. Ces cellules semblent posséder des capacités régénératives et de pluri-potence. Pour soutenir cette hypothèse, il a été proposé plus tard, que ces cellules souches progénitrices appartenaient au compartiment basal, notamment associé à leur indépendance aux androgènes d'une part, et à l'expression de marqueurs basaux comme les protéines bcl-2 et p63 d'autre part (Litvinov et al., 2003). Ce concept de cellules souches épithéliales de la prostate ne date donc pas d'hier. Mais même si l'existence de telles cellules ayant des capacités d'auto renouvellement ne semble plus discutée, la nature et les caractéristiques phénotypiques de ces cellules souches progénitrices font depuis longtemps débat.

Plusieurs études ont tenté d'isoler ces cellules souches chez l'homme, en se basant sur l'étude de certains marqueurs moléculaires. Parmi ces marqueurs, CD44 a été initialement identifié comme un marqueur des cellules souches, mais sa spécificité exclusive aux cellules souches reste néanmoins controversée (Liu et al. 1997). Collins et al, ont mise en évidence que des cellules du compartiment basale exprimant les intégrines $\alpha 2\beta 1$, possédaient des capacités d'auto renouvellement en culture (Collins et al., 2001). De plus, une sous population cellulaire qui exprime le marqueur de surface CD133 a été identifiée, parmi la population de cellules exprimant les intégrines $\alpha 2\beta 1$ (Richardson et al. 2004). Actuellement, CD44, les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et CD133 sont définis comme les trois marqueurs définissant cette population de cellules souches nichée dans le compartiment basal, chez l'homme. Leong et al ont isolé à partir de l'épithélium de la glande prostatique d'une souris sauvage C57bl6, une population cellulaire souche $Lin^-Sca1^+CD44^+CD133^+CD117^+$, qui partage des caractéristiques moléculaires communes à l'homme et à la souris (Leong et al., 2008). Ils ont montré que la greffe d'une seule cellule de cette population dans la capsule rénale d'une souris immunodéficiente, était capable de générer des glandes prostatiques fonctionnelles, après transplantation (Figure 2B).

L'existence de ces populations cellulaires intermédiaires et souches, et le fait que le RA ainsi que la PSA soient exprimés dans certaines cellules basales, laissent encore en suspend certaines questions sur le processus de différenciation de l'épithélium prostatique (Garraway et al. 2003). S'agit-il d'un processus durant lequel les cellules basales migrent et perdent progressivement leurs caractéristiques basales afin d'acquérir un phénotype luminal ? Ou s'agit-il de cellules progénitrices qui restent dans un état latent et quiescent, attendant les signaux nécessaires à leur différenciation terminale vers un phénotype luminaire sécrétoire ? Ces questions restent à ce jour importantes, notamment dû à la difficulté de définir l'origine cellulaire du cancer de la prostate.

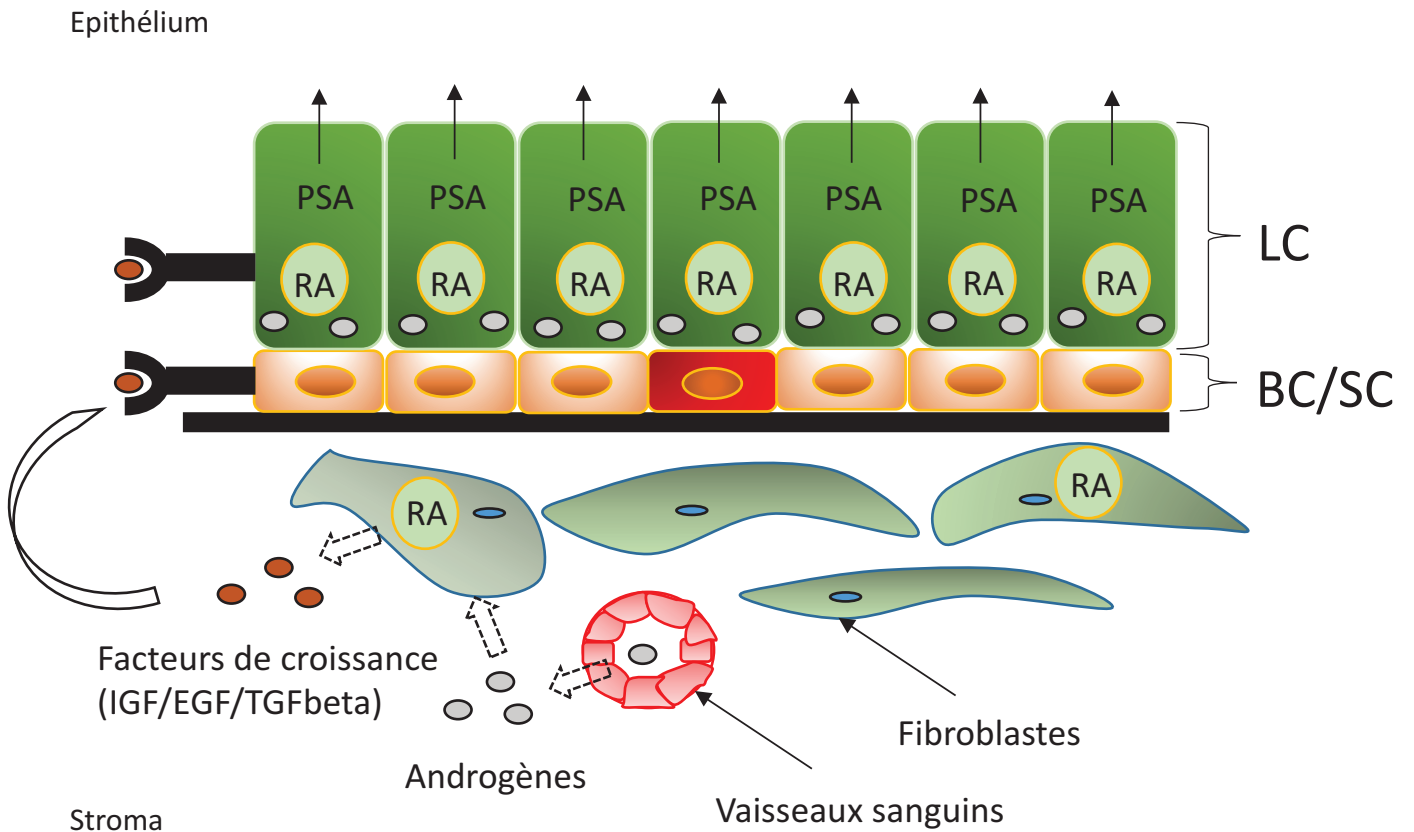


Figure 3 : Rôle de la signalisation androgénique stromale dans le maintien de l'homéostasie des cellules épithéliales de la glande prostatique. Les androgènes apportés par la circulation sanguine dans le compartiment stromale, vont agir sur les cellules fibroblastiques exprimant le RA. En réponse aux androgènes, les fibroblastes vont sécréter différents facteurs de croissance qui vont, par une action paracrine, réguler l'apoptose, la prolifération et la différenciation des cellules du compartiment épithéliale. *Inspiré de Isaacs et al 2004*

I.B.4) Le stroma fibro-musculaire et son rôle dans la différenciation cellulaire

La principale différence histologique entre l'homme et la souris, réside dans l'organisation du compartiment stromal. En effet, chez l'homme on retrouve une composante stromale importante dans la zone du stroma fibromusculaire antérieur, tandis que chez la souris il consiste en une fine couche de cellules musculaires lisses (Oliveira et al. 2016).

Le rôle du stroma dans le processus inflammatoire du cancer de la prostate est bien connu (Marzo et al. 2007). Néanmoins, son implication dans la différenciation cellulaire a longtemps été mal considérée. On sait maintenant que certaines cellules fibroblastiques du compartiment stromal expriment le RA et répondent donc à la signalisation androgénique (Long et al., 2005). Le processus de différenciation de l'épithélium prostatique semble également impliqué une interaction fonctionnelle entre celui-ci et la matrice extracellulaire stromale, jouant également un rôle dans la balance entre prolifération cellulaire et apoptose. L'action des androgènes sur les fibroblastes exprimant le RA, va permettre le relargage de plusieurs facteurs de croissance, tel que l'IGF, EGF et le TGF β , qui vont contribuer à maintenir l'homéostasie cellulaire de l'épithélium prostatique (Niu & Xia 2009)(Hägglöf & Bergh 2012) (Figure 3).

I.C) Récepteurs aux androgènes et signalisation androgénique dans la glande prostatique

I.C.1) Rôle physiologique de la signalisation androgénique

Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes indispensables au fonctionnement du système endocrine de l'homme adulte. Ils vont notamment permettre d'induire la différenciation et la maturation des organes reproducteurs humains (Timms 2008). La testostérone, sécrétée par les testicules, est l'androgène circulant majoritairement retrouvé dans le sang chez l'homme. Dans les testicules, ce sont les cellules de Leydig qui vont assurer 95% de la sécrétion et de la production de la testostérone circulante. Le précurseur de la testostérone est le cholestérol. Par une série de bioconversion du cholestérol se produisant dans les cellules de Leydig, la testostérone va être convertie en dihydrotestostérone (DHT) par l'enzyme alpha 5 reductase (Watson et al., 2015).

La quantité d'androgènes circulants utilisable par les tissus périphériques, est finement régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire, via l'action de l'hormone lutéinisante (LH) sur les cellules de Leydig. En amont de cet axe, les cellules neurosécrétoires hypothalamiques vont libérer l'hormone LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) qui va agir sur les cellules gonadotropes antéhypophysaires. Ces dernières, en sécrétant les gonadotrophines comme la LH et la FSH, vont stimuler la stéroïdogénèse et donc la production des androgènes en agissant sur les cellules de Leydig (Chen et al., 2009) (Figure 4A).

Les stéroïdes libres peuvent diffuser aisément jusqu'aux noyaux des cellules afin de réguler l'expression génique, via un capteur très spécifique qui est le RA. Même si la testostérone est capable de lier le RA, c'est son métabolite principal, la DHT, qui présente la plus forte affinité pour ce récepteur (Gao et al. 2005). Le RA est distribué de façon large dans l'organisme. Son expression est plus élevée dans les organes sexuels (prostate, testicules et ovaires), mais il est aussi retrouvé dans le cœur, le foie et les muscles.

I.C.2) Récepteur aux androgènes : du gène à la protéine

Le gène codant pour le RA est localisé sur le chromosome X dans la région Xq11-12, chez l'homme (Lubahn et al., 1988). La région codante est composée de 8 exons qui s'étendent sur une région de 2757 nucléotides. Le gène RA code pour une protéine de 110 kDa comprenant 919 acides aminés (Aa). Le RA est un facteur de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires, dont l'action génomique dépend de son ligand (DHT ou testostérone) (Mangelsdorf et al. 1995). Comme les autres membres de la famille des récepteurs nucléaires, le RA est composé de trois domaines fonctionnels majeurs : le domaine N-terminale (NTD ; 1-555 Aa), le domaine de liaison à l'ADN (DBD ; 555-623), et le domaine de liaison au ligand en C-terminale (LBD ; 665-919Aa). Ces deux derniers domaines sont reliés entre eux par une région charnière flexible (Hinge ; 623-665). Le domaine DBD, hautement conservé permet la liaison à l'ADN sur les gènes cibles du RA. Cette liaison permet alors l'activation des domaines NTD et LBD qui vont réguler l'activité transcriptionnelle du RA (Tan et al., 2014) (Figure 4B).

Chez la souris, le mRA présente 85% de similarité avec la séquence du RA humain (Faber et al., 1991). La séquence codante également distribuée sur 8 exons (2697pb), code

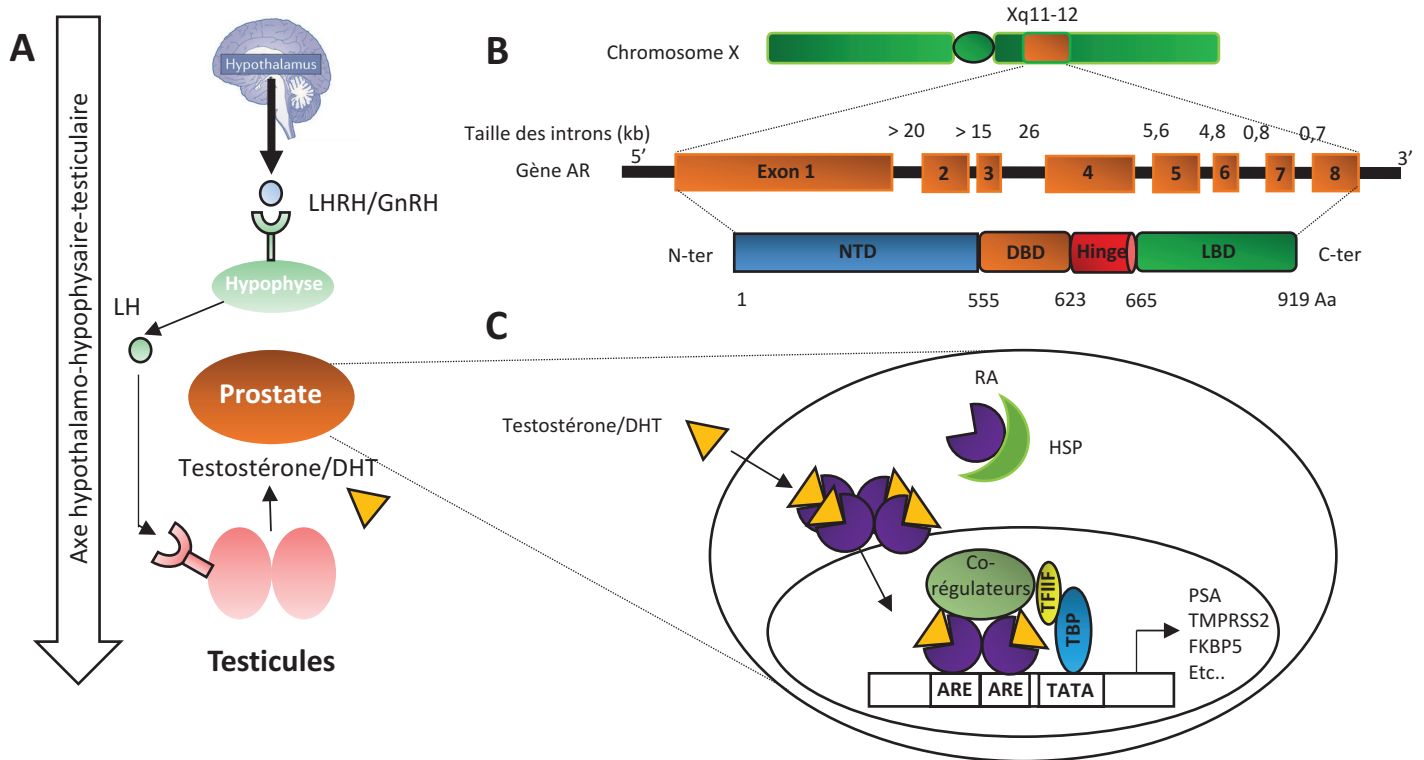


Figure 4 : Structure du récepteur aux androgènes et signalisation androgénique. (A) Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire permettant de réguler la stéroïdogénèse des androgènes au niveau des testicules. (B) Vue schématique du gène codant pour le RA et de la protéine correspondante. Les rectangles représentent les exons annotés de 1 à 8, lesquelles sont séparés par des régions introniques dont la taille mentionnée en kb est variable. Les différents domaines fonctionnels (NTD, DBD, Hinge, LBD) du RA sont schématisés sous la structure du gène du RA. (C) Vue simplifiée du mode d'action génomique du RA, lequel se lie à son ligand (DHT) au niveau du cytoplasme des cellules, pour ensuite se dimériser. Cette dimérisation conduit à la translocation cytoplasmique du RA dans le noyau des cellules, où il va recruter un complexe de régulation transcriptionnel au niveau de ses séquences spécifiques de liaison à l'ADN (ARE). Ce complexe associé au RA va permettre de réguler l'expression des gènes cibles du RA.

pour une protéine composée de 899 Aa. Les domaines fonctionnels de cette protéine sont très conservés de la souris à l'homme.

I.C.3) Mode d'action génomique du récepteur aux androgènes

En absence de son ligand, le RA est inactif au sein d'un complexe macromoléculaire dans le cytoplasme des cellules. Suite à la liaison de son ligand DHT au niveau d'une poche située dans le LBD, le RA subit un changement conformationnel qui conduit à sa dimérisation. Une fois activé, le RA va être transloqué dans le noyau des cellules, où il se lie à des sites de liaisons spécifiques sur l'ADN, les éléments de réponse aux androgènes (ARE) (Heinlein & Chang 2004). Classiquement, il a été décrit dans la voie génomique du RA que celui-ci était capable de recruter les facteurs de base de la machinerie transcriptionnelle, tel que les TBP (TATA binding protein), le facteur de transcription IIF (TFIIF) et d'autres co-régulateurs généraux de la transcription. Le recrutement de ce complexe au niveau du promoteur des gènes cibles du RA, comme la PSA, TMPRSS2, ou encore FKBP5, va permettre de réguler leur expression. (Tan et al. 2014) (Figure 4C).

Au delà de cette représentation classique, il est évident que la signalisation du RA est bien plus complexe, et plus particulièrement dans le contexte du cancer de la prostate. En effet, celle-ci implique des interactions du RA avec un grand nombre de facteurs de transcription et épigénétiques, dont l'action va être dépendante ou non du ligand, mais aussi du contexte cellulaire.

I.D) Le cancer de la prostate

I.D.1) Généralités

Le cancer de la prostate est un des cancers les plus fréquemment observés chez l'homme dans le monde (Siegel et al., 2014). Même s'il est décrit comme n'ayant pas de frontière, sa prévalence reste néanmoins plus importante dans certaines populations, plus particulièrement aux Etats-Unis dans les populations afro-américaines, et en Europe du Nord (Haas et al., 2008). En France, il représente la 3^{ème} cause de mortalité chez l'homme après le cancer du poumon et le cancer colorectal, avec plus de 50 000 nouveaux cas diagnostiqués

chaque année (Litt 2013). Le cancer de la prostate constitue donc un problème majeur de santé publique.

Il s'agit le plus souvent d'un cancer à progression lente. Il peut être totalement silencieux ou responsable de symptômes urinaires comme une difficulté à uriner, ou à l'inverse une envie d'uriner plus fréquente. L'agressivité du cancer de la prostate est déterminée principalement par trois facteurs :

- L'extension du cancer (localisée à la prostate, étendue aux ganglions ou à d'autres organes)
- L'agressivité des cellules cancéreuses vues au microscope (score de gleason)
- Le taux de PSA dans le sang

Il existe différents moyens pour traiter le cancer de la prostate, dont le choix est principalement associé au stade de progression de la maladie. Dans le contexte d'un cancer localisé, parmi les traitements administrés aux patients on retrouve la chirurgie, la radiothérapie externe, la curiethérapie, ou encore certains traitements anti-hormonaux. Dans le cas des cancers de la prostate métastatiques, les métastases se logent le plus souvent au niveau des ganglions lymphatiques et de l'os. Le traitement initial des métastases du cancer de la prostate repose sur un traitement anti-hormonal visant à baisser le taux de testostérone dans le sang. Néanmoins des mécanismes de résistance aux thérapies hormonales se produisent fréquemment.

1.D.2) Diagnostic du cancer de la prostate

Il est très fréquent qu'à partir de 50 ans la prostate augmente de volume. C'est que l'on appelle l'hypertrophie bénigne de la prostate, qui va engendrer une compression de l'urètre à l'origine de troubles urinaires (pollakiurie, dysurie, retard à la miction, vidange incomplète). De plus, des troubles de l'érection et de l'éjaculation peuvent aussi survenir à cause de cette hypertrophie bénigne de la prostate. L'ensemble de ces troubles du système uro-génitale peuvent laisser suspecter un cancer de la prostate avec l'âge (Has 2012).

La suspicion d'un cancer de la prostate va donc amener une série d'examens complémentaires. Parmi eux, le toucher rectal va permettre d'apprécier la consistance et la

régularité des bords de la prostate. En effet, le toucher rectal pourra avant toutes autres examens permettre de déceler une augmentation du volume de la prostate, un durcissement ou encore la présence de nodules. En parallèle, un dosage sérique de la PSA dans le sang, considéré comme étant un des premiers outils de dépistage du cancer de la prostate, est indispensable pour établir un diagnostic clair. Le dosage de la PSA est le second outil de dépistage du cancer de la prostate. La désorganisation de l'architecture de l'épithélium prostatique ainsi que l'augmentation du nombre de cellules vont être à l'origine d'une élévation du taux du PSA dans la circulation générale. Dans le cadre du diagnostic, un taux de PSA dans le sang supérieur à 4ng/ml va être considéré comme anormal, et amènera des examens complémentaires plus approfondis. Néanmoins le dosage sanguin de la PSA n'est pas toujours un indice de confiance. En effet, un taux plus élevé de PSA n'est pas toujours synonyme de cancer de la prostate. Il peut simplement être la conséquence d'une inflammation locale ou de lésions bénignes de la prostate. Donc lorsqu'il n'existe pas de signes évocateurs d'un cancer de la prostate chez un patient, un toucher rectal et le dosage de la PSA permettra de poser un premier diagnostic du cancer de la prostate, qui doit être complété par des examens histologiques et radiologiques par la suite. Cette confirmation s'effectue le plus souvent par une biopsie prostatique, au cours de laquelle plusieurs échantillons de tissus sont prélevés dans différentes zones de la prostate afin de mettre en évidence des anomalies histologiques de la glande prostatique (Has 2012).

I.D.3) Facteurs de risque du cancer de la prostate

Les principaux facteurs de risque associés au développement d'un cancer de la prostate sont l'âge, les antécédents familiaux, l'environnement, mais également le mode de vie, principalement lié à une alimentation riche en matières grasses.

I.D.3.a) Âge

Le cancer de la prostate est considéré comme un cancer de l'homme mûr ou âgé, car la majorité des cancers de la prostate surviennent après l'âge de 65 ans. Dans le rapport d'orientation de la haute autorité de santé (HAS) fait en 2012, il a été rapporté que le nombre de cas incidents du cancer de la prostate est très faible avant l'âge de 50 ans avec 290 cas pour 100 000 individus, soit moins de 0,5% des cas incidents. Ce nombre augmente

progressivement à partir de 60 ans, avec 10959 cas pour 100000 individus entre 70 et 75 ans, soit 18% des cas incidents. Au niveau mondial, cette incidence a subi une forte augmentation entre 1980 et 2005, à laquelle a succédé une nette baisse en 2011 (Pohar 2011). Dans le même sens, il a été observé une baisse importante du taux de mortalité, 3,8% entre 2005 et 2011, alors que cette baisse n'était que de 0,85% entre 1980 et 2005. Ces évolutions s'expliquent en grande partie par l'amélioration du dépistage et des méthodes de diagnostic, ainsi qu'un meilleur suivi des patients.

I.D.3.b) Les antécédents familiaux

Plusieurs études ont apporté des preuves tangibles prouvant qu'il existe une histoire familiale du cancer de la prostate (Carter et al., 1992) (Schaid et al., 1998). En effet, on estime que 5 à 15% des cancers de la prostate peuvent être attribués à l'héritage de mutations génétiques dans une branche familiale. A la différence d'autres cancers, l'identification des mutations géniques associées au développement de ces formes familiales du cancer de la prostate a été difficile. Cette difficulté est principalement liée au fait que cette prédisposition héréditaire peut être attribuée à un grand nombre de gènes. Parmi ces gènes, on retrouve HPC1, PCaP, HPCX, HPC20, HPC2/ELAC2, PG1/MSR1, CAPB et BRCA2.

Les études épidémiologiques appuyant l'existence des formes héréditaires du cancer de la prostate, ont conduit à des analyses à grande échelle, visant à identifier les locis impliqués. En 1996, une équipe a montré que la région 1q24-25 pourrait contenir un gène de prédisposition au cancer de la prostate, appelé HPC1 (Hereditary prostate cancer 1) (Xu et al., 2000). Une autre équipe a identifié en 1998, un autre locus susceptible de posséder un gène de prédisposition, nommé PCaP, dans la région télomérique du bras long du chromosome 1 (1q42.2-43) (Berthon et al. 1998). Ces deux études ont ensuite ouvert la voie à l'identification de plusieurs régions chromosomiques contenant des gènes de prédisposition au cancer de la prostate, tel que HPCX (Xq27-28), HPC20 (20q13), HPC2 (17p11), PG1 (prostate cancer susceptibility gene 1) (8p22-23)(Karayi et al., 2000).

D'autres études épidémiologiques ont également montré une corrélation entre le cancer de la prostate et d'autres cancers d'origine héréditaire, comme le cancer du sein, les lymphomes, les cancers du système digestif et les tumeurs cérébrales. Il a notamment été mis en évidence une augmentation significative du risque de développer un cancer du sein, chez

les femmes appartenant à une famille dans laquelle certains individus ont développé un cancer de la prostate précoce (Valeri et al. 2000). Cette découverte a suggéré l'existence de gènes de prédisposition communs entre le cancer de la prostate et le cancer du sein. Il a été suspecté que les deux gènes de prédisposition au cancer du sein, BRCA1 (17q21) et BRCA2 (13q12-13), pourraient être à l'origine de certaines formes héréditaires du cancer de la prostate. Même si aucune étude familiale n'a clairement établi que le gène BRCA2 pourrait être un gène de prédisposition commun à ces deux cancers, plusieurs études récentes ont montré que des mutations germinales du suppresseur de tumeur BRCA2 sont associées à un risque de développer un cancer de la prostate agressif (Taylor et al., 2017).

I.D.3.c) Alimentation

L'alimentation riche en graisses est considérée comme un facteur de risque important associé au développement du cancer de la prostate. Des études épidémiologiques menées sur de larges cohortes de patients à travers le monde ont pointé du doigt l'impact de l'alimentation riche en graisses sur le cancer de la prostate (Whittemore et al., 1995) (Rose et al., 1986). Du point de vue moléculaire, plusieurs théories relient une alimentation riche en lipides et le développement du cancer de la prostate. Il a notamment été montré qu'une alimentation riche en matière grasse, peut entraîner chez certains individus une augmentation des androgènes circulants (testostérone) dans le sang, pouvant affecter la progression tumorale (Demark-Wahnefried et al. 2001). D'autres études ont démontré qu'une alimentation riche en graisse entraîne la carcinogénèse prostatique via le processus d'oxydation lipidique. En effet, une alimentation riche en graisse va entraîner une augmentation du métabolisme lipidique conduisant à l'accumulation de radicaux libres dans les tissus. Ces réactifs oxygénés et les différents métabolites lipidiques pro-inflammatoires vont créer un stress oxydatif dans les cellules cancéreuses, ayant un effet pro-tumorigénique (Fleshner & Klotz 1999).

I.D.4) Notions d'histologie des lésions de la glande prostatique : Souris VS Homme

Comme je l'ai détaillé dans la suite de ce manuscrit, de très nombreux modèles murins d'études du cancer de la prostate, connus sous l'appellation GEM PCa (Genetically engineered mouse (GEM) models of prostate cancer), ont été générés dans le but de mieux comprendre les mécanismes de développement du cancer de la prostate. Afin de rester

Souris			Homme		
Type de lésion	Vue schématique	Histologie H&E	Type de lésion	Vue schématique	Histologie H&E
A Epithélium normal			B Epithélium normal		
C Néoplasies intraépithéliales prostatiques PIN	Classification de Park mPIN1/2 mPIN3/4 Classification usuelle / modèle de shapell LGPIN HGPIN	 	D Néoplasies intraépithéliales prostatiques PIN	LGPIN ↓ Peu de signification diagnostique HGPIN ↓ Considéré comme les lésions précurseurs des carcinomes	
E Carcinomes microinvasifs	Invasion locale 		F Carcinomes invasifs Adénocarcinome	Invasion distante 	
G Carcinomes invasifs Adénocarcinome	Invasion distante 				

Figure 5 : Description des différents types de lésions histologiques précancéreuses et cancéreuses retrouvées chez la souris et chez l'homme. Histologie normale de la glande prostatique chez la souris (A) et chez l'homme (B). Les lésions PIN se caractérisent par une prolifération incontrôlée des cellules épithéliales qui vont envahir la lumière du compartiment luminaire. Chez la souris, le modèle de Park et al, s'oppose à la classification de de Bar Harbor (C). Chez l'homme, les lésions LGPIN ont peu de signification dans les analyses histologiques, en revanche les lésions HGPIN sont considérées comme des lésions précancéreuses et peuvent présenter une caractéristique invasive mineure (D). Les carcinomes microinvasifs, uniquement considérés chez la souris, sont des lésions capable d'envahir localement le stroma, et vont former de petites structures acinaires autour des lésions précancéreuses, comme indiqué par les flèches sur la photo (E). Les cellules tumorales deviennent ensuite plus agressives et vont se différencier pour former des lésions de type carcinomes/adénocarcinomes qui peuvent présenter un potentiel invasif (F,G). Dans ces carcinomes, la structure de la glande est complètement désorganisée et marquée par l'apparition de nombreuses structures acinaires qui s'étendent largement au stroma.

cohérent dans l'interprétation anatomopathologique des lésions observées dans les différents modèles murins, un consensus a été approuvé par différents pathologistes et vétérinaires au sein d'un consortium, NIC MMHCC (National Cancer Institut Mouse Models of Human Cancers Consortium) (Shappell et al. 2004) (Ittmann et al. 2013). Ce comité a établi une taxonomie des atteintes de la prostate chez la souris. L'objectif était d'uniformiser et de préciser les terminologies des différentes lésions histologiques, permettant ainsi de corréler les résultats obtenus dans les différents laboratoires. En 2004, Shappell et al ont recommandé d'utiliser le système de classification Bar Harbor pour caractériser les phénotypes histologiques des nouveaux modèles GEM (Shappell et al. 2004).

Basée sur cette classification, je présente ici une liste non exhaustive des lésions histologiques observées dans les différents modèles murins GEM, en confrontant celles-ci aux atteintes histologiques observées chez l'homme.

I.D.4.a) Hyperplasie Bénigne de l'épithélium prostatique

L'hyperplasie bénigne de la prostate (BPH) est considérée comme une atteinte non néoplasique de l'épithélium prostatique. Elle se caractérise généralement par une augmentation de l'espace glandulaire et du nombre de cellules épithéliales, créant ainsi une stratification de l'épithélium. Des changements cytologiques sont aussi observés, avec des cellules épithéliales ayant un noyau atypique plus large, un aspect de la chromatine anormale, et des nucléoles qui deviennent plus denses. Ces BPH peuvent être localisées ou diffuses. Elles sont localisées, lorsqu'elles touchent seulement quelques glandes de manière isolée, et diffuses lorsqu'elles sont étendues dans la majorité des glandes de l'épithélium prostatique.

La désignation BPH chez la souris est associée à une faible prolifération des cellules épithéliales glandulaires, avec une absence de phénotype inflammatoire. Chez l'Homme, les BPH ne sont pas considérées comme des lésions précancéreuses. Cette observation résulte du fait que les BPH se développent principalement dans la zone de transition chez l'homme, alors que les lésions bénignes à l'origine de la majorité des cancers de la prostate se trouvent dans la zone périphérique (Chokkalingam et al. 2003). En revanche, chez la souris le cancer de la prostate peut provenir de ces BPH.

I.D.4.b) Néoplasie intraépithéliale prostatique

Chez l'homme, les néoplasies intraépithéliales prostatiques (PIN) sont caractérisées par la prolifération de cellules épithéliales atypiques qui vont envahir la lumière de la glande prostatique. Chez l'homme, ces lésions PIN sont généralement considérées comme non invasives, c'est à dire que la structure externe de la glande n'est pas affectée. En fonction du degré de prolifération au sein de la lumière de la glande, les lésions peuvent être qualifiées de PIN de haut grade (HGPIN). Ces dernières sont considérées comme des lésions pouvant évoluer vers un phénotype plus agressives, caractérisé par l'apparition de carcinomes invasifs (Bostwick et al., 2004) (Figure 5C/D).

Chez la souris, des lésions similaires résultant de la prolifération aberrante des cellules épithéliales au sein de la glande prostatique, sont regroupées sous le terme mPIN. Depuis plus de vingt ans, les examens anatomopathologiques réalisés sur les différents GEM PCa ont montré que les mPIN progressent fréquemment vers un phénotype plus agressif, marqué par l'apparition de carcinome invasif chez les souris mutantes. Les mPIN, considérées comme des néoplasies pré-invasives ont été observées dans tous les lobes prostatiques des différents modèles GEM. Comme dans le cas des BPH, plusieurs altérations cytologiques ont été rapportées. Dans les mPIN les cellules épithéliales ont des noyaux élargis présentant une membrane irrégulière, un nombre de nucléoles plus importants et une hyperchromasie.

La classification de ces lésions mPIN est encore un sujet très controversé à l'heure actuelle. Dans la classification de Bar Harbor, il est proposé que la description morphologique des mPIN devrait se faire en se basant simplement sur la capacité à progresser de ces lésions. En effet le potentiel invasif ou non d'une lésion précancéreuse est un concept important afin d'anticiper le devenir des lésions bénignes de la prostate. La classification de Bar Harbor s'oppose au modèle de Park et al, dans lequel les lésions mPIN sont classifiées en fonction du degré d'altération de l'épithélium prostatique (Park et al. 2002). Dans ce système, il existe une graduation des mPIN basée sur une échelle s'étendant de 1 à 4. Par exemple les mPIN de grade 2 présentent des noyaux atypiques et une stratification de l'épithélium comprenant au minimum 2 assises de cellules épithéliales. Dans les mPIN de grade 4, les cellules épithéliales envahissent la glande prostatique dans laquelle la lumière n'est plus visible, et la fine couche de stroma-fibromusculaire entourant la glande est irrégulière, voir absente dans certaines zones. Ce processus est caractéristique d'une lésion PIN qui rentre dans un processus

d'invasion. Actuellement, il est parfois difficile de distinguer clairement les mPIN de grade 1 par rapport au mPIN de grade 2. C'est pourquoi afin de faciliter cette classification, ces deux types de mPIN (1 et 2) sont souvent regroupées sous le terme de mPIN de bas grade (LGPIN), tandis que les mPIN de grade 3/4 sont appelées HGPIN, comme dans la pathologie humaine (Figure 5C/D).

I.D.4.c) Carcinome microinvasif

Les carcinomes microinvasifs sont décrits comme des lésions invasives en devenir, caractérisées par la pénétration d'un petit nombre de cellules épithéliales atypiques au travers de la membrane basale de l'épithélium, qui vont envahir le stroma. Dans le cas des carcinomes microinvasifs, l'invasion est décrite comme localisée au stroma entourant les lésions bénignes HGPIN, et ne s'étant pas aux autres glandes adjacentes, comme dans le cas des carcinomes invasifs. Les critères de reconnaissance des carcinomes microinvasifs dans les GEM incluent, une séparation spatiale entre les HGPIN et de petits acini atypiques qui vont se former dans le stroma adjacent. Malgré l'importance de ces stades initiaux dans le processus d'invasion, ce type de lésions n'est pas considéré sur le plan clinique chez l'homme. C'est pourquoi dans le diagnostic clinique, les carcinomes microinvasifs vont plus être qualifiés de HGPIN, suspectées d'évoluer vers un phénotype invasif (Figure 5E).

I.D.4.d) Carcinome invasif

Le carcinome est une néoplasie épithéliale maligne de la glande prostatique. Du point de vue histologique, les carcinomes invasifs se caractérisent par une perte d'architecture de la structure glandulaire, contrairement au PIN qui conservent une structure acinaire. Le caractère malin des cellules tumorales se traduit par leur capacité à envahir localement le stroma, le système lymphatique et vasculaire adjacent dans un premier temps, puis à métastaser dans un second temps. Il est donc clairement défini que les carcinomes invasifs ont un potentiel métastatique. Chez la souris, les carcinomes invasifs sont généralement associés à une desmoplasie stromale, qui se caractérise par l'apparition d'un stroma fibreux plus abondant ainsi qu'une inflammation chronique (Figure 5F/G).

La classification des carcinomes en différents sous type de tumeurs, est essentiellement basée sur le statut de différenciation de ces lésions. Parmi ces différents sous-

types de carcinomes, on retrouve les adénocarcinomes, les carcinomes neuroendocrines et d'autres rares carcinomes peu différenciés, tel que les carcinomes sarcomatoïdes. Il est important de préciser que la majorité des carcinomes observés sont des adénocarcinomes. Basé sur des caractéristiques cytologiques et moléculaires, les adénocarcinomes sont subdivisés en tumeurs bien différenciées, modérément différenciées ou peu différenciées, à la fois chez l'homme et dans les GEM. Le diagnostic des carcinomes neuroendocrines ou carcinomes à petites cellules est essentiellement basé sur la recherche de marqueurs neuroendocrines spécifiques, comme la Chr A et la synaptophysine.

I.D.4.e) Cancer métastatique de la prostate

Chez l'homme, les cellules métastatiques vont préférentiellement disséminer au niveau des os, avec des cellules qui sont majoritairement ostéoblastiques. Pour les tumeurs neuroendocrines, le tropisme métastatique va principalement concerner le foie, la vessie, les ganglions lymphatiques et le cerveau.

Il n'y a qu'un faible nombre de GEM qui développent des carcinomes qui vont métastaser dans des sites distants de la prostate. Ce sont essentiellement les modèles transgéniques surexprimant l'oncogène SV40 (GEM TRAMP et LADY) qui vont métastaser (Gingrich et al. 1996). Chez la souris, les principaux sites de métastases se trouvent au niveau des ganglions lymphatiques et des poumons. Dans de rares cas, les GEM peuvent développer des métastases au niveau des os (Ding et al. 2012).

I.D.5) Altérations génétiques et moléculaires dans le cancer de la prostate

Actuellement, on estime que 90% des cancers de la prostate découverts suite à un dosage montrant une élévation de la PSA circulante dans le sang, sont des cancers localisés au moment du diagnostic (Penney et al. 2013). Néanmoins le devenir de ces cancers de la prostate localisés est très variable. Au moment du diagnostic, certains hommes vont présenter un cancer localisé qui va rapidement dégénérer en cancer métastatique, alors que d'autres vont présenter un cancer asymptomatique répondant très bien aux traitements initiaux. Jusqu'à présent, l'évaluation de l'agressivité tumorale au moment du diagnostic est majoritairement basée sur l'étude du taux de PSA ainsi que sur le score de Gleason. Cependant, ces outils ne sont pas toujours adéquates et efficaces pour anticiper de manière

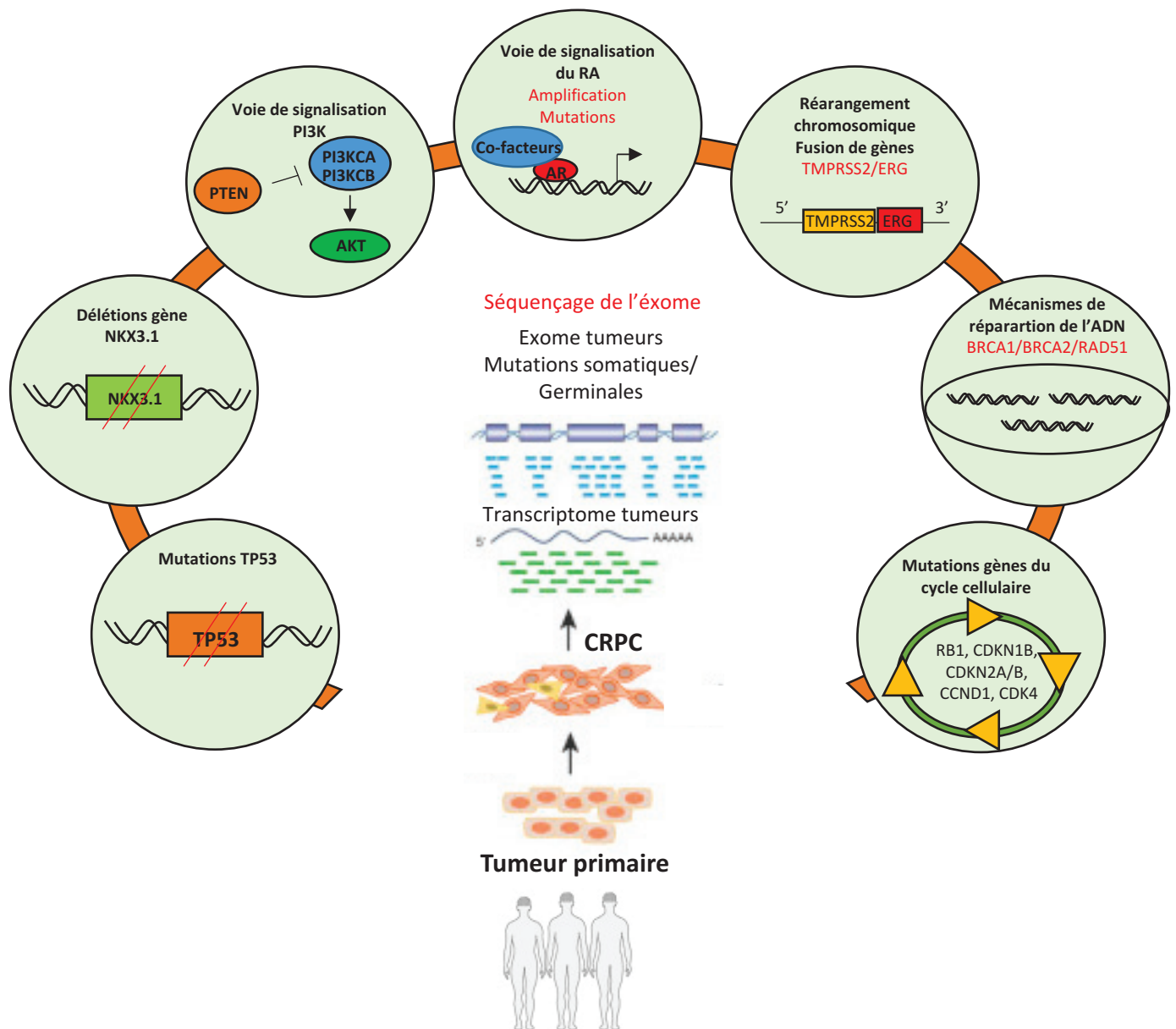


Figure 6 : Représentation schématique des altérations génétiques les plus fréquemment observées dans les tumeurs primaires, dans les cancer de la prostate métastatiques, et dans les CRPC. Des analyses de séquençage clinique réalisées par plusieurs institutions de santé ont permis de répertorier les mutations de gènes récurrentes dans les cancers de la prostate. Ces analyses révèlent une grande diversité du paysage mutationnel entre les individus. La mise en évidence de ces altérations moléculaires suggèrent que certaines d'entre elles pourraient être des cibles thérapeutiques intéressantes, laissant envisager l'utilisation du séquençage de l'exome dans le cadre d'une médecine personnalisée. L'ensemble des altérations génétiques représentées sur ce schéma sont détaillées dans le texte. *Modifié d'après Robinson et al, 2015*

précise le devenir des tumeurs de la prostate (Cooperberg et al., 2009). C'est pourquoi d'autres outils diagnostics sont donc nécessaires à une meilleure compréhension du devenir des tumeurs primaires de la prostate. Parmi ces outils, l'établissement des profils moléculaires et génétiques des tumeurs de la prostate, pourrait permettre de différencier et de mieux caractériser les tumeurs qui évolueront vers des formes malignes par rapport aux tumeurs dites bénignes. C'est pourquoi de nombreux efforts ont été consentis ces dernières années afin de distinguer et classer les différents sous types moléculaires du cancer de la prostate. Ces analyses ont été effectuées à la fois dans les cancers de la prostate localisés, mais aussi dans les cancers de la prostate métastatiques, et plus particulièrement dans les cancers résistants à la castration (CRPC). Car en effet, le profil génétique pourrait aussi permettre de mieux comprendre les mécanismes de résistance au traitement, et si besoin de réorienter le traitement dans l'optique de dresser un traitement personnalisé pour chaque patient.

De nombreuses études se sont attelées à définir le profil génétique et moléculaire des tumeurs primaires de la prostate, en utilisant le séquençage de l'exome couplé à des analyses transcriptomiques. Parmi les altérations génomiques les plus fréquemment observées dans les tumeurs primaires de la prostate, on retrouve des mutations ponctuelles, un gain du nombre de copies génique (DNA copy-number changes), des réarrangements chromosomiques et des fusions de gènes. Les différentes études comparatives entre les tumeurs primaires et les cancers métastatiques de la prostate, montrent qu'il existe évidemment de nombreuses similarités dans le paysage mutationnel. Néanmoins, une des différences se trouve dans le taux de mutations ponctuelles et les altérations du nombre de copies géniques (Abeshouse et al. 2015)(Robinson et al. 2015). En effet ces deux types d'altérations géniques sont significativement beaucoup plus élevées dans les cancers de la prostate métastatiques par rapport aux tumeurs primaires de la prostate. Je dresse ici une liste des gènes mutés de manière récurrente, et décrits comme cliniquement utile d'un point de vue thérapeutique dans les cancers de la prostate (Figure 6).

I.D.5.a) Tmprss2 : fusion de gènes

Les altérations génomiques les plus fréquentes dans les tumeurs primaires de la prostate, sont les fusions de gènes ayant un promoteur régulé par les androgènes (Tmprss2, SLC45A3,...) avec la protéine ERG, et les autres membres de la famille des facteurs de transcription ETS (E twenty six), plus particulièrement ETV1, ETV4, FLI1. Depuis la

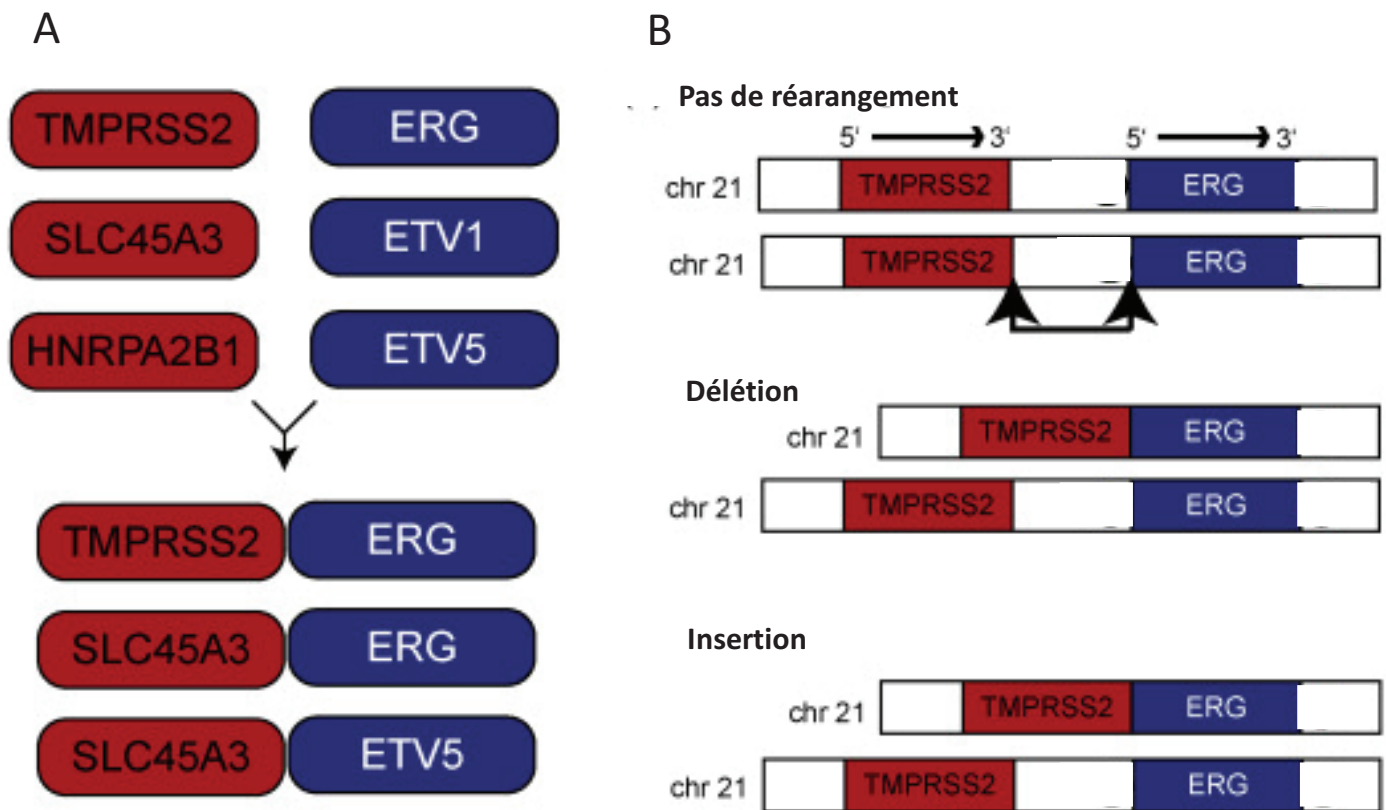


Figure 7 : Représentation schématique des réarrangements chromosomiques conduisant aux gènes de fusion ETS. Plusieurs gènes régulés par le RA et la signalisation androgénique (TMPRSS2, SLC45A3, HNRPA2B1) peuvent fusionner avec différents membres de la famille des facteurs de transcription ETS (ERG, ETV1, ETV5) **(A)**. LA fusion de gène la plus fréquemment observée dans les tumeurs humaines est la fusion de gène entre TMPRSS2 et ERG. Les gènes TMPRSS2 (The prostate-Specific androgen-induced transmembrane Protease Serine 2 gene) et ERG (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog gene) sont localisés sur le chromosome 21, et séparés approximativement par 3 mégabases. Deux événements génomiques conduisant à la fusion de gène TMPRSS2:ERG ont été identifiés. Le premier est la délétion de la région séparant les deux gènes. L'autre mécanisme est l'insertion de cette région intergénique sur un autre chromosome **(B)**. *Modifié d'après Tomlins et al, 2005.*

découverte de ces gènes de fusion ETS, de nombreux partenaires de fusion en 3' et en 5' des gènes ETS ainsi que des variants d'épissages ont été identifiés (Tomlins et al. 2009). Parmi ces fusions de gènes, la première identifiée et la plus courante, est la fusion de gène entre *TMPRSS2* et *ERG* (*TMPRSS2:ERG*). En effet, Tomlins et al, ont caractérisé pour la première fois des fusions récurrentes entre la région non traduite du gène *TMPRSS2* en 5', et deux facteurs de transcription *ERG* et *ETV1* dans des lignées cellulaires de la prostate, mais aussi sur une série de cancers de la prostate humains (Tomlins et al. 2005). La fusion *TMPRSS2:ERG* est observée dans 40 à 50% des cancers de la prostate localisée (Figure 7).

I.D.5.b) Mutations de *PTEN*, *PI3K* : conséquence de la sur-activation de la voie *PI3K/AKT*

Un autre type de mutations qui s'accumulent précocement dans les tumeurs primaires de la prostate sont les délétions chromosomiques ou délétions géniques. Ces mutations par délétion ont une résonance particulière lorsqu'elles touchent des gènes suppresseurs de tumeurs. Le gène *PTEN* a été décrit initialement comme le gène le plus fréquemment muté ou délété dans le cancer de la prostate (Salmena et al., 2008). Ces mutations ont été attribuées à la localisation de ce gène dans la région chromosomique 10q23, connue pour être sujette à des altérations géniques majeures, tel que des pertes alléliques fréquentes. En effet, très tôt, il a été montré que cette région 10q23 subissait une perte d'hétérozygotie (LOH) au niveau du locus contenant le gène *PTEN*. De plus, l'inactivation du gène *PTEN* par délétion homozygote a été rapportée dans 10 à 15% des tumeurs primaires de la prostate (Wang et al., 1998). D'autres études ont par la suite confirmé cette perte bi-allélique conduisant à l'inactivation complète du gène *PTEN* (Verhagen et al. 2006). Néanmoins, même si aucune mutation ponctuelle du gène *PTEN* n'a été décrite initialement, des études récentes utilisant le séquençage de l'exome couplées à des analyses transcriptomiques, ont pu préciser le statut mutationnel de *PTEN*. Des analyses de l'altération du nombre de copies géniques (CNAS, copy numbers alterations) réalisées sur 181 tumeurs primaires, ont montré une perte du nombre de copies de *PTEN* à l'état homozygote et hétérozygote (Taylor et al., 2010). Même si les mutations ponctuelles affectant le gène *PTEN* sont très peu décrites, deux études plus récentes ont permis d'identifier des mutations non-sens et faux sens de *PTEN* dans deux séries de tumeurs primaires de la prostate (Barbieri et al. 2012). Dans les cancers de la prostate métastatiques, le taux de mutations affectant le gène *PTEN* suit la tendance générale de l'augmentation du nombre de mutations par rapport au tumeurs primaires. En effet, il a été

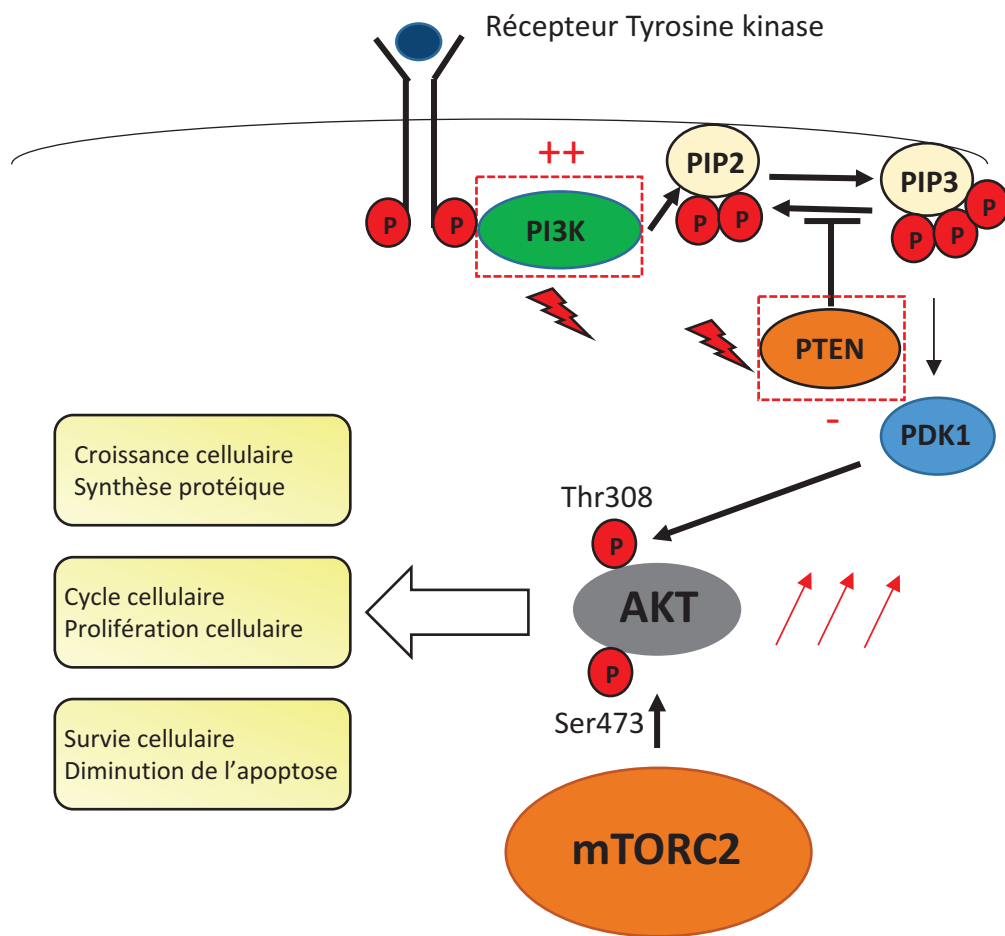


Figure 8 : Vue simplifiée des conséquences fonctionnelles des mutations de PTEN et PI3K sur l'activation de la voie PI3K/AKT. L'activation des récepteurs tyrosines kinases vont permettre le recrutement de la protéine PI3K. De part son activité kinase la protéine PI3K va permettre la conversion du phosphatidylinositol_{4,5} diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol_{3,4,5} triphosphate. Cette dernière va permettre l'activation de PDK1, qui elle même phosphoryle AKT. A l'inverse PTEN va jouer un rôle inhibiteur sur cette conversion de PIP2 en PIP3, exerçant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation. Les mutations inactivatrices de PTEN vont entraîner une levée de l'inhibition de cette voie de signalisation. A l'inverse les mutations activatrices de PI3K vont accélérer la cascade de phosphorylation en amont et en aval de la voie PI3K/AKT. Ces deux types de mutations vont conjointement aboutir à une activation constitutive de la voie de signalisation, dont laquelle l'effecteur principal AKT , va jouer un rôle oncogénique.

montré que le nombre de mutations de *PTEN*, préférentiellement des mutations par perte du nombre de copies, doublait dans les tumeurs avancées par rapport aux tumeurs primaires.

Dans les tumeurs primaires ainsi que dans les cancers avancés de la prostate, des mutations des gènes *PI3KCA* (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit A) et *PI3KCB* (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit B), deux sous unités catalytiques du complexe protéique PI3K, ont été caractérisées. Abeshouse et al, ont identifié 6 mutations ponctuelles de *PI3KCA* et 2 mutations de *PI3KCB*, parmi les 333 tumeurs primaires séquencées dans leur étude (Abeshouse et al. 2015). La majeure partie de ces mutations sont des mutations ponctuelles activatrices déjà connues, et décrites comme des points chauds mutationnels (Mutationnal hotspot). Une autre étude a rapporté que le gène *PI3KCA* était muté dans 6% des tumeurs primaires, parmi les 181 tumeurs primaires de la prostate analysées (Taylor et al., 2010). Tout comme dans le cas de *PTEN*, le taux de mutations de *PI3KCA* et *PI3KCB* doublent dans les cancers métastatiques par rapport aux tumeurs primaires de la prostate (Grasso et al. 2012)(Robinson et al. 2015)(Abeshouse et al. 2015).

PTEN est connu depuis longtemps pour être un régulateur négatif de la voie de signalisation PI3K/AKT, en exerçant une action inhibitrice sur le complexe PI3K via une boucle de rétrocontrôle négative (Song et al., 2012). L'ensemble des mutations inactivatrices de *PTEN* et les mutations activatrices de *PI3K*, convergent vers une même conséquence fonctionnelle qui est l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT. De plus, des mutations activatrices d'un autre effecteur en aval de la voie de signalisation PI3K, la protéine AKT1, ont été identifiées dans les cancers localisés de la prostate (Abeshouse et al. 2015). Il paraît donc évident que cette voie de signalisation est une cible thérapeutique de choix dans le traitement du cancer de la prostate (Figure 8).

I.D.5.c) Diminution d'expression de *NKX3.1*

Le gène *NKX3.1* code pour un facteur de transcription dont l'expression est décrite comme localisée dans les cellules luminales de l'épithélium prostatique (Abate-Shen et al., 2008). La diminution et/ou la perte d'expression de *NKX3.1* est un événement fréquent dans la tumorigénèse prostatique. De plus, cette diminution d'expression de *NKX3.1* est décrite comme un événement critique dans le processus d'initiation tumoral du cancer de la prostate, mais aussi dans un grand nombre de mécanismes affectant le développement de la prostate et

la différenciation cellulaire (Abate-Shen et al. 2008). Le gène *NKX3.1* est localisé dans la région chromosomique 8p21.2, au niveau de laquelle des pertes d'hétérozygoties (LOH) ont été depuis longtemps observées, dans environ 50 % des cancers de la prostate (Vocke et al. 1996)(Sakr et al. 1994). Des analyses immunohistochimiques ont également mise en évidence une diminution d'expression de la protéine NKX3.1 dans les cancers de la prostate humain. Il a été rapporté une perte d'expression de *NKX3.1* dans environ 20% néoplasies intraépithéliales prostatiques (PIN), et 40% des adénocarcinomes chez l'Homme, (Bowen et al. 2000).

Le gène *NKX3.1* a donc été rapidement défini comme un suppresseur de tumeur majeur dans le cancer de la prostate. Les LOH génèrent une haplo-insuffisance qui va conduire à la perte de l'allèle restante à l'âge adulte. Néanmoins, il est intéressant de noter qu'aucune mutation somatique ponctuelle du gène *NKX3.1* n'a été détectée dans les cancers humains (Voeller et al. 1997). C'est un point important qui appuie le rôle du gène *NKX3.1* dans les formes héréditaires du cancer de la prostate. Plusieurs études ont suggéré une relation étroite entre les formes héréditaires du cancer de la prostate et les pertes d'hétérozygoties observées sur le bras court du chromosome 8 (Chr8p) contenant le gène *NKX3.1* (Wiklund et al., 2003) (Xu et al., 2001). Plus récemment, des mutations germinales conduisant à l'expression de plusieurs variants du gène *NKX3.1* ont été identifiées par des analyses de séquençage, dans 188 cancers familiaux de la prostate (Zheng et al. 2006). Enfin, comme dans le cas du gène suppresseur de tumeur *PTEN*, les nombreuses études visant à invalider le gène *Nkx3.1* chez la souris ont montré que ce gène présente un rôle oncosuppressif, et viennent donc appuyer les données obtenues chez l'homme (Bowen et al. 2000)(Abdulkadir et al. 2002)(Kim et al., 2002).

I.D.5.d) Altérations génétiques du RA et signalisation androgénique

Aucune mutation du RA n'a été rapportée dans les tumeurs primaires (Taylor et al. 2010)(Abeshouse et al. 2015). Le récepteur aux androgènes est un facteur indispensable au développement de la glande prostatique, et joue également un rôle crucial dans la croissance et la différenciation cellulaire au cours de la tumorigénèse prostatique (Heinlein & Chang 2004). C'est pourquoi, même si le RA n'est pas muté dans les tumeurs primaires de la prostate, son activité reste néanmoins indispensable à la progression tumorale. En effet, il a été montré que d'une part, l'expression des gènes de fusion oncogéniques ETS sont sous le

contrôle de la signalisation androgénique, et que d'autre part celle-ci est également impliquée dans la genèse de ces réarrangements chromosomiques ETS (Lin et al. 2009)(Mani et al. 2009). Cependant, la sensibilité et la dépendance vis à vis de la signalisation androgénique varient d'une tumeur à l'autre. Etant donné l'importance thérapeutique du ciblage du RA, il est important de connaître l'activité du récepteur aux androgènes. C'est pourquoi certaines études ont établi un score d'activité du RA, basé sur l'analyse transcriptomique des gènes cibles du RA, dans les lignées cellulaires mais aussi chez les patients (Hieronymus et al. 2006)(Abeshouse et al. 2015). Il a également été constaté que les tumeurs primaires présentant des mutations dans les gènes SPOP et FOXA1 ont une activité transcriptionnelle du RA plus importante (Abeshouse et al. 2015). Cette corrélation n'est pas surprenante étant donné l'interaction physique et fonctionnelle qui existe entre le RA, et ses deux co-régulateurs transcriptionnels SPOP et FOXA1 (Geng et al. 2014)(Yang & Yu, 2015). De plus, plusieurs autres co-activateurs et co-répresseurs du RA, tel que NCOA2, NCOR2, NRIP1 ou EP300, sont connus pour être mutés à la fois dans les cancers localisés et métastatiques de la prostate (Taylor et al. 2010)(Grasso et al. 2012)(Robinson et al. 2015).

L'immense différence existant entre les cancers localisés et les CRPC, en terme de paysage mutationnel, réside dans les altérations génétiques du RA. Il a été mise en évidence que des mutations du RA, et plus particulièrement des mutations par amplification, ont été rapportées dans plus de 60% des CRPC (Grasso et al. 2012)(Robinson et al. 2015). Une première étude de séquençage de l'exome menée sur plus d'une cinquantaine de CRPC, avait montré un nombre très élevé de mutations par amplification du RA (Grasso et al. 2012). Par la suite, l'étude de Robinson et al, a révélé que 107 des 150 cas de cancers de la prostate métastatiques (71.3%) analysés par séquençage, présentaient des mutations du RA. Dû à son activité prédominante dans la tumorigénèse prostatique, le RA est la cible thérapeutique incontestable dans le cancer de la prostate. Néanmoins les mécanismes de résistance au traitement par castration chimique sont nombreux (Watson et al. 2015). C'est la raison pour laquelle, ces mutations du RA sont probablement une conséquence des mécanismes de résistances aux traitements, plus qu'un éventuel processus de mutation naturelle indispensable à la progression tumorale dans le cancer de la prostate.

I.D.5.e) Autres gènes fréquemment mutés

En dehors des larges altérations génomiques, tel que les fusions de gènes et les variations du nombre de copies géniques décrites précédemment, les cancers de la prostate présentent peu de mutations ponctuelles somatiques comparés à d'autres types de tumeurs épithéliales (Lawrence et al. 2013). Des études ont montré que le taux global de mutations dans les cancers de la prostate localisés est très faible, avec une moyenne de 0,94 mutations par mégabase (Abeshouse et al. 2015). Malgré ce faible taux de mutations, on retrouve quand même plusieurs gènes mutés de manière récurrentes. Une première étude dans laquelle une série de 112 cancers de la prostate localisés ont été séquencés, avait permis de mettre en évidence 12 gènes mutés de manière significative (Barbieri et al. 2012). Parmi eux, on retrouve de nouveaux gènes, tel que *SPOP*, *FOXA1*, *CDKN1B* et *MED12*. Les mutations sporadiques identifiées pour ces gènes étaient principalement des mutations faux sens (Abeshouse et al. 2015). En revanche, à la différence de gènes comme *PTEN* ou *TP53*, le taux de mutations de *FOXA1*, *SPOP* et *MED12* n'augmente pas de manière significative dans les cancers métastatiques par rapport aux tumeurs primaires, suggérant une implication plus importante dans les stades précoces (Abeshouse et al. 2015).

L'inactivation du rétinoblastome (*RB1*), un gène suppresseur de tumeur impliqué dans le cycle cellulaire, est fréquente dans les cancers de la prostate. Il est connu depuis longtemps que des délétions importantes conduisant à des pertes alléliques se produisent au niveau du locus codant pour le gène *RBI* (Bookstein et al. 1990)(Brooks et al., 1995). Plus récemment, les études de séquençage ont montré un taux élevé de mutations par perte du nombre de copies de *RB* dans les cancers métastatiques, de l'ordre de 21% (Robinson et al. 2015). En dehors de *RB*, d'autres mutations de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ont été détectées, à la fois dans les cancers localisés et métastatiques. Parmi ces gènes on retrouve plusieurs cyclines dépendantes des kinases, tel que *CDKN2A/B*, *CDKN1B*, *CDK12* et *CDK4*, mais aussi le gène *CCND1* codant pour la cyclin D1 (Grasso et al. 2012)(Robinson et al. 2015)(Abeshouse et al. 2015).

D'autres mutations moins fréquentes, mais néanmoins cliniquement utiles ont été détectées. Parmi elles, on retrouve des kinases impliquées dans la voie de signalisation MAPK tel que *BRAF*, *RAC1* et *HRAS* (Grasso et al. 2012)(Abeshouse et al. 2015). Des mutations ont également été décrites pour plusieurs gènes impliqués dans la machinerie de réparation de

l'ADN, tel que *ATM*, *FANCD2*, *RAD51*, *BRCA1* et *BRCA2* (Karanika et al., 2015)(Robinson et al. 2015). Et enfin, des mutations récurrentes par amplification de gènes ont également été identifiées pour plusieurs oncogènes, tel que *MYC* et *FGFR*.

I.D.6) Altérations épigénétiques dans les cancers de la prostate : un nouveau constat

Comme je l'ai décrit précédemment le cancer de la prostate est causé par différentes combinaisons d'altérations génétiques. Néanmoins, au-delà des mutations affectant la séquence des gènes, il n'est désormais plus à démontrer que les modifications épigénétiques jouent un rôle clef dans le cancer de la prostate. Ces anomalies épigénétiques associées au cancer de la prostate, incluent des changements dans l'expression génique, préférentiellement dû à des modifications post traductionnelles des marques d'histones, ou à la méthylation de l'ADN. Il est donc primordial de comprendre les modifications de l'épigénome dans le cancer de la prostate, afin de pouvoir au mieux dégager des applications thérapeutiques visant à inhiber ces mécanismes épigénétiques.

Ces modifications post traductionnelles des marques d'histones, soit par acétylation, méthylation, ubiquitinylation ou phosphorylation, vont entraîner un changement de conformation de la chromatine, en affectant le code des histones. Ces changements conformationnels, en fonction de la nature des marques d'histones, vont être associés à une augmentation ou à l'inverse à une diminution de l'expression des gènes cibles. Dans le contexte du cancer de la prostate, plusieurs enzymes impliqués dans la modification des marques d'histones sont connus pour être dérégulés. Parmi eux, on retrouve plusieurs protéines de la famille des histones déacétylases (HDACs), ainsi que la méthyle transférase EZH2. Plus récemment, le rôle des méthyles transférases appartenant au complexe protéique COMPASS, tel que MLL1, MLL2, MLL3 et MLL4, a émergé dans le cancer de la prostate.

I.D.6.a) EZH2 : un oncogène dans le cancer de la prostate

La protéine EZH2 est un membre du complexe répresseur polycomb (PRC2) qui catalyse la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). L'activité de EZH2 va

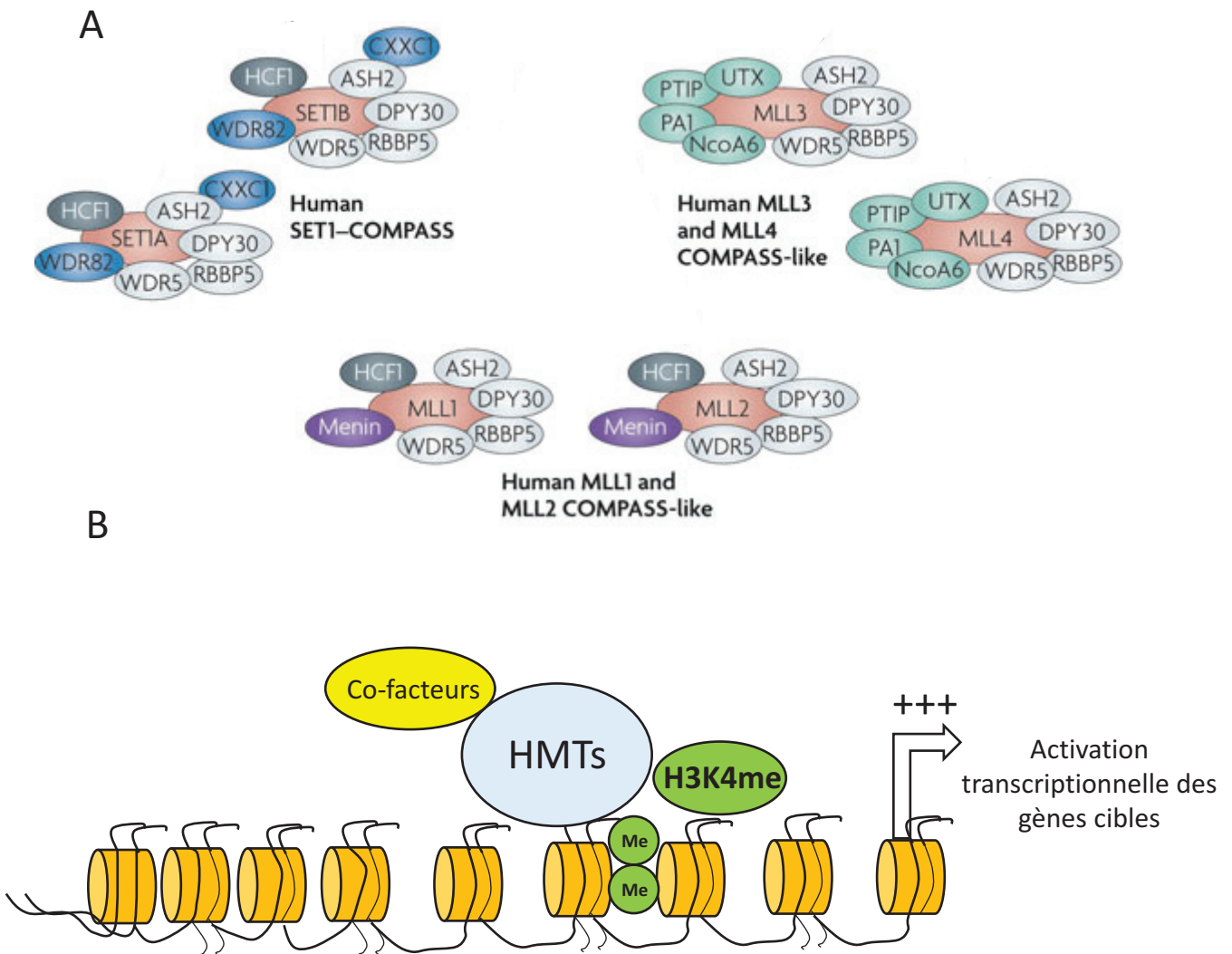


Figure 9 : Composition et activité du complexe MLL/COMPASS. (A) Représentation schématique des sous unités spécifiques (SET1A, SET1B, MLL1/2/3/4) et communes (ASH2L, DPY30, WDR5, RBBP5) des différents complexes COMPASS (Human SET1-COMPASS; Human MLL1/2 COMPASS-like; Human MLL3 et MLL4 COMPASS-like). (B) Les différentes HMTs (H3K4) de la famille COMPASS vont permettre la mono, di ou tri méthylation de la lysine 4 de l’histone H3, permettant une ouverture de la chromatine et une augmentation de l’activité transcriptionnelle. *Modifié d’après Mohan et al; 2015*

donc réprimer l'expression de ses gènes cibles. Depuis plus d'une dizaine d'année, EZH2 est considéré comme un solide biomarqueur des cancers de la prostate métastatique, et par conséquent une cible thérapeutique intéressante. En 2002, des analyses immunohistochimiques couplées à des analyses transcriptomiques, menées sur des cancers de la prostate humains, ont pu montrer pour la première fois une surexpression de EZH2 dans les cancers métastatiques (Zhou et al. 2002). Cette étude a montré que le gène *EZH2* est un des gènes les plus significativement surexprimés dans les cancers de la prostate métastatiques, par rapport aux cancers localisés. Depuis, les évidences montrant le rôle oncogénique de EZH2 dans les cancers de la prostate n'ont cessé de croître. De nombreux efforts ont été fournis afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de EZH2 dans les cancers de la prostate.

I.D.6.b) Le complexe COMPASS : un rôle émergent dans le cancer de la prostate

Ce complexe « COMPASS » exerce une activité histone-méthyle transférase (HMT) qui permet de catalyser la mono, di ou tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) (Shilatifard 2012). Ces modifications des marques d'histones sont associées à une ouverture de la chromatine et une augmentation de l'activité transcriptionnelle des gènes cibles. Ce complexe COMPASS est très conservé de la levure à l'homme. Il existe chez l'homme différents complexes COMPASS, qui sont les complexes « Human SET1/COMPASS », « Human MLL1/2 COMPASS-like », « Human MLL3/4 COMPASS-like ». Chacun de ces complexes contient des co-facteurs en commun, tel que les protéines ASH2L, WDR5, RBBP5, DPY30. Parmi les composants spécifiques à chacun de ces complexes, on retrouve les protéines Set1A, Set1B, MLL1 (*KMT2A*), MLL2 (*KMT2B*), MLL3 (*KMT2C*), MLL4 (*KMT2D*), qui sont capable de catalyser l'activité histone-méthyl transférase sur les marques H3K4 (Eissenberg & Shilatifard 2010). Ces différents gènes *KMTs* codants pour les protéines MLL, subissent fréquemment des réarrangements chromosomiques dans les cellules leucémiques conduisant à l'expression de protéines de fusions oncogéniques (Mohan et al., 2010). Dans le cancer de la prostate, la mise en évidence de mutations affectant les différents gènes *KMTs* a émergé avec les analyses de séquençage de l'exome (Figure 9).

Grasso et al, ont d'abord mis en évidence des mutations dans les gènes codants pour les différents membres du complexe COMPASS dans plusieurs CRPC (Grasso et al. 2012). Par la suite d'autres études cliniques ont montré que les différents gènes *KMTs*, et plus particulièrement *KMT2C/D* étaient mutés dans les tumeurs primaires et les cancers de la

prostate métastatiques (Abeshouse et al. 2015) (Robinson et al. 2015). Différents types de mutations tel que des gains et des pertes du nombre de copie, ainsi que des mutations ponctuelles ont été trouvées dans les gènes codants pour MLL1, MLL2, ASH2L, et WDR5. Du point de vue fonctionnel, il semblerait que ce complexe MLL/COMPASS interagisse avec le RA, et joue un rôle dans la régulation positive des gènes cibles du RA (Grasso et al. 2012). Néanmoins la diversité des mutations qui affectent les différents membres de ce complexe ne permet pas d'affirmer que ces mutations, puissent être qualifiées d'activatrices ou de délétères pour l'activité du complexe. Des études ultérieures apporteront probablement des indices nécessaires à une meilleure compréhension du rôle de ce complexe dans le cancer de la prostate.

I.D.7) Les modèles murins d'étude du cancer de la prostate

De nombreuses études utilisant des lignées cellulaires immortalisées à partir de cancers de la prostate humains, ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement du cancer de la prostate. Néanmoins, la plupart de ces lignées sont issues de cancers de la prostate métastatiques. C'est la raison pour laquelle ces modèles cellulaires présentent certaines limites. Ils ne permettent pas de récapituler les différentes étapes de l'initiation à la progression tumorale, observées dans les cancers de la prostate humain. De plus, l'utilisation des lignées cellulaires en culture ne permet pas de reproduire l'interaction fonctionnelle entre les cellules cancéreuses prostatiques et les différents compartiments cellulaires de l'environnement tumoral, comme les cellules basales et épithéliales neuroendocrines, mais aussi les cellules du stroma. Les mêmes problèmes se posent pour les modèles de xénogreffes (PDX : patients derived xenograft) utilisant des lignées cancéreuses humaines. De plus, l'absence de système immunitaire chez la souris hôte constitue une limite importante de ces modèles.

Les contraintes générées par ces différents modèles d'études et la nécessité d'avoir des preuves génétiques, ont donc conduit à l'élaboration de modèles de souris transgéniques, visant à étudier les mécanismes de la cancérogénèse prostatique. Ces modèles murins transgéniques sont regroupés sous le terme GEM PCa. Les premières générations de GEM PCa, tels que les modèles TRAMP ou LADY, utilisaient principalement le promoteur de la probasine dans le but de surexprimer classiquement l'antigène T du SV40 (simian virus 40).

Par la suite, l'identification des altérations génétiques à l'origine du cancer de la prostate chez l'homme, a conduit au développement de modèle d'inactivation conditionnelle de gènes, dans les différents contingents cellulaires de la prostate, en utilisant le système CRE-Lox. L'élaboration de ces modèles d'inactivation conditionnelle a permis une meilleure compréhension des mécanismes de l'initiation et de la progression tumorale dans les cancers de la prostate. Le but était de reproduire le plus fidèlement possible ce qu'il se produit chez l'Homme. Le tableau 1 présente en détails les caractéristiques génétiques et histologiques de chacun des modèles murins cités par la suite.

I.D.7.a) La première génération : les modèles murins du cancer de la prostate surexprimant l'antigène T du SV40

I.D.7.a.1) Le modèle TRAMP

Un des premiers GEM du cancer de la prostate est le modèle TRAMP (TRansgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate). Dans ce modèle transgénique, l'antigène T du SV40 est fusionné au promoteur minimal de la probasine du rat (rPB). Ce promoteur rPB, dont l'activité est contrôlée par la signalisation androgénique, va permettre une expression importante de l'antigène grand T SV40 (Tag) et de l'antigène petit t (tag), dans les lobes ventraux et dorsaux de la prostate (Greenberg et al. 1994)(Greenberg et al. 1995). Cette surexpression de l'oncogène SV40 conduit à l'inactivation de deux suppresseurs de tumeurs, pRb et p53, spécifiquement dans les épithéliales prostatiques (Gingrich et al. 1996). Ce modèle TRAMP est caractérisé par une progression tumorale très rapide. En effet, après seulement 4 mois, toutes les souris TRAMP développent des HGPIN, qui évoluent très rapidement en adénocarcinomes invasifs peu différenciés à l'âge de 6 mois, avec une pénétrance de 100% (Greenberg et al. 1995). De plus, ces souris développent également des métastases au niveau des ganglions lymphatiques et des poumons, plus rarement au niveau osseux (Gingrich et al. 1996). Néanmoins ce modèle murin TRAMP présente une sensibilité très variable aux androgènes au travers des différentes études. Il a été montré que les souris TRAMP castrées développent des tumeurs peu différenciées et plus de métastases, en comparaison des souris transgéniques non castrées au même âge (Gingrich et al. 1997). Ces tumeurs indépendantes des androgènes sont désormais reconnues comme des carcinomes neuroendocrines, car celles-ci expriment des marqueurs neuroendocrines spécifiques, tel que la synaptophysine ou la chromogranine A (Kaplan-Lefko et al. 2003).

Modèles	Cre Recombinase	Effet	Pénétrance/Atteintes histologiques	Modèles de :	Références
TRAMP	rPB : promoteur minimal de la probasine du rat	Surexpression précoce de l'antigène grand T et petit t de l'oncogène SV40	18-24 semaines : PIN 28 semaines : adénocarcinomes qui différencient vers un phénotype Neuroendocrines (NE) (pénétrance 100%) Métastases gg lymphatiques (100%), poumons (60%)	Cancer de la prostate métastatique Tumeurs NE	Greenberg et al, 1995 Gingrich et al, 1997
LADY	LPB : promoteur large de la probasine du rat	Surexpression importante de l'antigène grand T de l'oncogène SV40	33 semaines : carcinomes (100%) Evolution vers phénotype NE Métastases (90%)	Cancer de la prostate métastatique Tumeurs NE	Yan et al, 1997 Masumori et al, 2001
Nkx3.1 +/-		Délétions germinales du gène <i>Nkx3.1</i> à l'état hétérozygote	> 1 an : PIN (25%)	Initiation tumorale	Kim et al, 2002 Tanaka et al, 2000
Nkx3.1 -/-		Délétions germinales du gène <i>Nkx3.1</i> à l'état homozygote	> 1 an : PIN (60%)	Initiation tumorale	Kim et al, 2002
PSA- Cre⁺ ; Nkx3.1^{flax/flax}	PSA Cre ⁺ : expression spécifique de la Cre dans les cellules épithéliales de la glande prostatique après la période de la puberté.	Inactivation conditionnelle du gène <i>Nkx3.1</i> à l'âge adulte	20-25 semaines : PIN	Initiation tumorale Lésions histologiques similaires l'homme	Abdulkadir et al, 2002
Pten +/-		Délétions germinales du gène <i>Pten</i> à l'état hétérozygote	6-22 semaines : PIN (40%) 40-65 semaines : PIN, Adénocarcinoma 7%	Initiation et progression tumorale du cancer de la prostate	Podsypanina et al; 1999 Stambolic et al; 2000
PB Cre4 Pten^{flax/flax}	PB Cre4 : Cre recombinase sous le contrôle de ARR ₂ PB (promoteur de la probasine sous le contrôle de la signalisation androgénique)	Inactivation conditionnelle du gène <i>Pten</i> dans les cellules épithéliales de la glande prostatique à l'âge adulte (post-puberté)	9 semaines : HGPIN 17-26 semaines : Carcinomes (100%)	Initiation et progression tumorale du cancer de la prostate	Trotman et al, 2003

Modèles	Cre Recombinase	Effet	Pénétrance/Atteintes histologiques	Modèles de :	Références
PB Cre4 <i>Pten</i> ^{flox/flox} ; <i>p53</i> ^{flox/flox}	PB Cre4 : Cre recombinase sous le contrôle de ARR ₂ PB (promoteur de la probasine sous le contrôle de la signalisation androgénique)	Inactivation conditionnelle des gènes <i>Pten</i> et <i>TP53</i> dans les cellules épithéliales de la glande prostatique à l'âge adulte (post-puberté)	11 semaines : Adénocarcinomes (100%)	Initiation et progression tumorale du cancer de la prostate	Wang et al, 2003
Pten ^{+/-} ; Nkx3.1 ^{-/-}		Délétions germinales du gène <i>Pten</i> (hétérozygote) et du gène <i>Nkx3.1</i> (homozygote)	Jusqu'à 52 semaines : HGPIN (100%) > 52 semaines : Adénocarcinomes (85%), métastases gg lymphatiques (25%)	Progression tumorale et stade métastatique du cancer de la prostate	Kim et al; 2002 Abate-shen et al., 2003
Nkx3.1Cre^{ERT2} <i>Pten</i> ^{flox/flox}	Nkx3.1 Cre^{ERT2} : Cre recombinase spécifique des cellules lumbinales et inductible au tamoxifène	Inactivation conditionnelle du gène <i>Pten</i>	39-52 semaines : HGPIN >69 semaines : Adénocarcinome microinvasif (100%) Adénocarcinomes peu différenciés Tumeurs résistante à la castration chimique	Initiation et progression tumorale Etude de la résistance à l'hormonothérapie	Floc'h et al, 2012
Hi-Myc	ARR₂PB : promoteur de la probasine sous le contrôle des androgènes permettant une expression élevée du transgène	Surexpression de l'oncogène c-Myc	> 13 semaines : PIN > 20 semaines : Adénocarcinomes (80%) > 26 semaines : Adénocarcinomes (100%)	Initiation et progression tumorale du cancer de la prostate	Ellwood-Yen et al., 2003)
Pb-mAR	rPB : promoteur minimal de la probasine du rat	Surexpression du récepteur aux androgènes	> 1 an : PIN	Initiation tumorale	Stanbrough et al; 2001
Osr1 Cre- R26hAR ^{loxP/wt}	Osr1 Cre : surexpression du transgène dans les cellules lumbinales et basales	Surexpression d'un transgène humain du récepteur aux androgènes	> 1 an : PIN (50%)	Initiation tumorale	Zhu et al; 2011

Tableau 1 : Tableau récapitulatif montrant les différents GEM Pca. Les différents systèmes de Cre Recombinase, ainsi que les atteintes histologiques observées pour chacun des modèles murins sont répertoriés dans le tableau ci-dessus.

Même si l'utilisation de l'oncogène non humain SV40 est une limite critiquable du modèle TRAMP. Il reste néanmoins un modèle d'étude du cancer de la prostate important de nos jours, pour deux raisons majeures. La première raison est associée au phénotype neuroendocrine des lésions prostatiques observées dans ce modèle. Les tumeurs neuroendocrines de la prostate sont rares, mais cliniquement importantes chez l'homme du fait de leur caractère agressif (Hansson & Abrahamsson 2003). La deuxième raison réside dans le fait que les gènes *TP53* et *RBI* sont inactivés dans ce modèle. Or ces deux gènes sont mutés de manière récurrente dans les cancers humains, suggérant que le phénotype tumorale observé dans les souris TRAMP reflète les conséquences de l'inactivation de p53 et RB dans les cancers de la prostate humain.

I.D.7.a.2) Le modèle LADY

Le modèle LADY, dans lequel l'oncogène Tag du SV40 est fusionné là encore au promoteur rPB, est très similaire au modèle TRAMP. Du point de vue purement génétique, la différence par rapport au modèle TRAMP concerne la construction du promoteur rPB. Dans ce modèle LADY, un large fragment du rPB est utilisé, rebaptisé LPB, qui va permettre d'exprimer uniquement l'antigène grand T et non pas l'antigène petit t (Yan et al. 1997). Beaucoup de lignées de souris LADY, présentant une expression variable du Tag, ont été générées. Tout comme dans le modèle TRAMP, toutes les différentes lignées murines présentent généralement des phénotypes tumoraux agressifs, qui peuvent dériver pour certains vers des carcinomes neuroendocrines (Masumori et al. 2001).

Les modèles murins du cancer de la prostate surexprimant le Tag produisent majoritairement des cancers neuroendocrines et des sous types de carcinomes, qualifiés de rares dans la population humaine. Ces premières études ont laissé constater que l'utilisation de l'oncogène SV40, ne permettait pas de reproduire clairement la carcinogénèse prostatique observée chez l'homme. Il y avait donc une réelle nécessité d'améliorer ces modèles d'études *in vivo*. C'est pourquoi, par la suite, l'utilisation de « Cre recombinase » sous le contrôle de promoteurs spécifiques de la prostate, a permis d'invalider chez la souris des gènes connus pour être altérés chez l'homme. Le but de cette approche était de développer des modèles murins plus pertinents, afin de mimer au mieux la pathologie humaine.

I.D.7.b) La seconde génération : modèles murins basés sur les altérations génétiques humaines

Par invalidation totale ou conditionnelle, plusieurs gènes mutés chez l'homme ont été ciblés chez la souris par ingénierie génétique. Parmi eux on retrouve les suppresseurs de tumeurs *Nkx3.1*, *Pten* ou encore *p53*. Plusieurs modèles surexprimant des oncogènes du cancer de la prostate, tel que *Myc* ou *RAS* ont également été générés.

I.D.7.b.1) Les modèles d'invalidation du gène suppresseur de tumeur *Nkx3.1*

Le gène *Nkx3.1* est exprimé spécifiquement dans les cellules épithéliales de la glande prostatique, durant le développement et à l'âge adulte, chez la souris comme chez l'homme (Sciavolino et al. 1997)(Bhatia-Gaur et al. 1999). La protéine *Nkx3.1* est un régulateur important du développement de la glande prostatique, dont la perte de fonction est impliquée dans l'initiation tumorale du cancer de la prostate (Abate-Shen et al. 2008). En effet comme il a déjà été mentionné, des LOH au niveau de la région chromosomique contenant le gène *Nkx3.1* sont fréquentes chez l'homme (Asatiani et al. 2005). L'invalidation du gène *Nkx3.1* chez la souris semblait donc pertinente, dans le but de générer un modèle murin d'initiation et de progression tumorale cohérent par rapport à la pathologie humaine.

Chez la souris, la perte du gène *Nkx3.1* seule ne suffit pas à induire de vraies lésions cancéreuses de la prostate. Les premiers modèles de souris mutantes homozygotes et hétérozygotes pour *Nkx3.1* (*Nkx3.1^{-/-}* et *Nkx3.1^{+/-}*), développaient seulement des lésions bénignes, de type hyperplasique et dysplasique à des âges jeunes, qui évoluaient vers des lésions PIN chez les souris âgées de plus de 1 an (Tanaka et al. 2000)(Kim et al., 2002). De plus aucune souris *Nkx3.1* n'a réellement développé un cancer de la prostate caractérisé par l'apparition de lésions cancéreuses, de type carcinome invasif. Par la suite, l'invalidation conditionnelle de *Nkx3.1* à l'âge adulte a permis de déterminer que la perte de fonction de *Nkx3.1* à l'origine de l'initiation tumorale du cancer de la prostate, semblait indépendante de son rôle dans la morphogénèse prostatique. En effet, l'utilisation d'une Cre Recombinase, sous le contrôle du promoteur de la PSA, a permis l'invalidation du gène *Nkx3.1* spécifiquement dans les cellules luminales prostatiques à l'âge adulte. Cette invalidation conditionnelle de *Nkx3.1* dans ce modèle *PSA-Cre⁺ Nkx3.1^{lox/lox}* conduit également et

uniquement au développement de lésions PIN semblables histologiquement à celles observées chez l'Homme (Abdulkadir et al. 2002). Malgré ces phénotypes modérés, ces différents modèles murins soulignent l'importance de la perte fonctionnelle de *Nkx3.1* dans les stades précoces de la tumorigénèse prostatique.

I.D.7.b.2) Les modèles d'inactivation du gène suppresseur de tumeur *Pten*

Les souris knock-out homozygotes pour le gène *Pten* ($Pten^{-/-}$) meurent très prématurément durant le développement embryonnaire entre E3.5 et E9.5 (Cristofano et al., 1998)(Suzuki et al. 1998). Même si l'inactivation homozygote de *Pten* est létale, les conséquences de la perte de fonction de ce gène dans la prostate ont pu être étudiées, grâce au modèle murin hétérozygote $Pten^{+/-}$. Il a été montré que ces souris hétérozygotes $Pten^{+/-}$ développaient un large spectre de tumeurs dans différents organes, y compris dans la prostate (Podsypanina et al. 1999). En effet, Cristofano et al, ont décrit les premiers que les souris $Pten^{+/-}$ développaient des hyperplasies au niveau de la glande prostatique ainsi que des PIN, qui ne progressaient pas vers un cancer de la prostate (Cristofano et al. 1998). Ultérieurement, d'autres études ont décrits que les souris $Pten^{+/-}$ âgées pouvaient dans de rares cas développer des lésions plus agressives, de type adénocarcinome (Podsypanina et al. 1999)(Stambolic et al. 2000).

Dans ce modèle de délétion germinale de *Pten* à l'état hétérozygote, de nombreuses atteintes cancéreuses dans d'autres organes (sein, cerveau, intestin,...) émergent beaucoup plus tôt que les lésions prostatiques, limitant ainsi l'étude du cancer de la prostate (Cristofano et al. 1998)(Podsypanina et al. 1999). Pour pallier à ce problème, plusieurs modèles utilisant différents systèmes de Cre recombinase, ont permis l'inactivation du gène *Pten* dans les cellules de la glande prostatique à l'âge adulte. (Trotman et al. 2003)(Wang et al. 2003)(Backman et al. 2004). La plupart de ces études ont rapporté des données similaires, montrant que l'inactivation conditionnelle de *Pten* conduit au développement de HGPIN, qui pour certaines d'entre elles vont évoluer vers des lésions de type carcinome. En revanche, le développement de métastases au niveau des poumons et des ganglions lymphatiques, consécutives à l'inactivation conditionnelle de *Pten*, n'a été rapporté que par une seule étude (Wang et al., 2003).

Ces modèles d'inactivation conditionnelle de *Pten* ont été largement utilisés en combinaison avec d'autres mutations génétiques observées chez l'homme.

I.D.7.b.3) Les modèles d'inactivation combinée des gènes suppresseurs de tumeurs *Nkx3.1* et *Pten*

Il a été montré que la perte de fonction de *Nkx3.1* combinée à celle de *Pten* dans le modèle murin *Nkx3.1*^{-/-} *Pten*^{+/-}, aggravent le phénotype observé dans le modèle *Nkx3.1*^{-/-}, lié à la présence de lésions HGPIN à seulement 6 mois (Kim et al., 2002). La caractérisation phénotypique des doubles mutants *Nkx3.1*^{-/-} *Pten*^{+/-} a montré que les lésions HGPIN progressaient vers des lésions de type adénocarcinome invasif pour 84% des souris analysées (Abate-shen et al. 2003). Ces données suggèrent donc une interaction fonctionnelle forte entre ces deux gènes suppresseurs de tumeurs. De plus, la progression tumorale de ce modèle double mutant partage de fortes similarités avec ce qui est observé chez l'homme, notamment en terme d'expression génique. L'ensemble de ces données indique que le modèle *Nkx3.1*^{-/-} *Pten*^{+/-} semble être pertinent, pour étudier les mécanismes moléculaires du cancer de la prostate (Ouyang et al. 2008).

Dans la glande prostatique, l'expression de la protéine Nkx3.1 est presque exclusivement restreinte aux cellules épithéliales luminales, même si une expression résiduelle a été mise en évidence dans quelques cellules épithéliales basales (Bhatia-Gaur et al. 1999)(Chen et al., 2005). Cette expression réduite aux cellules luminales a récemment conduit à l'élaboration d'une Cre recombinase spécifique, utilisant le promoteur de *Nkx3.1*. Il s'agit là du modèle *Nkx3.1* Cre^{ERT2}, dans lequel la Cre recombinase inducible au tamoxifène, est placée sous le contrôle du promoteur endogène de *Nkx3.1*, et remplace le gène *Nkx3.1*. Plusieurs études ont déjà utilisé cette Cre inducible. Le modèle *Nkx3.1* Cre^{ERT2}; *Pten*^{flox/flox} permet de combiner la perte de *Nkx3.1*, et l'inactivation de *Pten* à l'âge adulte suite à l'induction de la Cre (Wang et al., 2009)(Floc'h et al. 2012). Cette approche permet de se rapprocher des événements génétiques opérant chez l'homme durant la progression du cancer de la prostate. De manière intéressante, il a été montré que ce modèle *Nkx3.1* Cre^{ERT2} *Pten*^{flox/flox} développent des tumeurs de la prostate résistante à la castration (Floc'h et al. 2012). C'est pourquoi ce modèle semble plus qu'intéressant pour étudier les mécanismes à l'origine de la résistance à la castration chimique, observés chez l'homme.

I.D.7.b.4) Les modèles murins transgéniques de surexpression de l'oncogène Myc

C-Myc est un oncogène fréquemment surexprimé tant au niveau transcriptionnel que protéique dans les cancers de la prostate humains. Il a été montré que le niveau d'expression de c-myc augmente proportionnellement aux grades du cancer de la prostate (Gurel et al. 2008). Ces données suggèrent un rôle important de cet oncogène dans le processus d'initiation tumoral d'une part, et de progression tumoral d'autre part, chez l'homme. Plusieurs études ont cherché à évaluer les conséquences de la surexpression de c-Myc dans la glande prostatique, chez la souris. Deux modèles principaux de surexpression de c-Myc ont été développés. Dans le premier modèle l'oncogène Myc est sous le contrôle du promoteur court de la PB induisant ainsi une faible expression de Myc. Dans le second modèle, l'expression de Myc est sous le contrôle du promoteur de la PB, couplé à deux éléments de réponse aux androgènes (ARR₂PB), qui permettent d'induire une expression forte de Myc dans les cellules épithéliales prostatiques (Ellwood-Yen et al. 2003). Ces deux modèles ont respectivement été baptisés Lo-Myc et Hi-Myc. Ces deux modèles murins développent des lésions PIN avec une pénétrance complète qui évoluent vers des lésions cancéreuses de type adénocarcinome. En accord avec le niveau d'expression de c-Myc, il a été montré que la progression tumorale est plus rapide dans le modèle Hi-Myc, par rapport au modèle Lo-Myc. Néanmoins aucune de ces souris ne développent de métastases. De plus, il a été montré que la surexpression de c-Myc entraîne une diminution d'expression du suppresseur de tumeur de Nkx3.1, comme ce qui a pu être observé dans certaines lésions PIN développées chez l'homme (Iwata et al. 2010).

Ellwood et al ont également montré que les lésions PIN et les adénocarcinomes développés dans le modèle Hi-Myc régressent après castration chimique des animaux, et ne deviennent jamais résistantes à la castration (Ellwood-Yen et al. 2003). L'utilisation d'un promoteur régulé par les androgènes (ARR₂PB) dans ce modèle Hi-Myc pourrait expliquer en partie cette réponse thérapeutique efficace. Malgré tout, le phénotype observé dans les modèles Lo et Hi-Myc corrèle avec les amplifications fréquentes de Myc dans les cancers humains, appuyant l'intérêt de ce modèle pour l'étude de la tumorigénèse prostatique.

I.D.7.b.5) Les modèles murins d'invalidation et de surexpression du récepteur aux androgènes (RA)

Le rôle du RA dans le cancer de la prostate est complexe. Même si le RA est la cible thérapeutique majeure dans les cancers de la prostate humains, il est fréquent d'observer une résistance aux traitements anti-androgéniques (Vis & Schröder 2009). Les tumeurs deviennent dans ce cas indépendantes de la signalisation androgénique, comme dans le cas des tumeurs neuroendocrines qui présentent un mauvais pronostic clinique. C'est pourquoi afin de mieux comprendre l'implication du RA dans la tumorigénèse prostatique, ainsi que les mécanismes de résistances aux traitements, plusieurs modèles murins de surexpression du RA ont été générés.

Plusieurs GEM, utilisant différentes Cre recombinase, ont permis la surexpression du RA chez la souris. Dans le premier modèle développé, la surexpression du RA sous le contrôle du promoteur Pb, induit le développement de PIN dans les souris âgées de plus de 1 an (Stanbrough et al., 2001). Il a également été montré que la surexpression d'un transgène humain du RA sous le contrôle du promoteur *Osr1* chez la souris, conduisait au développement tardif de PIN dans 50% des animaux, qui évoluaient dans de rares cas en adénocarcinome (Zhu et al. 2011). Ces premières données suggéraient que l'augmentation d'expression du RA seule, ne suffit pas à induire un cancer de la prostate chez la souris. Néanmoins, l'utilisation de promoteurs spécifiques conduisant à une expression stable et constitutive du RA chez les souris castrées, suggèrent un intérêt de ces modèles dans l'étude des CRPC. Car en effet dans les CRPC, malgré la castration, la voie du RA reste constitutivement activée via différentes voies de signalisation impliquées dans la résistance aux traitements (Watson et al. 2015).

A l'inverse d'autres études ont cherché à déterminer les conséquences d'une perte de fonction du RA chez la souris. Plusieurs modèles d'invalidation conditionnelle du RA, dans les différents compartiments cellulaires de la prostate ont été générés. Il a été montré que la délétion conditionnelle du RA dans les cellules épithéliales de la glande prostatique induit une dédifférenciation partielle et une hyper-prolifération des cellules de l'épithélium prostatique (Wu et al. 2007)(Y Niu et al. 2008). Malgré cette augmentation de la prolifération aucune lésion PIN n'a été observée dans ce modèle d'invalidation conditionnelle du RA. L'invalidation du RA dans les cellules épithéliales de la glande prostatique, semble donc

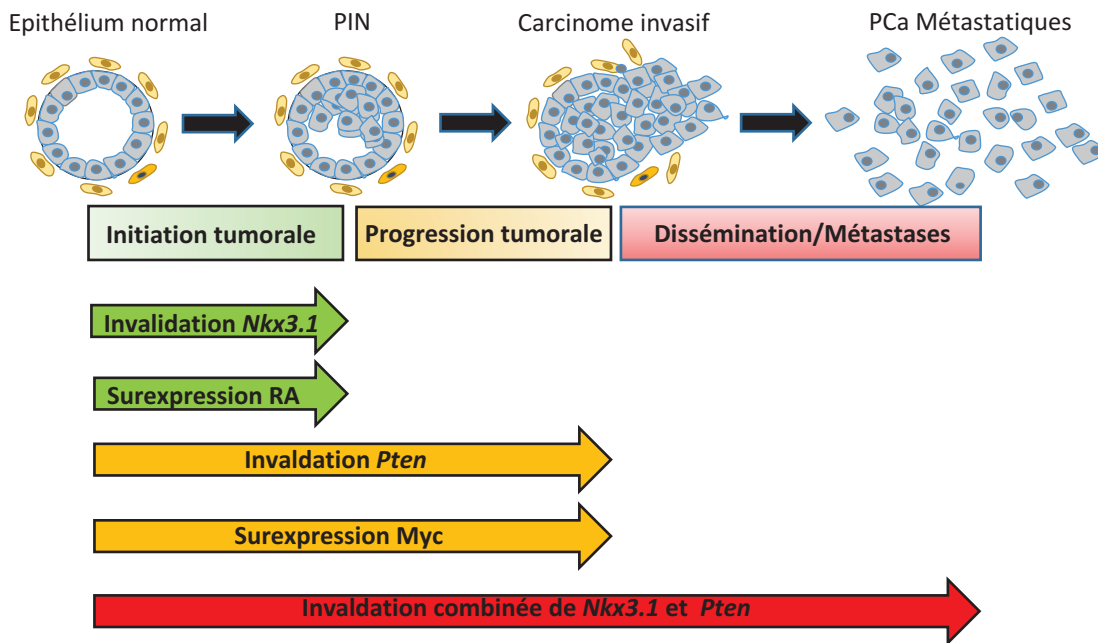


Figure 10 : Représentation schématique des mécanismes conduisant de l'initiation à la progression tumorale dans les GEM Pca. L'invalidation des gènes suppresseurs de tumeurs et/ou l'activation d'oncogènes, seuls ou en combinaison permet de mimer les différents stades de la tumorigénèse observés dans les cancers de la prostate humains.

jouer un rôle complexe dans la balance entre prolifération et différenciation cellulaire. En revanche, les conséquences de la perte fonctionnelle du RA dans le compartiment stromal affecte plus clairement la tumorigénèse prostatique. Niu et al, ont montré que la perte d'expression du RA dans les cellules stromales et épithéliales, au sein du modèle pes-ARKO TRAMP, conduit au développement de tumeurs peu différenciées avec un index de prolifération élevé à des stades précoces (Niu et al., 2008).

L'ensemble de ces modèles murins présentant des altérations d'expression du RA montre la complexité du rôle de celui-ci dans la carcinogénèse prostatique, et souligne sa double importance dans les compartiments des cellules stromales et luminales.

Les modèles GEM-PCa générés durant ces 20 dernières années, ont montré l'intérêt de cibler chez la souris des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs, fréquemment altérés chez l'homme (Figure 10). Il en ressort des modèles d'études cliniques et diagnostiques intéressants, qui pour certains reproduisent en partie la pathologie humaine. De plus la résistance à la castration chimique observée dans plusieurs modèles, fait de ces derniers des outils intéressants pour étudier les mécanismes de résistance à l'hormonothérapie retrouvés chez l'Homme.

I.D.h) Traitement du cancer de la prostate

I.D.h.1) Hormonothérapie : ciblage thérapeutique du récepteur aux androgènes

Les androgènes et le RA sont nécessaires au développement et au maintien de l'homéostasie tissulaire de la glande prostatique. Néanmoins, un des événements précoces se produisant dans les cancers de la prostate, est une dérégulation de cette homéostasie tissulaire dépendante des androgènes. Cette dernière va conduire à une prolifération accrue des cellules de la glande prostatique. C'est pourquoi le cancer de la prostate est souvent décrit comme androgéno-dépendant, faisant du RA une cible thérapeutique préférentielle dans le cancer de la prostate.

Lorsque le cancer de la prostate est encore localisé, le traitement consiste majoritairement en une intervention chirurgicale (prostatectomie), ou une intervention de radiothérapie locale afin d'éradiquer la tumeur primaire (Lepor & Lepor 2005)(Incrocci

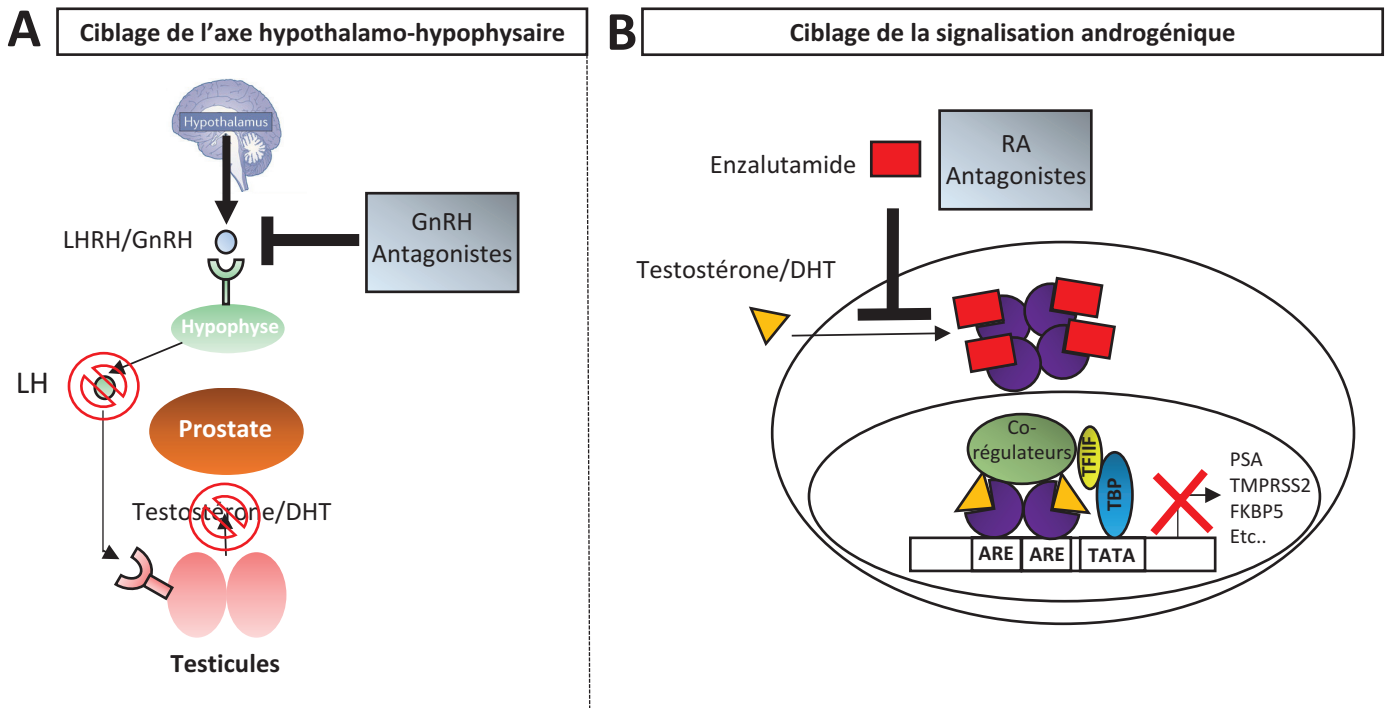


Figure 11 : Mode d'action des antagonistes de la LHRH et du RA . L'utilisation chronique des antagonistes de la LHRH vont permettre de bloquer le récepteur à la LHRH au niveau de l'hypophyse. Cette inhibition du récepteur à la LHRH supprime la production de la LH par les cellules hypophysaires, causant au niveau testiculaire une chute de la production et la sécrétion de testostérone (A). Les antagonistes du RA, tel que l'enzalutamide, entre en compétition avec la DHT pour la liaison aux RA. L'interaction entre ces molécules inhibitrices et le RA bloquent la translocation nucléaire et l'association avec les co-facteurs du RA.

Nom générique	Nom déposé	Approuvé par la FDA en :	Classe de médicaments
Leuprolide®	Lupron Depot® Eligard	1989 2002	Antagoniste LHRH
Triptorelin®	Trelstar®	2000	Antagoniste LHRH
Histrelin®	Vantas®	2004	Antagoniste LHRH
Flutamide®		1989	Antagoniste du RA
Bicalutamide®	Casodex®	1995	Antagoniste du RA
Nilutamide®	Nilandron®	1996	Antagoniste du RA
Enzalutamide®	Xtandi®	2012	Antagoniste du RA

Figure 12 : Agents pharmaceutiques ciblant la signalisation androgénique dans les cancers de la prostate.

2015). En revanche, suite à une rechute ou lorsque le cancer est diagnostiqué tardivement, le traitement s'oriente alors sur l'hormonothérapie qui vise à bloquer la signalisation androgénique. L'hormonothérapie peut être appliquée chez les patients selon différentes méthodes (Figure 11) :

- Castration chirurgicale ou pulpectomie : de part un acte chirurgicale, la pulpectomie consiste à enlever la pulpe des testicules, qui va avoir pour conséquence d'abaisser le niveau de production de testostérone. Ce type de castration est néanmoins rare.
- Castration chimique utilisant des antagonistes de l'hormone LHRH : les antagonistes de la LHRH vont stopper l'action des gonadotropines au niveau de l'hypophyse, et donc bloquer la production des androgènes par les testicules. Ces antagonistes de la LHRH qui agissent en amont de l'axe hypothalamo-hypophysaire, présentent une grande efficacité pour diminuer la sécrétion des androgènes circulants (Huhtaniemi et al., 2009). Un grand nombre de ces antagonistes sont approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) dans le traitement du cancer de la prostate (Figure 12).
- Castration chimique utilisant des antagonistes du RA : ces inhibiteurs compétitifs du RA ont pour but de bloquer directement l'action des androgènes au niveau des cellules cancéreuses. Plusieurs inhibiteurs du RA, tel que le Bicalutamide®, le Nilutamide® ou encore l'Enzalutamide® sont approuvés par la FDA et utilisés en hormonothérapie depuis plusieurs années (Watson et al. 2015) (Figure 12).

Malgré ce large éventail de traitement visant à bloquer la signalisation androgénique, il est plus que fréquent d'observer chez les patients une résistance aux traitements anti-androgéniques. Bien que les patients répondent correctement à l'hormonothérapie pour une durée qui varie de quelques mois à quelques années, il s'en suit dans de nombreux cas, une progression uniforme de la maladie vers un stade létal du cancer de la prostate, nommée CRPC (Watson et al. 2015). Ces CRPC sont aussi souvent qualifiés de « cancer de la prostate androgéno-indépendant » ou « réfractaire aux hormones ». Cependant, il est de plus en plus clair que les androgènes et le RA vont continuer à jouer un rôle dans la progression de ces CRPC (Mostaghel & Plymate 2011). Malgré un faible niveau d'androgènes circulants suite à la castration, la signalisation androgénique persiste dans les CRPC (Robinson et al. 2015). Actuellement, une des questions majeures dans le traitement du cancer de la prostate, est de mieux comprendre quels sont les mécanismes qui conduisent au maintien de l'action des androgènes dans les CRPC. Plusieurs études ont pointé du doigt les mécanismes qui

pourraient être à l'origine de cet échec de l'hormonothérapie dans le traitement du cancer de la prostate.

I.D.h.2) Mécanismes de résistance à l'hormonothérapie

Comme nous avons pu le voir précédemment, le gène codant pour le RA est amplifié ou muté dans plus de 50% des CRPC, alors qu'il n'est pas altéré dans les tumeurs primaires (Taylor et al., 2010)(Grasso et al. 2012). Il a déjà été montré que ces amplifications du gène codant pour le RA étaient à l'origine d'une augmentation du niveau d'ARNm du RA dans 1/3 des CRPC (Visakorpi et al. 1995). Des données obtenues *in vitro* ont également mis en évidence que le niveau d'ARNm du RA était rapidement augmenté dans une lignée cellulaire du cancer de la prostate (VCaP), en réponse à une privation en androgènes (Cai et al., 2009). Malgré tout, les mécanismes qui régulent l'expression du récepteur aux androgènes lui-même, ne sont pas encore bien compris. Quelques études anciennes ont mis en évidence que les androgènes étaient capable de réguler négativement l'expression du RA, suggérant que l'augmentation d'expression du RA dans les CRPC était le résultat d'une levée de l'inhibition sur sa propre expression (Krongrad et al., 1991)(Blok et al. 1992). Plus récemment, Cai et al ont également montré dans plusieurs lignées cellulaires du cancer de la prostate, que le RA était capable de se lier sur différents sites de son promoteur pour réguler positivement ou négativement son expression (Cai et al. 2011). En réponse à une stimulation par les androgènes, le RA recrute la protéine LSD1 qui va déméthyliser les marques activatrices d'histone H3K4me1/2, et ainsi réguler négativement l'expression du RA. A l'inverse, dans un environnement appauvri en androgènes, le RA serait capable de lier une région activatrice (enhancer) dans l'intron 2 afin d'augmenter sa propre expression. De plus, plusieurs variant d'épissage du RA (AR-Vs), constitutivement actifs indépendamment du ligand, semblent avoir une expression augmentée chez les patients ayant des CRPC (Hörnberg et al. 2011).

Plusieurs études récentes suggèrent que cette augmentation d'expression du RA dans le contexte des CRPC, pourrait entraîner un changement d'activité transcriptionnelle du RA. Des expériences de ChIP sequencing ont notamment montré que la surexpression du RA dans des lignées cellulaires du cancer de la prostate, entraînait une augmentation globale du nombre de sites occupés par le RA sur la chromatine (Atala 2013). Cette augmentation d'occupation de la chromatine a été confirmée *in vivo* chez l'homme, toujours par des expériences de ChIP sequencing réalisés sur des échantillons humains de CRPC (Sharma et

al. 2013). De plus, des mutations affectant l'expression et l'activité de plusieurs co-régulateurs transcriptionnel du RA, peuvent aussi modifier ses sites de liaison à la chromatine. Il a notamment été mis en évidence une augmentation d'interaction entre le RA et le facteur épigénétique EZH2, fréquemment surexprimé dans les CRPC. Via un mécanisme dépendant de la phosphorylation de AKT, cette association entre le RA et EZH2 semble être à l'origine d'une augmentation d'activité du RA dans les CRPC (Xu et al. 2013). D'autres facteurs cruciaux impliqués dans la régulation de l'expression des gènes cibles du RA, tel que le facteur pionnier FOXA1 ou GATA2, semble également jouer un rôle crucial dans le repositionnement du RA sur la chromatine dans les CRPC (Böhm et al., 2009)(Grasso et al. 2012).

Dans les CRPC, des mutants du RA pourraient répondre à d'autres stimuli hormonaux indépendamment des androgènes. Zhao et al, ont mis en évidence que certains mutants du RA répondent aux glucocorticoïdes dans plusieurs lignées cellulaire du cancer de la prostate, permettant ainsi de maintenir la signalisation du RA (Zhao et al. 2000). De nombreuses autres études ont montré que le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et les glucocorticoïdes permettaient de contourner la signalisation androgénique dans le cancer de la prostate. Néanmoins, son rôle pro ou anti-tumoral est encore controversé, et le potentiel thérapeutique de l'inhibition du GR reste à démontrer (Montgomery et al., 2014). Enfin, d'autres études ont également suggéré que la voie PI3K pourrait participer aux mécanismes de résistance dans les CRPC, en maintenant active la voie de signalisation du RA (Mulholland et al., 2006).

Les mécanismes de résistance à l'hormonothérapie sont très nombreux et variés dans les CRPC. Néanmoins même si l'hormonothérapie ne permet plus de cibler efficacement le RA dans ce contexte, celui-ci reste tout de même actif. C'est la raison pour laquelle, il est nécessaire de développer des inhibiteurs plus spécifiques ne permettant pas cette restauration de l'activité du RA. De plus, les analyses intégratives de ChIP sequencing ont révélé que de nombreux facteurs transcriptionnels ou épigénétiques sont impliqués dans le maintien de l'activité du RA. L'idée de cibler ces partenaires du RA, souvent mutés dans les CRPC, semble également être une opportunité thérapeutique intéressante.

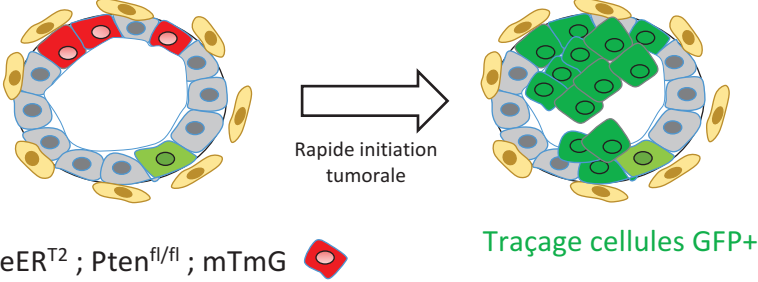
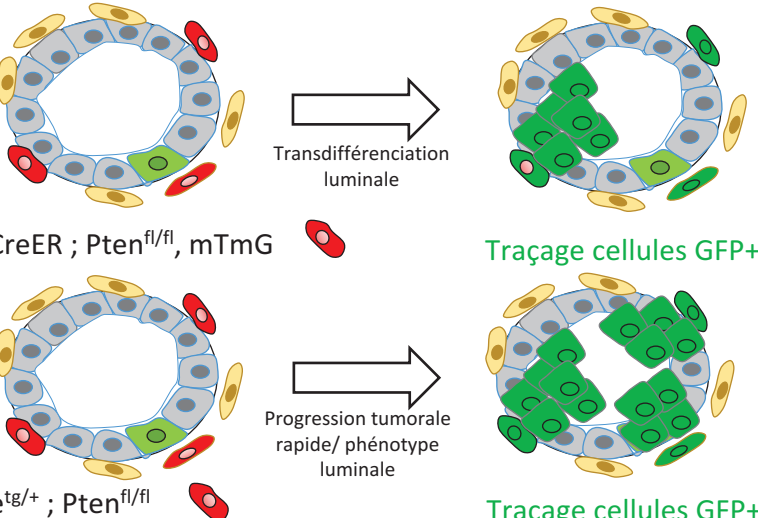
Compartiment cellulaire	Modèle murin d'inactivation de <i>Pten</i>	Références
Luminale	 <p>K8-CreER^{T2} ; Pten^{fl/fl} ; mTmG</p> <p>Traçage cellules GFP+</p>	Choi et al; 2012
Basale	 <p>K14-CreER ; Pten^{fl/fl}, mTmG</p> <p>Traçage cellules GFP+</p> <p>K5-Ce^{tg/+} ; Pten^{fl/fl}</p> <p>Traçage cellules GFP+</p>	Choi et al; 2012 Lu et al; 2013

Figure 13 Modèle murin d'étude de l'origine cellulaire du cancer de la prostate : Illustration schématique de la stratégie employée pour permettre le traçage des cellules à l'origine du cancer de la prostate, dans le contexte de la tumorigénèse prostatique induite par la perte de *Pten*. Le système rapporteur mTmG exprime la protéine de fluorescence rouge (RFP) qui est remplacée par la GFP suite à l'induction du système Cre LoxP par le tamoxifène, permettant ainsi l'inactivation de *Pten* soit dans les cellules luminales (K8-Cre), soit dans les cellules basales (K14-Cre; K5-Cre). Suite à l'induction par le tamoxifène le GFP devient exprimer de manière permanente dans les différents types cellulaires. Elle permet donc le traçage des cellules dans les lésions pré cancéreuses et cancéreuses qui se développent suite à l'inactivation de *Pten*.

I.D.i) Origine cellulaire du cancer de la prostate

La question de l'origine cellulaire fait l'objet d'un débat animé depuis plus d'une dizaine d'année. Historiquement, les cellules de type luminale sont décrites comme étant l'origine cellulaire du cancer de la prostate. Néanmoins, certains cancers de la prostate deviennent résistants à la castration, et sont alors considérés comme indépendant de la signalisation androgénique. Cette indépendance aux androgènes est une caractéristique des cellules basales. C'est pourquoi, l'hypothèse de l'origine basale du cancer de la prostate a été considérée. De plus, il a également été observé par des analyses immunohistochimiques, que les cellules intermédiaires ont une expression augmentée dans les cancers de la prostate humain (van Leenders et al. 2003). Ceci suggère que ces cellules intermédiaires pourraient être à l'origine du cancer de la prostate. Néanmoins, peu d'études ont apporté des réponses sur le rôle de cette population dans l'initiation tumorale du cancer de la prostate. Enfin, l'implication de cellules souches cancéreuses de la prostate est de plus en plus étudié dans le cancer de la prostate, et plus particulièrement dans les mécanismes de résistance à l'hormonothérapie.

I.D.i.1) La double origine luminale et basale du cancer de la prostate

Même si les adénocarcinomes de la prostate présentent généralement un phénotype luminal chez l'homme, les populations cellulaires lumineales et basales sont considérées comme pouvant être à l'origine du cancer de la prostate. Pendant longtemps, la perte d'expression des marqueurs basaux comme la cytokératine 5 ou la protéine p63, a été considérée comme un élément de diagnostic du cancer de la prostate (Humphrey 2007). Cependant, en 2010, Goldstein et al ont isolé différentes populations cellulaires à partir de tumeurs primaires de la prostate chez l'homme (Goldstein 2010). Des analyses par cytométrie en flux (FACS) sur ces tumeurs primaires, ont permis de caractériser plusieurs populations de cellules lumineales et basales, basés sur le niveau d'expression des cytokératines (CK8/18/5/14), du RA, de p63, Nkx3.1, CD49f, et Trop2. Cette étude utilisant différentes approches a pu montrer que chez l'homme, des cellules avec des caractéristiques moléculaires basales, sont également retrouvées dans les tumeurs primaires.

L'utilisation de différentes Cre Recombinase, spécifiques des cellules basales ou lumineales couplées à des rapporteurs fluorescents, ont permis de générer des modèles murins

d'inactivation conditionnelle de *Pten*, dans le but de tracer l'origine cellulaire du cancer de la prostate.(Goldstein 2010) (Choi et al., 2012)(Wang et al., 2014). Choi et al ont logiquement montré, que l'inactivation conditionnelle du gène *Pten* dans les cellules luminales (*K8-CreERT2^{wt/Tg}; Pten^{fl/fl}*) conduit au développement de lésions PIN seulement 1 mois après l'inactivation conditionnelle du gène. De manière intéressante, cette même étude a révélé que l'inactivation du gène *Pten* dans les cellules basales (*K14-CreER^{Tg/Tg}; Pten^{fl/fl}*) conduit également au développement de PIN, mais plus tardivement que dans le modèle *K8-Pten* (Choi et al. 2012). Cette période de latence semble associée au fait que ces cellules basales invalidées pour le gène *Pten*, subissent une transdifférenciation vers un phénotype luminal. A l'inverse, dans un autre modèle murin d'inactivation conditionnelle de *Pten* dans les cellules basales (*K5-CE^{Tg/+}; Pten^{fl/fl}*), les lésions prostatiques progressent plus vite et sont plus agressives que dans le modèle *K8-Pten* (*K8-CE^{Tg/+}; Pten^{fl/fl}*) (Lu et al. 2013)(Figure 13).

Ces études de traçage cellulaire confortent l'hypothèse de la double origine cellulaire du cancer de la prostate. Néanmoins, les variabilités phénotypiques observées en terme de vitesse de progression et d'agressivité tumorale, posent la question de l'impact du fond génétique et de la pénétrance des différentes Cre Recombinase.

I.D.i.2) Le modèle des cellules souches cancéreuses de la prostate

Les cancers de la prostate contiennent des populations clonales hétérogènes, distinguables les unes des autres par leur caractéristique phénotypique et moléculaire. Nous avons vu précédemment que les tumeurs de la prostate peuvent être successivement affectées par des mutations récurrentes touchant un grand nombre de gènes. L'ensemble de ces mutations vont être à l'origine de l'hétérogénéité génétique et donc de l'évolution clonale du cancer de la prostate (Cooper et al. 2015). Le modèle des cellules souches cancéreuse (CSCs) propose qu'au sein d'un même clone tumoral, les cellules sont organisées de manière hiérarchique. A la base de cette organisation hiérarchique, certaines cellules souches cancéreuses seraient dotées de capacités d'auto régénération et de différenciation (Kreso & Dick 2014). En d'autres mots, les CSCs sont décrites comme capables de maintenir un clone tumoral de part leur capacité d'auto régénération, mais aussi de générer une hétérogénéité intra-clonale, de part leur capacité à se différencier en différents sous types cellulaires.

Basé sur l'expression de différents marqueurs de surface, diverses méthodes ont été employées pour purifier les cellules souches cancéreuses de la prostate (PCSCs), à partir de tumeurs de la prostate humaines et murines (Collins et al., 2005)(Lawson et al., 2007). Dans un modèle murin d'inactivation de *Pten* (*PbCre4 Pten^{fl/fl}*), une population cellulaire souche identifiée comme $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{CD49f}^+$ (LSC) a été isolée (Mulholland et al., 2009). Cette étude a montré par des expériences de xéno greffe dans la capsule rénale de souris immunodéficientes, que cette population LSC était capable d'initier la tumorigénèse, *in vivo*. De plus, des expériences menées *in vitro*, ont mis en évidence que cette population cellulaire LSC était capable de former des sphères en culture, suggérant la forte capacité d'auto-renouveaulement de ces cellules (Lawson et al. 2007). Une autre étude a montré de manière étonnante qu'il existait chez la souris, une population de cellules baptisées CARN (Castration-resistant Nkx3.1-expressing cells), ayant des caractéristiques luminales (Wang et al., 2009). Ce modèle de cellules CARNs s'oppose au fait que les PCSCs soient considérées comme des cellules provenant uniquement du compartiment basal. Chez l'homme, plusieurs études ont isolé à partir de tumeurs primaires, des PCSCs décrites comme $\text{CD44}^+ \text{CD133}^+ \alpha 2\beta 1^+$, qui semblent être douées de clonogénicité *in vitro* (Collins et al., 2005)(Patrawala et al., 2007).

Même si ces deux populations de PCSCs semblent bien définies, la distinction entre cellules souches normales et PCSCs n'est toujours pas claire, notamment au travers de l'expression des différents marqueurs de surface. En effet, Leong et al ont isolé à partir de l'épithélium de la glande prostatique chez la souris, une population cellulaire souche $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{CD44}^+ \text{CD133}^+ \text{CD117}^+$, qui partage des caractéristiques moléculaires communes à l'homme et à la souris (Leong et al. 2008). Néanmoins, chez la souris la présence des marqueurs de surfaces CD44 et CD133 dans les PCSCs n'est pas clairement décrite.

I.D.i.3) Rôle central du récepteur aux androgènes dans les cellules souche cancéreuses de la prostate

De manière intéressante, plusieurs études ont mis en évidence que les PCSCs isolées à partir de tumeurs primaires humaines ou de cancers de la prostate non traités, présentent une faible expression, voir une absence d'expression du RA (Deng & Tang 2015). Dans l'étude de Collins et al, les populations cellulaires $\text{CD44}^+ \text{CD133}^+ \alpha 2\beta 1^+$ purifiées à partir de 7 tumeurs primaires de la prostate n'exprimaient pas le RA (Collins et al., 2005). Des immunofluorescences réalisées sur des xéno greffes de cellules CD44^+ , isolées au préalable à

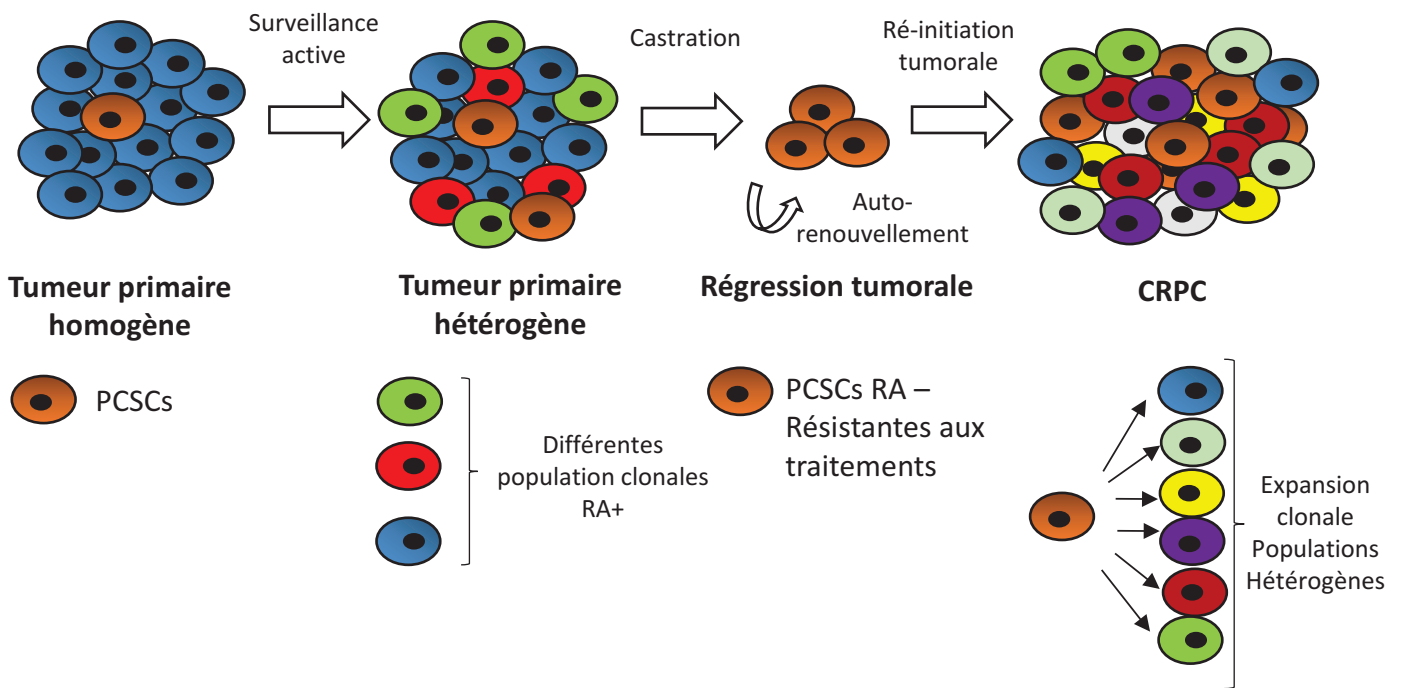


Figure 14 : Modèle hypothétique de résistance à l'hormonothérapie médié par les PCSCs dans les CRPC. Il est considéré dans ce modèle que les tumeurs primaires contiennent des PCSCs en nombre faible, présentant un faible taux de prolifération. Suite à la castration, les différentes populations clonales exprimant le RA subissent une réduction massive, tandis que les PCSCs prolifèrent indépendamment du RA dans cet environnement appauvri en androgènes. Dans ce contexte les PCSCs seraient capable de réinitier la tumorigénèse, conduisant à la prolifération d'une population hétérogènes de cellules cancéreuses dans les CRPC. *Inspiré de Rybak et al; 2014.*

partir de tumeurs humaines, montrent que ces cellules n'expriment pas le RA (Patrawala et al., 2006). De plus, des PCSCs ayant une faible expression de PSA (PSA^{-low}) montrent également une diminution d'expression du RA (Qin et al. 2012). Cette diminution d'expression du RA dans les PCSCs des cancers de la prostate non traités, pourrait être simplement dû au fait que ces cellules sont moins différenciées. Néanmoins, cette absence d'expression du RA dans les PCSCs a une importance majeure en terme de traitement. Car en effet, l'absence du RA pourrait rendre les PCSCs insensible à l'hormonothérapie.

En accord avec cette théorie, plusieurs études ont montrés que les PCSCs n'exprimant pas le RA sont résistantes à la castration chimique (Rybak et al., 2015). Dans l'étude de Germann et al, une population de PCSCs n'exprimant pas AR, est enrichie dans un modèle de xénogreffe (BM18) résistant à la castration (Germann et al. 2012). Deux autres études ont mis en évidence que des PCSCs isolées à partir de CRPC humains et murins, et exprimant les marqueurs souches NANOG et SOX2, présentent une absence d'expression du RA (Jeter et al. 2011)(Kregel et al. 2013). Ces données suggèrent que les PCSCs n'exprimant pas le RA seraient capable de croitre dans un environnement dépourvu en androgènes. C'est pourquoi certains émettent l'hypothèse que les PCSCs préexistent dans les tumeurs primaires, et pourraient être à l'origine des CRPC suite au traitement de castration chimique . Il s'agirait donc de l'expansion clonale des PCSCs RA négative, à l'origine de la ré-initiation des CRPC (Figure 14).

II) Cancer du sein et récepteurs aux estrogènes

II.A) Cancer du sein

II.A.1) Généralités

Dans le monde, on estime qu'approximativement 1 400 000 nouveaux cas de cancers du sein ont été diagnostiqués en 2012 (Tao et al. 2015). Ces données épidémiologiques font du cancer du sein, le cancer le plus fréquemment observé chez les femmes en France, dans l'union européenne et aux Etats-Unis d'Amérique (Siegel et al., 2016). En 2015, 54 000 nouveaux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués en France. On estime actuellement qu'une femme sur huit sera concernée un jour par le cancer du sein. Ces chiffres

impressionnants montrent que le cancer du sein est une priorité absolue en terme de santé publique. C'est la raison pour laquelle dans beaucoup de pays développés, des plans d'action visant à dépister précocement le cancer du sein ont été mis en place. En France, par exemple il est recommandé depuis plusieurs années de procéder à des mammographies à partir de l'âge de 50 ans, et de renouveler celles-ci tous les cinq ans.

Néanmoins, même dans le cas où les diagnostics sont réalisés précocement, il n'est pas toujours évident de traiter efficacement le cancer du sein dû à l'hétérogénéité de cette maladie, tant au niveau histologique que moléculaire.

II.A.2) Facteurs de risque

Plusieurs études épidémiologiques menées à travers le monde ont mis en évidence que plusieurs facteurs liés à l'âge, au mode de vie, à la génétique ainsi qu'à l'environnement intervenaient dans l'étiologie du cancer du sein.

II.A.2.a) Âge

Comme pour la plupart des cancers, la probabilité de développer un cancer du sein augmente avec l'âge. Très peu de cancer du sein sont diagnostiqués avant l'âge de 40 ans, alors que l'incidence augmente très vite entre 55 et 70 ans (Anders et al., 2010).

II.A.2.b) Facteurs hormonaux endogènes

Des études ont montré qu'une survenue précoce des premières menstruations augmente le risque de développer un cancer du sein. Dans ce contexte, certains émettent l'hypothèse qu'une exposition hormonale prolongée à un âge jeune, pourrait expliquer cette prévalence plus élevée pour le cancer du sein. Les femmes pour lesquelles la ménopause se manifeste tardivement après 50 ans présentent également un risque accru de développer un cancer du sein (Cancer 1997).

II.A.2.c) Facteurs génétiques

L'histoire familiale est très présente dans le cancer du sein. Plusieurs mutations génétiques héréditaires sont susceptibles d'augmenter le risque de développer un cancer du

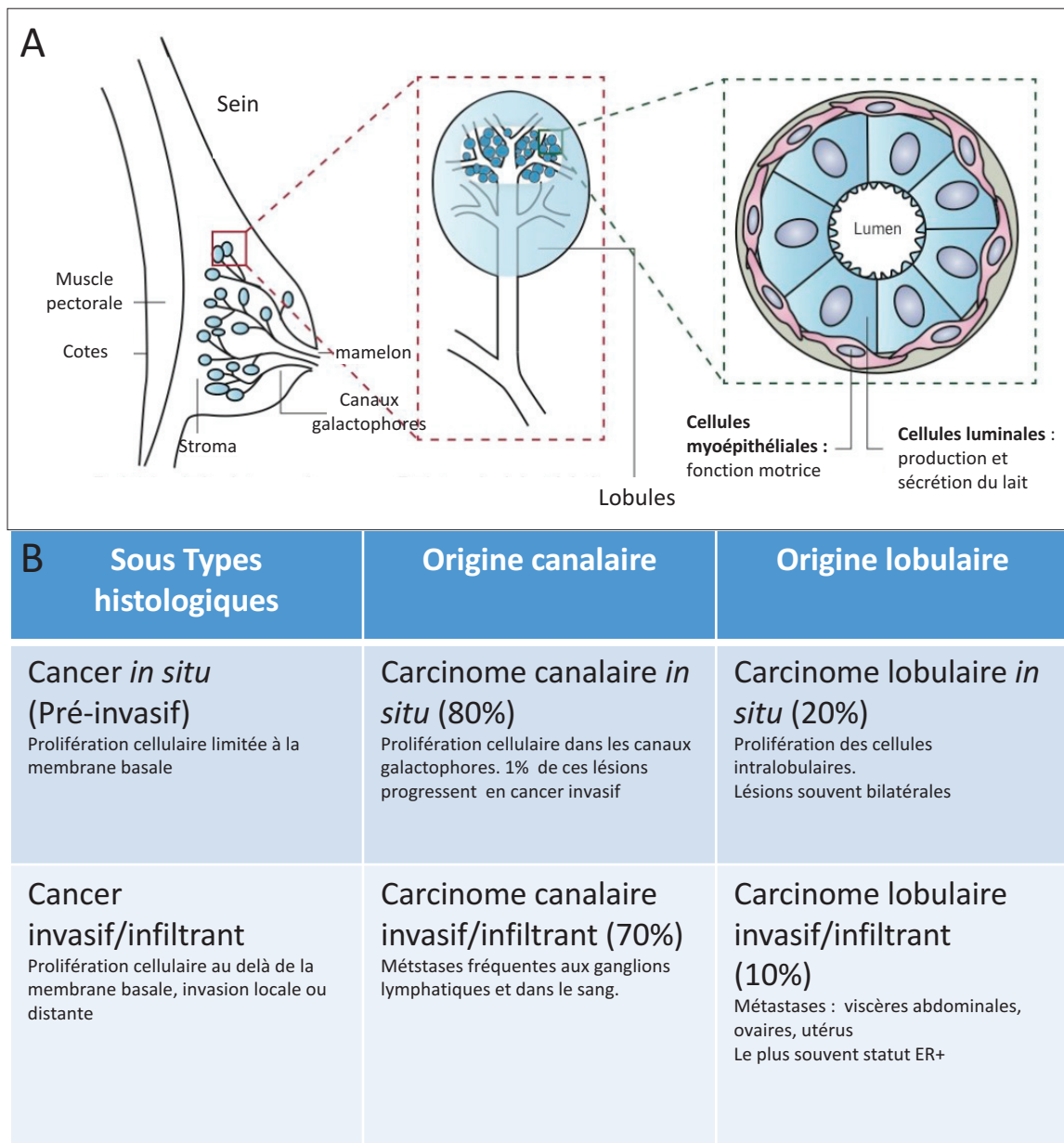


Figure 15 : Structure histologiques de la glande mammaire et classification histologiques des sous types du cancer du sein. (A) Les seins sont situés dans la partie antéro-postérieure du thorax et reposent en arrière sur le muscle pectorale. Dans chaque sein la glande mammaire est organisée en lobules (20 à 40). Chacun de ces lobules sont formés d'acini. Ces acini forment des cavités, reliées les unes aux autres par des petits canaux intralobulaires. La structure élémentaire des acini est formée de deux couches de cellules, une couche luminale qui assure la production et la sécrétion du lait maternel, et une couche de cellules musculaires myoépithéliales qui assurent la fonction motrice contractile qui permet l'écoulement du lait. (B) Tableau récapitulant les différents sous-types histologiques du cancer du sein. *Modifié d'après Rossi et al.*

sein. Parmi les gènes connus pour être impliqués dans la prédisposition héréditaire au cancer du sein, on retrouve *BRCA1* et *BRCA2*. Les analyses familiales ont montré qu'entre 55 et 70% des femmes porteuses de mutations dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2*, développent un cancer du sein (Nielsen et al., 2016).

II.A.2.d) Obésité

Plusieurs études épidémiologiques ont montré que les individus obèses augmentaient considérablement leur risque de développer un cancer du sein. Cette augmentation du risque de développer un cancer du sein, est essentiellement attribuée au fait que chez les individus obèses ont un taux sérique d'estradiols augmenté.

D'autres facteurs de risque liés au mode de vie comme la cigarette, la consommation excessive d'alcool ou encore l'absence d'activité sportive semblent être associés au risque de développer un cancer du sein.

II.A.3) Notions anatomiques et histologiques de la glande mammaire

Dans chaque sein, la glande mammaire forme une masse de densité variable entre les individus. Elle est organisée en une vingtaine de lobes, qui vont former de petites grappes. Dans chacun de ces lobules, l'unité de base est l'alvéole ou acinus, qui forme une cavité arrondie en cul de sac. Les acini sont composés d'une couche de cellules luminales bordant la lumière de la cavité, qui vont assurer les fonctions sécrétrices de la glande mammaire. Une couche de cellules myoépithéliales sous-jacente aux cellules luminales, permet d'assurer la fonction contractile permettant l'excrétion du lait. Ces deux assises cellulaires forment l'épithélium glandulaire de la glande mammaire. Les acini se drainent dans des canaux intralobulaires pour permettre la circulation du lait sécrétée. L'ensemble de ces petits canaux intralobulaires vont ensuite drainer les sécrétions dans de plus gros canaux galactophores qui convergent aux mamelons. Cette glande mammaire présente donc deux composantes majeures, qui sont la partie lobulaire et la partie canalaire, englobées dans un tissu adipeux dense (Rossi et al ; 2011) (Figure 15A).

Tumeur primaire (T)	Caractéristiques histologiques
Tx	Tumeur primaire non évaluée
T0	Tumeur primaire non palpable
Tis	Carcinome in situ
T1	Tumeur primaire dont la taille est inférieure à 2cm
T1mic	T1 avec microinvasion inférieure à 1mm
T2	Tumeur primaire dont la taille est comprise entre 2 et 5 cm
T3	Tumeur primaire dont la taille est supérieure à 5cm
T4	Tumeur qui présente une extension directe à la paroi thoracique ou à la peau, indépendamment de sa taille
Ganglions lymphatique régionaux	Degrés d'envahissement des gg lymphatiques
Nx	Envahissement des gg lymphatiques régionaux non évaluables
N0	Absence d'envahissement ganglionnaire régionale
N1mi	Présence de micrométastases (inférieure à 2mm)
N1	Envahissement de 1 à 3 gg axillaires
N2	Envahissement de 4 à 9 gg axillaires ou envahissement gg mammaires internes sans envahissement axillaire
N3	Envahissement d'au moins 10 gg axillaires ou envahissement gg sous-claviculaires ou envahissement gg mammaires internes
Métastases à distance	Absence ou présence de métastase(s)
Mx	Renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance
M0	Absence de métastases à distance
M1	Présence de métastase(s) à distance

Tableau 2: Tableau récapitulatif des critères d'évaluation du cancer du sein dans la classification TNM

II.A.3.a) Les sous-types histologiques du cancer du sein et leur classification

II.A.3.a.1) Classification anatomopathologique classique

Les cancers du sein prolifèrent à partir des cellules de l'épithélium glandulaire. La majorité des tumeurs malignes de la glande mammaire sont des carcinomes ou adénocarcinomes. Basé sur la structure anatomique de la glande mammaire et l'origine cellulaire des tumeurs, on distingue deux types de carcinomes, les carcinomes canaux et les carcinomes lobulaires. Indépendamment de l'origine anatomique, les carcinomes peuvent présenter un caractère invasif ou non, on parlera alors respectivement de carcinome invasif ou infiltrant, et de carcinome *in situ* (Makki 2015). Dans le contexte des carcinomes invasifs la prolifération tumorale dépasse la membrane basale pour envahir le tissu conjonctif. Les carcinomes canaux invasifs (IDC) sont les carcinomes invasifs les plus fréquents. Ils représentent 55% à 70% des cancers du sein invasifs diagnostiqués, tandis que les carcinomes lobulaires invasifs (ILC) sont plus rares, constituant 5 à 15% des cancers du sein diagnostiqués (Eheman et al. 2009). Les carcinomes canaux et lobulaires *in situ* (DCIS ; LCIS) sont des lésions néoplasiques dans lesquelles la prolifération des cellules épithéliales va se limiter aux canaux galactophores et aux lobules (Makki 2015) (Figure 15B).

Les cancers du sein sont donc initialement classifiés sur leur apparence histologique, leur origine cellulaire (canaux ou lobulaire), ainsi que sur leur capacité à envahir le stroma adjacent et métastaser par la suite. Plusieurs types de classifications ont permis d'affiner les critères morphologiques, histologiques et cytologiques des lésions. Parmi ces classifications, on retrouve la classification TNM et SBR.

II.A.3.a.2) Classification TNM

La classification TNM (Tumor, Node, Métastase), appliquée à plusieurs cancers, a été initialement créée pour définir le degré d'extension du cancer, c'est à dire locale, régionale ou généralisé. Depuis sa création, cette classification a beaucoup évolué et les critères histologiques se sont affinés avec l'évolution des techniques d'imagerie. Actuellement les éléments clés de cette classification sont, la taille des tumeurs, la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques ou dans des sites distants. De plus, l'ensemble des critères pris en

Caractéristiques	Score
Formation de tubules (%)	
Majorité des cellules tumorales (>75%)	1
Degrés modérés (10-75%)	2
Peu de tubules ou absence de tubules (<10%)	3
Pléomorphisme des noyaux	
Noyaux de petites tailles, cellules uniformes	1
Augmentation de la taille des noyaux modérée	2
Variation importante de la taille des noyaux	3
Index mitotique	
0-5 (histo) ou 0-1 (cyto)	1
6-10 (histo) ou 2-4 (cyto)	2
>11 (histo) ou > 5 (cyto)	3
GRADES	
Grade 1 (cellules bien différenciées)	3-5
Grade 2 (cellules modérément différenciées)	6-7
Grade 3 (cellules peu différenciées)	8-9

Tableau 3: Critères d'évaluation du diagnostic cytologique du cancer du sein basé sur la classification SBR.

compte dans cette classification, permet de définir un stade de la maladie (Veronesi et al., 2006) (tableau 2).

II.A.3.a.3) Classification SBR

Basé sur l'étude de différentes caractéristiques histologiques et cytologiques, la classification SBR (Scarff-Bloom-Richardson) permet de définir plusieurs grades du cancer du sein. L'index mitotique, la taille des noyaux, l'aspect de la chromatine ainsi que l'architecture des cellules sont des critères permettant de définir les grades du cancer dans cette classification. Ces critères vont permettre d'attribuer un score. L'analyse des caractéristiques cytologiques des cellules cancéreuses permet de définir leur état de différenciation. Actuellement, il existe trois grades. Le grade I correspond aux tumeurs les moins agressives tandis que le grade 3 correspond aux tumeurs les plus agressives (Meyer et al. 2005) (tableau 3).

Au travers de ces différentes classifications, des facteurs cliniques et pathologiques sont donc utilisés en routine afin de catégoriser les cancers du sein chez les patientes. Néanmoins, l'utilité clinique des différentes classifications histologiques est souvent limitée. En effet, 70% des cancers du sein sont des IDC qui montrent une grande divergence en terme de sensibilité aux traitements, mais également en terme de comportement clinique entre les patientes (Li et al., 2005). On sait depuis longtemps qu'une hétérogénéité moléculaire s'ajoute à l'hétérogénéité morphologique et histologique des tumeurs. Cette hétérogénéité moléculaire a une importance fondamentale dans l'orientation du traitement.

II.A.3.b) Classification moléculaire du cancer du sein

Plusieurs études utilisant des technologies d'analyse du transcriptome et de séquençage à haut débit dans les tumeurs humaines, ont permis d'établir une taxonomie moléculaire des cancers du sein (Sorlie et al. 2001)(Sotiriou & Pusztai 2009). Ces analyses cliniques à grande échelle réalisées dans les différents sous-types histologiques du cancer du sein, ont révélé une grande hétérogénéité génétique. Le récepteur aux estrogènes (ER), le récepteur à la progestérone (PR), et le récepteur membranaire HER2 sont les trois biomarqueurs utilisés pour définir les sous-types moléculaires du cancer du sein. Même si

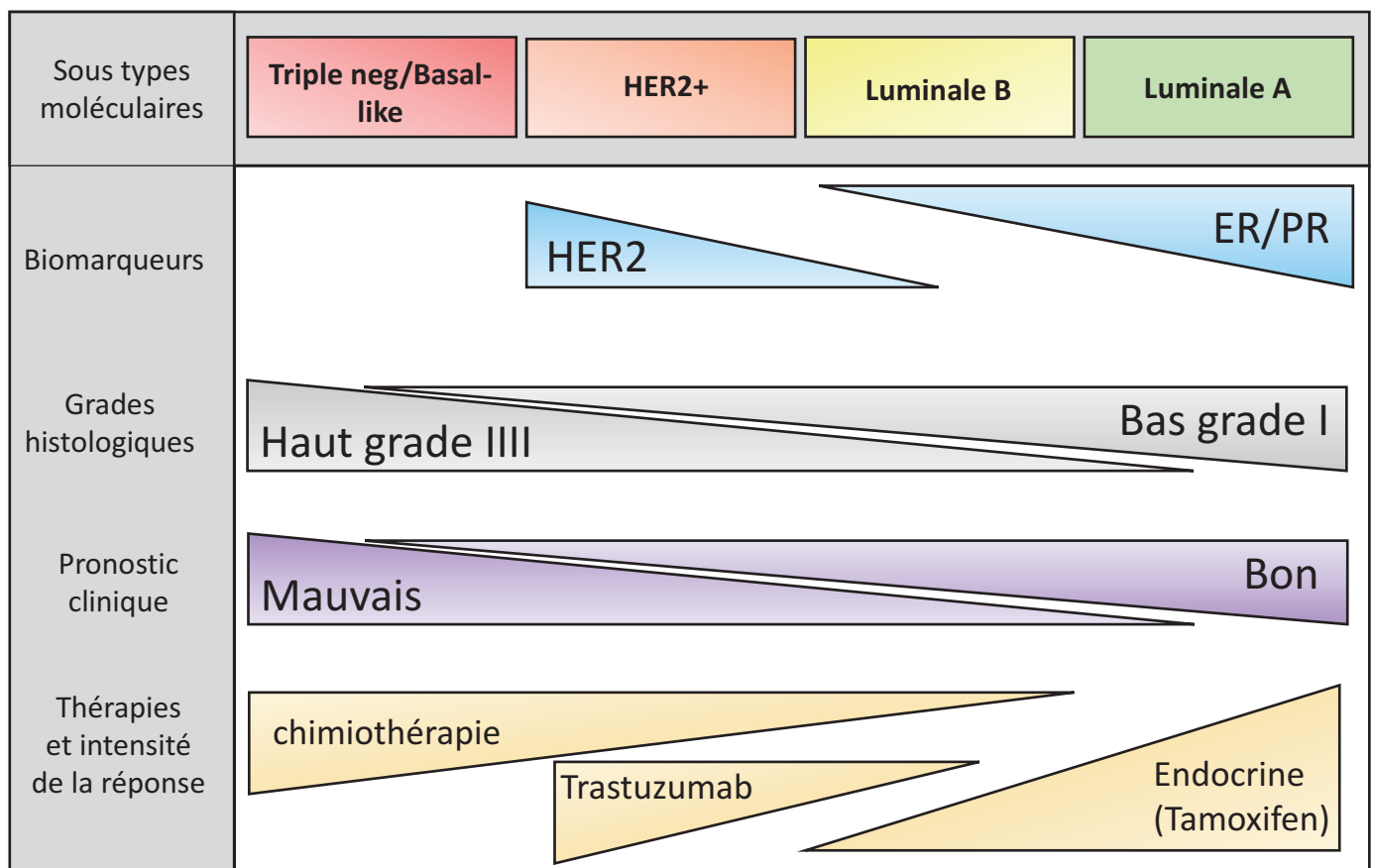


Figure 16 : Classification et caractéristiques des sous-types moléculaires du cancer du sein. Les sous types moléculaires du cancer du sein se subdivisent en trois groupes majeurs : Triple négatif (basal-like), HER2 positif, luminale B et luminale A. Les tumeurs triple négatives et HER2+ sont souvent des tumeurs de haut grade associées à un mauvais pronostic, à l'inverse des tumeurs du type luminale. La chimiothérapie est le traitement principalement utilisé pour les tumeurs triples négatives. Les tumeurs HER2+ sont traitées par le trastuzumab, un anticorps bloquant du récepteur HER2. La thérapie endocrine (tamoxifen) visant à bloquer l'action pro-proliférative du récepteur aux estrogènes, est le traitement de référence pour les sous-types luminaux.

cette classification en sous types moléculaires évoluent depuis quelques années, elle se base majoritairement sur le niveau d'expression respectif de chacun de ces trois récepteurs (Guedj et al. 2012).

II.A.3.b.1) Les tumeurs lumineuses A/B

Le premier sous type moléculaire du cancer du sein qualifié de « lumineuse » exprime ER et PR, mais ne présente pas ou peu d'expression de HER2 (Dai et al. 2015). Dans ces tumeurs dites lumineuses, on retrouve deux sous-groupes, les tumeurs lumineuses A et les tumeurs lumineuse B. Basé sur l'analyse de l'expression des biomarqueurs par immunohistochimie, les tumeurs lumineuses A sont décrites comme étant ER+ ; PR+ ; HER2-, tandis que les tumeurs lumineuses B sont décrites comme étant ER+ ; PR+, HER2+ (Vallejos et al. 2010). Néanmoins, toutes les tumeurs lumineuses B n'expriment pas le récepteur HER2 (Cheang et al. 2009). Des analyses transcriptomiques réalisées sur un large série de cancers du sein, ont révélé un caractère plus agressif des tumeurs lumineuses B, lié à une expression élevée de gènes pro-prolifératifs par rapport au sous type tumorale A (Sorlie et al. 2001). Cependant, ces tumeurs lumineuses représentant environ 65% des cancers du sein, sont généralement de bon pronostic (O'Brien et al. 2010). En effet, ces tumeurs lumineuses, et plus particulièrement les tumeurs du sous-type lumineuse A, répondent très bien à la thérapie hormonale visant à inhiber l'activité du RE (Figure 16).

II.A.3.b.2) Les tumeurs HER2 positives et basal-like

Les tumeurs qui surexpriment le récepteur HER2 présentent généralement des mutations par amplifications au niveau du locus codant pour HER2. Ces tumeurs sont le plus souvent associées à des hauts grades histologiques, et sont de mauvais pronostic (Sotiriou & Pusztai 2009). Le traitement de référence est le trastuzumab, un anticorps monoclonale visant à bloquer l'activité du récepteur HER2 (Maximiano et al., 2016).

Les tumeurs du sous type basal-like sont plus communément appelées tumeurs triple négatives, car celles-ci n'expriment pas ER, PR et HER2 (Dai et al. 2015). Ces tumeurs sont caractérisées au niveau moléculaire par une expression importante des cytokératines basales (CK5, 6, 14, 17), ainsi qu'une expression faible de BRCA1 (Abd El-Rehim et al. 2005). Tout

comme dans le cas des tumeurs HER2+, les tumeurs triple négatives sont associées à des hauts grades histologiques, et sont de mauvais pronostic (Figure 16).

L'établissement des profils moléculaires du cancer du sein a permis une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes de progression de la maladie. De plus, la découverte des acteurs moléculaires majeurs et spécifiques aux différents cancers du sein, a ouvert la voie au développement de nouvelle approche thérapeutique. C'est pourquoi la prise en charge des patientes atteintes du cancer du sein, nécessite obligatoirement l'analyse du profil histologique combinée à l'analyse du profil moléculaire des tumeurs, afin de définir au mieux une valeur pronostic et d'orienter le traitement.

II.B) Récepteur aux estrogènes alpha (RE α) : structure, fonctions et rôle dans le cancer du sein

II.B.1) Généralités

La signalisation estrogénique est connue pour jouer un rôle primordial dans l'acquisition de la maturité sexuelle, la reproduction et dans un grand nombre de processus biologiques au sein de différents tissus (Gruber et al., 2002). Néanmoins, des dérégulations de cette signalisation sont aussi impliquées dans plusieurs cancers tel que le cancer du sein. L'estrogène le plus actif biologiquement au niveau de la glande mammaire est le 17 β œstradiol (E2). La signalisation des estrogènes est relayée dans les cellules, via des récepteurs nucléaires intracellulaires qui sont les récepteurs aux estrogènes. Deux récepteurs nucléaires aux estrogènes ont été décrits jusqu'à présent, le récepteur aux estrogènes alpha (RE α), et le récepteur aux estrogènes beta (RE β) (Hayashi et al. 2003). Ces deux récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdiennes (Mangelsdorf et al. 1995).

II.B.2) Récepteur aux estrogènes : du gène à la protéine

II.B.2.a) Structure du gène ESR1

L'ADN complémentaire codant pour la forme humaine du récepteur aux estrogènes (RE α cDNA) a été cloné en 1986 (Green et al. 1986). Le gène *ESR1* codant pour le RE α , est

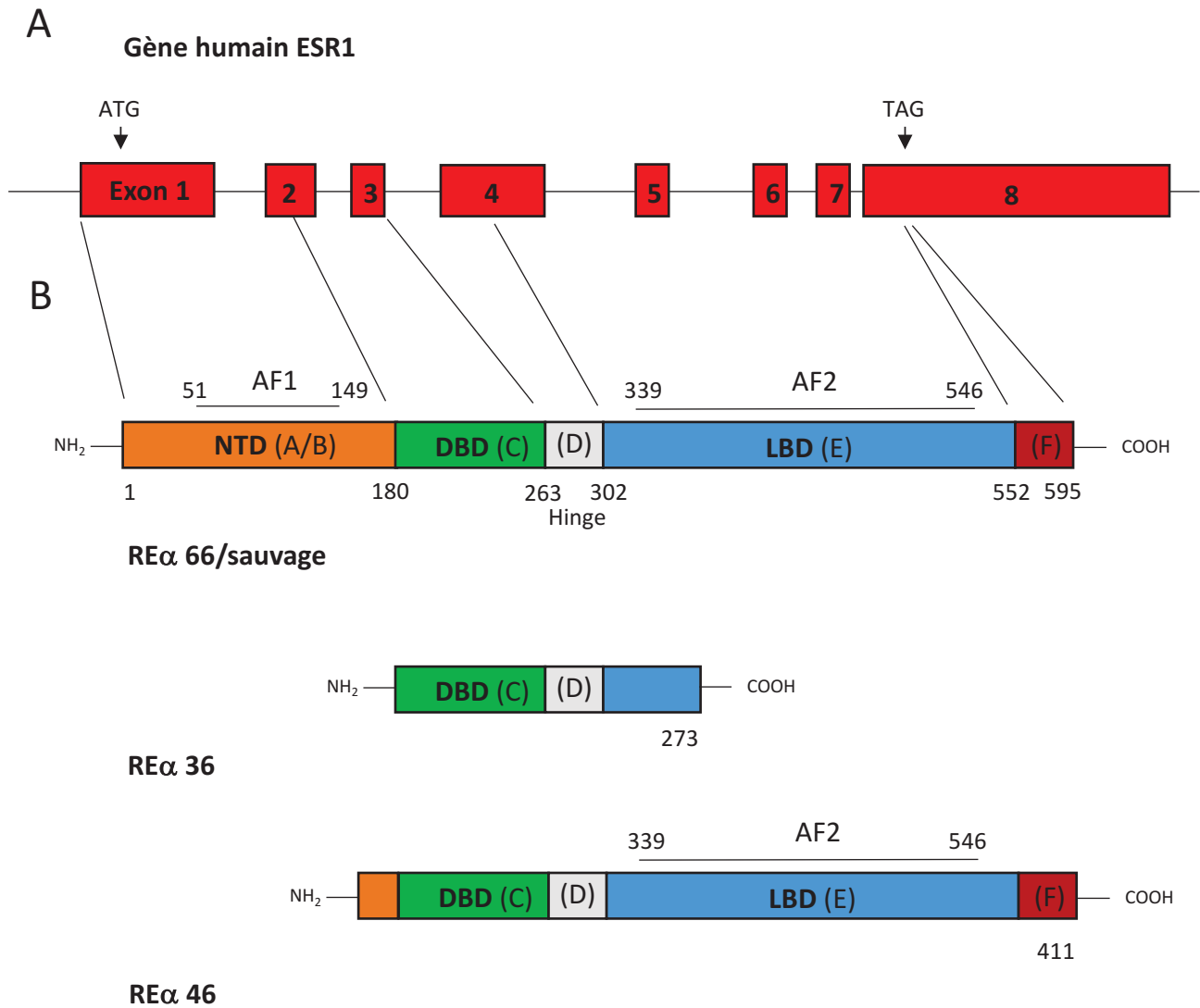


Figure 17 :Représentation schématique de la structure du gène ESR1, du REα et de ses isoformes. (A) La structure du gène ESR1 comprend 8 exons (boîtes rouges) séparés par des introns (ligne noires), qui sont tous deux représentés à l'échelle sur cette vue schématique. Les lignes verticales montrent la correspondance entre les régions codante du gène et les domaines fonctionnels du REα. (B) La localisation des différents domaines du REα est représenté par des boîtes. La région A/B contient le domaine fonctionnel AF1. La région C contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD). La région D constitue la région charnière. La région E contient le domaine fonctionnelle AF2. Les structures des isoformes REα36 et REα46, correspondant à des formes tronquées du REα, sont représentées de manière schématique sous la forme totale du REα.

localisé sur le chromosome 6q25.1. Son organisation génomique comprend 8 exons qui s'étendent sur une région de 140kb. Les analyses comparatives des cDNA de différentes espèces, tel que la souris, le rat et le poulet montre que la structure du gène est très conservée au cours de l'évolution (Koike et al., 1987). Dans le contexte du cancer du sein, des études de séquençage de l'exome portant sur de nombreuses tumeurs mammaires, ont montré que la fréquence des mutations ponctuelles sur le gène *ESR1* était faible (Stephens et al. 2012). En revanche des mutations par amplification sont fréquemment décrites au niveau de la région chromosomique du gène *ESR1* (Vincent-Salomon et al., 2008) (Figure 17A).

II.B.2.b) Structure protéique et localisation subcellulaire du récepteur aux estrogènes α

Comme la plupart des récepteurs nucléaires aux hormones, le RE α est composé de plusieurs domaines fonctionnels qui vont agir en synergie, pour réguler l'activité transcriptionnelle de la protéine. De la partie N-terminale à la partie C-terminale, on retrouve le domaine N-terminale (NTD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine de liaison au ligand (LBD). Deux domaines d'activation fonctionnelle du RE, qui sont les domaines AF1 et AF2, sont respectivement localisés dans le NTD et le LBD (Kumar et al. 2011). Le domaine AF1 assure l'activité transcriptionnelle du RE indépendamment du ligand, à la différence du domaine AF2 qui nécessite une liaison au ligand. Le LBD va permettre l'ancrage du RE au niveau de l'ADN principalement sur les séquences ERE (Elément de réponse aux estrogènes), qui résident dans les régions promotrices et activatrices des gènes cibles (Klinge 2001). Le domaine « D » qui suit le DBD constitue une région charnière (Hinge) dans la structure de la protéine, incluant une séquence de localisation nucléaire (NLS). Enfin, dans le partie C-terminale, le domaine « F » permet de moduler l'activité transcriptionnelle du RE (Kumar et al. 2011) (Figure 17B).

Des expériences d'immunofluorescence et de fractionnement cellulaire menées dans des lignées cellulaires de cancer du sein, ont montré que le RE α est majoritairement localisé dans le noyau des cellules, en présence ou en absence du ligand (Monje et al., 2001)(Kocanova et al. 2010). De part son activité transcriptionnel intense dans les cellules mammaires, il est évident que le rôle du RE α est presque exclusivement restreint aux noyaux des cellules. Néanmoins, plusieurs isoformes du RE α ont été identifiées depuis plus d'une dizaine d'années. Il semblerait que certains d'entre eux jouent un rôle clef dans le cytoplasme

des cellules, en induisant une signalisation estrogénique qualifiée de non-génomique (Thomas & Gustafsson 2015).

II.B.2.c) Les isoformes du récepteur aux estrogènes α

Plusieurs variants d'épissage et isoformes du RE α ont été détectés dans les cellules mammaires normales et cancéreuses. Les variants du RE α dans lesquels certains exons sont délétés par rapport à la forme totale (RE α 66), codent pour des protéines tronquées dont les fonctions ne sont pas toujours bien établies. Parmi ces formes tronquées du RE α , les plus connus sont les protéines RE α 36, et RE α 46 (Thomas & Gustafsson 2015). Du point de vue de la structure protéique, l'isoforme RE α 36 a perdu le domaine AF1 ainsi qu'une large portion du LBD (Wang et al., 2006). Il est principalement localisé dans le cytoplasme et à la membrane cellulaire, au niveau de laquelle il va induire la signalisation non-génomique du RE en présence ou en absence du ligand (Omarjee et al. 2016). Il a été montré que cet isoforme semble jouer un rôle pro-prolifératif, et induire des résistances à la thérapie hormonale dans les cancers du sein (Li et al., 2013). L'isoforme RE α 46 est caractérisé par la perte de l'exon1A, qui conduit à une forme tronquée du RE α dans laquelle la majorité du domaine AF1 est absent. La transcription de cet isoforme sous le contrôle des promoteurs E et F dans la région 5'UTR, est issu de l'épissage alternatif de l'exon 1E directement sur l'exon 2 dans la partie codante du gène ESR1 (Flouriot et al., 2000). Il a été montré dans des lignées cellulaires du cancer du sein, comme les MCF7, que cet isoforme est principalement localisé à la membrane des cellules (Marquez & Pietras 2001) (Figure 17B).

II.B.3) Mécanismes d'action du RE

II.B.3.a) Voie génomique classique dépendante du ligand

Le mécanisme d'action classique du RE α dépend de la liaison à son ligand E₂. La liaison de ce dernier au niveau du domaine LBD va entraîner un changement conformationnel du RE α , qui se dissocie alors des protéines chaperones, comme Hsp90, auxquelles il est associé en absence de stimulation estrogénique. Cette association avec le ligand permet également la phosphorylation du RE α au niveau du domaine AF-1. Les complexes ligand-récepteur vont ensuite former des dimères, qui dans le noyau des cellules vont se lier au

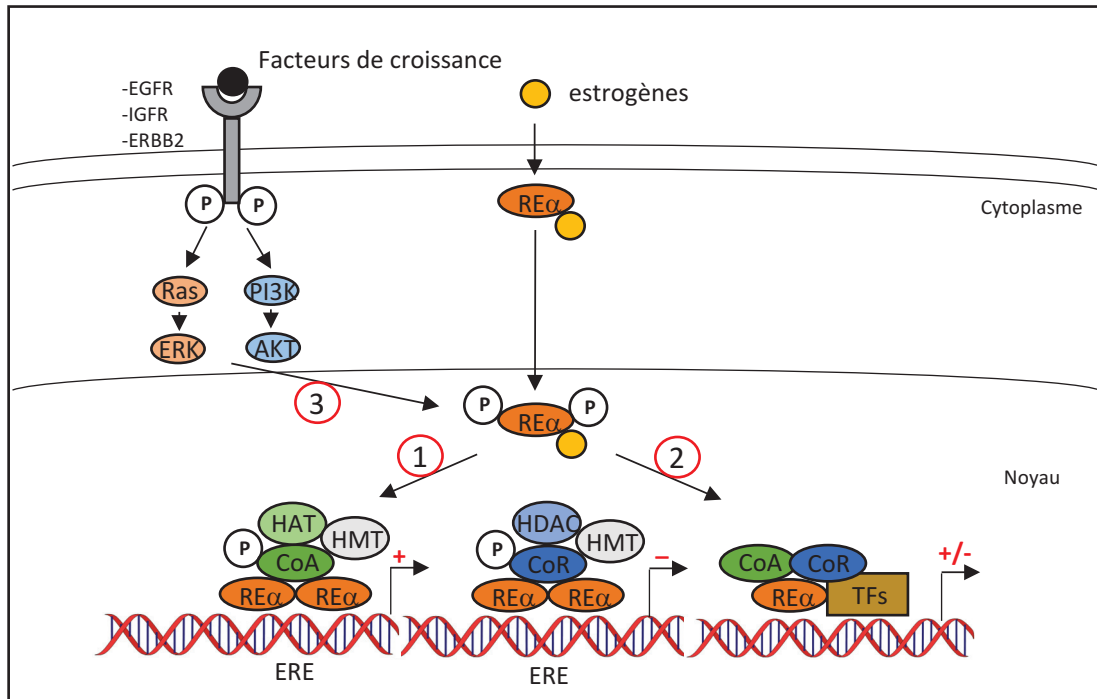


Figure 18 : Mode d'action du récepteur aux estrogènes. 1 : Voie génomique classique dépendante du ligand. 2 : Voie génomique indépendante des ERE. 3 : Voie génomique indépendante du ligand.

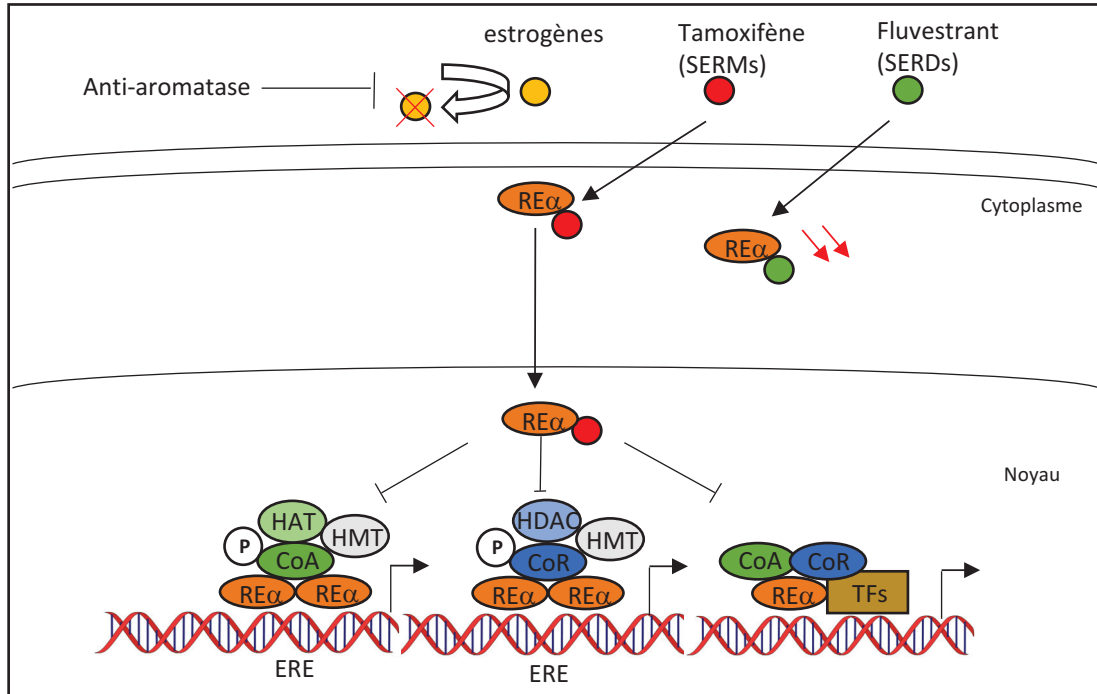


Figure 19 : Mécanismes d'action des différents traitements d'hormonaux thérapeutiques.

niveau des séquences spécifiques ERE, dans la région promotrice des gènes cibles. C'est via son domaine DBD que le RE α va interagir avec ces séquences ERE. Lorsqu'il est lié aux séquences ERE, le RE α recrute des co-activateurs, ou des co-répresseurs de la transcription au sein de complexes multi-protéiques qui vont réguler l'expression de ses gènes cibles. Parmi ces co-répresseurs et co-activateurs transcriptionnels, on retrouve différents facteurs de transcription ainsi que des protéines impliquées dans la modification des marques d'histones (Thomas & Gustafsson 2011). Bien que les séquences ERE soient souvent localisées dans la région proximale du promoteur des gènes cibles, il a été mis en évidence que le RE peut se lier fréquemment à des séquences activatrices (Ehnancer), dans des régions distales situées à plus de 5kb en amont du site d'initiation de la transcription (Carroll et al. 2006) (Figure 18).

II.B.3.b) Voie génomique indépendante des séquences ERE

En plus de son action en tant que facteur de transcription passant par la voie génomique classique dépendante des ERE, le RE est également capable d'interagir avec des éléments de réponses d'autres facteurs de transcription, comme ceux de Fos/jun (sites AP-1) (Kushner et al. 2000), SP-1 (Saville et al. 2000), ou encore NF- κ B (Biswas et al., 2005) et STAT5 (Fox et al., 2009). Cette propriété du RE permet d'expliquer la régulation estrogéno-dépendante de nombreux gènes, ne contenant pas d'EREs au niveau de leur région promotrice. Dans ce contexte, le RE agit comme un cofacteur transcriptionnel et ne lie pas directement l'ADN (Figure 18).

II.B.3.c) Voie génomique indépendante du ligand

Le RE α peut également exercer son activité transcriptionnelle en absence du ligand. En effet, des récepteurs aux facteurs de croissance tel que l'EGFR ou l'IGFR, induisent des cascades de phosphorylation impliquant différentes kinases, qui sont capable de phosphoryler et activer le RE α , indépendamment des estrogènes (Thomas & Gustafsson 2011) (Figure 18).

III.B.3.d) Voie non génomique

Il est connu que plusieurs récepteurs nucléaires, y compris le RE α , sont également localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules (Pedram et al. 2006). En plus du rôle exercé par le RE dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles dans le noyau des

cellules, celui-ci est également capable d'engendrer une signalisation rapide en interagissant avec plusieurs effecteurs des voies de signalisation cytoplasmiques localisés à la membrane plasmique des cellules. Le RE α localisé à la membrane plasmique va lier son ligand (E2) lui permettant d'interagir physiquement avec les protéines G mais aussi différentes kinases, tel que AKT, Src et PI3K, qui vont engendrer une cascade de phosphorylation en aval (Levin & Hammes 2016). De manière intéressante, il a été montré qu'en plus de la forme totale RE α -66, plusieurs formes tronquées de ce dernier, localisées en dehors du noyau des cellules existent dans différents organes. Il a notamment été rapporté que les isoformes RE α -46 (Li et al. 2003) et RE α -36 (Omarjee et al. 2016) sont localisés à la membrane plasmique dans plusieurs lignées cellulaires du cancer du sein. Dans plusieurs lignées cellulaires du cancer du sein, l'isoforme RE α -36 est capable d'activer les voies de signalisation MAPK/ERK et AKT/PI3K en réponse à une stimulation par les estrogènes, qui vont en retour augmenter la prolifération cellulaire et inhiber l'apoptose (Rao et al. 2011). L'isoforme RE α -46 est également impliquée dans les effets membranaires du récepteur, plus particulièrement dans les cellules endothéliales humaines. En effet, dans le contexte endothélial, le RE α -46 est notamment capable de former un complexe moléculaire à la membrane plasmique incluant c-Src, PI3K, AKT, et eNOS pour induire une signalisation estrogénique rapide notamment impliqué dans le processus de cicatrisation endothéliale (Kim & Bender 2009)(Adlanmerini et al. 2015).

II.B.4) Hormonothérapie : ciblage du RE dans le traitement du cancer du sein

Les principaux traitements du cancer du sein sont, en fonction de l'avancement de la maladie sont la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie. Comme nous avons pu le voir précédemment, les cancers du sein positif pour le RE sont les plus fréquemment observés. Dans ce sous type ER+, le développement du cancer du sein est largement associé à l'activité du RE (Group 2002). En réponse aux hormones stéroïdiennes, le RE va réguler positivement ou négativement l'expression d'un grand nombre de gènes, ce qui va conduire à une prolifération aberrante des cellules cancéreuses. C'est la raison pour laquelle, le RE est une cible majeure dans le traitement du cancer du sein. Cette approche thérapeutique visant à inhiber l'action du RE et des estrogènes, est plus communément

appelée thérapie endocrine ou hormonothérapie. Le ciblage de l'activité des estrogènes et du RE peut se faire à différents niveaux. C'est pourquoi, différentes thérapies endocrines sont approuvées dans le traitement du cancer du sein (Ignatiadis & Sotiriou 2013).

Plusieurs molécules anti-estrogéniques regroupées sous le terme SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulator), vont permettre de bloquer l'action du RE dans les cellules cancéreuses (Maximov et al., 2013). Depuis le début des années 70, un anti-estrogène connue sous le nom générique de Tamoxifène, est utilisé dans le traitement du cancer du sein en vue de bloquer l'action du RE. Il s'agit donc d'une référence en terme de thérapie endocrine depuis plus de trente ans, pour les patientes ayant un cancer du sein ER+. Son efficacité a été prouvée durant toutes ces années dans les cancers du sein, aussi bien à des stades précoces que tardifs. La forme médicamenteuse administrée aux patientes la plus couramment utilisée est le Novaldex ® (Clemons et al., 2002). Ces dernières années, plusieurs analogues du tamoxifène, tel que le raloxifène et le torémifène, ont permis d'améliorer l'efficacité thérapeutique de ces SERMs (Maximov et al. 2013). Toujours dans le cadre de l'hormonothérapie, les anti-aromatases vont bloquer la synthèse des estrogènes, constituant une autre alternative thérapeutique dans les cancers du sein ER+ (Ma et al., 2015). Enfin une dernière classe de molécules appelée SERDs (Selective Estrogen Receptor Downregulator), tel que le fluestrant ®, vont permettre de diminuer l'expression du RE, afin de réduire son activité (McDonnell et al., 2015) (Figure 19).

Malgré ce large éventail thérapeutique dans le traitement des cancers du sein ER+, les mécanismes de résistance à l'hormonothérapie sont plus que fréquents (Hart et al. 2015). De manière étonnante, dans la plupart des cancers du sein résistant à l'hormonothérapie, le RE est toujours actif et continue d'être exprimé. Plusieurs études ont montré que cette persistance de la signalisation estrogénique, implique de nombreux mécanismes, dont l'augmentation d'expression du RE lui-même et de ses co-activateurs, ou encore son interaction fonctionnelle avec différentes voies de signalisation altérées dans le cancer du sein (Osborne & Schiff 2011). Plusieurs mutations dans le gène *ESR1* sont également considérées comme des biomarqueurs prédictifs de résistance à l'hormonothérapie. En effet, il a notamment été montré récemment que la fréquence des mutations de *ESR1* est faible dans les tumeurs primaires, alors qu'elle est plus importante dans les cancers métastatiques, suggérant ainsi une expansion clonale des cellules présentant des mutations dans le gène *ESR1* suite au traitement anti-hormonal (Wang et al. 2016). De plus, il est également connu que la perte d'expression

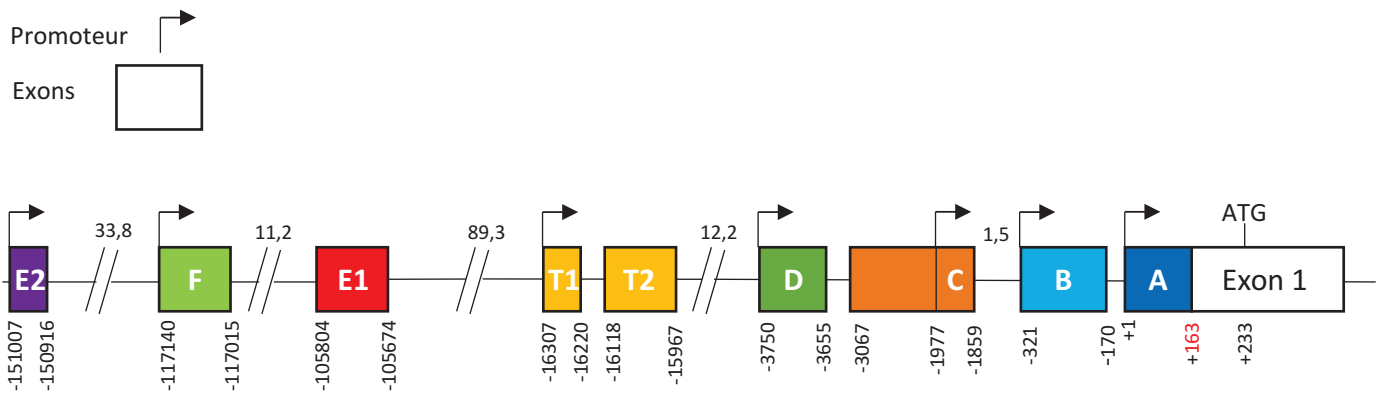


Figure 20 : Organisation génomique de la région promotrice du gène ESR1 selon la nomenclature de Ros et al, 2001. Représentation schématique de la localisation génomique des différents promoteurs (flèches), et des exons en amont (boîtes) dans la région 5'-UTR du gène ESR1. A chacun des exons a été attribué une lettre capitale, plus un numéro pour E1 et E2 . Les exons A, B, C et D et leur promoteur respectif constitue la partie proximale du promoteur de ESR1. L'expression des exons T1 et T2 est restreinte aux testicules, tandis que celle des exons E1 et E2 a été décrite comme spécifique au foie. Le chiffre indiqué en dessous de chaque exon représente la distance en paire de bases (pb) par rapport au site d'initiation de la transcription +1. La distance entre les différents exons est annotée en kilobases (kb). Tous les exons de la partie 5'-UTR annotés sur ce schéma subissent un épissage alternatif à partir d'un site d'acceptation d'épissage localisé à 163 pb en aval du site d'initiation +1 de la transcription. *Modifié d'après Ros et al, 2001.*

du RE au cours de la progression tumorale est un mécanisme de résistance à l'hormonothérapie. Cette conversion d'un statut ER+ vers un statut ER- doit être pris en considération dans le choix du traitement, car une étude montre qu'elle a été observée dans 15 à 20% des cancers du sein métastatiques résistants à l'hormonothérapie (Hoefnagel et al. 2012). Il est donc primordial de mieux comprendre les mécanismes qui régulent l'expression du RE α .

II.C) Régulation de l'expression du récepteur aux estrogènes α

L'altération du niveau d'expression du RE constitue une étape importante dans le développement du cancer du sein, et influence la réponse aux traitements anti-hormonaux. La concentration intracellulaire du RE résultent de la balance entre synthèse et dégradation de ce dernier (Nonclercq et al., 2004). De plus, de nombreux facteurs de transcription et facteurs épigénétiques sont impliqués dans la régulation de l'expression du RE. Je détaille par la suite les différents mécanismes par lesquelles ces différents facteurs vont réguler l'expression du RE au niveau de sa région promotrice.

II.C.1) Organisation génomique du promoteur du gène ESR1

Le gène humain *ESR1* est une large unité génétique qui s'étend sur une région de 300 kb, incluant la région codante de 140 kb contenant les 8 exons qui vont définir les domaines structuraux et fonctionnels du RE α (Ponglikitmongkol et al., 1988). Même si l'organisation de la région codante du gène *ESR1* est clairement décrite depuis longtemps, la région promotrice en amont de l'exon 1 présente une organisation complexe. Différentes analyses de criblage et de séquençage de banques d'ADNc, issues de lignées cancéreuses du sein et de différents tissus, ont identifié de nouveaux ARNm du RE α dont la taille varie dans la région 5'UTR (Grandien 1996)(Thompson, 1997)(Flouriot 1998). Ces différents ARNm sont issus de l'épissage alternatif de plusieurs exons localisés dans la région 5'-UTR du gène *ESR1*. Ces données ont suggéré qu'il existait donc différents promoteurs alternatifs dans cette région 5'-UTR contrôlant l'épissage et l'expression des transcrits du RE α (Koš et al., 2001). Néanmoins dans la littérature, de nombreuses discordances existent dans les terminologies utilisées, pour définir ces séquences promotrices en 5' du gène *ESR1*. En 2001, Kos et al ont suggéré une nomenclature générale inspirée des différentes études portant sur le promoteur de *ESR1* (Koš et al. 2001). Il est accepté que la transcription du gène *ESR1* est régulée par au

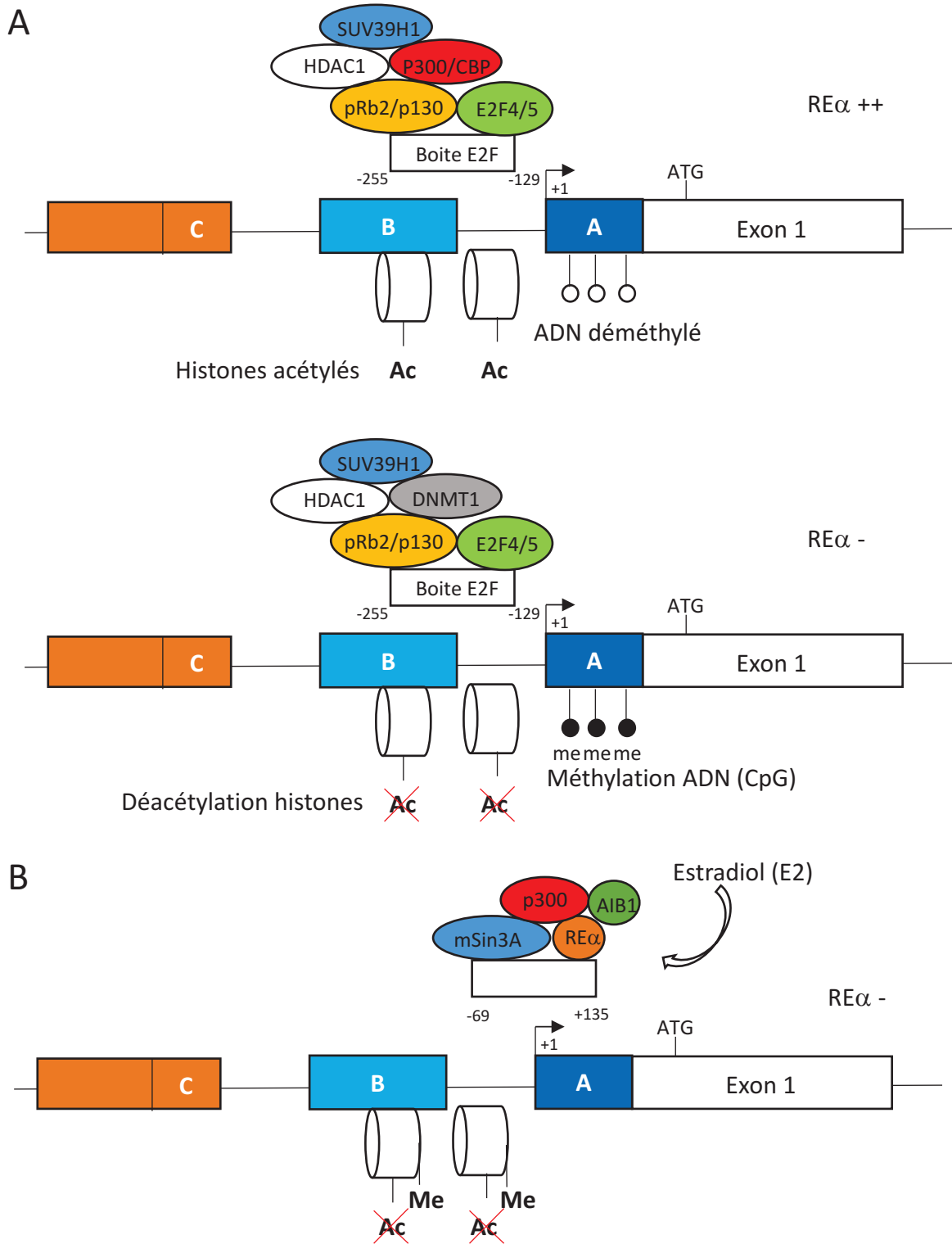


Figure 21 : Mécanismes épigénétiques régulant l'expression du RE α . (A) Modèle de régulation épigénétique de ESR1 selon lequel pRb2/p130 recrute HDAC1, SUV139H1 et une histone acétyltransférase p300/CBP au niveau du promoteur proximal du RE α dans les cellules ER+. Ce complexe permet l'acétylation des marques d'histones, qui entraîne une ouverture de la chromatine et le maintien de l'expression de ESR1. Dans les lignées cancéreuses négatives pour le RE α , ce complexe recrute la méthyle transférase DNMT1 qui modifie l'activité du complexe, entraînant une déacétylation des marques d'histones et une augmentation de la méthylation de l'ADN sur le promoteur du gène ESR1. La structure chromatinienne devient alors plus compact, ce qui réprime l'expression du RE α . (B) En réponse à la stimulation par les estrogènes, un complexe entre mSin3A et le RE α est recruté sur le promoteur proximal du gène ESR1 autour du site d'initiation +1 de la transcription pour réprimer l'expression du RE.

moins sept promoteurs présents dans différents transcrits, dont la région 5'-UTR (Figure 6). De plus, des études ont montré que l'expression de ces différents variants d'épissage du RE α semble être spécifique à certains tissus (Koř et al. 2001)(Figure 20).

En accord a cette complexité structurale du promoteur de *ESR1*, il n'est pas surprenant qu'un grand nombre de facteurs affectent l'expression du RE α dans le cancer du sein. Il a été montré que la signalisation hormonale, plusieurs facteurs de transcription ainsi que des effecteurs épigénétiques sont impliqués dans la régulation de l'expression du RE α .

II.C.2) Régulation épigénétique de l'expression du RE α

La méthylation de l'ADN fait partie des mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression du RE α . Il a été mis en évidence en premier lieu, que l'absence d'expression du RE dans les lignées cancéreuses mammaires ER-, était dû à une hyper méthylation des îlots CpG localisés en 5' du gène *ESR1* (Ottaviano et al. 1994). Il a été suggéré très tôt que cette hyperméthylation anormale conduisait à une inactivation transcriptionnelle du RE α , à l'origine de la résistance au traitement anti-hormonale (Lapidus et al. 1998). Par la suite les mécanismes moléculaires de cette hyperméthylation ont été mise en évidence. Il a notamment été montré que l'utilisation du 5-aza-2'-cytidine (5-aza-dC) qui inhibe l'action de la méthyl-transférase DNMT1 (DNA methyl-transférase 1) entraînait une déméthylation au niveau du promoteur de *ESR1* dans des lignées cancéreuses du sein (Ferguson et al., 1997). De plus, l'utilisation de cet inhibiteur 5-aza-dC dans la lignée cancéreuse mammaire ER-, MDA-MB-231, permet de ré-exprimer le RE α (Ferguson, 1995).

La déacétylation du promoteur de *ESR1* est également impliquée dans la régulation de l'expression du RE α . Il a d'abord été mis en évidence que le traitement de lignées cancéreuses mammaires ER- avec la TSA (trichostatin A), un inhibiteur des HDACs, entraînait une augmentation d'expression des ARNm du RE (Yang et al., 2000). Par la suite, Kawai et al, ont montré que la surexpression de la déacétylase HDAC1 dans la lignée de cancer du sein ER+ MCF7 , diminuait l'expression du RE α (Kawai, 2003). Par la suite, l'occupation de deux complexes multimoléculaires impliquant HDAC1, a été mis en évidence sur le promoteur du gène *ESR1*. Macaluso et al, ont montré que les complexes moléculaires pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-p300 et pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-DNMT1-

SUV39H1 régulaient l'expression du RE α dans les cellules MCF7 (Macaluso, 2003). Ces complexes moléculaires lient une boîte de liaison du facteur E2F sur le promoteur de *ESR1*, située 100 à 200pb en amont du site d'initiation +1 de la transcription (Macaluso et al., 2007). Ces complexes impliquant une compétition entre des HATs, des HDACs et des DNMTs, vont modifier les marques d'acétylation des histones et de méthylation de l'ADN sur le promoteur de *ESR1*, pour activer ou réprimer son expression. Enfin, une autre étude montre qu'un complexe dans lequel la protéine d'échafaudage mSin3A associée à HDAC1 et au RE α , occupe le promoteur de *ESR1* au niveau du site d'initiation +1 de la transcription (Ellison-Zelski et al., 2009). L'implication de ce complexe dans la modification des marques histones n'est pas clairement établie, mais il semblerait que celui-ci entraîne une diminution de certaines marques d'acétylation (AcH3K14), et une augmentation des marques de méthylation (H4K20me3). De plus, il a été montré que la liaison de ce complexe répressif sur le promoteur proximal de *ESR1* était dépendante de la signalisation estrogénique (Ellison-Zelski, 2009).

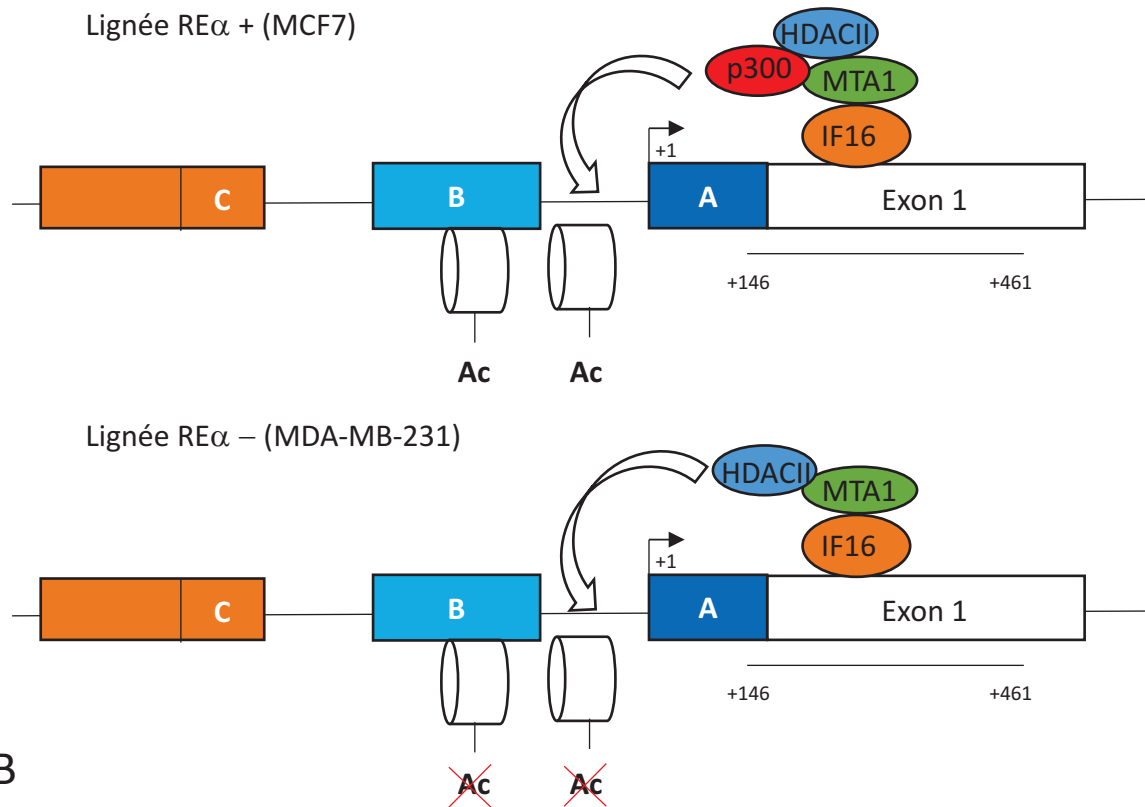
Toutes ces études montrent le rôle prédominant des HDACs et des DNMTs dans la régulation de l'expression du RE α . Il a donc été suggéré que ces différentes enzymes pourraient être des cibles thérapeutiques intéressantes. L'entinostat (ENT), un inhibiteur des HDACs, a montré son efficacité dans le cancer du sein, *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Sabnis et al. 2011) (Figure 21).

II.C.3) Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression du RE α

Plusieurs facteurs de transcription régulant l'expression du RE α , ont été identifiés pour occuper le promoteur de *ESR1*. Ces facteurs de transcription peuvent réguler l'expression du RE α de manière directe en interagissant avec des séquences consensus au niveau de l'ADN, ou ils peuvent également permettre le recrutement de complexe épigénétique (Figure 22).

Parmi ces facteurs de transcription, il a été montré que la protéine MTA1 (metastasis associated protein 1), connue pour être surexprimée dans les cancers du sein métastatiques, joue le rôle de régulateur transcriptionnel du RE α . En fonction du contexte cellulaire, MTA1 peut réguler positivement ou négativement la transcription du RE α . Dans la lignée cellulaire ER+ MCF7, MTA1 s'associe au facteur de transcription TFAP2C pour réguler positivement

A



B

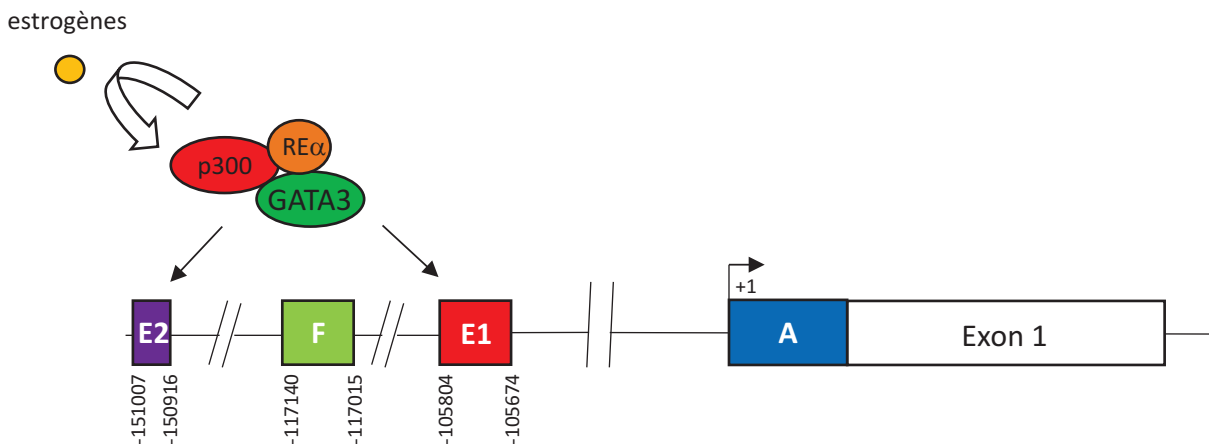


Figure 22 : Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression du RE α . (A) Illustration schématique des mécanismes moléculaires par lesquels le facteur de transcription MTA1 régule l'expression du RE α dans les cellules ER + et ER-. (B) Modèle hypothétique selon lequel GATA3 régulerait positivement l'expression du Re α , en recrutant un complexe multiprotéique incluant le RE α et p300 au niveau de deux séquences activatrices dans la région distale du promoteur de ERS1, en réponse aux estrogènes.

l'expression du RE α . Ces facteurs de transcription semblent occuper la partie proximale du promoteur et l'exon 1 du gène *ESR1*. En revanche, dans la lignée cellulaire ER- MDA-MB-231, MTA1 et IFI16 forme un complexe répressif contribuant à la perte d'expression du RE α , et conduisent à l'acquisition d'une résistance au traitement anti hormonale (Kang et al. 2014). Il a été montré que MTA1 était capable d'interagir avec plusieurs membres de la famille des HDACs (Reddy et al. 2012). C'est pourquoi, Kang et al, émettent l'hypothèse que cette régulation de l'expression de *ESR1* dépendante de MTA1, pourrait faire intervenir des complexes protéiques impliqués dans la modification des marques d'acétylation des histones.

Le facteur de transcription GATA3, dont l'expression est fortement corrélée à celle du RE α dans les cancers du sein, joue également un rôle crucial dans le maintien de l'expression du RE α (Lacroix & Leclercq 2004). Eeckhoute et al, ont montré que dans la lignée ER+ T47D, GATA3 était capable de se lier au niveau d'une séquence activatrice (Enh1) dans la région distale du promoteur du gène *ESR1* (Eeckhoute et al. 2007). De plus, il semblerait que cette régulation positive de l'expression du RE α soit dépendante de la signalisation estrogénique. Dans cette étude, il est montré qu'il existe une boucle de rétrocontrôle positif par laquelle le RE α et GATA3, maintiennent tous deux leur niveau d'expression. Il a également été mise en évidence que le suppresseur de tumeur p53 est capable d'occuper le promoteur proximal du gène *ESR1* pour permettre de maintenir l'expression de ce dernier (Shirley et al. 2009). Tout comme pour GATA3 et le RE α , la perte d'expression de p53 dans le cancer du sein corrèle avec un mauvais pronostic (Mair et al. 2016). Deux autres facteurs de transcription de la famille FOX (Forkhead box), FOXO3A et FOXM1, semblent coopérer pour réguler l'expression du RE α (Guo & Sonenshein 2004)(Madureira et al. 2006).

L'implication du facteur de transcription TWIST dans la régulation de l'expression du RE α , a également été rapportée (Vesuna et al. 2012). Le facteur de transcription TWIST lie le promoteur du RE α , et permet le recrutement d'un complexe multiprotéique incluant l'histone déacétylase HDAC1, et l'ADN méthyle-transférase DNMT3B. Ces deux facteurs épigénétiques vont contribuer à la compaction de la chromatine dans la région promotrice, et ainsi diminuer la transcription du RE α .

Comme nous avons pu le voir, de nombreuses protéines impliquées dans la modification des marques d'histones, la méthylation de l'ADN, et plusieurs facteurs de transcription régulent l'expression du RE α . Des études ont montré que la perte d'expression du RE dans les cancers du sein métastatiques, préalablement traités par hormonothérapie, est un phénomène courant (Kuukasjarvi et al., 1996)(Broom et al. 2009). Cette diminution d'expression du RE dans les métastases par rapport à la tumeur primaire constitue un facteur de mauvais pronostic. C'est pourquoi, il est donc important de comprendre les mécanismes et d'identifier les facteurs à l'origine de cette diminution d'expression du RE. De plus, d'autres mécanismes, tel que les modifications post-traductionnelles du RE α sont également impliqués dans les dérégulations de son expression (Le Romancer et al. 2011).

III) Gène MEN1 et Syndrome des Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1

III.A) Généralités

Le syndrome des néoplasies endocriniennes multiples de type 1, plus communément appelé syndrome des NEM1 (OMIM#131100), est une maladie héréditaire qui se caractérise par l'apparition de tumeurs dans différents organes endocrines, tel que les glandes parathyroïdes, le pancréas endocrine et l'antéhypophyse (Brandi et al. 2001). La prévalence est d'environ 1/30 000 personnes. Ce syndrome familial se transmet au cours des différentes générations sur un mode autosomique dominant. Néanmoins, le syndrome peut aussi se développer de manière sporadique. Il est dû à des mutations dans le gène suppresseur de tumeur *MEN1*. Plus rarement, d'autres lésions endocrines ou non peuvent aussi survenir dans le cas de ce syndrome NEM1, incluant des tumeurs des corticosurrénales, carcinoïdes des bronches, du tube gastro-intestinal et du thymus, ainsi que des lipomes, des angiofibromes et des collagénomes (Falchetti et al. 2009) (Tableau 4).

Syndrome MEN1			
Tumeurs endocrines	Pénétrance	Tumeurs non-endocrines	Pénétrance
Hyperparathyroïdie	90-100%	Angiofibromes faciaux	85%
Tumeurs gastro-entéro-pancréatiques :		Collagénomes faciaux	70%
-Gastrinomes	40%	Lipomes	30%
-Insulinomes	10%	Léiomyomes	10%
-Non-fonctionnelles	20%	Méningiomes	5%
-Glucagonome, VIPomes, Somatostatинomes	2%	Ependydomes	1%
Adénomes antéhypophysaires :		Phéochromocytomes	<1%
- Prolactinomes	20%		
- Autres (GH, ACTH, Non fonctionnels)	17%		
Tumeurs endocrines associées			
Tumeurs corticosurréaliennes	25%		
Tumeurs carcinoïdes neuroendocrines :			
Gastriques	10%		
Thymiques	2%		
Bronchiques	2%		

Tableau 4: Atteintes cliniques associées au Syndrome MEN1, et pénétrance estimée des lésions à l'âge de 40 ans. *Inspiré de Brandi et al, 2001.*

III.B) Atteintes cliniques : les tumeurs endocrines

III.B.1) Tumeurs des glandes parathyroïdes

Les atteintes parathyroïdiennes constituent la première manifestation de la maladie chez une majorité des patients atteints du syndrome des NEM1 (90%) (Falchetti et al. 2009). On peut parler d'une pénétrance quasi complète dans le cas des atteintes des glandes parathyroïdiennes, chez l'homme comme chez la femme. L'âge d'apparition de ces lésions est très précoce, car c'est généralement entre 10 et 25 ans que se manifeste une hyperparathyroïdie asymptomatique (Piecha et al., 2010). L'hyperparathyroïdie va ensuite progresser lentement. Ce n'est généralement qu'après 50 ans que ces lésions bénignes vont se manifester d'un point de vue clinique, associée notamment à une hypercalcémie. L'approche thérapeutique admise est généralement la parathyroïdectomie. Ces tumeurs n'évoluent que dans de rares cas en carcinomes qui vont présenter des capacités invasives et métastaser (Sato et al. 2000).

III.B.2) Tumeurs hypophysaires

Des atteintes hypophysaires vont se produire chez 15 à 40% de patients atteints du syndrome NEM1 (Falchetti et al. 2009). Il est important de noter que ces lésions à l'hypophyse touchent plus les femmes que les hommes. Ce sont généralement les tumeurs hypophysaires qui engendrent les premiers symptômes cliniques du syndrome des NEM1 (Syró et al. 2012). L'hypophyse est composée de plusieurs contingents cellulaires qui produisent et sécrètent une large gamme d'hormones différentes (PRL, GH, ACTH,...), donnant lieu à différents types de tumeurs mono ou multi-hormonales et plus ou moins différenciées. Dans le cas du syndrome des NEM1, il est estimé que 65 à 85% des tumeurs sont des macroadénomes hypophysaires plurihormonaux, majoritairement des prolactinomes (Syró et al. 2012)(Verges et al., 2014).

III.B.3) Tumeurs gastro-entéro-pancréatiques

Ces tumeurs gastro entéro pancréatiques (GEP) incluent les tumeurs neuroendocrines de l'estomac, du duodénum, du pancréas et du tractus intestinal (Klöppel et al., 2004). Parmi les tumeurs GEP les plus fréquemment observées dans le cas du syndrome MEN1, on retrouve les gastrinomes et les insulinomes qui se développent respectivement chez environ

40% et 20% des patients (Falchetti et al. 2009). D'autres tumeurs tel que les glucagonomes, somatostatineomes et VIPomes, sont observées beaucoup plus rarement, dans moins de 2% des cas (Wong et al., 2000). Ces tumeurs sont complexes, car en fonction de leur statut de différenciation, elles vont entraîner une sécrétion plus ou moins importante d'hormones, à l'origine de différents symptômes cliniques.

III.C) Le gène *MEN1*

Le gène *MEN1*, gène de prédisposition au syndrome des NEM1, a été identifié pour la première fois en 1997 par clonage positionnel (Chandrasekharappa et al. 1997). Ce gène localisé sur le chromosome 11q13, est considéré depuis longtemps comme un suppresseur de tumeur dans les organes endocrines. Néanmoins, depuis plus d'une dizaine d'année le rôle de ce gène s'est révélé beaucoup plus complexe en dehors du champ des organes endocrines. En effet, il est clairement établi que celui-ci va jouer un rôle oncogénique dans les leucémies. De plus comme nous le verrons par la suite, son rôle dans la tumorigénèse d'autres organes, tel que la glande mammaire et la prostate émerge, mais reste encore très controversé (Figure 23).

III.C.1) Evolution et conservation entre les espèces

Le gène *MEN1* est largement conservé entre les espèces chez les mammifères, et notamment entre l'homme et la souris (Guru et al. 1999). Les fortes similarités de séquence entre l'homme et la souris sont appuyées par le fait, que l'inactivation du gène *Men1* à l'état hétérozygote (*Men1*^{+/-}) chez la souris, phénotypie le syndrome NEM1 observé chez l'homme (Crabtree et al. 2001)(Bertolino et al., 2003). De plus, des orthologues du gène *MEN1* sont présents chez le zebrafish (Manickam et al. 2014) et *Drosophila Melanogaster* (Guru et al. 2001). En revanche le gène est absent chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Caenorhabditis elegans*, suggérant qu'en terme d'évolution des espèces, ce gène est relativement « jeune ». Cependant, malgré l'origine récente de ce gène, il est indispensable à la vie. En effet les souris nullyzygotes pour le gène *Men1* (*Men1*^{-/-}) meurent prématurément au cours du développement embryonnaire entre E11.5 et E13.5, associé à des atteintes dans de multiples organes (Bertolino et al., 2003).

III.C.2) Les transcrits du gène MEN1

Le gène *MEN1* qui s'étend sur une région de 7,2 kb, est composé de 10 exons. Le premier exon, ainsi que la partie distale de l'exon 10 sont des régions non-codantes du gène. La séquence codante du gène *MEN1* est composée au total de 1830 pb. Deux transcrits du gène *MEN1* ont été identifiés chez l'homme. Un premier transcrit de 2,8 kb est exprimé dans la plupart des organes, l'autre transcrit de 4,2 kb est exprimé spécifiquement dans le thymus et le pancréas (Lemmens et al. 1997). Chez la souris, le gène *Men1* est localisé sur le chromosome 19, et présente une organisation intron-exon similaire à celle retrouvée chez l'homme. Chez la souris, deux transcrits différents du gène *Men1* ont été identifiés (2,8 et 3,2 kb). Ces deux transcrits sont exprimés dans la plupart des tissus à l'exception du tissu musculaire squelettique (Stewart et al. 1998).

III.C.3) Les mutations du gène MEN1

Jusqu'à présent plus de 1000 mutations germinales et 200 mutations sporadiques du gène *MEN1* ont été identifiées, au travers des nombreuses études cliniques réalisées chez les patients NEM1 (Lemos et al, 2000). Des LOH conduisant à la perte du gène *MEN1* sont presque systématiquement observées dans les tumeurs développées chez les patients NEM1 mais aussi dans les tumeurs sporadiques (Lubensky et al. 1996). De plus, des analyses récentes du séquençage de l'exome, portant sur une large série de tumeurs neuroendocrines pancréatiques, ont mis en évidence que le gène *MEN1* était muté dans plus de 40% des tumeurs analysées (Jiao et al. 2011). En accord avec la fonction oncosuppressive du gène *MEN1*, ces mutations sont largement décrites comme des mutations inactivatrices. Néanmoins, même si un grand nombre de mutations du gène *MEN1* ont été décrites, aucune corrélation entre génotype et phénotype n'a pu être établie (Wautot et al. 2002). Cette difficulté à établir une corrélation entre le statut mutationnel du gène *MEN1* et le phénotype affiché chez le patient, réside très probablement dans la difficulté à comprendre le rôle biologique de la protéine menin, codée par le gène *MEN1*.

III.D) Implication du gène *MEN1* dans les tissus hormono-dépendants

III.D.1) Syndrome NEM1 et prédisposition au cancer du sein

En 2014 a été publié un article, montrant que les patientes atteintes du syndrome NEM1 présentaient un risque certes faible mais significatif de développer un cancer du sein par rapport à la population générale (Dreijerink et al., 2014). Cette étude a été menée sur trois grandes cohortes de patientes atteintes du syndrome NEM1, incluant un total 675 individus. Il s'agit donc ici d'une étude robuste, de laquelle il ressort concrètement que les mutations du gène *MEN1* prédisposent les patientes au cancer du sein. Car en effet, ils ont pu mettre en évidence une diminution d'expression de menin par des analyses immunohistochimiques dans un nombre significatif (8/10) de cancers du sein développés chez les patientes NEM1, dans une cohorte allemande. De plus, des analyses de séquençage de l'ADN issues des tumeurs du sein des patientes NEM1, ont révélé des LOH fréquentes au niveau du locus codant pour le gène *MEN1*. Jusqu'à la publication de cette étude, seulement quelques cas isolés de patientes NEM1 avaient été rapportés comme ayant un risque plus important de développer un cancer du sein (Honda et al. 2004)(Naito et al. 2006).

Ces données obtenues chez la femme viennent conforter les résultats précédemment obtenus par notre groupe sur le rôle oncosuppressif du gène *MEN1* dans le cancer du sein. Il a été montré auparavant que les souris hétérozygotes *Men1*^{+/-} développaient des cancers du sein à des âges avancés, dans lesquelles l'expression du gène *Men1* était perdue (Bertolino et al., 2003). Par la suite, Seigne et al, ont montré que l'inactivation du gène *Men1* spécifiquement dans les cellules épithéliales de la glande mammaire chez la souris, conduit au développement de lésions précancéreuses, appelés néoplasies intraépithéliales mammaires (Seigne et al. 2013). Très récemment, une étude de séquençage portant sur une large série de 560 cancers du sein, a révélé des mutations sporadiques du gène *MEN1*, décrites comme des « driver mutation » (Nik-Zainal et al. 2016). Néanmoins, il est important de souligner que la fréquence des mutations du gène *MEN1* est très faible dans les cancers du sein humain.

*III.D.2) Emergence du rôle du gène *MEN1* dans le cancer de la prostate*

Les mutations du gène *MEN1* sont également de plus en plus considérées dans le cancer de la prostate. Il y a une dizaine d'année, notre groupe avait considéré le rôle du gène

MEN1 dans le cancer de la prostate. En effet, Seigne et al ont montré que 12,8% des souris hétérozygotes *Men1*^{+/-} parmi une cohorte de 47 souris, développaient des cancers de la prostate au delà de 18 mois (Seigne et al. 2010). Plus précisément, dans les souris *Men1*^{+/-} analysées, il a été mise en évidence la présence de 2 adénocarcinomes et 4 carcinomes *in situ*, présentant tous une diminution drastique de l'expression de menin.

Dans le contexte du syndrome NEM1, peu de données sont disponibles concernant une possible association entre le syndrome et la prédisposition à développer un cancer de la prostate. Une seule étude clinique révèle que dans une famille allemande, certains patients présentant un passé d'hyperparathyroïdie ont développé des tumeurs atypiques, avec parmi celles-ci des tumeurs de la prostate chez les hommes de la famille (Perakakis et al. 2016). En revanche, de manière intéressante, une étude du séquençage de l'exome réalisée sur une série de 147 CRPC a révélé une mutation ponctuelle sporadique du gène *MEN1* (Grasso et al. 2012).

Les données concernant les mutations du gène *MEN1* dans le cancer de la prostate et du sein sont encore très rares dans la littérature. Néanmoins, plusieurs indices issus de l'étude des modèles murins et des analyses de séquençage réalisées chez l'homme, indiquent qu'il semble intéressant de se pencher sur le rôle du gène *MEN1* dans la cancérogénèse de la prostate.

III.E) La protéine Menin

III.E.1) Généralités

Le gène *MEN1* code pour une protéine nommée menin. Menin est une protéine composée de 610 acides aminés dont la séquence est conservée de la drosophile à l'homme. La protéine menin est exprimée de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus et lignées cellulaires, aussi bien endocrines que non endocrines, au cours du développement embryonnaire et de la vie adulte, chez l'homme (Wautot et al.,2000) et la souris (Stewart et al 1998 ©). La localisation de la protéine menin est majoritairement nucléaire, même si plusieurs études ont rapporté que la protéine menin peut aussi être localisée dans le cytoplasme ainsi qu'à la membrane cytoplasmique des cellules, en témoigne ces différents

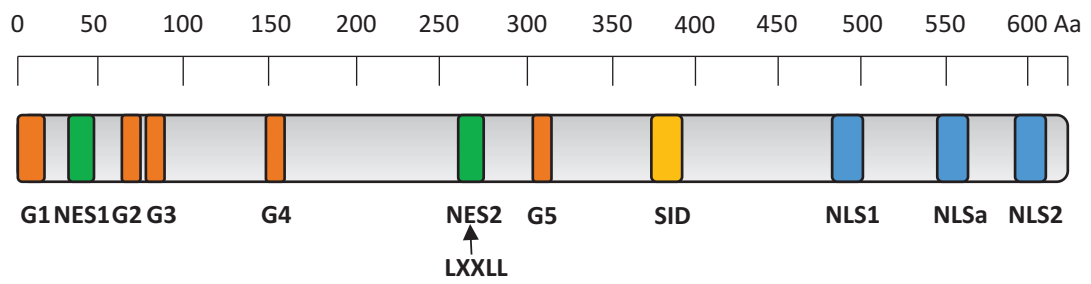


Figure 23 : Structure de la protéine menin. Représentation schématique des différents motifs de la protéine menin.

partenaires impliqués dans les grandes voies de signalisation cellulaires (Matkar et al., 2013)(He et al. 2016).

Les rôles biologiques joués par la protéine menin dans l'organisme sont nombreux et complexe. Il a notamment été montré que la protéine menin joue un rôle crucial dans différents processus cellulaires tel que, l'hématopoïèse, l'adipogénèse, la myogénèse, ou encore l'ostéogénèse. Dans le contexte du syndrome NEM1, il est clairement établi que la protéine menin joue un rôle anti-tumoral aussi bien dans les cellules endocrines, que dans les cellules non endocrines. Néanmoins, en dehors du contexte endocrine, les connaissances autour des fonctions jouées par cette protéine sont encore parfois controversées.

III.E.2) Structure de la protéine

Même si la protéine menin ne présente aucune homologie de séquence avec une autre protéine connue, elle possède néanmoins des motifs protéiques que l'on peut qualifier de communs (Figure 23). Parmi ces motifs on retrouve :

-Des séquences de localisation nucléaire appelées NLS. Parmi ses NLS, deux séquences NLS dites classiques, NLS1 et NLS2, ont été identifiées dans la partie C-terminale de la protéine, et semblent être indispensables à sa localisation nucléaire. Toujours dans cette même région C-terminale, un domaine NLS dit accessoire, NLSa, a également été identifié. Via ces séquences NLSs, menin est capable d'interagir directement avec l'ADN, indépendamment de la séquence d'ADN, sans motif particulier (La et al. 2006).

-Deux séquences fonctionnelles d'export nucléaire, appelées NES. La première séquence NES (NES1) s'étend des acides aminés 33 à 41 dans la séquence humaine et murine de la protéine, et la deuxième séquence NES (NES2) est comprise entre les acides aminés 258 et 267. Ces séquences permettant à la protéine de naviguer entre le noyau et le cytoplasme de la cellule, pourraient en partie expliquer sa localisation cytoplasmique.

-Un domaine SID (mSin3A-interacting domain), qui s'étend des acides aminés 371 à 387. Celui-ci permet l'interaction entre menin et mSin3A, un corépresseur transcriptionnel recrutant les histones déacétylases HDACs.

-Un motif LXXLL, acides aminés 263 à 267. Ce type de motif est présent sur un large nombre de facteurs de transcription et de cofacteurs, permettant de réguler positivement ou négativement l'activité transcriptionnelle. Dans le cas de la protéine menin, il a été rapporté

que ce domaine lui permet d'interagir avec le récepteur aux estrogènes, un récepteur nucléaire jouant un rôle prépondérant dans la cancérogénèse mammaire.

-Cinq sites prédits caractéristiques d'une activité guanosine triphosphatase (GTPase), nommés G1 à G5.

III.E.3) Menin au cœur de la régulation transcriptionnelle

Initialement, l'absence d'homologie avec aucune autre protéine connue, n'a pas permis de définir clairement les fonctions cellulaires de cette protéine menin. C'est la raison pour laquelle, de nombreux efforts ont été consentis pour identifier les partenaires de menin, dans le but de mieux comprendre le rôle joué par cette protéine. Beaucoup de partenaires de menin ont été identifiés ces vingt dernières années. Ces partenaires de menin peuvent être classés en quatre grandes catégories : les activateurs transcriptionnels, les répresseurs transcriptionnels, les effecteurs des voies de signalisation et les protéines impliquées dans le maintien de la structure de la cellule. Même si l'identification de tous ces partenaires ont permis d'avancer dans la compréhension des fonctions cellulaires de menin, son rôle reste néanmoins complexe dans la tumorigénèse des différents organes. De plus, il a été montré que menin est distribué de manière large sur le génome, où cette protéine interagit sur des milliers de sites différents de la chromatine (Scacheri et al. 2006). C'est pourquoi, il est clairement établi aujourd'hui, que menin joue le rôle de protéine d'échafaudage, au sein de plusieurs complexes protéiques régulant positivement ou négativement l'expression génique.

III.E.3.a) Menin : un acteur majeur du complexe MLL/COMPASS-like

Une étude de purification de protéines *in vitro* dans une lignée érythroleucémique (cellules K562), a permis de mettre en évidence pour la première fois en 2004, une interaction physique entre menin et les membres du complexe MLL/COMPASS-like (Yokoyama et al., 2004). Cette interaction a laissé suggérer que menin jouait un rôle d'activateur transcriptionnel au sein de ce complexe MLL/COMPASS-like. Néanmoins, plusieurs études révèlent que le rôle de menin au sein de ce complexe est très dépendant du contexte cellulaire, et exerce une action tissu-spécifique.

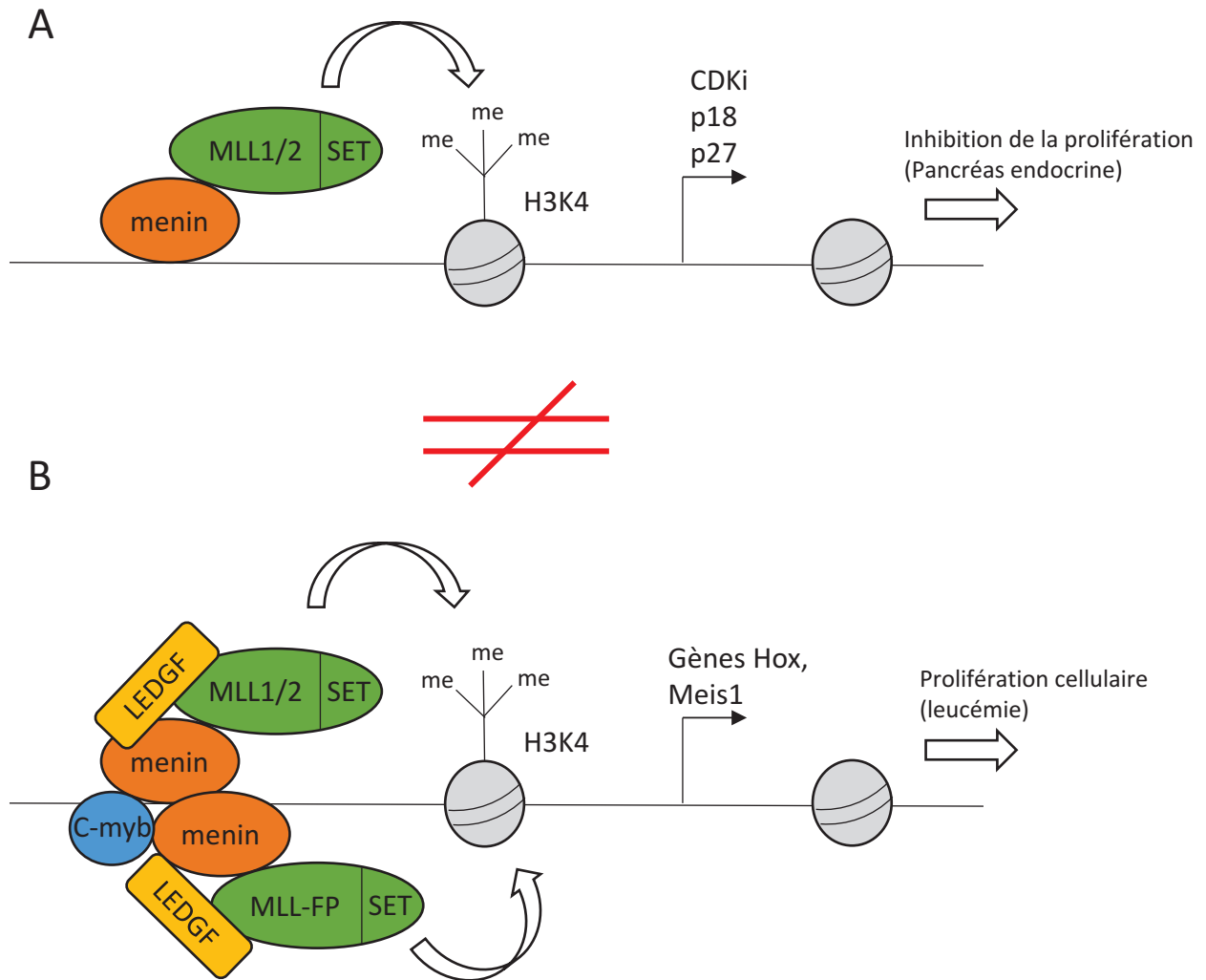


Figure 24 : Menin : activateur transcriptionnel au sein du complexe HMT COMPASS-like. La protéine menin agit comme une protéine d'échaffaudage au sein du complexe HMT COMPASS, et régule l'expression de gènes cibles spécifiques au sein de différents tissus. (A) Dans le pancréas endocrine, la protéine menin interagit avec MLL1 et MLL2 pour jouer un rôle de suppresseur de tumeurs, en régulant positivement l'expression des inhibiteurs de cyclines p18 et p27. (B) Dans les cellules leucémiques, menin est capable de recruter la forme sauvage de MLL, ainsi que les protéines de fusion MLL-FP pour réguler positivement l'expression de plusieurs gènes, dont les gènes pro-prolifératifs de la famille Hox. *Inspiré D'après Matkar et al, 2013.*

Dans le pancréas endocrine, il a été montré que menin en interagissant avec la protéine MLL1 (KMT2A), un membre du complexe COMPASS-like, régulait l'expression de deux inhibiteurs des cyclines dépendantes des kinases (CDKIs), p18^{INK4C} et p27^{Kip1} (Milne et al. 2005). En effet, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine dans des cellules tumorales d'îlots pancréatiques MIN6 et des MEFs, ont mis en évidence que menin était capable de se lier au promoteur des gènes p18^{INK4C} et p27^{Kip1}, favorisant ainsi la méthylation des marques d'histones H3K4 (Karnik et al. 2005). De plus il a été montré que l'expression de p18^{INK4C} et p27^{Kip1} était diminuée dans les insulinomes développés dans les souris *Men1*^{+/-} (Karnik et al. 2005). Ces données ont montré que menin semblait exercer en partie sa fonction oncosuppressive dans le pancréas endocrine, via son interaction avec le complexe MLL/COMPASS-like (Figure 24A).

Dans les leucémies, le gène *MLL1* situé sur le chromosome 11q23, subit fréquemment des translocations chromosomiques qui vont conduire à l'expression de différentes protéines de fusion, nommées MLL-FPs (Slany 2005). Dans les leucémies aiguës, les oncoprotéines MLL-FPs ainsi générées, vont conduire à une activation constitutive des gènes de la famille HOX (gènes à homéodomaines) (Hess 2004). Plusieurs études ont montré l'implication de menin dans la régulation positive de l'expression des gènes *HOX*. En effet, Yokoyama et al. ont mis en évidence que menin interagissait avec différentes MLL-FPs dans des progéniteurs myéloïdes transformés, afin d'induire l'expression des oncogènes *HOXA7*, *HOXA9* et *HOXA10* (Yokoyama et al., 2005). Plus récemment, Yokoyama et al ont également rapporté que menin joue un rôle indispensable de protéine adaptatrice permettant l'interaction entre les MLL-FPs et la protéine LEDGF. Ce ménage à trois entre menin, MLL et LEDGF semble indispensable au recrutement de ce complexe HMT au niveau des promoteurs des gènes *Hoxa9* et *Meis1* dans les cellules hématopoïétiques, chez la souris (Akihiko et al., 2008). Dans ce contexte, il a été montré que menin en interagissant avec MLL et les MLL-FPs, va participer à la leucémogénèse (Figure 24B).

Plus récemment, l'élucidation de la structure cristallographique de menin a permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires de cette protéine (Murai et al., 2011)(Huang et al. 2012). Ces analyses cristallographiques ont permis de mettre en évidence une interaction directe et de forte affinité, entre menin et la partie N-terminale de la protéine MLL1. La découverte des motifs protéiques structuraux impliqués dans cette interaction, a ouvert le champ au développement d'inhibiteurs spécifiques de menin. Ces inhibiteurs avaient

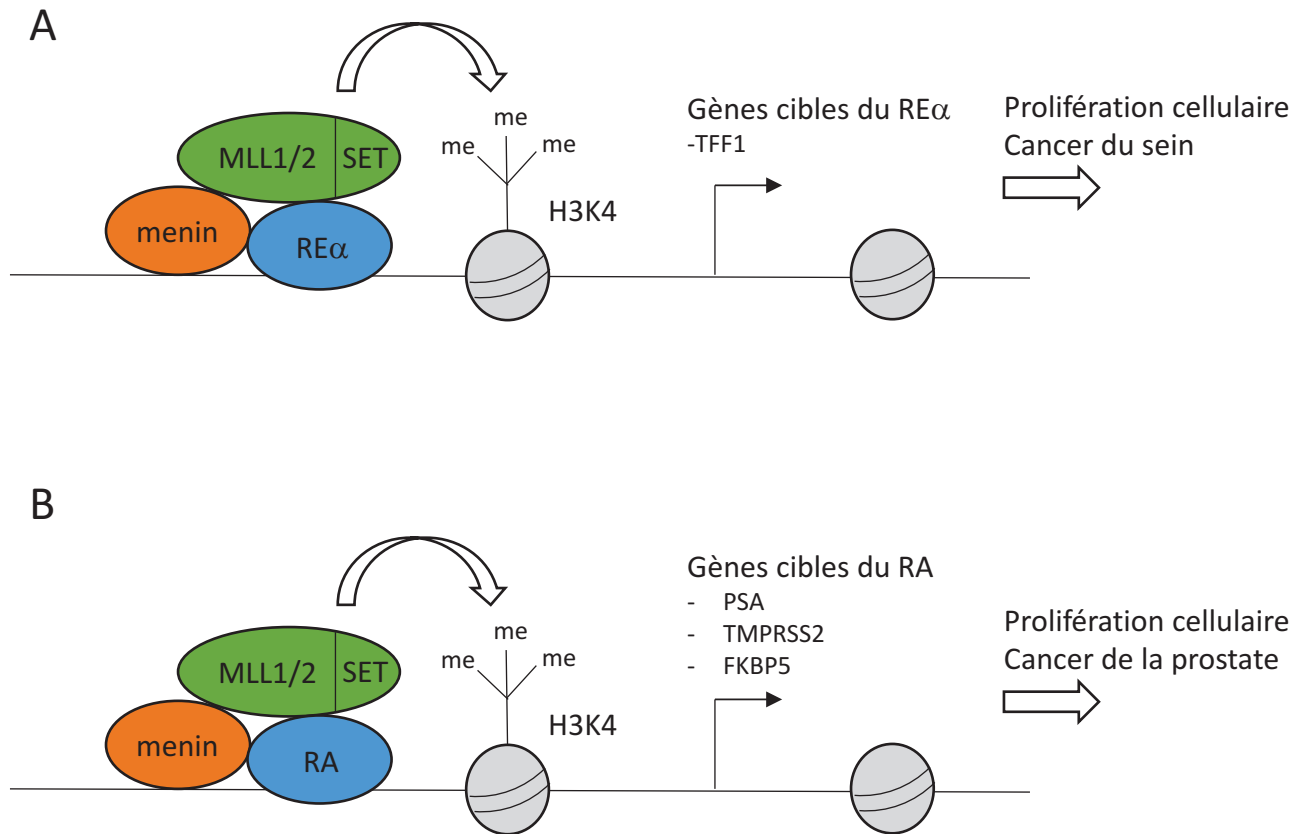


Figure 25 : Interaction entre menin et les récepteurs nucléaires aux hormones : rôle fonctionnel au sein du complexe HMT COMPASS-like. (A) Dans les lignées cancéreuses mammaires, menin interagit avec le RE α et permet le recrutement du complexe HMT COMPASS sur les gènes cibles du RE. (B) Dans les lignées cancéreuses de la prostate, menin interagit avec le RA permettant le recrutement du complexe HMT COMPASS sur le promoteur des gènes cibles du RA. Cette augmentation d'expression des gènes cibles du RE et du RA joue un rôle pro-prolifératif dans le cancer du sein et de la prostate. *Inspiré D'après Matkar et al, 2013.*

pour but de cibler l'action du complexe menin-MLL dans les leucémies. Le premier inhibiteur, baptisé MI-2-2, a montré des résultats intéressants sur l'inhibition d'expression des gènes *HOX* dans des cellules leucémiques transformés, malgré sa faible affinité pour menin (Shi et al. 2012). Depuis, d'autres inhibiteurs plus spécifiques tel que le MI-503 et le MI-463 ont été développés, et ont montré des effets thérapeutiques très prometteurs, notamment *in vivo* dans des modèles murins de leucémies (Borkin et al. 2015).

L'ensemble de ces données montrent que la protéine menin au sein du même complexe (MLL/COMPASS-like) peut jouer un rôle oncosuppressif, comme dans le cas du pancréas endocrine, ou un rôle oncogénique comme dans le cas des leucémies. Cette interaction entre menin et MLL incarne toute la complexité du rôle spécifique de menin dans les différents tissus.

III.E.3.b) Interaction entre menin et les récepteurs nucléaires : son rôle dans la signalisation hormonale

La protéine menin interagit avec plusieurs récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation transcriptionnelle, tel que le $RE\alpha$, $PPAR\gamma$, $PPAR\gamma$, $LXR\alpha$ et le RA. Ces interactions physiques et fonctionnelles entre menin et les récepteurs nucléaires ont suggéré un rôle important de menin dans la signalisation hormonale, aussi bien au niveau physiologique que pathologique.

En 2006, Dreijerink et al ont montré pour la première fois que menin était capable d'interagir avec le $RE\alpha$, d'une manière dépendante du ligand, via son motif LXXLL (Dreijerink et al. 2006). Dans cette étude la protéine menin est décrite comme un coactivateur transcriptionnel du $RE\alpha$. En effet, menin semble être impliqué dans la régulation positive de l'expression d'un gène cible du RE, TFF1, dans les cellules MCF7, en réponse à une stimulation par les estrogènes. De plus, il semblerait que menin permettent le recrutement du complexe MLL/COMPASS-like au niveau des gènes cibles du RE, induisant ainsi une augmentation des marques de triméthylation sur les histones H3K4, et donc une augmentation de l'activité transcriptionnelle. Une deuxième étude publiée en 2010, est venu confirmer cette interaction physique et fonctionnelle entre menin et le RE dans les cellules MCF7 (Imachi et al. 2010). Cette étude plus récente, a également montré qu'une forte expression de menin était un facteur de mauvais pronostic, pour les patientes présentant un cancer du sein ER+

(Figure 25A). Très récemment, Dreijerink et al ont a nouveau publié une étude spécifiant plus précisément l'action oncogénique de menin dans les lignées cellulaires du cancer du sein, en utilisant des analyses intégratives de ChIP sequencing (Dreijerink et al., 2017). Dans cette étude il est montré que dans les cellules MCF7, menin co-occupe avec le facteur pionnier FOXA1 et GATA3, des séquences activatrices situées dans le promoteur distale de plusieurs oncogènes. Ces données suggèrent que menin joue également un rôle oncogénique indépendamment du $RE\alpha$ dans ces lignées du cancer du sein.

Plus récemment, Malik et al ont rapporté une interaction physique entre menin et le RA (Malik et al. 2015). De manière similaire au $RE\alpha$, ils ont montré que menin, le RA et MLL formaient un complexe régulant positivement l'expression des gènes cibles du RA, dans différentes lignées du cancer de la prostate positive pour le RA (LNCaP, VCaP). Par l'utilisation de différents inhibiteurs de menin, ils ont mise en évidence que la perte d'interaction entre menin, le RA et MLL conduisait à une diminution de la croissance tumorale des cellules cancéreuses prostatiques humaines xénotransplantées dans des souris immunodéficientes. Et enfin, des analyses immunohistochimiques menées sur des échantillons de cancer de la prostate humain, ont révélé qu'une forte expression de menin corrélée avec un mauvais pronostic, chez les patients atteints du cancer de la prostate. Cette étude montre le rôle important du complexe menin-MLL comme co-activateur transcriptionnel du RA, et met en lumière le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de menin dans le traitement des cancers de la prostate avancés (Figure 25B).

Il a également été montré que menin joue un rôle important dans le foie pour empêcher la survenue de la stéatose hépatique, en inhibant les fonctions de deux récepteurs nucléaires, $PPAR\alpha$ et $LXR\alpha$. Cheng et al, ont dans un premier temps prouvé que la perte d'interaction physique et fonctionnelle entre menin et $PPAR\alpha$ chez la souris, induisait une accumulation de triglycérides dans le foie, à l'origine d'une stéatose hépatique (Cheng et al. 2011). Par la suite, la mise en évidence d'une interaction entre menin et $LXR\alpha$ est venue confirmer le rôle protecteur de menin dans le foie. En effet, menin semble agir comme un corepresseur de l'activité transcriptionnelle du $LXR\alpha$, permettant ainsi de limiter la lipogenèse hépatique (Cheng et al. 2015).

III.E.3.c) Autres partenaires de menin impliqué dans la régulation transcriptionnelle

La protéine menin est également connue pour réprimer directement ou indirectement la transcription en interagissant avec plusieurs facteurs épigénétiques, tel que EZH2 et PRMT5, ainsi que certains facteurs de transcription, tel que JunD et NFκB (Figure 26).

- JunD

JunD, une protéine appartenant à la grande famille des facteurs de transcription AP-1, est un des premiers partenaires de menin à avoir été identifié. En 1999, Agarwal et al, ont mise en évidence une interaction entre menin et JunD, à la fois par des expériences de GST pull down, mais aussi par des expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules HEK-293T (Agarwal et al. 1999). Trois domaines d'interaction avec JunD ont été identifiés sur la protéine menin. Dans cette même étude, des essais luciférase utilisant un système de gène rapporteur spécifique des facteurs de transcription de la famille AP1, ont montré que menin semblait impliqué dans la régulation de la transcription en s'associant avec JunD. Par la suite, d'autres études ont permis de mieux comprendre par quels mécanismes menin régulait l'activité transcriptionnelle de JunD. Kim et al, ont montré que menin était indispensable au recrutement de deux histones déacétylases (HDAC), mSin3A et HDAC1, sur le promoteur des gènes cibles de JunD (Kim et al., 2003). Ce complexe entre menin, JunD et ces HDACs va entraîner une déacétylation des marques d'histones, régulant ainsi négativement l'expression des gènes cibles de JunD. Un autre mécanisme de régulation de l'activité transcriptionnelle de JunD par menin a été démontré. Celui-ci implique une compétition entre menin et la kinase c-Jun (JNK). En interagissant avec JunD, menin empêche la phosphorylation de JunD nécessaire à son activation, par la kinase JNK (Huang et al. 2012) (Figure 26A).

L'ensemble de ces données sur l'interaction fonctionnelle entre menin et JunD, suggère que l'absence ou la présence de menin va permettre de contrôler le fait que JunD active ou non des gènes pro-prolifératifs. Il apparaît donc que menin jouerait un rôle de suppresseur de tumeurs associé à JunD. De plus, la structure cristallographique de menin a révélé que JunD et MLL interagissait

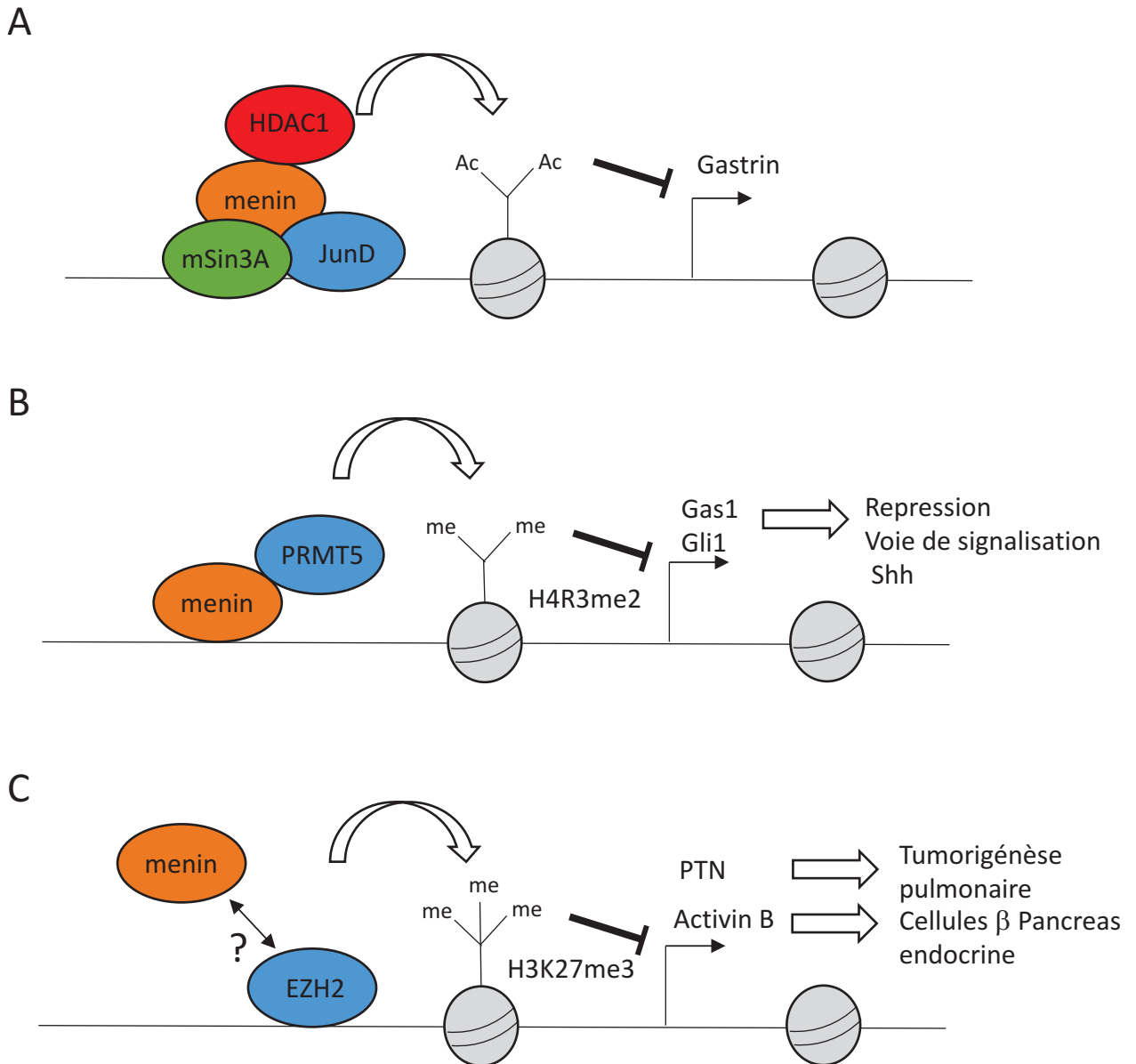


Figure 26 : Menin : répresseur transcriptionnel. (A) Dans les lignées cellulaires HEK293 et HeLa, menin interagit avec le facteur de transcription JunD, et permet le recrutement d'un complexe de régulation des marques d'acétylation d'histones, en s'associant avec les protéines HDAC1 et mSin3A. (B) Via son interaction avec PRMT5, menin permet la diméthylation des marques H4R3, et régule négativement des effecteurs de la voie Shh tel que Gas1 et Gli1 (C) L'interaction fonctionnelle entre menin et EZH2, permet de réguler positivement la triméthylation des marques d'histones H3K27 pour inhiber l'expression des gènes cibles, tel que PTN dans les lignées cellulaires du cancer du poumon, et l'activin B dans les cellules β pancréas endocrine. *Inspiré D'après Matkar et al, 2013.*

- NFκB

Heppner et al ont rapporté par des expériences de coimmunoprécipitation *in vivo* et *in vitro* dans des cellules HEK-293, que menin était capable d'interagir avec les membres de la famille des facteurs de transcription NFκB, p50 (NF-κB1), p52 (NF-κB2), p65 (RelA) (Heppner et al. 2001). Il est également montré dans cette même étude, que menin inhibe la transcription des gènes cibles, via son interaction avec les facteurs de transcription de la famille NFκB. Cette interaction physique et fonctionnelle entre menin et NFκB n'a été confirmé que bien plus tard en 2012, et a pointé du doigt un rôle oncosuppressif de menin dans la tumorigénèse hépatique (Gang et al. 2013). En effet, il a été montré dans différentes lignées cancéreuses hépatocytaires, que menin interagissait avec une HDAC, la protéine SIRT1, pour empêcher la transactivation de la protéine p65. La déacétylation de p65 par SIRT1 empêche son recrutement au niveau de ces gènes cibles, diminuant ainsi l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires.

- PRMT5

Gurung et al, ont montré que menin était capable d'interagir avec une arginine méthyle- transférase, la protéine PRMT5, et via cette interaction menin semble réguler la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) (Gurung et al., 2013). Dans des MEFs, il a été mis en évidence par des expériences de CHIP, que le recrutement de PRMT5 par menin au niveau du promoteur du gène *Gas1*, entraîne une augmentation des marques d'histones H4R3me2, qui vont inhiber l'expression de cet effecteur de la voie Shh. De manière similaire, il a été montré que menin et PRMT5 agissent en synergie sur le promoteur d'un autre effecteur de la voie Shh, la protéine *Gli1*, dans le but d'inhiber son expression (Gurung et al, 2013). Les souris β Men1, dans lesquelles le gène *Men1* est invalidé spécifiquement dans les cellules β du pancréas développent des insulinomes (Bertolino et al., 2003). Pour appuyer les données obtenues dans les MEFs, des expériences menée *in vivo* dans les souris β Men1, ont montré que l'inhibition de la voie Shh conduit à une diminution de la prolifération cellulaires dans les insulinomes (Gurung et al., 2013). Ces données suggèrent que dans le pancréas endocrine, menin pourrait exercer en partie sa fonction oncosuppressive en inhibant la voie Shh (Figure 26B).

- EZH2

EZH2 est une protéine appartenant au complexe PRC2 (polycomb repressive complex), impliqué dans la triméthylation des marques d'histones H3K27, connues pour être des marques répressives (Margueron & Reinberg 2011). Il a été montré dans plusieurs lignées cellulaires humaines du cancer du poumon, que menin exerçait une action oncosuppressive en inhibant l'expression d'un facteur de croissance la pléiotrophine (PTN), via le complexe PRC2 (Gao et al. 2009). En effet, il a été mise en évidence que dans des MEF *Men1^{-/-}*, les membres du complexe PRC2, comme SUZ12 et EZH2, n'étaient plus présent sur le promoteur de la PTN, induisant donc une diminution des marques d'histones répressives H3K27me3. Plus récemment, Gherardi et al, ont montré que menin lie le promoteur du gène codant pour l'Activin B, un ligand de la famille du TGFβ, et favorise le recrutement de EZH2 sur ce même promoteur (Gherardi et al. 2017). Des expériences de CHIP réalisées dans les MEF *Men1^{-/-}*, ont révélé une diminution des marques H3K27 sur le promoteur du gène codant pour l'Activin B. Etant donné que l'activin B est connue pour jouer un rôle pro-tumorigénique dans les insulinomes (Ripoche et al. 2016), ces données suggèrent que menin pourrait réguler négativement le gène codant pour l'activin B via le complexe PRC2, dans les cellules β du pancréas (Figure 26C).

Néanmoins, cette interaction entre menin et le complexe PRC2 ne semble être que fonctionnelle, car aucune interaction physique entre menin et les différents membres du complexe PRC2 n'a pu être mis en évidence au travers de ces différentes études.

III.E.4) Menin à l'interface des grandes voies de signalisation

Comme nous avons pu le voir jusqu'à présent, la protéine menin de part sa localisation majoritairement nucléaire, joue un rôle clef dans la régulation transcriptionnelle de l'expression génique, en s'associant avec divers facteurs de transcription et facteurs épigénétiques. Cependant, plusieurs études ont révélé que menin pouvait également être localisé dans le cytoplasme et à la membrane des cellules, régulant ainsi plusieurs voies de signalisations cellulaires, tel que la voie du TGFβ, la voie des BMP, la voie Wnt, ou encore la voie PI3K/AKT (Figure 27).

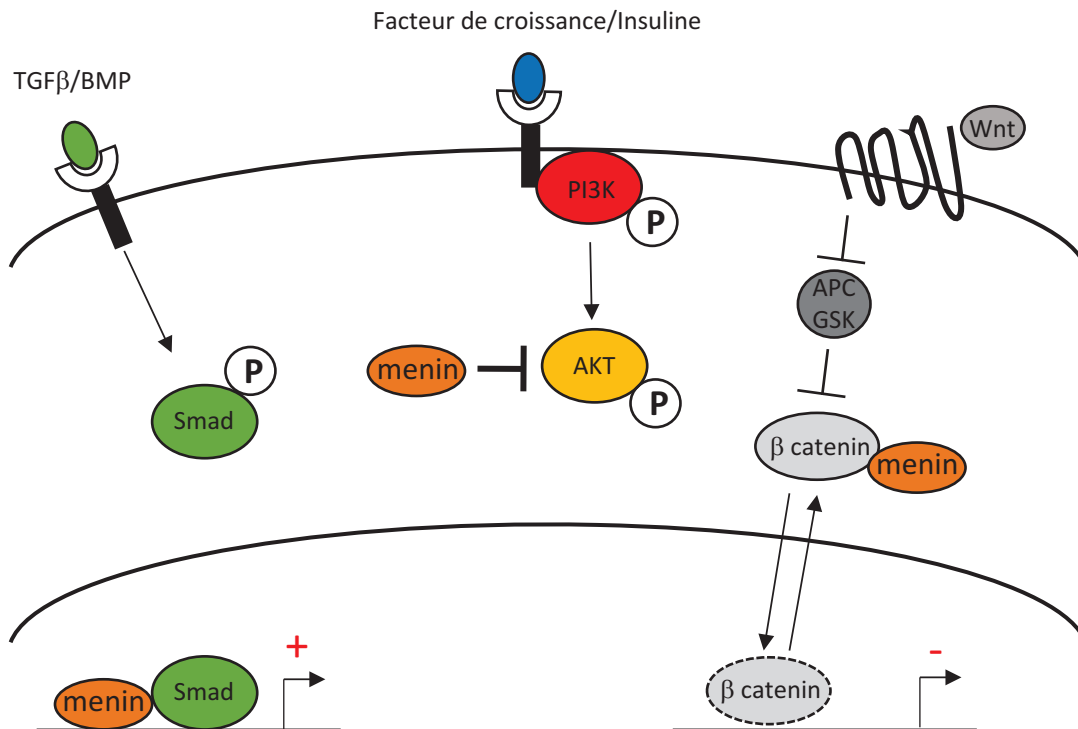


Figure 27 : Menin à l'interface des voies de signalisation cellulaire . Menin est capable d'interagir avec plusieurs effecteurs des grandes voies de signalisation cytoplasmique, comme les smads, AKT ou encore la β catenin, dans le but de réguler positivement ou négativement l'action de ces voies de signalisation au sein de différents tissus. *Inspiré D'après Matkar et al, 2013.*

III.E.4.a) Interaction entre menin les voies canoniques et non canoniques du TGF β

En ce qui concerne la voie canonique du TGF β , il a été mis en évidence que menin était capable d'interagir avec la protéine SMAD3, un effecteur en aval de la voie de signalisation, et régulerai ainsi la liaison de ce facteur de transcription à l'ADN (Kaji et al., 2001). Menin est également impliqué dans la voie de signalisation non canonique du TGF β , la voie BMP (bone morphogenetic pathway). Sowa et al, ont montré que menin en interagissant avec les protéines SMAD1/5 et RUNX2, était impliqué dans la différenciation ostéoblastique (Sowa et al. 2004).

III.E.4.b) Interaction entre menin et la voie de signalisation Wnt/ β -catenin

Des dérégulations de la voie Wnt/ β -catenin sont fréquentes dans de nombreux cancers, y compris les cancers du pancréas endocrine. L'activation constitutive de la voie Wnt/ β -catenin spécifiquement des les cellules β des îlots pancréatiques chez la souris, induit une prolifération accrue des cellules β , en augmentant l'expression de deux facteurs oncogéniques, Pitx2 et la cycline D2 (Rulifson et al. 2007). Cette implication de la voie Wnt/ β -catenin dans les tumeurs d'îlots, a rapidement amené à considérer un rôle de menin dans la régulation de cette voie. En 2009, Cao et al ont montré que menin était capable d'interagir avec la β -catenin dans les cellules endocrines du pancréas (Cao et al. 2009). En interagissant avec la β -catenin, menin contrôle la localisation subcellulaire de cette dernière, l'empêchant d'exercer son activité transcriptionnelle pro-tumorigénique dans le noyau des cellules endocrines. Plus récemment, Jiang et al ont apporté la preuve de l'importance de cette interaction physique et fonctionnelle entre menin et la voie Wnt/ β -catenin dans les tumeurs d'îlots, *in vivo* chez la souris (Jiang et al. 2014). En effet, l'inactivation conditionnelle et combinée du gène *Men1* et du gène codant pour la β -catenin dans les cellules β des îlots pancréatiques, diminue considérablement la prolifération des cellules β .

L'ensemble de ces données montrent que menin est un régulateur négatif de la voie de signalisation Wnt/ β -catenin dans les cellules endocrines des îlots pancréatiques. Les données obtenues *in vivo* suggère que la voie Wnt/ β -catenin est une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des tumeurs neuroendocrines pancréatiques déficientes pour le gène *MEN1*.

III.E.4.c) Interaction entre menin et la voie de signalisation PI3K/AKT/FOXO

Il a été montré dans des MEFs, et dans des cellules murines de tumeurs d'îlots MIN6, que menin était capable d'interagir avec la protéine AKT1 (Wang et al. 2011). Cette interaction entre menin et la protéine AKT1 semble empêcher sa translocation et son activation à la membrane plasmique des cellules endocrines et non endocrines. De plus, dans cette même étude, une augmentation de la phosphorylation de AKT1 a été mise en évidence dans les insulinomes développées chez les souris hétérozygotes *Men1*^{+/-} par rapport aux îlots contrôles des souris *Men1*^{+/+}. Une autre étude a rapporté que menin était capable d'interagir physiquement avec la protéine FOXO1, un des effecteurs majeurs de AKT, dans le cytoplasme des lignées cancéreuses hépatocytaires HepG2 et des MEFs (Wuescher et al. 2011).

Les différentes données issues de ces études indiquent un rôle important de menin dans la régulation de l'activité de AKT, en amont et en aval de la voie. Néanmoins, l'activation de AKT est connue pour être fréquemment altérée dans les tumeurs neuroendocrines pancréatiques, notamment dû à des mutations au niveau des gènes codants pour les différents effecteurs de la voie PI3K/mTOR (Jiao et al. 2011). C'est pourquoi, beaucoup de travaux restent à faire pour savoir comment menin régule précisément cette voie de signalisation PI3K/mTOR dans les tumeurs d'îlots, indépendamment des mutations intrinsèques à cette voie.

Pour conclure sur le rôle de cette protéine menin, il est sûr que depuis plus de dix ans de nombreux progrès ont été accomplis, afin de mieux comprendre les fonctions biochimiques de cette protéine. La découverte de la structure cristallographique de menin a permis de définitivement sceller l'hypothèse que menin agit comme une protéine d'échafaudage, interagissant avec de nombreux partenaires pour réguler différentes fonctions cellulaires. Il est important de souligner que le rôle de cette protéine semble être hautement spécifique aux différents tissus, notamment au travers de son interaction avec le complexe MLL/COMPASS-like. C'est la raison pour laquelle, le développement des inhibiteurs de menin semble être une opportunité thérapeutique importante dans certains cancers, comme pour les leucémies.

Néanmoins, du fait de cette action dépendante du tissu, ces inhibiteurs de menin pourraient avoir des effets délétères pour les patients notamment au niveau du pancréas endocrine. Cependant, la découverte de tous ces nouveaux partenaires de menin laisse beaucoup de questions en suspens. Comment menin choisit parmi ses différents partenaires exprimés de façon ubiquitaire dans beaucoup de tissus ? Existe-t-il une stœchiométrie dans l'expression de menin au sein des différents tissus permettant d'expliquer le choix de tel ou tel partenaires ? Est-ce que le choix des partenaires de menin est uniquement dépendant du contexte cellulaire ?

RESULTATS

Article 1

***Men1*-disruption in *Nkx3.1*-deficient prostatic cells accelerates tumour development and results in early AR^{low} and late AR^{low}/CD44⁺ lesions**

Contexte du projet

Données préliminaires

Les mutations du gène suppresseur de tumeur *MEN1* sont connues pour être à l'origine du syndrome NEM1. Ce syndrome constitue une maladie héréditaire associée à une perte d'hétérozygotie progressive du gène *MEN1*, affectant principalement les organes endocrines tel que le pancréas endocrine, la glande parathyroïdes et l'hypophyse. Plus récemment, l'implication du gène *MEN1* a émergé dans la tumorigénèse d'autres organes, et plus particulièrement dans le cancer de la prostate et du sein, dans lesquelles son rôle reste encore très controversé. Il a notamment été démontré que la protéine menin, codée par le gène *MEN1*, est impliquée dans la régulation de la signalisation hormonale en interagissant notamment avec le RA (Malik et al. 2015). Cette interaction entre menin et le RA dans les lignées cellulaires du cancer de la prostate, semblent réguler positivement l'expression des gènes cibles du RA, suggérant un rôle oncogénique de menin dans le cancer de la prostate. A l'inverse, notre groupe a suggéré un rôle oncosuppresseur du gène *Men1* dans la glande prostatique. En effet, le modèle murin hétérozygote *Men1*^{+/-}, connu pour récapituler la pathologie humaine, développe également des cancers de la prostate à un âge avancé et avec une faible fréquence (Seigne et al. 2010). Afin de mieux déterminer le rôle précis joué par le gène *Men1* dans la tumorigénèse de la glande prostatique, nous avons généré un nouveau modèle d'inactivation conditionnelle du gène *Men1* dans la glande prostatique, le modèle *Men1*^{F/F}-*Nkx3.1Cre*^{ERT2-/+}.

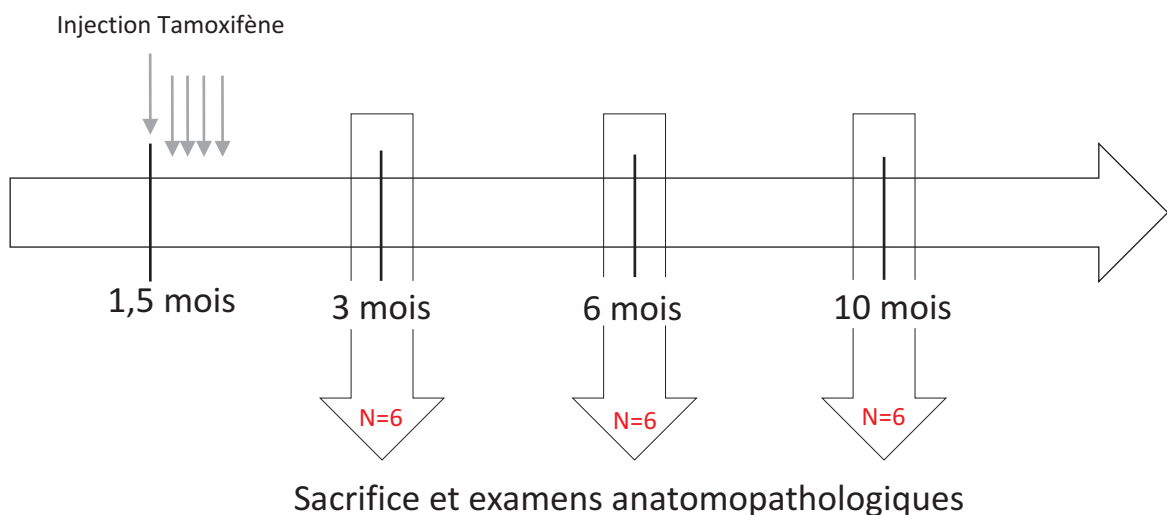
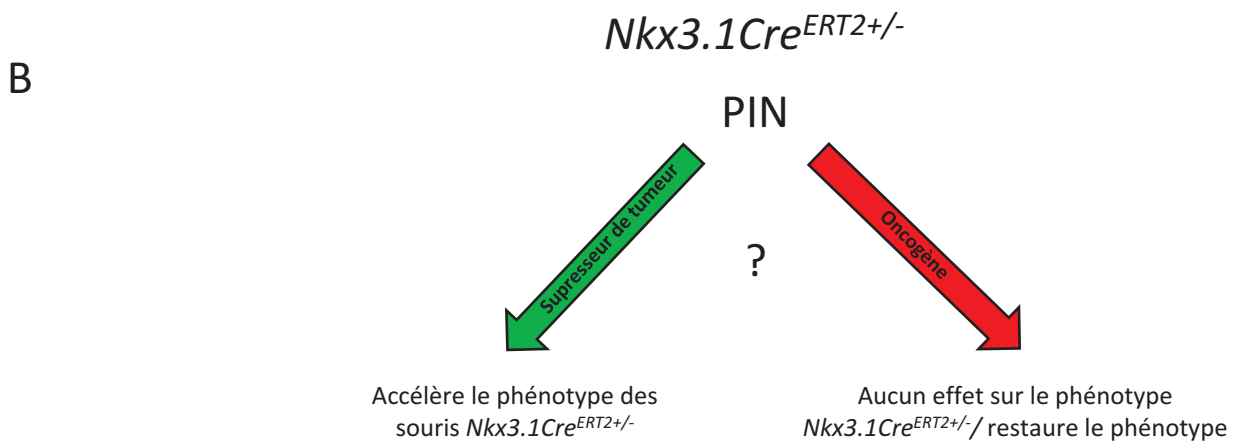
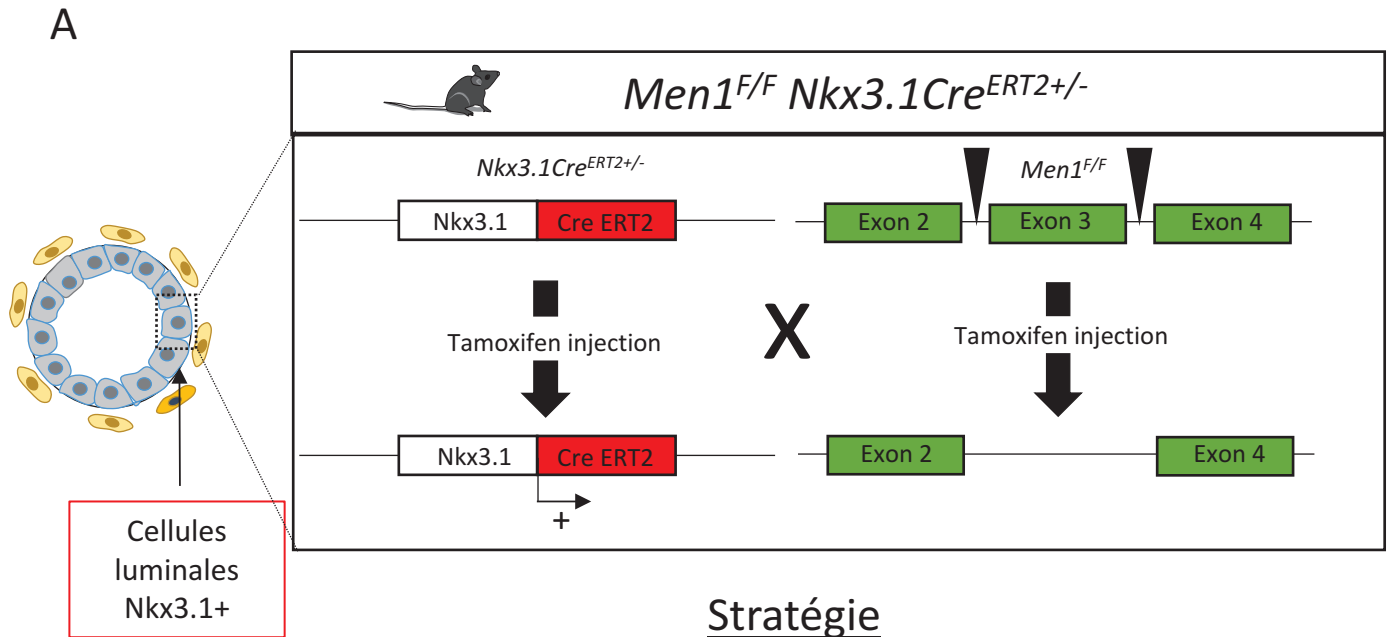


Figure 28 : (A) Représentation schématique de la stratégie utilisée pour induire l'invalidation conditionnelle du gène *Men1*, spécifiquement dans les cellules luminales de la glande prostatique à l'âge adulte, dans le modèle *Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2+/-}*. (B) Illustration schématique de la stratégie employée pour déterminer le rôle du gène *Men1* dans la glande prostatique. (C) Représentation schématique du protocole expérimental, dans lequel les souris *Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2+/-}* ont été ou non traitées à 1,5 mois, par 5 injections de tamoxifène consécutivement sur une durée de 5 jours. La prostate a ensuite été extraite dans chacune de ces souris pour procéder aux analyses anatomopathologiques.

Choix du modèle murin

Nous avons décidé d'utiliser, comme base, un modèle murin d'initiation tumorale déjà bien caractérisé, le modèle *Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}*. Le gène *Nkx3.1* est connu pour être un gène suppresseur de tumeur dans la glande prostatique. Les souris hétérozygotes *Nkx3.1^{+/-}* développent des lésions précancéreuses PIN dans la glande prostatique entre l'âge de 3 et 6 mois, qui n'évoluent jamais vers des lésions cancéreuses (Minjung J. Kim et al. 2002). Dans le modèle *Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}*, la Cre-Recombinase inducible au tamoxifène a été insérée (knock-in) dans l'un des deux allèles du gène *Nkx3.1* permettant son expression sous le contrôle du promoteur du gène *Nkx3.1*, tandis que l'autre allèle sauvage *Nkx3.1* reste fonctionnel. Il s'agit donc ici d'un modèle similaire au modèle hétérozygote *Nkx3.1^{+/-}*, qui d'après les données de la littérature ne développe pas de lésions PIN avant l'âge de 6 mois (Floc'h et al. 2012).

Choix de la Cre recombinase

Les cellules luminales sont souvent décrites comme les cellules d'origine du cancer de la prostate. Cette souris *Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}* est un outil génétique intéressant, qui nous a permis d'invalider le gène *Men1* spécifiquement dans les cellules luminales de la glande prostatique. Des données préliminaires obtenues au sein de notre laboratoire, ont mis en évidence une diminution d'expression de la protéine menin dans les lésions cancéreuses de la prostate chez l'homme. Afin de se rapprocher de ce que nous avons observé chez l'homme, le caractère inducible de la Cre Recombinase nous a permis d'invalider le gène *Men1* à l'âge adulte, suite à l'injection de tamoxifène. De plus, l'invalidation du gène *Men1* à l'âge adulte permet de s'affranchir des contraintes développementales éventuelles liées à une invalidation précoce du gène *Men1*.

Stratégie

Ce modèle *Men1^{F/F}-Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}* nous a permis d'étudier l'effet de l'invalidation du gène *Men1* dans le contexte d'une haploinsuffisance pour le gène *Nkx3.1* (*Nkx3.1^{+/-}*). La question était donc de savoir si l'invalidation du gène *Men1* conduit à une accélération du phénotype *Nkx3.1^{+/-}*, suggérant un rôle oncosuppresseur pour le gène *Men1* dans la glande

prostatique. Ou si à l'inverse, l'invalidation du gène *Men1* n'aurait aucun effet sur le phénotype *Nkx3.1*^{+/-} ou pourrait même engendrer une restauration de ce dernier, suggérant un rôle oncogénique pour le gène *Men1* dans la glande prostatique.

Démarche expérimentale

Les souris *Men1*^{F/F}-*Nkx3.1Cre*^{ERT2-/+} ont été traitées ou non au tamoxifène à l'âge de 1 mois et demi. Il est important de souligner que nous avons induit l'invalidation du gène *Men1* à 1,5 mois, car à cet âge les organes sexuels secondaires tel que la glande prostatique sont matures. Nous avons ensuite extrait la prostate à différents âges (3 mois, 6 mois, et 10 mois), pour ensuite procéder aux examens anatomopathologiques, visant à caractériser de manière précise le phénotype obtenu dans les souris double mutantes.

Résumé succinct

Les analyses anatomopathologiques et histologiques nous ont révélé que l'invalidation du gène *Men1* conduit à une accélération du phénotype observé dans les souris *Nkx3.1*^{+/-} contrôles. En effet, seulement 1,5 mois après l'invalidation du gène *Men1* nous avons mis en évidence que toutes les souris doubles mutantes développaient des lésions PIN, alors qu'une seule souris contrôle n'a développé de telles lésions, au même âge. Les analyses réalisées dans les groupes de souris plus âgées, à 6 mois et 10 mois, ont montré que certaines lésions ayant perdu l'expression de menin, présentaient un caractère microinvasif, que nous n'avons pas observé dans les souris contrôles. Par la suite, les différentes analyses effectuées ont permis de révéler les caractéristiques de la dédifférenciation cellulaire des lésions développées dans ce modèle.

L'élaboration et l'analyse de ce nouveau modèle murin *Men1*^{F/F}-*Nkx3.1Cre*^{ERT2-/+} a donc été bénéfique pour conforter notre hypothèse de départ d'un rôle oncosuppressif du gène *Men1* dans la glande prostatique.

***Men1*-disruption in *Nkx3.1*-deficient prostatic cells accelerates tumorigenesis and results in early AR^{low} PIN and late AR^{low}/CD44⁺ microinvasive carcinoma development**

Running title *Men1* inactivation accelerates tumorigenesis of prostatic cells

Romain Teinturier¹, Samuele Gherardi¹, Rémy Bonnavion¹, Nicolas Gadot², Isabelle Goddart³, Myriame Decaussin-Pétry⁴, Francis Vacherot⁵, Virginie Firlej⁵, Virginie Vlaeminck-Guillem¹⁻⁴, Philippe Bertolino¹, Muriel Le Romancer¹ and Chang Xian Zhang^{1*}

¹ *Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Lyon, 69008, France*

² *Centre Léon Berard, Plateforme de Recherche anatomopathologique, Lyon, France*

³ *Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, laboratoire de modèles tumoraux (LMT), Lyon, France.*

⁴ *Department of Pathology, Hospices Civils de Lyon, Centre hospitalier Lyon Sud, Université Lyon I, 69495 Pierre Bénite, Lyon, France.*

⁵ *Université Paris-Est, UPEC, Créteil, F-94000, INSERM, U955, Equipe 7, Créteil, F-94000, France*

Conflict of interest statements

Nothing to disclose.

Correspondence and requests for reprints:

Changxian Zhang, MD, PHD

INSERM 1052, Cancer Research Centre of Lyon, France, F-69008, France

E-mail: chang.zhang@lyon.unicancer.fr

Word count

Introductory paragraph

Mutations of the *MEN1* gene predispose patients to Multiple Endocrine Neoplasia type 1 syndrome affecting mainly endocrine tumours. Recently, rare *MEN1* mutations were reported in sporadic prostate cancers, reminiscent of our previous finding that male heterozygous *Men1* knockout mice developed prostate cancer with a low but significant frequency. Intriguingly, Malik et al recently reported that menin and MLL complex appeared to be crucial for the proliferation of AR⁺ cancer cell lines established from metastatic prostatic cancers. To understand the discrepancy and to study complex functions of menin in prostatic cells, we performed inducible prostatic cell-specific *Men1*-disruption in the *Nkx3.1*-deficient mouse. We found that the double mutant mice displayed the occurrence of early mPIN and progressive development of microinvasive carcinomas respectively at 1.5 months and 4.5 months after induced *Men1*-disruption, accompanied by disordered α -SMA and reduced E-cadherin expression. Markedly, *Men1*-deficient lesions displayed prominent partial dedifferentiation features, including an early down regulation of both AR and its target genes and a general decrease in CK18 expression. Markedly, more than 60% of cells in *Men1*-deficient late lesions expressed CD44. The findings may shed light into better understanding of the occurrence of less or de-differentiated prostate tumours, as well as their treatment.

Prostate cancer is the second most common cancer in men worldwide and causes more than 200,000 deaths each year¹. Apart from the previously known common genetic alterations, such as gain of AR function, loss of NKX3.1 and PTEN, recent work on metastatic castration-resistant prostate cancers (CRPC) detected recurrent genomic alterations implying the factors involved in chromatin structure modification². Markedly, the components of the Compass complexes³, KMT2B, KMT2C and 2D, as well as menin encoded by the *MEN1* gene and interacting with KMT2A/B, were found mutated²⁻⁴. Considering the role of menin and compass-like complex found to be required for the growth of human prostatic cancer cell lines both in cultured and xenograft conditions⁶, there exists obvious discrepancy between the data obtained from natural occurring prostate tumours and those from prostatic cancer cell lines, which may reflect complex, even opposite, functions of menin in prostatic cells in different context⁵⁻⁶.

To better dissect the role of the *Men1* gene in the initiation of tumorigenesis of prostatic cells, *Men1^{F/F}* mice⁷, were crossed with *Nkx3.1Cre^{ERT2}* mice where the activity of the Cre recombinase under the control of the endogenous *Nkx3.1* promoter can be induced in prostatic luminal cells after tamoxifen injection. *Men1^{F/F}-Nkx3.1Cre^{ERT2/+}* mice thus generated were subjected to tamoxifen treatment (*Men1NT*) or not (*Men1N*) at 1.5 months of age after birth, and prostatic glands were subjected to pathological examination at 1.5, 4.5 and 8.5 months after injection (Fig. 1a). Since *Nkx3.1Cre^{ERT2}* mice develop PIN (prostatic intraepithelial neoplasia) lesions at around 6 months of age at low frequency and reach to full penetrance after 10 months⁸⁻⁹, *Men1NT* mice should allow us to determine whether additional *Men1*-disruption may rescue or exacerbate the phenotype of *Men1N* mice. Menin detection by IHC confirmed *Men1*-disruption in prostatic luminal cells in *Men1NT* mice treated with tamoxifen (Fig. 1b and 1c).

We observed that 1.5 month after the induction of Cre recombinase, PIN lesions were observed in ventral, lateral, dorsal and anterior lobes in all male *Men1NT* mice (n = 7), with high-grade PIN being observed in 6 over 7 *Men1NT* mice, whereas among untreated age-

matched *Men1N* mice, only 1 mouse displayed low-grade PIN (n = 5, Fig. 1d, Supplementary Fig. 1, Table 1). A majority of prostatic cells within lesions in treated *Men1NT* mice lost menin expression (Fig. 1b and 1c). We noticed that tamoxifen-treated *Men1NT* mice developed progressively more advanced lesions with prominent pleomorphic changes (Fig. 1e, Supplementary Fig. 2) and microinvasive prostatic carcinomas at 6 (2/7, n=7) and 10 months (4/6, n=6) of age (Fig. 1f, upper panel, Table 1). No age-matched *Men1N* mice developed microinvasive carcinomas (n=5 for both the group of 6 and 10 months of age). *Men1^{FF}* mice either treated with tamoxifen or not developed no PIN lesions at 10 months of age, and the treated *Nkx3.1Cre^{ERT2/+}* mice developed no microinvasive carcinomas at 10 months of age (data not shown). Consistently, α -smooth muscle actin staining showed an attenuated or broken smooth cell layer around the lesions, highlighting the alteration of prostatic structures during the process of microinvasive carcinoma formation (Fig. 1f, lower panel, Supplementary Fig. 3a). Ki67 staining with 6-month-old *Men1NT* mice revealed that PIN lesions lacking menin expression showed a significantly higher proliferative activity (Fig. 1g, Supplementary Fig. 4). Taken together, our results demonstrate that prostate-specific *Men1*-disruption in mice led to the acceleration of tumorigenesis of *Nkx3.1^{-/+}* prostatic cells.

Notably, double IF staining using antibodies against menin (red) and AR (green) on prostate glands from 3 and 6-month-old tamoxifen-untreated *MEN1N* or treated *MEN1NT* mice. (Fig. 2a, top panel versus middle and bottom panels, Supplementary Fig. 5a) *Men1N* mice, revealed a reduced AR expression in menin-deficient prostatic cells. Immunohistochemistry (IHC) analyses also showed that the decreased AR expression was accompanied by a decreased AR-target gene expression, such as FKBP5 and PSA (Fig. 2b, Supplementary Fig. 5b). We further analyzed the expression of several cell lineage markers to better define their cell differentiation status. IHC analyses showed that there is a decrease in CK18 expression in the lesions, whereas no increased CK5 expression was observed (Fig. 2c). Consistent to the latter, P63 expression appeared no obvious alteration (Supplementary Fig. 6). Furthermore, we found markedly reduced E-Cadherin expression in *Men1*-deficient

lesions (Supplementary Fig. 3b), whereas no vimentin expression could be detected (data not shown).

The strongly reduced AR expression in *Men1*-deficient lesions prompted us to confirm the effects of menin on the expression of AR and its target genes in prostatic cancer cell lines. *MEN1* knockdown in LNCaP cells resulted in a significant decrease in the levels AR mRNA expression with two of the three Si-*MEN1* used, and of PSA mRNA expression (Figure 2d, left panel). Furthermore, using Si-*MEN1* (1), we observed a strongly reduced expression of AR, PSA and TMPRSS2 by western blotting (Fig. 2d right panel). To know whether the above effects of menin are mediated by MLL complex, we treated LNCaP cells with a menin-MLL interaction inhibitor, MI503. Indeed, MI-503 treatment led to a reduced AR and PSA transcription with a dose-dependent manner (Figure 2d). The latter result prompted us to define the occupancy of menin on the *AR* promoter by CHIP analysis. The data demonstrated a significantly menin-enriched region on the proximal part of the *AR* promoter from -1500 pb to +550 pb region flanking its TSS (Fig. 2e). Importantly, we found that the same region displayed a highly methylated H3K4me3 mark and was co-occupied by one of the MLL components ASH2L, suggesting strongly that MLL complex binds at this region. Moreover, when the cells were treated with an inhibitor of menin and MLL interaction, MI-503, the CHIP signal obtained with anti-menin and H3K4me3 antibodies were significantly reduced, confirming the involvement of menin-MLL complex in this region (Fig. 2e, Supplemental Fig. 8). The above data demonstrated that menin regulates *AR* transcription, most likely via its binding to the proximal *AR* promoter region, mediated by MLL complex.

The reduced AR expression has been recently linked to the appearance of prostatic cell populations expressing some molecular markers reminiscent of stem cells¹⁰⁻¹¹. We have, therefore, carried out the expression analyses of several markers. IF analyses showed that, although no CD44 expression could be detected in prostate glands either in control mice, or in PIN lesions from treated double mutant mice 1.5 month after the induction of Cre recombinase, surprisingly, prominent CD44 expression was detected in the majority of *Men1*-deficient prostatic cells from all the treated *Men1^{NT}* mice 8.5 month after the induction, the

percentage of CD44-expressing cells reaching above 60% of *Men1*-deficient prostatic cells (Figure 2f). However, we did not find the expression of other stem cell related markers, including CD133, $\alpha 2\beta 1$ integrins (CD49b) and CD49f (data not shown).

Taken together, *Men1* prostatic cell-specific disruption in *Men1^{NT}* mice resulted in the occurrence of early AR^{low} PIN and late AR^{low}/CD44⁺ PIN and microinvasive carcinomas, confirming that the *Men1* gene plays an oncosuppressive role during the initiation of tumorigenesis of prostate luminal cells. Our works also afforded evidence showing that menin critically regulates AR expression, likely through its binding to the proximal AR promoter. Interestingly, *Men1*-deficient early lesions displayed prominent partial dedifferentiation features, including a general decrease in CK18 expression, and down regulation of both AR and its target genes. The characteristics of these lesions are reminiscent of recent findings in human prostate cancers where undifferentiated PSA^{low} tumours were found among both advanced primary prostate cancers (GS9/10) and CRPC¹². Our model may provide a useful tool for further addressing this group of cancers. Intriguingly, *Men1*-deficient late lesions expressed massively CD44. Several lines of evidence may question whether the *Men1*-deficient cells were converted into stem-cells: 1) The activation of CD44 were detected in the majority of the cells in more advanced prostatic lesions; 2) no invasive adenocarcinomas were found in the aged mutant mice; 3) The expression of other stem-cell markers were not found in the same lesions. One of the other possibilities would be that CD44 expression may represent a feature of more advanced dedifferentiation of luminal cells and confer them with more growth and invasive capacity, as suggested by Patrawala et al¹³. Further works are needed to clarify the biological consequences and the underlying mechanisms of such CD44 activation. Also, our finding that menin plays a critical role at the regulation of AR expression provides complementary data to the previous work on the regulation of the AR pathway by menin, suggesting its putative oncogenic role in the prostate cancers whose growth are dependent on AR activities. Taken together, the current work highlights the oncosuppressive role of the *MEN1* gene in the initiation of prostatic cell tumorigenesis, and may have implications for new strategies of threatening prostate cancers,

considering the complex deregulation of the AR pathway caused by its inactivation at different molecular contexts¹⁴.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Emilie SERVOZ for the maintenance of the mouse colonies, Dr. Brigitte MANSHIP for her assistance in proofreading the manuscript. This study was supported by Epigenetics & Cancer Program (ASC14092CSA), Agence National de Recherche (grant SVSE2 ANR 10 BLANC 1240 04), the Ligue contre le Cancer du Rhône and de la Loire, the Fondation de l'Association pour la Recherche contre le Cancer (SFI20101201530).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RT conducted the experiments, analysed and interpreted the data, prepared figures and manuscript; S.G, and R.B provided technical and material support and participated in data interpretation; M.D, V.F, and F.V supervised the development of the tissue banks, performed pathological analyses and data interpretation; N.G, I.G and V.V provided material and methodological support and participated in data interpretation; P.B and M.L participated in study design and provided critical revision of the manuscript; C.X.Z conceived and supervised the study and manuscript preparation, and obtained funding.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

METHODS

Animals. *Men1^{F/F}* (on a mixed C57B:6 and 129/SvJ background) were generated, bred and maintained as previously described. *Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}* mice were provided by the Jackson laboratory, and bred with *Men1^{F/F}* mice to generate *Men1^{F/F}-Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}* mice, as well as *Men1^{+/+}-Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}* mice. *Men1^{F/F}-Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}* mice were treated by intra-peritoneal injection of 100 μ l Tamoxifen at 10 mg / ml daily for five consecutive days at 1.5 months of age after birth, and control mice were injected with oil. Prostatic glands were subjected to pathological examination and other analyses at 1.5, 4.5 and 8.5 months after injection. All animal experiments were conducted in accordance with accepted standards of animal care and were approved by the Animal Care and Use Committee of the University Lyon 1.

Cell Culture and transfections. The prostatic cancer cell line expressing AR, namely LNCaP was cultured in RPMI medium (Gibco Invitrogen) containing 25 mM glucose and supplemented with 10% (v/v) foetal calf serum (FCS), 2 mM L-Glutamine, 100 unit/ml Penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, HEPES 10mM, Sodium Pyruvate 1mM, at 37°C with 5% CO₂. Transient transfections were carried out using Dharmafect 2 (Dharmacon) according to the manufacturer's instructions. Inhibition of menin-MLL interaction was achieved through the use of MI-503 (Active Biochem), at the concentration of 1 μ M, 2.5 μ M, and 5 μ M.

Real-time reverse transcriptase-PCR and western blot analyses. RNA were extracted using RNeasy-Kits (Qiagen, Valencia, USA). Real-Time PCR analyses were carried out on a Step-One RT-System (Applied-Biosystem, France) using

SYBR-Green (Life-Technology, France) and results of each samples normalized to *36B4*. Primer used are as follow : *MEN1* Fw: 5'-CATCCAGGACTACAACACTACT-3' ; *MEN1* Rev: 5'-ATGACATCATTGGCTACTTC-3'; *AR* Fw: 5'-TCTTGTCGTCTTCGGAAATGT-3'; *AR* Rev: 5'-AAGCCTCTCCTTCCTCCTCCTGTA-3'; *PSA* Fw: 5'-ACGCTGGACAGGGGGCAAAG-3'; *PSA* Rev: 5'-GGGCAGGGCACATGGTTCACT-3'. Total protein extracts from cells were prepared and analysed as described previously. Cell lysates were separated on 10% SDS polyacrylamide gels and transferred onto PDVF membrane using Transblot Turbo (biorad).The membrane was incubated for 1 h in blocking buffer (Tris-buffered saline, 0.3% Tween (TBS-T), 5% nonfat dry milk or BSA) and incubated overnight at 4 °C with indicated antibodies. Blots were developed using chemiluminescence ECL Lumi-light^{Plus} (Roche) per the manufacturer's protocol. The following primary antibodies were used for western blot : rabbit anti-menin at 1/8000 (Bethyl laboratories, TX, USA), anti-AR at 1/4000 (Bethyl laboratories, TX, USA), anti-PSA at 1/4000 (Abcam), anti-TMPRSS2 at 1/2000 (Abcam), mouse anti-actin monoclonal antibody from ICN (1:50 000, Aurora, CA, USA).

Immunostaining. Prostate tissues were collected and fixed in 4% formalin prior paraffin embedding, sectioned and stained with hematoxylin and eosin according to a standard protocol. Briefly, endogenous peroxidases were quenched in 3% H₂O₂ solution for 30 min at room temperature. Heatinduced epitope retrieval was performed by immersion in antigen-unmasking solution (catalog no. H-3300; Vector Laboratories) in a microwave oven for 15 min. After blocking with antibody diluent (Dako), sections were incubated overnight with a primary antibody. For immunofluorescence (IF), stainings were revealed with a Cy3 or Cy5 tyramide

amplification kit (PerkinElmer), according to the manufacturer's instructions, with prior incubation with the appropriate biotinylated secondary antibody or incubation with appropriate Alexa Fluor 488, 555, coupled secondary antibodies (Life Technologies) for 1 h. For immunohistochemistry (IHC), after incubation with the primary antibody, biotinylated secondary antibody was applied for 1 h and revealed using the avidin-biotin complex (ABC)-3,3'-diaminobenzidine system (Vector Laboratories). The following primary antibodies were used for immunostaining : goat anti-menin at 1/8000 (Bethyl laboratories, TX, USA), rabbit anti-AR 1/4000 (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti ki67 1/1000 (Biotrend), rabbit anti- α SMA 1/6000 (Genetex), mouse anti-Ecadherin 1/2000 (BD Biosciences), mouse anti-CK18 1/6000 (Abcam), rabbit anti-CK5 1/1000 (Covance), mouse anti-p63 1/5000 (Oncogene), rabbit anti-PSA (Abcam), rabbit anti-FKBP51 (Abcam), Rat PE anti-CD44 1/100 (BD biosciences). Analysis were acquired on an Eclipse- NiE NIKON microscope and analysed using NIS-Elements Software. Cell counting was manually performed on multiple-channel pictures with the Image j cell counter module (U.S. National institutes of Health, Bethesda, MD). The data on the graphs and the results of counting are represented as means \pm standard errors on the means (SEM).

ChIP-qPCR assay. Chromatin for ChIP was prepared from 5 millions of LNCaP cells. Briefly, cells were fixed in 1% formaldehyde for 10 min, nuclei were obtained and lysed in 300 μ l ice-cold RIPA buffer prior Chromatin-DNA shearing with a Diogene Bioruptor. ChIP was performed using 5 μ g of anti-Menin antibody (A300-105A, Bethyl Laboratories Inc., USA), anti-H3K4me3 (C15410003, Diagenode, Belgium), anti-Ash2L (D93F6, Cell Signaling). Dynabeads® Protein G (10003D, Life Technologies,

France) were used to retrieve Immunocomplexes. DNA was then extracted with phenol/chlorophorm/isoamylalcohol, following proteinase-K reverse-crosslinking. 2 μ l of IP-DNA or 2 ng of INPUT DNA were used for Real Time PCR analysis to quantify co-precipitated chromatin-DNA. Relative enrichment of a given promoter region obtained with a specific anti- body was compared with Input DNA. Blocks region on Chr1 was used as a negative control for Menin, Ash2L and H3K4me3 ChIPs. Primers used are as follow: AR -2000. Fw: 5'-CCCACATCATCCTCTACGCC-3'; Rev: 5'-GTATGCAGCCGCTTGCTTTT-3'; AR -1500. Fw: 5'-GGAGGCGACAGAGGGAAAA-3'; Rev 5'-TTCACCGAAGAGGAAAGGGC-3'; AR +1 TSS. Fw: 5'-CCGTCCAAGACCTACCGAGG-3'; Rev: 5'-CCGGTTCTGGATCACTTCG-3'; AR +340. Fw: 5'-GAGAGGTTGCGTCCCAGAG-3'; Rev: 5'-CAGCTGAGTCATCCTCGTCC-3'; AR +550. Fw: 5'-GCAACTCCTTCAGCAACAGC-3'; Rev: 5'-GACACCGACACTGCCTTACA-3'. Chr1 Neg primers. Fw: 5'-CGGGGGTCTTTTTGGACCTT-3'; Rev: 5'-GAAACACGGCTGCCAGAAAC-3'.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed as described in the figure legends; unpaired Student t tests were used unless otherwise indicated. All analyses were done using Prism5 software (GraphPad, USA); a P value of < 0.05 was considered significant. Results are given as means +/- standard errors of the means (SEM).

REFERENCES

1. Siegel, R., Miller, K. & Jemal, A. Cancer statistics , 2015 . *CA Cancer J Clin* **65**, 29 (2015).
2. Grasso, C. S. *et al.* The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* **487**, 239–43 (2012).
3. Shilatifard, A. NIH Public Access. 65–95 (2012). doi:10.1146/annurev-biochem-051710-134100.The
4. Robinson, D. *et al.* Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* **161**, 1215–1228 (2015).
5. Seigne, C. *et al.* Characterisation of prostate cancer lesions in heterozygous Men1 mutant mice. *BMC Cancer* **10**, 395 (2010).
6. Malik, R. *et al.* Targeting the MLL complex in castration-resistant prostate cancer. *Nat. Med.* **21**, 344–352 (2015).
7. Bertolino, P. *et al.* Pancreatic β -cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer Res.* **63**, 4836–4841 (2003).
8. Floc'h, N. *et al.* Dual targeting of the Akt/mTOR signaling pathway inhibits castration-resistant prostate cancer in a genetically engineered mouse model. *Cancer Res.* **72**, 4483–4493 (2012).
9. Wang, X. *et al.* A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature* **461**, 495–500 (2009).
10. Qin, J. *et al.* The PSA-/- prostate cancer cell population harbors self-renewing long-term tumor-propagating cells that resist castration. *Cell Stem Cell* **10**, 556–569 (2012).
11. Rybak, A. P., Bristow, R. G. & Kapoor, A. Prostate cancer stem cells: deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget* **6**, 1900–19 (2015).
12. Liu, X. *et al.* Systematic dissection of phenotypic, functional, and tumorigenic

- heterogeneity of human prostate cancer cells. *Oncotarget* **6**, 23959–23986 (2015).
13. Patrawala, L. *et al.* Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* **25**, 1696–1708 (2006).
 14. Watson, P. A., Arora, V. K. & Sawyers, C. L. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 701–11 (2015).

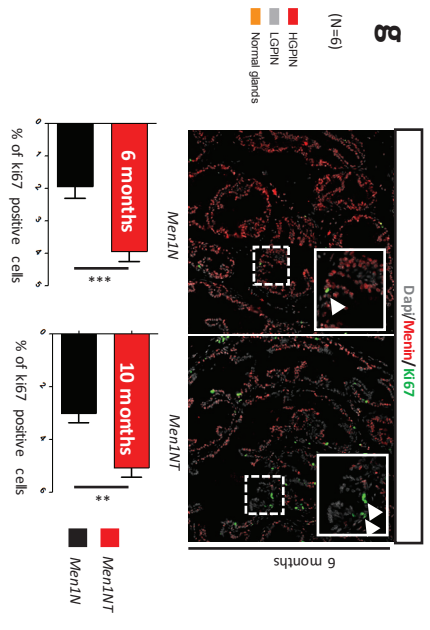
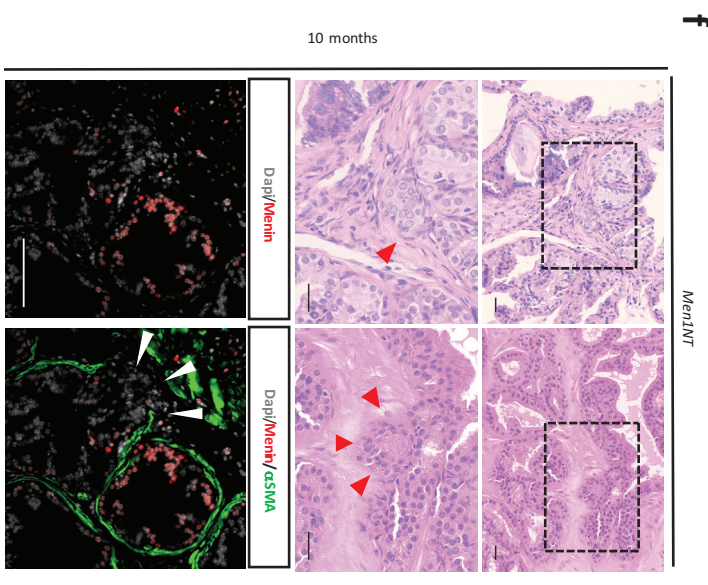
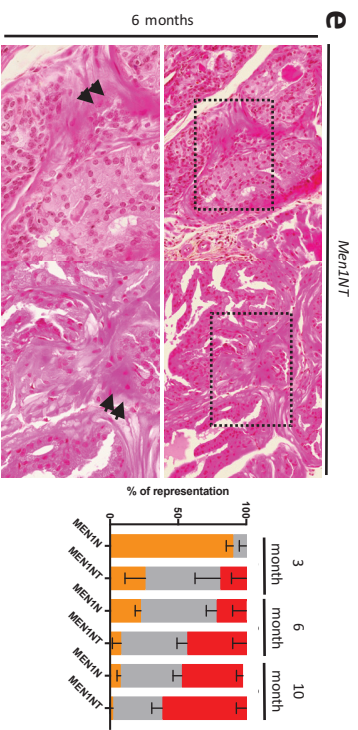
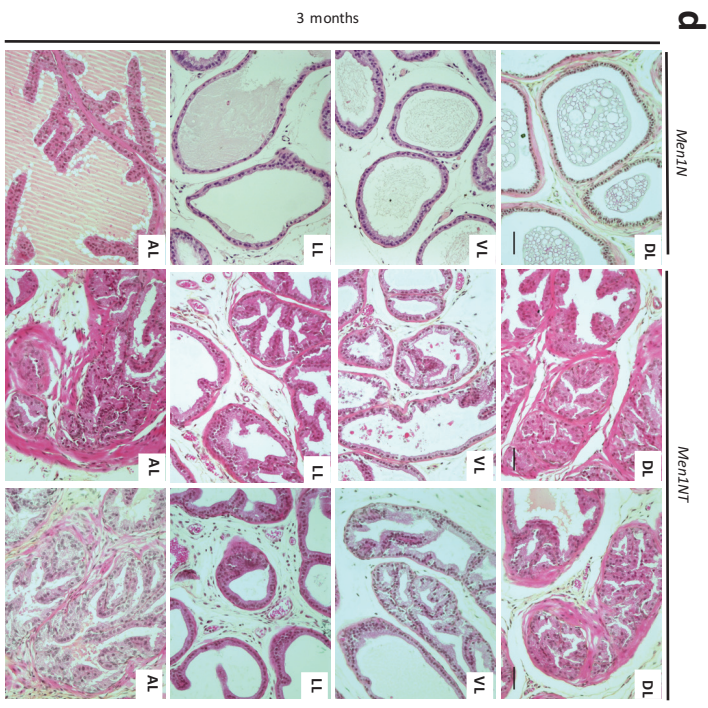
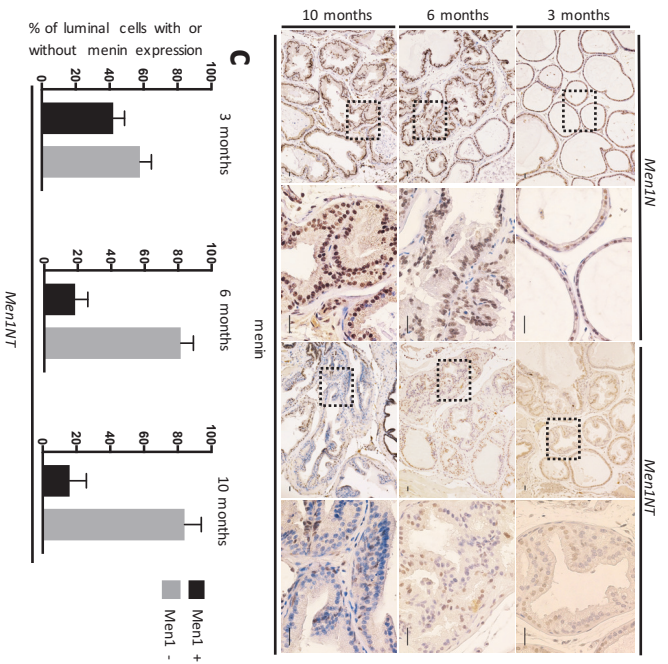
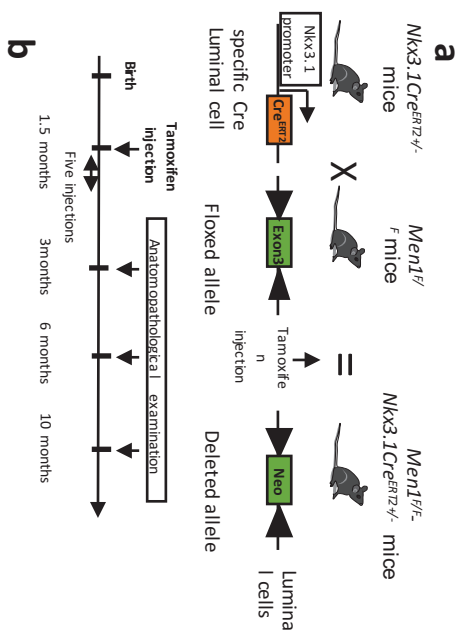


Figure 1 *Men1*-disruption accelerates *Nkx3.1*-deficient prostatic luminal cell phenotype. **(a)** Schematic view of the general strategy used for the generation of *Men1*^{F/F}-*Nkx3.1Cre*^{ERT2+/-} mice. The mouse line *Nkx3.1Cre*^{ERT2+/-} expressing an inducible (by tamoxifen) Cre recombinase under the control of the endogenous *Nkx3.1* promoter, was crossed with *Men1*^{F/F} mice in which the exon 3 of the *Men1* gene is flanked by LoxP site, in order to specifically delete the *Men1* gene in the luminal cells of the prostatic gland. Experimental time course shows that *Men1*^{F/F}-*Nkx3.1Cre*^{ERT2+/-} have been subjected or not to daily tamoxifen injection for five days. Then, the mice were sacrificed at 1.5, 4.5 and 8.5 months post tamoxifen injection to proceed with the anatomopathological and histological examinations. **(b)** Depletion of menin in prostatic glands and PIN lesions of *Men1*^{F/F}-*Nkx3.1Cre*^{ERT2+/-} mice. Immunohistochemistry analysis using an anti-menin antibody was performed in prostate sections of *Men1*^{F/F}-*Nkx3.1Cre*^{ERT2+/-} treated with tamoxifen (*Men1NT*), and in untreated control mice (*Men1N*), at 3, 6 and 10 months of age. Right columns for each age group are a two-fold magnification showing *Men1* expression in the normal prostatic gland or neoplastic cells. Scale bar 25 μm. **(c)** Quantification of positive and negative luminal cells for menin expression in each age group (n = 6). **(d)** Representative haematoxylin & eosin (H&E) staining images of prostatic lobes from double mutant and control mice. Prostatic glands were collected from *Men1N* control and *Men1NT* mutant mice at three months of age. Prostatic gland architecture for different lobes was observed after H&E staining. DL : dorsal lobe, LL : lateral lobe, VL : ventral lobe, AL:anterior lobe. Scale bar 25 μm. **(e)** Lefthand panel: representative H&E staining images for two high grade PIN lesions in *Men1N T* mice at 6 months of age. Scale bar 25 μm. Righthand panel: Histological evaluation and distribution of normal gland, Low-grade PIN (LGPIN) and High-grade PIN (HGPIN) lesions for the prostatic glands. Three distant sections for each mice (n = 6 for *Men1N* and *Men1NT* of each age group) were scored. **(f)** The upper panel: Representative histological section (H&E) for two microinvasive carcinomas from *Men1N T* mice at 10 months of age. In late-stage HGPIN of *Men1*^{F/F} *Nkx3.1 + T*, microinvasive carcinoma (MIC) was seen with nests of atypical tumors cells as indicated by arrows, infiltrating into the surrounding stroma and forming irregular contours. The bottom panel is a two-fold magnification of the top panel. Scale bar 25 μm. Lower Panel: Immunofluorescence analysis against αSMA performed in *Men1NT* prostate specimen, arrows indicate discontinuous αSMA staining in the surrounding stromal compartment. Scale bar 50 μm. **(g)** Immunofluorescence staining against Ki67 on prostate sections from *Men1N* and *Men1NT* at 6 months of age. Scale bar 25 μm. Graph is representative quantification of Ki67 staining in the mice at 6 (Mean +/- SEM, *** p<0,001) and 10 ((Mean +/- SEM, ** p<0,01) months of age.

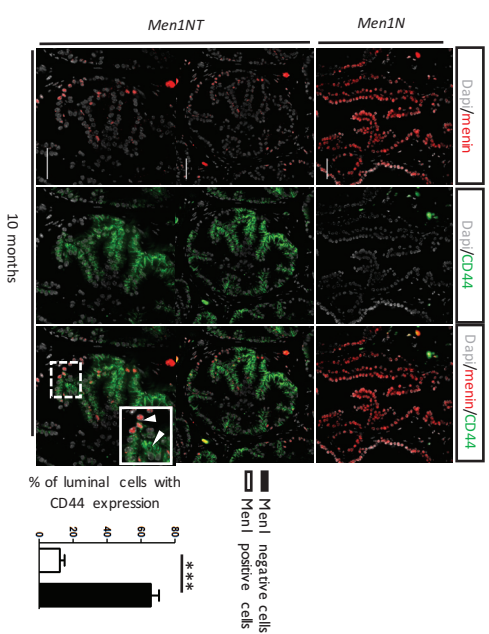
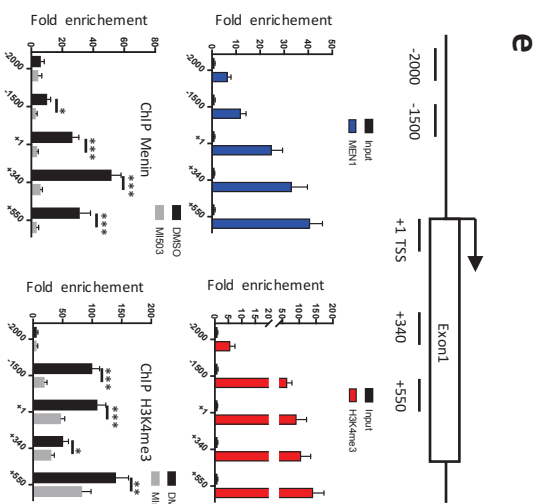
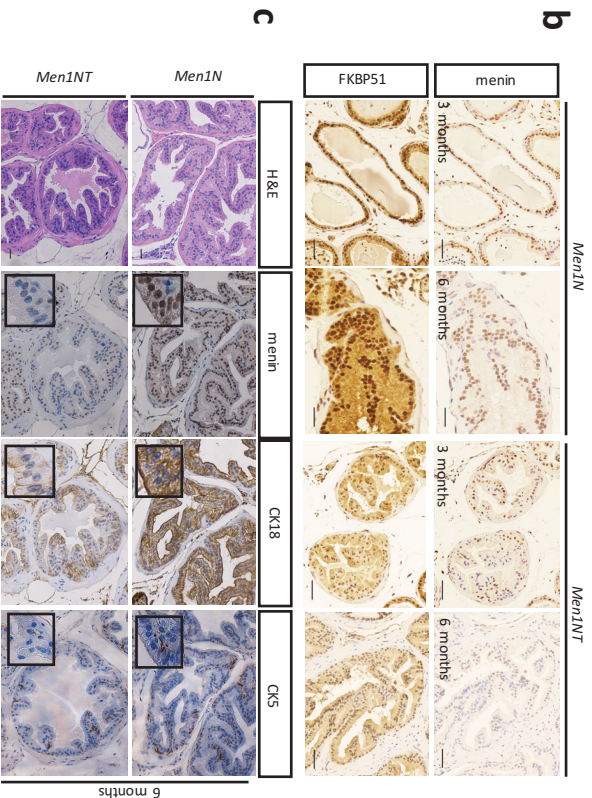
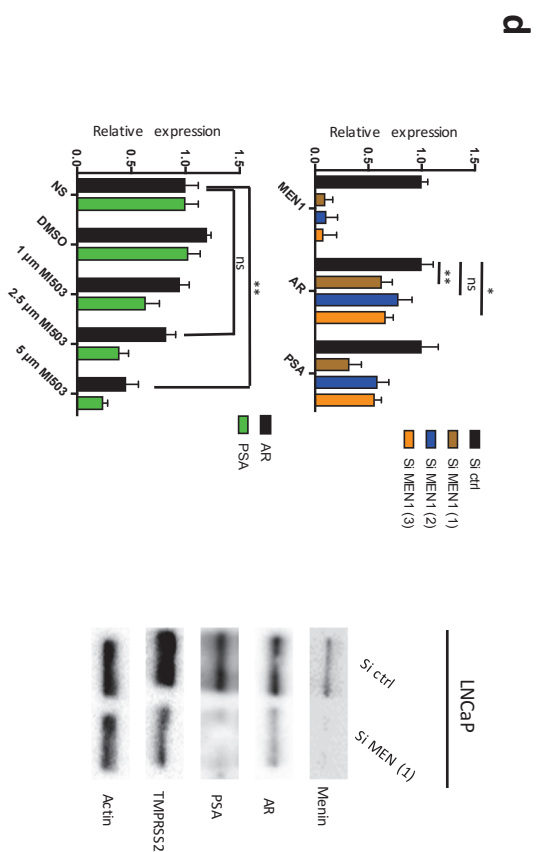
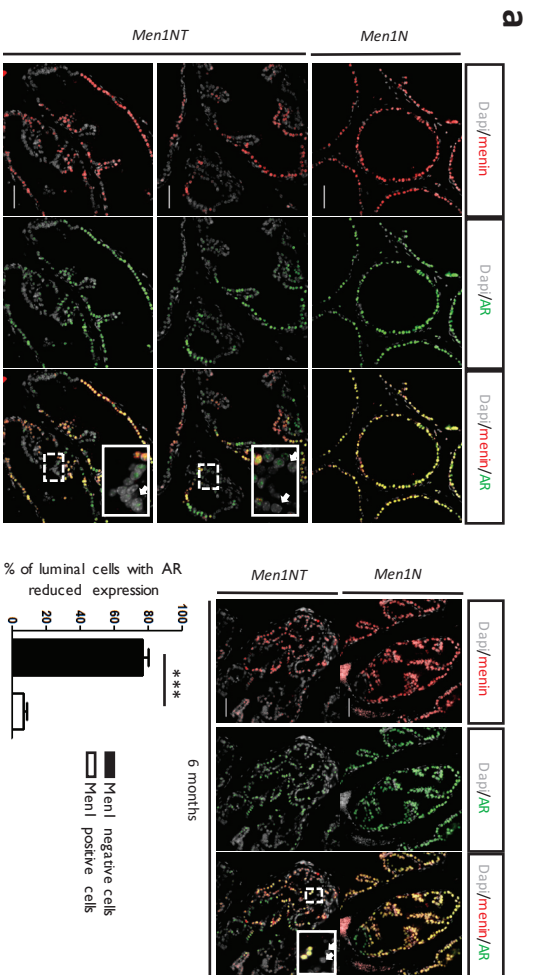
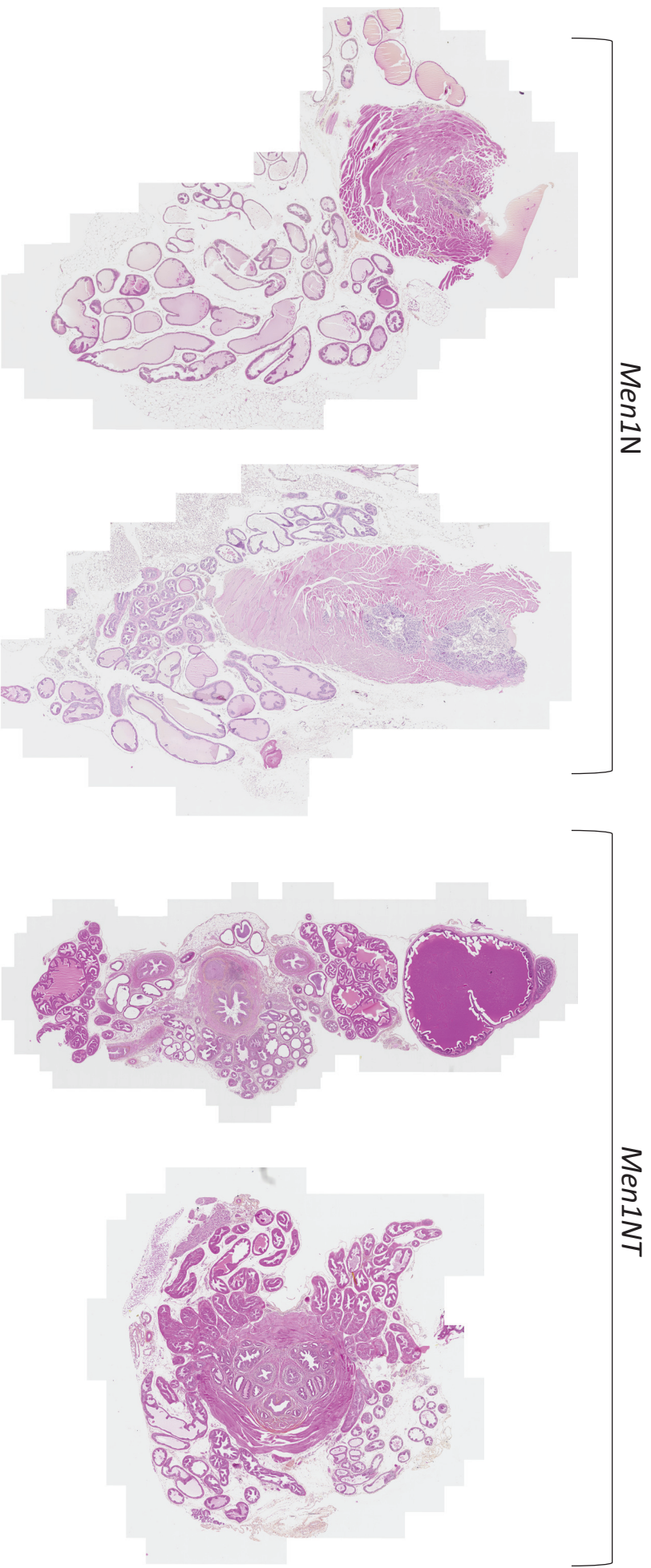
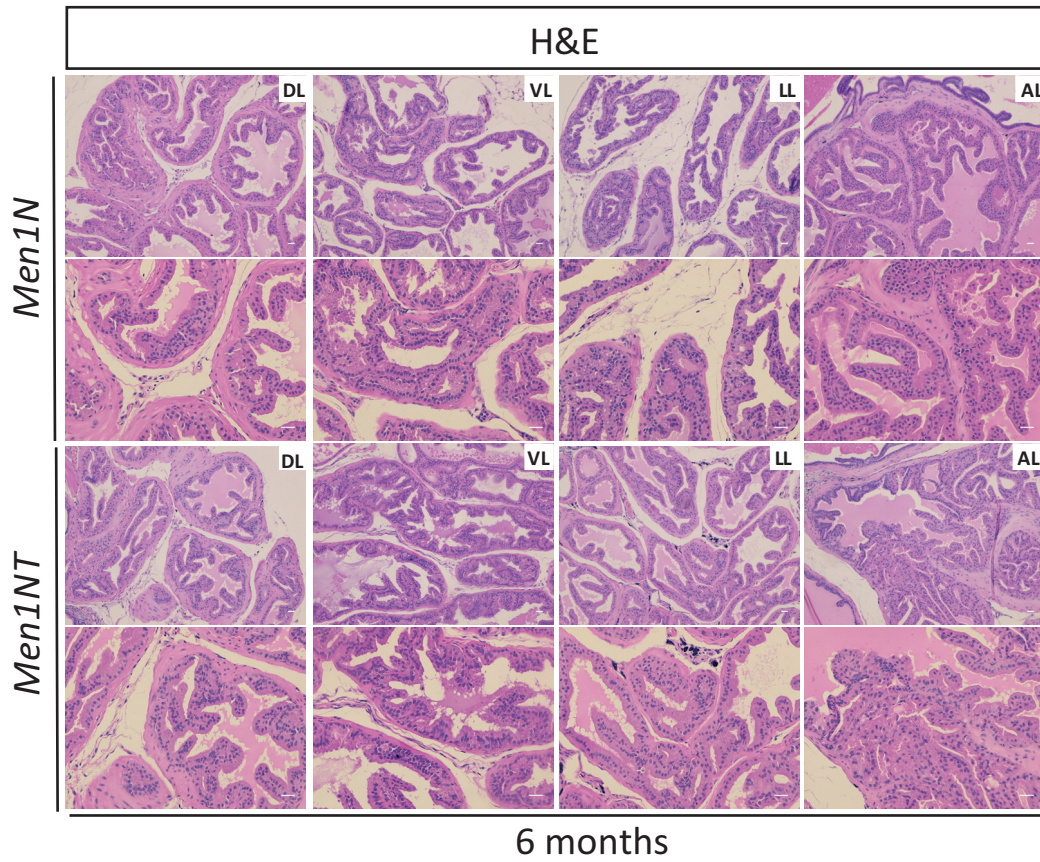


Figure 2 *Men1*-disruption in *Nkx3.1*-deficient prostatic cells results in early AR^{low} and late AR^{low}CD44⁺ prostatic lesions. (a) Co-immunofluorescence against AR and menin in prostate tissues from *Men1N* and *Men1NT* at 3 (left panel) and 6 (upper right panel) months of age. Graph is representative quantification of AR staining in menin positive and negative cells from *Men1NT* mice (n = 6). (b) Immunohistochemical detection of FKBP51 was performed in 6 months-old *Men1N* and *Men1NT* mice. The right column for each of these mice is a two-fold magnification of the left column. (c) H&E staining (left column) and immunohistochemistry against menin, CK18 and CK5 (from left to the right) on prostate sections from *Men1N* and *Men1NT* mice at 6 months of age. (d) Right-hand panel: Western blot analyses of menin, AR, PSA and TMPRSS2 expression in LNCaP cells treated with Si-RNA control (Si Ctrl) or Si -RNA targeting the *MEN1* gene (Si *MEN1* hs1), β -actin as been used as loading control. Left-hand panel: Upper panel, quantitative RT-qPCR analyses of *MEN1*, *AR* and *PSA* transcripts in LNCaP cells treated with Si ctrl or three different Si-RNAs targeting the *MEN1* gene (Si *MEN1* hs1, hs2, hs3). Lower panel, quantitative RT-qPCR analyses of *AR* and *PSA* mRNA expression in LNCaP cells treated with DMSO or with the menin inhibitor MI503 at three different concentrations, 1, 2.5 and 5 μ m. € Quantitative qPCR analyses of menin and H3K4me3 binding on the -2000pb / + 550pb area flanking the *AR* gene transcription start site (TSS), in LNCaP cells and in LNCaP cells treated with DMSO or MI503 at 5 μ m. (f) Co-immunofluorescence against CD44 and menin in *Men1N* and *Men1NT* mouse prostate tissues at 10 months of age. The lower panel is a twofold magnification of the middle panel. Inset is an amplified view showing an increase in CD44 expression in *Men1*-deficient cells. Graph is representative quantification of CD44 staining in menin positive and negative cells from *Men1NT* mouse (n = 6). All the data are represented as mean +/- SEM, ns p>0.05, * p<0.05, ** p<0.01, p<0.001.



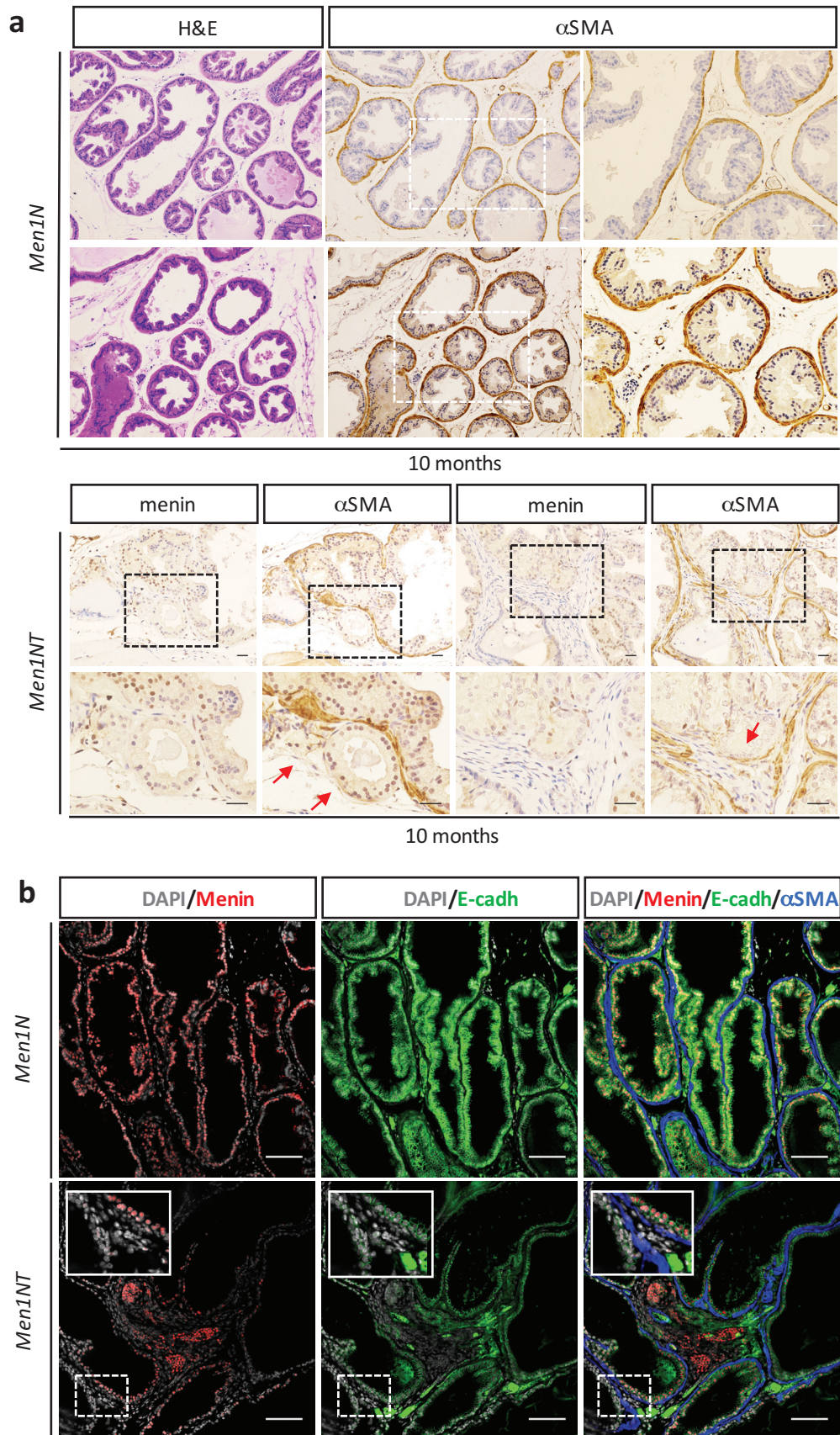
Supplementary Figure 1 The early effect of *Men1*-disruption in *Mkx3.1*-deficient prostatic cells. H&E stained entire section of prostate lobes from *Men1^N* (two left panels) and *Men1^{NT}* mice (two right panels) at three months of age.



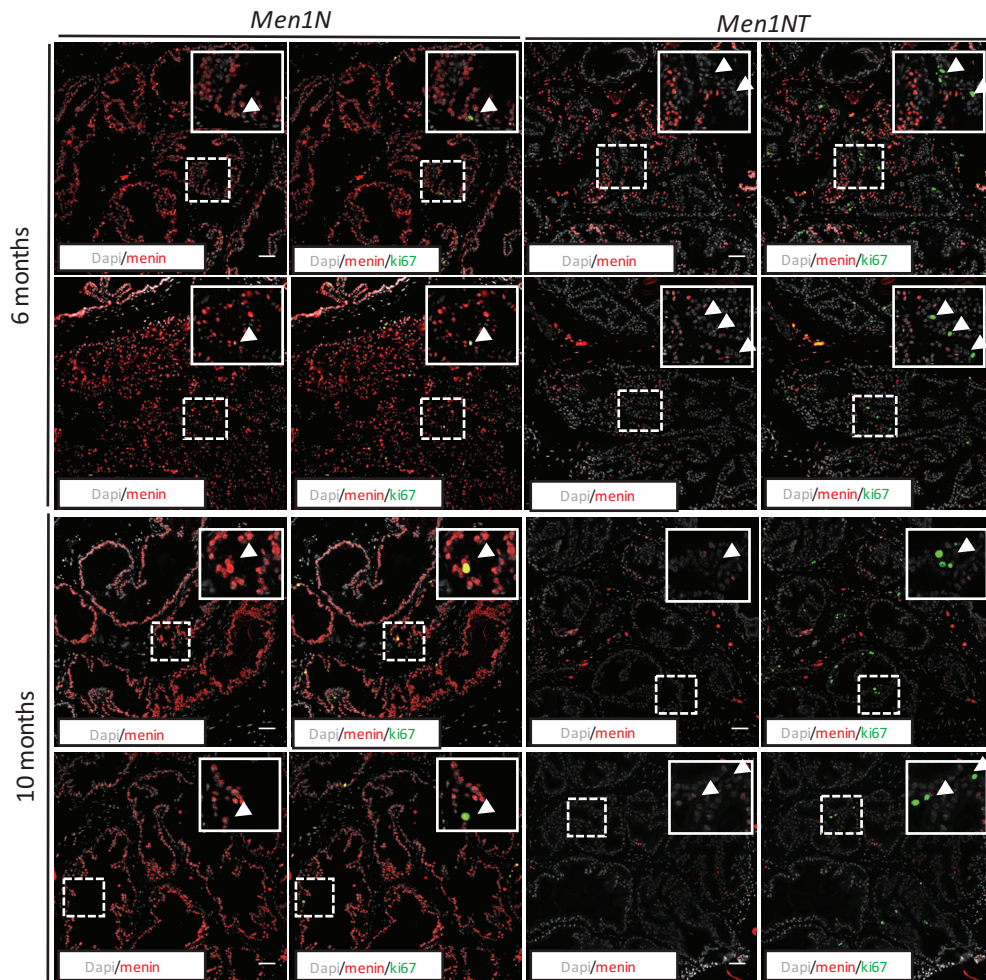
Supplementary Figure 2, related to Figure 1e. The effect of *Men1*-disruption in the mouse at 6 months of age. Representative images of H&E staining of different lobes from *Men1^N* (upper panel) and *Men1^{NT}* (lower panel) mice at 6 months of age. The lower panel is two-fold magnification of the upper panel. DL : dorsal lobe, LL : lateral lobe, VL : ventral lobe, AL anterior lobe. Scale bar 25 μ m.

Genotype	Pathological classification	3 months	6 months	10 months
Men1N <i>Men1^{F/F-}</i> <i>Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}</i> untreated	Normal PIN MIC	(5/5) 83% (1/5) 16% (0/5) 0%	(0/5) 0% (5/5) 100% (0/5) 0%	(0/5) 0% (5/5) 100% (0/5) 0%
MEN1NT <i>Men1^{F/F-}</i> <i>Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}</i> Tamoxifen treated	Normal PIN MIC	(0/7) 0% (7/7) 100% (0/7) 0%	(0/7) 0% (7/7) 100% (2/7) 28%	(0/7) 0% (7/7) 100% (4/7) 57%

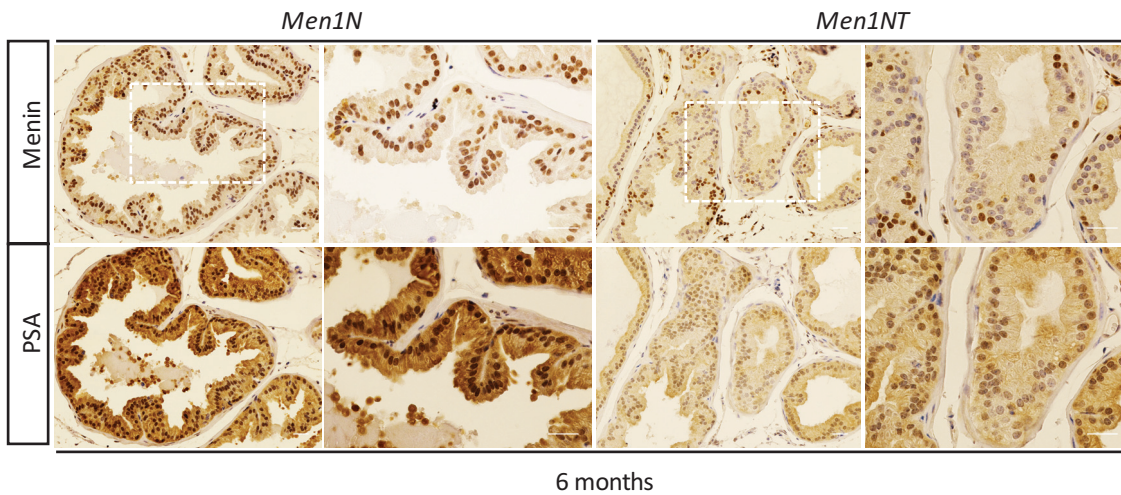
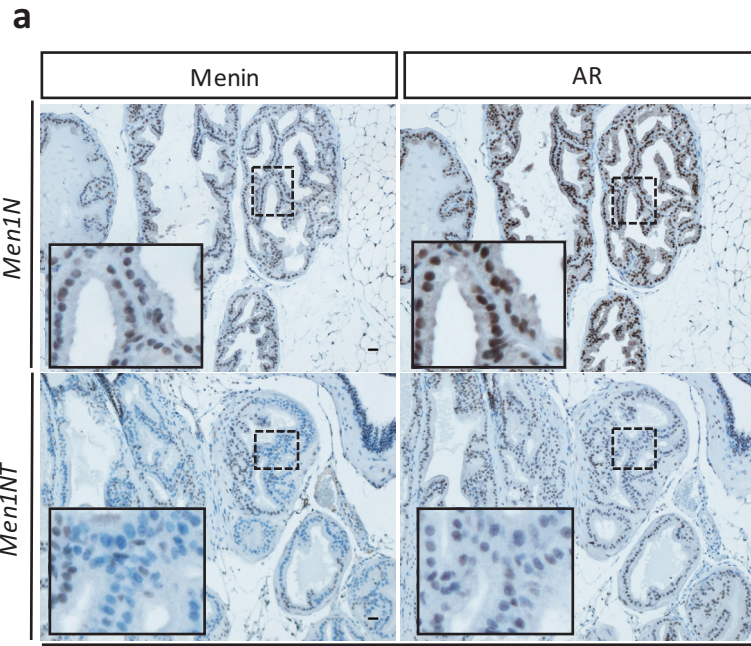
Table 1, related to figure 1. Prostatic lesions were classified according to the recommendation of Bar Harbor meeting of the mouse models of human cancer consortium prostate pathology committee. mPIN : mouse prostatic intraepithelial neoplasia, MIC : microinvasive carcinoma. The number of mice displaying each pathological classification category is indicated, and the corresponding percentage is shown in parentheses.



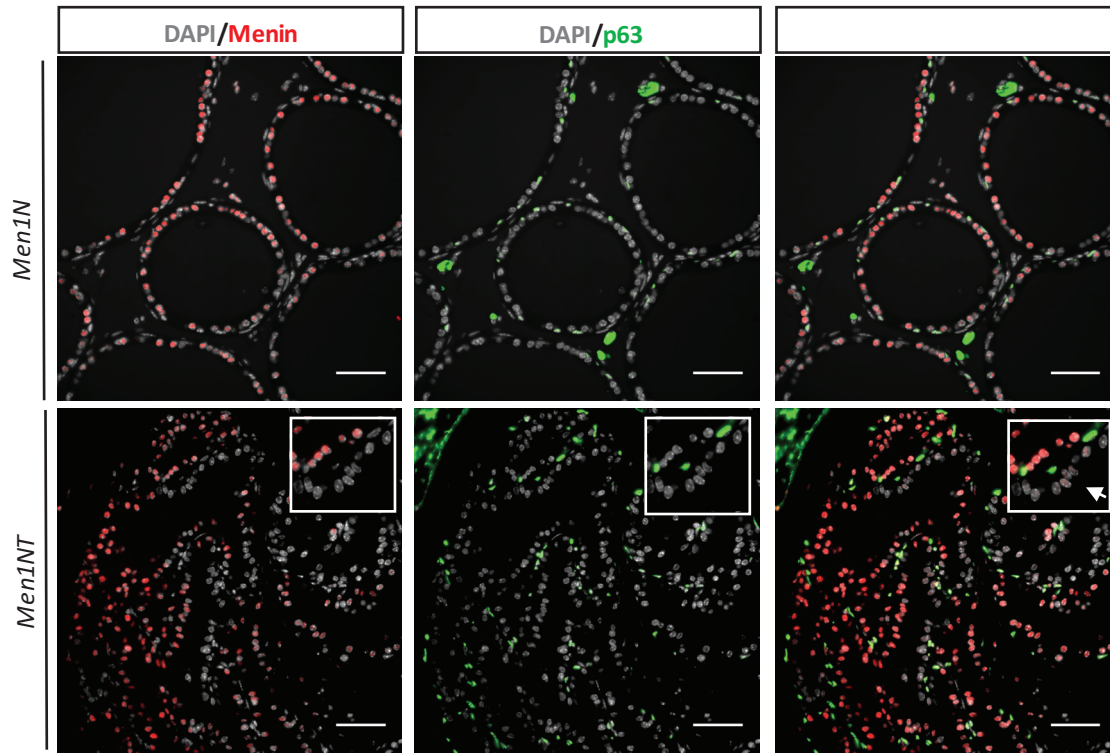
Supplementary Figure 3, related to figure 1f. Altered α SMA and E-cadherin expression upon *Men1*-disruption. (a) H&E staining and immunohistochemical analyses of menin and α SMA expression in the prostate gland from *Men1N* (upper part) and *Men1NT* (lower part) at 10 months of age. For immunohistochemical detection of α SMA in *Men1N* mice, right panel is a two-fold magnification of the left panel, showing that α SMA staining is continuous around the structure of mPIN lesions. Conversely, α SMA immunostaining in *Men1NT* shows a discontinuous layer around MIC lesions as indicated by the red arrows (lower panel). Lower panel is a two-fold magnification of the upper panel. (b) Triple immunofluorescence staining against menin, E-cadherin and α SMA on prostate sections from *Men1N* (upper panel) and *Men1NT* (lower panel) at 10 months of age. Insets show an amplified view of a part of immunostained prostatic lesions, illustrating the discontinuous α SMA layer and the decrease in E-cadherin expression in some of the *Men1*-deficient cells. Scale bar 50 μ m.



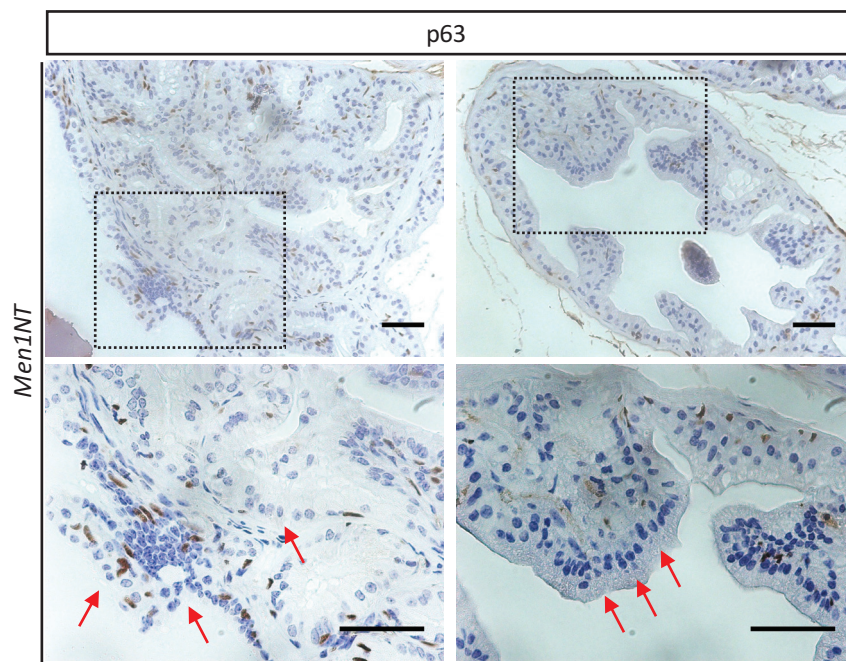
Supplementary Figure 4, related to figure 1g. *Men1*-disruption in *Nkx3.1*-deficient luminal cells leads to increase in cell proliferation. Co-immunofluorescence staining against menin and ki67 on prostate sections from *Men1N* (left panel) and *Men1NT* (right panel) at 6 months and 10 months of age, respectively. Insets show an amplified view of a part of immunostained prostatic lesions, illustrating that *Men1*-deficient cells from *Men1NT* have more ki67 positive staining. Scale bar 25 μ m.



Supplementary Figure 5, related to figure 2a and 2b. (a) Altered expression of AR and PSA expression upon Men1-disruption. Immunohistochemical detection of menin and AR expression on prostate section from *Men1N* mice (upper panel) and *Men1NT* (lower panel) at 10 months of age. Insets are an amplified view, illustrating the decrease in AR expression in PIN lesions from *Men1NT* mice. **(b)** Immunohistochemical detection of menin and PSA expression on prostate sections from *Men1N* (left panel) and *Men1NT* (right panel) mice at 6 months of age. The lower panel is a two-fold magnification of the upper panel. Scale bar 25 μ m.



3 months



6 months

Supplementary Figure 6, related to Figure 2c p63 expression in Men1-deficient prostatic lesions. Left-hand panel: Co-immunofluorescence against menin and p63 on prostate sections from *Men1N* mice (upper panel) and *Men1NT* mice (lower panel) at three month of age. Arrow in the inset, illustrate that none of the luminal *Men1*-deficient cells express the basal marker p63. Right-hand panel: Immunohistochemical detection of p63 on prostate section from *Men1NT* mice at 6 months of age. The lower panel is a two-fold magnification of the insets in the upper panel. Red arrows show that, again, the neoplastic cells from PIN lesions developed in *Men1NT* mice at 6 months of age don't express the basal marker p63.

Article 2

Reduced menin expression leads to diminished ERα and Gata3 expression in mammary cells and correlates with the occurrence of human luminal B subtype breast cancer

Contexte du projet

Données préliminaires

Des données préliminaires obtenues au sein de notre laboratoire ont pu montrer le rôle oncosuppressif du gène *Men1* dans les cellules de la glande mammaire, chez la souris. Le modèle *WapCre⁺Men1^{F/F}*, l'inactivation conditionnelle du gène *Men1* dans les cellules épithéliales de la glande mammaire, conduit au développement de lésion précancéreuses. Les analyses moléculaires réalisées dans ce modèle a permis de révéler une diminution d'expression du REα dans les cellules des lésions PIN déficientes pour le gène *Men1*. Plus récemment, des analyses cliniques menées en collaboration avec le département d'oncologie médicale du Centre Léon Bérard, ont montré qu'une expression faible de menin corrélait avec la survenue du sous type luminaire B du cancer du sein, exprimant faiblement le REα. Ces données issues du modèle murin *WapCre⁺Men1^{F/F}*, ainsi que des cancers humains nous ont amené à considérer le rôle de la protéine menin dans la régulation de l'expression du REα.

Résumé succinct

Pour résumer brièvement les données obtenues dans cet article 2, j'ai notamment pu mettre en évidence que le knockdown de menin conduit à une diminution d'expression du REα, dans deux lignées cellulaires du cancer du sein ER+ (MCF7 et T47D). De plus, j'ai montré que menin était capable de réguler l'expression du REα au niveau transcriptionnel, en occupant la partie proximale du promoteur du gène *ESR1*, codant pour le REα. L'utilisation

d'un inhibiteur de menin bloquant son interaction avec la protéine MLL, conduit également à la diminution d'expression du RE α . Néanmoins, il semblerait au vue de nos résultats que la perte de fonction de ce complexe n'affecte pas les marques d'histones activatrices H3K4me3 sur le promoteur proximal du gène *ESR1*. C'est la raison pour laquelle le rôle joué par menin sur cette partie proximale du promoteur de ESR1 reste encore mal compris.

Reduced menin expression leads to diminished ERα and Gata3 expression in mammary cells and correlates with the occurrence of human luminal B subtype breast cancer

Running title ERα regulation by menin plays a role in luminal B breast cancer

Romain Teinturier^{1#}, Samuele Gherardi^{1#}, Loay Kassem², Lucie Malbeteau¹, Muriel Le Romancer¹, Laura CORBO¹, Thomas Bachelot³, Isabelle Tréilleux^{4*} and Chang Xian Zhang^{1*}

¹ Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Lyon, 69008, France

² Clinical Oncology Department, Faculty of Medicine, Cairo University, Cairo, Egypt

³ Department of Medical Oncology, Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁴ Département de Biopathologie, Centre Léon Bérard, Lyon, France

RT and SG share the first authorship.

Conflict of interest statements

Nothing to disclose.

Correspondence and requests for reprints:

*IT and CXZ are co-senior authors of this study.

Chang Xian Zhang,

Cancer Research Centre of Lyon, France, F-69008, France

Email: chang.zhang@lyon.unicancer.fr

Isabelle Tréilleux

Centre Léon Bérard, Lyon, 69008, France

Email : isabelle.treilleux@lyon.unicancer.fr

Abstract

Menin, encoded by the tumour suppressor gene *MEN1*, has been recently involved in breast cancers. However, the previous studies reported controversial observations and the mechanisms underlying the involvement of the *MEN1* gene in breast cancer remains elusive. In the current study, we investigated the detailed role of menin in breast cancer by carrying out both clinical and experimental analyses. Double immunofluorescent analysis showed that early mammary lesions developed in *Men1* mutant mice displayed weak ER α expression. Consistently, *MEN1* silencing using Si-RNA approach led to both reduced *ESR1* mRNA and ER α protein expression in ER α ⁺ cell lines, MCF7 and T47D. Importantly, by analysing menin expression in 354 human breast cancers, we found that lower menin expression was associated with ER⁻ breast cancers (p=0.004). Moreover, among 294 ER⁺ breast cancer samples within the cohort, reduced menin expression was not only associated with bigger tumour size (p= 0.01) and higher SBR grades (p= 0.005), but also correlated with luminal B subtype breast cancer (p= 0.006). To dissect the regulation of ER α expression by menin, we next defined an unknown binding area of menin on the proximal *ESR1* promoter by ChIP analyses, situated between -2500pb to +2000pb position. Using reporter gene assay, the activity of the proximal *ESR1* promoter was shown markedly reduced upon menin downregulation. Finally, our data also showed that menin physically interacts with Gata3 and *MEN1* silencing led to reduced Gata3 expression in MCF7 cells,. The current work highlighted the link between menin's role in the regulation of ER α and Gata3 expression and the occurrence of luminal B subtype breast cancer. Our data provide insights onto the development of luminal B subtype breast cancer, and the better assessment for their target therapy.

Key words

menin, the *ESR1* gene, ER α , Gata3, breast cancer, luminal B subtype, promoter binding area

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy worldwide and remains the leading cause of cancer-related mortality in women¹. Only a relatively small proportion of breast cancers arises in individuals who inherit mutations in breast cancer susceptibility genes, such as the *BRCA1* and *BRCA2* genes². Previous expression profiling enabled to classify breast cancer into 7 different biologic subtypes, including luminal A, luminal B, luminal C, HER2-enriched, basal-like, claudin-low, and normal breast-like³. Two of these subtypes carry mammary luminal cell features in different extent. The luminal A subtype, representing about 44% of breast cancers, is known to overexpress ER-regulated genes, with reduced express of HER2 and proliferation related genes⁴. These tumours are sensitive to endocrine therapies, with a rather favourable prognosis. Luminal B breast tumours, representing about 20% of breast cancers, display lower expression of ER-related genes, a variable expression of HER2, and a higher expression of proliferation related genes⁵. Luminal B subtype has also been shown to have genomic instability and carry a poorer prognosis⁶.

Mutations of the *MEN1* gene predispose patients to Multiple Endocrine Neoplasia type 1 syndrome, with combined occurrence of endocrine tumours affecting mainly parathyroid glands, endocrine pancreas and anterior pituitary⁷. After its identification, the tumour spectrum of the disease has been enlarged to several types of non-endocrine tumours, such as lipoma, angioma⁸. Furthermore, numerous studies have revealed that menin is a multifaceted protein involved not only in the development and cell growth control of endocrine cells, but also in a variety of biological processes, including hematopoiesis, adipogenesis, osteogenesis⁹⁻¹⁰⁻¹¹. Diverse biological functions of menin may result from its physical or functional interactions with numerous proteins in different cell types¹². These menin-interacting proteins include transcription factors (the components of AP1, NFkB and the TGFβ signaling pathways) and chromatin modifying proteins (histone methyl transferase complex containing

mixed lineage leukaemia, MLL, and mSin3A histone deacetylase complex, HDAC). Through analysing the 3-D structure of the menin protein, the study by Huang et al. confirmed that menin has a strong affinity with both MLL1 (KMT2A) and MLL4 (KMT2B)¹³. Notably, menin is also known to physically interact with a range of nuclear receptors, including ER α and AR, and to regulate the corresponding pathways¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶.

Several lines of data, including those obtained from our laboratory, suggest that menin may be closely involved in hormone-dependant cancers, including in breast cancers. 1) Female heterozygous *Men1* knockout mice developed ER-positive breast cancer, with a low but significant frequency¹⁷, and conditional mammary gland-specific *Men1*-disruption led to MIN (mammary intraepithelial neoplasia) lesion development in more than 50% of female mutant mice¹⁸. 2) A recent exhaustive analysis with several cohorts of MEN1 patients revealed significant predisposition to breast cancer¹⁹. 3) Menin down-regulation was detected in a substantial proportion of human sporadic breast cancer samples¹⁸, and more importantly, *MEN1* mutations were found, although rarely, in sporadic breast cancers, making it being listed among the driver mutations/genes in this pathology²⁰. It is noted that the above genetic or genomic analyses all highlight menin's suppressive role in the tumorigenesis of mammary cells. However, at the same time, several studies reported data suggesting that the *MEN1* gene may display oncogenic effects in breast cancer cell lines and breast cancer development¹⁴⁻¹⁵⁻²¹. The controversial data make the mechanisms underlying the involvement of the *MEN1* gene in breast cancer still elusive. Noticeably, the latest publication revealing the regulation of menin on the enhancer of the *ESR1* gene suggests the distinct roles of menin in different subtypes of breast cancer²¹. The authors provided compelling data showing that, although menin does possess a crucial tumour suppressive role in normal mammary cells, it plays an oncogenic role in ER⁺ breast cancer cells through an enhancer-mediated action on *ESR1* expression. Given the existence of two different luminal subtypes of ER⁺ breast cancer, in the

current study, we sought to further investigate the role played by menin in these luminal subtype breast cancers. Our data unveiled the correlation between reduced menin expression and human luminal B subtype breast cancer, and detailed menin's role in the regulation of ER α and Gata3 expression that is essential for mammary luminal cell entity.

Material and Methods

Human patient samples

Human paraffin blocks were prepared and processed for immunostaining analyses as previously described¹⁸. The study was conducted in accordance with the guidelines in the Declaration of Helsinki and the use of all patient tissue specimens was carried out according to French laws and regulations.

Animal breeding

Men1^{F/F}-WapCre⁺ and *Men1^{+/+}-WapCre⁺* mice previously generated in our lab were used¹⁸. All animal experiments were conducted in accordance with accepted standards of animal care and were approved by the Animal Care and Use Committee of the University Lyon 1.

TMA analysis of human breast cancers

Breast cancers were obtained from 354 patients (M0) who underwent surgery at the Centre Leon Berard (CLB) from 2001 to 2003. Tissue micro-array (TMA) block preparation, menin expression assessment using IHC, and statistical analyses were performed as previously described¹⁸. Overall survival (OS), defined as the time from diagnosis to death or date of last follow-up, and progression-free survival (PFS), defined as the time from diagnosis to death or progression or to date of last follow-up (for censored patients), were studied. Survival

distributions were estimated using the Kaplan–Meier method and compared between menin level groups using the log-rank test. Details are available in the Supplementary

Construction of Luciferase constructs

We used genomic DNA extracts from MCF7 cells to generate promoter regions, prAB (genomic location : Chr6q25.1 ; 152127793-152129027) and prC (genomic location : Chr6q25.1 ; 152124474-152127509) of the human ESR1 gene. For prAB motif the forward primer was 5'-GATGCTAGCTATCCTAGCCCAAGTGAACCG-3' and the reverse primer was 5'-GCAGATCTGTGCAGACCGTGTCCCCGCAG-3'. For prC motif the forward primer was 5'-GAAGGTACCAGCATTGTTGGGCTGGACCTATT-3' and the reverse primer was 5'-CATAAGCTTATCTGACGAAGTGTTTCATGGTCT-3'. The resulting fragments of the proximal *ESR1* promoter region was cloned into the pGL3 Basic vector (Promega, Madison WI).

Cell Culture and transfections and luciferase assays

Two breast cancer cell lines expressing ER α , namely MCF7 and T47D were used in this study. MCF7 cells were cultured in DMEM (Gibco Invitrogen) containing 25 mM glucose supplemented with 10% (v/v) foetal calf serum (FCS), 2 mM L-Glutamine, 100 unit/ml Penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, MEM non-essential amino acids solution (1X), 100 mM β -Mercaptoethanol, at 37°C with 5% CO₂. T47D cells cultured in RPMI medium (Gibco Invitrogen) containing 25 mM glucose and supplemented with 10% (v/v) foetal calf serum (FCS), 2 mM L-Glutamine, 100 unit/ml Penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, HEPES 10 mM, Sodium Pyruvate 1 mM, at 37°C with 5% CO₂. Transient transfections were carried out in phenol red-free medium supplemented with 10% charcoal stripped serum (Biowest), in order to remove steroid hormones (steroid depletion), using Dharmafect 2 (Dharmacon) according

to the manufacturer's instructions. Inhibition of menin-MLL interaction was achieved through the use of MI-503 (Active Biochem), at the concentration of 2 μ M. Prior to performing treatment with estrogen ligands and MI503, cells were grown in phenol red-free medium supplemented with 10% charcoal stripped serum (Biowest), in order to remove steroid hormones (steroid depletion). Then the cells were treated for 3hours with E₂ (SIGMA) 10⁻⁸M and MI503 for 48hours at different concentrations.

Luciferase assays

For luciferase assay, MCF7 cells were cultured in 24 wells plate. Then 48h after the transfection, 250ng of the reporter plasmid prAB or prC, and 5 ng pRL-TK internal control vector were added to each well. Cell lysates were prepared and analyzed as previously reported²², by using a Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI). Comparisons between mean values were assessed using the two-tailed Student *t*-test.

Real-Time Reverse transcriptase and qPCR analyses

RNAs were extracted using RNeasy-Kits (Qiagen, Valencia, USA). Real-Time PCR analyses were carried out on a Step-One RT-System (Applied-Biosystem, France) using SYBR-Green (Life-Technology, France) and results of each samples normalized to *36B4*. Primer used are as follow :

MEN1 Fw: 5'-CATCCAGGACTACA ACTACT-3' ; *MEN1* Rev: 5'-ATGACATCATTGGCTACTTC-3'; *ESR1* Fw: 5'- GGCTGCAAGGCCTTCTTCAA-3'; *ESR1* Rev: 5'-CCTGGCAGCTCTTCCTCCTG-3'; *TFF1 (Ps2)* Fw: 5'-TTGTGGTTTTTCCTGGTGTC A -3'; *TFF1 (Ps2)* Rev: 5'-CCGAGCTCTGGGACTAATCA -3'; *GATA3* Fw: 5'-CAGACCACCACAACCACACTCT-3'; Rev : 5'-GGATGCCTTCCTTCTTCATAGTCA-3'

Protein extraction, immunoprecipitation, GST pull down and immunoblotting

Total protein extracts from cells were prepared and analysed as described previously²². The

following primary antibodies were used for western blot : rabbit anti-menin at 1/8000 (Bethyl laboratories, TX, USA), rabbit anti-ER α 1/4000 (Bethyl laboratories), rabbit anti-GATA3 (Bethyl laboratories), mouse anti-actin monoclonal antibody from ICN (1:50 000, Aurora, CA, USA). Immunoprecipitation was carried out according to the protocol described previously, with primary antibodies goat mouse anti-GATA3 at 1/2000 (Santa Cruz Bio, CA, USA). For GST pull-down assay, 1.25 μ g purified GST-menin protein or GST control protein was incubated with 1 mg or 2 mg of nuclear cell extracts prepared from MCF7 cells, as previously described. The co-sedimented proteins were detected by western blot using standard conditions.

Immunostaining

Briefly, endogenous peroxidases were quenched in 3% H₂O₂ solution for 30 min at room temperature. Heat induced epitope retrieval was performed by immersion in antigen-unmasking solution (catalog no. H-3300; Vector Laboratories) in a microwave oven for 15 min. After blocking with antibody diluent (Dako), sections were incubated overnight with a primary antibody. For immunofluorescence (IF) staining, signals were revealed with a Cy3 or Cy5 tyramide amplification kit (PerkinElmer), according to the manufacturer's instructions, with prior incubation with the appropriate biotinylated secondary antibody. The following primary antibodies were used for immunostaining: goat anti-menin at 1/8000 (Bethyl laboratories), rabbit anti-ER 1/4000 (Santa Cruz Biotechnology). Analyses were acquired on an Eclipse- NiE NIKON microscope, using NIS-Elements Software.

Proximity ligation assay (PLA)

MCF7 cells were fixed in methanol for 5 min and washed twice in PBS, then treated and analysed according to the manufacturer's instructions (Duolink II Fluorescence, Olink

Bioscience, Sweden), using dual primary antibodies rabbit anti-GATA3 1/2000 (Bethyl laboratories) and goat anti-menin 1/2000 (Bethyl laboratories). Analyses were acquired on an Eclipse- NiE NIKON microscope using NIS-Elements Software

ChIP-qPCR assay

Chromatin for ChIP was prepared from 5 millions of MCF7 or T47D cells. Briefly, cells were fixed in 1% formaldehyde for 10 min, nuclei were obtained and lysed in 300 µl ice-cold RIPA buffer prior Chromatin-DNA shearing with a Diogene Bioruptor. ChIP was performed using 5 µg of anti-menin antibody (A300-105A, Bethyl Laboratories Inc.), anti-H3K4me3 (C15410003, Diagenode, Belgium). Dynabeads® Protein G (10003D, Life Technologies, France) were used to retrieve Immunocomplexes. DNA was then extracted with phenol/chlorophorm/isoamylalcohol, following proteinase-K reverse-crosslinking. 2 µl of IP-DNA or 2 ng of INPUT DNA were used for Real Time PCR analysis to quantify co-precipitated chromatin-DNA. Relative enrichment of a given promoter region obtained with a specific antibody was compared with input DNA. Blocks of the region on Chr1 was used as a negative control for menin and H3K4me3 ChIPs. Primers used are as follow: *ESR1* -2500. Fw: 5'-GGAGCACCTCAGTATGCGT -3'; Rev: 5'-CTCTCATTTCCCAGTGGCGT-3'; *ESR1* -2000 Fw: 5'-TTTCCTCTTGCTTGGGGTGG-3'; Rev 5'-TACTGGGGAGGAGAAACCCC-3'; *ESR1* -1400 Fw: 5'-GCCCTATGAAGTGCTTTTTGCAT-3'; Rev: 5'-ACACATTAGGTGCATCGCAG-3'; *ESR1* -800 Fw: 5'-GCCCAGTGAACCGAGAAGA-3'; Rev: 5'-CGGTCTGGTCCAGCTAACAG-3'; *ESR1* +1 TSS Fw: 5'-TATCCAGCAGCGACGACGACCAG-3'; Rev: 5'-ATCACTCCAGGCACAACCTCG-3'; *ESR1* + 400 Fw: 5'-CATCTGGGATGGCCCTACTG-3'; Rev: 5'-CTCGGGGTAGTTGTACAGG-3'; *ESR1* +1200 Fw: 5'-CAGGCAAATAAACACGGGGC-3'; Rev: 5'-GCTAACTCCAAACACCCCA-3'; *ESR1* +2000 Fw: 5'-

GCCTGCAGAGGGATTAGGTG-3'; Rev: 5'-ATTCAGGACCCAGCCATGCG-3'; Chr1
Neg primers. Fw: 5'-CGGGGGTCTTTTTGGACCTT-3'; Rev: 5'-
GAAACACGGCTGCCAGAAAC-3'.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed as described in the figure legends; unpaired Student t tests were used unless otherwise indicated. All analyses were done using Prism5 software (GraphPad, USA); a P value of < 0.05 was considered significant. Results are given as means +/- standard errors of the means (SEM).

Results

Men1-deficiency in the mouse leads to ER α downregulation in early mammary lesions.

We have previously reported the high incidence of occurrence of mammary intraepithelial neoplasia (MIN) lesions found in *Men1* mammary conditional mutant mice¹⁸, the former displaying weak ER α expression. To better determine the causative role of menin deficiency in reduced ER α expression, we carried out double IF analysis of menin and ER α expression in respectively normal young *Men1^{F/F}-WapCre⁻* control mice and age-matched *Men1^{F/F}-WapCre⁺* mutant mice with MIN lesions. Three mice each in the control and mutant groups at different ages were analysed. As showed in Figure 1a, all the mammary luminal cells in control mice expressed menin. On the contrary, menin expression was lost in mammary cells of 80% of the 10-month-old mutant mice (Figure 1a). ER α was expressed in about 40% of the luminal cells expressing menin in *Men1^{F/F}-WapCre⁻* control mice (Figure 1a, upper panel), whereas its expression is lost in *Men1*-deficient cells of mutant mice (lower panel). The

merged image of menin and ER α staining indicated clearly that ER α was specifically less or not expressed in the nuclei of menin-deficient luminal cells (Figure 1a).

Menin downregulation in human ER α ⁺ mammary cells leads to reduced ER α expression.

We next sought to confirm the direct regulation of ER α expression by menin using different approaches in ER⁺ breast cancer cell lines. To this end, we first performed *MEN1* silencing using Si-RNA approach. As showed in Figure 1b, *MEN1* knockdown with two different Si-*MEN1*, both of them being effective in reducing *MEN1* transcription, led to a two fold decrease in *ESR1* mRNA levels in MCF7 and T47D cells by RT-qPCR analysis (Figure 1b, left panel). With the same treatment, *MEN1*-silencing cells displayed reduced ER α protein expression by western blot analyses (Figure 1b, right panel). At the same time, we checked the effects of *MEN1*-KD under oestrogen stimulation. The data obtained confirmed that *MEN1*-KD retained its effects in reducing *ESR1* transcription under the used conditions (Figure 1c). The above data thus demonstrated that menin expression is critical for maintaining *ESR1* transcription and ER α expression.

Lower menin expression is associated with luminal B subtype breast cancer.

The above observation prompted us to perform a thorough investigation of menin expression in a human breast cancer panel consisted of breast cancer patients operated in CLB from 2001 to 2003. In this cohort with 354 human breast cancer patients, we found that lower menin expression was significantly associated with ER⁻ breast cancers (p=0.004, Table 1). Furthermore, among the 294 assessable ER⁺ patients, 116 patients (39.5%) had low menin expression and 178 patients (60.5%) had high expression. Markedly, statistical analyses revealed that high menin expression was associated with luminal A subtype, whereas low menin expression with luminal B subtype breast cancer (p = 0.006, Table 2). Besides, low

menin expression correlated also with bigger tumour size ($p=0.016$) and higher SBR grades ($p=0.005$, Table 2).

Interestingly, we found that low menin expression predicted worse DMFS, with 10 yrs DMFS at 71.5% versus 81.2% in the case of high menin expression, with borderline statistical significance, $p=0.053$ (Figure 2a). Low menin expression was also associated with a trend for worse DFS with 65.7% 10 yrs DFS versus 75.0% seen in high menin expression patients, (borderline significance, $p= 0.088$, Figure 2b). Importantly, low menin expression was significantly associated with worse DFS in patients older than 50 years at diagnosis ($p=0.006$, Figure 1c).

The above data obtained in human patients, consistent with the observations made in *Men1*-deficient mutant mice, revealed the close relation between reduced menin expression and weaker ER α expression, suggesting that decreased ER α expression triggered by *Men1*-deficiency could be the molecular basis of the correlation observed in the current study between reduced menin expression and the occurrence of luminal B subtype breast cancer, the latter having in general worse prognostic than luminal subtype A breast cancer.

Menin binds to the proximal region of the ESR1 promoter.

Dreijerink *et al.* has recently reported that menin plays a role in the regulation of *ESR1* transcription in an enhancer-mediated way²¹. We noticed that, although the study showed a possible menin binding on transcription start site (TSS) region of the *ESR1* promoter, no further analysis has been performed on this region, likely because of few change in H3K4me3 mark upon *MEN1* silencing. To better dissect the regulation of *ESR1* transcription by menin at the proximal *ESR1* promoter region, we carried out ChIP analyses of menin binding from -2500pb to +2000pb around TSS (Figure 3a, top panel). Our data showed that menin was significantly enriched in the area from the transcription start site to +2000pb from the former

(Figure 3b), both in MCF7 and T47D cells, and more specifically in the promoter area C in MCF7. Importantly, by using luciferase reporter assay, we confirmed that the transcriptional activity of the proximal *ESR1* promoter was indeed markedly reduced when the *MEN1* gene was knocked down (Figure 3c).

According to the data of Dreijerink et al, showing that H3K4 marks are enriched in the proximal part of ER α promoter, we sought to investigate the involvement of the COMPASS-like complex in the regulation of ER α expression. By treating MCF7 and T47D cells with the inhibitor of menin-MLL interaction, MI503, RT-qPCR analyses showed more than two fold decrease in *ESR1* gene expression (Figure 4a, left panel). Western blot analyses in MCF7 and T47D cells using the same inhibitor also revealed a decrease in ER α expression at the protein level (Figure 4a, right panel). Considering the current acknowledge on COMPASS complex transcriptional regulatory role, we further checked the eventual alteration of H3K4me3 mark at this region when *MEN1/MLL complex* is inhibited. As showed in Figure 4b, ChIP analysis with anti-H3K4me3 antibodies indicated that the histone methylation on the H3K4 position was not altered upon menin/MLL inhibition, while the same treatment led to markedly reduced menin binding. Furthermore, RT-qPCR analyses also showed that neither MLL1 nor MLL2 alone seemed to play a role in *ESR1* transcription (Figure 4c). Taken together, our data provided evidence showing that menin may regulates the proximal *ESR1* promoter through compass-like complex independent mechanisms.

Mein interacts with Gata3 and regulates its expression in MCF7 cells

The transcription factor Gata3 is known to be a major factor involved in the regulation of *ESR1* expression²³. Moreover Gata3 has been reported to interact with menin in lymphocytes²⁴. We verified whether the expression of this protein changes after *MEN1* silencing by western blot, and found that Gata3 expression was markedly decreased at the

protein level, but not at the mRNA level in MCF7 cells (Figure 5a). We thus further performed analyses using both GST pull-down and PLA analyses, to determine whether menin interacts GATA3 in breast cancer cells. The data obtained demonstrated that Gata3 interacted with menin, shown both by GST pull down experiment and at the endogenous level by PLA in MCF7 cells, the binding of GATA3 being located at the 259 and 571 amino acids (Figure 5a). Nevertheless, we did not find any binding of GATA3 on the proximal part of the *ESR1* promoter (data not shown).

Discussion

The current work affords both clinical and experimental data showing that menin is critically involved in ER α expression and that its inactivation in mammary cells may play an important role in the occurrence of luminal B subtype breast cancer. Our data highlighted complex cellular and molecular consequences of reduced menin expression in mammary cells. Our data highlighted complex physiopathological consequences of the reduced menin expression in mammary cells, suggesting that they may cover not only cell proliferation, but also other characteristics of tumour cells.

Correlation of reduced menin expression and luminal B subtype

We have previously observed that the mammary lesions developed in mammary cell-specific *Men1* mutant mice displayed low ER α expression¹⁸. We've now further demonstrated that the decrease in *Men1*-deficient mammary cells is an early event, suggesting that menin inactivation favours the occurrence of mammary lesions with weak ER α expression. Interestingly, by analysing menin expression in a large cohort, we found that reduced menin expression was significantly correlated with both ER $^-$ breast cancer and, among ER $^+$ breast cancer, with luminal B subtype breast cancer. Consistent to this finding, reduced menin was

also found to be correlated to bigger tumour size, more advanced BSR grades and worse prognostics, all of them being the major features of luminal B subtype breast cancer⁵. Interestingly, in the search of other luminal cell factors whose expression could be regulated by menin, we found that not only menin binds physically with Gata3 in mammary cells, but also *MEN1* silencing resulted in reduced Gata3 expression. Knowing that Gata3 is a critical mammary luminal cell factor and its reduced expression is often seen in luminal B subtype breast cancer²⁵, the observed regulatory role of menin on Gata3 expression would be relevant for understanding luminal B subtype occurrence. In the literature, the mechanisms leading to the occurrence of two subtypes of luminal breast cancers are only rarely addressed. The current work may provide useful hints or interest for further advancing such studies.

Inversely, the data from our work showing menin's positive regulatory role on *ESR1* transcription, reminiscent of the data reported by Dreijerink et al based on their genomic analyses using cancer cell line, seem to support the role of menin in breast cancer cell lines whose cell proliferation is highly ER α -dependent. Therefore, by combining the data obtained from our experimental and clinical analyses, we consider that menin plays most likely an opposite role in the occurrence of luminal A and B subtypes of breast cancers.

Menin's binding on the proximal ESR1 promoter

The current work revealed that menin binds to the proximal *ESR1* promoter. Importantly, following *MEN1* silencing, the transcriptional activity of this promoter region was reduced, whereas H3K4me3 was not significantly altered. Dreijerink et al has recently described their finding about capacity of menin in regulating *ESR1* transcription by binding to the remote upstream part of regulatory sequences of the *ESR1* gene, through an enhancer-mediated looping mechanism involving GATA3²¹. Moreover, the occupancy of this enhancer sequence by GATA3 have been already reported to play an important role in the regulation of

ER α expression upon estradiol stimulation²³. Our finding provides, therefore, complementary information concerning menin's regulatory role on the proximal *ESR1* promoter expression and suggests that other factors may also participate in this regulation mediated by menin. It would be interesting in the future to identify the factors or cofactor work together, positively or negatively, with menin in regulating the *ESR1* gene.

The emerging role of the *MEN1* gene in the tumorigenesis of mammary cells starts to show its multifaceted effects. The current work provides substantial data showing that menin may play different, even opposite, roles in different contexts of breast cancer development, in agreement with the findings recently reported by Dreijerink et al. This may better explain seemingly controversial data reported so far from genetic data obtained from naturally occurring tumours and those obtained mainly from cultured cancer cells. Our data may also call for cautious selection of subtypes of breast cancer in designing new therapeutic strategies involving the use of menin and MLL inhibitors.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Emilie SERVOZ for the maintenance of the mouse colonies, Dr. Brigitte MANSHIP for her assistance in proofreading the manuscript. This study was supported by Epigenetics & Cancer Program (ASC14092CSA), Agence National de Recherche (grant SVSE2 ANR 10 BLANC 1240 04), the Ligue contre le Cancer du Rhône and de la Loire, the Fondation de l'Association pour la Recherche contre le Cancer (SFI20101201530).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.T and S.G conducted the experiments, analysed and interpreted the data, prepared figures and manuscript; L.K and L.M provided technical and material support and participated in data

interpretation; T.B and I.T supervised the development of the tissue banks, performed pathological analyses and data interpretation; M.L, and L.C and I.T participated in study design and provided critical revision of the manuscript; C.X.Z conceived and supervised the study and manuscript preparation, and obtained funding.

References

1. Tao, Z. *et al.* Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem. Biophys.* **72**, 333–338 (2015).
2. Petrucelli, N., Daly, M. B. & Feldman, G. L. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genet. Med.* **12**, 245–259 (2010).
3. Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–10874 (2001).
4. Dai, X. *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am. J. Cancer Res.* **5**, 2929–43 (2015).
5. Creighton, C. J. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biol. Targets Ther.* **6**, 289–297 (2012).
6. Kittaneh, M. & Montero, A. J. Biomarkers in Cancer Molecular Profiling for Breast Cancer : A Comprehensive Review. *Biomark. Cancer* **5**, 61–70 (2013).
7. Men, T. Editorial : Multiple Endocrine Neoplasia — Syndromes of. **83**, (1998).
8. Falchetti, A. *et al.* Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): not only inherited endocrine tumors. *Genet. Med.* **11**, 825–35 (2009).
9. Cheng, P. *et al.* Tumor suppressor Menin acts as a corepressor of LXR α to inhibit hepatic lipogenesis. *FEBS Lett.* **589**, 3079–3084 (2015).
10. Yokoyama, A. *et al.* The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic

- cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell* **123**, 207–218 (2005).
11. Sowa, H. *et al.* Menin is required for bone morphogenetic protein 2- and transforming growth factor β -regulated osteoblastic differentiation through interaction with Smads and Runx2. *J. Biol. Chem.* **279**, 40267–40275 (2004).
 12. Matkar, S., Thiel, A. & Hua, X. Menin: A scaffold protein that controls gene expression and cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 394–402 (2013).
 13. Huang, J. *et al.* The same pocket in menin binds both MLL and JUND but has opposite effects on transcription. *Nature* **482**, 542–6 (2012).
 14. Imachi, H. *et al.* Menin, a product of the MEN1 gene, binds to estrogen receptor to enhance its activity in breast cancer cells: Possibility of a novel predictive factor for tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res. Treat.* **122**, 395–407 (2010).
 15. Dreijerink, K. M. A. *et al.* Menin links estrogen receptor activation to histone H3K4 trimethylation. *Cancer Res.* **66**, 4929–4935 (2006).
 16. Malik, R. *et al.* Targeting the MLL complex in castration-resistant prostate cancer. *Nat. Med.* **21**, 344–352 (2015).
 17. Bertolino, P., Tong, W.-M., Galendo, D., Wang, Z.-Q. & Zhang, C.-X. Heterozygous Men1 Mutant Mice Develop a Range of Endocrine Tumors Mimicking Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1880–1892 (2003).
 18. Seigne, C. *et al.* High incidence of mammary intraepithelial neoplasia development in Men1-disrupted murine mammary glands. *J. Pathol.* **229**, 546–58 (2013).
 19. Dreijerink, K. M. A., Goudet, P., Burgess, J. R. & Valk, G. D. Breast-cancer predisposition in multiple endocrine neoplasia type 1. *N. Engl. J. Med.* **371**, 583–4 (2014).
 20. Nik-Zainal, S. *et al.* Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* **534**, 1–20 (2016).

21. Dreijerink, K. M. *et al.* Article Enhancer-Mediated Oncogenic Function of the Menin Tumor Suppressor in Breast Cancer. *Cell Rep.* **In Press**, 2359–2372 (2017).
22. Bonnavion, R. *et al.* Foxa2, a novel protein partner of the tumour suppressor menin, is deregulated in mouse and human *MEN1* glucagonomas. *J. Pathol.* 1–12 (2017).
doi:10.1002/path.4885
23. Eeckhoute, J. *et al.* Positive cross-regulatory loop ties GATA-3 to estrogen receptor ?? expression in breast cancer. *Cancer Res.* **67**, 6477–6483 (2007).
24. Nakata, Y. *et al.* that plays a pivotal role in human T helper type 2 cell development c-Myb , Menin , GATA-3 , and MLL form a dynamic transcription complex that plays a pivotal role in human T helper type 2 cell development. **116**, 1280–1290 (2013).
25. Mair, B. *et al.* Gain- and Loss-of-Function Mutations in the Breast Cancer Gene GATA3 Result in Differential Drug Sensitivity. *PLoS Genet.* **12**, 1–26 (2016).

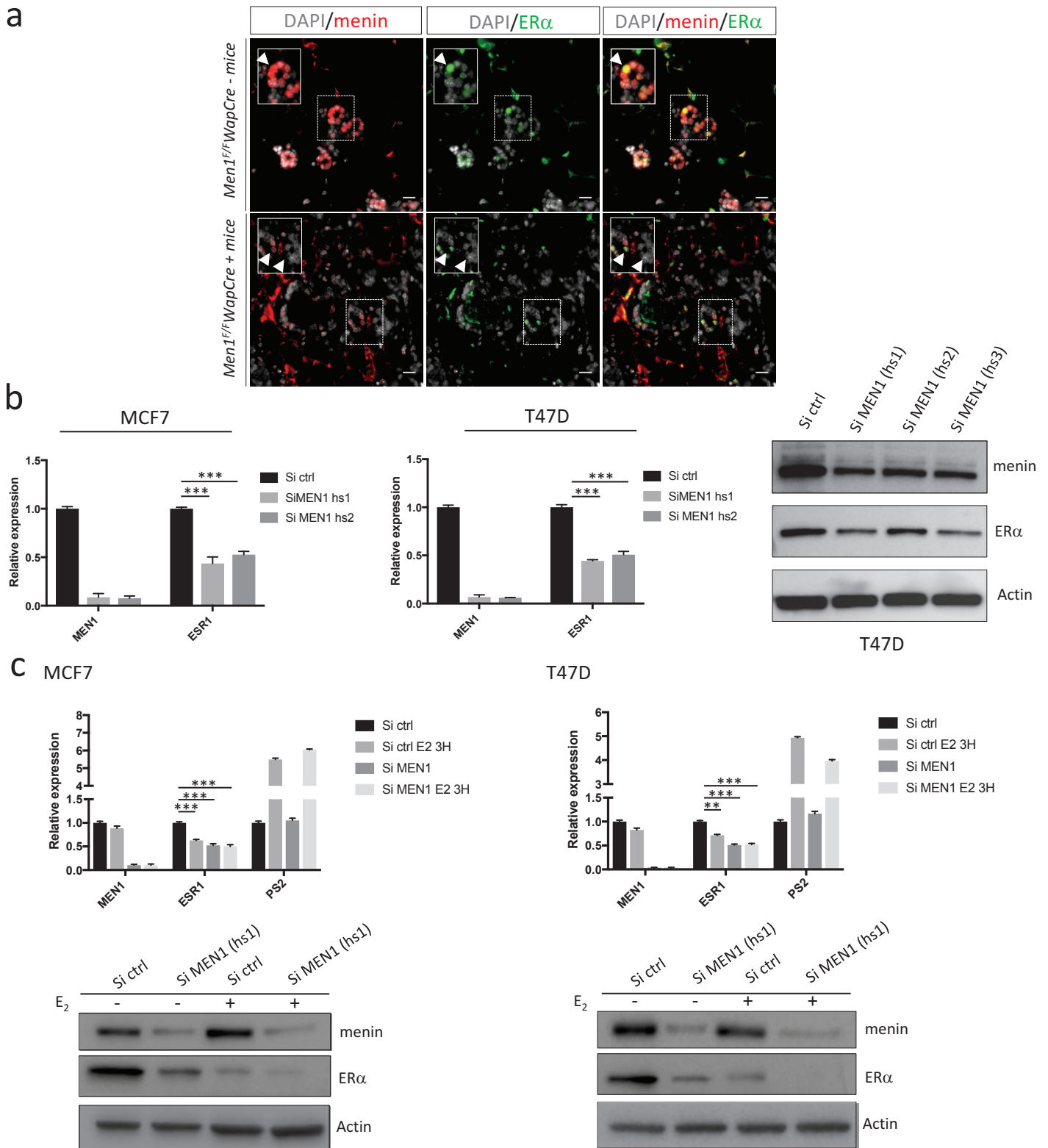


Figure 1. Reduced menin expression leads to decrease ER α expression. **a**, Co-immunofluorescence against menin and ER α on mammary glands sections from *Men1^{F/F}WapCre* - mice (upper panel) and *Men1^{F/F}WapCre* + mice (lower panel) at 10 months of age. Arrow heads in the inset, illustrate that the reduced menin deficiency led to the loss of ER α expression. **b**, Quantitative RT-qPCR analyses of the *MEN1* and *ESR1* gene expression in MCF7 and T47D cells treated with Si-RNA control (Si ctrl) or two different Si-RNA targeted the *MEN1* gene (hs1 and hs2). Western blot analyses using antibodies against menin and ER α , in T47D treated with Si-RNA control (Si ctrl) or three different Si *MEN1* (Si *MEN1*, hs1, hs2, hs3). **c**, *MEN1* knockdown decreases ER α expression in ER+ breast cancer cell lines upon estradiol stimulation. Western blot analyses using antibodies against menin and ER α , in MCF7 and T47D treated with Si-RNA control (Si ctrl) or Si *MEN1*-hs1 and then subjected to estradiol (E₂) stimulation at 10nM concentration. Quantitative RT-qPCR analyses of the *MEN1* and *ESR1* gene expression in MCF7 and T47D cells treated with Si ctrl or Si *MEN1*-hs1 and the subjected to estradiol (E₂) stimulation at 10nM concentration. All the data are represented as mean +/- SEM, ns p>0.05, * p<0.05, ** p<0.01, p<0.001.

Variable		Menin low (≤ 100)		Menin high (> 100)		P*
		No.	(%)	No.	(%)	
		151	(42.7)	203	(57.3)	
Age (Yr)	- <i>Mean (\pm SD)</i>	59.2 (± 13.3)		58.6 (± 11.2)		0.081 [†]
Age groups	- $\leq 50y$	31	(20.5)	58	(28.6)	0.085
	- $> 50y$	120	(79.5)	145	(71.4)	
BMI	- ≤ 25	78	(53.4)	133	(67.9)	0.007
	- > 25	68	(46.6)	63	(32.1)	
T. size	- $\leq 2cm$	72	(47.7)	131	(64.5)	0.002
	- $> 2cm$	79	(52.3)	72	(35.5)	
LN invasion	- <i>No</i>	64	(42.4)	84	(41.1)	0.85
	- <i>Yes</i>	87	(57.6)	119	(58.6)	
SBR grade	- <i>Gr 1</i>	16	(10.6)	46	(22.7)	0.001
	- <i>Gr 2</i>	68	(45.0)	102	(50.2)	
	- <i>Gr 3</i>	67	(44.4)	55	(27.1)	
ER status	- <i>Negative</i>	26	(17.2)	20	(9.9)	0.041
	- <i>Positive</i>	125	(82.8)	183	(90.1)	
PR status	- <i>Negative</i>	44	(29.1)	44	(21.7)	0.108
	- <i>Positive</i>	107	(70.9)	159	(78.3)	
Her 2 status	- <i>Negative</i>	84	(89.6)	100	(95.2)	0.049
	- <i>Over-expressed</i>	12	(10.4)	5	(4.8)	

Table 1 : Correlation between Menin expression and the clinico-pathologic factors of breast cancer. Low menin expression is associated with ER negative status (**p=0.041**). *Correlation by Pearson's Chi square test unless otherwise specified [†] Difference between means by Student's T test.

Variable		Menin low		Menin high		P*
		No.	(%)	No.	(%)	
		116	(39.5)	178	(60.5)	
Age groups	- ≤50y	21	(18.1)	51	(28.7)	0.040
	- >50y	95	(81.9)	127	(71.3)	
Menopausal Status	-Premenopausal	22	(19.9)	56	(32.6)	0.053
	-Postmenopausal	92	(80.1)	118	(67.4)	
BMI	-≤25	64	(57.1)	116	(67.8)	0.045
	->25	48	(42.9)	55	(32.2)	
T. size	- ≤2cm	62	(53.4)	120	(67.4)	0.016
	- >2cm	54	(46.6)	58	(32.6)	
LN invasion	-No	46	(39.7)	74	(41.6)	0.744
	-Yes	70	(60.3)	104	(58.4)	
SBR grade	-Gr 1	16	(13.8)	46	(25.8)	0.005
	-Gr 2	62	(53.4)	99	(55.6)	
	-Gr 3	38	(32.8)	33	(18.5)	
PR status	-Negative	18	(15.5)	21	(11.8)	0.358
	-Positive	98	(84.5)	157	(88.2)	
Breast Ca. Subtype	-Luminal A	67	(57.8)	130	(73.0)	0.006
	-Luminal B	49	(42.2)	48	(27.0)	
Type of adjuvant hormonal	-Tamoxifen	51	(45.5)	81	(45.8)	0.970
	-AI	61	(54.5)	96	(54.2)	
Type of adjuvant chemo	-Anthracyclin	51	(96.2)	77	(88.5)	0.509
	-Anthra/Taxane	2	(3.8)	9	(10.3)	
	-Other	0	(0)	1	(1.1)	

Table 2 : Correlation between Menin expression and the clinico-pathologic factors of breast cancer. Low menin expression is associated with **Luminal B subtype, (p=0.006)**.

*Correlation by Fisher's exact test

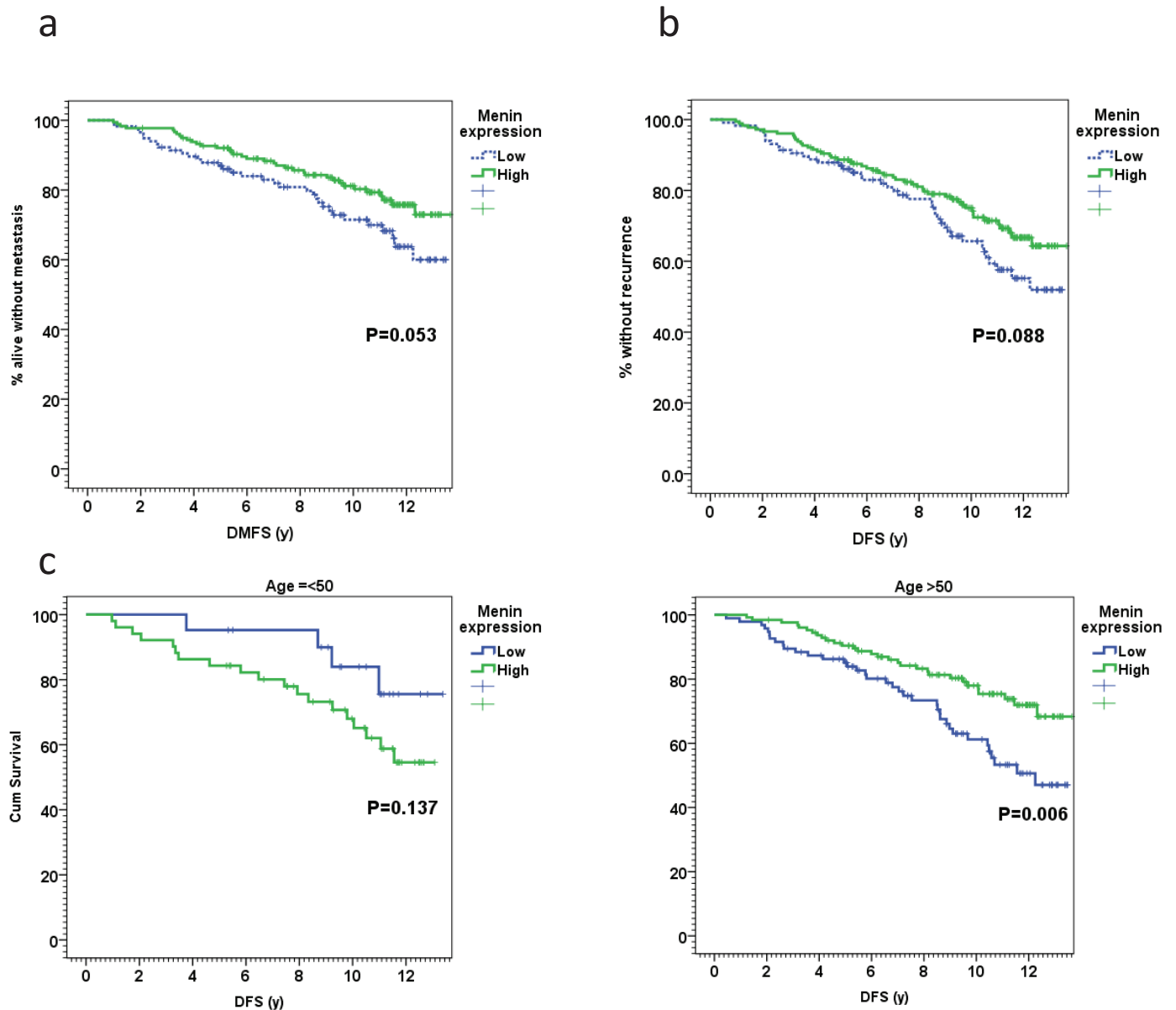


Figure 2. Comparison of Kaplan-Meier survival curves in between menin-high and menin-low expression breast cancer. Comparison of Kaplan–Meier estimates for **a**, distant metastasis-free survival (DMFS) **b**, disease free survival (DFS) **c**, cumulative survival (left panel : patients younger than 50 years old; right panel : patients older than 50 years old) in breast cancer patients included in the TMA analysis showing the survival distribution curves between tumours with high expression of menin (> 100) (blue curve) and low menin nuclear staining (\leq 100) (green curve).

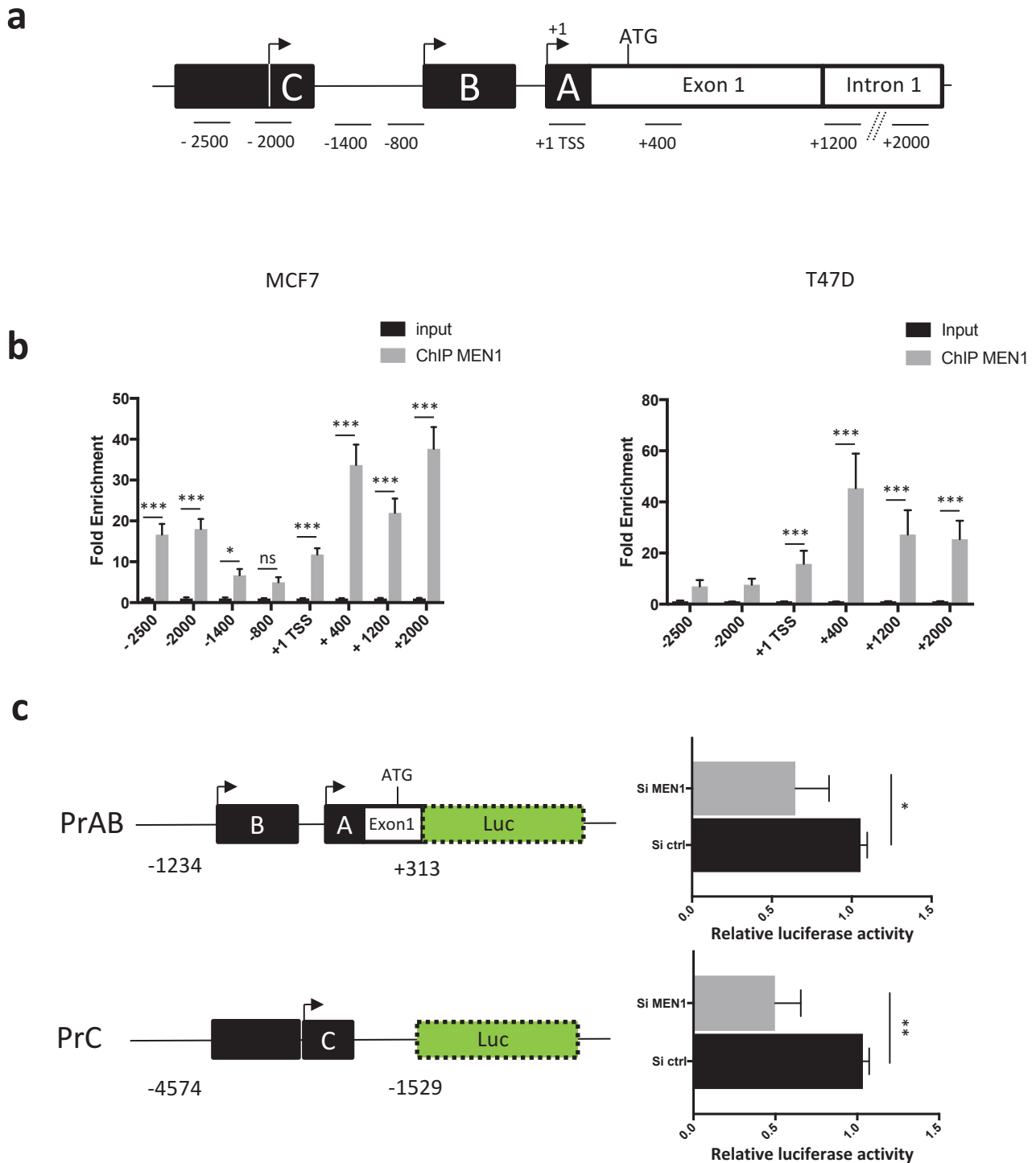


Figure 3. Recruitment and effects of menin on the proximal *ESR1* promoter. **a**, Schematic view of the eight different regions of the *ESR1* promoter studied by ChIP. **b**, Quantitative qPCR analysis of menin binding on the -2500pb/+2000pb area flanking the transcription start site (TSS) on the *ESR1* gene, in MCF7 and T47D cells. **c**, Schematic representation of the pGL3-prAB-luc vector containing A and B alternative promoter of the *ESR1* gene, and pGL3-prC-luc vector containing alternative promoter C of the *ESR1* gene. MCF7 cells were transfected with Si-ctrl or *Si MEN1*-hs1 and pGL3-prAB or pGL3-prC luciferase reporter assay. After 48h of transfection, luciferase activities in triplicate samples for each conditions were measured. All the data are represented as mean +/- SEM, ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

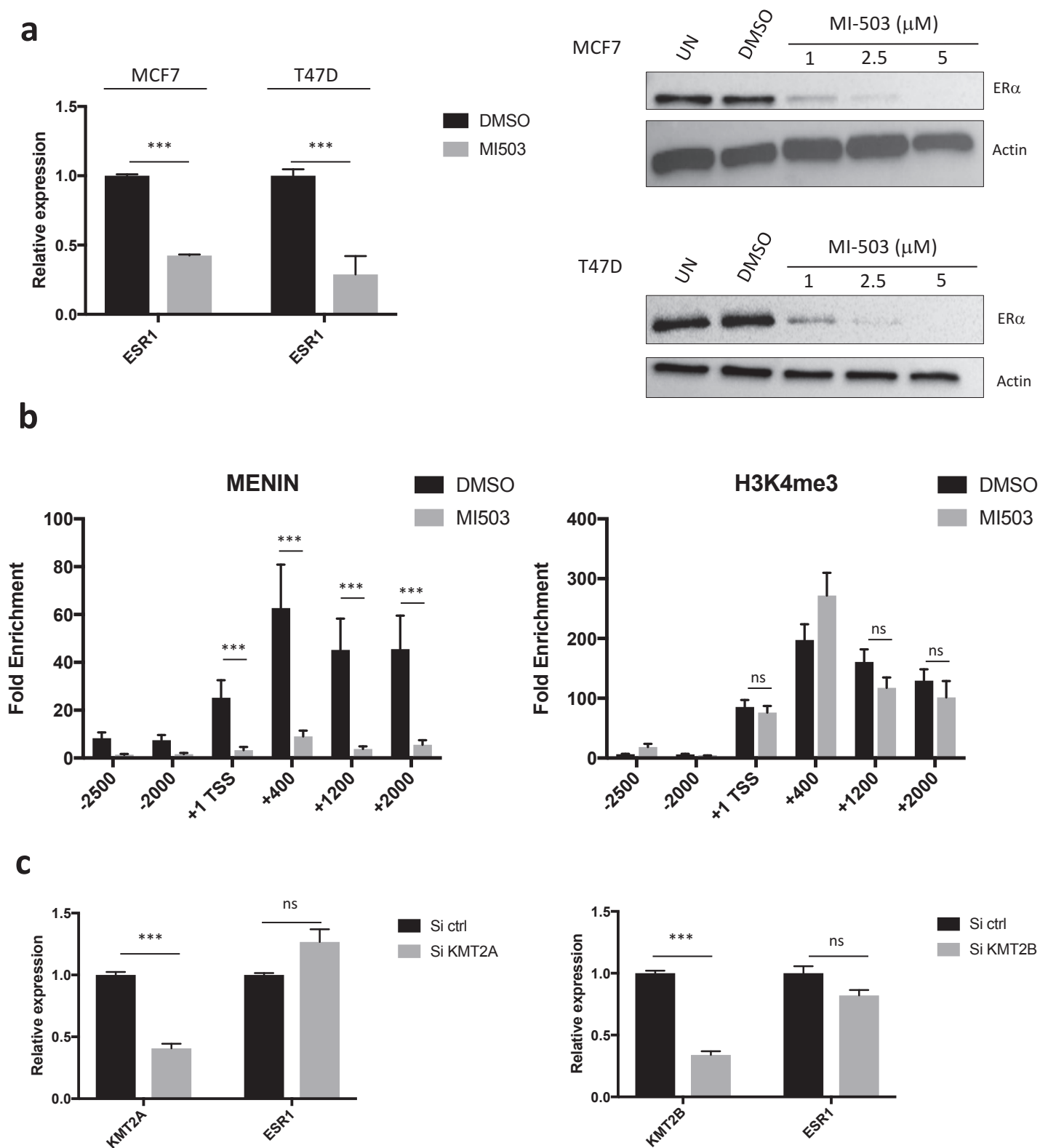


Figure 4. The regulation of the proximal *ESR1* promoter by menin is independent of the COMPASS-like complex. **a**, Quantitative RT-qPCR analyses of the *ESR1* gene expression in MCF7 and T47D cells treated or not with the inhibitor of menin-MLL interaction, MI503 at the concentration of 1 μ M. Western blot analyses of ER α expression in MCF7 cells untreated (NS), **b**, Quantitative qPCR analysis of menin binding on the -2500pb/+2000pb area flanking the transcription start site (TSS) on the *ESR1* gene, in MCF7 cells treated or not with the inhibitor of menin-MLL interaction, MI-503, at a concentration of 2 μ M. **c**, Quantitative RT-qPCR analyses of the *KMT2A* (MLL1), *KMT2B* (MLL2) and *ESR1* gene expression in MCF7 cells treated with Si ctrl, Si *KMT2A* or Si *KMT2B*.

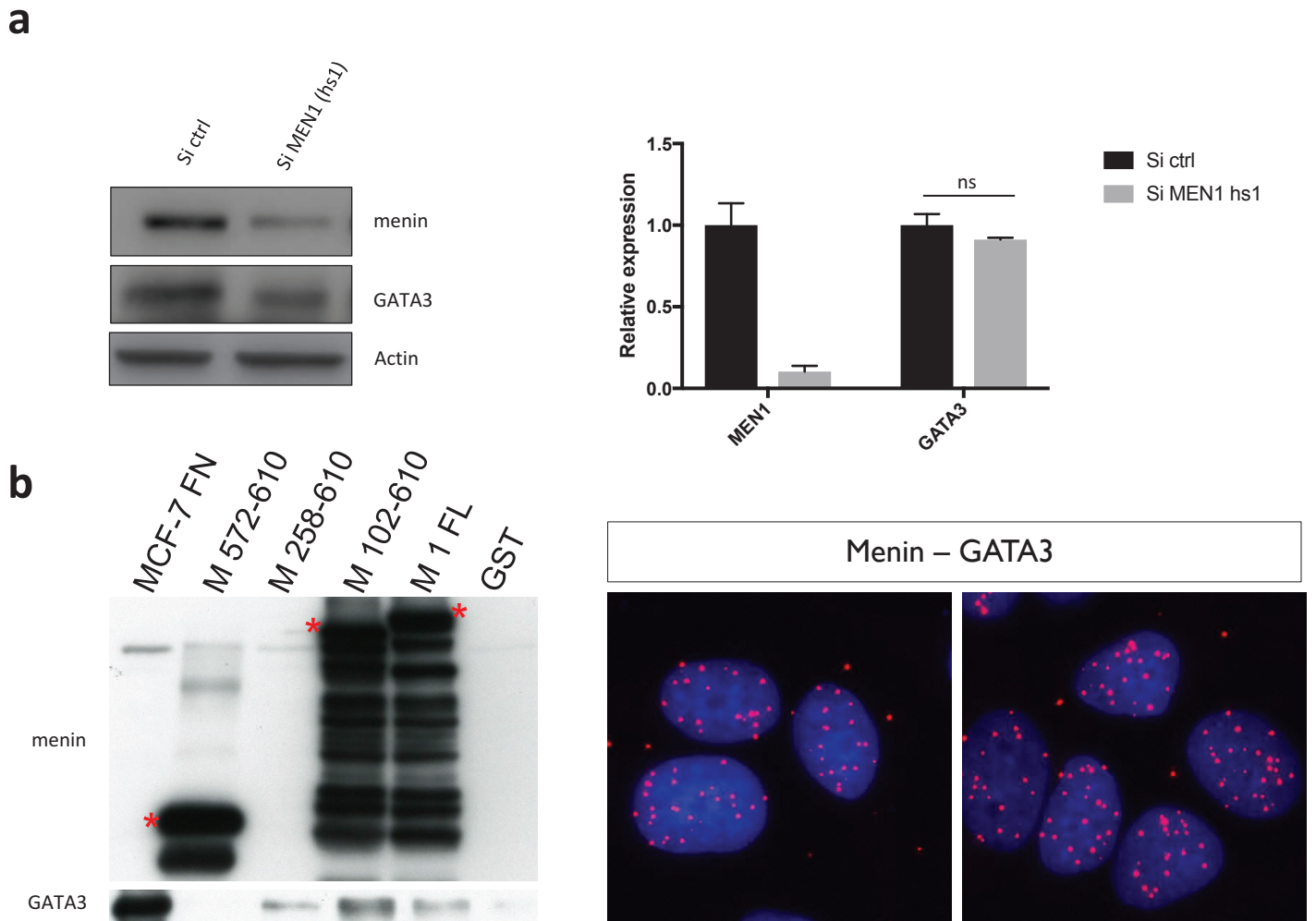


Figure 5. Menin interacts with GATA3 and regulates its expression in MCF7 cells. **a**, Western blot analyses using antibodies against menin and GATA3, in MCF7 cells treated with Si ctrl or Si MEN1-hs1. Quantitative RT-qPCR analyses of the *ESR1* gene expression in MCF7 cells treated with Si ctrl or Si MEN1-hs1 **b**, Localization of interacting sites between menin and GATA3 by GST pull down analysis. GST-menin full length (FL), or different truncated GST-menin proteins were incubated with nuclear lysates of MCF7 cells, and subjected to western blot analyses with anti-GATA3 antibody. PLA analysis with anti-menin and anti-GATA3 antibodies.

DISCUSSION

Partie I : Implication du gène MEN1 dans la tumorigénèse de la glande prostatique

Par le passé, différents travaux conduits dans plusieurs laboratoires y compris le nôtre, ont permis de considérer les fonctions oncosuppressives du gène *MEN1* dans les cancers hormono-dépendants, plus particulièrement dans les cancers du sein et de la prostate. Néanmoins, les données sur son rôle dans les cancers hormono-dépendants sont encore peu nombreuses, et souvent contradictoires dans la littérature. **Mes travaux de recherche doctorale ont donc eu pour but de conforter notre hypothèse de base, suggérant que le gène *MEN1* est un suppresseur de tumeurs dans les glandes prostatiques et mammaires.**

Pour répondre à cette question dans le contexte du cancer de la prostate, mes recherches ont abouti à l'élaboration et la caractérisation d'un **nouveau modèle murin d'invalidation du gène *Men1***, spécifiquement dans les cellules de la glande prostatique. La stratégie était d'étudier les effets de la perte du gène *Men1* dans le modèle d'initiation tumorale *Nkx3.1^{+/-}*. L'ensemble des résultats issus de l'analyse de ce modèle, montrant que l'invalidation du gène *Men1* participe à l'initiation tumorale dans les cellules de la glande prostatique, ont confirmé le rôle oncosuppressif du gène *Men1* dans la glande prostatique. Ainsi nous avons montré que :

- **L'invalidation du gène *Men1*** dans les cellules luminales de la glande prostatique conduit à une **accélération du phénotype *Nkx3.1^{+/-}***, suggérant un rôle clef du gène *Men1* dans le processus d'initiation tumorale.
- **La perte du gène *Men1*** conduit très précocement à une **diminution importante, voir une perte de l'expression du RA**, dans les lésions précancéreuses développées au sein de notre modèle. De plus, *menin* est impliqué dans la régulation de l'expression du RA, en occupant le promoteur de ce dernier.
- Une **diminution des marqueurs luminaux** dans les lésions précancéreuses des souris double mutantes a été observée, suggérant que les cellules ayant perdu l'expression de *menin* subissent une dédifférenciation partielle.
- Dans les lésions avancées des souris âgées (10 mois), **l'invalidation du gène *Men1* entraîne une forte augmentation du niveau d'expression du marqueur**

de surface CD44, dont le rôle et l'influence sur la tumorigénèse restent encore mal connus dans le cancer de la prostate, plus particulièrement chez la souris.

L'ensemble de ces résultats montre donc que le gène *Men1* joue le rôle de suppresseur de tumeur dans la glande prostatique, chez la souris. Néanmoins, son impact sur la progression tumorale reste modéré en lien avec le phénotype développé dans les souris double mutantes, dans lesquelles aucune lésion n'évolue vers un cancer de la prostate invasif. En revanche, il est indéniable que l'invalidation du gène *Men1* affecte la différenciation cellulaire au sein de ces lésions précancéreuses, même si les conséquences fonctionnelles de cette dédifférenciation cellulaire restent à élucider d'un point de vue mécanistique. Ces travaux réalisés sur ce nouveau modèle murin ouvrent donc une série de questions, qui sont :

Comment considérer le rôle oncosuppressif du gène *Men1* dans la tumorigénèse de la glande prostatique ?

- *Un suppresseur de tumeur ? Oui, mais aux effets néanmoins modérés !*

Les analyses histologiques réalisées sur les souris hétérozygotes *Men1*^{+/-} âgées (plus de 24 mois), avaient pu révéler une incidence faible de carcinomes mammaires et prostatiques. D'autre part, dans le modèle *Wap-Cre Men1*^{F/F}, l'invalidation conditionnelle du gène *Men1* dans les cellules de la glande mammaire conduit au développement de lésions précancéreuses mammaires entre 8 et 12 mois, qui évoluent vers des lésions cancéreuses dans de très rare cas, entre 15 et 18 mois. Dans notre modèle *Men1*^{F/F}-*Nkx3.1Cre*^{ERT2-/+}, nous avons également mise en évidence le développement précoce de lésions précancéreuses, suite à l'invalidation du gène *Men1* dans les cellules luminales de la glande prostatique. Néanmoins, aucune de ces lésions n'a évolué vers des lésions cancéreuses de type adénocarcinomes chez les souris âgées. Toutes ces données issues de l'analyse des différents modèles murins d'invalidation du gène *Men1*, renforcent indéniablement l'idée que ce dernier joue un **rôle oncosuppressif dans les glandes prostatiques** et mammaires. Cependant, **l'incidence faible des lésions cancéreuses nous amène à questionner le caractère oncosuppressif mineur du gène *Men1*, dans ces cancers hormono-dépendants.**

Les analyses immunohistochimiques réalisées dans les souris *Men1*^{F/F}-*Nkx3.1Cre*^{ERT2-/+} âgées de 3 mois (1,5 mois après l'induction de l'invalidation du gène *Men1*), révèlent que

l'expression de menin est absente dans environ 50% des cellules luminales de la glande prostatique. Nous avons pu mettre en évidence que, toutes les souris doubles mutantes traitées au tamoxifène développent des lésions PIN à trois mois, alors qu'une seule souris contrôle a développé de telles lésions. Il est donc intéressant de noter que cette invalidation du gène *Men1* dans seulement 50% des cellules luminales, suffit à accélérer l'initiation tumorale, par rapport aux souris contrôles. Il semble donc que **l'invalidation du gène *Men1* joue un rôle prédominant dans l'initiation tumorale** des cellules épithéliales de la glande prostatique.

Nous avons observé que, à l'âge de 6 mois et majoritairement à 10 mois, certaines souris double mutantes ont développé des lésions plus avancées, de type adénocarcinomes microinvasifs. Cependant, aucun adénocarcinome microinvasif n'a été constaté aux mêmes âges dans les souris contrôles. Les examens anatomopathologiques des souris âgées de 6 et 10 mois, laissent donc suggérer que la perte du gène *Men1* joue un rôle modéré dans la progression tumorale. Il n'est néanmoins pas si paradoxal que les souris doubles mutantes ne développent un cancer de la prostate invasif, malgré cette initiation tumorale précoce. Car en effet, le cancer de la prostate est un cancer de l'homme mûr, qui peut rester dans un état de quiescence pour une longue période avant d'être détectable d'un point de vue clinique. Il est admis qu'une succession d'altérations génétiques vont conférer à une ou plusieurs lésions précancéreuses, la capacité d'évoluer vers des lésions cancéreuses (Shen & Abate-Shen 2010). Cette notion selon laquelle le cancer de la prostate évolue via la combinaison de plusieurs événements génétiques récurrents, a été largement confirmée chez la souris. En effet l'invalidation seule des suppresseurs de tumeurs *Pten* ou *Nkx3.1*, ne suffit pas induire un cancer de la prostate chez la souris (Minjung J. Kim et al. 2002)(Backman et al. 2004). En revanche, l'invalidation combinée de ces deux mêmes gènes est suffisante pour induire un cancer de la prostate. Effectivement, il a été montré que dans le modèle *Nkx3.1^{+/-} Pten^{+/-}*, l'apparition de lésions cancéreuses de type adénocarcinomes invasifs ne se produit qu'à partir de l'âge de 1 an (Abate-shen et al. 2003). Similairement, via une approche identique à la notre, l'invalidation conditionnelle de *Pten* à l'âge adulte dans le modèle *Pten^{F/F}-Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}*, montre que les souris double mutantes ne développent pas de lésions cancéreuses avant l'âge de 12 mois (Floc'h et al. 2012). Il était peu probable que l'invalidation du gène *Men1* combinée à la perte de fonction de *Nkx3.1* dans notre modèle, entraîne une accélération du phénotype précancéreux *Nkx3.1^{+/-}* au même titre que l'invalidation de *Pten*. Il serait donc intéressant d'analyser une cohorte de souris double mutantes plus âgées, au-delà de 15 à 18 mois, afin de savoir si l'invalidation du gène *Men1*

peut conduire au développement de lésions cancéreuses plus tardivement. Il n'est pas exclu que le rôle oncosuppressif du gène *Men1* dans la progression tumorale de notre modèle *Men1^{F/F}-Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}*, soit dépendante du vieillissement. Cette hypothèse rejoint l'observation de l'incidence tardive des adénocarcinomes prostatiques qui ont été observés dans le modèle des souris hétérozygotes *Men1^{+/-}* (Seigne et al. 2010).

Malgré tout, il apparaît que **la perte d'expression du gène *Men1* ne serait pas un événement génétique majeur permettant la transition des lésions précancéreuses vers un phénotype cancéreux.** Il est également envisageable dans le contexte des souris *Nkx3.1^{+/-}*, que la perte d'expression du gène *Men1* au niveau des cellules luminales de la glande prostatique, ne soit pas suffisante pour générer un cancer invasif de la prostate à court terme. Dans l'optique de résoudre cette problématique, il serait intéressant de combiner l'inactivation du gène *Men1* à d'autres événements génétiques additionnels, tel que la perte de fonction du gène *Pten*, fréquemment observée chez l'homme. Car même si l'inactivation seule de *Pten* ne conduit pas systématiquement au développement de lésions cancéreuses, la progression tumorale du modèle *Pten^{+/-}* est plus rapide que celle des modèles *Nkx3.1^{+/-}* ou *Nkx3.1^{-/-}*. L'inactivation combinée des gènes *Pten* et *Men1*, nous permettrait de savoir si encore une fois la perte de menin conduit à une accélération du phénotype précancéreux, dans le contexte des souris *Pten^{+/-}*, et surtout si elle pourrait conduire au développement plus précoce de lésions cancéreuses.

- Comment expliquer cette initiation tumorale précoce dans les souris *Men1^{F/F}
Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}* ?

L'état d'avancement des connaissances du modèle *Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}*, ne permet pas de définir précisément quels mécanismes pourraient expliquer cette initiation tumorale précoce dans les souris doubles mutantes, par rapport aux souris contrôles. Néanmoins, les examens anatomopathologiques réalisés sur les souris doubles mutantes âgées de 3 mois, laissent penser que la perte du gène *Men1* pourrait affecter, un ou des des événements impliqués dans la transformation des cellules de la glande prostatique. Chez l'homme comme chez la souris, la perte de fonction du gène *NKX3.1* compte parmi les événements génétiques initiateurs de la tumorigénèse, qui vont conduire au développement des lésions précancéreuses dans la glande prostatique. Dans notre modèle nous avons mis en évidence que la perte combinée des gènes *Men1* et *Nkx3.1* coopère pour accélérer la

tumorigénèse prostatique. L'inactivation du gène *Men1* pourrait initier et accélérer la tumorigénèse via un ou des mécanismes indépendants de la perte de fonction de Nkx3.1. A l'inverse, il n'est pas exclu de se questionner sur une interaction fonctionnelle entre menin et Nkx3.1, qui pourrait impacter le processus de tumorigénèse de la glande prostatique.

Car en effet, la protéine Nkx3.1 tout comme le RA, sont décrits comme indispensable au maintien de l'homéostasie tissulaire de la glande prostatique, et plus spécifiquement dans le compartiment luminale (Abate-Shen et al., 2008). Des études ont montré que le RA et Nkx3.1 agissent en synergie pour réguler la transcription de plusieurs gènes cibles dans le contexte du cancer de la prostate (Tan et al. 2012). De plus, il a été mis en évidence dans la lignée cellulaire du cancer de la prostate LNCAP, que le RA était capable de lier un élément de réponse ARE dans une région activatrice en 3'UTR du gène *Nkx3.1*, et par ce biais régule positivement l'expression de NKX3.1 (Thomas et al., 2010). Ces études montrent une interaction physique et fonctionnelle forte entre Nkx3.1 et le RA. Or, nous avons vu que l'inactivation du gène *Men1*, conduit à une perte d'expression de plusieurs marqueurs spécifiques du phénotype luminale, dont le RA, au sein des lésions PIN des souris double mutantes. Dans le modèle murin *Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}*, le knock-in d'un des allèles du gène *Nkx3.1* permet l'expression de la Cre Recombinase sous le contrôle du promoteur de *Nkx3.1*, tandis que l'autre allèle sauvage reste fonctionnel. Il est donc envisageable que la perte d'expression et de fonction du RA dans les cellules déficientes pour le gène *Men1*, conduisent également à une altération des fonctions et/ou de l'expression de la protéine Nkx3.1, codée par l'allèle sauvage. Une diminution d'expression plus précoce de Nkx3.1 dans les souris doubles mutantes traitées au tamoxifène, par rapport aux souris contrôles, pourraient être une explication à cette initiation tumorale prématurée. Pour répondre à cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des expériences d'immunomarquage pour détecter l'expression de Nkx3.1, dans le but de comparer son niveau d'expression entre les souris contrôles et les souris double mutantes.

Comment interpréter la diminution d'expression du RA dans les lésions PIN développées au sein de notre modèle $Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}$?

- Une balance entre prolifération et différenciation ?

Une des caractéristiques de la glande prostatique est sa dépendance aux androgènes, qui via l'action du RA vont être nécessaires au maintien de l'homéostasie tissulaire. Cependant, il est souvent considéré que cette signalisation androgénique lorsqu'elle est activée dans le cancer de la prostate, va conduire à une prolifération aberrante des cellules (Shen & Abate-Shen 2010). Nous avons montré une forte diminution de l'expression du RA dans plus de 80% des cellules déficientes pour le gène *Men1*, seulement 1,5 mois après l'invalidation de ce dernier. De plus, nous avons pu voir une diminution globale de l'expression de deux gènes cibles du RA, PSA et FKBP5, dans les lésions PIN des souris âgées de 3 et 6 mois. Ces données suggèrent qu'il existe une interaction fonctionnelle attendue entre menin et le RA chez la souris, et que l'invalidation du gène *Men1* accélère la tumorigénèse dans le modèle $Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}$, indépendamment de la signalisation androgénique.

Dans la littérature, les preuves montrant que le RA est nécessaire à l'initiation tumorale sont très maigres. La surexpression constitutive du RA dans un modèle murin transgénique, conduit au développement de PIN dans seulement 45% des souris (Stanbrough et al., 2001). A l'inverse, l'invalidation conditionnelle du RA dans les cellules épithéliales de la glande prostatique chez la souris, entraîne une hyperprolifération très restreinte au sein de cluster de cellules épithéliales, qui n'aboutit pas au développement de lésions PIN (Wu et al. 2007). De plus, une étude récente utilisant le modèle $Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}; AR^{lox/Y}$, permettant d'invalider spécifiquement le RA dans les cellules luminales à l'âge adulte, montre que ces cellules luminales AR- prolifèrent de manière transitoire en ne deviennent jamais tumorigénique (Xie et al. 2017). Les études de ces modèles murins de gain ou de perte de fonction du RA, ne permettent pas d'affirmer clairement le rôle joué par celui-ci dans l'initiation tumorale. Il apparaît que la diminution d'expression du RA et de ses gènes cibles dans notre modèle $Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}$, pourrait jouer un rôle secondaire ou modéré dans l'augmentation de la prolifération cellulaire, et le développement des lésions PIN. En revanche, la diminution d'expression du RA en réponse à l'invalidation du gène *Men1* semble

jouer un rôle dans le maintien du statut de différenciation dans notre modèle $Men1^{F/F}$ $Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}$.

Le RA est considéré comme un « gatekeeper » du phénotype luminal dans la glande prostatique. Niu et al ont montré que dans le modèle pes-ARKO-TRAMP, l'invalidation du RA dans les cellules épithéliales de la glande prostatique conduit à une dédifférenciation partielle des cellules luminales, se caractérisant par une augmentation du nombre de cellules épithéliales intermédiaires CK8+/CK5+ (Y Niu et al. 2008). Il est envisageable de considérer que la perte d'expression des marqueurs luminaux, comme la CK18 dans les lésions PIN de notre modèle murin, soit une conséquence fonctionnelle de la perte de l'expression du RA. Car à l'inverse, les lésions PIN des souris contrôles positives pour *menin* présentent une expression du RA et de la CK18. Cependant nous n'avons pas observé d'augmentation des marqueurs basaux, tel que la CK5 ou p63, dans les cellules luminales déficientes pour le gène *Men1*. Nos données sont consistantes avec celles de Xie et al, qui ont montré que l'invalidation conditionnelle du RA dans les cellules luminales de la glande prostatique à l'âge adulte, ne conduit pas à une augmentation d'expression de la CK5 dans les cellules déficientes pour le RA (Xie et al. 2017). Pour compléter ces résultats, il serait nécessaire d'analyser les niveaux d'expression d'autres marqueurs luminaux (CK8) et basaux (CK14, CK7) afin de confirmer les données obtenues. Ces résultats suggèrent que la diminution d'expression du RA consécutive à l'invalidation du gène *Men1*, pourrait induire une dédifférenciation partielle des cellules luminales. La majorité des cancers de la prostate sont des adénocarcinomes, caractérisés par un phénotype luminal, et une absence de cellules épithéliales basales (Humphrey 2007). Il est donc difficile d'établir les conséquences fonctionnelles de cette dédifférenciation partielle sur la progression tumorale dans les souris doubles mutantes.

- La perte d'expression du gène MEN1 pourrait-elle jouer un rôle dans l'acquisition de la résistance à l'hormonothérapie ?

Dans le but de mieux comprendre l'origine des mécanismes de résistance à l'hormonothérapie, une étude menée dans les souris doubles mutantes $Nkx3.1^{+/-}$ $Pten^{+/-}$, avait mis en évidence l'acquisition d'un phénotype cancéreux indépendant de la signalisation androgénique. En effet dans ces souris doubles mutantes ayant subi une castration chimique, les cellules épithéliales de la glande prostatique sont capables de proliférer et de survivre en

absence d'androgènes, et de conduire au développement de lésions PIN qui vont évoluer vers des lésions cancéreuses (Gao et al., 2006). Cette étude montre que le modèle $Nkx3.1^{+/-} Pten^{+/-}$ est capable d'initier la tumorigénèse de la glande prostatique indépendamment de la signalisation androgénique. On peut donc établir un parallèle avec les données obtenues dans notre étude, montrant que l'initiation tumorale peut être indépendante de la signalisation androgénique dans le modèle $Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}$. Cependant il faut prendre en considération que dans les souris $Nkx3.1^{+/-} Pten^{+/-}$ castrées, le RA est toujours exprimé à la différence de notre modèle, suggérant que celui-ci peut rester fonctionnelle indépendamment des androgènes. C'est pourquoi dans le modèle $Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}$, nous apportons une preuve supplémentaire montrant que le potentiel effet « cell-autonome » du RA décrit par Gao et al, ne semble pas indispensable à l'initiation et la progression tumorale.

En accord avec la diminution d'expression du RA, les analyses immunohistochimiques réalisées dans les lésions PIN des souris double mutantes à 3 et 6 mois, ont également mis en évidence une diminution d'expression de la PSA dans la majorité des cellules. Or depuis peu, plusieurs études issues du même laboratoire insistent sur l'expression hétérogène du RA et de la PSA au sein des populations cellulaires du cancer de la prostate. En effet, ils ont isolé à partir de tumeurs primaires de la prostate non traitées et de CRPC, différents sous-types cellulaires décrits comme $AR^{+}PSA^{+}$, $AR^{+}PSA^{-}$, $AR^{-}PSA^{+}$, ou encore $AR^{-}PSA^{-}$, qui ne répondent pas de la même manière à l'hormonothérapie (Liu et al., 2015). Il rapporte que les sous-types cellulaires exprimant faiblement la PSA, nommés PSA^{low} , sont résistants à la castration et capable d'initier la tumorigénèse en absence d'androgènes. En lien avec la diminution d'expression de la PSA et du RA observée dans les lésions PIN des souris $Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}$, on peut tout de même se questionner sur l'acquisition d'un phénotype résistant à la castration dans notre modèle. Des expériences de castration chimique suite à l'induction de la Cre Recombinase dans notre modèle $Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}$, pourrait nous permettre de prouver que cette population cellulaire que nous décrivons comme $AR^{low}PSA^{low}$ est capable de proliférer en absence d'androgènes.

- Un rôle peu probable de la perte de menin dans l'acquisition d'un phénotype neuroendocrine

Des études ont montré le rôle crucial de la perte d'expression du RA dans la différenciation cellulaire, et plus particulièrement dans l'acquisition du phénotype

neuroendocrine (Parimi et al., 2014). Hormis la surexpression de l'oncogène SV40 dans le modèle TRAMP, peu de modèles murins conduisent au développement de lésions cancéreuses neuroendocrines (Masumori et al. 2001). Par rapport aux caractéristiques histologiques des lésions PIN développées dans le modèle $Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}$, il semblait peu probable que cette diminution d'expression du RA puisse induire une dédifférenciation vers un phénotype neuroendocrine. En effet, les carcinomes neuroendocrines constituent des lésions agressives, qui diffèrent largement des cellules tumorales des lésions précancéreuses, d'un point de vue histologique. De plus, les analyses par immunofluorescence n'ont pas révélé d'augmentation du marqueur neuroendocrine ChrA dans les lésions PIN du modèle $Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}$, à l'âge de 10 mois (données non montrées). Cependant, les résultats obtenus dans notre modèle murin spécifique des cellules luminales, ne suffisent pas à exclure une éventuelle implication du gène *Men1* dans la différenciation endocrine. Il pourrait être intéressant d'analyser l'expression de menin sur des coupes de cancer de la prostate neuroendocrine humaine, afin d'identifier si dans ces sous-types particuliers une diminution de son expression pourrait être observée.

- Comment intégrer les données contradictoires de la littérature sur le rôle de l'interaction physique et fonctionnelle entre menin et le RA ?

Il a été mis en évidence que menin interagit avec le RA au sein du complexe COMPASS-like pour réguler positivement l'expression des gènes cibles du RA, et ainsi augmenter la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate (Malik et al. 2015). Cependant, dans notre modèle $Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}$, l'interaction fonctionnelle menin et le RA n'est pas nécessaire pour initier la tumorigénèse dans notre modèle murin.

Des mutations du RA sont reportées dans plus de 60% des cancers métastatiques de la prostate et plus particulièrement dans les CRPC, alors qu'aucune mutation ne semble se produire dans les tumeurs primaires (Robinson et al. 2015). C'est la raison pour laquelle, ce « switch » dans l'activité et l'expression du RA, fait de lui l'oncogène prédominant dans les cellules cancéreuses métastatiques de la prostate. C'est dans les cellules issues de cancers de la prostate métastatiques que l'interaction entre menin et le RA a été rapportée par Malik et al. Dans cette même étude, ils ont pu mettre en avant une augmentation d'expression de menin très importante dans une série de cancer de la prostate métastatique, comparativement aux lésions bénignes. En combinant les analyses menées dans les lignées cancéreuses en culture et

les données obtenues chez l'homme, menin semble jouer un rôle oncogénique en s'associant au RA dans le contexte des cancers métastatiques de la prostate. De notre côté, nous rapportons que la perte de l'expression et de l'activité du RA dans les cellules normales de la glande prostatique déficientes pour le gène *Men1*, semble faire partie des événements liés à l'initiation tumorale. Nos données suggèrent donc que le rôle du complexe menin-RA n'est pas oncogénique dans les stades précoces de la cancérogénèse prostatique. L'ensemble de ces résultats semblent indiquer que menin pourrait jouer un rôle opposé entre les stades précoces et tardifs du cancer de la prostate.

En opposition avec les fonctions oncogéniques du COMPASS-like complex dans les cancers métastatiques, nous avons montré que la perte de fonction du complexe, pourrait réguler négativement l'expression du RA dans la lignée cellulaire du cancer de la prostate LNCAP. Plusieurs membres du complexe COMPASS, tel que *ASH2L*, *WDR5*, *RBBP5* ou encore *KMT2B* ont été identifiés pour être mutés dans les CRPC (Grasso et al. 2012). Il serait intéressant de savoir si certains cancers de la prostate présentant des mutations dans les gènes codants pour les membres du complexe COMPASS ont également une expression diminuée du RA. Cependant nos données concernant l'expression de menin dans les cancers de la prostate humains sont encore trop préliminaires. Il est nécessaire de procéder à des analyses plus exhaustives chez l'homme, notamment par des TMA (tissu microarray), afin de mieux définir le niveau d'expression de menin au cours des différents stades de la maladie. Ce type d'analyse permettrait d'autant plus d'établir des corrélations entre le niveau d'expression de menin et d'autres marqueurs, tel que le RA ou la PSA, systématiquement utilisé en clinique pour ce dernier. Malik et al propose que les inhibiteurs de menin bloquant son interaction avec le complexe COMPASS, pourrait être une alternative thérapeutique intéressante dans les CRPC. En lien avec nos résultats, il convient de se questionner sur les effets associés à l'utilisation de ces inhibiteurs sur l'expression du RA, dans les cancers humains.

Comment interpréter l'augmentation d'expression du marqueur de surface CD44, et quel rôle joue-t-il dans le processus de tumorigénèse de notre modèle ?

- Une conséquence fonctionnelle de la perte du RA ?

Dans les lésions PIN des souris doubles mutantes âgées de 10 mois, nous avons pu mettre en évidence une forte augmentation du niveau d'expression du marqueur de surface

CD44, dans les cellules déficientes pour le gène *Men1*. Cette augmentation d'expression de CD44 n'est pas réellement surprenante. En effet des études ont montré que la perte d'expression du RA dans les lignées cellulaires du cancer de la prostate, est associée à une augmentation de ce marqueur de surface (Schroeder et al. 2014). Cependant dans le cas de notre modèle murin *Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}*, l'accumulation tardive de CD44 dans les lésions PIN s'oppose à la diminution précoce de l'expression du RA à seulement 3 mois. Une question qui reste en suspend est : pourquoi cette augmentation d'expression de CD44 se produit si tardivement ? Il est compliqué de répondre à cette question et d'apporter la preuve évidente d'un lien entre la perte du RA et l'augmentation de CD44, même si les données de la littérature le suggèrent. De plus, dans la glande prostatique CD44 a été initialement décrit comme un marqueur des cellules basales (Liu et al., 1997). Cette augmentation d'expression corrèle avec l'idée d'une différenciation partielle des cellules que nous avons observé dans les lésions PIN de notre modèle *Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}*.

- Est-ce que l'augmentation d'expression de CD44 pourrait conduire à l'acquisition d'un phénotype stem-like dans les cellules déficientes pour le gène Men1 ?

Comme je l'ai mentionné dans l'introduction, l'absence d'expression du RA est un caractère commun aux cellules souches épithéliales et cancéreuses de la prostate (Deng & Tang 2015). Plusieurs études ont rapporté que dans les tumeurs primaires de la prostate humaines, il existe des populations cellulaires négatives pour le RA, qui expriment une combinaison de marqueurs des cellules souches, et notamment CD44 (Collins et al., 2005). Ces données suggèrent que la perte du RA suite à l'inactivation du gène *Men1* dans notre modèle, pourrait conduire à une dédifférenciation de certaines cellules tumorales vers un phénotype souche. Il convient néanmoins de rester extrêmement prudent à ce sujet sur plusieurs aspects. Premièrement, CD44 est considéré comme un marqueur des PCSCs chez l'homme, alors que chez la souris son expression a été uniquement montré dans une population cellulaire souche de l'épithélium de la glande prostatique (Wang et al. 2009). Deuxièmement, CD44 n'est pas un marqueur exclusif des cellules souches. En effet, les analyses du profil moléculaire des cellules souches cancéreuses dans différents cancers, ont montré que ce sont certains isoformes de CD44, comme CD44v6, qui semblent être très spécifiques des cellules souches (Yan et al., 2015). De plus, cette expression généralisée de CD44 dans quasi toutes les cellules tumorales de notre modèle à 10 mois, corrèle peu avec la présence généralement minoritaire des cellules souches dans les cancers de la prostate

humains. Pour préciser la nature de ces cellules CD44⁺, il conviendrait donc de clarifier la situation dans notre modèle, en réalisant des immunomarquages de ces isoformes spécifiques des cellules souches de CD44. D'autres analyses sont nécessaires pour évaluer la présence de marqueurs des cellules souches. Un triage cellulaire par FACS à partir des lésions PIN de notre modèle *Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}* permettrait d'analyser simultanément plusieurs marqueurs des cellules souches tels que CD133, les intégrines $\alpha2\beta1$, ALDH1, Sca1, CD49f, pour définir la présence éventuelle d'une ou plusieurs populations cellulaires souches. De nombreuses expériences seraient donc encore nécessaires pour confirmer l'hypothèse de l'acquisition d'un phénotype souche dans les souris doubles mutantes *Men1^{F/F} Nkx3.1Cre^{ERT2-/+}*.

- Quel rôle pour CD44 dans la tumorigénèse ?

Le rôle de la molécule d'adhésion CD44 dans le développement du cancer de la prostate est très controversé, décrite comme pro ou anti-tumorale au sein de différentes études. Certaines études ont montré que l'expression de CD44 est perdue dans plus de 90% des tumeurs primaires de la prostate (Figge et al., 1996), tandis que d'autres ont détecté à l'inverse une augmentation d'expression dans environ 60% des tumeurs localisées (Nagabhushan et al. 1996). Il est donc difficile d'établir une corrélation claire entre l'augmentation d'expression de CD44 et la progression tumorale, ou le caractère microinvasif des lésions observées à 10 mois dans notre modèle murin. Néanmoins, Patrawala et al ont montré qu'une population cellulaire CD44⁺ isolée à partir de tumeurs de la prostate chez l'homme, expriment fortement la β -catenin, un effecteur de la voie Wnt, ainsi que la protéine SMO, un récepteur de la voie de signalisation Shh (Patrawala et al. 2006). On sait que dans le contexte du pancréas endocrine menin est impliqué dans la régulation de ces voies de signalisation Wnt et Shh (Cao et al. 2009)(Gurung et al., 2013), qui ont été rapportées comme suractivées dans le cancer de la prostate (Karhadkar et al. 2004). Il a été montré qu'une cible transcriptionnelle de la voie shh, la protéine Gli1 joue un rôle oncogénique dans la lignée cellulaire du cancer de la prostate 22RV1 (Karhadkar et al. 2004). Gurung et al ont mis en évidence que menin en interagissant avec PRMT5 sur le promoteur du gène codant pour Gli1, était capable de réprimer l'expression de ce dernier (Gurung et al., 2013). De la même manière, menin semble réprimer la voie Wnt dans les cellules β du pancréas endocrine, en inhibant notamment l'activité transcriptionnelle et la translocation nucléaire de la β -catenin (Cao et al. 2009). Il pourrait être judicieux de regarder dans les lésions PIN des souris âgées

de 10 mois, le niveau d'expression de plusieurs des effecteurs (Gli1, Gas1, SMO) de cette voie Shh, mais aussi la localisation de la β -catenin afin d'étudier l'état d'activation de ces voies de signalisation Shh et Wnt.

***MEN1* est-il aussi un gène de prédisposition au cancer de la prostate chez l'homme ?**

- Association du syndrome NEM1 avec le cancer de la prostate ?

A la différence de ce qui a été récemment observé dans le cas du cancer du sein (Dreijerink et al., 2014), aucune étude n'a mis en évidence une association entre le syndrome des NEM1 et une incidence plus élevée de survenue du cancer de la prostate. Il est envisageable qu'il n'existe pas de lien évident entre ce syndrome et l'apparition des cancers de la prostate. Néanmoins, le cancer de la prostate se manifeste tardivement dans la population générale, car celui-ci peut être indolore et latent un grand nombre d'année. La survenue tardive des cancers de la prostate au cours du vieillissement pourrait expliquer le fait que ceux-ci ne soit pas mis en évidence dans le cas des patients NEM1. De plus, il est envisageable que chez les patients NEM1, les médecins et pathologistes ne prêtent pas une grande attention à la survenue d'un cancer de la prostate fréquent dans la population générale, ou qu'il considère celui-ci comme une association fortuite. Il serait important de sensibiliser les conseillers en génétique, à la mise en place d'un suivi plus précoce et attentif chez les patients NEM1, pour identifier d'éventuelles lésions bénignes de la prostate. Cependant à l'heure actuelle, il est clair que dans le contexte du syndrome NEM1, le gène *MEN1* n'est pas un *bona fide* supresseur de tumeur pour la glande prostatique.

- Comment considérer le rôle oncosuppressif du gène MEN1 dans les cancers de la prostate sporadiques chez l'homme, lié à la fréquence faible des mutations?

Les mutations sporadiques du gène *MEN1* dans les cancers de la prostate, sont très peu décrites dans la littérature. Grasso et al, ont pu mettre en évidence une mutation du gène *MEN1* dans un cancer de la prostate parmi 50 CRPC analysés (Grasso et al. 2012). Il convient de signaler que cette fréquence faible de mutations du gène *MEN1* est en contradiction avec les différentes analyses immunohistochimique préliminaires, qui ont été réalisées pour essayer d'évaluer le niveau d'expression de menin dans les cancers de la prostate. Nous disposons de quelques données préliminaires qui ne figurent pas encore dans notre étude, montrant que le

niveau d'expression de menin est réduit ou absent dans plusieurs atteintes bénignes et tumeurs primaires de la prostate, par rapport au niveau d'expression dans les cellules épithéliales des glandes prostatiques péri-tumorales (données non publiées du laboratoire). Malik et al mettent également en avant dans leur étude une diminution d'expression de menin dans les lésions bénignes de la prostate, et à l'inverse une augmentation du niveau d'expression de menin dans les cancers métastatiques (Malik et al. 2015). Néanmoins dans cette étude, des données sur l'expression de menin dans les glandes prostatiques saines et péri-tumorales manquent cruellement à l'interprétation des résultats. Il y a une vraie nécessité de confronter les analyses sur l'expression de menin entre des tissus sains ou péri-tumoraux par rapport aux lésions précancéreuses et cancéreuses de la prostate. De plus d'un point de vue expérimentale, il est nécessaire de se mettre en adéquation sur le choix des anticorps utilisés en clinique pour évaluer l'expression de menin. Plus d'analyses à grande échelle, tel que des TMA, sont nécessaires afin de mieux caractériser le niveau d'expression de menin dans les cancers de la prostate chez l'homme, notamment en fonction du grade des tumeurs et de leur caractère résistant à l'hormonothérapie.

Partie II : Implication du gène *MEN1* dans la tumorigénèse de la glande mammaire, et son rôle dans la régulation de l'expression du récepteur aux œstrogènes α

Des données cliniques montrant qu'une expression faible de menin corrèle avec la survenue plus importante des sous types moléculaires ER⁻ et luminal B du cancer du sein, nous ont incité à enquêter sur l'implication de menin dans la régulation de l'expression du RE α . Mes travaux de thèse ont pu montrer que la protéine menin est impliquée dans la régulation de l'expression du RE α au niveau transcriptionnel. Nous avons montré que le knockdown de menin entraînait une diminution d'expression du RE α dans les lignées cellulaires du cancer du sein MCF7 et T47D (ER⁺). Nous avons également mis en évidence que menin était capable d'occuper le promoteur du gène *ESR1* codant pour le RE α , suggérant qu'il pourrait jouer un rôle de régulateur positif de l'expression de ce dernier. Dreijerink et al, ont montré par le passé, que menin était capable d'interagir avec le RE α pour réguler positivement l'expression de ses gènes cibles dans la lignée cellulaire MCF7 (Dreijerink et al., 2006). Menin semble donc jouer un rôle double, dans lequel il participe d'une part à la régulation de l'activité transactivatrice du RE α , et d'autre part à la régulation de son expression. Etant donné l'importance thérapeutique du ciblage du RE α dans les cancers du sein, ces données amènent plusieurs questions :

Par quels mécanismes menin pourrait réguler positivement l'expression du RE α ?

Dans le cadre de mes travaux de thèse, j'ai pu montrer que menin est impliqué dans la régulation transcriptionnelle du RE α . J'ai notamment mis en évidence que menin occupe la région promotrice proximale du gène *ESR1*, au niveau du site d'initiation de la transcription (TSS), mais aussi dans une large zone s'étendant sur 1kb qui recouvre une partie de l'exon 1 et de l'intron. De plus, les données issues des essais luciférase confortent celles des ChIP, montrant pour la première fois que menin participe à la régulation de l'activité du promoteur proximale du gène *ESR1*. Ces résultats permettent d'enrichir d'avantage nos connaissances sur la régulation de l'expression du gène *ESR1* par menin, très récemment dévoilées par une autre étude (Dreijerink et al., 2017). En effet, Dreijerink et al, ont rapporté qu'un complexe protéique impliquant menin, GATA3 et FOXA1 semble réguler l'expression du gène *ESR1*, via des séquences activatrices (enhancers) situées dans le promoteur distal de ce dernier. L'occupation de ces mêmes séquences activatrices par GATA3 dans la partie distale du promoteur de *ESR1*, a déjà pu être rapporté par le passé (Eeckhoutte et al. 2007). Il est connu

depuis longtemps que menin est capable d'interagir avec GATA3 dans les cellules T helper 2, jouant un rôle important dans la différenciation cellulaire des lignages lymphocytaires (Nakata et al. 2013). Nous avons pu confirmer l'existence d'une interaction physique entre menin et GATA3 dans les cellules MCF7. Néanmoins, à la différence de ce qui a été rapporté par Dreijerink et al au niveau du promoteur distal de *ESR1*, nos expériences de CHIP ont révélé que menin et GATA3 ne semble pas co-occuper les régions testées sur le promoteur proximal de *ESR1* (données non montrées). Le ou les mécanismes par lesquels menin régulerait positivement l'expression du RE α au niveau du promoteur proximal de *ESR1*, semble donc être indépendant de son interaction avec le facteur de transcription GATA3.

Des analyses menées *in-silico* nous ont montré que les marques de méthylation H3K4me3 étaient particulièrement abondantes dans la partie proximale du promoteur du gène *ESR1*, dans différentes lignées cellulaires du cancer du sein. Etant donné l'importance fonctionnelle du complexe menin-MLL dans la régulation de l'expression génique, nous avons enquêté sur une éventuelle implication de ce complexe dans la régulation de l'expression du RE α . Nous avons pu mettre en évidence que le traitement des cellules MCF7 et T47D avec un inhibiteur de l'interaction menin-MLL (MI503), conduit à une diminution d'expression de *ESR1*. De plus, des expériences de CHIP ont montré que l'inhibiteur MI503 diminue drastiquement l'occupation de menin sur le promoteur de *ESR1*, dans la lignée cellulaire MCF7. Cependant, malgré l'abondance des marques de méthylation H3K4 au niveau de la région d'occupation de menin, l'inhibiteur MI503 ne diminue pas l'enrichissement des marques H3K4me3. Mes résultats semblent donc exclure l'implication du complexe COMPASS dans la régulation transcriptionnelle du RE α . D'autre part, ces données ouvrent une question plus large sur la spécificité de l'inhibiteur MI503. Est-ce que l'inhibiteur de l'interaction menin-MLL pourrait également altérer son interaction avec d'autres facteurs, dépendante du complexe COMPASS-like ? De plus, l'établissement de la structure cristallographique de menin a montré que MLL et JunD interagisse de manière compétitive sur le même site de la protéine menin (Huang et al. 2012). En accord avec la diminution d'expression de *ESR1* et l'absence de modifications des marques H3K4me3 suite au traitement avec le MI503, il est envisageable de se questionner sur l'implication du complexe JunD-menin dans la régulation de l'expression du RE α . Pour valider ou invalider cette hypothèse, il serait intéressant de regarder les sites d'occupation de JunD sur le promoteur proximal de *ESR1*.

Toutes ces données montrent que menin pourrait réguler l'expression du gène *ESR1*, au niveau du promoteur proximal d'une part, mais également au niveau des séquences activatrices du promoteur distal d'autre part. Nos résultats restent néanmoins rudimentaires, car ils ne montrent pas clairement par quels mécanismes menin régulerait l'expression du RE α dans la partie proximale du promoteur de *ESR1*. D'autres complexes de modification des marques d'histones et de méthylation de l'ADN, se lient au niveau du promoteur proximal du gène *ESR1*. Parmi eux plusieurs sont connus pour être des partenaires de menin. On retrouve notamment au niveau du promoteur proximal, plusieurs membres de la famille des HDACs, mSin3A mais aussi des HAT, tel que p300 (Hervouet et al., 2013). Il serait donc intéressant d'étudier s'il existe une éventuelle cohabitation entre menin et ces différents facteurs épigénétiques, afin de savoir si menin pourrait modifier les marques d'acétylation au niveau de cette région proximale du gène *ESR1*. De la même manière, on peut émettre une hypothèse sur l'implication de menin dans la régulation des marques de méthylation de l'ADN. Car en effet, plusieurs DNMT tel que la DNMT1, connue pour interagir fonctionnellement avec menin dans les cellules endocrines du pancréas, sont présentes au niveau du promoteur proximal du RE α (Hervouet et al. 2013)(Cheng et al. 2016). En dehors de l'hypothèse d'une régulation épigénétique, et étant donné que menin occupe le TSS du gène *ESR1*, il est possible que menin puisse être impliqué dans la machinerie transcriptionnelle basale, impliquant la RNA polymérase II. On peut donc anticiper que menin, en tant que cofacteur, pourrait hypothétiquement être impliqué dans différents complexes macromoléculaires régulant l'expression du RE α . Pour répondre à cette question, des expériences de ChIP visant à étudier plus en profondeur les différents sites d'occupation de menin sur le promoteur du gène *ESR1* sont nécessaires.

Est-ce encore utile de débattre sur le rôle oncogénique ou oncosuppressif du gène *MEN1* dans le cancer du sein ? Ne serait-ce pas dépendant du contexte cellulaire ?

Les données sur le rôle du gène *Men1* dans la glande mammaire sont très controversées. Dans les études utilisant comme modèle les lignées cellulaires isolées à partir de cancer du sein métastatiques ER⁺, menin semble jouer un rôle oncogénique en interagissant notamment avec le RE α , mais aussi avec d'autres facteurs de transcription tel que GATA3 et FOXA1 (Dreijerink et al., 2006)(Dreijerink et al., 2017). Dans ce contexte, menin régulerait positivement l'expression de plusieurs oncogènes, favorisant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. En revanche, notre groupe a montré que

l'invalidation du gène *Men1* dans les cellules épithéliales normales de la glande mammaire chez la souris (modèle *WapCre Men1^{F/F}*), conduit au développement de lésions précancéreuses, suggérant un rôle oncosuppressif du gène *Men1* (Seigne et al. 2013). En accord avec ces données obtenues chez la souris, Dreijerink et al rapportent également un rôle oncosuppressif du gène *MEN1* chez les patientes atteintes du syndrome NEM1 (Dreijerink et al., 2014), mais aussi dans une lignée primaire de cellules luminales progénitrices (LP) de la glande mammaire (Dreijerink et al., 2017). Il semble donc qu'il existe une différence fondamentale sur le rôle de menin entre le contexte métastatique et les cellules épithéliales normales de la glande mammaire.

Nos données amènent à nous questionner sur les conséquences fonctionnelles, associées à une diminution d'expression de menin dans les cancers du sein ER⁺. Une expression élevée du RE α , corrèle généralement avec un bon pronostic et une meilleure réponse à l'hormonothérapie. Néanmoins, la perte d'expression du RE α peut survenir au cours de la progression du cancer du sein et corrèle à l'inverse avec un mauvais pronostic. Est-ce qu'une expression faible de menin pourrait entraîner une diminution de l'expression du RE α dans les cancers du sein ? Nous avons pu apporter un élément de réponse en montrant, qu'une expression faible de menin est associée au sous type moléculaire luminal B du cancer du sein, connu pour exprimer faiblement le RE α . De plus, notre étude montre qu'une expression faible de menin est associée à la fois à un grade plus avancé, mais aussi à une moins bonne survie chez les patientes atteintes d'un cancer du sein ER⁺. En fin, nos travaux ont permis de révéler qu'une down-régulation du gène *MEN1* conduit à une expression réduite de Gata3, ce qui corrèle souvent avec le sous type luminal B du cancer du sein.

L'ensemble de ces données montrant une implication éventuelle de menin dans la régulation de l'expression du RE α , nécessite tout de même d'être approfondie dans le contexte clinique. La diminution d'expression du RE α est un des nombreux mécanismes pouvant conduire à une résistance à l'hormonothérapie. Nos données amènent donc une question plus large sur l'implication du niveau d'expression de menin dans la résistance aux traitements anti-estrogéniques. Cependant dans notre étude, aucune corrélation n'a été établie entre le niveau d'expression de menin et la réponse au traitement d'hormonothérapie utilisant le tamoxifène. En revanche de manière étonnante, Imachi et al ont rapporté à l'inverse qu'une expression élevée de menin dans les cancer du sein ER⁺, pourrait être un facteur de résistance

à l'hormonothérapie, utilisant le raloxifène (Imachi et al. 2010). Pour clarifier cela, il serait donc nécessaire de mener des analyses sur des cohortes de patientes plus importantes, ayant reçu un traitement adjuvant d'hormonothérapie, afin de corrélérer la réponse au traitement avec le niveau d'expression de menin.

Comment corrélérer cette diminution d'expression de menin avec le statut mutationnel de ce dernier dans les cancers du sein ?

La question redondante sur le rôle du gène *MEN1* dans les cancers hormono-dépendants, concerne l'absence de corrélation entre les variations du niveau d'expression de menin et le statut mutationnel du gène *MEN1*. En effet, comme dans le cas du cancer de la prostate, les mutations du gène *MEN1* sont rares dans le cancer du sein. Une étude menée sur plusieurs cohortes de patientes atteintes du syndrome NEM1, a pu montrer que ces dernières sont plus prédisposées à développer un cancer du sein par rapport à la population générale (Dreijerink et al., 2014). C'est la première fois, qu'une étude met en évidence une association entre le syndrome NEM1 et la survenue des cancers hormono-dépendants. Il est envisageable que dans ce contexte des NEM1, le gène *MEN1* fasse partie de ces gènes à prédisposition faible ou modérée, mais qui en combinaison avec d'autres mutations mène à une susceptibilité plus accrue de développer un cancer du sein. Néanmoins dans le contexte du syndrome NEM1, cette étude pointe du doigt un rôle oncosuppressif du gène *MEN1* dans le cancer du sein.

En dehors du syndrome NEM1, les mutations sporadiques du gène *MEN1* sont très rares. Très récemment, une analyse de séquençage de l'exome réalisée sur 560 cancers du sein, a révélé de manière surprenante des mutations du gène *MEN1* (Nik-Zainal et al. 2016). Dans cette étude, le gène *MEN1* est décrit comme faisant parti des 93 gènes les plus fréquemment porteurs de « driver mutations » dans les cancers du sein. Cependant, ce faible taux de mutations n'explique pas les variations d'expression de menin qui ont été rapportées par différentes études dans les cancers du sein (Imachi et al. 2010)(Seigne et al. 2013). Il se peut donc que la dérégulation de l'expression de menin soit en cause. Aussi, il convient de se questionner sur l'aspect expérimental des analyses immunohistochimiques visant à établir le niveau d'expression de menin dans les cancers du sein. En effet, la conservation des échantillons tumoraux et le choix des anticorps variant d'une étude à l'autre, pourrait

introduire un biais expérimental dans l'analyse du niveau d'expression de menin. Il est nécessaire d'uniformiser au mieux les analyses cliniques, visant à étudier le niveau d'expression de menin dans les cancers du sein. Néanmoins, comme dans les cancers de la prostate, la prédisposition aux cancers du sein serait la plupart du temps multigénique. C'est pourquoi, dans le cas des cancers du sein sporadiques, les rares altérations du gène *MEN1* vont vraisemblablement conférer un avantage mineur dans la cancérogénèse mammaire.

CONCLUSION

L'objectif de mon projet de thèse était de mieux comprendre les mécanismes de tumorigénèse liés à l'inactivation du gène *MEN1* dans les cancers hormono-dépendants. Mes travaux ont notamment abouti à l'élaboration d'un nouveau modèle murin d'inactivation conditionnelle du gène *Men1*, dans la glande prostatique. Ce dernier a permis de conforter les données précédemment obtenues dans notre laboratoire, sur le rôle oncosuppressif du gène *MEN1* dans la glande prostatique. De plus, les analyses réalisées dans les lignés cellulaires cancéreuses de la prostate et du sein ont pu montrer l'importance de la protéine menin dans la régulation de l'expression du RA et du RE α .

Tout d'abord, dans la première partie de mon travail, l'étude du modèle murin *Men1^{F/F}Nkx3.1Cre^{ERT2+/-}* a permis de montrer que l'inactivation conditionnelle du gène *Men1* dans les cellules luminales de la glande prostatique conduit à une accélération du phénotype développée dans les souris *Nkx3.1Cre^{ERT2+/-}*. Cette accélération se caractérise par le développement de lésions précancéreuses PIN seulement 1,5 mois après l'inactivation du gène *Men1* dans les cellules de la glande prostatique, montrant que celui-ci joue un rôle crucial dans le processus d'initiation tumorale. Quels sont le ou les mécanismes moléculaires qui conduisent à cette initiation tumorale rapide suite à l'inactivation du gène *Men1*, reste une question importante et non résolue dans notre étude. C'est la raison pour laquelle, par des analyses transcriptomiques, il serait intéressant de confronter les profils d'expression génique dans les lésions PIN développées dans les souris *Men1^{F/F}Nkx3.1Cre^{ERT2+/-}* traitées et non traitées au tamoxifène. Ce type d'approche pourrait permettre de savoir si l'inactivation du gène *Men1* conduit à l'augmentation d'expression de certains oncogènes, ou si celle-ci conduit à l'activation d'une ou plusieurs voies de signalisation. De plus, dans notre modèle *Men1^{F/F}Nkx3.1Cre^{ERT2+/-}*, nous avons pu mettre en évidence que cette accélération du phénotype *Nkx3.1^{+/-}*, semble être indépendante de la signalisation androgénique, et liée au moins partiellement à la dédifférenciation cellulaire. Comme je l'ai mentionné dans la discussion, cette notion selon laquelle le RA et la signalisation androgénique ne semble pas nécessaire à l'initiation tumorale, a déjà été relayée par de nombreuses études. De plus, nous avons montré une expression altérée de plusieurs gènes, y compris la diminution de CK18 et l'expression ectopique de CD44 dans les cellules des lésions PIN déficientes pour le gène *Men1*. Donc, au-delà du rôle attribué au gène *Men1* dans la tumorigénèse de la glande

prostatique, ce modèle pourrait s'avérer être un modèle d'étude intéressant des mécanismes qui conduisent à la résistance à l'hormonothérapie, plus précisément dans le contexte d'une perte d'expression du RA.

Un autre axe de mon travail nous a conduit à considérer l'implication directe de menin dans la régulation de l'expression des récepteurs nucléaires aux hormones, RE α et RA. Les expériences de CHIP réalisées dans des lignées cellulaires du cancer du sein et de la prostate, ont permis de mettre en évidence que menin occupe la région promotrice des gènes codants ces deux récepteurs nucléaires. Un fait marquant est la mise en évidence pour la première fois, de l'implication du COMPASS-like complex dans la régulation de l'expression du RA. Cette étude arrive au moment où les mutations des différents membres du complexe COMPASS sont de plus en plus pointées du doigt dans les cancers de la prostate. Des travaux visant à mimer la perte de fonction de ce complexe chez la souris, pourraient notamment permettre de mieux comprendre son rôle dans la tumorigénèse de la prostate. Dans le contexte du cancer du sein, mes travaux apportent des données supplémentaires à celles récemment publiées par Dreijerink et al, montrant que menin est capable de réguler l'expression de *ESRI*, en occupant la partie proximale du promoteur de ce dernier. Néanmoins, les mécanismes par lesquels menin régule l'expression du RE α dans cette région reste à élucider. Dans la littérature, plusieurs partenaires de menin ont été identifiés pour occuper cette région proximale du promoteur de *ESRI*. C'est pourquoi, des expériences de CHIP sont nécessaires pour corréliser la co-occupation éventuelle de menin avec les facteurs de transcription et/ou facteurs épigénétiques connues pour lier le promoteur du RE α .

Pour conclure de manière plus large, j'espère que mes travaux auront convaincu la communauté travaillant sur le gène *MEN1*, qu'il est important de considérer le rôle oncosuppressif de ce dernier dans les tissus hormono-dépendants, à l'heure où l'on ne parle de cette protéine uniquement comme d'un oncogène. De plus, depuis plusieurs années, des études montrent le bénéfice que pourrait conférer l'utilisation de l'inhibiteur de l'interaction menin-MLL notamment dans les leucémies, mais aussi dans les cancers hormono-dépendants. Or, mes travaux montrent que celui-ci entraîne une diminution d'expression du RA et du RE α , respectivement dans le contexte du cancer de la prostate et du sein. Il y a donc une nécessité de prendre du recul face à ce nouvel outil thérapeutique, dont les effets pourraient être plus complexe que ceux qui ont été anticipés.

ANNEXES

Lorsque j'ai intégré l'équipe du Dr Chang Zhang en master 2, la thématique portait sur les mécanismes de différenciation et la tumorigénèse dans les organes endocrines, et plus particulièrement dans le pancréas endocrine. C'est pourquoi, en plus de mon projet de thèse initial, j'ai eu l'opportunité de participer à d'autres études axées sur la compréhension de différents mécanismes impliqués dans la tumorigénèse du pancréas endocrine. Vous trouverez en annexe la liste des différentes publications dans lesquelles je figure.

Article 1 : Foxa2, a novel protein partner of the tumour suppressor menin, is deregulated in mouse and human MEN1 glucagonomas.

Dans cette étude où je figure co-premier auteur avec le Dr Rémy Bonnavion, nous avons démontré pour la première fois l'existence d'une interaction physique et fonctionnelle entre menin et le facteur pionnier FOXA2. Nos données indiquent que menin est impliqué dans la régulation de l'expression de FOXA2 spécifiquement dans les cellules α du pancréas. De plus, les résultats obtenus *in vivo* chez l'homme et la souris, nous laissent suggérer que la perte de fonction du complexe menin-FOXA2 pourrait participer à la tumorigénèse des glucagonomes.

Article 2 : Islet Cells Serve as Cells of Origin of Pancreatic Gastrin-Positive Endocrine Tumors

Dans cette étude s'intéressant à l'histogénèse des tumeurs endocrines pancréatiques exprimant la gastrine, j'ai essentiellement contribué aux révisions du manuscrit jusqu'à son acceptation. L'origine cellulaire des différents types de tumeurs endocrines pancréatiques reste énigmatique, notamment en ce qui concerne les tumeurs exprimant des hormones non pancréatiques tels que les gastrinomes. Dans cette étude, la caractérisation d'un nouveau modèle murin d'inactivation du gène *Men1* spécifiquement dans les cellules progénitrices endocrines pancréatiques *Ngn3+*, le modèle *PancEndoMen1 KO*, a permis de démontrer que les gastrinomes pancréatiques liés à l'inactivation du gène *Men1*, avaient pour origine les cellules pancréatiques endocrines elles-mêmes.

Article 3 : ActivinB Is Induced in Insulinoma To Promote Tumor Plasticity through a - Cell-Induced Dedifferentiation

J'ai également eu l'opportunité de travailler en étroite collaboration avec le Dr Philippe Bertolino, qui était à la tête d'un sous-groupe dans l'équipe du Dr Chang Zhang. Ces travaux ont permis de mettre en évidence que l'ActivinB, un effecteur de la voie du TGF β , est un acteur majeur dans la plasticité des cellules β endocrines, tumorales ou non tumorales. En effet la double invalidation conditionnelle du gène *Men1* et du gène codant pour l'activin B, spécifiquement dans les cellules β des îlots pancréatiques chez la souris, conduit à une dédifférentiation des insulinomes développés dans ce modèle, sans affecter de manière significative la croissance tumorale. L'expression de l'activin B est fréquemment augmentée dans les tumeurs neuroendocrines pancréatiques (TNEPs) chez l'homme. C'est pourquoi, cette étude laisse envisager que la détection de l'ActivinB pourrait être utilisée à des fins diagnostiques/pronostiques chez des patients atteints de TNEPs.


Article 4 : Menin regulates Inhbb expression through an Akt/Ezh2-mediated H3K27 histone modification

Cet article qui se situe dans la continuité de l'article précédent a permis de préciser quels mécanismes conduisent à l'augmentation de l'expression de l'activin B dans les insulinomes. Il a notamment été mise en évidence qu'il existe une interaction fonctionnelle entre menin et le complexe PRC2, qui semble être dépendante de la voie AKT, et qui va contribuer à réprimer l'expression de l'activin B dans les cellules β des îlots pancréatiques. Le complexe PRC2 occupe le promoteur du gène codant pour l'activin B, entraînant une augmentation des marques de triméthylation sur les histones H3K27. Ces marques de méthylations répressives vont engendrer une compaction de la chromatine et par conséquent une inhibition de l'expression de l'activin B dans les cellules β des îlots pancréatiques. Néanmoins, la perte d'expression de menin dans le contexte des tumeurs d'îlots pancréatiques, va entraîner une levée d'inhibition de ce complexe menin-PRC2, qui conduit à augmenter l'expression de l'activin B.

Article 5 : big-h3 Represses T-Cell Activation in Type 1 Diabetes

Un autre projet initié par le Dr Anca Hennino, auquel j'ai pu contribuer, a permis de montrer qu'un membre de la famille du TGF β , BigH3, joue un rôle crucial dans l'inhibition de l'activité des lymphocytes T, dans le contexte du diabète de type 1.

Foxa2, a novel protein partner of the tumour suppressor menin, is deregulated in mouse and human *MEN1* glucagonomas

Rémy Bonnavion^{1,2,3†}, Romain Teinturier^{1,2,3†}, Samuele Gherardi^{1,2,3}, Emmanuelle Leteurtre^{4,5}, Run Yu⁶, Martine Cordier-Bussat^{1,2,3}, Rui Du^{7,8}, François Pattou^{5,9}, Marie-Christine Vantyghem^{5,10}, Philippe Bertolino^{1,2,3}, Jieli Lu^{1,2,3,7,8†*} and Chang Xian Zhang^{1,2,3,7†*} 

¹ INSERM U1052, Lyon, France

² CNRS UMR5286, Lyon, France

³ Université de Lyon, Lyon, France

⁴ Institut de Pathologie, CHRU de Lille, Lille, France

⁵ Department of Endocrinology and Metabolism, Univ. Lille 2, INSERM UMR 1190, Lille, France

⁶ Division of Endocrinology, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA, USA

⁷ The E-Institute of Shanghai, Sino-French Life Science and Genomic Centre, Ruijin Hospital, Shanghai, China

⁸ Shanghai Clinical Centre for Endocrine and Metabolic Diseases, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao-Tong University, Shanghai, China

⁹ CHRU Lille, Endocrine Surgery, Lille, France

¹⁰ CHRU Lille, Endocrinology, Lille, France

*Correspondence to: J Lu, Shanghai Clinical Centre for Endocrine and Metabolic Diseases; Ruijin Hospital, Shanghai Jiao-Tong University, Shanghai 200025 China. E-mail: lj11319@rjh.com.cn;

Or CX Zhang, INSERM 1052, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, F-69008, France. E-mail: chang.zhang@lyon.unicancer.fr

†Equal contributions.

Abstract

Foxa2, known as one of the pioneer factors, plays a crucial role in islet development and endocrine functions. Its expression and biological functions are regulated by various factors, including, in particular, insulin and glucagon. However, its expression and biological role in adult pancreatic α -cells remain elusive. In the current study, we showed that Foxa2 was overexpressed in islets from α -cell-specific *Men1* mutant mice, at both the transcriptional level and the protein level. More importantly, immunostaining analyses showed its prominent nuclear accumulation, specifically in α -cells, at a very early stage after *Men1* disruption. Similar nuclear FOXA2 expression was also detected in a substantial proportion (12/19) of human multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) glucagonomas. Interestingly, our data revealed an interaction between Foxa2 and menin encoded by the *Men1* gene. Furthermore, using several approaches, we demonstrated the relevance of this interaction in the regulation of two tested Foxa2 target genes, including the autoregulation of the *Foxa2* promoter by Foxa2 itself. The current study establishes menin, a novel protein partner of Foxa2, as a regulator of Foxa2, the biological functions of which extend beyond the pancreatic endocrine cells.

Copyright © 2017 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: Foxa2; menin; functional interaction; pancreatic α -cells; glucagonoma

Received 11 September 2015; Revised 17 January 2017; Accepted 30 January 2017

Introduction

Foxa2 (originally termed hepatocyte nuclear factor 3 β) belongs to the Foxa subfamily of forkhead box-containing transcription factors, which includes the transcription factors Foxa1, Foxa2, and Foxa3. In contrast to the other two Foxa members [1,2], Foxa2 is a key factor in embryonic development, as homozygous *Foxa2*-null mice die during embryogenesis [3]. Importantly, Foxa2 expression in the developing and adult pancreas is crucial for glucose and lipid metabolism [4], as well as other physiological functions of pancreatic α -cells and β -cells. For example, Foxa2 expression is required *in vivo* for the maturation of α -cells [5] and the maintenance of normal β -cell functions [6,7]. Moreover,

it is well documented that Foxa2 regulates transcription of the gene (*Gcg*) encoding proglucagon, the biosynthesis and secretion of glucagon, and α -cell differentiation [8–11]. However, the *in vivo* biological functions of Foxa2 in adult α -cells have not been detailed.

Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) is a rare autosomal dominant disorder characterized by the development of multiple hyperplastic and tumour lesions, preferentially affecting the parathyroid gland, endocrine pancreas, and anterior pituitary [12]. The gene *MEN1* encodes a protein of 610 amino acids referred to as menin, which has been highly conserved during evolution [13]. Menin expression has been found in a majority of human tissues analysed to date. Interestingly, menin has been shown to interact with a

number of transcription factors or cofactors, such as JunD [14], the transforming growth factor- β effectors Smad1, Smad3, and Smad5 [15], and the mixed lineage leukaemia protein MLL [16,17]. Menin positively regulates the transcription of p18Ink4c and p27Kip1, two cyclin-dependent kinase inhibitors [17,18]. Several *in vitro* studies have also shown that menin is involved in the regulation of several hormones, such as parathyroid hormone [19], insulin [20], and prolactin [21]. More recently, menin interactions with AKT and Foxo1 were found in several studies [22,23], suggesting its relevant role in these pathways. Interestingly, we have recently demonstrated that the expression of large Maf proteins, MafA and MafB, which are known to have crucial endocrine functions in islet cells, was deregulated in *Men1*-deficient mouse and/or human insulinomas [24,25]. However, the mechanisms underlying the endocrine specificity of *MEN1* syndrome are far from being elucidated.

In order to gain an insight into the mechanisms involved in *MEN1* tumorigenesis, *Men1* knockout (KO) mice were generated with either conventional or conditional knockout technology [26–29]. We previously generated an α -cell-specific *Men1* mutant mouse model [30] by crossing mice carrying the conditional *Men1* KO allele, *Men1^{F/F}*, with transgenic mice expressing Cre recombinase under the control of the *Gcg* gene promoter [31]. These *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mutant mice develop early α -cell hyperplasia at 2 months of age, evolving into dysplasia at around 4 months, and finally giving rise to glucagonomas after 7 months. Intriguingly, our analyses revealed that *Men1* ablation in α -cells also led to insulin-expressing tumours, probably through a cell transdifferentiation mechanism [30,32].

The aim of our current study was to identify specific menin targets or factors contributing to the initiation of islet cell tumorigenesis, by using this mouse model, as the consequences of *Men1* inactivation in the α -cells of these mice occurred at a very early stage. For this purpose, we analysed the transcriptional expression of a panel of transcriptional factors and cofactors in islet lesions of these mice. We found that, whereas other factors showed no obvious alterations (data not shown), *Foxa2* was overexpressed in *Men1*-deficient α -cells. Interestingly, this *Foxa2* overexpression was predominantly observed in the nuclei. Nuclear FOXA2 accumulation was also detected in human *MEN1* glucagonomas. Moreover, we obtained evidence supporting the ability of menin to interact with *Foxa2* and regulate its auto-transactivation. Our data thus demonstrate a new regulatory role for menin in *Foxa2* expression in pancreatic α -cells.

Materials and methods

Human patient samples

Human paraffin-embedded pancreatic tissues were obtained from 11 *MEN1* patients with glucagonomas

(CHRU Lille, France). The study was conducted in accordance with the guidelines in the Declaration of Helsinki, and the use of all patient tissue specimens was carried out according to French laws and regulations.

Animal breeding

Mice carrying one floxed *Men1* allele (*Men1^{+F}*) were crossed with *GluCre* transgenic (*GluCre⁺*) mice. This produced *Men1^{+F}-GluCre⁻* and *Men1^{+F}-GluCre⁺* mice, from which three different mouse lines were further derived, namely *Men1^{F/F}-GluCre⁻*, *Men1^{+/+}-GluCre⁺*, and *Men1^{F/F}-GluCre⁺*, with the first two lines being used as controls. All animal experiments were conducted in accordance with accepted standards of animal care, and were approved by the Animal Care and Use Committee of the University Lyon 1.

Cell culture

A mouse embryonic fibroblast (MEF) cell line carrying the homozygous mutant *Men1* gene (*Men1^{-/-}*) was used in this study [26]. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco Invitrogen, Calsbad, CA, USA) containing 25 mM glucose supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 100 mM β -mercaptoethanol, at 37 °C with 5% CO₂. The glucagon-producing mouse cell line α TC1-9 was cultured in RPMI-1640 medium (Gibco Invitrogen) containing 11.2 mM glucose supplemented with 10% FBS, 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin, at 37 °C with 5% CO₂. β TC3, Bosc, Ins1 and LCT10 cells were cultured as described previously [25,33].

Cell transfections

Transient transfections were carried out in *Men1^{-/-}* MEFs and α TC1-9 cells with Dharmafect Duo (Dharmacon, Lafayette, CO, USA), according to the manufacturer's instructions. For each transfection, a mixture of 0.25 μ g of the reporter plasmid, 0.125 μ g of one or two of the expression vectors (pCI-neo, pCI-M1, and pCI-Foxa2) and 5 ng of pRL-TK internal control vector was added to each well. The total amount of DNA was kept constant by adding the empty pCI-neo expression vector. Cell lysates were analysed for firefly and *Renilla* luciferase activity with the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. Activities were measured with the Luminoskan Ascent luminometer (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). Transfection assays were conducted three times in triplicate. The firefly/*Renilla* activity ratios are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) of the triplicates, after being normalized with that of the pCI-neo-transfected control cells from the same experiment. Comparisons between mean values were performed with a two-tailed Student's *t*-test.

Protein extraction, immunoprecipitation, glutathione-S-transferase (GST) pulldown, and immunoblotting

Enriched nuclear and cytoplasmic protein fractions from cells were prepared and analysed as described previously [33]. The following primary antibodies were used: rabbit anti-menin at 1:10 000 (A300-105A; Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA), goat anti-Foxa2 (M-20) at 1:5000 (sc-6554; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), and mouse anti-actin monoclonal antibody (BA3R, 1:50 000; ICN, Aurora, CA, USA). Immunoprecipitation was carried out according to the protocol described previously [34]. For His-tagged protein purification, an Ni-nitrilotriacetic acid kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used according to the manufacturer's instruction. For *in vitro* interaction assays, purified GST-menin bound to 50 μ l of glutathione resin (GE Healthcare, Aurora, OH, USA) was incubated with 50 μ g of purified His-tagged human FOXA2 in a solution containing 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 1 mM dithiothreitol. After washing, the co-sedimented proteins were subjected to Coomassie Blue gel staining or western blot analyses. For GST pulldown assays, 1.25 μ g of purified GST-menin or GST control protein was incubated with 1 mg or 2 mg of nuclear cell extracts prepared from β TC3 cells, as described previously [34]. The co-sedimented proteins were detected by western blotting under standard conditions.

Immunostaining

The experimental procedures for immunostaining were as described previously [30,35].

Proximity ligation assay (PLA)

α TC1-9 cells (10×10^5) were fixed in methanol for 5 min, washed twice in phosphate-buffered saline, treated according to the manufacturer's instructions (Duolink II Fluorescence; Olink Bioscience, Uppsala, Sweden), and then incubated with two primary antibodies (rabbit anti-menin and goat anti-Foxa2) for 1 h at 37 °C. After the washes, the secondary antibodies conjugated with complementary oligonucleotides were added, and incubated at 37 °C for 1 h. The samples were then treated with ligase and fluorescently labelled oligonucleotides, allowing for their amplification, and signals were visualized under a fluorescence microscope.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)-quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay

The crosslinked chromatin was sheared with a Diogene Bioruptor (Diagenode, Liège, Belgium). After sonication, samples were incubated with 5 μ g of specific antibody (menin, A300-105A; Bethyl Laboratories; Foxa2, sc-6554; Santa Cruz Biotechnology) at 4 °C. Immunoprecipitated DNA was recovered by incubation

with Dynabeads Protein G (10003D; Life Technologies, Calsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The primers used in quantitative real-time PCR (qPCR) are listed in supplementary material, Table S1.

Results

Foxa2 expression is deregulated in α -cell tumours of *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mice

We performed RT-qPCR analyses of *Foxa2*, which is crucial for the endocrine pancreas, using RNA isolated from the islets of *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mutant mice at 6 months ($n = 7$) and 12 months ($n = 10$) of age. A total of 10 mRNA samples from *Men1^{F/F}* mice at 6 months ($n = 3$) and at 12 months ($n = 3$), and *GluCre⁺* mice at 6 months ($n = 2$) and at 12 months ($n = 2$), were used. We found that, whereas the level of *Men1* expression remained very low in *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mice at these experimental time-points, *Foxa2* was significantly overexpressed, with 1.71-fold and 1.86-fold increases at 6 and 12 months of age, respectively, as compared with the control mice (a combination of *Men1^{F/F}* and *GluCre⁺* mice; Figure 1A, B). Immunohistochemical (IHC) analyses revealed higher nuclear Foxa2 levels in glucagonomas (Figure 1C, middle panel) than in exocrine cells and in control islets, but not in insulinomas (Figure 1C, right panel), from *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mice. More interestingly, the detection of menin and Foxa2 proteins by double immunofluorescence (IF) staining revealed that Foxa2 overexpression was only present in menin-deficient α -cells (Figure 1D). Next, we examined the expression of these genes in glucagonomas that had developed in glucagon pathway-deficient *Gcgr*-null mutant mice [36]. Whereas menin was normally expressed, a reduced Foxa2 nuclear expression pattern was observed (supplementary material, Figure S1), suggesting that Foxa2 nuclear expression could also be dependent on the presence of an intact glucagon pathway. Taken together, our data reveal Foxa2 deregulation, with overt nuclear expression, in mouse *Men1* glucagonomas.

Foxa2 nuclear overexpression is an early event in menin-deficient α -cells

In order to determine whether Foxa2 overexpression is an early event arising after *Men1* ablation in α -cells, we examined Foxa2 expression in pancreas sections from *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mice at 24 days and 2 months of age by using triple IF staining for menin, Foxa2, and glucagon. Three mice per control group and mutant group were analysed. IF analysis revealed that all glucagon-positive cells in control islets expressed menin (Figure 2A). In contrast, menin expression was lost in α -cells of 30% of the 24-day-old and 63% of the 2-month-old *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mice (Figure 2D, G). Foxa2 was expressed in a majority of cells in the control islets (Figure 2B), and its expression was increased in

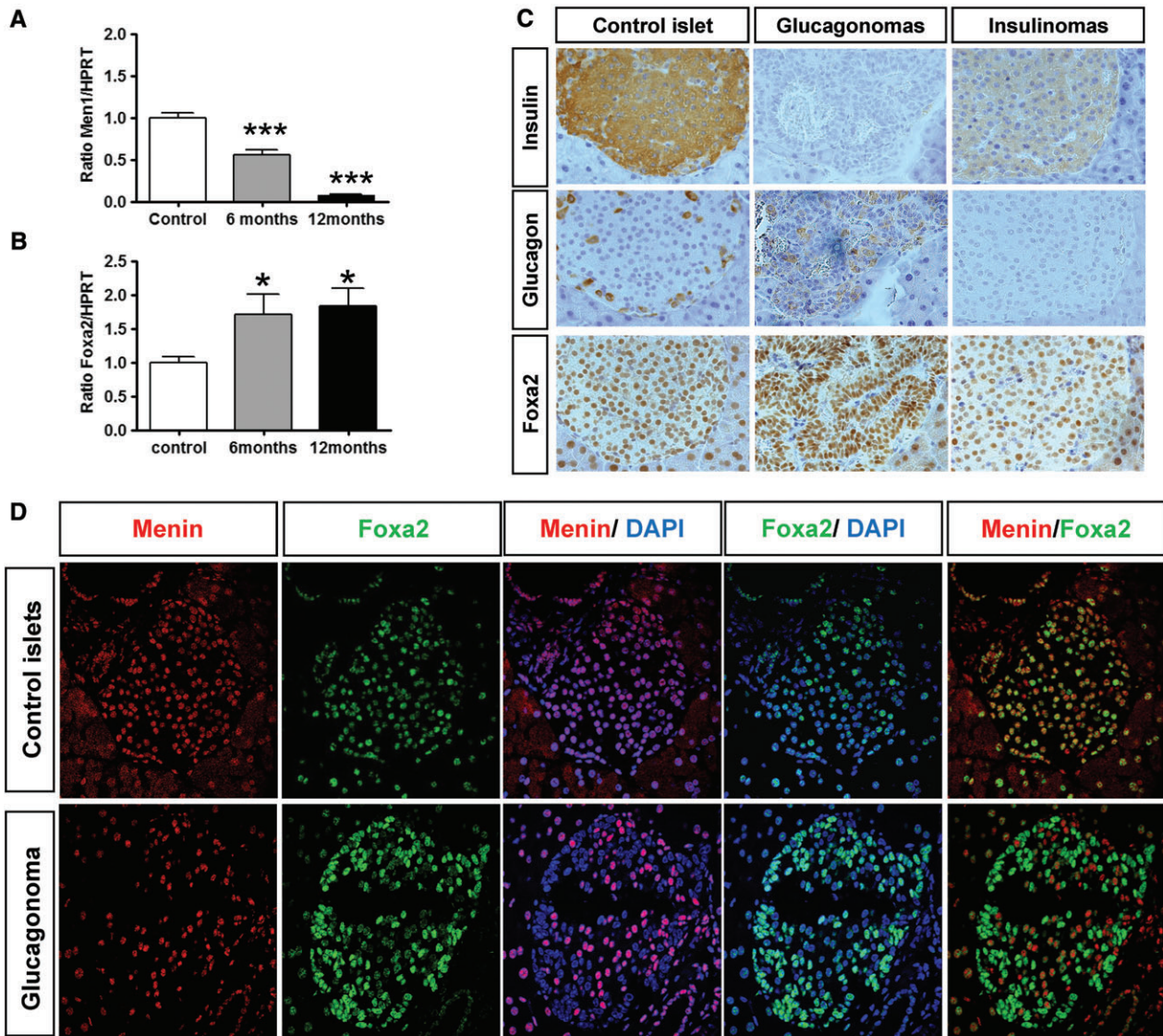


Figure 1. Foxa2 expression in tumours developing in *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mice. (A, B) RT-qPCR analysis of *Men1* (A) and *Foxa2* (B) transcripts was carried out in islet tumours from 6-month-old ($n=7$) and 12-month-old ($n=10$) *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mice as compared with their littermate *GluCre⁺* or *Men1^{F/F}* control mice ($n=10$). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*Hprt*) was used as an internal standard. A Mann-Whitney *U*-test was used to compare mean values between mutant mice and the control group. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ as compared with the control group. (C) Representative IHC staining of Foxa2, glucagon and insulin in pancreas sections from 8-month-old *Men1^{+/+}-GluCre⁺* control mice (left panels) and mutant *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mice (middle and right panels). (D) Immunostaining of Foxa2 (green) and menin (red) in pancreases of 8-month-old and control mice and islet tumours from *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mice. Original objective magnification: $\times 40$. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

some glucagon-positive cells in 24-day-old (Figure 2E) and 2-month-old (Figure 2H) *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mice. The merged image of menin and Foxa2 staining indicated that Foxa2 was specifically overexpressed in the nuclei of menin-deficient α -cells (Figure 2F, I).

We carried out a quantitative analysis by scoring the percentage of Foxa2-overexpressing cells in menin-expressing and menin-deficient cells from *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mice. The number of α -cells overexpressing Foxa2 was thus quantified, and is shown in Figure 2J. The data showed that, at 24 days and 2 months of age, only 5% and 0% of menin-positive α -cells showed strong Foxa2 staining, respectively. Similar results were obtained in control mice (data not shown), suggesting that α -cells in mutant mice

that have not yet lost menin expression could serve as an internal control. Remarkably, 31.6% and 52.6% of *Men1*-deficient α -cells showed Foxa2 overexpression at 24 days and 2 months, respectively. Taken together, our data indicate that loss of menin in α -cells is accompanied by a marked increase in Foxa2 nuclear expression as early as 24 days after birth.

FOXA2 nuclear expression can be detected in human glucagonomas

The above finding prompted us to investigate whether FOXA2 expression is altered in human MEN1 glucagonomas. To this end, we examined FOXA2 expression in 19 glucagon-positive lesions from 11

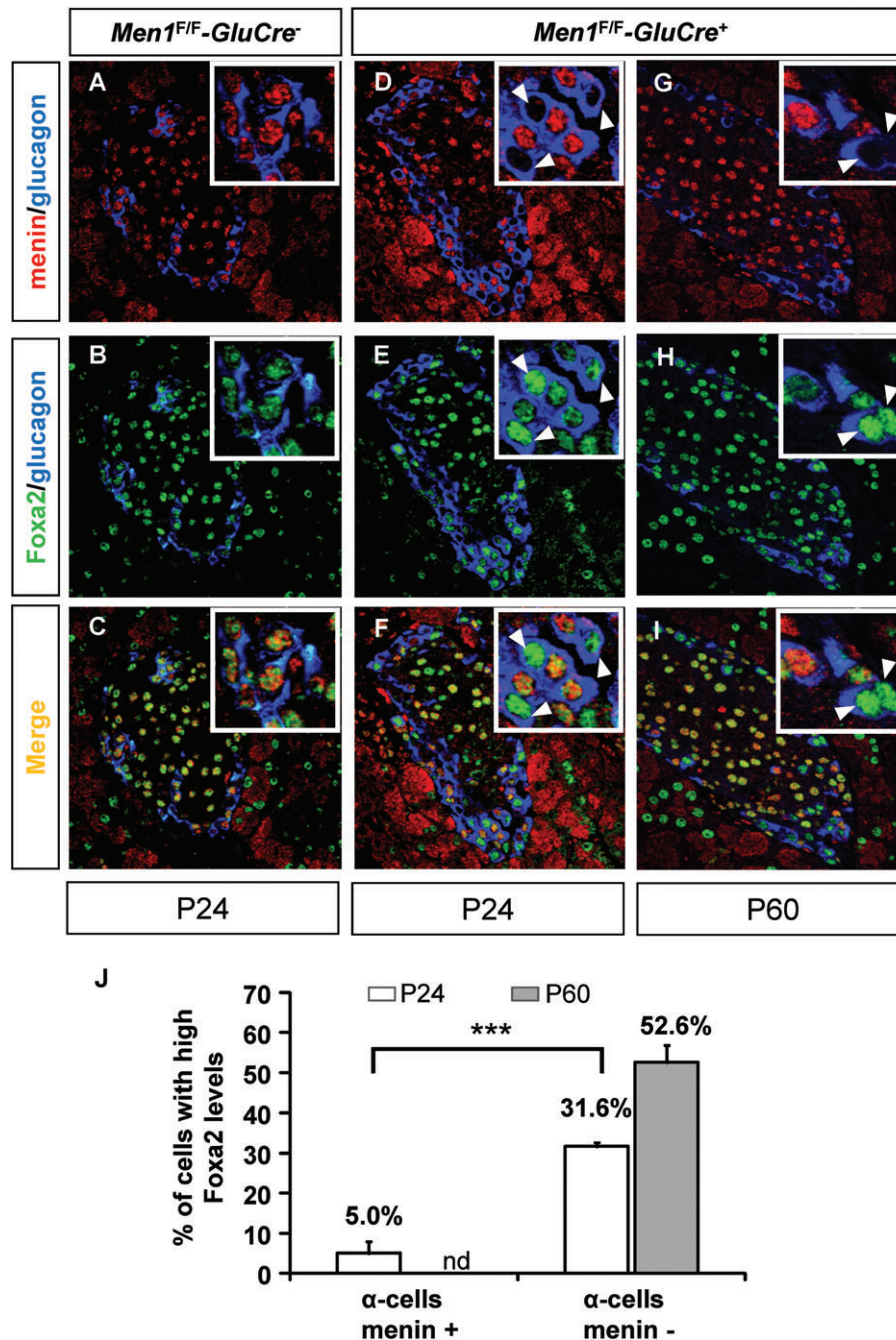


Figure 2. Foxa2 is specifically overexpressed in menin-deficient α -cells of 24-day-old and 2-month-old *Men1^{Fl/Fl}-GluCre⁺* mice. (A–I) Mouse pancreas sections were subjected to triple IF staining with antibodies against menin (red), Foxa2 (green), and glucagon (blue), and were then visualized by confocal microscopy, 24 days (P24) or 60 days (P60) after birth. Insets show enlarged views of the islets. (A, D, G) Merged pictures of menin and glucagon staining. (B, E, H) Merged pictures of Foxa2 and glucagon staining. (C, F, I) Merged pictures of triple staining. Arrowheads point to menin-deficient α -cells showing Foxa2 overexpression. (J) Proportions of Foxa2-overexpressing α -cells in menin-expressing and menin-deficient α -cell populations of *Men1^{Fl/Fl}-GluCre⁺* mice at 24 and 60 days. At least two mice were subjected to α -cell counting. Cells negative for 4',6-diamidino-2-phenylindole staining were excluded from the count. The bars represent the percentage of cells showing strong Foxa2 staining among the total number of menin-positive or menin-negative α -cells. nd, not detected. Statistical analyses of cell distribution were performed with Fisher's exact test when applicable. Asterisks denote a significant difference between two distributions. *** $p < 0.001$.

MEN1 patients with glucagonomas, by using triple IF staining [35]. In peritumoural pancreatic tissues, both nuclear and cytoplasmic FOXA2 expression were observed in α -cells and β -cells (Figure 3, left panels). Interestingly, FOXA2 nuclear expression was detected in 12 of the glucagonomas tested (Figure 3, middle panels). We noticed that, in the samples showing multiple

islet lesions, FOXA2 nuclear expression was detected in glucagon-positive tumours, but not in insulin-positive lesions (Figure 3, right panel).

Menin interacts with Foxa2

The above results suggest that menin may be involved in the regulation of Foxa2 expression in α -cells. This

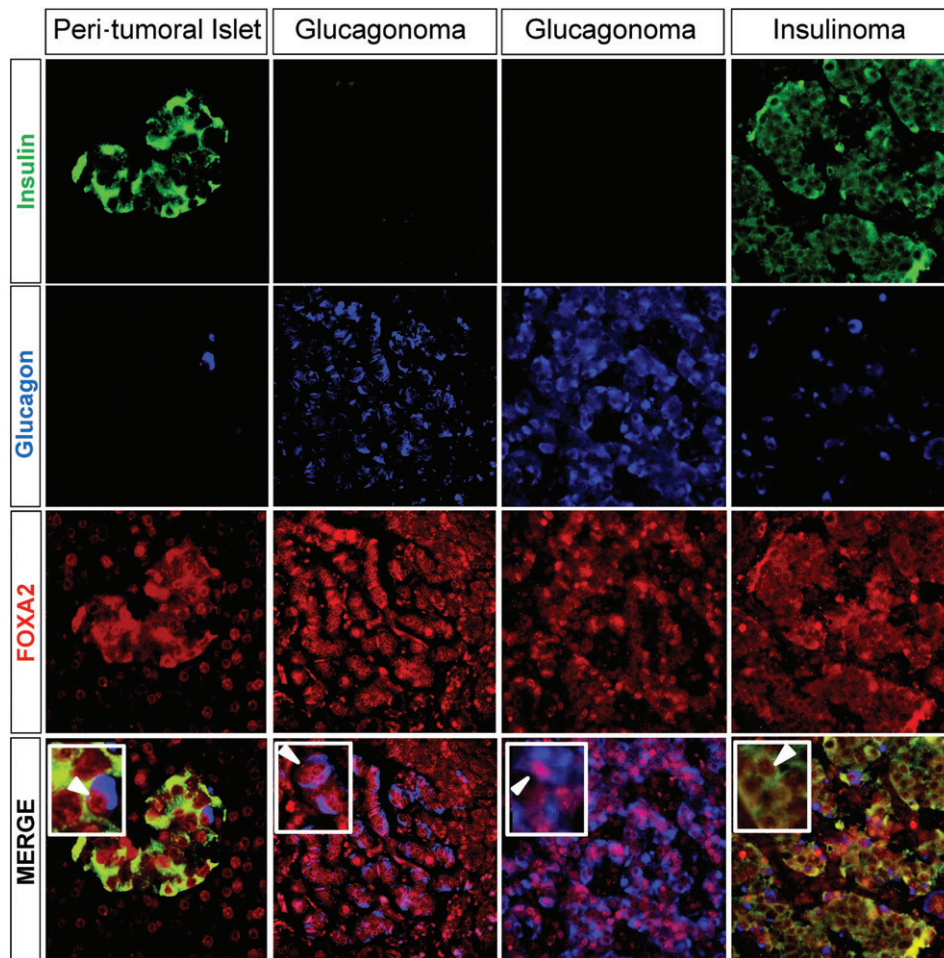


Figure 3. Altered FOXA2 expression in human MEN1 glucagonomas. Representative IF staining is shown for FOXA2, glucagon and insulin in pancreas sections from MEN1 patients with glucagonomas. The representative images obtained from peritumoural islets, glucagon-positive tumours and insulin-positive tumours are shown in the left, middle and right columns, respectively. Arrows in the insets in the bottom panel depict triple FOXA2, glucagon and insulin IF staining with magnified views. Original objective magnification: $\times 40$.

regulation could be mediated either by its binding to the promoter of *Foxa2*, or by its direct or indirect interaction with Foxa2, thus competing with Foxa2 or preventing Foxa2 from auto-transactivating its own promoter [37]. To determine whether menin interacts with Foxa2, we conducted co-immunoprecipitation assays, and found that endogenous menin interacted specifically with endogenous Foxa2 in protein extracts of β TC3 (Figure 4A) and α TC1-9 (Figure 4B) cells. To further confirm the interaction and visualize its subcellular localization, we performed PLAs with both anti-menin and anti-Foxa2 antibodies in mouse α TC1-9 cells. The data thus obtained showed that menin and Foxa2 undergo a protein–protein interaction mainly in the nucleus, giving rise to red dots in nuclei of the tested cells (Figure 4C). To further investigate the binding between menin and Foxa2, we performed an *in vitro* interaction assay using purified human GST–menin and purified human His-tagged FOXA2 (supplementary material, Figure S2). The results showed the binding of the two proteins, as evidenced by the presence of an extra band in the Coomassie Blue-stained gel, which could be detected by western blotting with

anti-Foxa2 antibodies (Figure 4D). As this binding could be, once again, direct or indirect owing to the presence of co-purified proteins, to resolve this issue we conducted Blitz experiments. No interaction was observed by Blitz analysis (data not shown), suggesting that the menin–Foxa2 interaction may not be direct. We then localized which part of the menin protein was involved in Foxa2 binding, by using GST pulldown assays with a panel of different truncated GST–menin constructs [34]. Our data showed that the minimum menin region required to interact with Foxa2 is situated between amino acids 258 and 475, whereas neither the 5' end (M1-102, M1-193) nor the 3' end (M572-610) of menin interacted with Foxa2 (Figure 4E; supplementary material, Fig. 3). Altogether, the data obtained from the different assays described above establish menin and Foxa2 as interacting protein partners.

Menin inhibits the auto-activation of the *Foxa2* promoter by Foxa2 itself

The Foxa2 overexpression in menin-deficient α -cells of *Men1^{FF}-GluCre⁺* mice and its interaction with

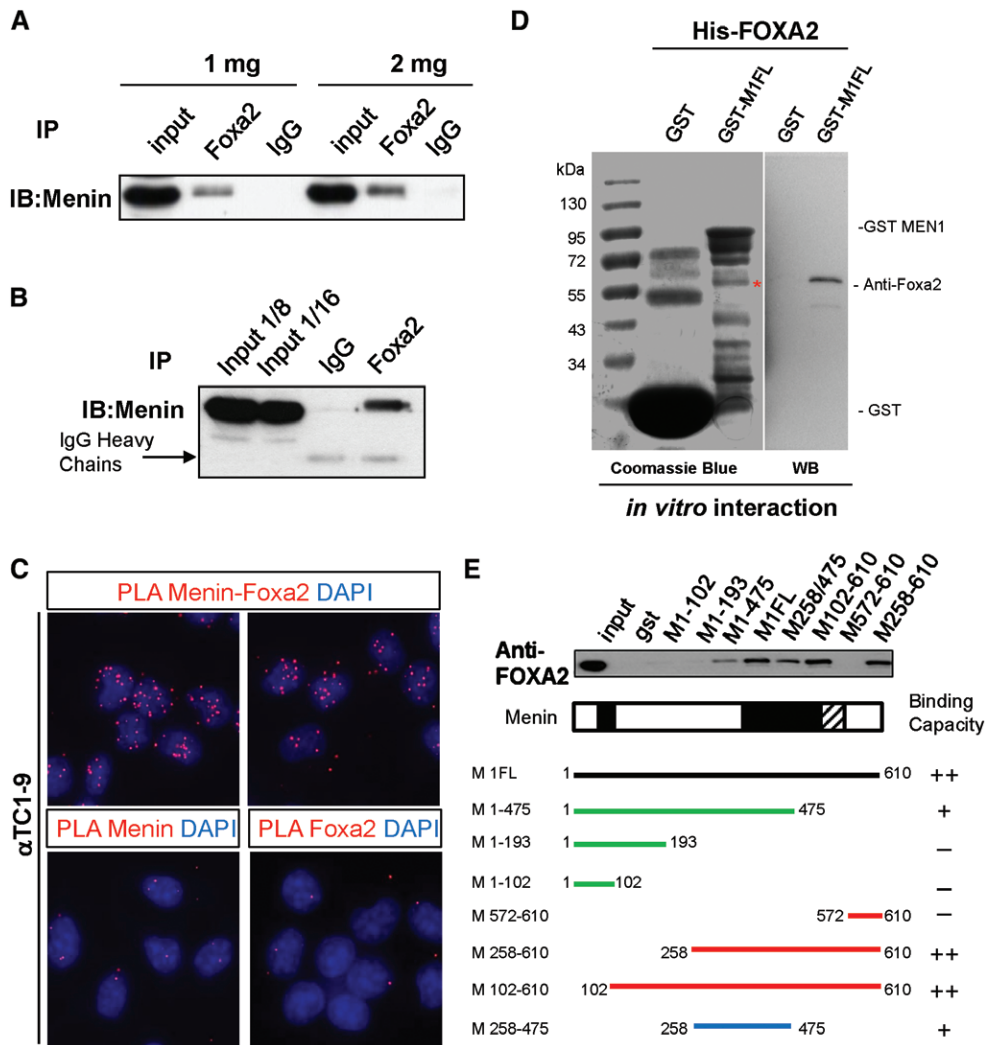


Figure 4. Menin interacts with Foxa2. (A, B) Co-immunoprecipitation assays on endogenous proteins. Nuclear protein extracts (1 mg and 2 mg) from β TC3 cells (A) and 2 mg of total protein extracts from α TC1-9 cells (B) were immunoprecipitated with anti-Foxa2 antibody or IgG as control. Precipitated fractions were analysed by western blotting (WB) with an anti-menin antibody. Input corresponds to protein extracts prepared from tested cells. (C) PLA analysis with anti-menin and anti-Foxa2 antibodies. The same analyses with anti-menin alone and anti-Foxa2 alone were performed as controls. Note that the red dots (positive signals) can only be seen in the former. (D) *In vitro* interaction of purified menin and Foxa2. The purified human GST–menin fusion protein was incubated with the purified human His-tagged FOXA2 protein. The eluate was subjected to either Coomassie Blue gel staining (left column) or western blot analyses with anti-Foxa2 (right column). *An extra band appeared in the eluate from the GST–menin and Foxa2 *in vitro* interaction, but not in the control (GST and Foxa2). (E) Localization of interacting sites between menin and Foxa2 by GST pull-down analysis. GST–menin was incubated with nuclear lysates of β TC3 cells. Top: anti-Foxa2 western blot of bound Foxa2. Bottom: schematic diagram of eight GST–menin full-length or truncated fusion protein constructs used for pull-down assays. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitation.

menin suggest that menin may act as a transcriptional co-regulator of *Foxa2* and inhibit its previously reported auto-activation [37]. In order to test this hypothesis, we used MEFs carrying two *Men1*-null alleles (*Men1*^{-/-}) [26] that express neither menin nor Foxa2 (supplementary material, Figure S4). These cells were selected to avoid any confounding effect of endogenous menin and Foxa2. To investigate the regulatory effect of menin on the *Foxa2* promoter by using an *in vitro* gene reporter assay, *Men1*-null MEFs were transiently co-transfected with the proximal mouse *Foxa2* promoter linked to the firefly luciferase gene (pFoxa2; Figure 5A) and different expression vectors containing either *MEN1* (pCI-M1) or *Foxa2* (pCI-Foxa2) cDNA cloned under the control of the constitutively active cytomegalovirus

promoter. The data presented in Figure 5B show that menin re-expression itself in *Men1*^{-/-} MEFs had no effect on the activity of the *Foxa2* promoter (pFoxa2) as compared with its basal activity. In contrast, Foxa2 re-expression led to a two-fold increase in pFoxa2 activity, as previously reported [37]. Importantly, the combined reconstitution of MEN1 and Foxa2 expression in *Men1*^{-/-} MEFs revealed that menin re-expression significantly inhibited the auto-transactivation of pFoxa2 by Foxa2, by 60% (Figure 5B).

To confirm this inhibitory effect of menin in α -cells, we performed *Men1* knockdown with three different types of small interfering RNA (siRNA) against *Men1* (si-*Men1*) in α TC1-9 cells expressing both menin and Foxa2 and transfected with the proximal mouse

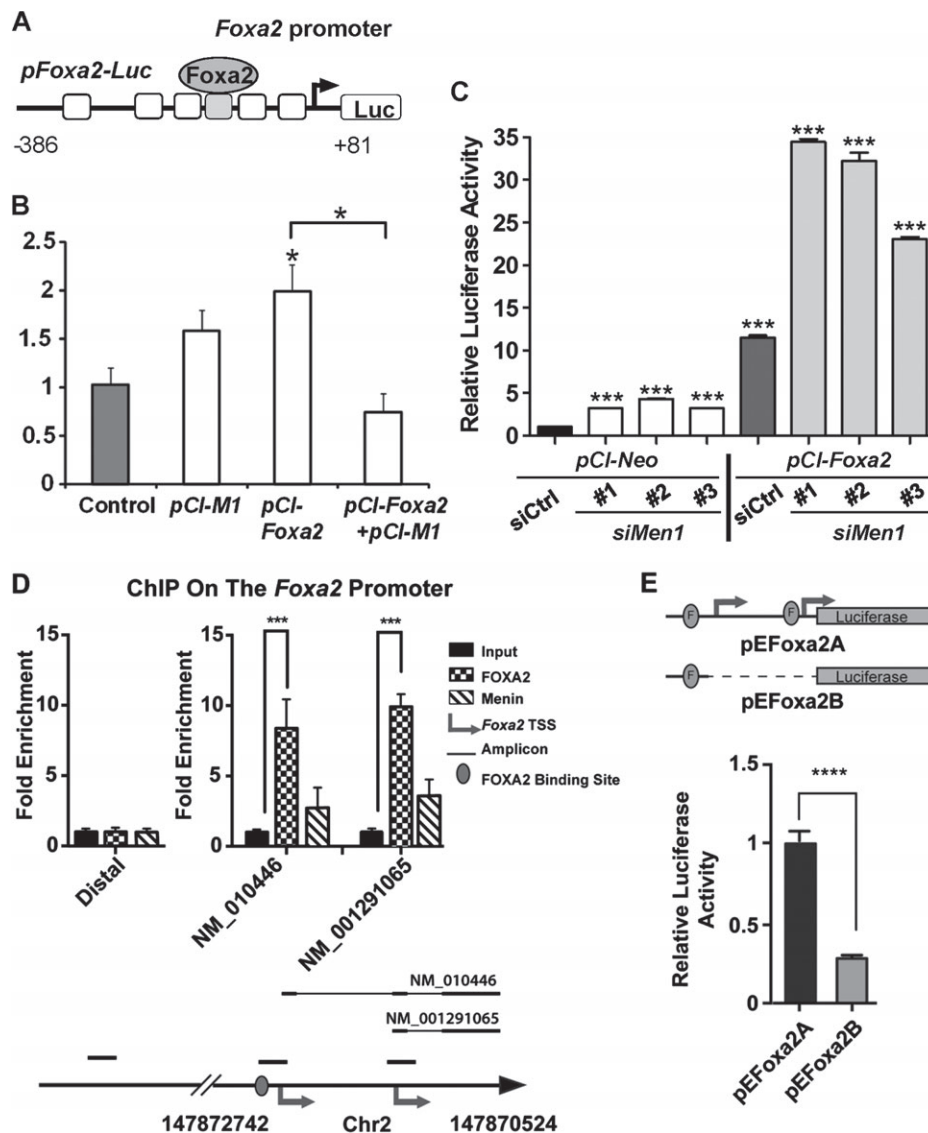


Figure 5. Menin participates in regulation of the *Foxa2* promoter *in vitro*. (A) The reporter construct containing the mouse *Foxa2* promoter. Note that the mouse *Foxa2* promoter (–386 bp to +81 bp) was amplified by PCR and then subcloned into the pGL3 basic luciferase promoter at the restriction enzyme sites *SacI* and *XhoI*. The proximal *Foxa2* promoter contained a Foxa consensus binding site (grey box) and known binding sites for various transcriptional regulators (white boxes). (B) Transient co-transfection studies with pFoxa2-luc plasmid and the indicated expression vector in *Men1*^{–/–} MEFs. The control corresponds to the reporter plasmid transfected along with pCI-neo empty expression vector. (C) Transient co-transfection studies in α TC1–9 cells with three different si-*Men1*s (1, 2, and 3) or si-control. For both (B) and (C), data represent fold change relative to control basal activity, and are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ (two-tailed Student's *t*-test). (D) ChIP assay performed with anti-Foxa2 and anti-menin antibodies on protein extracts prepared from α TC1–9 cells. Specific binding was assessed by qPCR of the region from –536 bp to +1280 bp in the proximal *Foxa2* promoter area. Note that Foxa2, but not menin, binds to two different sites on the tested promoter area. A distal region, ~5 kb upstream of the *Foxa2* transcription start site (TSS), was also included in the analysis, and showed no menin and Foxa2 enrichment. (E) Transient co-transfection studies with pEFOxa2A plasmid and pEFOxa2B plasmid in α TC1–9 cells. Data represent fold change relative to control basal activity, and are presented as mean \pm SEM. **** $p < 0.0001$.

Foxa2 promoter linked to the firefly luciferase gene, pFoxa2, and pCI-Foxa2, in comparison with those transfected with pFoxa2 and pCI-Neo. We found that *Men1* knockdown resulted in a 3.5-fold increase in basal pFoxa2 activity, and a similar increase was seen when pCI-Foxa2 was used, as compared with control siRNA (si-control) (Figure 5C). These data are consistent with the above data obtained in menin-overexpressing MEFs (Figure 5B), thus confirming the inhibitory role played by menin in *Foxa2* transcriptional regulation.

The above results prompted us to examine whether menin binds to the *Foxa2* promoter. We used ChIP assays with anti-Foxa2 and anti-menin antibodies to assess the association of Foxa2 and menin with the *Foxa2* promoter region. ChIP assays confirmed the presence of Foxa2 on the proximal *Foxa2* promoter at the previously defined *Foxa2* auto-activation site. Moreover, ChIP assays revealed a novel Foxa2-binding site close to the transcription initiation site of a *Foxa2* isoform (NM_001291065; Figure 5D). Conversely, although we observed seemingly higher enrichment with anti-menin

antibodies at the two above-mentioned *Foxa2*-binding sites, we failed to detect a significant presence of menin in this region after conducting repeated experiments. To better understand the likely regulatory role played by the novel *Foxa2*-binding site on its own promoter, α TC1-9 cells were transiently co-transfected with the enlarged mouse *Foxa2* promoter linked to the firefly luciferase gene containing either both *Foxa2*-binding sites (pE*Foxa2A*) or only the previously described *Foxa2*-binding site (pE*Foxa2B*). The data showed that the presence of the novel *Foxa2*-binding site resulted in an increase in the activity of the *Foxa2* promoter (Figure 5E), suggesting that the novel *Foxa2*-binding site could be an auto-activation site for the *Foxa2* isoform transcript (NM_001291065). Altogether, these data suggest that menin does not bind to the *Foxa2* auto-activation sites on the *Foxa2* promoter.

Next, we investigated whether menin regulates *Foxa2* targets other than the *Foxa2* promoter. We chose to examine the effect of menin on the activity of the *Pdx1* promoter, a known *Foxa2* target in islets. A schematic representation of the promoter and its different cis-regulating elements is shown in supplementary material, Figure S5. First, co-transfection experiments with menin, *Foxa2* expression vectors and a plasmid encoding firefly luciferase under the control of the *Pdx1* promoter were performed in a panel of different endocrine and non-endocrine cell lines. Interestingly, an inhibitory effect of menin on the *Pdx1* promoter was seen in *Men1*-deficient MEFs and LCT10 cells, a menin-deficient Leydig cell line [33], but not in other menin-expressing cell lines (Figure 6A). Additional analyses were then performed in LCT10 cells. Remarkably, the introduction of mutant menin constructs carrying R415X or 1384del disease-causing mutations [38] failed to result in the same inhibition as seen for wild-type menin in these cells (Figure 6B). Furthermore, the inhibitory effect of menin on the *Pdx1* promoter occurred in a dose-dependent manner (Figure 6C). Our data thus indicate that menin is able to regulate the *Pdx1* promoter, a *Foxa2* target.

Discussion

The current study provides evidence that nuclear expression of *Foxa2* increases at a very early stage after *Men1* disruption in menin-deficient α -cells of *Men1^{F/F}-GluCre⁺* mice. Similar nuclear accumulation of FOXA2 was observed in a substantial proportion of human MEN1 glucagonomas. Importantly, our data, having identified the interaction between menin and FOXA2, revealed the involvement of menin in the regulation of *Foxa2* expression in adult pancreatic α -cells.

Menin, a new protein partner and regulator of *Foxa2*

Using several approaches, including two assays based on the use of endogenous proteins

(co-immunoprecipitation and PLA), we identified *Foxa2* as a new partner of menin. Considering the vital biological function of *Foxa2* in pancreatic endocrine cells, we believe that the identification of its interaction with menin may help significantly in deciphering the physiological role of menin in the endocrine pancreas, and also the mechanisms underlying the tissue specificity of MEN1 tumourigenesis. It is interesting to note that, among numerous menin-interacting partners, only a limited number of proteins are known to impact on islet cell functions, and these might play a critical role in the tissue specificity of MEN1 pathologies [25,39].

Our data on the interaction between menin and *Foxa2* imply a crucial role for menin in the regulation of *Foxa2*-targeted promoters and the repression of its auto-transactivation in both endocrine and non-endocrine cells. Furthermore, we have shown that two disease-causing *MEN1* germline mutants lost this capacity to regulate *Foxa2* transactivation. These data establish menin as a novel regulator of *Foxa2*, which helps to improve our understanding of the biological functions of menin in α -cells. A recent study highlighted the role of glucagon in *Foxa2* regulation in liver cells [4]. Our data provide evidence that menin is probably involved in a similar regulatory process in α -cells.

Even though we have demonstrated that *Foxa2* is a functional interacting partner of menin, the mechanisms underlying the regulation of *Foxa2* expression via such an interaction remain to be elucidated. One possibility could be that this interaction is DNA-dependent; that is, menin may replace or compete with other transcriptional factors or co-factors, and thus hamper the auto-transactivation of *Foxa2*. Alternatively, this interaction could also be 'off-DNA-strand', so that menin may prevent *Foxa2* from fixing to its own binding targets. As ChIP assays failed to show the presence of co-occupancy of menin and *Foxa2* on the same site(s) in the tested *Foxa2* promoter region, the current data seem to support the latter hypothesis. However, at this stage, we cannot exclude the possibility that menin and *Foxa2* may bind together to the *Foxa2* promoter on a different site or sites to those tested in the current study.

The importance of menin–*Foxa2* interaction in the tumourigenesis of α -cells

Interestingly, we noticed that menin inactivation had not occurred by day 24 in all α -cells, indicating that the Cre-recombinase is not yet active in all of the target cells at this stage. Therefore, α -cells do not constitute a 'synchronized homogeneous' population. This may also, at least partially, explain why not all menin-deficient α -cells showed increased *Foxa2* expression. Our work also raises the following question: to what extent does the early disruption of the *Men1*–*Foxa2* functional interaction contribute to α -cell proliferation and glucagonoma initiation and progression? We attempted to test the effects of *Foxa2* overexpression in α TC1-9 cells, but found no

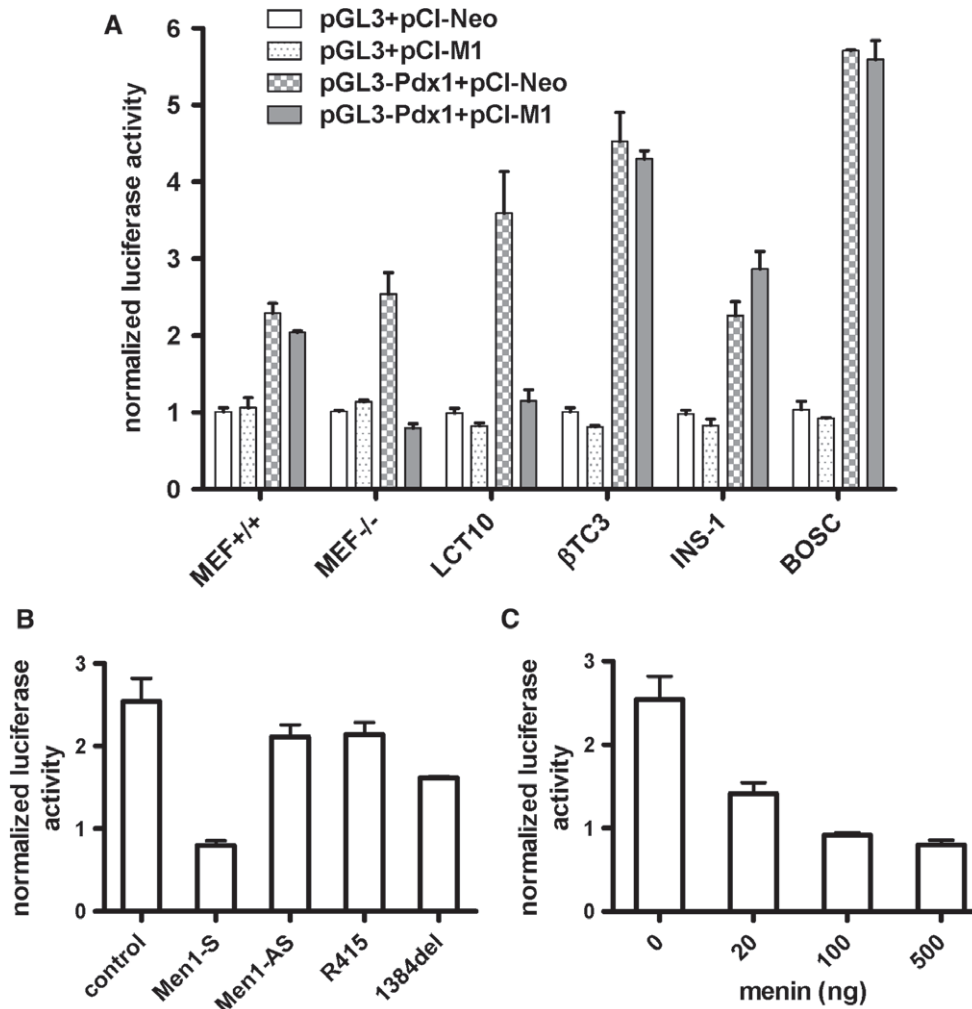


Figure 6. Menin regulates the *Pdx1* promoter. (A) Effects of menin reconstitution on the *Pdx1* promoter in different cell lines. Note that the re-expression of menin has an inhibitory effect on the *Pdx1* promoter in *Men1*-deficient MEF and LCT10 cells, but not in menin-expressing MEF, β TC3, INS-1 and BOSC cells. (B) Menin, but not antisense menin or mutant menin (pM1-*Arg415ter*, pM1-1384delAGG), can inhibit the *Pdx1* promoter in *Men1*-deficient LCT10 cells. (C) Dose-dependent inhibition of *Pdx1* in LCT10 cells transfected with different amounts (0, 20, 100 and 500 ng) of menin-expressing vector.

change in terms of morphology or cell proliferation (data not shown). As α TC1-9 cells are derived from glucagonomas from SV40 TAG-expressing transgenic mice, and given the oncogenic effects of TAG, these cells may not be the most suitable for testing the effects of *Foxa2* overexpression. Interestingly, ectopic expression of *Foxa2* has been reported in mouse prostate tumours resulting from β -catenin activation [40], in mouse prostate neuroendocrine carcinomas [41], and in a subset of human neuroendocrine lung tumours [42]. Consistent with these observations, none of the endocrine pancreas-specific *Foxa2* KO mouse models gave rise to islet tumour development [5–7]. In contrast to the above findings and to what we observed in α -cell-specific *Men1* mutant mice, *Foxa2* has been reported to have tumour suppressor functions in lung cancer cell lines [43]. Although we currently do not have irrevocable proof of the role of *Foxa2* in the control of α -cell proliferation after menin inactivation, *Foxa2* may have dual functions depending on its interaction with menin, similarly to what was reported for the AP1

factor JunD [44]. Another possibility could be that the function of *Foxa2*, together with its interaction with menin, could be cell type-specific.

Although the current study revealed an interaction between menin and *Foxa2*, and enabled us to gain an insight into its function in gene regulation, we know very little about the factors required for or influencing this interaction. We unravelled the role of menin in the regulation of *Foxa2* expression. However, further analyses on other binding sites, particularly in the 5' upstream part of the *Foxa2* promoter, are warranted, in order to fully decipher the underlying mechanisms. Moreover, the current study has not enabled us to establish the molecular consequences of *Foxa2* nuclear accumulation in glucagonomas. Therefore, the relevance of menin–*Foxa2* interaction in α -cells should be further addressed; in particular, the specific targets of *Foxa2* nuclear expression in α -cells need to be identified. Considering the rarity of human MEN1 glucagonoma, more interesting clues may emerge from the development of an *in vivo* model showing α -cell-specific conditional *Foxa2* overexpression.

Acknowledgements

We are grateful to Denis Ressenkoff (Centre Quantime-tre, Lyon, France) for expert assistance with confocal microscopy, Jean-Michel Martin for the maintenance of the mouse colonies, and Dr Brigitte MANSHP for her assistance in proofreading the manuscript. We thank Dr J. Philippe for the α TC1-9 cell line, and Dr Chris Wright for the Pdx1 promoter. Jieli Lu was the recipient of PhD fellowships from the Association pour la Recherche contre le Cancer, France, and the E-Institute of Shanghai Jiaotong University, China.

This study was supported by the Epigenetics & Cancer Programme (ASC14092CSA), Agence National de Recherche (grant SVSE2 ANR 10 BLANC 1240 04), the CMIRA programme of Region Rhône-Alpes (14.007031), the Ligue contre le Cancer du Rhône and de la Loire, the Fondation de l'Association pour la Recherche contre le Cancer (SFI20101201530), and the National Science Foundation of China (NSFC, 81170719, 81370960). Jieli Lu was supported by the Chenxing Plan of Shanghai Jiaotong University, and a Gaofeng Clinical Medicine Grant from Shanghai Municipal Education Commission (20152202).

Author contributions statement

The authors contributed in the following way: RB, RT: conducted the experiments, analysed and interpreted the data, and prepared figures and the manuscript; SG, RD: provided technical and material support, and participated in data interpretation; EL, RY, FP, MCV: supervised the development of the tissue banks, performed pathological analyses, provided material support, and participated in data interpretation; MC, PB: participated in study design and supervision, and critically revised the manuscript; JLL conceived and supervised the study, and prepared the manuscript; CXZ: conceived and supervised the study, prepared the manuscript, and obtained funding.

References

- Kaestner, KH, Hiemisch H, Schutz G, *et al.* Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3 γ results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 4245–4251.
- Kaestner KH, Katz J, Liu Y, *et al.* Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3 α affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression in vivo. *e Genes Dev* 1999; **13**: 495–504.
- Weinstein DC, Ruiz i Altaba A, Chen WS, *et al.* The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 1994; **78**: 575–588.
- von Meyenn F, Porstmann T, Gasser E, *et al.* Glucagon-induced acetylation of Foxa2 regulates hepatic lipid metabolism. *Cell Metab* 2013; **17**: 436–447.
- Lee CS, Sund NJ, Behr R, *et al.* Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic alpha-cells. *Dev Biol* 2005; **278**: 484–495.
- Gao N, White P, Doliba N, *et al.* Foxa2 controls vesicle docking and insulin secretion in mature Beta cells. *Cell Metab* 2007; **6**: 267–279.
- Sund NJ, Vatamaniuk MZ, Casey M, *et al.* Tissue-specific deletion of Foxa2 in pancreatic beta cells results in hyperinsulinemic hypoglycemia. *Genes Dev* 2001; **15**: 1706–1715.
- Gauthier BR, Schwitzgebel VM, Zaiko M, *et al.* Hepatic nuclear factor-3 (HNF-3 or Foxa2) regulates glucagon gene transcription by binding to the G1 and G2 promoter elements. *Mol Endocrinol* 2002; **16**: 170–183.
- Philippe J. Hepatocyte-nuclear factor 3 beta gene transcripts generate protein isoforms with different transactivation properties on the glucagon gene. *Mol Endocrinol* 1995; **9**: 368–374.
- Philippe J, Morel C, Prezioso VR. Glucagon gene expression is negatively regulated by hepatocyte nuclear factor 3 beta. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 3514–3523.
- Heddad Masson M, Poisson C, Guérardel A, *et al.* Foxa1 and Foxa2 regulate α -cell differentiation, glucagon biosynthesis, and secretion. *Endocrinology* 2014; **155**: 3781–3792.
- Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia – syndromes of the twentieth century. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 2617–2620.
- Stewart C, Parente F, Piehl F, *et al.* Characterization of the mouse Men1 gene and its expression during development. *Oncogene* 1998; **17**: 2485–2493.
- Agarwal SK, Guru SC, Heppner C, *et al.* Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell* 1999; **96**: 143–152.
- Kaji H, Canaff L, Lebrun JJ, *et al.* Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming growth factor type beta signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 3837–3842.
- Hughes CM, Rozenblatt-Rosen O, Milne TA, *et al.* Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the hoxc8 locus. *Mol Cell* 2004; **13**: 587–597.
- Milne TA, Hughes CM, Lloyd R, *et al.* Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 749–754.
- Karnik SK, Hughes CM, Gu X, *et al.* Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 14659–14664.
- Sowa H, Kaji H, Kitazawa R, *et al.* Menin inactivation leads to loss of transforming growth factor beta inhibition of parathyroid cell proliferation and parathyroid hormone secretion. *Cancer Res* 2004; **64**: 2222–2228.
- Sayo Y, Murao K, Imachi H, *et al.* The multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin, inhibits insulin production in rat insulinoma cells. *Endocrinology* 2002; **143**: 2437–2440.
- Namihira H, Sato M, Murao K, *et al.* The multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin, inhibits the human prolactin promoter activity. *J Mol Endocrinol* 2002; **29**: 297–304.
- Zhang H, Li W, Wang Q, *et al.* Glucose-mediated repression of menin promotes pancreatic β -cell proliferation. *Endocrinology* 2012; **153**: 602–611.
- Wuescher L, Angevine K, Hinds T, *et al.* Insulin regulates menin expression, cytoplasmic localization, and interaction with FOXO1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; **301**: E474–E483.
- Hamze Z, Vercherat C, Bernigaud-Lacheretz A, *et al.* Altered MENIN expression disrupts the MAFA differentiation pathway in insulinoma. *Endocr Relat Cancer* 2013; **20**: 833–848.
- Lu J, Hamze Z, Bonnavion R, *et al.* Reexpression of oncoprotein MafB in proliferative β -cells and Men1 insulinomas in mouse. *Oncogene* 2012; **31**: 3647–3654.
- Bertolino P, Radovanovic I, Casse H, *et al.* Genetic ablation of the tumor suppressor menin causes lethality at mid-gestation with defects in multiple organs. *Mech Dev* 2003; **120**: 549–560.
- Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, *et al.* A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 1118–1123.

28. Bertolino P, Tong WM, Herrera PL, et al. Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer Res* 2003; **63**: 4836–4841.
29. Piret SE, Thakker RV. Mouse models for inherited endocrine and metabolic disorders. *J Endocrinol* 2011; **211**: 211–230.
30. Lu J, Herrera PL, Carreira C, et al. Alpha cell-specific Men1 ablation triggers the transdifferentiation of glucagon-expressing cells and insulinoma development. *Gastroenterology* 2010; **138**: 1954–1965.
31. Herrera PL. Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 2000; **127**: 2317–2322.
32. Lu J, Jaafar R, Bonnavion R, et al. Transdifferentiation of pancreatic α -cells into insulin-secreting cells: from experimental models to underlying mechanisms. *World J Diabetes* 2014; **5**: 847–853.
33. Hussein N, Lu J, Casse H, et al. Deregulation of anti-Mullerian hormone/BMP and transforming growth factor-beta pathways in Leydig cell lesions developed in male heterozygous multiple endocrine neoplasia type 1 mutant mice. *Endocr Relat Cancer* 2008; **15**: 217–227.
34. Cao Y, Liu R, Jiang X, et al. Nuclear–cytoplasmic shuttling of menin regulates nuclear translocation of {beta}-catenin. *Mol Cell Biol* 2009; **29**: 5477–5487.
35. Bonnavion R, Jaafar R, Kerr-Conte J, et al. Both PAX4 and MAFA are expressed in a substantial proportion of normal human pancreatic alpha cells and deregulated in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 2013; **8**: e72194.
36. Yu R, Dhall D, Nissen NN, et al. Pancreatic neuroendocrine tumors in glucagon receptor-deficient mice. *PLoS One* 2011; **6**: e23397.
37. Pani L, Quian XB, Clevidence D, et al. The restricted promoter activity of the liver transcription factor hepatocyte nuclear factor 3 beta involves a cell-specific factor and positive autoactivation. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 552–562.
38. Hussein N, Casse H, Fontanière S, et al. Reconstituted expression of menin in Men1-deficient mouse Leydig tumour cells induces cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Cancer* 2007; **43**: 402–414.
39. Shi K, Parekh VI, Roy S, et al. The embryonic transcription factor Hlx9 is a menin interacting partner that controls pancreatic β -cell proliferation and the expression of insulin regulators. *Endocr Relat Cancer* 2013; **20**: 111–122.
40. Yu X, Wang Y, Jiang M, et al. Activation of beta-Catenin in mouse prostate causes HGPIN and continuous prostate growth after castration. *Prostate* 2009; **69**: 249–262.
41. Chiaverotti T, Couto SS, Donjacour A, et al. Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer. *Am J Pathol* 2008; **172**: 236–246.
42. Khoor A, Stahlman MT, Johnson JM, et al. Forkhead box A2 transcription factor is expressed in all types of neuroendocrine lung tumors. *Hum Pathol* 2004; **35**: 560–564.
43. Halmos B, Basseres DS, Monti S, et al. A transcriptional profiling study of CCAAT/enhancer binding protein targets identifies hepatocyte nuclear factor 3 beta as a novel tumor suppressor in lung cancer. *Cancer Res* 2004; **64**: 4137–4147.
44. Agarwal SK, Novotny EA, Crabtree JS, et al. Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 10770–10775.

SUPPLEMENTARY MATERIAL ONLINE

Supplementary materials and methods

Supplementary figure legends

Figure S1. Foxa2 expression in tumours developed in *Gcgr* KO mice

Figure S2. Gel analysis of GST, GST-menin, and human His-tagged Foxa2

Figure S3. A representative Coomassie Blue stained gel demonstrating that the same amount of GST and GST-full length or GST-truncated menin proteins was used for PD assays in Figure 4E

Figure S4. Foxa2 transcript detection and menin protein analysis

Figure S5. Details of the *Pdx1-Luc* construct

Table S1. Primers used for the cloning of the mouse *Foxa2* promoter

Table S2. Primers used for RT-qPCR

Table S3. Primers used for ChIP assays

Islet Cells Serve as Cells of Origin of Pancreatic Gastrin-Positive Endocrine Tumors

Rémy Bonnavion,^{a,b,c*} Romain Teinturier,^{a,b,c} Rami Jaafar,^{a,b,c*} Doriane Ripoché,^{a,b,c} Emmanuelle Leteurtre,^{d,e} Yuan-Jia Chen,^f Jens F. Rehfeld,^g Florian Lepinasse,^h Valérie Hervieu,^{a,b,c,h} François Pattou,^{e,i} Marie-Christine Vantyghem,^{e,j} Jean-Yves Scoazec,^{a,b,c,h} Philippe Bertolino,^{a,b,c} Chang Xian Zhang^{a,b,c,k}

INSERM U1052, Lyon, France^a; CNRS UMR5286, Lyon, France^b; Université de Lyon, Lyon, France^c; Institut de Pathologie, CHRU de Lille, Lille, France^d; Université Lille 2, INSERM UMR 859, Lille, France^e; Department of Gastroenterology, Peking Union Medical College Hospital, Beijing, China^f; Department of Clinical Biochemistry, Rigshospitalet, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark^g; Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Service d'Anatomie Pathologique, Lyon, France^h; CHRU Lille, Endocrine Surgery, Lille, Franceⁱ; CHRU Lille, Endocrinology, Lille, France^j; Sino-French Life Science and Genomic Center, Ruijin Hospital, Shanghai, China^k

The cells of origin of pancreatic gastrinomas remain an enigma, since no gastrin-expressing cells are found in the normal adult pancreas. It was proposed that the cellular origin of pancreatic gastrinomas may come from either the pancreatic cells themselves or gastrin-expressing cells which have migrated from the duodenum. In the current study, we further characterized previously described transient pancreatic gastrin-expressing cells using cell lineage tracing in a pan-pancreatic progenitor and a pancreatic endocrine progenitor model. We provide evidence showing that pancreatic gastrin-expressing cells, found from embryonic day 12.5 until postnatal day 7, are derived from pancreatic *Ptfla*⁺ and neurogenin 3-expressing (*Ngn3*⁺) progenitors. Importantly, the majority of them coexpress glucagon, with 4% coexpressing insulin, indicating that they are a temporary subpopulation of both alpha and beta cells. Interestingly, *Men1* disruption in both *Ngn3* progenitors and beta and alpha cells resulted in the development of pancreatic gastrin-expressing tumors, suggesting that the latter developed from islet cells. Finally, we detected gastrin expression using three human cohorts with pancreatic endocrine tumors (pNETs) that have not been diagnosed as gastrinomas (in 9/34 pNETs from 6/14 patients with multiple endocrine neoplasia type 1, in 5/35 sporadic nonfunctioning pNETs, and in 2/20 sporadic insulinomas), consistent with observations made in mouse models. Our work provides insight into the histogenesis of pancreatic gastrin-expressing tumors.

Gastrinomas are endocrine tumors which secrete the peptide hormone gastrin. They cause Zollinger-Ellison syndrome (ZES), characterized by multiple duodenal-jejunal ulcers, diarrhea, and gastroesophageal reflux (1). Most gastrin-producing cells are found in the adult gastric antrum and, to a lesser extent, in the proximal duodenum in mammals. Intriguingly, most primary gastrinomas are found in the duodenum. The rest are mainly in the pancreas and are only rarely found in the stomach and elsewhere (liver, lung, and ovaries) (2). Gastrinomas develop either sporadically or hereditarily, as seen in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1; disease identifier OMIM131100). MEN1 patients develop multiple tumors in endocrine organs, primarily affecting parathyroid glands, the pituitary, the pancreas, and the foregut. Gastrinomas are the most common functioning tumors of the gastroenteropancreatic axis in MEN1 patients (3, 4), displaying multiple small lesions in the duodenum and, in rare cases, in the pancreas. Sporadic gastrinomas are often solitary tumors occurring both in the duodenum and in the pancreas, and the etiology is poorly understood. Interestingly, somatic *MEN1* mutations and a loss of heterozygosity at the *MEN1* locus have been detected in approximately 30% of both sporadic duodenal and pancreatic gastrinomas (5, 6). In addition, we have previously reported gastrin-expressing pancreatic tumors in about 15% of heterozygous *Men1* mutant mice (7), confirming that *MEN1* inactivation plays a crucial role in the pathogenesis of gastrinomas.

Deciphering the cells of origin of tumors is important not only for improved understanding of tumor biology but also for personalized tumor treatment with targeted therapy (8). Determining the cells of origin of pancreatic gastrinomas is of special interest, since gastrin-expressing cells are not found in the normal adult

human or rodent pancreas. Several studies have described gastrin expression in developing and neonatal mammal pancreases, which decreases rapidly after birth (9–13). Analyses of extracts from a neonatal rodent pancreas established that gastrin was fully processed and active in the pancreas at this stage (10). Consistently, using transgenic mice harboring the green fluorescent protein (GFP) gene under the control of the mouse gastrin promoter, Takaishi and colleagues demonstrated that GFP expression could be targeted to pancreatic cells in embryonic and neonatal pancreases until 2 days after birth (14). Passaro et al. postulated that stem cells formed in ventral pancreatic buds could be the cell of origin of pancreatic gastrinomas found in the gastrinoma triangle, based

Received 19 March 2015 Returned for modification 29 April 2015

Accepted 23 June 2015

Accepted manuscript posted online 13 July 2015

Citation Bonnavion R, Teinturier R, Jaafar R, Ripoché D, Leteurtre E, Chen Y-J, Rehfeld JF, Lepinasse F, Hervieu V, Pattou F, Vantyghem M-C, Scoazec J-Y, Bertolino P, Zhang CX. 2015. Islet cells serve as cells of origin of pancreatic gastrin-positive endocrine tumors. *Mol Cell Biol* 35:3274–3283. doi:10.1128/MCB.00302-15.

Address correspondence to Chang Xian Zhang, chang.zhang@lyon.unicancer.fr.

* Present address: Rémy Bonnavion, Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany; Rami Jaafar, UCSF School of Medicine, Diabetes Center, San Francisco, California, USA.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00302-15>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/MCB.00302-15

on the clinical features of the tumors (15). Indeed, pancreatic endocrine cells derive from the differentiation of neurogenin 3-expressing (Ngn3^+) progenitors, while gastric and duodenal gastrin-expressing cells are also derived from endocrine progenitors expressing Ngn3 in the corresponding tissue (16). This suggests that pancreatic gastrin-expressing cells may also arise from Ngn3^+ pancreatic endocrine progenitors. Recently, Suissa et al. (17), using different mouse models and cell lineage tracing, reported the existence of embryonic and perinatal gastrin-expressing cell populations in the pancreas and ascertained that they were a distinct cell lineage derived from pancreatic Ngn3^+ progenitors. However, their role in pancreatic gastrinoma development has not been addressed.

It is worth mentioning that several previous attempts to generate mouse gastrinoma models were unsuccessful. Neither the use of a gastrin promoter-driven simian virus 40 (SV40) large T antigen (18) nor *Men1* disruption in villin-expressing gastrointestinal cells gave rise to gastrinoma development in the mouse (19). Altogether, the observations described above prompted us to better study gastrin-expressing cells in the pancreas and search for alternative ways to determine the cellular origin of pancreatic gastrinomas.

MATERIALS AND METHODS

Human patient samples. The study was conducted in accordance with the guidelines in the Declaration of Helsinki, and the use of all patient tissue specimens was carried out according to French laws and regulations.

Animal study approval. All animal maintenance and experiments were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee (protocol CLB 2010/016).

Mouse studies. *Ngn3^{TA}* knock-in mice were generously provided by Jan N. Jensen (20). The tetO-cre mouse line [B6.Cg-Tg(tetO-cre)1Jaw/J MGI: 2679524] was purchased from Charles River France. The *Men1^{lox/lox}-RIP-Cre⁺* (β *Men1* knockout [KO]) (21), *Men1^{lox/lox}-Glu-Cre⁺* (α *Men1* KO) (22), and *R26^{eYFP}* mouse lines have already been described (23). *Ptf1a-Cre* knock-in mice (24) were generously provided by Christopher V. E. Wright.

IHC and IF. Neonate and adult pancreases were fixed in neutral buffered formalin (Lilly's fixative) for 2 h at room temperature and for 18 h at 4°C, respectively, and then embedded in paraffin. Serial sections of 3 μm were prepared, mounted on Superfrost Plus glass slides, and subjected to deparaffinization and rehydration. Immunostainings were performed as previously described (25). Briefly, endogenous peroxidases were quenched in 3% H_2O_2 solution for 30 min at room temperature. Heat-induced epitope retrieval was performed by immersion in antigen-unmasking solution (catalog no. H-3300; Vector Laboratories) in a microwave oven for 15 min. After blocking with antibody diluent (Dako), sections were incubated overnight with a primary antibody. For immunofluorescence (IF), stainings were revealed with a Cy3 or Cy5 tyramide amplification kit (PerkinElmer), according to the manufacturer's instructions, with prior incubation with the appropriate biotinylated secondary antibody or incubation with appropriate Alexa Fluor 488-, 555-, or 647-coupled secondary antibodies (Life Technologies) for 1 h. For immunohistochemistry (IHC), after incubation with the primary antibody, biotinylated secondary antibody was applied for 1 h and revealed using the avidin-biotin complex (ABC)-3,3'-diaminobenzidine system (Vector Laboratories). Images were captured on either a Leica DRMB epifluorescence microscope (Leica Microsystems), a TCS-SP5 confocal microscope (Leica Microsystems), or a Zeiss 780 confocal microscope. Cell counting was manually performed on multiple-channel pictures with the ImageJ cell counter module (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD).

The data on the graphs and the results of counting are represented as means \pm standard errors of the means.

Antibodies. Antigastrin antibody (Novocastra; Leica Biosystems) recognizing nonsulfated (I) and sulfated (II) gastrin 17 as well as gastrin 34, antigastrin antibody (serum 2717; Jens F. Rehfeld), antigastrin antibody (catalog no. sc-7783; Santa Cruz) recognizing gastrins 17, 34, and 71, antiprogastrin antibody (rabbit polyclonal antibody; a kind gift from Julie Pannequin), and anti-Pax4 antibody (a kind gift from Beatriz Sosa-Pineda [26]) were used in the study (see Table S1 in the supplemental material for a detailed description of all antibodies used in the study). Donkey secondary antibodies coupled with either Alexa Fluor 488, 555, or 647 were used (Life Technologies, Jackson ImmunoResearch). For IHC or immunofluorescence with tyramide signal amplification, biotinylated secondary antibodies from horse or donkey were used (Vector Laboratories). Negative controls were conducted by omitting primary antibody incubation. For the gastrin antibody from Santa Cruz, controls were conducted by incubating the antibody with the corresponding peptide (catalog no. sc-7783 P; Santa Cruz).

Serum gastrin measurement. The concentration of gastrin in serum from mice was measured with a highly sensitive gastrin radioimmunoassay (RIA) (27). Due to the small serum volume ($<50 \mu\text{l}$), conventional gastrin RIAs could not be used. The supersensitive RIA (based on antibody no. 921325 from the J. F. Rehfeld laboratory) has a detection limit of 1.0 pmol of gastrin per 15 μl of sample in the incubation mixture, and the cross-reactivity with cholecystokinin (CCK) is minor ($<10\%$), with an intra-assay coefficient variation of 8%. Note that CCK circulates at a 10-fold lower concentration than gastrin.

PCRs. Mouse islets were purified using the standard collagenase P protocol (Roche). Total RNA was isolated from adult C57BL/6J mouse tissues (Charles River) using an RNeasy minikit (Qiagen). Standard reverse transcription-PCRs were performed (annealing temperature, 60°C; 40 cycles) using the following primers: for *gastrin*, forward (Fw) primer 5'-AACAGCGCCAGTTCAACAAG-3' and reverse (Rv) primer 5'-AAGTCCATCCATCCGTAGGC-3', for *cholecystokinin*, Fw primer 5'-TGCTAGCGGATACATCCAG-3' and Rv primer 5'-ATCCATCCAGCCCATGTAGTC-3', for *GIP*, Fw primer 5'-TTTCCCTGAGATTGCCCTGC-3' and Rv primer 5'-CGCAGAGGGGACTTTCATCA-3', for *insulin 2*, Fw primer 5'-GCAGCACCTTTGTGGTTCCC-3' and Rv primer 5'-TGCAGTAGTTCTCCAGCTGG-3', and for the TATA box binding protein (Tbp) gene, Fw primer 5'-CCCTATCACTCCTGCCACACC-3' and Rv primer 5'-CGAAGTGCAATGGTCTTTAGGTC-3'.

RESULTS

Pancreatic gastrin⁺ cells represent transient subpopulations of alpha and beta cells at birth. We first tried to better characterize the population of mouse neonatal pancreatic gastrin-expressing (NPG) cells. To achieve that aim, we used different gastrin antibodies that recognize different forms of processed gastrin peptides. The *gastrin* transcript encodes the progastrin immature peptide that is processed by cleavage and other posttranslational modifications, giving rise to different mature peptides (gastrin 34 and gastrin 17) and immature gastrin peptides (gastrin 71) (28). Thus, the presence of the different gastrin peptides is highly dependent on the expression and activity of the key enzymes necessary for its processing. We used the Novocastra antigastrin antibody widely used by pathologists for the diagnosis of gastrinomas. Both this antibody and the homemade serum 2717 recognize gastrins 17 and 34. The SCBT antibody recognizes gastrins 17 and 34, as well as the gastrin 71 precursor. Immunofluorescence (IF) analyses with Novocastra antigastrin antibody demonstrated that scattered cells with positive cytoplasmic staining could be detected in the pancreas of mouse neonates (Fig. 1A). We quantified the proportion of these NPG cells relative to the total endocrine cell population at birth by performing double IF staining for gastrin and

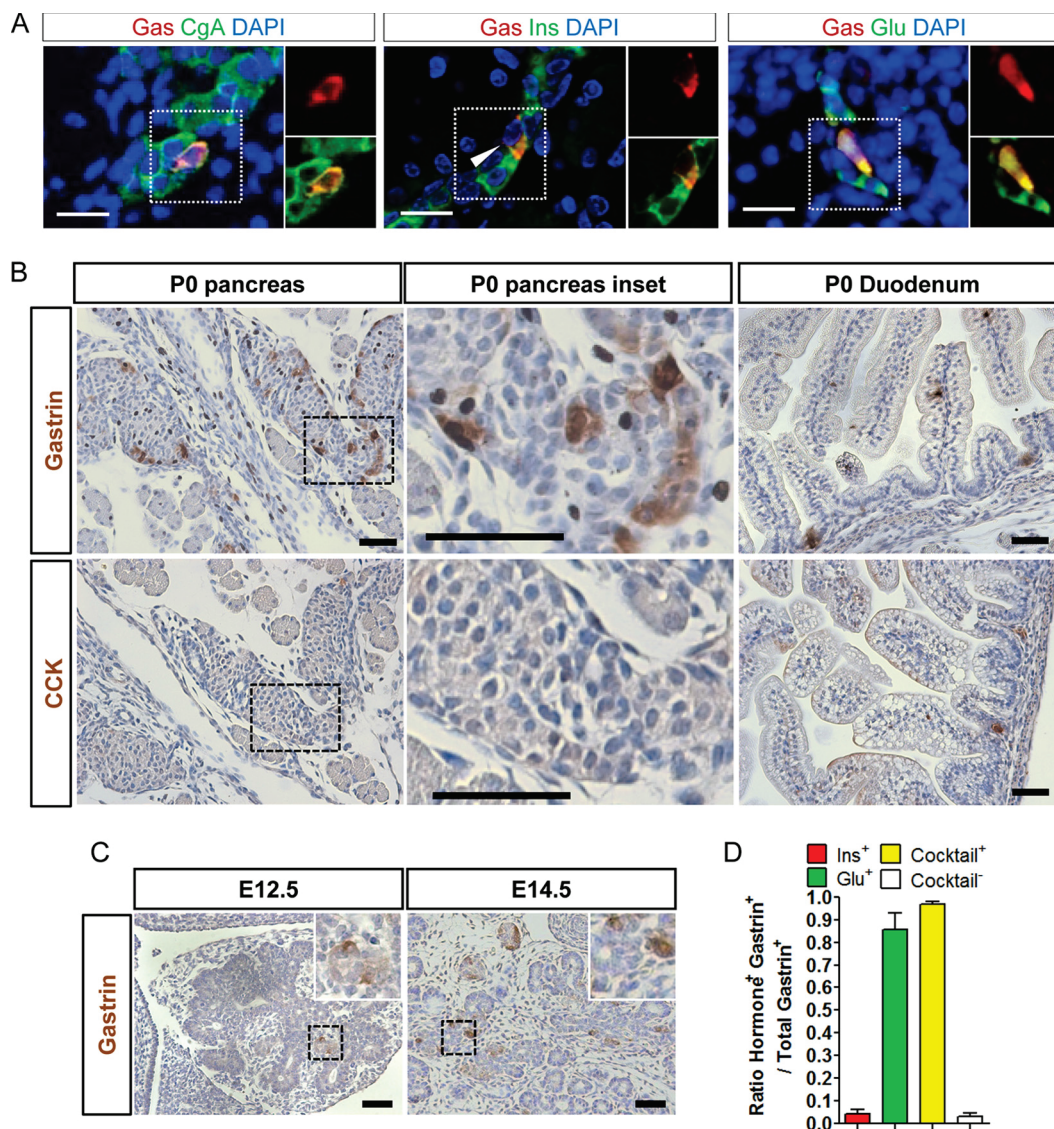


FIG 1 Neonatal gastrin-expressing cells represent subsets of alpha and beta cells. (A) IF colocalization of gastrin and chromogranin A, insulin, or glucagon in the pancreases of newborn wild-type mice ($3 \leq n \leq 6$ mice). Magnified views of the area with the dotted outline are shown on the right. Bars = 20 μm . (B) Representative IHC stainings for gastrin and CCK in wild-type mouse pancreas and duodenum at birth. Magnified views of the area with the dashed outline are shown in the middle panel. Bars = 50 μm . (C) Representative IHC staining for gastrin in wild-type mouse pancreas at E12.5 and E14.5 ($n = 3$ mice of each age). (Insets) Magnified views of the area with the dashed outline. Bars = 50 μm . (D) Percentage of gastrin-expressing cells ($3 \leq n \leq 7$ mice) expressing glucagon, insulin, or any of the pancreatic hormones (Cocktail) (see Results) at birth in wild-type mouse pancreas. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; Gas, gastrin; Ins, insulin; Glu, glucagon.

chromogranin A, a marker of endocrine cells (Fig. 1A). The NPG cell population represented $4.3\% \pm 0.1\%$ of the total endocrine cell number at postnatal day 0 (P0) but became undetectable at P7 (data not shown), consistent with previous results reported in the literature (17, 29). We noticed that in the normal adult mouse pancreas, weak expression of both gastrin and progastrin was detected in alpha cells with one of the antigastrin antibodies used in this study (SCBT) (see Fig. S1A in the supplemental material) and antiprogastrin antibody (from Julie Pannequin) (see Fig. S1B in the supplemental material), with both antibodies giving rise to positively stained cells in the antrum and proximal duodenum (data not shown). Moreover, the *gastrin* transcript but not the *cholecystokinin* transcript was also detected in RNA isolated from

adult mouse pancreas (see Fig. S1C in the supplemental material). The data support the existence of either residual gastrin expression or a differently processed gastrin peptide, possibly gastrin 71, in adult pancreatic alpha cells on the basis of the specificity of the antibody used. The related peptide hormone CCK was not expressed at P0 in the pancreas but was detectable in the duodenum at birth, as was gastrin (Fig. 1B), confirming that there was no cross-reaction with CCK by the antigastrin antibody used in this study. Next, we checked the existence of gastrin-expressing (gastrin⁺) cells in the developing mouse pancreas. Gastrin⁺ cells were readily detected but rarely at embryonic day 12.5 (E12.5), and the population was markedly increased at E14.5 in the developing pancreas of wild-type mice (Fig. 1C).

Furukawa and colleagues previously observed that some gastrin⁺ cells were also positive for insulin staining using the restaining method (12). By double IF staining, we could indeed detect rare cells expressing both gastrin (Novocastra antibody) and insulin (Fig. 1A and D), accounting for $4.4\% \pm 1.8\%$ of total NPG cells, while most NPG cells were negative for insulin. Since we observed that most NPG cells localized to the periphery of developing mouse endocrine islets, where most alpha cells reside, we sought to determine if these NPG cells could express glucagon. Indeed, a very high proportion ($85.5\% \pm 7.3\%$) of NPG cells was also found to express glucagon (Fig. 1A and D). Thus, it appears that NPG cells represent subpopulations of both developing alpha and beta cells. We performed double staining of gastrin with other pancreatic hormones, and we found that somatostatin-expressing cells did not express gastrin at P0 (see Fig. S2 in the supplemental material). In order to identify cells expressing only gastrin and none of the other pancreatic hormones, we performed double staining with gastrin antibody and a cocktail of pancreatic hormones (insulin, glucagon, somatostatin, and ghrelin). A very small proportion ($3.3\% \pm 1.3\%$) of gastrin-expressing cells was indeed negative for the hormonal cocktail (Fig. 1D).

Pancreatic gastrin⁺ cells originate from pancreatic progenitors within the developing pancreas. Considering that all alpha and beta cells are derived from Ngn3⁺ endocrine progenitors, we suspected that NPG cells might also be derived from the differentiation of pancreatic progenitors, as virtually all NPG cells expressed either glucagon or insulin. In order to determine if NPG cells were derived from pancreatic progenitors instead of a result of the migration of gut progenitors or gut differentiated cells, we performed lineage-tracing experiments with *Ptf1a-Cre⁺-R26^{eYFP}* mice, since during development *Ptf1a*-expressing cells give rise only to pancreatic acinar, ductal, and endocrine cells (24) (Fig. 2A). Using double IF staining, $61.3\% \pm 4.1\%$ of the NPG cells were found to also express the yellow fluorescent protein (YFP) reporter in *Ptf1a-Cre⁺-R26^{eYFP}* mice ($n = 3$ mice) (Fig. 2B), confirming our hypothesis. Similar results were obtained when the proportion of alpha and beta cells expressing the YFP reporter was counted, indicating that the Cre used was not 100% efficient in the targeted cell population (data not shown).

We next genetically traced the progeny of Ngn3⁺ pancreatic endocrine progenitors using *Ngn3^{wt/tTA}-tetO-Cre⁺-R26^{eYFP}* mice (Fig. 2A). Consistent with the findings of Suissa et al. (17), YFP expression could be detected in $10.87\% \pm 5.46\%$ of NPG cells from these mice (Fig. 2B), with a similar YFP expression rate being detected in alpha cells from the same mice. We noticed that in wild-type neonatal mouse pancreases, all the gastrin⁺ cells expressed menin protein at the same level observed in other islet cells (Fig. 2C). We then analyzed *Men1^{fllox/fllox}-Ngn3^{wt/tTA}-tetO-Cre⁺-R26^{eYFP}* mice, where the *Men1* gene can be disrupted in Ngn3-expressing cells and which are referred to as *PancEndoMen1* KO mice. Menin expression was lost in about 20% (specifically, $20.2\% \pm 4.7\%$) of NPG cells from *PancEndoMen1* KO mice (Fig. 2C), further confirming the above-presented cell-tracing data obtained using YFP. Our results indicate that NPG cells are derived from the pan-pancreatic (*Ptf1a⁺*) and pancreatic endocrine (*Ngn3⁺*) progenitors. Taking these results together, we define, for the first time, NPG cells to be temporal subpopulations of either glucagon-expressing or insulin-expressing cells, with pancreatic progenitors being their common cell of origin.

Perinatal pancreatic gastrin-expressing cells display a distinct molecular signature. To study the relation between NPG cells and duodenal G cells, we compared the protein expression profiles of several factors known to be expressed in these cells. Analyses of the transcription factors expressed by NPG cells showed that they displayed high levels of MafB expression, and some also expressed low levels of Pdx1 at P0, whereas they did not express MafA, Pax4, Cdx2, or Ngn3 (Fig. 3A). Interestingly, at P0 duodenal G cells displayed an MafB⁻, Pdx1^{high/low}, MafA⁻, Pax4⁺, Cdx2^{-/low} expression profile (Fig. 3B), showing that they are a cell population distinct from NPG cells.

Mouse pancreatic gastrin-expressing tumors develop upon Men1 disruption in both Ngn3⁺ pancreatic progenitors and insulin- or glucagon-expressing cells. Having identified that NPG cells were derived from pancreatic progenitors, we hypothesized that the pancreatic progenitors and their derivatives, including NPG cells, could be among the cells of origin of pancreatic gastrinomas. To test this hypothesis, we examined aged mice with *Men1* disruption in Ngn3⁺ progenitors. Histological analyses of pancreases dissected from aged *PancEndoMen1* KO mice showed that 12-month-old mutant mice displayed a large amount of endocrine lesions. Tumor lesions exhibited a complete loss of menin expression, as expected (Fig. 4A), due to Ngn3-Cre-mediated gene disruption in pancreatic endocrine progenitors, with most of them being positive for insulin staining by IHC (the detailed data concerning the analysis of other islet tumors will be published elsewhere). Interestingly, by using gastrin antibody, several tumors were positively stained (Fig. 4A), whereas other adjacent islet tumors were not, and CCK was not detected with two different antibodies in these gastrin-immunoreactive tumor cells (data not shown). The frequency of gastrin⁺ lesions in the *PancEndoMen1* KO mouse model is reported in Table 1.

Unexpectedly, we found that gastrin⁺ tumors also expressed insulin (insulin⁺) with a much lower intensity than other insulin⁺ tumors negative for gastrin and other hormones (Fig. 4A; see also Fig. S3A in the supplemental material). Similar results were obtained when we studied the occurrence of gastrin⁺ lesions in *PancMen1* KO (*Men1^{fllox/fllox}-Ptf1a-Cre⁺*) mice, but a higher proportion of analyzed mice (8/9) displayed pancreatic gastrin⁺ tumors (Fig. 4B and Table 1). The higher percentage of gastrin⁺ lesions in the latter mice than in the *PancEndoMen1* KO mice most likely resulted from the better Cre efficiency in *PancMen1* KO mice, since we observed 3-fold more pancreatic endocrine cells expressing the reporter at birth in *Ptf1a-Cre⁺-R26^{eYFP}* mice than *Ngn3^{wt/tTA}-tetO-Cre⁺-R26^{eYFP}* mice (data not shown). Since NPG cells coexpress insulin or glucagon at birth, we next sought to determine whether perinatal *Men1* disruption specifically in insulin⁺ or glucagon⁺ cells led to gastrin⁺ tumor development. Careful analysis of menin-deficient lesions from *Men1^{fllox/fllox}-Rip-Cre* (β *Men1* KO) mice at 12 months of age revealed the occurrence of gastrin⁺ lesions (Fig. 4B). The cells expressing gastrin in tumors also expressed insulin but not glucagon, as demonstrated by triple IF staining (Fig. 4C; see also Fig. S3A in the supplemental material). Three out of four analyzed β *Men1* KO mice developed at least one gastrin⁺ tumor, with a total of 5 lesions out of 106 lesions analyzed being gastrin⁺ (Table 1). Molecular characterization of gastrin⁺ tumors from *PancEndoMen1* and β *Men1* KO mice demonstrated that gastrin-expressing tumors were Pdx1⁺, consistent with a gastrin⁺ beta cell origin of these tumors (Fig. 4D). Nevertheless, Ki67 analyses did not

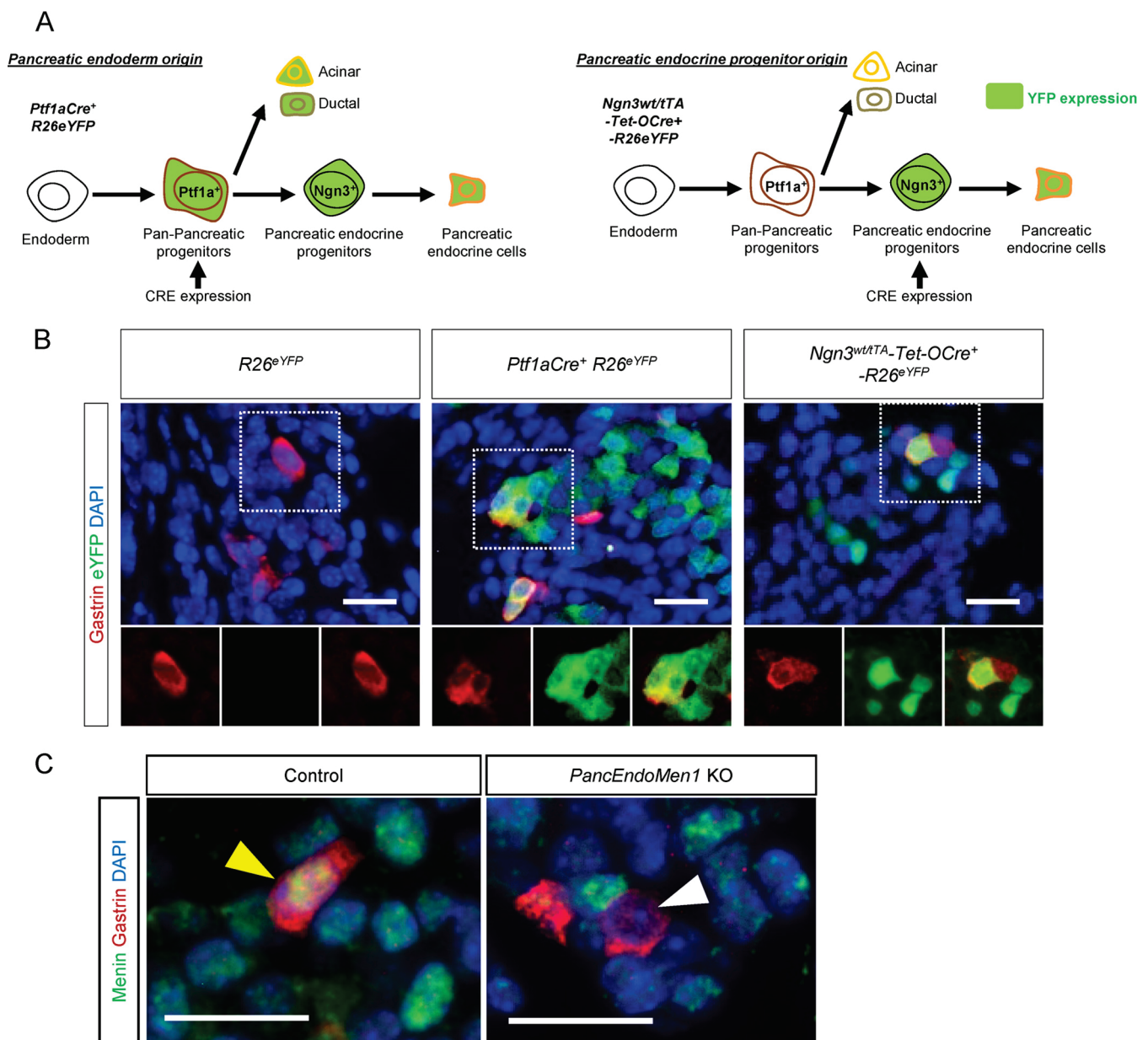


FIG 2 Pancreatic progenitor tracing and *Men1* disruption in pancreatic progenitors define the derivation of NPG cells. (A) Schematic illustration of the two mouse models used for lineage tracing of pancreatic progenitors and pancreatic endocrine progenitors, respectively. (B) Representative IF staining for gastrin and enhanced YFP (eYFP) in the neonatal pancreases of control *R26^{eYFP}* mice, *Ptf1a-Cre⁺ -Rosa26^{eYFP}* mice, and *Ngn3^{wT/TA}-tetO-Cre⁺ -R26^{eYFP}* mice. Gastrin-expressing cells express the genetic tracer enhanced YFP. (C) IF staining for menin and gastrin in the neonatal pancreases of *PancEndoMen1* KO mice. Bars = 20 μ m.

reveal any difference in proliferation from that of other insulin-expressing tumors (see Fig. S3B in the supplemental material). In parallel, the same analyses were also carried out in the mutant mice where the *Men1* gene was specifically disrupted in glucagon⁺ cells (α *Men1*). All the glucagon-expressing lesions in 12- to 18-month-old α *Men1* KO mice were positive for gastrin detection with the antigastrin antibody (SCBT) but negative for progastrin detection with a progastrin antibody (homemade). When using other gastrin antibodies, we observed an occurrence of gastrin⁺ lesions similar to that found in β *Men1* KO mice (Table 1). To homogenize the data, only those lesions revealed to be positive by

the gastrin antibody used in the clinic (Novocastra) were considered gastrin⁺ and are included in Table 1. We additionally measured the concentration of gastrin in the serum of 12-month-old *PancEndoMen1* and β *Men1* KO mice. We did not detect significantly elevated serum gastrin levels in mice presenting with pancreatic gastrin⁺ tumors, possibly reflecting the nonfunctionality of these lesions (see Fig. S3C and D in the supplemental material).

Gastrin-expressing cells can be seen in a substantial number of human islet tumors that were not diagnosed as gastrinomas. The observations presented above prompted us to examine how frequently gastrin coexpression was found in human islet tumor

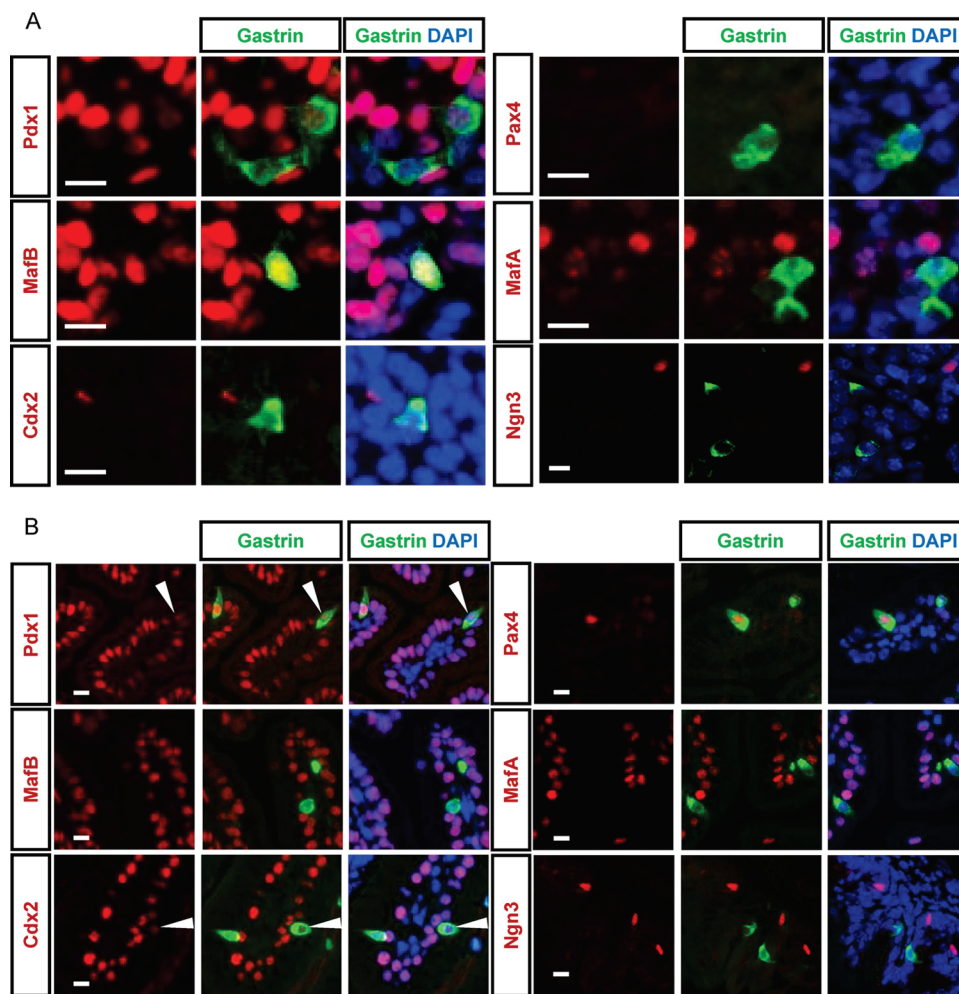


FIG 3 Differential molecular expression profiles between perinatal pancreatic gastrin⁺ and perinatal duodenal gastrin⁺ cells. (A and B) Double IF immunostaining with antibodies against gastrin and the indicated transcription factors in the pancreases (A) and duodenum (B) of newborn wild-type mice. Bars = 10 μ m.

lesions that were not previously diagnosed as gastrinomas. To this end, we performed gastrin detection by IHC using gastrin antibody (Novocastra) in a panel of 34 pancreatic endocrine tumors (pNETs) from 14 MEN1 patients, 35 sporadic nonfunctioning pNETs and another panel of 20 sporadic insulinomas. As shown in Fig. 5A and B, gastrin expression was detected in 9/34 MEN1 pNETs tested (from 6/14 MEN1 patients), in 5/35 sporadic nonfunctioning pNETs, and in 2/20 cases of sporadic insulinomas. Among the five sporadic nonfunctioning pNETs expressing gastrin, two displayed additional insulin and glucagon expression. Among 34 MEN1 pNETs, only 2 tumors were positive for insulin, and both were negative for gastrin. The remaining MEN1 pNETs were glucagon and/or pancreatic polypeptide (PP) positive. Double staining further demonstrated that gastrin⁺ cells in the MEN1 pNETs tested also coexpressed glucagon or PP (Fig. 5C), while in the two gastrin-positive sporadic insulinomas, gastrin⁺ cells were negative for glucagon but frequently coexpressed insulin (Fig. 5C).

DISCUSSION

By better defining the pancreatic gastrin-expressing cells, the current work revealed some new features of perinatal pancreatic gas-

trin⁺ cells. Our data extend the origin of NPG cells further to pancreatic Ptf1a⁺ progenitors. We report that about 60% of NPG cells expressed the YFP reporter, as determined by lineage tracing. The 40% of gastrin⁺ cells negative for the reporter could be the result of low Cre-mediated recombination efficiency. Importantly, the presence of only a few gastrin⁺ cells not coexpressing other islet hormones at the perinatal stage, the period, unfortunately, omitted in the work of Suissa et al. (17), adds important information for the definition of NGP cells. The low number of monohormonal gastrin⁺ cells at birth detected in our study suggests that, at birth, the monohormonal population initially described by Suissa et al. (17) either undergoes cell death or further differentiates into double-positive cells: glucagon-expressing gastrin⁺ cells or insulin-expressing gastrin⁺ cells. Assays with a future generation of inducible gastrin⁺ cell-specific Cre driver mouse lines combined with lineage tracing will certainly provide information on which of these possibilities occurs. Our data also provide evidence suggesting that adult alpha cells may still express some residual level of gastrin, since adult alpha cells are weakly, yet consistently, positive for both gastrin antibodies (SCBT) and progastrin antibodies, and that the *gastrin* tran-

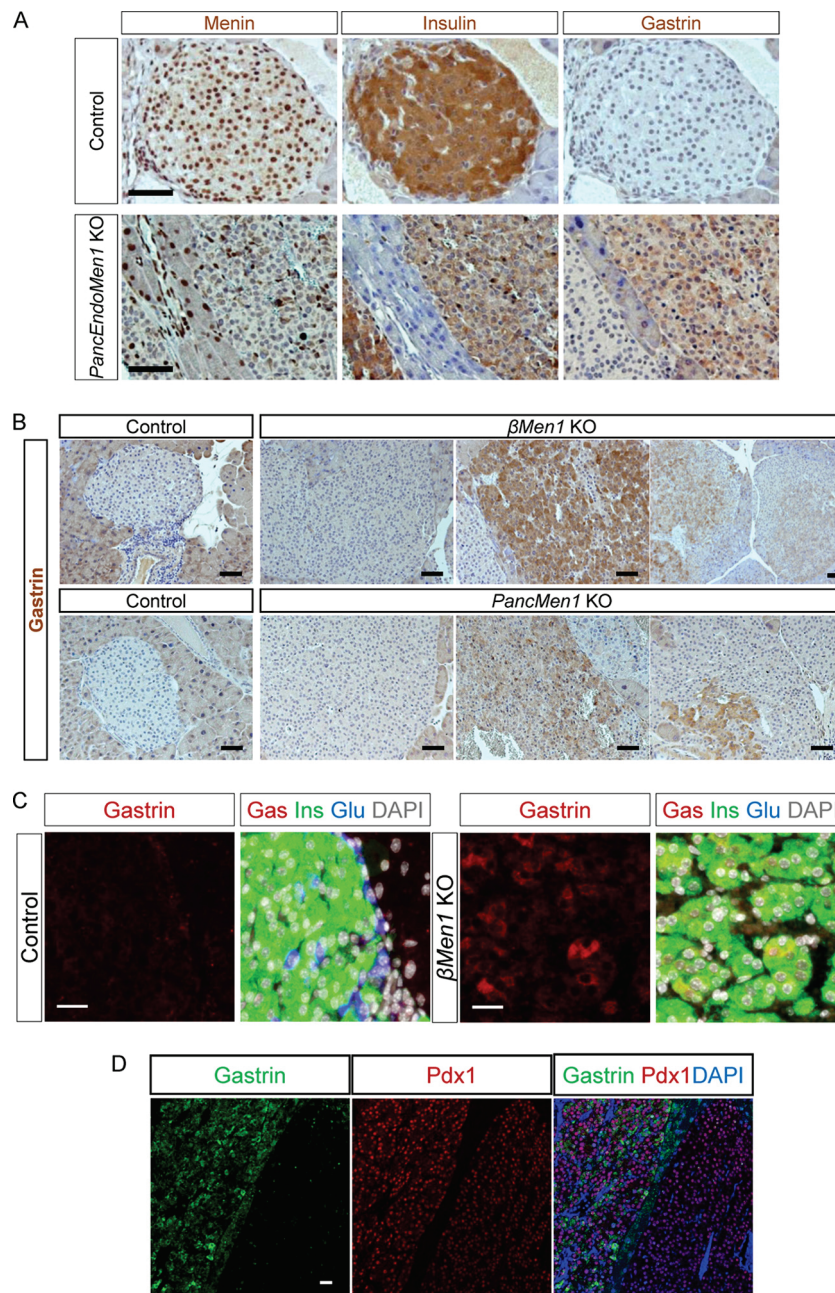


FIG 4 *PancEndoMen1* KO mice, *PancMen1* KO mice, and β *Men1* KO mice develop tumors expressing gastrin. (A) IHC stainings for the indicated factors in 12-month-old control and *PancEndoMen1* KO mice. Note that the tumor located on the right expressed gastrin, whereas the tumor on the left did not. Bars = 50 μ m. (B) IHC detection of gastrin in 12-month-old control and β *Men1* KO or *PancMen1* KO mice. Gastrin is not expressed in normal islet cells of control mice. Most lesions in mutant mice do not express gastrin (left), whereas subsets of tumors express gastrin at high levels (middle) or at low levels or focally (right). Bars = 50 μ m. (C) Triple IF stainings for insulin, glucagon, and gastrin in 12-month-old control and β *Men1* KO mice. Gastrin-expressing cells in tumors from β *Men1* KO mice also expressed insulin. Bars = 20 μ m. (D) Representative IF staining for Pdx1, gastrin, and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). The lesion on the right did not express gastrin but expressed Pdx1, whereas the lesion on the left expressed both gastrin and Pdx1. Bar = 25 μ m.

script can be detected in the adult pancreas. However, the fact that only one of the three gastrin antibodies used in this study detected gastrin suggests that the gastrin detected in adult alpha cells may represent an immature processed peptide form of gastrin (gastrin 71). Considering the existence of the numerous gastrin peptides reported in the literature (28) and the incomplete information about gastrin antibodies, more specific tools

and approaches will be needed to completely clarify the issue. This is of great interest, as several groups have recently reported on the biological activities of both progastrin and gastrin intermediates (30). Taking our results together, we defined the NPG cells to be temporal subpopulations of islet cells, with pancreatic progenitors being their common cell origin.

To our knowledge, the attempt to generate a mouse gastri-

TABLE 1 Summary of gastrin-expressing lesions in different models of *Men1* disruption

Model	No. of mice with gastrin lesions/total no. of mice	No. of gastrin ⁺ lesions/total no. of lesions (%)
<i>PancMen1</i> KO	8/9	14/346 (4.0)
<i>PancEndoMen1</i> KO	2/4	2/70 (2.9)
β <i>Men1</i> KO	3/4	5/106 (4.7)
α <i>Men1</i> KO	1/6	1/34 (2.9)

noma model has so far been unsuccessful, hampering the ability to perform detailed experimental analyses. Interestingly, targeting of distinct islet cell lineages, including, in particular, *Ptfla*⁺ and *Ngm3*⁺ pancreatic progenitors and alpha and beta cells, triggered the development of pancreatic gastrin-expressing tumors in all the different mouse *Men1* models. Importantly, our data show that these mouse gastrin-expressing tumors do not exactly mimic human pancreatic gastrinomas, giving rise to hormonal symptoms due to hypergastrinemia, which is rarely seen in MEN1 patients, according to detailed analyses provided by Pipeleers-Marichal et

al. (31). Keeping the clinical definition of human pancreatic gastrinoma in mind, we prefer to describe the lesions found in our mouse models as pancreatic gastrin-expressing tumors. Interestingly, we detected gastrin-expressing lesions in a substantial proportion of patients from three cohorts with human islet tumors not previously diagnosed as gastrinoma: MEN1 islet tumors, sporadic nonfunctioning islet tumors, and insulinomas. Our data provide evidence showing not only that human gastrin-expressing lesions similar to those found in our murine models exist but also that they may be more frequent than may be expected. These gastrin⁺ cells could have been missed at diagnosis because of the lack of clinical symptom and of specific but sensitive antibodies for gastrin detection. Importantly, the gastrin⁺ tumors in our mouse models and in human patients that we have described here may represent prelesions of pancreatic gastrinoma and could clinically awaken, giving rise to gastrinoma. Taken together, the observations made in *Men1*-deficient mouse models, revealing no gastrinoma associated with hypergastrinemia but pancreatic gastrin-expressing tumors, are consistent with the data obtained by analyses of three patient cohorts and are also reminiscent of what has been described by many clinical studies. Also, in the future it

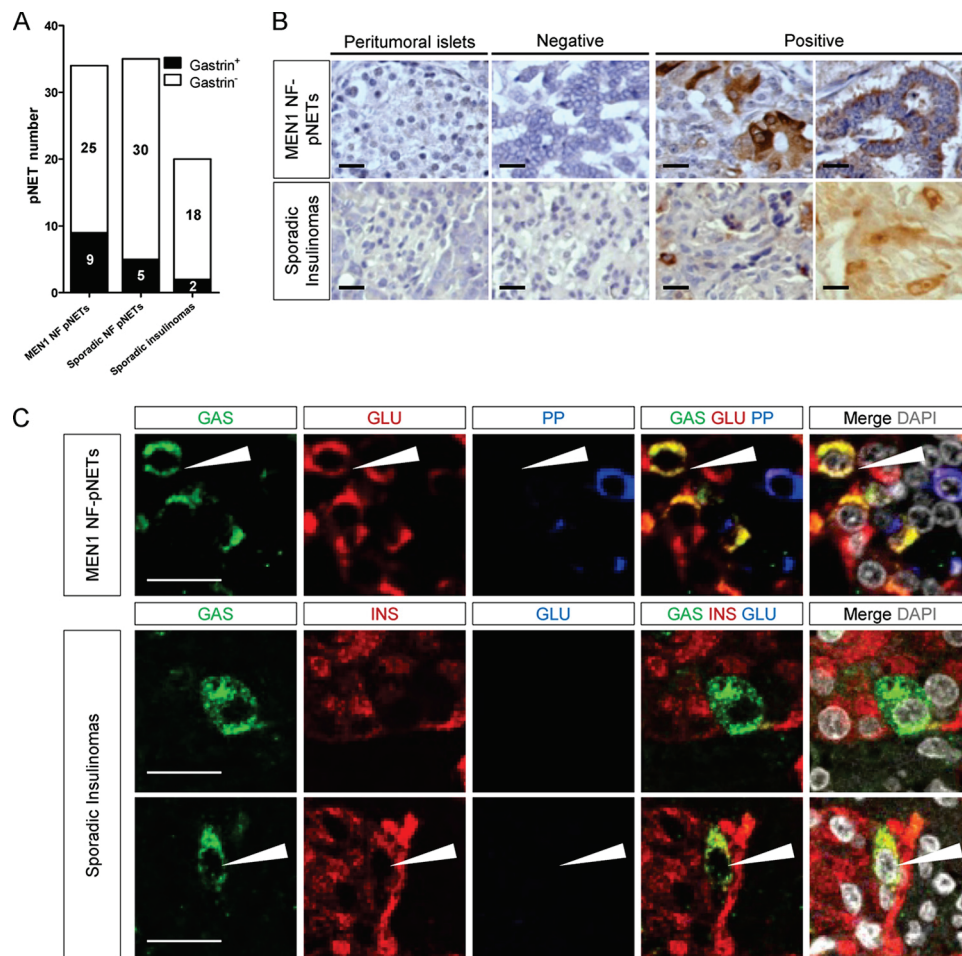


FIG 5 Detection of gastrin-expressing cells in human nongastrinoma pancreatic endocrine tumors. (A) Number of tumors with gastrin expression among the three cohorts with pNETs analyzed. (B) Representative IHC stainings from two cohorts of human pancreatic endocrine tumors (MEN1 or sporadic). (C) IF stainings for the indicated factors in pancreatic endocrine tumors containing gastrin-immunoreactive cells. Arrows, gastrin-expressing cells coexpressing glucagon (top) or insulin (bottom). NF, nonfunctioning. Bars = 20 μ m.

will be interesting and useful to study the similarity and the difference between gastrinomas and pancreatic gastrin⁺ tumors in patients without clinical gastrinoma symptoms.

By direct cell-specific *Men1* ablation, the current work affords, for the first time, strong evidence showing that islet cells themselves, either progenitors or differentiated cells, serve as the cells of origin of pancreatic gastrin-expressing tumors. Our data may also suggest that the above-mentioned NPG cells could also be among the cells of origin of these tumors, considering their ontogeny described in the current study. Remarkably, the frequency of gastrin⁺ tumors found in each of the above-mentioned models resembles the proportion of gastrin-positive cells found during the late embryonic and neonatal period. Interestingly, a similar situation may occur in humans, since Anlauf and colleagues reported that in two tumor banks comprising a total of 300 nonfunctioning pNETs, 3% of pNETs (9/300) stained positive for gastrin (32). However, we consider the possibility that NPG cells are by no means the unique cell of origin of pancreatic gastrinomas. Other possibilities may also be involved in pancreatic gastrinoma development, such as the ectopic expression or reexpression of gastrin by islet tumor cells that may dedifferentiate to the stage of the perinatal transient population coexpressing gastrin-glucagon and gastrin-insulin. The latter possibility can be tested in the future by disrupting the *Men1* gene uniquely in adult islet cells using an inducible *Cre-loxP* system.

Although pancreatic gastrinomas are described in general to be monohormonal tumors, clinical observations often report that they coexpress other islet hormones (33, 34). The data from our analysis of human islet tumors are consistent with those from these previous works. Intriguingly, we noticed that the gastrin⁺ islet lesions observed in our *PancEndoMen1* mutant mice coexpress insulin. This finding may suggest that the gastrin⁺ glucagon-expressing subpopulation could be less sensitive to *Men1* disruption and other tumorigenic stimuli than the gastrin⁺ insulin-expressing subpopulation. The fact that the transgenic mice carrying the SV40 large T antigen under the control of the gastrin promoter gave rise only to insulinomas and not glucagonomas may support such a hypothesis (18). However, this may not be the case in humans, since many gastrin⁺ MEN1 islet tumors expressed glucagon in our study. Due to the rarity of MEN1 islet tumors, the significance of this will need to be further studied in a larger cohort.

In conclusion, the current study provides meaningful insights into both the ontogeny of islet NPG cells and the histogenesis of pancreatic gastrinomas. Our data pave the way for further studies of the molecular mechanisms controlling the development of pancreatic gastrinomas. The mouse gastrin-expressing tumor models generated in the current study, the first of their kind, will also be of help for the conception of new strategies for diagnosis and treatment of the disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the members of the animal facilities ALECS-Co, ALECS-SPF, and ANICAN. We are also grateful to the staff from the CECIL imaging facility and especially Christophe Vanbelle. We are especially grateful to Jan N. Jensen for providing the *Ngn3^{wntTA}* mouse line, Christopher V. E. Wright for providing *Ptf1a-Cre* mice, J. Chayvialle and Colette Roche for anti-CCK antibodies, Beatriz Sosa-Pineda for anti-Pax4 antibodies, and Julie Pannequin for antiprogastin antibodies. We thank Chloe Tessereau,

Philippe Ruszniewski, Gérard Gradwohl, and Xianxin Hua for stimulating discussions.

This study was supported by the Ligue contre le Cancer du Rhône (to C.X.Z.) and de la Loire (to P.B.), the Agence National de Recherche (grant SVSE2 ANR 10 BLAN 1240 04), and the CMIRA program of the Région Rhône-Alpes (12004959-01); R.B. was the recipient of a 4th year doctoral fellowship from the Fondation ARC (DOC20120605135).

R.B. conducted the experiments, analyzed and interpreted the data, and prepared the figures and manuscript; R.T., R.J., and D.R. provided technical and material support and participated in interpretation of the data; E.L., J.-Y.S., F.L., V.H., Y.-J.C., F.P., and M.-C.V. supervised the development of the tissue banks, performed pathological analyses, provided material support, and participated in interpretation of the data; J.F.R. participated in development of the study concept and provided critical revision of the manuscript; P.B. participated in development of the study concept, design, and supervision and provided critical revision of the manuscript; and C.X.Z. conceived of the study, supervised the study and manuscript preparation, and obtained funding.

We have nothing to disclose.

REFERENCES

- Zollinger RM. 1987. Gastrinoma: the Zollinger-Ellison syndrome. *Semin Oncol* 14:247–252.
- Tartaglia A, Vezzadini C, Bianchini S, Vezzadini P. 2005. Gastrinoma of the stomach: a case report. *Int J Gastrointest Cancer* 35:211–216. <http://dx.doi.org/10.1385/IJGC:35:3:211>.
- Halfdanarson TR, Rubin J, Farnell MB, Grant CS, Petersen GM. 2008. Pancreatic endocrine neoplasms: epidemiology and prognosis of pancreatic endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 15:409–427. <http://dx.doi.org/10.1677/ERC-07-0221>.
- Thakker RV. 2014. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4). *Mol Cell Endocrinol* 386:2–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.002>.
- Debelenko LV, Zhuang Z, Emmert-Buck MR, Chandrasekharappa SC, Manickam P, Guru SC, Marx SJ, Skarulis MC, Spiegel AM, Collins FS, Jensen RT, Liotta LA, Lubensky IA. 1997. Allelic deletions on chromosome 11q13 in multiple endocrine neoplasia type 1-associated and sporadic gastrinomas and pancreatic endocrine tumors. *Cancer Res* 57:2238–2243.
- Zhuang Z, Vortmeyer AO, Pack S, Huang S, Pham TA, Wang C, Park WS, Agarwal SK, Debelenko LV, Kester M, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Yu F, Heppner C, Crabtree JS, Skarulis MC, Venzon DJ, Emmert-Buck MR, Spiegel AM, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Burns AL, Marx SJ, Jensen RT, Liotta LA, Lubensky IA. 1997. Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in sporadic gastrinomas and insulinomas. *Cancer Res* 57:4682–4686.
- Bertolino P, Tong WM, Galendo D, Wang ZQ, Zhang CX. 2003. Heterozygous *Men1* mutant mice develop a range of endocrine tumors mimicking multiple endocrine neoplasia type 1. *Mol Endocrinol* 17:1880–1892. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2003-0154>.
- Blanpain C. 2013. Tracing the cellular origin of cancer. *Nat Cell Biol* 15:126–134. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2657>.
- Larsson LI, Rehfeld JF, Sundler F, Hakanson R. 1976. Pancreatic gastrin in foetal and neonatal rats. *Nature* 262:609–610. <http://dx.doi.org/10.1038/262609a0>.
- Bardram L, Hilsted L, Rehfeld JF. 1990. Progastrin expression in mammalian pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:298–302. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.1.298>.
- Brand SJ, Fuller PJ. 1988. Differential gastrin gene expression in rat gastrointestinal tract and pancreas during neonatal development. *J Biol Chem* 263:5341–5347.
- Furukawa M, Magami Y, Azuma T, Inokuchi H, Nakayama D, Moriyasu F, Kawai K, Hattori T. 2001. Proliferation and functional changes of pancreatic gastrin cells in neonatal rat. *Pancreas* 23:421–426. <http://dx.doi.org/10.1097/00006676-200111000-00014>.
- Gittes GK, Rutter WJ, Debas HT. 1993. Initiation of gastrin expression during the development of the mouse pancreas. *Am J Surg* 165:23–25. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9610\(05\)80399-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9610(05)80399-X).
- Takaishi S, Shibata W, Tomita H, Jin G, Yang X, Ericksen R, Dubeykovskaya Z, Asfaha S, Quante M, Betz KS, Shulkes A, Wang TC. 2011. In vivo analysis of mouse gastrin gene regulation in enhanced GFP-BAC

- transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300:G334–G344. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00134.2010>.
15. Passaro E, Jr, Howard TJ, Sawicki MP, Watt PC, Stabile BE. 1998. The origin of sporadic gastrinomas within the gastrinoma triangle: a theory. *Arch Surg* 133:13–16.
 16. Jenny M, Uhl C, Roche C, Duluc I, Guillermin V, Guillemot F, Jensen J, Kedinger M, Gradwohl G. 2002. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J* 21:6338–6347. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdf649>.
 17. Suissa Y, Magenheim J, Stolovich-Rain M, Hija A, Collombat P, Mansouri A, Sussel L, Sosa-Pineda B, McCracken K, Wells JM, Heller RS, Dor Y, Glaser B. 2013. Gastrin: a distinct fate of neurogenin3 positive progenitor cells in the embryonic pancreas. *PLoS One* 8:e70397. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070397>.
 18. Montag AG, Oka T, Baek KH, Choi CS, Jay G, Agarwal K. 1993. Tumors in hepatobiliary tract and pancreatic islet tissues of transgenic mice harboring gastrin simian virus 40 large tumor antigen fusion gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6696–6700. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.14.6696>.
 19. Veniaminova NA, Hayes MM, Varney JM, Merchant JL. 2012. Conditional deletion of *menin* results in antral G cell hyperplasia and hypergastrinemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303:G752–G764. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00109.2012>.
 20. Wang S, Jensen JN, Seymour PA, Hsu W, Dor Y, Sander M, Magnuson MA, Serup P, Gu G. 2009. Sustained *Neurog3* expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9715–9720. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0904247106>.
 21. Bertolino P, Tong WM, Herrera PL, Casse H, Zhang CX, Wang ZQ. 2003. Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (*MEN1*) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer Res* 63:4836–4841.
 22. Lu J, Herrera PL, Carreira C, Bonnavion R, Seigne C, Calender A, Bertolino P, Zhang CX. 2010. Alpha cell-specific *Men1* ablation triggers the transdifferentiation of glucagon-expressing cells and insulinoma development. *Gastroenterology* 138:1954–1965. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.046>.
 23. Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, William CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F. 2001. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the *ROSA26* locus. *BMC Dev Biol* 1:4. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-213X-1-4>.
 24. Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV. 2002. The role of the transcriptional regulator *Ptf1a* in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 32:128–134. <http://dx.doi.org/10.1038/ng959>.
 25. Bonnavion R, Jaafar R, Kerr-Conte J, Assade F, van Stralen E, Leteurtre E, Pouponnot C, Gargani S, Pattou F, Bertolino P, Cordier-Bussat M, Lu J, Zhang CX. 2013. Both *PAX4* and *MAFA* are expressed in a substantial proportion of normal human pancreatic alpha cells and deregulated in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 8:e72194. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072194>.
 26. Wang Q, Elghazi L, Martin S, Martins I, Srinivasan RS, Geng X, Sleeman M, Collombat P, Houghton J, Sosa-Pineda B. 2008. Ghrelin is a novel target of *Pax4* in endocrine progenitors of the pancreas and duodenum. *Dev Dyn* 237:51–61. <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.21379>.
 27. Rehfeld JF, Ericsson P. 2012. Supersensitive gastrin assay using antibodies raised against a cholecystokinin homolog. *Scand J Clin Lab Invest* 72:175–179. <http://dx.doi.org/10.3109/00365513.2011.637130>.
 28. Rehfeld JF. 2006. The endoproteolytic maturation of progastrin and procholecystokinin. *J Mol Med* 84:544–550. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-006-0055-3>.
 29. Shimizu K, Shiratori K, Sakayori N, Kobayashi M, Hayashi N. 1999. Expression of cholecystokinin in the pancreas during development. *Pancreas* 19:98–104. <http://dx.doi.org/10.1097/00006676-199907000-00015>.
 30. Dimaline R, Varro A. 2014. Novel roles of gastrin. *J Physiol* 592:2951–2958. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2014.272435>.
 31. Pipeleers-Marichal M, Somers G, Willems G, Foulis A, Imrie C, Bishop AE, Polak JM, Hacki WH, Stamm B, Heitz PU, Kloppel G. 1990. Gastrinomas in the duodenum of patients with multiple endocrine neoplasia type 1 and the Zollinger-Ellison syndrome. *N Engl J Med* 322:723–727. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199003153221103>.
 32. Anlauf M, Garbrecht N, Henopp T, Schmitt A, Schlenger R, Raffel A, Krausch M, Gimm O, Eisenberger CF, Knoefel WT, Dralle H, Komminoth P, Heitz PU, Perren A, Kloppel G. 2006. Sporadic versus hereditary gastrinomas of the duodenum and pancreas: distinct clinico-pathological and epidemiological features. *World J Gastroenterol* 12:5440–5446.
 33. Kapran Y, Bauersfeld J, Anlauf M, Sipos B, Kloppel G. 2006. Multihormonality and entrapment of islets in pancreatic endocrine tumors. *Virchows Arch* 448:394–398. <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-005-0147-4>.
 34. Larsson LI, Grimelius L, Hakanson R, Rehfeld JF, Stadil F, Holst J, Angervall L, Sundler F. 1975. Mixed endocrine pancreatic tumors producing several peptide hormones. *Am J Pathol* 79:271–284.

ActivinB Is Induced in Insulinoma To Promote Tumor Plasticity through a β -Cell-Induced Dedifferentiation

Doriane Ripoche,^a Jérémie Charbord,^c Ana Hennino,^a Romain Teinturier,^a Rémy Bonnavion,^a Rami Jaafar,^a Delphine Goehrig,^a Martine Cordier-Bussat,^a Olli Ritvos,^b Chang X. Zhang,^a Olov Andersson,^c  Philippe Bertolino^a

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Inserm U1052, CNRS UMR5286, Université Lyon 1, Lyon, France^a; Department of Bacteriology and Immunology, Haartman Institute, University of Helsinki, and HUSLAB, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland^b; Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden^c

Loss of pancreatic β -cell maturity occurs in diabetes and insulinomas. Although both physiological and pathological stresses are known to promote β -cell dedifferentiation, little is known about the molecules involved in this process. Here we demonstrate that activinB, a transforming growth factor β (TGF- β)-related ligand, is upregulated during tumorigenesis and drives the loss of insulin expression and β -cell maturity in a mouse insulinoma model. Our data further identify Pax4 as a previously unknown activinB target and potent contributor to the observed β -cell dedifferentiation. More importantly, using compound mutant mice, we found that deleting activinB expression abolishes tumor β -cell dedifferentiation and, surprisingly, increases survival without significantly affecting tumor growth. Hence, this work reveals an unexpected role for activinB in the loss of β -cell maturity, islet plasticity, and progression of insulinoma through its participation in β -cell dedifferentiation.

Loss of maturity and acquisition of embryonic traits are well-established paradigms that contribute to tumor heterogeneity and metastasis (1, 2). Endocrine tumors that develop from pancreatic islet cells are highly heterogeneous (3). Although poorly differentiated endocrine tumors of the pancreas exist, the cause and contribution of β -cell dedifferentiation in the initiation and progression of those lesions remain undetermined. Loss of insulin expression has been observed in transgenic mouse models of insulinoma, supporting the existence of a mechanism that reverts the differentiated state of mature β cells in β -cell tumors (4, 5). Recently, Landsman et al. demonstrated that elevated Hedgehog/Gli signaling in β cells alters their identity and leads to the development of undifferentiated endocrine pancreatic tumors (6). Therefore, the participation of β -cell dedifferentiation in adult pancreatic pathologies such as islet tumors underscores the need to identify the autocrine factors controlling these mechanisms.

While the characterization of signals that regulate β -cell development and regeneration is the focus of intense work (7), less is known about mechanisms and molecules that control the differentiation state of mature adult β cells under pathological conditions. The phenomenon of β -cell dedifferentiation, characterized by a loss of expression of key β -cell genes, such as those encoding insulin, glucose transporter 2 (Glut2), and transcription factors associated with the cells' mature phenotype, was first reported in mouse and recently confirmed in cultured human islets in the absence of any pathological context (8–10). Further evidence has confirmed that the differentiated state of mature adult β cells is not permanent and is lost in response to signals such as oxidative stress and changes in transcriptional profile (11–13). The contribution of β -cell dedifferentiation to pathological conditions *in vivo* is also supported by recent work suggesting that β -cell dedifferentiation caused by *FoxO1* disruption underlies β -cell failure in type II diabetes (14).

Activins are transforming growth factor β (TGF- β)-related ligands that participate in a wide array of biological processes in development and cancer (15–17). Activins and their receptors control embryonic patterning of foregut-derived organs (18) and

are closely associated with the development of the endocrine pancreas (19). Although activinA and activinB are expressed in pancreatic islets, their presence in β cells is still debated (20–22). Nevertheless, transgenic mouse models have confirmed roles for these ligands in adult islets and in β -cell proliferation (23, 24). Interestingly, activinA decreases the expression of mature β -cell genes, highlighting a possible contribution of activins to β -cell dedifferentiation and islet plasticity (25). In contrast, the effect of activinB in pancreatic islets is less clear. Given that activinA and activinB affect the function of islet β cells and are frequently overexpressed in various tumors (26), we hypothesized that activins could contribute to β -cell tumor plasticity. Using a mouse insulinoma model based on the targeted disruption of the *Men1* gene (5), we found β -cell tumors to overexpress activinB. Further, our work reveals that activinB mediates β -cell dedifferentiation, causing tumor β cells to lose their mature characteristic while keeping an endocrine identity. The role of activinB in β -cell dedifferentiation was further supported by the absence of dedifferentiated β cells and increased survival in tumors lacking activinB expression.

MATERIALS AND METHODS

Mouse strains and procedure. β *Men1* and *Inh β B*-KO mice have been previously described (5, 27). Control (*Men1*^{+/+}), β *Men1*, and *Inh β B*- β *Men1* mice were maintained in a mixed 129sv/C57BL6 background.

Received 9 October 2015 Returned for modification 2 November 2015

Accepted 13 December 2015

Accepted manuscript posted online 28 December 2015

Citation Ripoche D, Charbord J, Hennino A, Teinturier R, Bonnavion R, Jaafar R, Goehrig D, Cordier-Bussat M, Ritvos O, Zhang CX, Andersson O, Bertolino P. 2016. ActivinB is induced in insulinoma to promote tumor plasticity through a β -cell-induced dedifferentiation. *Mol Cell Biol* 36:756–764. doi:10.1128/MCB.00930-15.

Address correspondence to Philippe Bertolino, philippe.bertolino@inserm.fr.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00930-15>.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Glucose measurements were done with 6-hour-fasted mice. All animal experiments were performed in accordance with the guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethical Committee.

Immunohistological analysis. Pancreases, collected from 6-h-fasted mice, were fixed in 4% formalin prior to paraffin embedding. Immunohistochemical staining (IHC) was revealed with diaminobenzidine (DAB) (DAB kit; Vector Laboratories, United Kingdom). Immunofluorescence samples were counterstained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories, United Kingdom). Lists of antibodies are provided in the supplemental material. The β -cell proliferation index was determined by calculating the percentage of Ki67⁺ Ins⁺ double-immunofluorescent cells normalized to Ki67⁺ Ins⁺ cells. For each genotype, 3 or 4 pancreases were used, and a minimum of 1,000 Ins⁺ cells were analyzed per animal.

Tumor and β -cell morphometric analyses. Tumor and β -cell surfaces were evaluated with Histolab software (Alphelys, France) after a visual elimination of artifacts from whole-pancreas scanning acquired on an Eclipse E44 microscope (Nikon, France). Sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) (tumor mass quantification) or for insulin (β -cell mass quantification). Quantifications were performed blind to the genotype on at least 2 randomized sections 30 μ m apart. Briefly, for each section, tumor area surfaces were determined based on scanned H&E staining normalized against total pancreas surfaces. Nonpancreatic tissues such as infiltrates, lymph nodes, and sectioning artifacts were manually excluded after visual inspection of all sections. Areas occupied by all pancreatic insulin-positive (insulin⁺) β cells were subsequently determined on matching serial sections based on insulin immunohistochemical staining. For each section, total insulin⁺ β -cell surfaces were subsequently normalized against total pancreas surfaces as mentioned above.

Cell culture. Min6 and β TC3 cells were cultured as described previously (25). Cells were subjected to 24 h of serum starvation prior to 72 h of stimulation with a subphysiological concentration (i.e., 1 nM) of activinB (PeproTech, USA). When mentioned, 10 nM SB431542 (Sigma, France) was added to the stimulation medium.

Real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR), Western blotting, and ELISA analysis. RNAs were extracted using RNeasy kits (Qiagen, Valencia, CA). Real-time PCR analyses were carried out on a Step-One RT system (Applied Biosystems, France) using SYBR green (Life Technology, France) and results for each sample normalized to *Tpb*. Primer sequences are provided in the supplemental material. Antibodies for Western blots are listed in the supplemental material. Quantification of activinB intraslet production was done with a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (mouse INHbB kit; USCNC, Houston, TX) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed as described in the figure legends; unpaired Student *t* tests were used unless otherwise indicated. All analyses were done using Prism5 software (GraphPad, USA); a *P* value of ≤ 0.05 was considered significant. Results are given as means \pm standard errors of the means (SEM).

RESULTS

Men1 advanced β -cell tumors show a heterogenic loss of insulin expression.

Expression of insulin is a hallmark of mature differentiated β cells. Having previously reported reduced insulin immunoreactivity in insulinomas that develop from *Men1*^{F/F}; *RipCre* mice (*β Men1*) (5), we hypothesized that insulinomas undergo cellular dedifferentiation. Using an immunohistochemical approach to detect insulin, we first confirmed a robust reduction of insulin expression in advanced *β Men1* tumors. Although insulin expression was barely detectable in several tumor cells (termed Ins⁻) within 14-month-old tumors, we found a few β cells scattered within islet structures to maintain a strong insulin immunoreactivity (termed Ins⁺) (Fig. 1A; see Fig. S1 in the supplemental

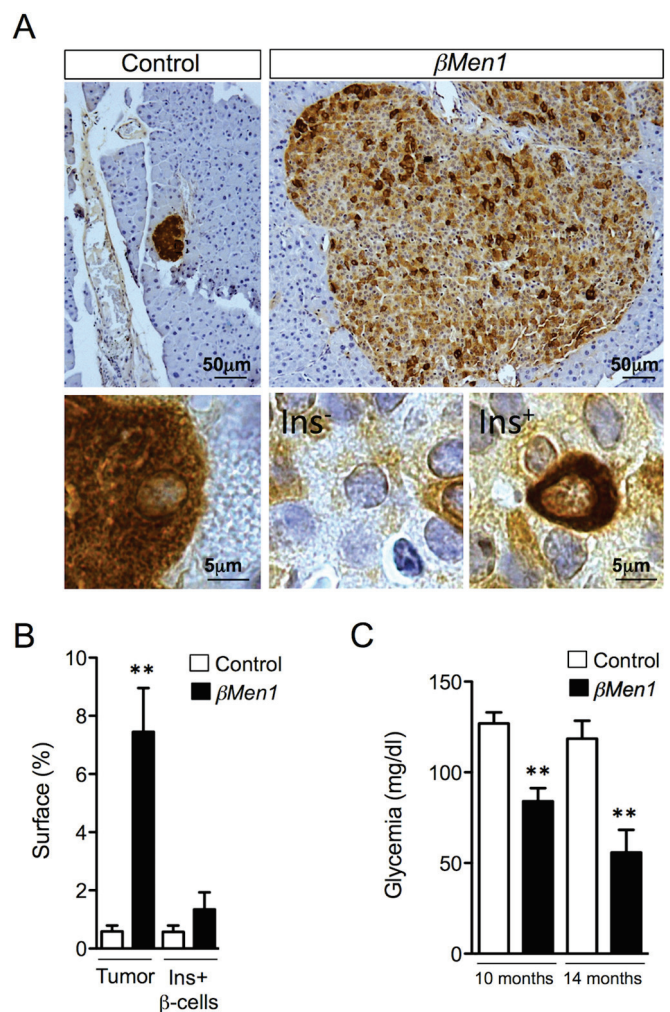


FIG 1 Analysis of insulin expression in β Men1 β -cell tumors reveals heterogeneity in intratumoral insulin expression. (A) Representative insulin staining heterogeneity seen in 14-month-old control and β Men1 tumors. Lower panels represent magnified views of upper panels. The Ins⁻ and Ins⁺ panels depict β cells expressing low and high insulin levels, respectively, in tumors. (B) Morphometric measurements of tumor versus insulin-immunoreactive (Ins⁺) β -cell surfaces observed in 14-month-old β Men1 and control mice. Data represent the means of surface \pm SEM. **, *P* < 0.01 by the Student *t* test. (C) Mean glycemia \pm SEM; **, *P* < 0.01 by the Student *t* test.

material). Quantification of the respective surface areas occupied by Ins⁺ and Ins⁻ tumor cells revealed that 7.45% \pm 1.508% of the pancreas was occupied by islet tumors, whereas Ins⁺ tumor β cells accounted for only for 1.35% \pm 0.581% of this surface in β Men1 tumors (Fig. 1B). Analysis of serum glucose concentrations revealed that β Men1 animals had become severely hypoglycemic at the age of 14 months (Fig. 1C), suggesting that the remaining Ins⁺ β -cell lesions are capable of producing an overload of insulin that impacts glycemia.

Men1 β -cell tumors progressively lose insulin expression, while they retain their endocrine character. We next analyzed the loss of insulin expression at various tumor stages. Dysplastic lesions that develop at 6 months showed insulin staining comparable to that for controls (Fig. 2A). The earliest insulin reduced expression was evident in 10-month-old adenomas and was even

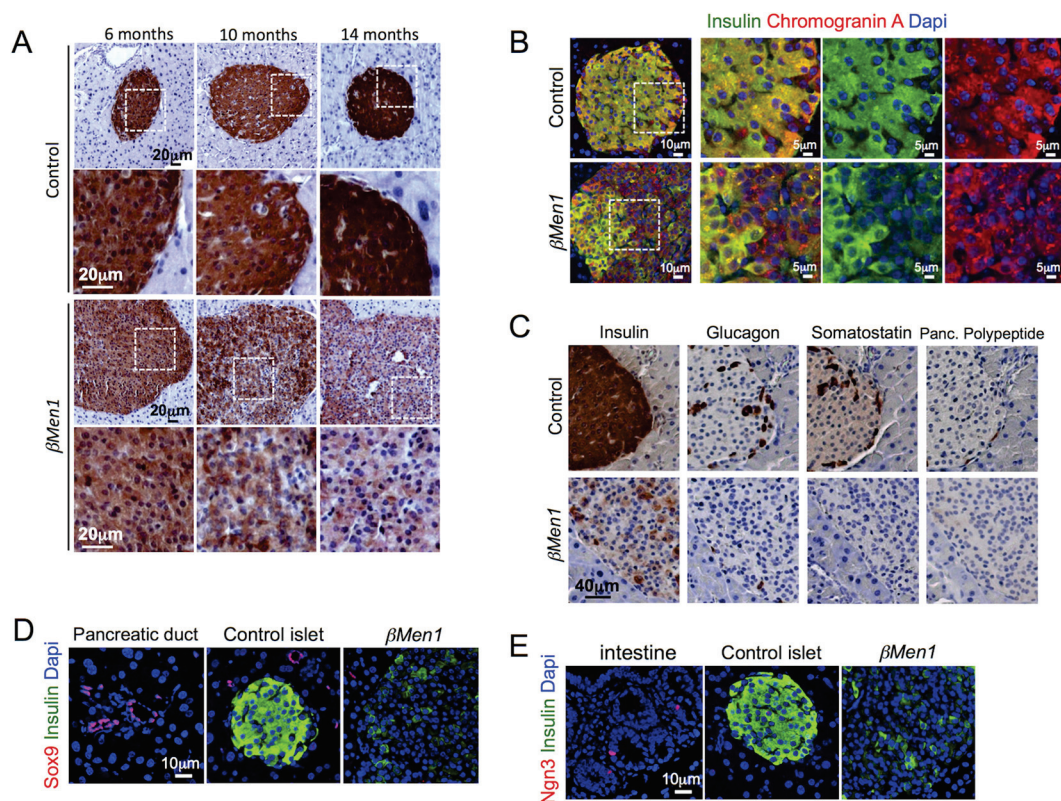


FIG 2 Progressive loss of insulin expression in $\beta Men1$ tumor β cells. (A) Immunohistochemical analysis of insulin expression at the indicated ages. (B) Analysis of chromograninA and insulin coexpression. Representative pictures of double-immunofluorescent staining from 14-month-old $\beta Men1$ and control mice are shown. (C) Immunohistochemical staining of insulin, glucagon, pancreatic (Panc.) polypeptide, and somatostatin in 14-month-old pancreas serial sections. (D and E) Analysis of Sox9 and Ngn3 expression in 14-month-old $Ins^- \beta Men1$ tumor lesions. Note that pancreatic ducts and intestinal tissues present on the same pancreatic sections were used as internal controls expressing Sox9 and Ngn3, respectively.

more pronounced at 14 months (Fig. 2A). We subsequently used chromograninA, a marker of neuroendocrine tumors, to address whether Ins^- lesions retain their endocrine character. We found chromograninA to be expressed in all tumors analyzed and to be colocalized with insulin in only a subset of tumor β cells (Fig. 2B). Next, we thought to determine menin expression in β cells that had lost insulin expression. First, we checked menin expression at 1 month of age and found that menin disruption was almost complete in β cells, whereas all α cells and Ins^- chromogranin $^+$ cells were expressing menin at that age (see Fig. S2 and S3 in the supplemental material). More interestingly, at 6 and 14 months of age, we found menin expression to be lost in all Ins^+ and Ins^- chromograninA $^+$ islet tumors that developed in $\beta Men1$ mice (see Fig. S3 in the supplemental material), supporting the idea that Ins^- chromograninA $^+$ tumors may originate from Ins^+ menin-disrupted β cells. Given the known α - to β -tumor-cell transdifferentiation that occurs in *Men1* glucagonomas (28), we analyzed whether Ins^- lesions expressed glucagon, somatostatin, or pancreatic polypeptide and failed to detect those hormones in Ins^- β -cell lesions (Fig. 2C). This observation suggests that the loss of insulin expression observed in tumor β cells reflects a dedifferentiation rather than a transdifferentiation. Finally, we found dedifferentiated lesions to lack the expression of Sox9 and Ngn3, supporting the idea that tumor β cells had lost their maturity rather than acquired a progenitor-like phenotype (Fig. 2D and E).

ActivinB expression is selectively increased during β -cell tumorigenesis. We next speculated that an autocrine factor produced by tumor cells promotes the loss of insulin expression. We explored transcriptomic analyses of *Men1*-KO β -cell and insulinoma models (29, 30), looking for candidates known to inhibit insulin expression. Given the importance of TGF- β signaling in insulin synthesis and maintenance of β -cell maturity (24, 31), we paid particular attention to related ligands. In this way, we identified the *Inh β B* gene, coding for activinB, to be upregulated in insulinomas depleted of *Men1*. Histological analyses performed with 2 independent activinB antibodies confirmed the selective induction of activinB expression in β -cell tumors and the near absence of activinB in control β cells (Fig. 3A; see Fig. S4 in the supplemental material). Knowing the importance of both activinA and activinB in islet β -cell functions (25, 32, 33), we further checked whether activinA expression was altered, but we did not find this ligand to be increased in *Men1* β -cell tumors (data not shown). Next, we sought to delineate the onset of activinB overexpression from aging $\beta Men1$ mice. Whereas activinB was absent in 4-month-old hyperplastic islets, we detected this ligand within a group of clustered cells randomly located within 6-month-old dysplastic islets. At 10 and 14 months of age, the number of cells expressing activinB was robustly increased (Fig. 3A). Islet content analysis confirmed that activinB was induced in 9-month-old $\beta Men1$ isolated islets compared to age-matched controls (Fig. 3B). Using a coimmunofluorescence approach, we further found

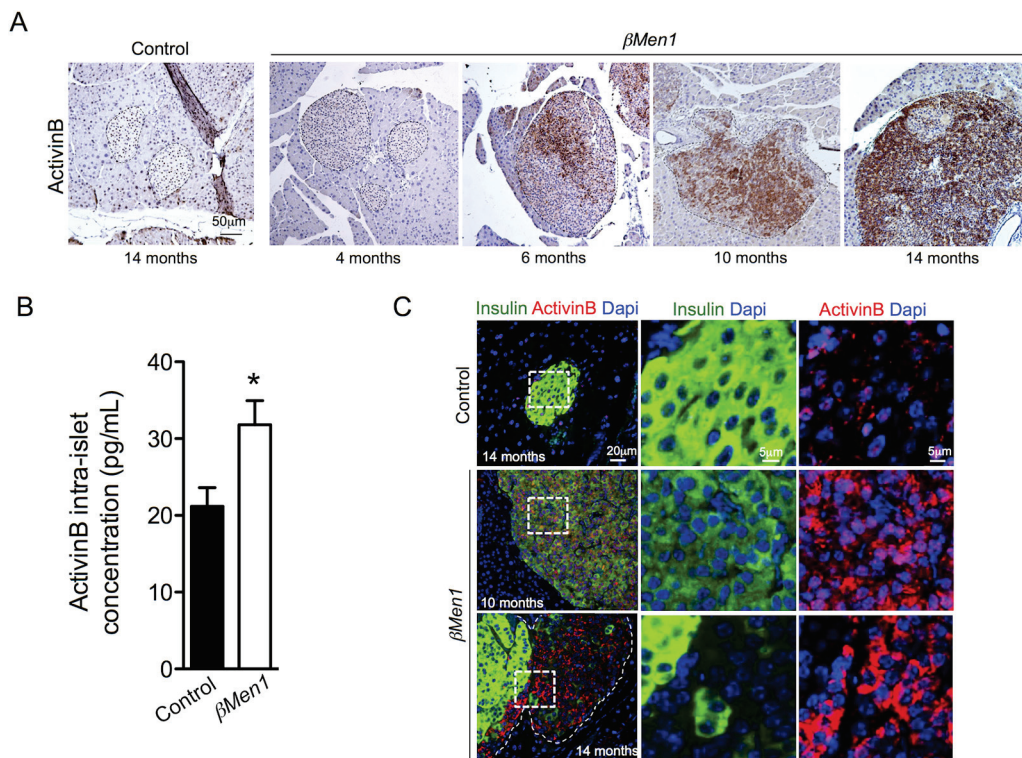


FIG 3 Induced activinB expression in β -tumor cells leads to a progressive downregulation of insulin expression. (A) Immunohistochemical analysis of activinB expression in β Men1 and control pancreas. Islets are outlined by dashed lines. (B) Quantification of intraislet activinB content. Size-matched hand-picked islets from 9-month-old β Men1 ($n = 4$) and control ($n = 4$) animals were used to extract protein and quantify activinB content by ELISA. Data are represented as means \pm SEM of triplicate measurements of 4 independent samples per genotype. *, $P < 0.05$ by the Student t test. (C) Immunofluorescent colocalization of activinB and insulin within 10- and 14-month-old tumor lesions and control islets. Right panels are higher magnifications of dashed areas.

lesions with reduced levels of insulin or a lack of insulin to express high levels of activinB, while activinB was absent in Ins^+ tumor cells and control islets (Fig. 3C). Taken together, these observations support that activinB induced-expression could represent a triggering signal that reduces insulin expression in β Men1 tumor β cells.

ActivinB expression induces the downregulation of insulin expression in β cells *in vitro*. Given that Smad3 has the capacity to bind and mediate repression of the insulin gene promoter (34), we next tested the direct effect of activinB stimulation on transcription of insulin genes *in vitro*. Using cultured Min6, we found that activinB significantly inhibited both *Ins1* and *Ins2* gene expression (Fig. 4). Use of the Psmad2/3-SB431542 inhibitor demonstrated a significant rescue of the *Ins1* and *Ins2* gene inhibition by activinB, confirming that part of this inhibition was taking place through Smad2/3, as previously reported (34). Interestingly *Ins2* gene inhibition was partly rescued by SB431542, suggesting that a Smad2/3 noncanonical mechanism was also involved.

ActivinB disruption in β Men1 mice rescues the loss of insulin expression in tumor β cells. We next examined the consequences of an activinB loss for β -cell tumorigenesis. Taking advantage of the viability of the homozygous *Inh β B-KO* mouse (27), we generated *Inh β B^{KO/KO}; Men1^{F/F}; RipCre* compound mutants (termed *Inh β B- β Men1*) to investigate whether the lack of activinB impacted the progressive loss of insulin expression in tumor β cells. Although quantification of the tumor cell mass progression did not revealed differences between β Men1 and *Inh β B- β Men1*

compound mutant mice, we found that the surface of the compound-mutant lesions plateaued at 6 months supporting the fact that activinB may impact tumor growth (Fig. 5A). Analysis of activinB immunoreactivity further confirmed the lack of activinB in *Inh β B- β Men1* tumors (see Fig. S5 in the supplemental material). Interestingly, we found that islet tumors of all analyzed 10- and 14-month-old *Inh β B- β Men1* mice stained homogeneously

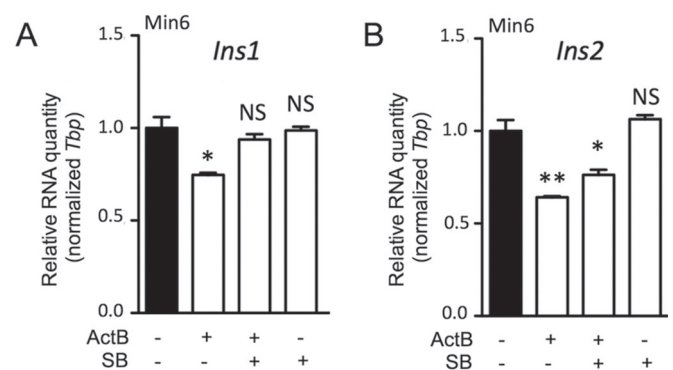


FIG 4 ActivinB inhibits insulin expression *in vitro*. Quantitative RT-PCR analysis of *Ins1* (A) and *Ins2* (B) gene expression in Min6 cells following 72 h of activinB (ActB) treatment is shown. SB, SB431542 inhibitor. Graphs are representative examples of 3 independent experiments. Data represent means \pm SEM for triplicate samples per experiment. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; NS, not significant (by the Student t test).

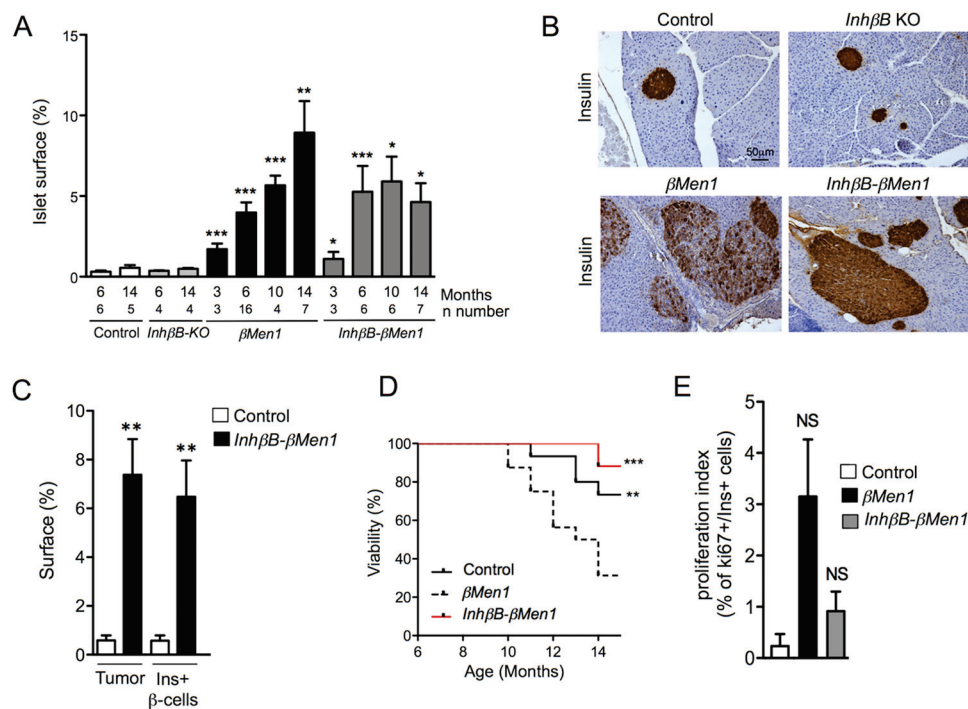


FIG 5 Inactivation of activinB restores insulin expression in $\beta Men1$ insulinomas and increases survival. (A) Measurements of islet cell surface during the course of tumorigenesis. Endocrine surface were calculated using H&E-stained whole pancreatic sections at the indicated ages. The graph shows the percentage of endocrine surface normalized to exocrine surfaces. Numbers of analyzed pancreases per genotype and age are indicated (n). Data are represented as mean of mouse surface \pm SEM. (B) Immunohistochemical analysis of insulin expression in 14-month-old pancreas from animals of the indicated genotype. (C) Morphometric measurements of tumor versus insulin-immunoreactive (Ins^+) β -cell surfaces observed in 14-month-old $Inh\beta B-\beta Men1$ and control mice. Data represent the mean of surface \pm SEM. **, $P < 0.01$ by the Student t test. (D) Survival curve of $\beta Men1$ ($n = 16$), $Inh\beta B-\beta Men1$ ($n = 14$), and control ($n = 14$) mice. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ (by the Mantel-Cox test). (E) Ki67 proliferative index of Ins^+ lesions and control β cells at 14 months of age. Data represent the mean of the number of Ki67 $^+$ / Ins^+ cells found in mutant and control animals \pm SEM. NS, not significant the Student t test.

for insulin, yet the intensity of the observed staining was slightly weaker than in control or $Inh\beta B-KO$ mutant islets (Fig. 5B and C; see Fig. S1 in the supplemental material). Moreover, we found that $\beta Men1$ animals lacking activinB demonstrated a prolonged survival after 10 months of age (Fig. 5D), which appears to be consistent with the slight, not significant, reduction of the Ki67 proliferation index of $Inh\beta B-\beta Men1$ lesions at 14 months of age (Fig. 5E). Taken together, these observations support the notion that the loss of insulin observed in the $\beta Men1$ lesions results from an autocrine effect of activinB and, more importantly, that the lack of activinB could negatively impact the progression of $\beta Men1$ tumors.

ActivinB decreases the expression of mature β -cell genes and contributes to the dedifferentiation of β -cell tumors. Maintenance of β -cell maturity is orchestrated by a subset of transcription factors that are essential for adult β cells (11, 23); therefore, we analyzed the impact of activinB on mature β -cell gene expression. Using Min6 and $\beta TC3$ cells derived from mouse insulinomas, we found the expression of $Ins1$, $Ins2$, $Slc2a2$, $Nkx6.1$, and $Pdx1$ to be significantly reduced in those cells following activinB treatment (Fig. 6A and B). The inhibition of $Mafa$ and $Nkx2.2$ by activinB appeared to be mutually exclusive in $\beta TC3$ and Min6 cells, while the expression of $Mafb$ remained unchanged in both cell lines. The downregulation of $Mafa$, $Nkx6.1$, $Nkx2.2$, and $Pdx1$ following activinB stimulation was also validated at the protein level (Fig. 6C). Interestingly, the expression of the paired box 4 (Pax4), a transcription factor involved in pancreatic β -cell dif-

ferentiation and more recently shown to promote β -cell differentiation in mature β cells (35), was strongly induced by activinB treatment in both $\beta TC3$ and Min6 cells (Fig. 6A and B). Use of the SB431542 inhibitor further demonstrated the specificity of the activinB-mediated induction through Smad2/3 signaling in $\beta TC3$ cells (Fig. 6D and E) as well as in Min6 cells (data not shown).

ActivinB disruption rescues the loss of tumor β -cell maturity in $\beta Men1$ tumors. We next investigated Ins^- lesions, which do express activinB. We were unable to detect $Mafa$ in Ins^- tumors, whereas we found $Pdx1$ and $Nkx6.1$ expression to be reduced yet still present in those lesions compared to control islets (Fig. 7A to C). Membrane expression of the glucose transporter $Glut2$ (encoded by the $Slc2a2$ gene) was absent at the surface of the Ins^- tumor β cells, suggesting that those cells had lost their glucose-sensing capacity (Fig. 7D). A marked increase in $Pax4$ expression was also evident in Ins^- lesions that overexpressed activinB, as seen by the strong staining observed in the lesions lacking insulin expression (Fig. 7E). Lesions that developed in the $Inh\beta B-\beta Men1$ mice were found to be well differentiated and to express $Mafa$, $Nkx6.1$, $Pdx1$, and $Pax4$ levels comparable to those in age-matched control islets (Fig. 7). As in normal pancreas, the expression of $Glut2$ was obvious at the surface of β cells in $Inh\beta B-\beta Men1$ tumors (Fig. 7D). Together these observations confirm that $\beta Men1$ tumors lacking activinB were protected against β -cell dedifferentiation and loss of maturity.

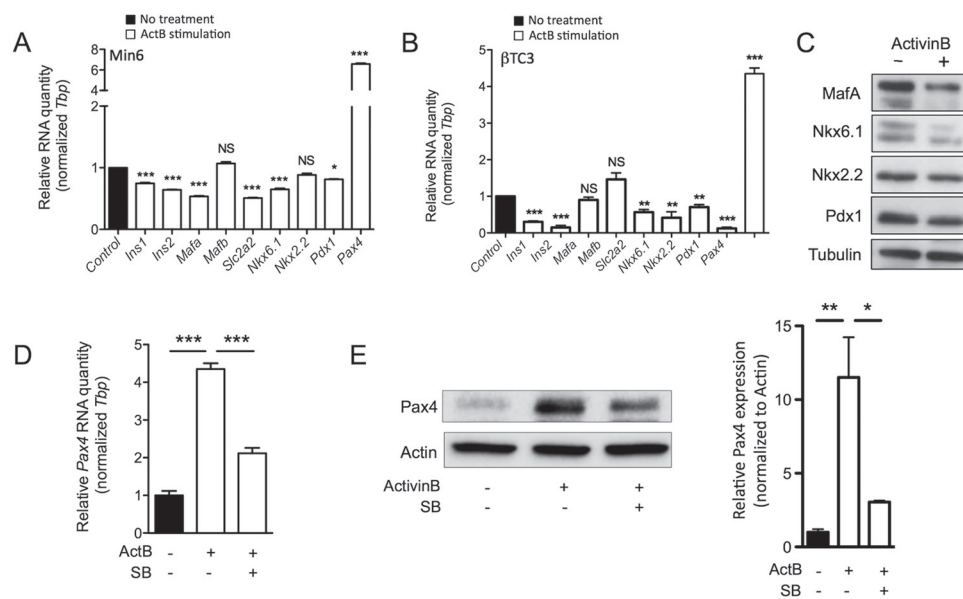


FIG 6 ActivinB decreases the expression of mature β -cell genes while promoting Pax4 expression. (A and B) Quantitative RT-PCR analysis of mature β -cell gene expression in Min6 (A) or β TC3 (B) cells following 72 h of activinB stimulation. (C) Analysis of MafA, Nkx6.1, Nkx2.2 and Pdx1 protein expression in Min6 cells subjected to 72 h of activinB stimulation (+). Tubulin was used as a loading control. (D and E) Analysis of Pax4 gene (D) and protein (E) expression in β TC3 cells subjected to 72 h of activinB (ActB) stimulation in the presence or absence of SB431542 (SB). Graphs are representative examples of 3 independent experiments. Data are presented as mean \pm SEM for triplicate samples per experiment. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; NS, not significant (by the Student t test).

DISCUSSION

Ample evidence from clinical studies and work with mice shows that pancreatic cells demonstrate a high degree of cellular plasticity in response to various stresses and pathological conditions. Here, we report that islet β -cell tumors induced by the loss of the *Men1* suppressor gene are subjected to β -cell dedifferentiation. More importantly, we demonstrate that activinB, which is barely detectable in normal β cells, is markedly induced in dysplastic lesions and causes tumor cells to progressively lose their insulin expression and their capacity to express mature markers essential for β -cell function, such as MafA, Pdx1, Nkx6.1, and Glut2.

The identification of activinB as an endogenous modulator of β -cell plasticity brings a new twist to its previously reported role in inhibiting insulin secretion (32, 33). This role is consistent with the emerging functions of the TGF- β /bone morphogenetic protein (BMP) superfamilies in the suppression of adult β -cell maturation (31). Smad-BMP signaling prevents β -cell differentiation in stem cells, zebrafish, and mice (36), and TGF- β , activinA, and Smad3 are capable of repressing insulin and a subset of mature β -cell genes in islet β -cell lines and isolated mouse islets (25, 34). Using Min6 and β TC3 cells, we found that activinB represses the expression of several genes associated with β -cell maturity. Interestingly, Szabat et al. reported that activinA stimulation of Min6 cells has the same effects (25). Thus, both activinA and activinB can promote β -cell dedifferentiation *in vitro*, through the same target genes. This observation conflicts somewhat with the acute, antagonistic roles previously reported for activinA and activinB in β -cell insulin secretion (32, 33). Nevertheless, both activins have the capacity to activate Smad3 phosphorylation through the use of Alk4/Alk7 type I receptors, which may explain their common *in vitro* effects on β -cell maturity. Wu et al. recently demonstrated that activinB is a more potent inducer of Smad3 phosphorylation

than activinA in isolated islets and β -cell lines (33). Given that Smad3 has the capacity to bind and mediate repression of the insulin gene promoter (34), our data suggest that activinA may not induce β -cell dedifferentiation *in vivo* as seen for activinB. Indeed, we did not detect an increase in activinA expression in *Men1* β -cell tumors, confirming that the observed β -cell dedifferentiation results solely from the autocrine effects of activinB. This conclusion is supported by the lack of β -cell dedifferentiation in the *Inh β B*- β *Men1* compound mutant mice. While the inactivation of activinB convincingly blocks tumor β -cell dedifferentiation, we cannot exclude the possibility that other factors also contribute to this process. Interestingly, some target candidates, such as MafA, seem to be partly rescued in tumors developed by compound mutant mice (Fig. 7A). Whereas the origin of this observation remains elusive, it supports the participation of complementary pathways and molecules that maintain the dedifferentiation process beyond activinB. Among possible candidates, menin itself could have an important role, as it was previously shown to contribute to decreased MafA expression in insulinoma cell lines (37). It will therefore be important to determine to what extent menin contributes to β -cell dedifferentiation through an activinB-independent mechanism.

Besides inducing the loss of β -cell maturity, activinB strongly upregulates Pax4, both in a β -cell line and in *Ins*⁻ dedifferentiated lesions. While Pax4 is essential for the development and differentiation of insulin-producing β cells in the mammalian pancreas (38), its functions in adult β cells have been proposed to orchestrate a network of genes that govern β -cell expansion and survival under physiological and pathological conditions (39). Examining the consequences of increased Pax4 expression in activinB-expressing tumor cells is therefore important. However, the low proliferative index of dedifferentiated tumors does not

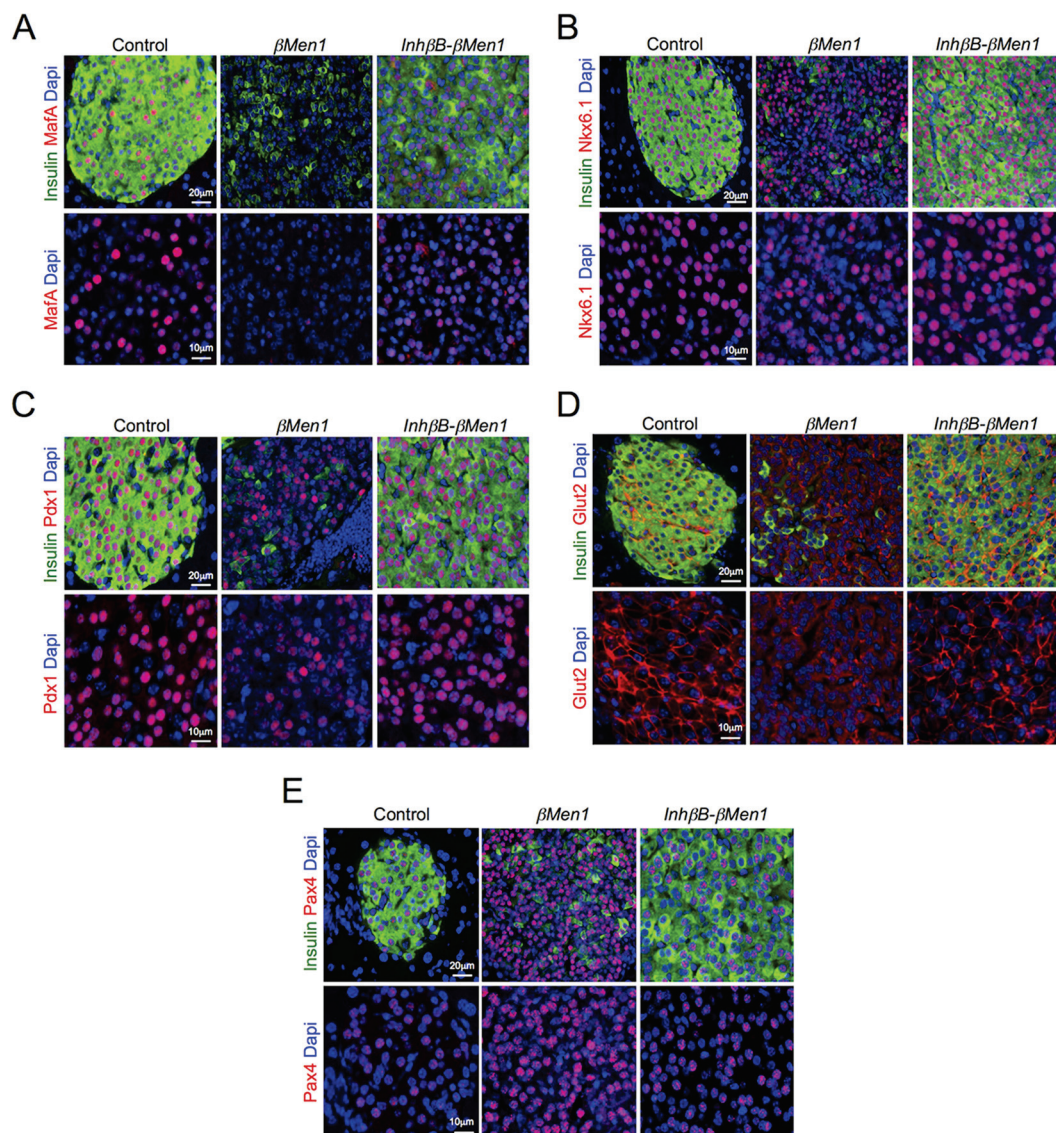


FIG 7 Inactivation of activinB rescues the loss of maturity seen in $\beta Men1$ insulinomas. Immunofluorescent colocalization of insulin and mature β -cell markers MafA (A), Nkx6.1 (B), Pdx1 (C), Glut2 (D), and Pax4 (E) in Ins^{-} $\beta Men1$ and $Inh\beta B-\beta Men1$ tumors developed at the age of 14 months is shown. Lower panels are magnified views of each separate marker fluorescent channel.

corroborate the previously described role of Pax4 in β -cell-induced proliferation in rat and human islets (40). Interestingly, long-term conditional overexpression of Pax4 in mature islet β cells represses the expression of insulin, MafA, and Glut2, consistent with the occurrence of β -cell dedifferentiation (35). This observation suggests that activinB-mediated induction of Pax4 may contribute to triggering or maintaining β -cell dedifferentiation in the pathophysiological context of β -cell tumors, a hypothesis supported by the lack of Pax4 overexpression and β -cell dedifferentiation in tumors in $Inh\beta B-\beta Men1$ mice lacking activinB expression.

While we initially demonstrated that activinB inhibits insulin secretion (32), work by Wu et al. confirmed that transient stimulation of isolated pancreatic islets with exogenous activinB suppresses glucose-stimulated induced secretion (GSIS) and ATP production (33). In the diabetic state, loss of acute GSIS is associ-

ated with a loss of the β -cell mature phenotype (41). Therefore, it will be important to determine whether a sustained inhibition of GSIS and ATP production mediated by upregulation of activinB in β cells could contribute to the observed plasticity of tumor β cells. Our observations suggest that tumor β cells overexpress activinB as a means of protecting against the overproduction of insulin in animals developing insulinomas. Although physiological protection against insulin overload may occur through limitation of GSIS in the early stages of tumor progression, the loss of β -cell functionality through dedifferentiation is likely to be the major protective mechanism operating in these tumors.

While in the field of pancreatic endocrine tumors much is still unknown about islet tumors due to their functional complexity and cellular diversity, our results identify activinB as an intrinsic β -cell candidate that contributes to the plasticity of islet tumors. Unlike previous insulinomas mouse models, which develop ag-

gressively proliferative, poorly dedifferentiated carcinomas upon forced activation of Hedgehog/Gli signaling or expression of the simian virus 40 (SV40) large T antigen in β cells (6, 42), the dedifferentiated tumors in the β Men1 mouse model have a low proliferative potential (data not shown) and lack expression of the Sox9 and Ngn3 markers of early pancreatic progenitors, similar to the case for the pancreatic endocrine tumors found in MEN1 patients. Such observations highlight the complexity and subtlety of the mechanism that may control β -cell tumor dedifferentiation *in vivo*. Published work from Anlauf et al. and Perren et al. (43, 44) has shown that most of the early islet lesions seen in MEN1 patients are glucagon positive, whereas the advanced hormone-secreting islet tumors detected in these same patients are mainly insulinomas or nonsecreting tumors. These observations suggest that glucagon-positive early lesions may be replaced or overtaken by insulinomas and mixed islet tumors during tumorigenesis, an observation consistent with our previous published work (28). To that extent, we believe that the identification of activinB-induced expression in β Men1 insulinomas and its role in their dedifferentiation/loss of mature characteristics sheds light on an important issue regarding the mechanism of origin of the insulinomas and nonfunctioning tumors seen in MEN1 patients. Therefore, activinB has potential as a biomarker and drug target that could refine the clinical classification of pancreatic endocrine tumors. More importantly, our work uncovers a previously unknown physiological role of activinB in the maintenance of β -cell maturity. Identifying the *in vivo* signals that trigger the expression of activinB in pancreatic islet cells will be crucial to further understanding the cellular contexts that promote β -cell dedifferentiation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the animal care staff of ALECs-SFP (Lyon, France) and ANICAN (CRCL-Lyon, France) for maintenance of mouse strains. We are grateful to B. Sosa-Pineda (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN) for the anti-Pax4 antibody. We thank Tamsin Lindström (Stockholm, Sweden) for critical reading and editing of the manuscript.

This work was supported by La Ligue contre le Cancer (CD42 and CD69), Lyon I University, l'Agence Nationale de Recherche (grant SVSE2 ANR10BLAN124004), and the European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD/AZ cellular plasticity program 2014). D.R. was supported by fellowships from the French Ministry of Education and Research and La Ligue.

D.R. and P.B. conceived and designed the experiments. D.R., J.C., A.H., R.J., R.B., D.G., R.T., M.C.-B., and P.B. performed the experiments and analyzed the data. O.A., O.R., and C.X.Z. contributed reagents and provided advice on experiments. D.R., C.X.Z., O.R., O.A., and P.B. discussed the results. P.B. wrote the manuscript.

We have no conflicts to disclose.

FUNDING INFORMATION

Ligue Contre le Cancer provided funding to Philippe Bertolino under grant numbers CD42 and CD69. Agence Nationale de la Recherche (ANR) provided funding to Chang Xian Zhang under grant number SVSE2 ANR10BLAN124004. European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD) provided funding to Philippe Bertolino under grant number EFSD/AZ cellular plasticity program 2014.

Olov Andersson thanks the Ragnar Söderbergs foundation, Swedish Research Council and Strategic Research Initiative in Stem Cells and Regenerative Medicine, for support.

REFERENCES

1. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. 2012. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 12:323–334. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3261>.
2. Brabletz T. 2012. To differentiate or not—routes towards metastasis. *Nat Rev Cancer* 12:425–436. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3265>.
3. Asa SL. 2011. Pancreatic endocrine tumors. *Mod Pathol* 24(Suppl 2): S66–S77. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2010.127>.
4. Pelengaris S, Khan M, Evan GI. 2002. Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 109:321–334. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00738-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00738-9).
5. Bertolino P, Tong WM, Herrera PL, Casse H, Zhang CX, Wang ZQ. 2003. Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer Res* 63:4836–4841.
6. Landsman L, Parent A, Hebrok M. 2011. Elevated Hedgehog/Gli signaling causes beta-cell dedifferentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:17010–17015. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1105404108>.
7. Ziv O, Glaser B, Dor Y. 2013. The plastic pancreas. *Dev Cell* 26:3–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.013>.
8. Weinberg N, Ouziel-Yahalom L, Knoller S, Efrat S, Dor Y. 2007. Lineage tracing evidence for *in vitro* dedifferentiation but rare proliferation of mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* 56:1299–1304. <http://dx.doi.org/10.2337/db06-1654>.
9. Russ HA, Bar Y, Ravassard P, Efrat S. 2008. *In vitro* proliferation of cells derived from adult human beta-cells revealed by cell-lineage tracing. *Diabetes* 57:1575–1583. <http://dx.doi.org/10.2337/db07-1283>.
10. Spijker HS, Ravelli RB, Mommaas-Kienhuis AM, van Apeldoorn AA, Engelse MA, Zaldumbide A, Bonner-Weir S, Rabelink TJ, Hoeben RC, Clevers H, Mummery CL, Carlotti F, de Koning EJ. 2013. Conversion of mature human beta-cells into glucagon-producing alpha-cells. *Diabetes* 62:2471–2480. <http://dx.doi.org/10.2337/db12-1001>.
11. Bernardo AS, Hay CW, Docherty K. 2008. Pancreatic transcription factors and their role in the birth, life and survival of the pancreatic beta cell. *Mol Cell Endocrinol* 294:1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2008.07.006>.
12. Back SH, Scheuner D, Han J, Song B, Ribick M, Wang J, Gildersleeve RD, Pennathur S, Kaufman RJ. 2009. Translation attenuation through eIF2alpha phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in beta cells. *Cell Metab* 10:13–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2009.06.002>.
13. Dhawan S, Georgia S, Tschien SI, Fan G, Bhushan A. 2011. Pancreatic beta cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of Arx. *Dev Cell* 20:419–429. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.03.012>.
14. Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. 2012. Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell* 150: 1223–1234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.029>.
15. Sulyok S, Wankell M, Alzheimer C, Werner S. 2004. Activin: an important regulator of wound repair, fibrosis, and neuroprotection. *Mol Cell Endocrinol* 225:127–132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2004.07.011>.
16. Xia Y, Schneyer AL. 2009. The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function. *J Endocrinol* 202:1–12. <http://dx.doi.org/10.1677/JOE-08-0549>.
17. Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, Rosenfeld R, Chen Q, Boone T, Simonet WS, Lacey DL, Goldberg AL, Han HQ. 2010. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* 142:531–543. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.011>.
18. Kim SK, Hebrok M, Li E, Oh SP, Schrewe H, Harmon EB, Lee JS, Melton DA. 2000. Activin receptor patterning of foregut organogenesis. *Genes Dev* 14:1866–1871.
19. Zhang YQ, Cleary MM, Si Y, Liu G, Eto Y, Kritzik M, Dabernat S, Kayali AG, Sarvetnick N. 2004. Inhibition of activin signaling induces pancreatic epithelial cell expansion and diminishes terminal differentiation of pancreatic beta-cells. *Diabetes* 53:2024–2033. <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.53.8.2024>.
20. Ogawa K, Abe K, Kurosawa N, Kurohmaru M, Sugino H, Takahashi M, Hayashi Y. 1993. Expression of alpha, beta A and beta B subunits of inhibin or activin and follistatin in rat pancreatic islets. *FEBS Lett* 319: 217–220. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80549-A](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(93)80549-A).

21. La Rosa S, Uccella S, Marchet S, Capella C, Lloyd RV. 2004. Localization of inhibins and activins in normal endocrine cells and endocrine tumors of the gut and pancreas: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Histochem Cytochem* 52:217–225. <http://dx.doi.org/10.1177/002215540405200210>.
22. Brown ML, Kimura F, Bonomi LM, Ungerleider NA, Schneyer AL. 2011. Differential synthesis and action of TGF β s superfamily ligands in mouse and rat islets. *Islets* 3:367–375. <http://dx.doi.org/10.4161/isl.3.6.18013>.
23. Oliver-Krasinski JM, Stoffers DA. 2008. On the origin of the beta cell. *Genes Dev* 22:1998–2021. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1670808>.
24. Brown ML, Schneyer AL. 2010. Emerging roles for the TGF β family in pancreatic beta-cell homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 21:441–448. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2010.02.008>.
25. Szabat M, Johnson JD, Piret JM. 2010. Reciprocal modulation of adult beta cell maturity by activin A and follistatin. *Diabetologia* 53:1680–1689. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-010-1758-0>.
26. Antsiferova M, Werner S. 2012. The bright and the dark sides of activin in wound healing and cancer. *J Cell Sci* 125:3929–3937. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.094789>.
27. Vassalli A, Matzuk MM, Gardner HA, Lee KF, Jaenisch R. 1994. Activin/inhibin beta B subunit gene disruption leads to defects in eyelid development and female reproduction. *Genes Dev* 8:414–427. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.8.4.414>.
28. Lu J, Herrera PL, Carreira C, Bonnavion R, Seigne C, Calender A, Bertolino P, Zhang CX. 2010. Alpha cell-specific Men1 ablation triggers the transdifferentiation of glucagon-expressing cells and insulinoma development. *Gastroenterology* 138:1954–1965. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.046>.
29. Serewko-Auret MM, Mould AW, Loffler KA, Duncan R, Kay GF, Hayward NK. 2010. Alterations in gene expression in MEN1-associated insulinoma development. *Pancreas* 39:1140–1146. <http://dx.doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181dc67fc>.
30. Yang Y, Gurung B, Wu T, Wang H, Stoffers DA, Hua X. 2010. Reversal of preexisting hyperglycemia in diabetic mice by acute deletion of the Men1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20358–20363. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1012257107>.
31. Blum B, Roose AN, Barrandon O, Maehr R, Arvanites AC, Davidow LS, Davis JC, Peterson QP, Rubin LL, Melton DA. 2014. Reversal of beta cell de-differentiation by a small molecule inhibitor of the TGF β pathway. *eLife* 3:e02809.
32. Bertolino P, Holmberg R, Reissmann E, Andersson O, Berggren PO, Ibanez CF. 2008. Activin B receptor ALK7 is a negative regulator of pancreatic beta-cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7246–7251. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0801285105>.
33. Wu H, Mezghenna K, Marmol P, Guo T, Moliner A, Yang SN, Berggren PO, Ibanez CF. 2014. Differential regulation of mouse pancreatic islet insulin secretion and Smad proteins by activin ligands. *Diabetologia* 57:148–156. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-013-3079-6>.
34. Lin HM, Lee JH, Yadav H, Kamaraju AK, Liu E, Zhigang D, Vieira A, Kim SJ, Collins H, Matschinsky F, Harlan DM, Roberts AB, Rane SG. 2009. Transforming growth factor-beta/Smad3 signaling regulates insulin gene transcription and pancreatic islet beta-cell function. *J Biol Chem* 284:12246–12257. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M805379200>.
35. Hu He KH, Lorenzo PI, Brun T, Jimenez Moreno CM, Aeberhard D, Vallejo Ortega J, Cornu M, Thorel F, Gjinovci A, Thorens B, Herrera PL, Meda P, Wollheim CB, Gauthier BR. 2011. In vivo conditional Pax4 overexpression in mature islet beta-cells prevents stress-induced hyperglycemia in mice. *Diabetes* 60:1705–1715. <http://dx.doi.org/10.2337/db10-1102>.
36. Chung WS, Andersson O, Row R, Kimelman D, Stainier DY. 2010. Suppression of Alk8-mediated Bmp signaling cell-autonomously induces pancreatic beta-cells in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1142–1147. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0910205107>.
37. Hamze Z, Vercherat C, Bernigaud-Lacheretz A, Bazzi W, Bonnavion R, Lu J, Calender A, Pouponnot C, Bertolino P, Roche C, Stein R, Scoazec JY, Zhang CX, Cordier-Bussat M. 2013. Altered MENIN expression disrupts the MAFA differentiation pathway in insulinoma. *Endocr Relat Cancer* 20:833–848. <http://dx.doi.org/10.1530/ERC-13-0164>.
38. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. 1997. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386:399–402. <http://dx.doi.org/10.1038/386399a0>.
39. Brun T, Gauthier BR. 2008. A focus on the role of Pax4 in mature pancreatic islet beta-cell expansion and survival in health and disease. *J Mol Endocrinol* 40:37–45. <http://dx.doi.org/10.1677/JME-07-0134>.
40. Brun T, Franklin I, St-Onge L, Bignon-Lauer A, Schoenle EJ, Wollheim CB, Gauthier BR. 2004. The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes β -cell proliferation and survival in rat and human islets. *J Cell Biol* 167:1123–1135. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200405148>.
41. Weir GC, Bonner-Weir S. 2004. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53(Suppl 3):S16–S21. http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.S16.
42. Hunter KE, Quick ML, Sadanandam A, Hanahan D, Joyce JA. 2013. Identification and characterization of poorly differentiated invasive carcinomas in a mouse model of pancreatic neuroendocrine tumorigenesis. *PLoS One* 8:e64472. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064472>.
43. Anlauf M, Schlenger R, Perren A, Bauersfeld J, Koch CA, Dralle H, Raffel A, Knoefel WT, Weihe E, Ruszniewski P, Couvelard A, Komminoth P, Heitz PU, Kloppel G. 2006. Microadenomatosis of the endocrine pancreas in patients with and without the multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome. *Am J Surg Pathol* 30:560–574. <http://dx.doi.org/10.1097/01.pas.0000194044.01104.25>.
44. Perren A, Anlauf M, Henopp T, Rudolph T, Schmitt A, Raffel A, Gimm O, Weihe E, Knoefel WT, Dralle H, Heitz PU, Komminoth P, Kloppel G. 2007. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): loss of one MEN1 allele in tumors and monohormonal endocrine cell clusters but not in islet hyperplasia of the pancreas. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1118–1128. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2006-1944>.



Menin regulates *Inhbb* expression through an Akt/Ezh2-mediated H3K27 histone modification



Samuele Gherardi¹, Doriane Ripoché¹, Ivan Mikaelian, Marie Chanal, Romain Teinturier, Delphine Goehrig, Martine Cordier-Bussat, Chang X. Zhang, Ana Hennino, Philippe Bertolino*

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Inserm U1052, CNRS UMR5286, Université Lyon 1, Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 October 2016

Received in revised form 24 January 2017

Accepted 10 February 2017

Available online 12 February 2017

Keywords:

Menin

ActivinB

Inhibinb

H3K27me3

Ezh2

Akt

ABSTRACT

Although *Men1* is a well-known tumour suppressor gene, little is known about the functions of Menin, the protein it encodes for. Since few years, numerous publications support a major role of Menin in the control of epigenetic gene regulation. While Menin interaction with MLL complex favours transcriptional activation of target genes through H3K4me3 marks, Menin also represses gene expression via mechanisms involving the Polycomb repressing complex (PRC). Interestingly, Ezh2, the PRC-methyltransferase that catalyses H3K27me3 repressive marks and Menin have been shown to co-occupy a large number of promoters. However, lack of binding between Menin and Ezh2 suggests that another member of the PRC complex is mediating this indirect interaction. Having found that ActivinB - a TGF β superfamily member encoded by the *Inhbb* gene - is upregulated in insulinoma tumours caused by *Men1* invalidation, we hypothesize that Menin could directly participate in the epigenetic-repression of *Inhbb* gene expression. Using Animal model and cell lines, we report that loss of Menin is directly associated with ActivinB-induced expression both *in vivo* and *in vitro*. Our work further reveals that ActivinB expression is mediated through a direct modulation of H3K27me3 marks on the *Inhbb* locus in Menin-KO cell lines. More importantly, we show that Menin binds on the promoter of *Inhbb* gene where it favours the recruitment of Ezh2 via an indirect mechanism involving Akt-phosphorylation. Our data suggests therefore that Menin could take an important part to the Ezh2-epigenetic repressive landscape in many cells and tissues through its capacity to modulate Akt phosphorylation.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The *MEN1* gene is a tumour suppressor gene that is frequently mutated in sporadic pancreatic neuroendocrine tumours (PanNET) and is responsible for the familial multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) syndrome [1]. MEN1 patients develop multiple tumours affecting endocrine organs including the parathyroids, pancreas, and anterior pituitary gland [2]. Consistent with this observation, mice with heterozygous *Men1* mutation phenocopy the human MEN1 syndrome [3] while conditional targeted ablation of *Men1* in pancreatic α - and β -cells specifically lead to glucagonomas and insulinomas [4,5]. Despite

the fact that Menin is widely expressed; its function appears tissue-specific and displays sometimes opposite roles between different organs. To that extent, Menin suppresses tumorigenesis in endocrine organs, whereas it is essential for leukemogenesis [6,7]. Functional studies have confirmed that the *MEN1* gene has a large spectrum of expression and that the Menin protein displays multifaceted biological functions in a broad range of different tissues and cells [8]. Indeed, numerous studies have revealed that Menin is involved in the development and cell growth control of endocrine cells, but also in haematopoiesis, adipogenesis, myogenesis, fibrogenesis, osteogenesis [9–12].

Understanding the biological role of *Men1* and the pathological consequences of its disruption relies therefore on a better understanding of Menin tissue-specific functions. Menin has been reported to engage in a broad range of interactions with a large number of transcription factors as well as chromatin modifying proteins and complexes to control gene expression and cell signalling by positive or negative regulation [8]. Biochemical studies have demonstrated that Menin physical interaction with the histone methyltransferase Mixed lineage leukemia 1 (MLL1), controls *Hoxa9* as well as cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs) *p18* and *p27* expression and pancreatic islet proliferation [13]. Interestingly, while Menin interaction with MLL complex favours

Abbreviations: ChIP, Chromatin Immuno-Precipitation; Dpc, Day post coitum; MEF, Mouse embryonic fibroblast; Men1, Multiple endocrine neoplasia type1; PanNET, Pancreatic NeuroEndocrine Tumour; PcG, Polycomb Gene; PCR, Polymerase Chain Reaction; PRC, Polycomb Repressing Complex; RNA, Ribonucleic Acid; RT-PCR, Reverse Transcriptase PCR; TSS, Transcription Starting Site; WT, Wild Type.

* Corresponding author at: Team, Signalling, Metabolism and Tumour progression, Inserm U1052, CNRS UMR5286, Univ. Claude Bernard Lyon I, Centre LEON-BERARD, Bat Cheney D, 28 Rue Laennec, 69008 Lyon, France.

E-mail address: philippe.bertolino@inserm.fr (P. Bertolino).

¹ equal contribution.

transcriptional activation of target genes through the addition of trimethylation marks to histone H3 at lysine 4 (H3K4me3), it was also shown to repress gene expression via mechanisms involving the regulation of the Polycomb (PcG) repressing complex through H3K27 trimethylation (H3K27me3) [14,15]. Interestingly, Enhancer of Zeste Homolog 2 (Ezh2), the PRC2-methyltransferase that catalyses H3K27 repressive trimethylation, and Menin have been shown to co-occupy a large number of promoters [16]. However, no direct binding between Menin and Ezh2 has been demonstrated, suggesting that another member of the PRC2 complex is mediating this indirect interaction [14]. More importantly, whereas Ezh2 and PRC2 complex act as Menin's partners for epigenetic regulation, the target genes they commonly regulate need to be further identified in endocrine and non-endocrine tissues.

Using a mouse insulinoma model based on the targeted disruption of the *Men1* gene [4], our group recently identified that Menin-depleted β -cell tumours overexpress ActivinB, a ligand of the TGF β superfamily [17]. Surprisingly, little is known about the mechanism that control the expression of the *Inhbb* gene that encodes for ActivinB. While previous work highlighted the participation of HIF1 α , the β -catenin pathway as well as insulin and glucose concentrations to modulation *Inhbb* expression, Menin contribution to this mechanism had never been suggested. Interestingly, the promoter and upstream regulatory sequences of *Inhbb* contain several H3K27me3 and H3K4me3 methylations that are characteristic of bivalent regulatory domains [18–21]. These particular bivalent domains are considered to poise expression of developmental genes allowing timely activation while maintaining repression in the absence of differentiation signals. Having found that

ActivinB is involved in the dedifferentiation of adult tumour β -cells and considering the central role of Menin at the interphase of the epigenetic MLL and PRC complex that respectively control H3K4me3 and H3K27me3, we hypothesize that Menin could directly participate in the epigenetic-control of the *Inhbb* gene expression. Here we report that loss of Menin is directly associated with ActivinB-induced expression both in endocrine pancreatic and testicular tumours. Our work further reveals that ActivinB expression is mediated through a direct modulation of H3K27me3 marks on the *Inhbb* locus in Menin-KO cell lines. More importantly, we show that Menin binds on the promoter of *Inhbb* gene where it favours the recruitment of Ezh2 likely via an indirect mechanism involving AKT Phosphorylation. Our data suggests that Menin could take an important part in contributing to the epigenetic repressive landscape in many cell types and tissues through its capacity to modulate AKT phosphorylation.

2. Materials and methods

2.1. Mice strains and procedure

Men1^{Het}, *Men1*^{F/F}; *RipCre* and *RipTag* mice have been previously described [3,4,22]. Mice were maintained in mixed 129sv/C57bl6 background. Islet isolation were performed using a collagenaseP-based protocol followed with an Histopaque-1077 as described before [23]. All animal experiments were performed in accordance with the guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethical Committee.

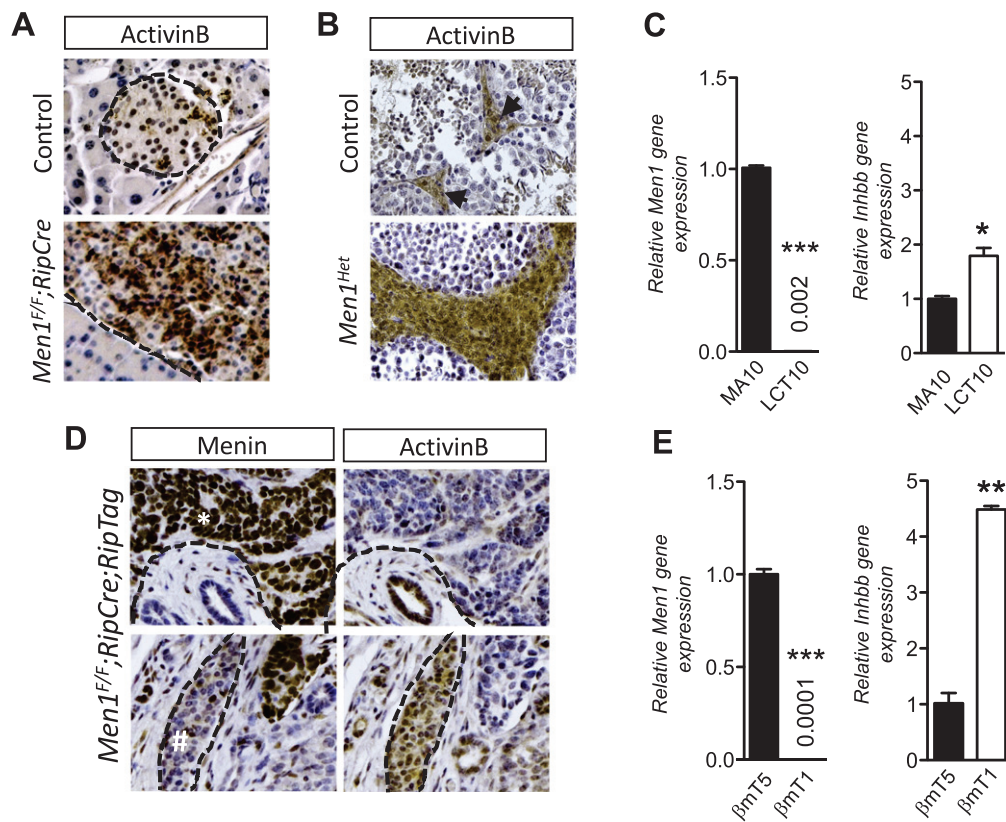


Fig. 1. ActivinB is expressed in endocrine tumours lacking Menin expression. (A and B) Immunohistological analysis of ActivinB expression in Insulinoma (A) and Leydig Cell tumours (B) that respectively develop in *Men1*^{F/F}; *RipCre* and *Men1*^{Het} animal model at the age of 12 months. Dashed lines delineate normal-islet and tumour-islet. Arrows point normal Leydig testicular cells. (C) Quantitative PCR analysis of *Men1* and *Inhbb* gene expression in MA10 and LCT10 Leydig tumour cells. (D) Immunohistological analysis of Menin and ActivinB expression in Insulinoma tumour developed by *Men1*^{F/F}; *RipCre*; *RipTag* compound mutant mice. Dashed lines delineate normal-islet and tumour-islet. *: Menin expressing insulinoma, #: insulinoma lacking Menin expression. (E) Quantitative PCR analysis of *Men1* and *Inhbb* gene expression in β mT1 and β mT5 cells derived from insulinomas developed by *Men1*^{F/F}; *RipCre*; *RipTag* mice. Graphs are representative examples of 3 independent experiments. Data represent means \pm SEM. *** P < 0.001 (by student t -test).

2.2. Immunohistological analysis

Tumours and control tissues were collected and fixed in 4% formalin prior paraffin embedding.

Immunohistochemical staining (IHC) was revealed with diaminobenzidine (DAB) (DAB kit; Vector Laboratories, UK). For all IHC, heat-induced epitope retrieval was performed by immersion in antigen-unmasking solution (Vector Laboratories, UK) in a microwave oven for 15 min. Cultured cells were seeded on glass coverslips and fixed with 4% PAF. Immunofluorescence samples were counterstained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories, UK). Used antibodies are as follow; ActivinB (H00003625-D01P, Abnova, USA), Menin (A300-106A, Bethyl Laboratories Inc., USA), H3K27me3 (C36B11, Cell Signaling, USA). Analysis were acquired on an Eclipse-NIE NIKON microscope and analysed using NIS-Elements Software.

2.3. Cell culture

Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were isolated from E12.5dpc *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} littermate embryos and maintained in DMEM 4.5 mM glucose culture medium completed as previously reported [24]. β mT1 and β mT5 cells were established from mouse *Men1*^{F/F}; *RipCre*; *RipTag* insulinoma tumours and maintained in culture in 11 mM Glucose RPMI medium supplemented with 20% FCS, Hepes 10 mM, Pyruvate 1 mM and 50 μ M of β Mercaptoethanol. Generation and culture of the MA10 and Menin-deficient LCT10 Leydig tumour cell line have been described before [25,26]. GSK343 and GSK126 Ezh2-inhibitor (Selleckchem, USA) were solubilized in DMSO according to manufacturer instruction and used at a final concentration of 10 μ M and 5 μ M respectively. Transient and stable re-expression of Menin in *Men1*^{KO} MEF was respectively achieved by Lipofectamine transfection (Invitrogen, USA) or by lentival infection following antibiotic selection. Inhibition of AKT was achieved through the use of 10 μ M of LY2940002 (Calbiochem, USA) and 2 μ M of MK-2206 inhibitors (Selleckchem, USA) while stimulation of AKT signalling was obtained following 30 nM Insulin stimulation (Actrapid™, NovoNordisk, Denmark).

2.4. Chromatin immunoprecipitation and PCR analysis

Chromatin for ChIP was prepared from 5 millions of Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs). Briefly, cells were fixed in 1% formaldehyde for 10 min, nuclei were obtained and lysed in 300 μ l ice-cold RIPA buffer prior Chromatin-DNA shearing with a Diogene Bioruptor. ChIP was performed using 5 μ g of anti-Menin antibody (A300-106A, Bethyl Laboratories Inc., USA), anti-H3K27me3 (C15410195, Diagenode, Belgium), anti-H3K4me3 (C15410003, Diagenode, Belgium), anti-Ezh2 (C15410039, Diagenode, Belgium), anti-Wdr5 (D9E11, Cell Signaling), anti-Ash2L (D93F6, Cell Signaling), anti-Suz12 (D39F6, Cell Signaling). Dynabeads® Protein G (10003D, Life Technologies, France) were used to retrieve Immunocomplexes. DNA was then extracted with phenol/chloroform/isoamylalcohol, following proteinase-K reverse-crosslinking. 2 μ l of IP-DNA or 2 ng of INPUT DNA were used for Real Time PCR analysis to quantify co-precipitated chromatin-DNA. Relative enrichment of a given promoter region obtained with a specific antibody was compared with Input DNA. A Blocks region on Chr17/19 was used as a negative control for Menin and H3K4me3 ChIPs, while the GAPDH TSS was chosen as a control for Ezh2 and H3K27me3 ChIPs. Primers used are as follow: *Inhbb* + 1000.Fw: 5'-TTCACTCTCCAGAGCGACTTG-3', *Inhbb* + 1000.Rev: 5'-GATCGGGTGAAGCGAAAGC-3', *Inhbb* + 500.Fw: 5'-CTCGGCACCTCTGTAAGAA-3', *Inhbb* + 500.Rev: 5'-TCTGGAGACTGAAGCGAAGG-3', *Inhbb*-TSS.Fw: 5'-AGGCAAAGCGAAGAATCCT-3', *Inhbb*-TSS.Rev: 5'-CGGCCAAAAGTCTCTCTGTG-3', *Inhbb*-500.Fw: 5'-GGGTCTACCTGCATTGTTG-3', *Inhbb*-500.Rev: 5'-

TCGTCCCTTGAAGGCTCTAG-3', *Inhbb*-1000.Fw: 5'-CAGGCAATGTGTCTGGTCT-3', *Inhbb*-1000.Rev: 5'-CTAAACCAACCTCGCAGAAAG-3', *Gapdh*-TSS.Fw: 5'-TCAGGAGAGTGTGTTGTAAGT-3', *Gapdh*-TSS.Rev: 5'-GGAGATTGCTACGCCATA-3', *Chr17/19*.Fw: 5'-CTTAGAGACCCACCACCTTTG-3', *Chr17/19*.Rev: 5'-AAGGCTTCCAGGATTTC-3'. Results are shown as Fold of enrichment. Percentage of input of all experiments are provided in Supplemental Fig. 1.

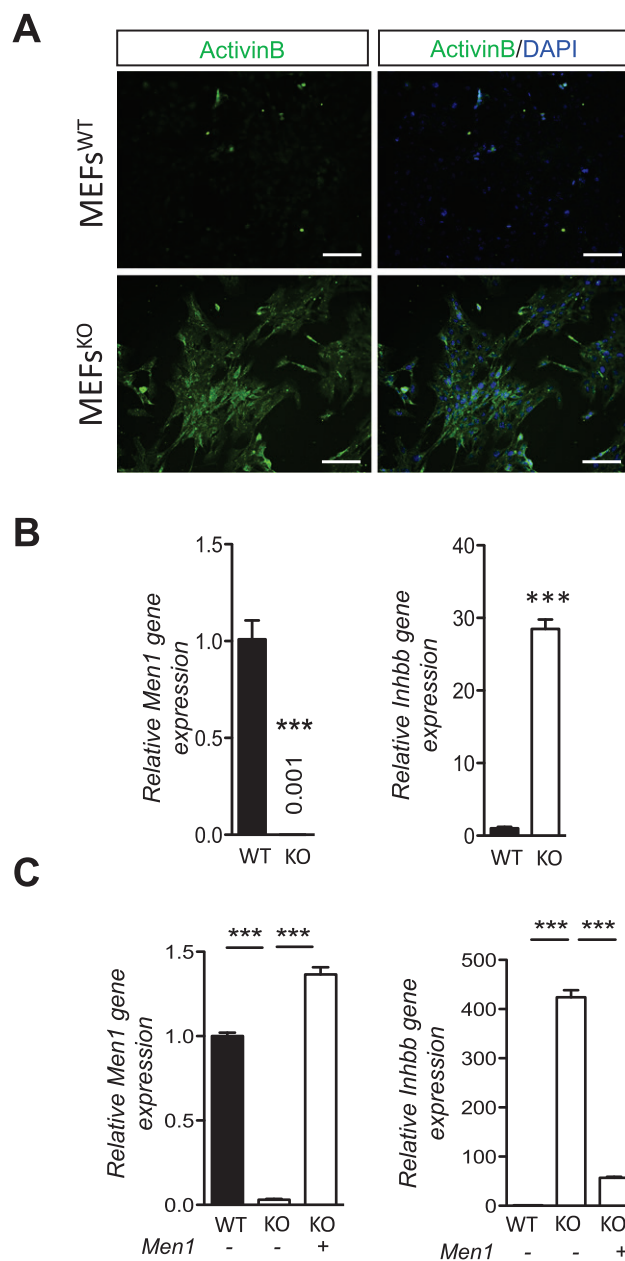


Fig. 2. ActivinB is repressed by Menin in mouse embryonic fibroblastic (MEF) cell lines. (A) Analysis of ActivinB expression in WT (*Men1*^{WT}) and Menin KO (*Men1*^{KO}) MEFs. Representative pictures of an ActivinB immunofluorescent staining counterstained with DAPI. (B) Quantitative PCR analysis of *Men1* and *Inhbb* gene expression in *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} MEFs. (C) Quantitative PCR analysis of *Men1* and *Inhbb* gene expression in *Men1*^{KO} MEFs rescued for Menin expression by transient transfection. *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} MEFs are used as reference controls. Graphs are representative examples of 3 independent experiments. Data represent means \pm SEM. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 (by student *t*-test).

2.5. Real-time reverse transcriptase-PCR and western blot

RNA were extracted using RNeasy-Kits (Qiagen, Valencia, USA). Real-Time PCR analyses were carried out on a Step-One RT-System (Applied-Biosystem, France) using SYBR-Green (Life-Technology, France) and results of each samples normalized to *Tbp*. Primer-sequences are available upon request. For Western-Blots, histones were obtained from an acid-protein extraction as reported previously [27], quantified using a Bradford protein assays and resolved on 12% acrylamide gel. Antibodies used for detection are as follow: H3K27me3 (C36B11, Cell Signaling, USA), H3K4me3 (C15410003, Diagenode, Belgium) and Histone H3 (ab1791, Abcam, UK).

3. Results

3.1. Menin inactivation is associated with ActivinB induced-expression in mouse tumour and derived cell lines

Having previously shown that loss of Menin in endocrine pancreatic β -cell results in tumours that overexpress ActivinB [17], we analysed whether ActivinB was expressed in other tumours associated with *Men1* ablation. To that extent, we investigated ActivinB expression in Leydig cells tumours that develop in *Men1*^{Het} mice [3] as well as in MA10 and LCT10 Leydig tumour-derived cell lines that respectively express or lack Menin [26]. First, as expected, we found Insulinomas developing from *Men1*^{F/F};*RipCre* animals to show a strong expression of ActivinB (Fig. 1A). More importantly our immunohistological analysis of ActivinB expression revealed that *Men1*-Leydig cell tumours present a strong ActivinB immunoreactivity (Fig. 1B), a result further confirmed by the increased mRNA expression we could detect in the *Men1*-deficient LCT10 Leydig-tumour cells (Fig. 1C). To test whether ActivinB was specifically controlled by Menin, we combined a model of

Insulinoma based on the expression of the large T antigen from Sv40 (*RipTag*) [22] with the *Men1*^{F/F};*RipCre* mouse model. We found *Men1*^{F/F};*RipCre*;*RipTag* compound mutant mice to develop insulinomas that originate both from *Men1* disruption or solely T antigen expression as shown by Menin immunohistochemistry (Fig. 1D). Interestingly, ActivinB expression was only detected in insulinoma lesions lacking Menin expression while T antigen derived-insulinomas show no ActivinB immunoreactivity (Fig. 1D). We further validated these observations using β mT5 and β mT1 insulinoma-derived cell lines that respectively express *Men1* or lack *Men1* expression (Fig. 1E). Together these observations suggest that a strong correlation exist between Menin loss of function and ActivinB induced expression both *in vivo* and *in vitro*.

3.2. *Inhbb* gene expression is induced in *Men1* KO fibroblast and abolished by the re-expression of Menin

Knowing that Menin disruption is specifically associated with tumorigenesis in endocrine tissues [3], we next thought to determine whether ActivinB-induced expression triggered by Menin ablation was specific to endocrine tissues and cells lines. To approach this question, we investigated ActivinB expression in *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) derived from littermate E12.5dpc embryos. While we found ActivinB to be expressed in *Men1*^{KO} MEFs, we did not detect its expression in matching WT control suggesting that the lack of Menin in those cells might contribute to ActivinB expression (Fig. 2A). Similar results were obtained from a duplicate pair of matching WT and KO littermate MEFs (data not shown). These observations were further validated at the RNA level since we found a 30-fold increase of *Inhbb* gene in MEFs lacking *Men1* expression (Fig. 2B). More interestingly, the reintroduction of Menin expression in *Men1*^{KO}

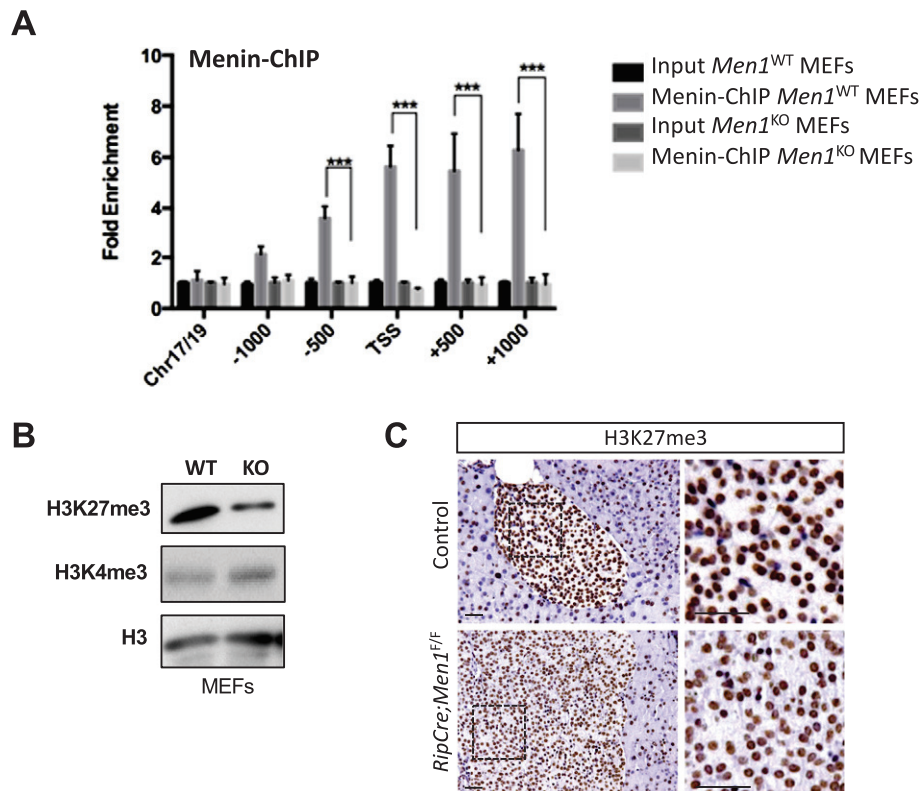


Fig. 3. Menin inactivation results in its lack of binding on the *Inhbb* promoter and a general decreased of H3K27me3 marks both in MEFs and islets tumours. (A) Quantitative qPCR analysis of Menin binding on the $-1000/+1000$ area flanking the *Inhbb* Transcription starting site (TSS: Transcription Starting Site). Chr17/19 represent a negative region used for reference. (B) Western-blot analysis of total H3K27me3 and H3K4me3 marks in *Men1*^{WT} (WT) and *Men1*^{KO} (KO) MEFs. (C) Immunohistological analysis of H3K27me3 expression in Insulinoma developed by *Men1*^{F/F};*RipCre* mice at the age of 8 months.

MEFs resulted in a significant reduction of *Inhbb* expression (Fig. 2C) supporting the direct role of Menin expression in ActivinB expression.

3.3. Menin binds the *Inhbb* gene promoter in fibroblasts and impacts H3K27me3 marks both in vitro and in vivo

Menin has been reported to bind DNA and interact with a large number of transcription factors to contribute to gene expression [8,28]. Therefore, we thought to determine whether Menin regulates ActivinB expression thought a direct binding on the *Inhbb* promoter loci. To that extent, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays on *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} MEFs, using an anti-Menin antibody. Interestingly, ChIP assays showed that Menin was bound to the *Inhbb* locus in the *Men1*^{WT} cells but not in *Men1*^{KO} cells (Fig. 3A). Based on Menin

association with trithorax family histone methyltransferase complex [29] and Polycomb (PcG) repressing complex [14,15], we next tested the impact of Menin ablation on histone modifications. We first investigated how the lack of Menin affects H3K4me3 and H3K27me3 marks that are respectively associated with positive [7,30] and negative gene transcription mediated by Menin [31]. Following histone extraction, we found that cellular H3K27me3 marks were strongly diminished in *Men1*^{KO} MEFs compared to *Men1*^{WT} littermate controls (Fig. 3B). Surprisingly, we did not find H3K4me3 marks to be affected in *Men1*^{KO} nor *Men1*^{WT} cells (Fig. 3B). Immunohistological analysis of H3K27me3 marks on Insulinomas tissues sections further confirmed a reduction of those marks in tumour cells following Menin ablation (Fig. 3C) suggesting that Menin contributes to the overall modulation of the methylation of histone H3K27 marks both in cells and insulinomas.

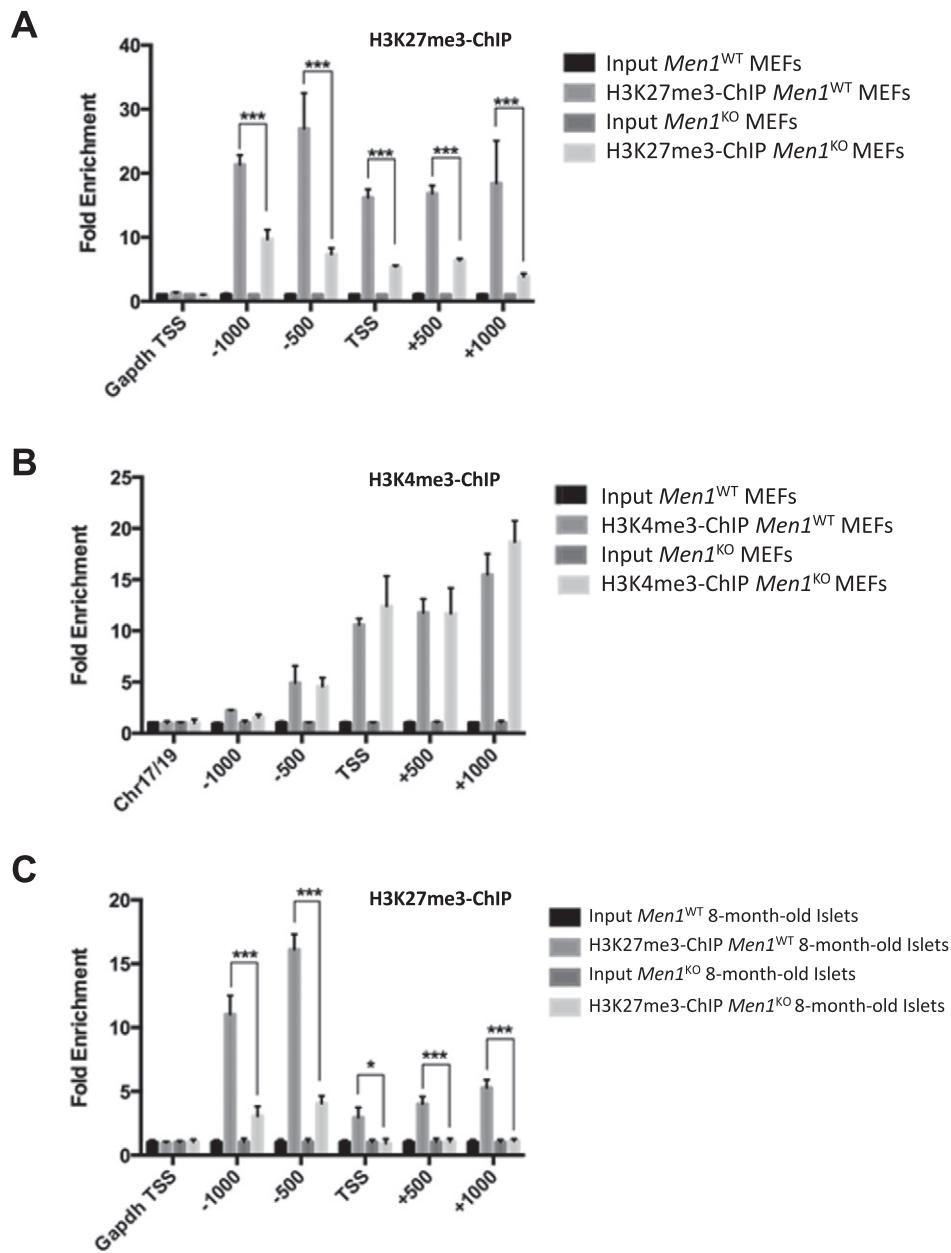


Fig. 4. Menin ablation reduced H3K27me3 occupancy on the *Inhbb* gene both in *Men1*^{KO} MEFs and isolated Insulinoma Tumour. (A and B) Quantitative qPCR analysis of H3K27me3 (A), H3K4me3 (B) binding on the –1000/+1000 area flanking the *Inhbb* Transcription starting site (TSS: Transcription Starting Site). Experiments were done following H3K27me3- and H3K4me3-antibody-Based-ChIP done on both *Men1*^{WT} (WT) and *Men1*^{KO} (KO) MEFs. (C) Quantitative qPCR analysis of H3K27me3 occupancy of the –1000/+1000 area flanking the *Inhbb* gene in both *Men1*^{F/F} and *Men1*^{F/F};RipCre isolated tumour islets at 8 months of age. Chr17/19 and GAPDH TSS represent negative regions used as negative background monitoring for H3K27m3 and H3K4me3 distributions.

3.4. Lack of Menin impacts H3K27 trimethylation and the occupancy of H3K27me3 marks on the *Inhbb* gene promoter locus

Having found that H3K27me3 marks were reduced in *Men1*^{KO} cell and tumours, we next performed ChIP-assays using antibodies capable of immunoprecipitating specifically H3K4me3 and H3K27me3 marks to investigate histone methylation at the *Inhbb* gene promoter locus. Consistent with the overall reduced H3K27me3 mark seen in *Men1*^{KO} cells, we found that the *Inhbb* – 1000/+1000 promoter region was showing less enrichment in H3K27me3 marks (Fig. 4A). On the contrary to this observation, ChIP-assays performed using H3K4me3 antibody did not reveal any significant changes in the occupancy of the H3K4me3 marks on the *Inhbb* promoter (Fig. 4B) suggesting that the loss of Menin in MEF cells impacts specifically the functions of the PcG complexes without altering the trithorax/MLL complexes as reported

previously for the *PTN* gene in lung adenocarcinomas [14]. Interestingly, analysis of Wdr5 and Ash2L binding at the *Inhbb* locus did confirm that the lack of Menin was not affecting the recruitment these 2 core proteins of the of Mll-complex at this location (Supplemental Fig. 2). Moreover, these findings suggest that Menin represses *Inhbb* gene transcription at least in part through H3K27me3 at the *Inhbb* locus. We next investigated whether this results could be confirmed *in vivo*. Thus, we performed H3K27me3-based ChIP-assays on hand-picked pancreatic islets isolated from 8 month-old-wild type and *Men1*^{F/F}; *RipCre* mice. As shown in Fig. 4C, we found that H3K27me3 marks were occupying the *Inhbb* – 1000/+1000 promoter region whereas it was strongly reduced in age-matched insulinomas tumour isolated from *Men1*^{F/F}; *RipCre* (Fig. 4C). Combined with our previous observation, this result provides the first direct evidence that Menin inhibits *ActivinB* expression by binding to the *Inhbb* locus through a modification of the trimethylation of Histone H3K27 marks.

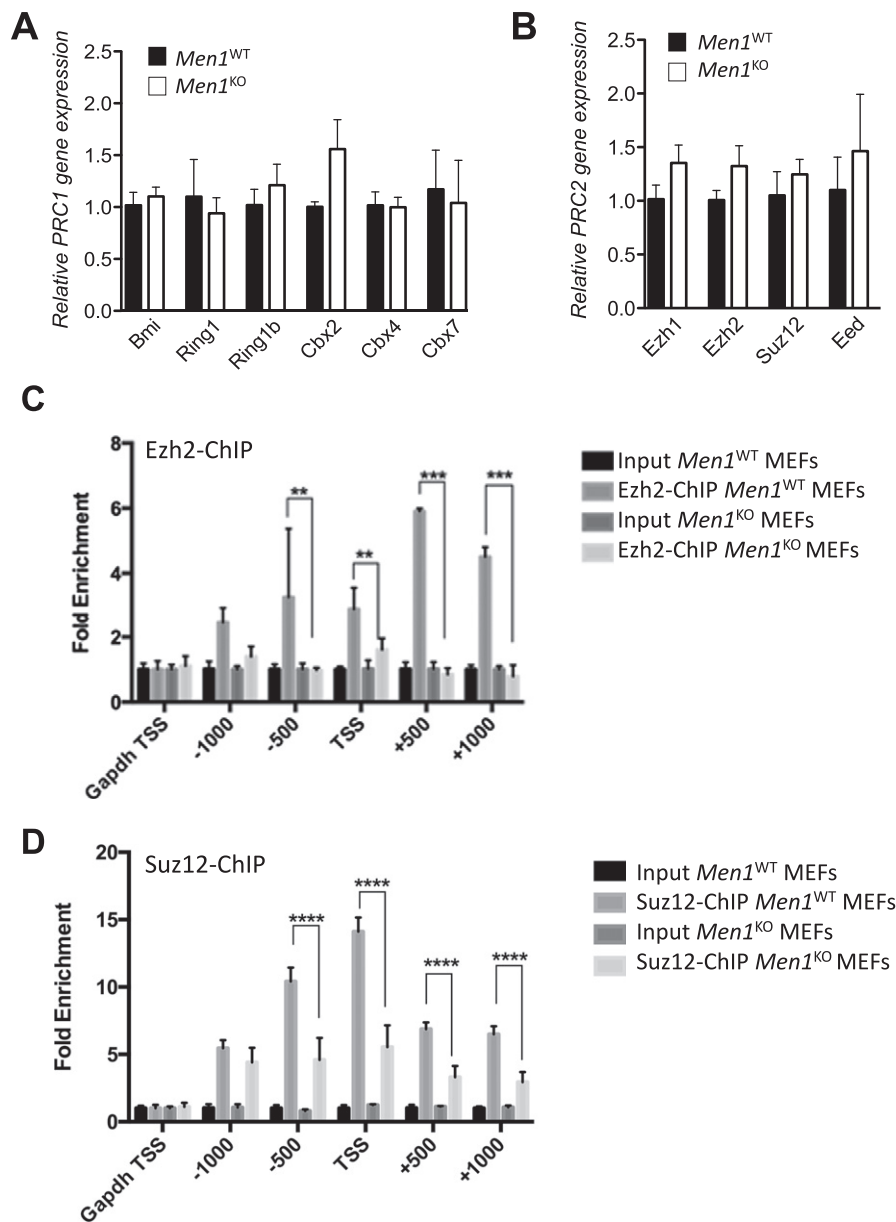


Fig. 5. Men1 ablation alter Ezh2 binding to the *Inhbb* promoter region without altering the expression of the core members of PRC1 and PRC2 complexes. (A and B) Quantitative PCR analysis comparing the expression of the gene encoding PRC1 (A) and PRC2 (B) core member in *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} MEFs. Graphs are representative examples of 3 independent experiments. (C and D) Quantitative qPCR analysis of Ezh2 (C) and Suz12 (D) binding on the – 1000/+1000 area flanking the *Inhbb* Transcription starting site (TSS: Transcription Starting Site). GAPDH TSS represent a negative region lacking Ezh2 and Suz12 binding and used as background reference. Representative from a triplicate Ezh2- and Suz12-immunoprecipitated chromatin isolated from *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} MEFs are shown. Data represent means \pm SEM. ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 (by student *t*-test).

3.5. Menin disruption abolishes Ezh2 binding to the *Inhbb* gene promoter locus without altering the expression of members of the PRC1 and PRC2 complexes

Histone H3 lysine 27 trimethylations are catalysed by the SET domain of Ezh2 that is part of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) [32]. Thus, we thought to determine whether the loss of H3K27me3 marks observed in Menin ablated cells was caused by a misregulated-expression of PRC complex-members. Quantitative RT-PCR analysis of gene expression of both PRC1 and PRC2 component factors reveals no significant differences of PRC1 (*Bmi*, *Ring1*, *Ring1b*, *Cbx2*, *Cbx4* and *Cbx7*) and PRC2 (*Ezh1*, *Ezh2*, *Suz12* and *Eed*) core proteins expression in *Men1*^{KO} MEFs compared to WT control cells (Fig. 5A and B). Having found a comparable expression of PcG complex members, we thought to address whether PRC2 was bound to the *Inhbb* promoter region. Interestingly we found Ezh2 binding to the *Inhbb* promoter regions be abolished in *Men1*^{KO} cells compared to WT control MEFs (Fig. 5C) suggesting that Menin contributes to the recruitment of PRC2 at the *Inhbb* gene promoter to trimethylate H3K27 at this locus. Previous work has proposed that the recruitment of PRC2 by Menin was indirect and could possibly take place through the core protein Suz12 [14]. Using Suz12-ChIP we further confirm this was indeed the case at the *Inhbb* promoter (Fig. 5D).

3.6. Chemical inhibition of Ezh2-mediated trimethylation of H3K27 marks induces ActivinB expression in *Men1*^{WT} MEFs

Next we wanted to determine whether a forced inhibition of H3K27me3 marks could result in a direct ActivinB induced-expression. To that extent, we used GSK343 and GSK126, two published inhibitors

of Ezh2 [33,34]. We first confirmed the efficacy of both these inhibitors in *Men1*^{WT} MEFs exposed to 48 h stimulation with 10 μ M GSK343, 3 μ M GSK126 or DMSO. As shown in Fig. 6A, we found that 10 μ M of GSK343 and 3 μ M of GSK126 were sufficient to induce a robust decrease of the H3K27me3 marks in *Men1*^{WT} MEFs, although we found some cells to express comparable level of H3K27me3 marks compared to DMSO-treated cells (Fig. 6A). Quantification of H3K27me3 inhibition revealed that 75% and 50% of *Men1*^{WT} MEFs cells had lost H3K27me3 marks when stimulated with GSK343 and GSK126 respectively (Fig. 6A). Following this observation, we found that *Men1*^{WT} MEFs treated with GSK343 or GSK126 were respectively showing a 3- and 2.5-fold-increased *Inhbb* gene expression compared to matching DMSO-treated controls (Fig. 6B). Finally, we further confirmed these observation at the protein level, showing that ActivinB expression could be detected in *Men1*^{WT} MEFs by immunofluorescent staining (Fig. 6C). Quantification of *Inhbb* immunoreactive cells further confirmed that 91,15% \pm 2,26 and 30,66% \pm 3,6 of *Men1*^{WT} MEFs were showing expression of ActivinB following GSK343 and GSK126 treatments (Fig. 6C).

3.7. Ezh2-binding on the *Inhbb* promoter is mediated by AKT-activity

Having found that Ezh2 binding to the *Inhbb* promoter region was abolished in *Men1*-KO cells, we next questioned how Menin ablation could drive this process. Previous work has shown that Akt suppresses Ezh2 methyl-transferase activity by impeding its binding to histone H3 [35]. Interestingly, Menin has been shown to be a negative regulator of AKT kinase activity in pancreatic islet adenomas [36]. To that extent, we analysed Akt activity in *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} MEFs and found that *Men1*^{KO} cells were showing a robust phosphorylation of Akt compared to *Men1*^{WT} MEFs, while the relative expression of total Akt was

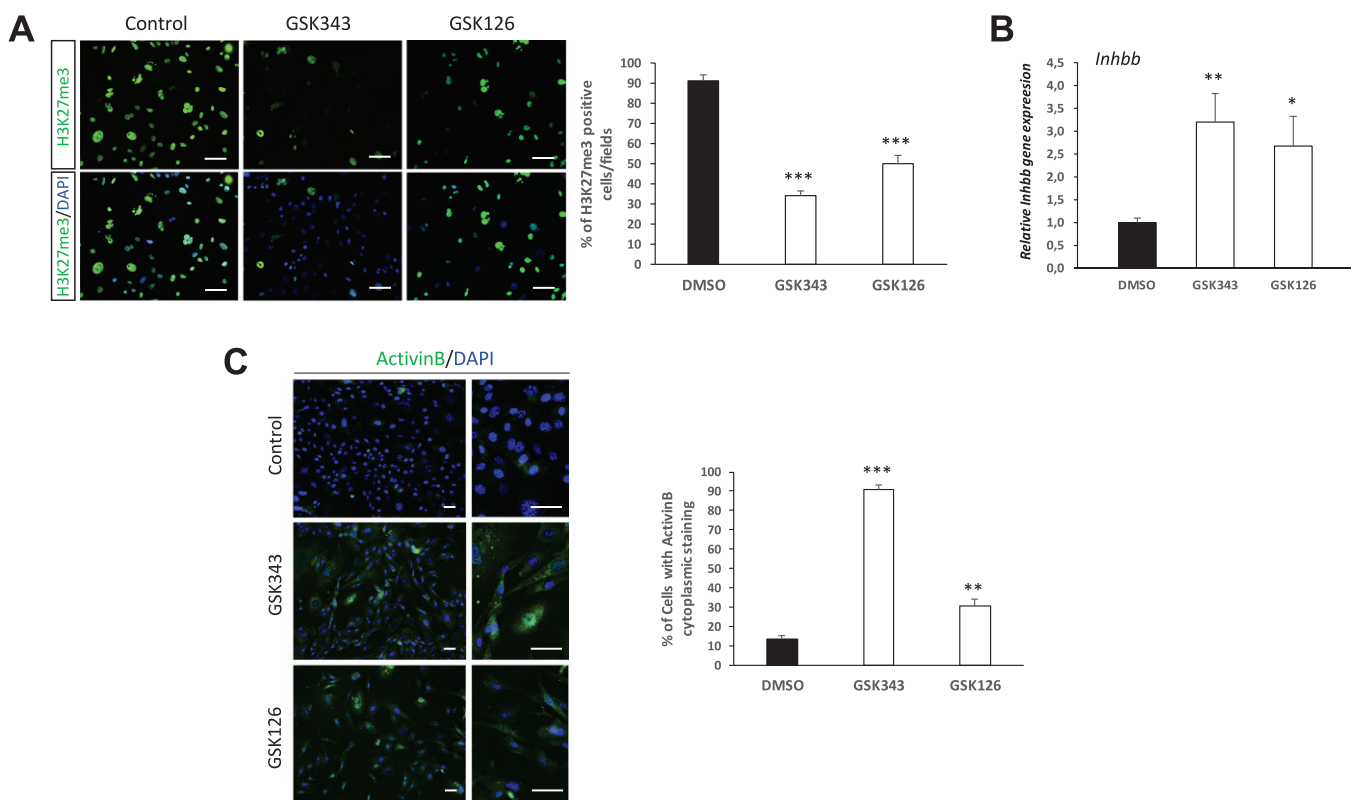


Fig. 6. H3K27me3 inhibition results in ActivinB induced-expression in *Men1*^{WT} Fibroblasts. (A) Immunohistological analysis of H3K27me3 marks in *Men1*^{WT} MEFs following 72 h stimulation using 10 μ M of GSK343 or 3 μ M of GSK126. Representative pictures of a H3K27me3 immunofluorescent staining counterstained with DAPI are shown. Graph shows the % of cells that retain a H3K27me3 staining following treatments. (B) Quantitative PCR analysis of *Inhbb* gene in *Men1*^{WT} MEFs treated with GSK343, GSK126 or DMSO. (C) Analysis of ActivinB expression in *Men1*^{WT} MEFs following GSK343 or DMSO treatments. Representative pictures of a ActivinB immunofluorescent staining counterstained with DAPI are shown. Right panels are magnified view of left panels. Graph shows the % of cells that demonstrate a positive ActivinB cytoplasmic staining following treatments. Graphs are representative examples of 3 independent experiments. Data represent means \pm SEM. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 (by student t -test).

comparable between those cells (Fig. 7A). Interestingly we noted that Ezh2 protein level was slightly increased in *Men1*^{KO} MEFs compared to WT control cells, a result consistent with the moderate yet not significant increased expression found at the RNA level (Fig. 5A). We next thought to analyse whether a modulation of AKT activation was impacting Ezh2 recruitment to the *Inhbb* gene promoter. To do so, we performed Ezh2-ChIP on *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} MEFs stimulated with Insulin or treated with the Akt-inhibitor MK-2206 [37]. By this mean, we aimed at respectively inducing or inhibiting Akt-Phosphorylation in *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} cells. Analyses of Ezh2-ChIPs shows that 6 h Insulin stimulation was sufficient to reduce significantly Ezh2 binding to 3 regions flanking the TSS of the *Inhbb* gene (Fig. 7B). On the contrary, Ezh2-ChIPs performed on *Men1*^{KO} cells following 24 h' treatment with MK2206 demonstrated an enrichment of Ezh2 on the – 1000 to + 500 region flanking *Inhbb*' TSS (Fig. 7C). Altogether these results support that the increased phosphorylation of Akt observed in *Men1*^{KO} cells may play a major role in the induced expression of *Inhibinbb* likely through a reduced binding of Ezh2 to the *Inhbb* locus.

3.8. Modulation of AKT-phosphorylation drives *Inhibinbb* expression in *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} MEFs

We next tested whether modulating Akt activation in *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} MEFs could respectively induce or inhibit the expression of *Inhibinbb* in those cells. Using insulin as an inducer of Akt activation, we first checked that *Men1*^{WT} cells were showing an increased Akt-phosphorylation. As shown in Fig. 8A, we found that phosphorylation of Akt was indeed induced in WT MEFs, while neither total Akt nor Ezh2 expression was altered by insulin in these cells. More interestingly,

using quantitative RT-PCR, we showed that *Inhibinbb* was induced in *Men1*^{WT} MEFs, confirming that the reduced binding of Ezh2 found in those cells was impacting *Inhbb* gene expression (Fig. 8B). Furthermore, the use of MK-2206 as well as LY-294002, 2 published Akt-inhibitors confirmed the opposite results in *Men1*^{KO} MEFs, showing that the reduced phosphorylation of Akt (Fig. 8C) was associated with a decreased expression of *Inhibinbb* (Fig. 8D). These results confirm that the role of Menin on Akt activation and its subsequent action on Ezh2 affinity for the *Inhbb* locus represent a novel mechanism controlling *Inhibinbb* expression.

4. Discussion

Epigenetic gene regulation plays essential role for development of organisms, cell differentiation and cancer progression. While the role of Menin had been clearly demonstrated in MLL-mediated H3K4 histone methylation [6,13,38,39], less was known about its potential role in PcG-mediated gene regulation. Here our work identifies the *Inhbb* gene, encoding for ActivinB, as a direct target of Menin gene repression through Ezh2, the PRC2-methyltransferase that catalyses H3K27 repressive trimethylation. More importantly, our results highlight that *Inhbb* expression is induced in several cell lines including MEFs that have lost Menin expression as well as in *Men1*-deficient tumours. These observations underline the importance of Menin and PRC2 in the regulation of *Inhbb* expression in pancreatic and testicular endocrine tissues, and thus provide a mechanism explaining the origin of the ectopic ActivinB expression we previously reported in insulinomas [17]. Using ChIP analyses, we further demonstrate that the co-occupancy of the *Inhbb* gene promoter by Ezh2, H3K27me3 and Menin found in

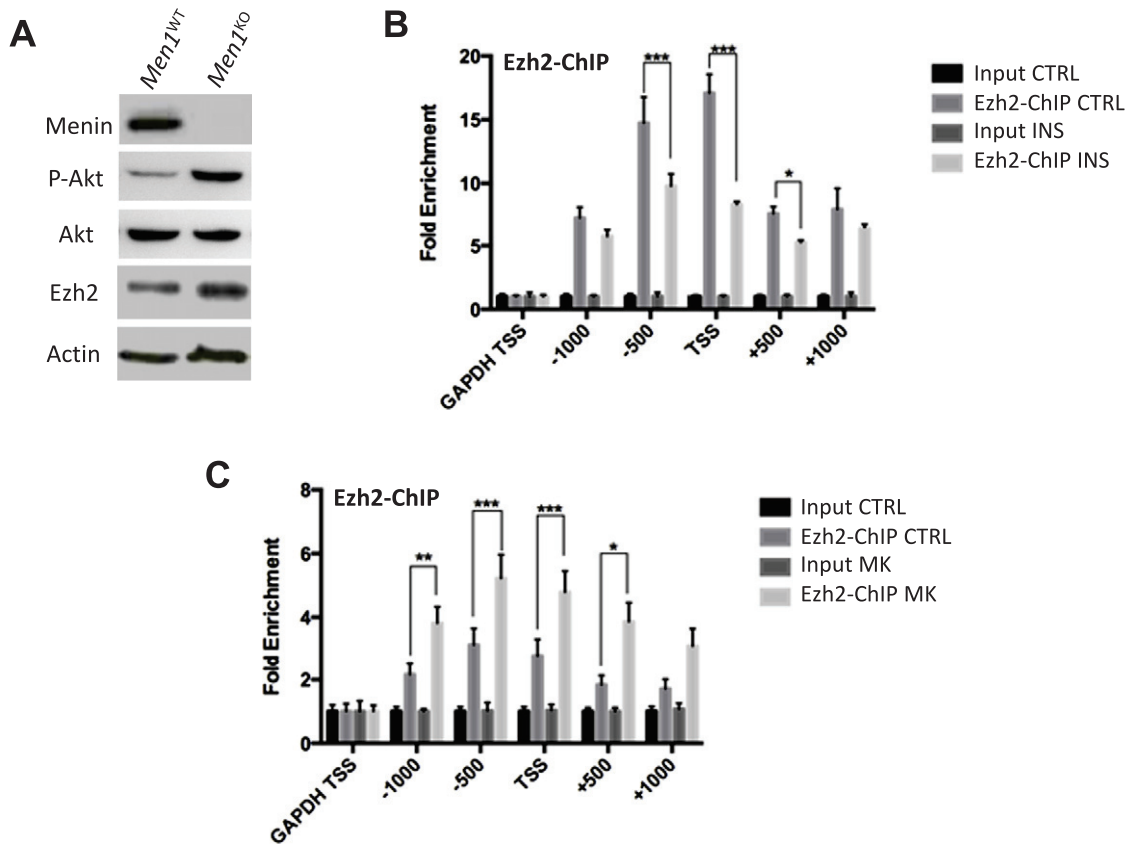


Fig. 7. Akt activity is induced in Menin deficient MEFs, and modulate Ezh2 occupancy on the *Inhbb* gene promoter. (A) Western-blot analysis of Menin, P-Akt, Akt and Ezh2 in cultured *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} MEFs. Note the robust Phosphorylation of Akt that is seen in KO cells compared to WT. (B and C) Quantitative qPCR analysis of Ezh2 occupancy on the – 1000/+ 1000 area flanking the *Inhbb* Transcription starting site (TSS: Transcription Starting Site). Analysis were done following Ezh2-antibody Based-ChIP performed on (B) non-treated (CTRL) or 6 h Insulin-stimulated (INS) *Men1*^{WT} MEFs and (C) non-treated (CTRL) or 24 h MK2206-stimulated (MK) *Men1*^{KO} MEFs. GAPDH TSS represents a negative region lacking Ezh2 binding and used as background reference. Data represent means \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ (by student *t*-test).

Men1^{WT} cells is lost in *Men1*^{KO} cells, suggesting a direct role of Menin in the recruitment of PRC2 to the *Inhbb* promoter. This conclusion is consistent with the fact that Menin and Ezh2 have previously been shown to co-occupy a large number of promoters [16]. To our knowledge, our observation represents the first evidence that Menin is involved in transcriptional inhibition in endocrine tissues prone to develop endocrine tumours associated with the MEN1 syndrome (i.e. Insulinoma and Leydig tumours). These results support therefore the importance of Menin for the inhibition of gene expression through PcG and H3K27me3 epigenetic marks that was initially reported for *Ptn*, the Pleiotropin encoding gene, in lung adenocarcinoma [14] and for *Pax2* in *Men1*^{KO} MEFs [15]. Interestingly, we found that Menin ablation was not significantly altering the expression of PRC1 and PRC2 core proteins, consistent with Gao et al. observation showing that Ezh2 and Suz12 expression are not altered in *Men1* ablated MEFs cells [15]. Nevertheless it is important to note that we found *Men1*^{KO} MEFs to present a slight increase of Ezh2 expression as suggested by our western blot analysis (Fig. 7A). This might suggest that Ezh2 might be stabilized in *Men1*^{KO} cells based on the fact that we did not find *Ezh2* transcript to be increased in those cells. More importantly, this observation suggests that yet Ezh2 might be slightly induced in *Men1*^{KO} MEFs, it does not result in an increased trimethylation of H3K27 marks at the *Inhbb* locus, supporting therefore a major role of Menin in controlling Ezh2 function at the *Inhbb* promoter locus.

Taken together these observations suggest that Menin is involved in the regulation of H3K27me3 marks by PRC2 rather than in the regulation of the PcG proteins themselves. It further supports that Menin could take an important part in contributing to the epigenetic repressive landscape in many cell type and tissues.

While Menin contribution to gene silencing through the recruitment of PRC2 is becoming evident, the involved mechanisms controlling this process remain elusive and further complicated by the absence of

existing interaction between Menin and Ezh2 [15]. Goa et al. have proposed that the recruitment of PRC2 by an indirect interaction between Menin is and the PRC2 core protein Suz12 at the *Pax2* promoter [14]. Interestingly, Suz12 based ChIP-sequencing demonstrates the existence of a binding of Suz12 to the promoter of the *Inhbb* gene [40], suggesting that Menin may also recruit PRC2 at the *Inhbb* gene promoter through an interaction with Suz12, a results confirmed by our analysis (Fig. 5D).

Beside the possible interaction between Menin et Suz12, our work reports the existence of a functional interaction between Menin and Ezh2 through an activation of Akt signalling. This observation is consistent with published work reporting that the phosphorylation of Ezh2 at serine 21 by Akt suppresses its methyltransferase activity, impedes its binding to histone H3 and results in a decrease of lysine 27 trimethylation that causes de-repression of silenced genes [35,41]. While our work supports the importance of Akt in Ezh2-functional inhibition through the identification of *Inhbb* as a target gene of this regulation, gene, it further demonstrates that Menin's role in PRC2 complex recruitment might be mediated through Akt signalling. This hypothesis is further supported by the known role of Menin in the inhibition of Akt activation that has been reported in mouse islet adenoma [36]. Our work further highlights the need to explore the phosphorylation of Ezh2 in cellular and animal model that are depleted for Menin in order to address its exact participation in the Akt/Ezh2/H3K27me3 axis.

Our results clearly support that Menin ablation results in a general reduction of H3K27me3 marks both *in vitro* and *in vivo*. Such reduction is further consistent with the decreased occupation of H3K27me3 marks on the *Inhbb* promoter and the increased ActivinB expression we found in *Men1*^{KO} cells and islet-tumours developed by our *Men1*^{F/F}; *RipCre* mouse model. While this observation is consistent with previous published work on Menin's role in *Ptn* and *Pax4* inhibition [14,15] it could appear conflicting considering the work recently published by Lin et al. that demonstrates the existence of a H3K27me3 enrichment

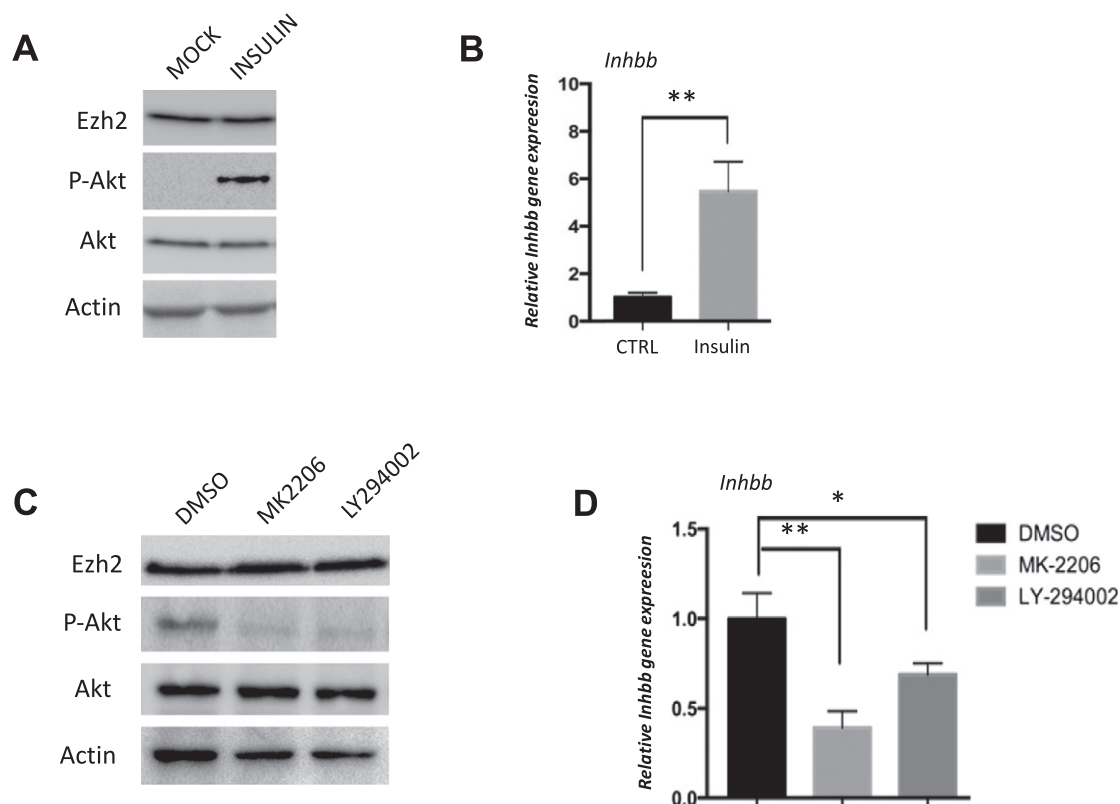


Fig. 8. Modulation of Akt Signalling in *Men1*^{WT} and *Men1*^{KO} MEFs controls Inhibinbb expression. (A) Western blot analysis of Ezh2, P-Akt and Akt protein expression in *Men1*^{WT} MEFs used for Insulin stimulations. (B) Quantitative PCR analysis of *Inhbb* gene expression in *Men1*^{WT} MEFs following (INS) or not (CTRL) 6 h insulin stimulation. (C) Western blot analysis of Ezh2, P-Akt and Akt protein expression in *Men1*^{KO} MEFs used for MK2206 and LY294002 stimulations. (D) Quantitative PCR analysis of *Inhbb* gene expression in *Men1*^{KO} MEFs following 24 h treatments with MK2206, LY294002 or DMSO (CTRL).

in *Men1*-depleted islet-tumours [42]. Interestingly, Lin et al. report that the H3K27me3 enrichment they report is only taking place in a number of gene that present a significant concomitant reduction of H3K4me3 [42]. To that extent, it could be interesting to analysis the occupancy of both H3K27me3 and H3K4me3 marks on the locus of the *Inhbb* gene in their islets tumour model. We explored this possibility and performed a bioinformatics analysis of Lin et al.'s published ChIP-seq datasets (NCBI GEO repository number: GSE63020). This analysis revealed that the H3K4me3 marks were showing a solid enrichment covering the first exon of the *Inhbb* gene in both control and islet-tumours at all analysed ages. More interestingly, we found that the H3K27me3 marks were showing a slight decrease in *Men1*-KO tumour-islets at 12 months of age (data not shown), confirming our observations and supporting that *Inhibinbb* should also be expressed in Lin et al.'s model.

Finally, it is interesting to note that the dissection of the epigenetic consequences of Menin ablation on the onset of endocrine tumour developed by MEN1-patients have so far attracted more interest through the comprehension of its contribution to the compass-like MLL complex functions. On this basis, Menin had been proposed to suppresses endocrine tumorigenesis partly through enhancing MLL-mediated H3K4 methylation and upregulation of p18, p27 and *Igfbp2* expression [13, 38,42]. Here our work unravels that Menin ablation will also impact Polycomb repressing complexes functions in MEN1 endocrine pancreatic tumours by affecting the expression of a subset of H3K27me3-repressed gene. While most of these Menin-targeted genes remain to be identified, our work points *Inhbb* as one of these candidates that was previously demonstrated to play a major role in controlling the plasticity and MEN1-pancreatic tumours [17].

Our work highlights that *Inhibinbb* expression is likely controlled by the capacity of Menin to recruit PRC2 at the *Inhbb* promoter through Akt signalling; this recruitment ultimately driving the remodelling of H3K27me3 marks by *Ezh2* at the *Inhbb* locus. Our present work further underscores the need to identifying the candidate genes that are repressed by Menin through its functional interaction with PRC2. More importantly it points the importance of understanding the balanced-contribution of Menin ablation in the remodelling of H3K4 and H3K27 methylation and its consequence on the epigenetic landscape of endocrine cells to better comprehend the biology of MEN1-endocrine tumours as well as the role of Akt signalling in the functional regulation of *Ezh2* misregulated target genes in cancer.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaggm.2017.02.003>.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

We thank the animal care staff of ALECs-SFP (Lyon, France) and ANICAN (CRCL-Lyon, France) for maintenance of mouse strains. We are grateful to Dr Jorg Tost, Tharshana Stephen and Cyril Cuenin for valuable discussions and technical support with ChIP experiments. This work was supported by La Ligue contre le Cancer (CD42 and CD69), Lyon I University, Aviesan/INSERM (DEMENIS project), and the European Foundation for the Study of Diabetes (EFS/AZ cellular plasticity program 2014). D.R. and R.T. were supported by fellowships from the French Ministry of Education and Research and La Ligue.

References

- [1] S.C. Chandrasekharappa, S.C. Guru, P. Manickam, S.E. Olufemi, F.S. Collins, M.R. Emmert-Buck, L.V. Debelenko, Z. Zhuang, I.A. Lubensky, L.A. Liotta, J.S. Crabtree, Y. Wang, B.A. Roe, J. Weisemann, M.S. Boguski, S.K. Agarwal, M.B. Kester, Y.S. Kim, C. Heppner, Q. Dong, A.M. Spiegel, A.L. Burns, S.J. Marx, Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1, *Science* 276 (1997) 404–407.
- [2] R.V. Thakker, P.J. Newey, G.V. Walls, J. Bilezikian, H. Dralle, P.R. Ebeling, S. Melmed, A. Sakurai, F. Tonelli, M.L. Brandi, S. Endocrine, Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (2012) 2990–3011.
- [3] P. Bertolino, W.M. Tong, D. Galendo, Z.Q. Wang, C.X. Zhang, Heterozygous *Men1* mutant mice develop a range of endocrine tumors mimicking multiple endocrine neoplasia type 1, *Mol. Endocrinol.* 17 (2003) 1880–1892.
- [4] P. Bertolino, W.M. Tong, P.L. Herrera, H. Casse, C.X. Zhang, Z.Q. Wang, Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice, *Cancer Res.* 63 (2003) 4836–4841.
- [5] J. Lu, P.L. Herrera, C. Carreira, R. Bonnavion, C. Seigne, A. Calender, P. Bertolino, C.X. Zhang, Alpha cell-specific *Men1* ablation triggers the transdifferentiation of glucagon-expressing cells and insulinoma development, *Gastroenterology* 138 (2010) 1954–1965.
- [6] A. Yokoyama, T.C. Somerville, K.S. Smith, O. Rozenblatt-Rosen, M. Meyerson, M.L. Cleary, The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis, *Cell* 123 (2005) 207–218.
- [7] Y.X. Chen, J. Yan, K. Keeshan, A.T. Tubbs, H. Wang, A. Silva, E.J. Brown, J.L. Hess, W.S. Pear, X. Hua, The tumor suppressor menin regulates hematopoiesis and myeloid transformation by influencing Hox gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 1018–1023.
- [8] S. Matkar, A. Thiel, X. Hua, Menin: a scaffold protein that controls gene expression and cell signaling, *Trends Biochem. Sci.* 38 (2013) 394–402.
- [9] P.J. Zindy, A. L'Helgoualch, D. Bonnier, A. Le Behec, B. Bourd-Boitin, C.X. Zhang, O. Musso, D. Glaise, M.B. Troadec, O. Loreal, B. Turpin, J. Leger, B. Clement, N. Theret, Up-regulation of the tumor suppressor gene menin in hepatocellular carcinomas and its significance in fibrogenesis, *Hepatology* 44 (2006) 1296–1307.
- [10] I. Maillard, Y.X. Chen, A. Friedman, Y. Yang, A.T. Tubbs, O. Shestova, W.S. Pear, X. Hua, Menin regulates the function of hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors, *Blood* 113 (2009) 1661–1669.
- [11] A. Aziz, T. Miyake, K.A. Engleka, J.A. Epstein, J.C. McDermott, Menin expression modulates mesenchymal cell commitment to the myogenic and osteogenic lineages, *Dev. Biol.* 332 (2009) 116–130.
- [12] K.M. Dreijerink, R.A. Varier, O. van Beekum, E.H. Jeninga, J.W. Hoppener, C.J. Lips, J.A. Kummer, E. Kalkhoven, H.T. Timmers, The multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) tumor suppressor regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent adipocyte differentiation, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 5060–5069.
- [13] S.K. Karnik, C.M. Hughes, X. Gu, O. Rozenblatt-Rosen, G.W. McLean, Y. Xiong, M. Meyerson, S.K. Kim, Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 14659–14664.
- [14] S.B. Gao, Z.J. Feng, B. Xu, Y. Wu, P. Yin, Y. Yang, X. Hua, G.H. Jin, Suppression of lung adenocarcinoma through menin and polycomb gene-mediated repression of growth factor pleiotrophin, *Oncogene* 28 (2009) 4095–4104.
- [15] B. Xu, D.Q. Zeng, Y. Wu, R. Zheng, L. Gu, X. Lin, X. Hua, G.H. Jin, Tumor suppressor menin represses paired box gene 2 expression via Wilms tumor suppressor protein-polycomb group complex, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 13937–13944.
- [16] S.B. Gao, B. Xu, L.H. Ding, Q.L. Zheng, L. Zhang, Q.F. Zheng, S.H. Li, Z.J. Feng, J. Wei, Z.Y. Yin, X. Hua, G.H. Jin, The functional and mechanistic relatedness of EZH2 and menin in hepatocellular carcinoma, *J. Hepatol.* 61 (2014) 832–839.
- [17] D. Ripoché, J. Charbord, A. Hennino, R. Teinturier, R. Bonnavion, R. Jaafar, D. Goehrig, M. Cordier-Bussat, O. Ritvos, C.X. Zhang, O. Andersson, P. Bertolino, ActivinB is induced in insulinoma to promote tumor plasticity through a beta-cell-induced dedifferentiation, *Mol. Cell. Biol.* 36 (2015) 756–764.
- [18] T.S. Mikkelsen, M. Ku, D.B. Jaffe, B. Issac, E. Lieberman, G. Giannoukos, P. Alvarez, W. Brockman, T.K. Kim, R.P. Koche, W. Lee, E. Mendenhall, A. O'Donovan, A. Presser, C. Russ, X. Xie, A. Meissner, M. Wernig, R. Jaenisch, C. Nusbaum, E.S. Lander, B.E. Bernstein, Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells, *Nature* 448 (2007) 553–560.
- [19] A.A. Sharov, M.S. Ko, Human ES cell profiling broadens the reach of bivalent domains, *Cell Stem Cell* 1 (2007) 237–238.
- [20] G. Pan, S. Tian, J. Nie, C. Yang, V. Ruotti, H. Wei, G.A. Jonsdottir, R. Stewart, J.A. Thomson, Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells, *Cell Stem Cell* 1 (2007) 299–312.
- [21] M. Ku, R.P. Koche, E. Rheinbay, E.M. Mendenhall, M. Endoh, T.S. Mikkelsen, A. Presser, C. Nusbaum, X. Xie, A.S. Chi, M. Adli, S. Kasif, L.M. Ptaszek, C.A. Cowan, E.S. Lander, H. Koseki, B.E. Bernstein, Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains, *PLoS Genet.* 4 (2008), e1000242.
- [22] D. Hanahan, Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes, *Nature* 315 (1985) 115–122.
- [23] M. Patry, R. Teinturier, D. Goehrig, C. Zetu, D. Ripoché, I.S. Kim, P. Bertolino, A. Hennino, betaig-h3 represses T-cell activation in type 1 diabetes, *Diabetes* 64 (2015) 4212–4219.
- [24] P. Bertolino, I. Radovanovic, H. Casse, A. Aguzzi, Z.Q. Wang, C.X. Zhang, Genetic ablation of the tumor suppressor menin causes lethality at mid-gestation with defects in multiple organs, *Mech. Dev.* 120 (2003) 549–560.
- [25] M. Ascoli, Regulation of gonadotropin receptors and gonadotropin responses in a clonal strain of Leydig tumor cells by epidermal growth factor, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 179–183.
- [26] N. Hussein, H. Casse, S. Fontaniere, A.M. Morera, M.J. Asensio, S. Bakeli, J.L. Lu, I. Coste, N. Di Clemente, P. Bertolino, C.X. Zhang, Reconstituted expression of menin in *Men1*-deficient mouse Leydig tumour cells induces cell cycle arrest and apoptosis, *Eur. J. Cancer* 43 (2007) 402–414.
- [27] D. Shechter, H.L. Dormann, C.D. Allis, S.B. Hake, Extraction, purification and analysis of histones, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1445–1457.

- [28] P. La, A.C. Silva, Z. Hou, H. Wang, R.W. Schnepf, N. Yan, Y. Shi, X. Hua, Direct binding of DNA by tumor suppressor menin, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 49045–49054.
- [29] C.M. Hughes, O. Rozenblatt-Rosen, T.A. Milne, T.D. Copeland, S.S. Levine, J.C. Lee, D.N. Hayes, K.S. Shanmugam, A. Bhattacharjee, C.A. Biondi, G.F. Kay, N.K. Hayward, J.L. Hess, M. Meyerson, Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the *hoxc8* locus, *Mol. Cell* 13 (2004) 587–597.
- [30] J. Yan, Y.X. Chen, A. Desmond, A. Silva, Y. Yang, H. Wang, X. Hua, Cdx4 and menin co-regulate *Hoxa9* expression in hematopoietic cells, *PLoS One* 1 (2006), e47.
- [31] A.T. Thiel, Z. Feng, D.K. Pant, L.A. Chodosh, X. Hua, The trithorax protein partner menin acts in tandem with EZH2 to suppress *C/EBPalpha* and differentiation in MLL-AF9 leukemia, *Haematologica* 98 (2013) 918–927.
- [32] R. Cao, L. Wang, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R.S. Jones, Y. Zhang, Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing, *Science* 298 (2002) 1039–1043.
- [33] S.K. Verma, X. Tian, L.V. LaFrance, C. Duquenne, D.P. Suarez, K.A. Newlander, S.P. Romeril, J.L. Burgess, S.W. Grant, J.A. Brackley, A.P. Graves, D.A. Scherzer, A. Shu, C. Thompson, H.M. Ott, G.S. Aller, C.A. Machutta, E. Diaz, Y. Jiang, N.W. Johnson, S.D. Knight, R.G. Kruger, M.T. McCabe, D. Dhanak, P.J. Tummino, C.L. Creasy, W.H. Miller, Identification of potent, selective, cell-active inhibitors of the histone lysine methyltransferase EZH2, *ACS Med. Chem. Lett.* 3 (2012) 1091–1096.
- [34] M.T. McCabe, H.M. Ott, G. Ganji, S. Korenchuk, C. Thompson, G.S. Van Aller, Y. Liu, A.P. Graves, A. Della Pietra III, E. Diaz, L.V. LaFrance, M. Mellinger, C. Duquenne, X. Tian, R.G. Kruger, C.F. McHugh, M. Brandt, W.H. Miller, D. Dhanak, S.K. Verma, P.J. Tummino, C.L. Creasy, EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations, *Nature* 492 (2012) 108–112.
- [35] T.L. Cha, B.P. Zhou, W. Xia, Y. Wu, C.C. Yang, C.T. Chen, B. Ping, A.P. Otte, M.C. Hung, Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3, *Science* 310 (2005) 306–310.
- [36] Y. Wang, A. Ozawa, S. Zaman, N.B. Prasad, S.C. Chandrasekharappa, S.K. Agarwal, S.J. Marx, The tumor suppressor protein menin inhibits AKT activation by regulating its cellular localization, *Cancer Res.* 71 (2011) 371–382.
- [37] H. Hirai, H. Sootome, Y. Nakatsuru, K. Miyama, S. Taguchi, K. Tsujioka, Y. Ueno, H. Hatch, P.K. Majumder, B.S. Pan, H. Kotani, MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo, *Mol. Cancer Ther.* 9 (2010) 1956–1967.
- [38] T.A. Milne, C.M. Hughes, R. Lloyd, Z. Yang, O. Rozenblatt-Rosen, Y. Dou, R.W. Schnepf, C. Krankel, V.A. Livolsi, D. Gibbs, X. Hua, R.G. Roeder, M. Meyerson, J.L. Hess, Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 749–754.
- [39] A. Yokoyama, M.L. Cleary, Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes, *Cancer Cell* 14 (2008) 36–46.
- [40] D. Pasini, P.A. Cloos, J. Walfridsson, L. Olsson, J.P. Bukowski, J.V. Johansen, M. Bak, N. Tommerup, J. Rappsilber, K. Helin, JARID2 regulates binding of the polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells, *Nature* 464 (2010) 306–310.
- [41] T.G. Bredfeldt, K.L. Greathouse, S.H. Safe, M.C. Hung, M.T. Bedford, C.L. Walker, Xenoestrogen-induced regulation of EZH2 and histone methylation via estrogen receptor signaling to PI3K/AKT, *Mol. Endocrinol.* 24 (2010) 993–1006.
- [42] W. Lin, H. Watanabe, S. Peng, J.M. Francis, N. Kaplan, C.S. Peadarallu, A. Ramachandran, A. Agoston, A.J. Bass, M. Meyerson, Dynamic epigenetic regulation by menin during pancreatic islet tumor formation, *Mol. Cancer Res.* 13 (2015) 689–698.

Maeva Patry,^{1,2,3} Romain Teinturier,^{1,2,3} Delphine Goehrig,^{1,2,3} Cornelia Zetu,⁴
Doriane Ripoché,^{1,2,3} In-San Kim,^{5,6} Philippe Bertolino,^{1,2,3} and Ana Hennino^{1,2,3}



βig-h3 Represses T-Cell Activation in Type 1 Diabetes



Diabetes 2015;64:4212–4219 | DOI: 10.2337/db15-0638

βig-h3/TGF-βi is a secreted protein capable of binding to both extracellular matrix and cells. Human genetic studies recently revealed that in the *tgfb1* gene encoding for βig-h3, three single nucleotide polymorphisms were significantly associated with type 1 diabetes (T1D) risk. Pancreatic islets express βig-h3 in physiological conditions, but this expression is reduced in β-cell insult in T1D. Since the integrity of islets is destroyed by autoimmune T lymphocytes, we thought to investigate the impact of βig-h3 on T-cell activation. We show here that βig-h3 inhibits T-cell activation markers as well as cytotoxic molecule production as granzyme B and IFN-γ. Furthermore, βig-h3 inhibits early T-cell receptor signaling by repressing the activation of the early kinase protein Lck. Moreover, βig-h3-treated T cells are unable to induce T1D upon transfer in Rag2 knockout mice. Our study demonstrates for the first time that T-cell activation is modulated by βig-h3, an islet extracellular protein, in order to efficiently avoid autoimmune response.

the immune response during insulinitis is likely to be communicated in large part through the extracellular matrix (ECM). βig-h3 (also known as TGF-βi) is a secreted protein found in the ECM and it has an N-terminal secretory signal (aa 1–23), four FAS1 homologous internal domains, and a cell attachment site (RGD) at its C terminus (4). βig-h3 binds to the ECM through interaction of the YH motif in its FAS1 domains with collagens I, II, IV, and VI (5,6). Its FAS1 domain interacts with its α3β1, αVβ3, and αVβ5 integrins on the cell surface. Previous studies demonstrated that recombinant βig-h3 could preserve the integrity and enhance the function of cultured pancreatic islet cells (7). Conversely, βig-h3 knockout (KO) islet function was compromised in vivo after transplantation in recipients with diabetes (8). These studies point out that βig-h3 might play an active role in the protection of β-cells against T-cell cytotoxic insult in T1D. The effect of βig-h3 on T-cell function and activation relative to its roles in islet β-cell–ECM destruction in T1D in mice has never been investigated and it is the focus of our project.

Type 1 diabetes (T1D) is a polygenic autoimmune disease characterized by smoldering inflammatory response directed against the insulin-producing β-islet cells of the pancreas. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cells are involved in the destruction of β-cells (shed by a prior insult). CD4⁺ T cells are insulin reactive, and CD8⁺ T cells play a major role as β-cell killers (1,2). Although both in vitro and in vivo evidence point to a role for regulatory T cells in T-cell-mediated regulation controlling diabetes in mouse models (3), the influence of the inflammatory environment in which they function remains poorly understood. The cross talk between the inflammatory milieu and

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Mice

Female C57Bl/6 NOD mice were bred and housed in specific pathogen-free conditions. T1D was chemically induced in C57Bl/6 using a standard low-dose (35 mg/kg) streptozotocin (STZ) protocol (9). Alternatively, for antibody depletion experiments, five consecutive intraperitoneal injections of 30 mg/kg STZ were used. Fourteen days after STZ treatment, 300 μg/kg of anti-TGF-βi neutralizing or control monoclonal antibody (Bio X Cell, West Lebanon, NH) was subsequently

¹Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France

²Université Lyon 1, Lyon, France

³Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁴National Institute of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases “N. Paulescu,” Bucharest, Romania

⁵Biomedical Research Institute, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

⁶KU-KIST Graduate School of Converging Science and Technology, Korea University, Seoul, Korea

Corresponding author: Ana Hennino, ana.hennino@inserm.fr.

Received 17 May 2015 and accepted 7 October 2015.

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db15-0638/-/DC1>.

P.B. and A.H. contributed equally to this work.

© 2015 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered.

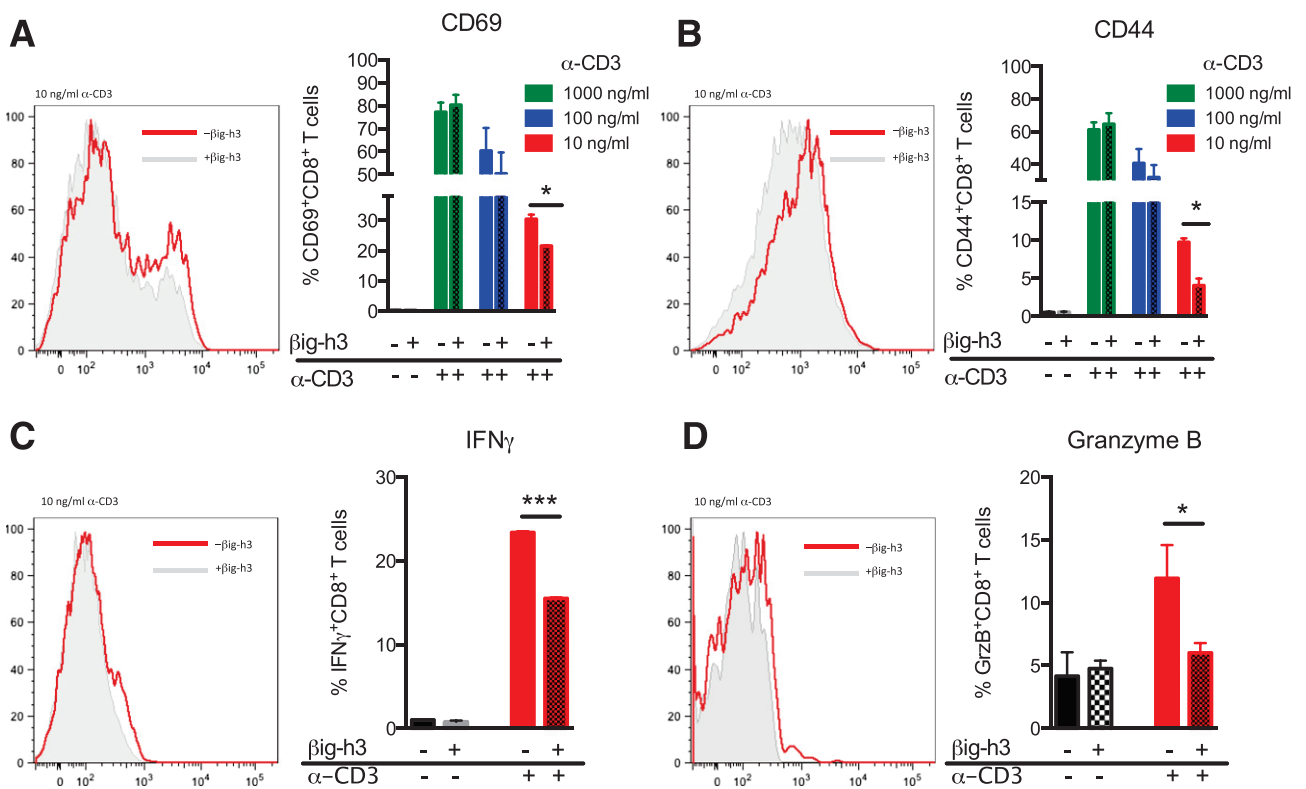


Figure 1—βig-h3 inhibits T-cell activation. A and B: Draining lymph node cells from WT C57Bl/6 (3×10^5 cells/condition) were treated or not with βig-h3 (5 μg/mL) for 24 h. Anti-CD3 Ab was further added at the indicated concentration for another 24 h. Representative histograms are illustrating the percentage of CD8+ T cells expressing CD69 (A) and CD44 (B) at their surface and IFN-γ (C) and granzyme B (D) in their cytoplasm. Graphs are quantifying the percentage of CD8+ T cells expressing CD69 (A) and CD44 (B) and the percentage of CD8+ T cells expressing IFN-γ (C) and granzyme B (GrzB) (D) in three individual mice. The results are representative of three independent experiments with three mice per group. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

intraperitoneally injected. Blood glucose was monitored from day 14 until sacrifice. Animals with glycemia superior to 200 mg/dL were considered diabetic. The local animal experimentation ethics committee approved the experimental protocols.

Patients

Samples (3 μm) were obtained from the National Institute for Diabetes, Bucharest, Romania, from cadaveric donor pancreata from patients with and without T1D and T2D. All experimental procedures were approved by the Romanian National Ethics Committee.

Cell Culture

Cells extracted from draining lymph nodes were cultured in 96 U-shaped well plates (300,000 cells/well). TGF-βi treatment (5 μg/mL; R&D Systems) was done for 24 h. Cells were activated with different doses of anti-mouse CD3ε antibody (eBioscience) for the indicated times. Anti-mouse CD3ε antibody (eBioscience) was used for cell activation as indicated. Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) staining was used for T-cell proliferation assays according to the manufacturer’s protocol (Invitrogen). Islet isolation was obtained after collagenase perfusion as reported previously (10) and handpicked before experimentation.

Flow Cytometry Analysis

Cells isolated from draining lymph node or perfused pancreata were stained using the following antibodies: CD8-V450, CD4-V500, CD44 A700 (BD Biosciences), and CD69 FITC (ImmunoTools). Intracellular staining was performed after phorbol myristic acid and ionomycin (1 μg/mL) activation for 4 h under normal culture conditions in the presence of GolgiPlug (BD Pharmingen). After activation, cells were permeabilized using Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen) prior to staining with anti-interferon (IFN) (clone XMG1.2; BD Pharmingen) and anti-granzyme B (clone GB12; Invitrogen). Flow cytometry was performed with a BD LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with BD FACSDiva software v5.0.1 (BD Biosciences) and FlowJo (Tree Star, Inc.).

Western Blot

Proteins were extracted with a RIPA buffer; 30 μg of protein was separated using SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham). Primary antibodies (anti-Lck [Cell Signaling]; anti-pSrc pY416, which recognizes Lck on pY394 [Cell Signaling]; anti-pLck pY505 [Cell Signaling]; mouse anti-actin [Sigma-Aldrich]) were incubated overnight, followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham) prior to detection using

an enhanced chemiluminescence solution (Pierce). Image Lab (Bio-Rad) was used for subsequent quantification.

Immunofluorescence and Confocal Microscopy

Triple immunofluorescent staining was performed on a 3- μ m-thick paraffin pancreas section. Sections were rehydrated and subjected to antigen retrieval in an unmasking solution (Vector H-3300). Tissue sections were incubated overnight with anti-TGF- β i (rabbit; Sigma-Aldrich), anti-insulin (guinea pig; Dako), and anti-glucagon (mouse; Sigma-Aldrich) primary antibodies. Secondary fluorescence-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch) was incubated 1 h prior to mounting using a DAPI-VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories). Cell immunofluorescent staining was performed on cytopspined cells fixed in 4% paraformaldehyde prior to permeabilization. Primary antibodies, anti-T-cell receptor (TCR)- β (Becton Dickinson), and phospho-Lck pY505 (Cell Signaling) were incubated overnight and subsequently detected using specific anti-Fab'2-Alexa 488, 647, and 555 (Molecular Probes) secondary antibodies prior to mounting. All staining was acquired on an LSM 780 Zeiss confocal microscope and subsequently analyzed using Zen software (Zeiss). The method used for colocalization quantifications was previously described (11).

Statistical Analysis

P values were calculated with Student *t* test (GraphPad Prism), as specified in figure legends (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001).

RESULTS

β ig-h3 Inhibits T-Cell Activation

To study a direct role of β ig-h3 on T cells, we isolated T cells from wild-type (WT) mouse lymph nodes and treated them using a human recombinant β ig-h3 for 24 h prior to their activation with different doses of anti-CD3 antibody (Fig. 1). Since TCR avidity modulates T-cell activation (12) and autoreactive T cells respond to low-affinity and avidity peptides, we compared the ability of CD8⁺ T cells to respond to high (1,000 ng/mL), intermediate (100 ng/mL), and low concentrations (10 ng/mL) of anti-CD3 after being treated (or not) with recombinant β ig-h3. We show that at high and intermediate concentrations of anti-CD3 β ig-h3 did not modulate the activation of CD8⁺ T cells after TCR engagement, as shown by the activation markers CD69 and CD44. In contrast, β ig-h3 was able to inhibit subsequent low-dose CD8⁺ (as well as CD4⁺) T-cell activation, as shown by the significant reduction of CD69 and CD44 expression (Fig. 1A and B and Supplementary Fig. 1A). Furthermore, both CD8⁺ and CD4⁺ T cells treated with β ig-h3 for 24 h displayed reduced production of intracellular IFN- γ and granzyme B (Fig. 1C and D and Supplementary Fig. 1A). In order to explore the role of β ig-h3 in the pathological condition of T1D, we extracted T cells from 6-month-old diabetic NOD mice and treated them with recombinant β ig-h3 for 24 h before assessing their production of IFN- γ . We found β ig-h3-pretreated pancreatic T cells from diabetic NOD mice to produce significantly lower intracellular IFN- γ

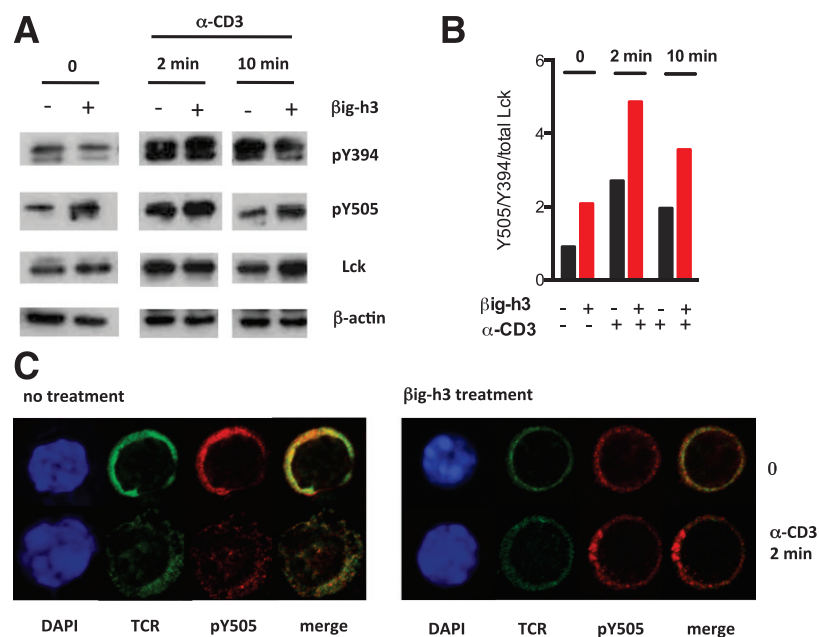


Figure 2— β ig-h3 signaling affects the Lck phosphorylation equilibrium. T cells were treated or not with β ig-h3 (5 μ g/mL) for 24 h and further stimulated with 10 ng/mL of anti-CD3 for the indicated times. **A**: Western blot analysis of expression levels of pLck Y505, pLck Y394, total Lck, and β -actin is indicated. **B**: Quantification of the ratio of pLck Y505 to total Lck mean intensity in different conditions. **C**: Confocal immunofluorescence of resting (0) or stimulated for 2 min (α -CD3 2 min) T cells stained with anti-TCR- β , pLck Y505, and DAPI. Results are representative of three independent experiments.

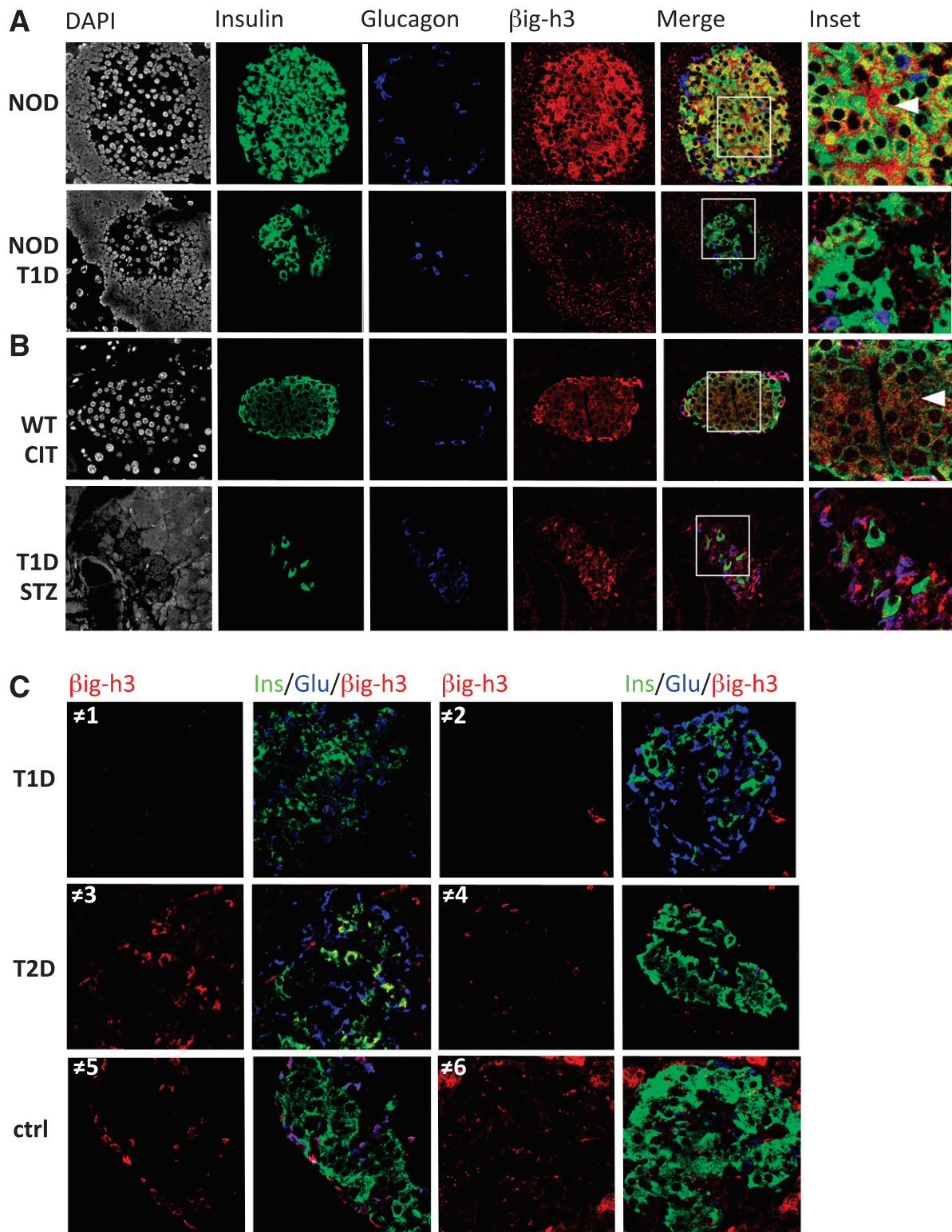


Figure 3—Altered expression of β ig-h3 in T1D insulin pancreatic islets. *A* and *B*: Immunofluorescent costaining for insulin, glucagon, and β ig-h3 within pancreatic islets in control mice (WT CIT), STZ-treated diabetic mice (T1D STZ), 6-month-old normoglycemic nondiabetic NOD mice (NOD), and diabetic age-matched mice (T1D NOD). The results are representative of three independent experiments with three mice per group. Insets are magnified views of merge. Arrows indicate extracellular staining for β ig-h3. *C*: Representative immunofluorescent stainings of a pancreas section from two cadaveric donors with T1D, two with T2D, and two without diabetes (ctrl).

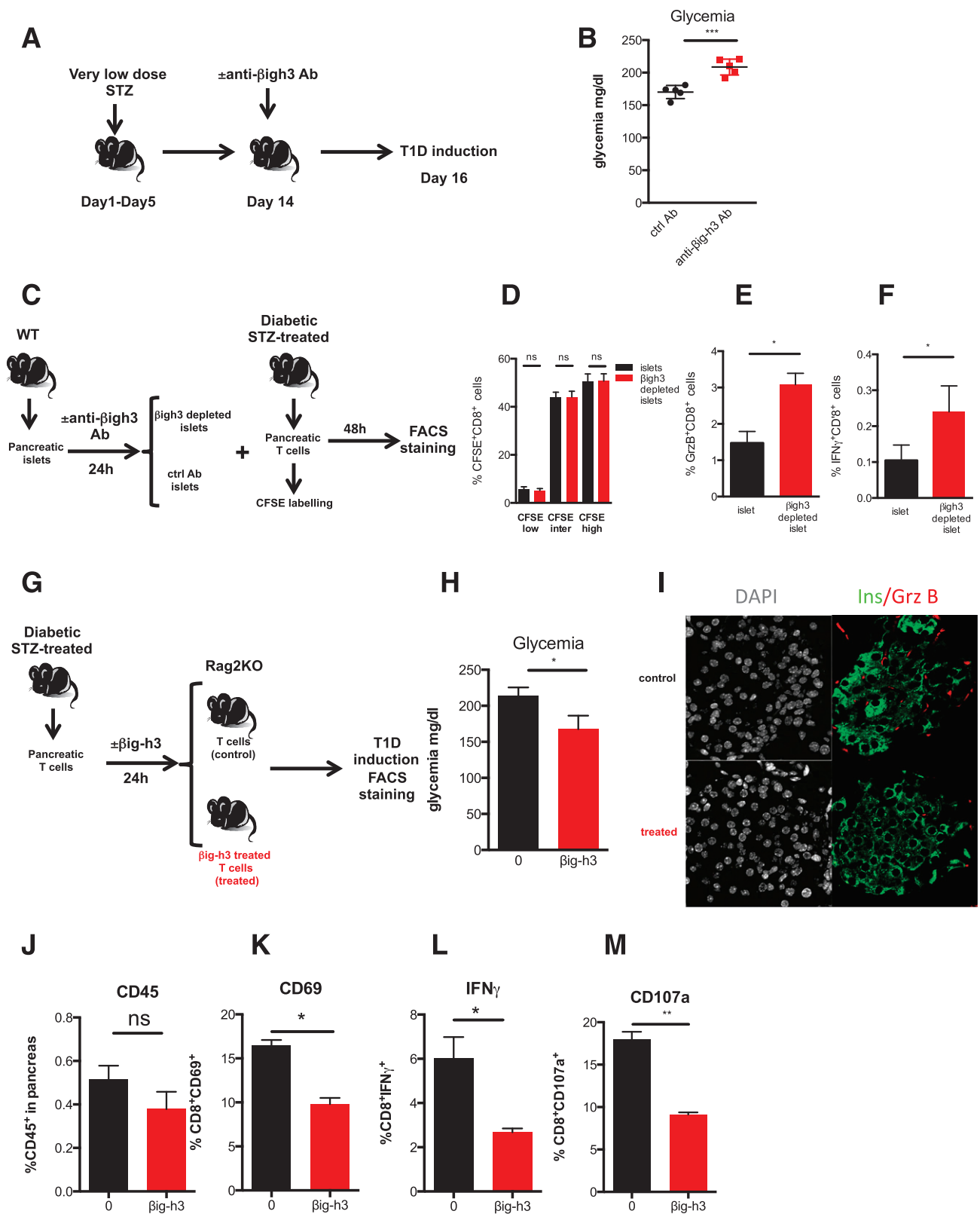


Figure 4— β ig-h3 controls activation of T cells in vivo. **A**: Mice were treated with a suboptimal dose of STZ (30 mg/kg) for 5 consecutive days and intraperitoneally treated on day 14 with neutralizing anti- β ig-h3 or control Ab (at a concentration of 300 μ g/kg) and assessed for glycemia. **B**: Glycemia measurement on day 16, representative of two independent experiments with five mice per group. ctrl, control. **C**: T cells extracted from diabetic STZ mouse pancreas were CFSE stained and added to the islet culture (β ig-h3 depleted of ctrl Ab treated) for 48 h, and the intracellular production of granzyme B (GrzB) (**E**) and IFN- γ (**F**) was assessed by flow cytometry. **D**: Quantification of the percentage of undivided (CFSE high) and divided cells (CFSE inter and CFSE low). **G**: Purified T cells from diabetic STZ-treated pancreas were incubated (treated) or not (control) with β ig-h3 (5 μ g/mL) for 24 h

(Supplementary Fig. 1B). Therefore, β ig-h3 was able to reduce the production of inflammatory cytokines by diabetogenic T cells *ex vivo*. Thus, together these results point out an important immunomodulatory role for β ig-h3 protein in the activation and production of inflammatory cytokines by T cells.

β ig-h3 Inhibits Early TCR Signaling

β ig-h3 has been reported to signal from the extracellular environment through α v β 3 integrins (13). Interestingly, integrin signaling has been reported to share early TCR signaling molecules (14,15). Therefore, we investigated the effect of β ig-h3 signaling on the activation of early actors of TCR signaling. Initiation of the TCR signaling pathway relies on the induction of tyrosine protein phosphorylation of the kinase Lck (16,17). The regulation of the enzymatic activity of this Src family tyrosine kinase is tightly controlled by conformational changes mainly relying on phosphorylation and dephosphorylation on two regulatory tyrosine residues, Y505 and Y394 (18,19). In resting T cells, as previously reported (20), a larger percentage of Lck was phosphorylated on Y394 and thus was present under its activated conformation (Fig. 2A). However, in clear contrast, β ig-h3-treated CD8⁺ T cells were mainly phosphorylated on Y505, implying that β ig-h3 signaling influenced the Lck conformation equilibrium toward its inactive state (Fig. 2A and B). After TCR engagement, with a low dose of anti-CD3, the ratio of Y505 to Y394 was higher in β ig-h3-treated T cells than in non-treated cells (Fig. 2A and B) at all time points (2 and 10 min). These data suggest that β ig-h3 blocks the TCR signaling pathway by influencing the equilibrium of Lck conformation toward an inactive state, characterized by Y505 phosphorylation. Next, we searched for the localization of Lck phosphorylated on inhibitory Y505 in resting and stimulated T cells by confocal microscopy. Lck phosphorylated on Y505 was colocalized with the TCR in high proportion (~60%) (Supplementary Fig. 2) in resting untreated T cells (Fig. 2C). In contrast, after TCR engagement with anti-CD3, pY505 colocalization with the TCR was significantly diminished (Fig. 2C and Supplementary Fig. 2). In β ig-h3-treated cells, the colocalization of Lck Y505 with TCR was similar in resting cells and after TCR engagement (~58%) (Supplementary Fig. 2 and Fig. 2C), suggesting that β ig-h3 signaling interferes with T-cell activation.

β ig-h3 Expression Is Reduced in Pancreatic Islets in T1D

To investigate the modulation of β ig-h3 expression in pathological conditions, we used chemical-induced (STZ) and genetic (NOD) mouse models of T1D. In the genetic

model, ~80% of NOD female mice develop diabetes at 6 months (21). Diabetic NOD females showed similar immune infiltration as NOD normoglycemic nondiabetic age-matched females (Fig. 3A), suggesting that a local immunosuppression mechanism might be involved. Immunofluorescence analysis showed that β ig-h3 was expressed in pancreatic islets in normal mice as well as in normoglycemic nondiabetic NOD mice (Fig. 3A and B). We found β ig-h3 expressed in the cytoplasm of both α - and β -cells as well as in the extracellular islet compartment (Fig. 3A and B, arrows). In contrast, in T1D islets, β ig-h3 expression was reduced at both the mRNA (Supplementary Fig. 3) and protein level (Fig. 3A and B). Only α -cells retained expression of β ig-h3 in diabetic mice (Fig. 3A and B). We also analyzed human pancreas sections from patients with T1D ($n = 2$) and T2D ($n = 2$) and patients without diabetes ($n = 2$). In human pancreas, β ig-h3 was expressed only by β -cells and in the ECM in patients with T2D and patients without diabetes. Patients with T1D show a much reduced β ig-h3 expression (Fig. 3C). Together, these data suggest that pancreatic islet expression of β ig-h3 might play a role in the susceptibility to develop T1D.

β ig-h3 Affects Activation of Diabetogenic T Cells In Vivo

C57Bl/6 mice treated with low-dose STZ (35 mg/kg) for 5 consecutive days develop hyperglycemia and T1D starting from day 14 (Supplementary Fig. 4A). To assess the role of β ig-h3 in diabetes development *in vivo*, we titrated STZ to a suboptimal dose (30 mg/kg for 5 consecutive days) that does not induce diabetes in C57Bl/6 mice from day 14. Mice treated with suboptimal STZ doses were injected on day 14 with neutralizing anti- β ig-h3 and assessed for glycemia on day 16 (Fig. 4A). In contrast to control Ab-treated mice, β ig-h3-depleted animals develop diabetes from suboptimal doses of STZ, as measured by a significant increase of glycemia (Fig. 4B). Next, we isolated islets from WT C57Bl/6 mice and cultured them in the presence of a neutralizing anti- β ig-h3 antibody prior to their coculture with STZ-diabetic isolated T cells. As shown in Supplementary Fig. 4B, we found that 24-h treatment with anti- β ig-h3 significantly decreased the amount of β ig-h3 protein detected in the supernatant of cultured islets. T cells extracted from STZ-diabetic pancreas were CFSE stained and added to the islet culture for 48 h prior to the quantification of the intracellular production of granzyme B and IFN- γ by flow cytometry (Fig. 4C). Whereas the proliferation of T cells was not affected by the β ig-h3 antibody treatment of islet cells (Fig. 4D), we

and intravenously transferred in Rag2 KO recipient mice (5×10^5 cells/animal). *H*: Graph shows glycemia measurements. *I*: Immunofluorescent staining for insulin, granzyme B, and DAPI within the pancreas of Rag2 KO recipient mice transferred with untreated T cells (control) or β ig-h3-treated T cells (treated) at day 2 after transfer. The results are representative of two independent experiments with three mice per group. Quantification of the percentage of CD45⁺ cells 14 days after cell transfer in mouse pancreas (*J*) and CD8⁺ T cells expressing CD69 (*K*), IFN- γ (*L*), and CD107a (*M*). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

found that the production of granzyme B and IFN- γ was significantly increased in β ig-h3-depleted islet conditions (Fig. 4E and F), suggesting that physiological release of the protein by the islets was able to inhibit T-cell cytotoxic cytokine production. In order to investigate the physiological relevance of the repression of the T-cell response in vitro, we used an in vivo diabetes transfer model. T cells from the pancreas of diabetic mice (STZ-induced T1D) were treated with recombinant β ig-h3 and then intravenously injected in immunodeficient Rag2 KO congenic mice. Mice were killed 2 days after T-cell injection, and islet infiltration by granzyme B⁺ cells was assessed by immunofluorescence (Fig. 4I and Supplementary Fig. 4C). Measurements of glycemia showed that β ig-h3-pretreated T cells were unable to induce diabetes as compared with untreated T cells (Fig. 4H). Although equivalent percentages of CD45⁺ cells were detected by FACS in the recipient's pancreas 10 days postinjection (Fig. 4J), T cells pretreated with β ig-h3 showed lower levels of CD69 (Fig. 4K) and less production of IFN- γ and CD107a (Fig. 4L and M). Thus, these findings reveal an important role of β ig-h3 in inhibiting diabetogenic T-cell activity in vitro and in vivo.

DISCUSSION

A major goal of T1D research is to restore β -cell function while eliminating diabetogenic T cells by immunotherapy in the hope of achieving insulin independence. To develop an effective immunotherapy, there must be a continued effort to define the molecular basis that underlies the T-cell response to pancreatic islet antigens in T1D. Therefore, identifying new targets involved in the protection against cytotoxic T-lymphocyte attack might be important for defining new therapy hints. We show here that β ig-h3, a protein of the islet ECM, is able to repress diabetogenic T-cell activation by interfering with early actors of the TCR signaling pathway, i.e., Lck. This alteration has major consequences on T-cell expression of activation markers (CD69 and CD44) upon TCR engagement, as well as production of IFN- γ and granzyme B. Previous findings identified β ig-h3 as a vital trophic factor promoting islet survival, function, and regeneration (7). We demonstrate that in addition to its trophic support to pancreatic islets, β ig-h3 plays an active role in inhibiting the activation T-cell activation to low concentrations of antigen or autoreactive T cells. Signaling through integrins has been described to only facilitate T-cell activation by lowering an activation threshold without qualitatively changing the T-cell response (22). Our results show that β ig-h3 signaling through T-cell surface integrins was able to inhibit TCR activation by phosphorylating Lck on inhibitory tyrosine Y505. Previous studies showed that Lck plays an important role in regulating autoimmunity since a specific deficiency of this kinase was described in patients with T1D (23). A key role of Lck in the CTL function of CD8⁺ T cells was also reported in mice (24). Nika et al. (20) showed that the ratio of Y394/Y505 was approximately 1.5 in normal cells. After β ig-h3 treatment, Lck was

mostly phosphorylated on inhibiting tyrosine Y505 (ratio of Y505 to Y394 above 2) (Fig. 2A and B) and colocalized with the TCR (Fig. 2C). As a consequence, engagement of the TCR in those β ig-h3-pretreated cells did not lead to delocalization of Y505 away from the TCR compared with untreated cells. Therefore transfer of β ig-h3-treated diabetogenic T cells into WT animals led to blunted activation and cytotoxic capacities in recipient pancreas. An interesting finding is that NOD female mice that do not develop diabetes at 6 months (~20%) express β ig-h3 in the pancreatic islets (Fig. 3B) and that the expression is lost in hyperglycemic age-matched diabetic NOD mice. Since the immune infiltration was similar, this data suggest that β ig-h3 expression might contribute as a protective shield against cytotoxic T-cell attack. Our experimental findings reconsider the conventional understanding of "cytotoxic" T-cell-induced β -cell death in T1D in order to take into account β -cell "matrix" as a critical component of T1D pathogenesis. Studies of the β ig-h3 impact on islet-specific T cells in from human peripheral blood T1D patients will further elucidate whether this protein is also a key target of immune tolerance in human T1D.

Acknowledgments. The authors thank ANICAN (Cancer Research Center of Lyon) animal staffs for maintenance of mouse strains. The authors thank Christophe Vanbelle for helpful assistance with confocal microscopy.

Funding. R.T. and D.R. were supported by fellowships from the French Ministry of Education and Research. This work was supported by a grant from La Ligue Contre le Cancer (P.B. and A.H.).

Duality of Interest. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Author Contributions. M.P. performed the experiments and analyzed the data. R.T., D.G., and D.R. performed the experiments. C.Z. provided and analyzed the human samples. I.-S.K. provided the depleting β ig-h3 antibody and designed the depletion experiments. P.B. wrote the manuscript. A.H. designed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. A.H. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

- DiLorenzo TP, Lieberman SM, Takaki T, et al. During the early prediabetic period in NOD mice, the pathogenic CD8(+) T-cell population comprises multiple antigenic specificities. *Clin Immunol* 2002;105:332–341
- Tsai S, Shamel A, Santamaria P. CD8+ T cells in type 1 diabetes. *Adv Immunol* 2008;100:79–124
- Zhao N, Hao J, Ni Y, et al. V γ 4 $\gamma\delta$ T cell-derived IL-17A negatively regulates NKT cell function in Con A-induced fulminant hepatitis. *J Immunol* 2011;187:5007–5014
- Skonier J, Bennett K, Rothwell V, et al. Beta ig-h3: a transforming growth factor-beta-responsive gene encoding a secreted protein that inhibits cell attachment in vitro and suppresses the growth of CHO cells in nude mice. *DNA Cell Biol* 1994;13:571–584
- Hashimoto K, Noshiro M, Ohno S, et al. Characterization of a cartilage-derived 66-kDa protein (RGD-CAP/beta ig-h3) that binds to collagen. *Biochim Biophys Acta* 1997;1355:303–314
- Choi Q, Hong KH, Kim JE, Kim HK. Changes in plasma levels of natural anticoagulants in disseminated intravascular coagulation: high prognostic value of antithrombin and protein C in patients with underlying sepsis or severe infection. *Ann Lab Med* 2014;34:85–91

7. Han B, Qi S, Hu B, Luo H, Wu J. TGF- β 1 promotes islet beta-cell function and regeneration. *J Immunol* 2011;186:5833–5844
8. Han KJ, Lee SY, Kim NH, et al. Increased risk of diabetes development in subjects with the hypertriglyceridemic waist phenotype: a 4-year longitudinal study. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2014;29:514–521
9. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 1976;193:415–417
10. Wu Y, Han B, Luo H, et al. DcR3/TR6 effectively prevents islet primary nonfunction after transplantation. *Diabetes* 2003;52:2279–2286
11. Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc* 1993;169:375–382
12. Savage PA, Boniface JJ, Davis MM. A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response. *Immunity* 1999;10:485–492
13. Tumbarello DA, Temple J, Brenton JD. β 3 integrin modulates transforming growth factor beta induced (TGFB1) function and paclitaxel response in ovarian cancer cells. *Mol Cancer* 2012;11:36
14. Goda S, Quale AC, Woods ML, Felthouser A, Shimizu Y. Control of TCR-mediated activation of beta 1 integrins by the ZAP-70 tyrosine kinase interdomain B region and the linker for activation of T cells adapter protein. *J Immunol* 2004;172:5379–5387
15. Cimo AM, Ahmed Z, McIntyre BW, Lewis DE, Ladbury JE. CD25 and CD69 induction by α 4 β 1 outside-in signalling requires TCR early signalling complex proteins. *Biochem J* 2013;454:109–121
16. Davis SJ, van der Merwe PA. Lck and the nature of the T cell receptor trigger. *Trends Immunol* 2011;32:1–5
17. Rhee I, Veillette A. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nat Immunol* 2012;13:439–447
18. Yamaguchi H, Hendrickson WA. Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature* 1996;384:484–489
19. Boggon TJ, Eck MJ. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 2004;23:7918–7927
20. Nika K, Soldani C, Salek M, et al. Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity* 2010;32:766–777
21. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 1980;29:1–13
22. Bachmann MF, McCall-Faienza K, Schmits R, et al. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 1997;7:549–557
23. Nervi S, Atlan-Gepner C, Kahn-Perles B, et al. Specific deficiency of p56lck expression in T lymphocytes from type 1 diabetic patients. *J Immunol* 2000;165:5874–5883
24. Milstein O, Hagin D, Lask A, et al. CTLs respond with activation and granule secretion when serving as targets for T-cell recognition. *Blood* 2011;117:1042–1052

REFERENCES

- Abate-shen, C. et al., 2003. Nkx3 . 1 ; Pten Mutant Mice Develop Invasive Prostate Adenocarcinoma and Lymph Node Metastases 1. *Cancer research*, 63, pp.3886–3890.
- Abate-Shen, C., Shen, M.M. & Gelmann, E., 2008. Integrating differentiation and cancer: The Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation*, 76(6), pp.717–727.
- Abd El-Rehim, D.M. et al., 2005. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *International Journal of Cancer*, 116(3), pp.340–350.
- Abdulkadir, S.A. et al., 2002. Conditional loss of Nkx3.1 in adult mice induces prostatic intraepithelial neoplasia. *Molecular and cellular biology*, 22(5), pp.1495–503. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=134699&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Abeshouse, A. et al., 2015. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*, 163(4), pp.1011–1025.
- Adlanmerini, M. et al., 2015. Une question Effets membranaires du récepteur alpha des œstrogènes.
- Agarwal, S.K. et al., 1999. Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell*, 96(1), pp.143–152.
- Anders, C.K. et al., 2010. NIH Public Access. *Semin Oncol.*, 36(3), pp.237–249.
- Asatiani, E. et al., 2005. Deletion , Methylation , and Expression of the NKX3 . 1 Suppressor Gene in Primary Human Prostate Cancer Gene in Primary Human Prostate Cancer. *Cancer Research*, 65(4), pp.1164–1173.
- Atala, A., 2013. Re: Overexpression of androgen receptor enhances the binding of the receptor to the chromatin in prostate cancer. *Journal of Urology*, 189(2), pp.769–770.
- Backman, S.A. et al., 2004. Early onset of neoplasia in the prostate and skin of mice with tissue-specific deletion of Pten. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(6), pp.1725–1730. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14747659>
<http://www.pnas.org/content/101/6/1725.full.pdf>
<http://www.jstor.org/stable/pdfplus/3371257.pdf>.

- Barbieri, C.E. et al., 2012. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nature genetics*, 44(6), pp.685–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2279>.
- Berthon, P. et al., 1998. Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *American journal of human genetics*, 62(6), pp.1416–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1377158&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bertolino, P., Tong, W.-M., et al., 2003. Heterozygous Men1 Mutant Mice Develop a Range of Endocrine Tumors Mimicking Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Molecular Endocrinology*, 17(9), pp.1880–1892.
- Bertolino, P., Tong, W.M., et al., 2003. Pancreatic β -cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer Research*, 63(16), pp.4836–4841.
- Bhatia-Gaur, R. et al., 1999. Roles for Nkx3. 1 in prostate development and cancer. *Genes & development*, 13, p.966.
- Biswas, D.K. et al., 2005. Crossroads of estrogen receptor and NF-kappaB signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2005(288), p.pe27. Available at: <http://stke.sciencemag.org/content/2005/288/pe27.long>.
- Blok, L.J. et al., 1992. Transcriptional regulation of androgen receptor gene expression in Sertoli cells and other cell types. *Molecular and cellular endocrinology*, 88(1–3), pp.153–164.
- Böhm, M. et al., 2009. A role for GATA-2 in transition to an aggressive phenotype in prostate cancer through modulation of key androgen-regulated genes. *Oncogene*, 28(43), pp.3847–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684615>.
- Bonkhoff, H., Stein, U. & Remberger, K., 1995. Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells. *Human Pathology*, 26(2), pp.167–170.
- Bookstein, R. et al., 1990. Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(19), pp.7762–7766.
- Borkin, D. et al., 2015. Pharmacologic inhibition of the menin-MLL interaction blocks progression of MLL leukemia invivo. *Cancer Cell*, 27(4), pp.589–602. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2015.02.016>.
- Bostwick, D.G. et al., 2004. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Reviews in*

- urology*, 6(4), pp.171–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16985598>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1472840>.
- Bowen, C. et al., 2000. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Research*, 60(21), pp.6111–6115.
- Brandi, M.L. et al., 2001. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(12), pp.5658–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739416>.
- Brooks, J.D., Bova, G.S. & Isaacs, W.B., 1995. Allelic loss of the retinoblastoma gene in primary human prostatic adenocarcinomas. *Prostate*, 26(1), pp.35–39.
- Broom, R.J. et al., 2009. Changes in estrogen receptor, progesterone receptor and Her-2/neu status with time: Discordance rates between primary and metastatic breast cancer. *Anticancer Research*, 29(5), pp.1557–1562.
- BRUNO VERGES, FRANCOISE BOUREILLE, PIERRE GOUDET, A.M., ALBERT BECKERS, GENEVIEVE SASSOLAS, PATRICK COUGARD, B.C. & CORINNE MONTVERNAY, A.C., 2014. Pituitary Disease in MEN Type 1 (MEN1): Data from the. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(April), pp.457–465.
- Cai, C. et al., 2011. Androgen Receptor Gene Expression in Prostate Cancer Is Directly Suppressed by the Androgen Receptor Through Recruitment of Lysine-Specific Demethylase 1. *Cancer Cell*, 20(4), pp.457–471. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.001>.
- Cai, C. et al., 2009. Reactivation of androgen receptor-regulated TMPRSS2:ERG gene expression in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Research*, 69(15), pp.6027–6032.
- Cancer, C.G. on H.F. in B., 1997. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *The Lancet*, 350(9084), pp.1047–1059. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673697082330>.
- Cao, Y. et al., 2009. Nuclear-Cytoplasmic Shuttling of Menin Regulates Nuclear Translocation of β -Catenin. *Molecular and Cellular Biology*, 29(20), pp.5477–5487. Available at: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.00335-09>.
- Carroll, J.S. et al., 2006. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet*, 38(11), pp.1289–1297. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17013392>.

- Carter, B.S. et al., 1992. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8), pp.3367–71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=48868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Chandrasekharappa, S.C. et al., 1997. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5311), pp.404–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103196>.
- Cheang, M.C.U. et al., 2009. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(10), pp.736–750.
- Chen, H. et al., 2005. Distinct regulatory elements mediate the dynamic expression pattern of Nkx3.1. *Developmental Dynamics*, 234(4), pp.961–973.
- Chen, Y., Clegg, N.J. & Scher, H.I., 2009. Anti-androgens and androgen-depleting therapies in prostate cancer: new agents for an established target. *The Lancet Oncology*, 10(10), pp.981–991. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70229-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70229-3).
- Cheng, P. et al., 2016. Interplay between menin and Dnmt1 reversibly regulates pancreatic cancer cell growth downstream of the Hedgehog signaling pathway. *Cancer Letters*, 370(1), pp.136–144. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.09.019>.
- Cheng, P. et al., 2011. Menin prevents liver steatosis through co-activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *FEBS Letters*, 585(21), pp.3403–3408. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.043>.
- Cheng, P. et al., 2015. Tumor suppressor Menin acts as a corepressor of LXR α to inhibit hepatic lipogenesis. *FEBS Letters*, 589(20), pp.3079–3084. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.049>.
- Choi, N. et al., 2012. Adult Murine Prostate Basal and Luminal Cells Are Self-Sustained Lineages that Can Both Serve as Targets for Prostate Cancer Initiation. *Cancer Cell*, 21(2), pp.253–265. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.005>.
- Chokkalingam, A.P. et al., 2003. Prostate carcinoma risk subsequent to diagnosis of benign prostatic hyperplasia: a population-based cohort study in Sweden. *Cancer*, 98(8), pp.1727–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14534890>.
- Clemons, M., Danson, S. & Howell, A., 2002. Tamoxifen ('Nolvadex'): A review. *Cancer Treatment Reviews*, 28(4), pp.165–180.
- Collins, A.T. et al., 2001. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J Cell Sci*, 114(Pt 21), pp.3865–3872.

- Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719553>.
- Collins, A.T. et al., 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Research*, 65(23), pp.10946–10951.
- Cooper, C.S. et al., 2015. Analysis of the genetic phylogeny of multifocal prostate cancer identifies multiple independent clonal expansions in neoplastic and morphologically normal prostate tissue. *Nature genetics*, 47(4), pp.367–72. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4380509&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cooperberg, M.R., Broering, J.M. & Carroll, P.R., 2009. Risk assessment for prostate cancer metastasis and mortality at the time of diagnosis. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(12), pp.878–887.
- Crabtree, J.S. et al., 2001. A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, pp.1118–1123.
- Cristofano, A.D. et al., 1998. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nature genetics*, 19(4), pp.348–355.
- Dai, X. et al., 2015. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research*, 5(10), pp.2929–43. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4656721&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Demark-Wahnefried, W. et al., 2001. Pilot study of dietary fat restriction and flaxseed supplementation in men with prostate cancer before surgery: Exploring the effects on hormonal levels, prostate-specific antigen, and histopathologic features. *Urology*, 58(1), pp.47–52.
- Deng, Q. & Tang, D.G., 2015. Androgen receptor and prostate cancer stem cells: Biological mechanisms and clinical implications. *Endocrine-Related Cancer*, 22(6), pp.T209–T220.
- Ding, Z. et al., 2012. Telomerase reactivation following telomere dysfunction yields murine prostate tumors with bone metastases. *Cell*, 148(5), pp.896–907. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.039>.
- Dreijerink, K.M. et al., 2017. Article Enhancer-Mediated Oncogenic Function of the Menin Tumor Suppressor in Breast Cancer. *Cell Reports*, In Press(1), pp.2359–2372. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.025>.
- Dreijerink, K.M.A. et al., 2014. Breast-cancer predisposition in multiple endocrine neoplasia type 1. *The New England journal of medicine*, 371(6), pp.583–4. Available at:

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028479314665801>.
- Dreijerink, K.M.A. et al., 2006. Menin links estrogen receptor activation to histone H3K4 trimethylation. *Cancer Research*, 66(9), pp.4929–4935.
- Eeckhoutte, J. et al., 2007. Positive cross-regulatory loop ties GATA-3 to estrogen receptor ?? expression in breast cancer. *Cancer Research*, 67(13), pp.6477–6483.
- Eheman, C.R. et al., 2009. The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 18(6), pp.1763–1769.
- Eissenberg, J.C. & Shilatifard, A., 2010. Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Developmental Biology*, 339(2), pp.240–249. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.017>.
- Ellison-Zelski, S.J., Solodin, N.M. & Alarid, E.T., 2009. Repression of ESR1 through actions of estrogen receptor alpha and Sin3A at the proximal promoter. *Molecular and cellular biology*, 29(18), pp.4949–4958.
- Ellwood-Yen, K. et al., 2003. Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell*, 4(3), pp.223–238.
- Elo, J.P. & Visakorpi, T., 2001. Molecular genetics of prostate cancer. *Annals of medicine*, 33(2), pp.130–141.
- English, H.F., Santen, R.J. & Lsaacs, J.T., 1987. Response of glandular versus basal rat ventral prostatic epithelial cells to androgen withdrawal and replacement. *The Prostate*, 11(3), pp.229–242.
- Falchetti, A. et al., 2009. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): not only inherited endocrine tumors. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 11(12), pp.825–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19904212>.
- Ferguson, A.T. et al., 1995. Demethylation of the Estrogen Receptor Gene in Estrogen Receptor-negative Breast Cancer Cells Can Reactivate Estrogen Receptor Gene Expression Advances in Brief Demethylation of the Estrogen Receptor Gene in Estrogen Receptor-negative Breast Cancer Cells . , pp.2279–2283.
- Ferguson, A.T. et al., 1997. Role of estrogen receptor gene demethylation and DNA methyltransferase.DNA adduct formation in 5-aza-2’deoxycytidine-induced cytotoxicity in human breast cancer cells. *J Biol.Chem.*, 272(0021–9258 (Print)), pp.32260–32266.
- Figge, J. et al., 1996. Decreased Levels of CD44 Protein and mRNA in . , pp.1461–1469.
- Fleshner, N.E. & Klotz, L.H., 1999. Diet, androgens, oxidative stress and prostate cancer

- susceptibility. *Cancer and Metastasis Reviews*, 17(4), pp.325–330.
- Floc'h, N. et al., 2012. Dual targeting of the Akt/mTOR signaling pathway inhibits castration-resistant prostate cancer in a genetically engineered mouse model. *Cancer Research*, 72(17), pp.4483–4493.
- Flouriot, G., 1998. Differentially Expressed Messenger RNA Isoforms of the Human Estrogen Receptor- Gene Are Generated by Alternative Splicing and Promoter Usage. *Molecular Endocrinology*, 12(12), pp.1939–1954. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/mend.12.12.0209>.
- Flouriot, G. et al., 2000. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *The EMBO Journal*, 19(17), pp.4688–4700. Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/19.17.4688>.
- Fox, E.M., Andrade, J. & Shupnik, M.A., 2009. Novel actions of estrogen to promote proliferation: Integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids*, 74(7), pp.622–627.
- Gang, D. et al., 2013. The tumor suppressor protein menin inhibits NF- κ B-mediated transactivation through recruitment of Sirt1 in hepatocellular carcinoma. *Molecular Biology Reports*, 40(3), pp.2461–2466.
- Gao, H. et al., 2006. Emergence of androgen independence at early stages of prostate cancer progression in Nkx3.1; Pten mice. *Cancer Research*, 66(16), pp.7929–7933.
- Gao, S.-B. et al., 2009. Suppression of lung adenocarcinoma through menin and polycomb gene-mediated repression of growth factor pleiotrophin. *Oncogene*, 28(46), pp.4095–104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19749796>.
- Gao, W., Bohl, C.E. & Dalton, J.T., 2005. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chemical Reviews*, 105(9), pp.3352–3370.
- Garraway, L.A. et al., 2003. Intermediate basal cells of the prostate: In vitro and in vivo characterization. *Prostate*, 55(3), pp.206–218.
- Geng, C. et al., 2014. Androgen receptor is the key transcriptional mediator of the tumor suppressor SPOP in prostate cancer. *Cancer research*, 74(19), pp.5631–43. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4209379&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Germann, M. et al., 2012. Stem-like cells with luminal progenitor phenotype survive castration in human prostate cancer. *Stem Cells*, 30(6), pp.1076–1086.
- Gherardi, S. et al., 2017. Menin regulates Inhbb expression through an Akt/Ezh2-mediated

- H3K27 histone modification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(4), pp.427–437. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.02.003>.
- Gingrich, J.R. et al., 1997. Androgen-independent Prostate Cancer Progression in the TRAMP Model. *Cancer research*, 57, pp.4687–4691. Available at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/57/21/4687>.
- Gingrich, J.R. et al., 1996. Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Research*, 56(18), pp.4096–4102.
- Goldstein, A.S., 2010. Identification of a Cell of Origin. , 568(July).
- Grandien, K., 1996. Determination of transcription start sites in the human estrogen receptor gene and identification of a novel, tissue-specific, estrogen receptor-mRNA isoform. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 116(2), pp.207–212.
- Grasso, C.S. et al., 2012. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*, 487(7406), pp.239–43. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3396711&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Green, S. et al., 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320(6058), pp.134–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3754034>.
- Greenberg, N.M. et al., 1995. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Medical Sciences*, 92(April), pp.3439–3443.
- Greenberg, N.M. et al., 1994. The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 8(2), pp.230–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8170479>.
- Group, T.E.H. and B.C.C., 2002. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J.Natl.Cancer Inst.*, 94(0027–8874), pp.606–616. Available at:
<file:///c:/Users/kroghvittorio/Documents/Dati/Personal/CV/PDF/vk089.pdf>.
- Guedj, M. et al., 2012. A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene*, 31(9), pp.1196–1206.
- Guo, S. & Sonenshein, G.E., 2004. Forkhead Box Transcription Factor FOXO3a Regulates Estrogen Receptor Alpha Expression and Is Repressed by the Forkhead Box Transcription Factor FOXO3a Regulates Estrogen Receptor Alpha Expression and Is

- Repressed by the Her-2 / neu / Phosphatidylinositol. *Molecular and Cellular Biology*, 19(19), pp.8681–8690.
- Gurel, B. et al., 2008. Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Modern pathol*, 21(9), pp.1156–1167. Available at: file:///C:/Users/JavierA/Documents/Mendeley Desktop/Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis.pdf.
- Guru, S.C. et al., 2001. Characterization of a MEN1 ortholog from *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 263(1–2), pp.31–38.
- Guru, S.C. et al., 1999. Isolation, genomic organization, and expression analysis of Men1, the murine homolog of the MEN1 gene. *Mammalian Genome*, 10(6), pp.592–596.
- Gurung, B., Feng, Z., Iwamoto, D. V., et al., 2013. Menin epigenetically represses hedgehog signaling in MEN1 tumor syndrome. *Cancer Research*, 73(8), pp.2650–2658.
- Gurung, B., Feng, Z. & Hua, X., 2013. Menin directly represses Gli1 expression independent of canonical Hedgehog signaling. *Molecular cancer research : MCR*, 11(10), pp.1215–22. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4028077&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Haas, G.P. et al., 2008. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *The Canadian journal of urology*, 15(1), pp.3866–3871.
- Hägglöf, C. & Bergh, A., 2012. The stroma-a key regulator in prostate function and malignancy. *Cancers*, 4(2), pp.531–548.
- Hansson, J. & Abrahamsson, P.-A., 2003. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Scandinavian journal of urology and nephrology. Supplementum*, 148(212), pp.28–36.
- Hart, C.D. et al., 2015. Challenges in the management of advanced, ER-positive, HER2-negative breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(9), pp.1–12. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrclinonc.2015.99>.
- Has, 2012. Cancer de la prostate : identification des facteurs de risque et pertinence d'un dépistage par dosage de l'antigène spécifique prostatique (PSA) de populations d'hommes a haut risque ? *Has*.
- Hayashi, S.-I. et al., 2003. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocrine-related cancer*, 10(2), pp.193–202.
- He, X. et al., 2016. Menin localization in cell membrane compartment. *Cancer Biology and*

- Therapy*, 17(1), pp.114–122. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1080/15384047.2015.1108497>.
- Heinlein, C.A. & Chang, C., 2004. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Reviews*, 25(2), pp.276–308.
- Heppner, C. et al., 2001. The tumor suppressor protein menin interacts with NF-kappaB proteins and inhibits NF-kappaB-mediated transactivation. *Oncogene*, 20(36), pp.4917–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11526476>.
- Hervouet, E. et al., 2013. Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. *Epigenetics*, 8(3), pp.237–45. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23364277>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3669116>.
- Hess, J.L., 2004. MLL: A histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends in Molecular Medicine*, 10(10), pp.500–507.
- Hieronimus, H. et al., 2006. Gene expression signature-based chemical genomic prediction identifies a novel class of HSP90 pathway modulators. *Cancer Cell*, 10(4), pp.321–330.
- Hoefnagel, L.D. et al., 2012. Prognostic value of estrogen receptor alpha and progesterone receptor conversion in distant breast cancer metastases. *Cancer*, 118(20), pp.4929–4935. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22415862>
http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/cncr.27518/asset/27518_ftp.pdf?v=1&t=iatkonsu&s=516d36972d5a3b4b73ef2c4b031853e92122636c.
- Honda, M. et al., 2004. Primary hyperparathyroidism associated with aldosterone-producing adrenocortical adenoma and breast cancer: relation to MEN1 gene. *Intern Med*, 43(4), pp.310–314. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15168774>
http://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/43/4/310/_pdf.
- Hörnberg, E. et al., 2011. Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS ONE*, 6(4).
- Huang, J. et al., 2012. The same pocket in menin binds both MLL and JUND but has opposite effects on transcription. *Nature*, 482(7386), pp.542–6. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3983792&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hudson, D.L. et al., 2001. Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate:

- identification of intermediate phenotypes by keratin expression. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 49(2), pp.271–278.
- Huhtaniemi, I. et al., 2009. Will GnRH antagonists improve prostate cancer treatment? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(1), pp.43–50.
- Humphrey, P.A., 2007. Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. *Journal of clinical pathology*, 60(1), pp.35–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17213347><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1860598>.
- Ignatiadis, M. & Sotiriou, C., 2013. Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nature reviews. Clinical oncology*, 10(9), pp.494–506. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23881035>.
- Imachi, H. et al., 2010. Menin, a product of the MEN1 gene, binds to estrogen receptor to enhance its activity in breast cancer cells: Possibility of a novel predictive factor for tamoxifen resistance. *Breast Cancer Research and Treatment*, 122(2), pp.395–407.
- Incrocci, L., 2015. Radiotherapy for prostate cancer and sexual health. *Translational andrology and urology*, 4(2), pp.124–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4708125&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ittmann, M. et al., 2013. Animal models of human prostate cancer: The consensus report of the new york meeting of the mouse models of human cancers consortium prostate pathology committee. *Cancer Research*, 73(9), pp.2718–2736.
- Iwata, T. et al., 2010. MYC overexpression induces prostatic intraepithelial neoplasia and loss of Nkx3.1 in mouse luminal epithelial cells. *PLoS ONE*, 5(2).
- Jeter, C.R. et al., 2011. NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene*, 30(36), pp.3833–3845. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.114>.
- Jiang, X. et al., 2014. Targeting β -catenin signaling for therapeutic intervention in MEN1-deficient pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature communications*, 5, p.5809. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4284642&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jiao, Y. et al., 2011. NIH Public Access. , 331(6021), pp.1199–1203.
- Kaji, H. et al., 2001. Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming

- growth factor type beta signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), pp.3837–42. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=31139&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kang, H.-J. et al., 2014. Differential regulation of estrogen receptor α expression in breast cancer cells by metastasis-associated protein 1. *Cancer research*, 74(5), pp.1484–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24413532>.
- Kaplan-Lefko, P.J. et al., 2003. Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model. *Prostate*, 55(3), pp.219–237.
- Karanika, S. et al., 2015. DNA damage response and prostate cancer: defects, regulation and therapeutic implications. *Oncogene*, 34(22), pp.2815–2822. Available at:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncr.2014.238>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25132269>.
- Karayi, M.K., Neal, D.E. & Markham, A.F., 2000. Current status of linkage studies in hereditary prostate cancer. *BJU International*, 86(6), pp.659–669.
- Karhadkar, S.S. et al., 2004. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*, 431(7009), pp.707–12. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361885>.
- Karnik, S.K. et al., 2005. Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), pp.14659–64. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1253549&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kawai, H. et al., 2003. Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor ?? *International Journal of Cancer*, 107(3), pp.353–358.
- Ki Wong, F. et al., 2000. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Seminars in cancer biology*, 10(4), pp.299–312. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966852>.
- Kim, H. et al., 2003. Menin, a tumor suppressor, represses JunD-mediated transcriptional activity by association with an mSin3A-histone deacetylase complex. *Cancer Research*, 63(19), pp.6135–6139.
- Kim, K.H. & Bender, J.R., 2009. Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 308(1–2), pp.3–8.

- Kim, M.J. et al., 2002. Cooperativity of Nkx3.1 and Pten loss of function in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), pp.2884–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11854455><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC122442>.
- Kim, M.J. et al., 2002. Nkx3.1 mutant mice recapitulate early stages of prostate carcinogenesis. *Cancer Research*, 62(11), pp.2999–3004.
- Klinge, C.M., 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic acids research*, 29(14), pp.2905–2919.
- Klöppel, G., Perren, A. & Heitz, P.U., 2004. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: The WHO classification. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1014, pp.13–27.
- Kocanova, S. et al., 2010. Ligands specify estrogen receptor alpha nuclear localization and degradation. *BMC Cell Biology*, 11(1), p.98. Available at:
<http://bmccellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2121-11-98>.
- Koike, S., Sakai, M. & Muramatsu, M., 1987. Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic acids research*, 15(6), pp.2499–513. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3031601><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC340665>.
- Koš, M. et al., 2001. Minireview: Genomic Organization of the Human ER α Gene Promoter Region. *Molecular Endocrinology*, 15(12), pp.2057–2063. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731608>.
- Kregel, S. et al., 2013. Sox2 Is an Androgen Receptor-Repressed Gene That Promotes Castration-Resistant Prostate Cancer. *PLoS ONE*, 8(1).
- Kreso, A. & Dick, J.E., 2014. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 14(3), pp.275–291. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>.
- Krongrad, A. et al., 1991. Androgen increases androgen receptor protein while decreasing receptor mRNA in LNCaP cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 76(1–3), pp.79–88.
- Kumar, R. et al., 2011. The Dynamic Structure of the Estrogen Receptor. *Journal of Amino Acids*, 2011, pp.1–7. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jaa/2011/812540/>.
- Kushner, P.J. et al., 2000. Estrogen receptor pathways to AP-1. [Review] [39 refs]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 74(5), pp.311–317.
- Kuukasjarvi, T. et al., 1996. Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated

- with poor response to endocrine therapy. *J Clin Oncol*, 14(9), pp.2584–2589.
- La, P. et al., 2006. Tumor suppressor menin: the essential role of nuclear localization signal domains in coordinating gene expression. *Oncogene*, 25(25), pp.3537–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16449969>.
- Lacroix, M. & Leclercq, G., 2004. About GATA3, HNF3A, and XBP1, three genes co-expressed with the oestrogen receptor-?? gene (ESR1) in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 219(1–2), pp.1–7.
- Lapidus, R.G. et al., 1998. Mapping of ER Gene CpG Island Methylation by Methylation-specific Polymerase Chain Reaction Mapping of ER Gene CpG Island Methylation by Methylation-specific Polymerase. *Cancer research*, pp.2515–2519.
- Lawrence, M.S. et al., 2013. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*, 499(7457), pp.214–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12213>.
- Lawson, D. a et al., 2007. Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(1), pp.181–186. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1716155/>.
- Lawson, D. a & Witte, O.N., 2007. Review series Stem cells in prostate cancer initiation and progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(8), pp.2044–2050.
- van Leenders, G.J.L.H. et al., 2003. Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *The American journal of pathology*, 162(5), pp.1529–37. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1851184&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lemmens, I. et al., 1997. Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. *Human molecular genetics*, 6(7), pp.1177–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9215690>.
- Leong, K.G. et al., 2008. Generation of a prostate from a single adult stem cell. , 456(December).
- Lepor, H. & Lepor, H., 2005. A review of surgical techniques for radical prostatectomy. *Reviews in Urology*, 7 Suppl 2, pp.S11-7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16985892.
- Levin, E.R. & Hammes, S.R., 2016. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear

- signalling by steroid receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17(12), pp.783–797. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27729652>.
- Li, C.I., Uribe, D.J. & Daling, J.R., 2005. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British Journal of Cancer*, 93(9), pp.1046–1052. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2361680&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.nature.com/doi/10.1038/sj.bjc.6602787>.
- Li, G. et al., 2013. Estrogen receptor- α 36 is involved in development of acquired tamoxifen resistance via regulating the growth status switch in breast cancer cells. *Molecular Oncology*, 7(3), pp.611–624.
- Li, L., Haynes, M.P. & Bender, J.R., 2003. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), pp.4807–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=153637&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lin, C. et al., 2009. Nuclear Receptor-Induced Chromosomal Proximity and DNA Breaks Underlie Specific Translocations in Cancer. *Cell*, 139(6), pp.1069–1083. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.030>.
- Litt, A.G., 2013. Détection précoce du cancer de la prostate Actualisation du référentiel de pratiques Mini-synthèse.
- Litvinov, I. V, De Marzo, A.M. & Isaacs, J.T., 2003. Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88(7), pp.2972–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843129>.
- Liu, A.Y. et al., 1997. Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), pp.10705–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=23453&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Liu, X. et al., 2015. Systematic dissection of phenotypic, functional, and tumorigenic heterogeneity of human prostate cancer cells. *Oncotarget*, 6(27), pp.23959–23986.
- LONG, R.M. et al., 2005. Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clinical Science*, 108(1), pp.1–11. Available at: <http://clinsci.org/lookup/doi/10.1042/CS20040241>.

- Lu, T.L. et al., 2013. Conditionally ablated Pten in prostate basal cells promotes basal-to-luminal differentiation and causes invasive prostate cancer in mice. *American Journal of Pathology*, 182(3), pp.975–991. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.11.025>.
- Lubahn, D.B. et al., Cloning of Human Androgen Receptor Complementary.
- Lubensky, I.A. et al., 1996. Allelic deletions on chromosome 11q13 in multiple tumors from individual MEN1 patients. *Cancer Research*, 56(22), pp.5272–5278.
- Ma, C.X. et al., 2015. Mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Nature Reviews Cancer*, 15(5), pp.261–275. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3920>.
- Macaluso, M. et al., 2007. Epigenetic modulation of estrogen receptor- α by pRb family proteins: A novel mechanism in breast cancer. *Cancer Research*, 67(16), pp.7731–7737.
- Macaluso, M. et al., 2003. pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-p300 and pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-DNMT1 multimolecular complexes mediate the transcription of estrogen receptor- α in breast cancer. *Oncogene*, 22(23), pp.3511–3517. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12789259>.
- Madureira, P.A. et al., 2006. The forkhead box M1 protein regulates the transcription of the estrogen receptor α in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35), pp.25167–25176.
- Mair, B. et al., 2016. Gain- and Loss-of-Function Mutations in the Breast Cancer Gene GATA3 Result in Differential Drug Sensitivity. *PLoS Genetics*, 12(9), pp.1–26.
- Maitland, N.J. & Collins, A.T., 2008. Prostate cancer stem cells: A new target for therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 26(17), pp.2862–2870.
- Makki, J., 2015. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*, 8(1), pp.23–31.
- Malik, R. et al., 2015. Targeting the MLL complex in castration-resistant prostate cancer. *Nature medicine*, 21(4), pp.344–352. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25822367>.
- Mangelsdorf, D.J. et al., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83, pp.835–839.
- Mani, R.-S. et al., 2009. Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5957), p.1230. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2935583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Manickam, P. et al., 2014. Isolation, characterization, expression and functional analysis of

- the zebrafish ortholog of MEN1. *Mammalian Genome*, 11(6), pp.448–454. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s003350010085>.
- Margueron, R. & Reinberg, D., 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469(7330), pp.343–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3760771&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Marquez, D.C. & Pietras, R.J., 2001. Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells. *Oncogene*, 20(39), pp.5420–5430. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11571639.
- Marzo, A.M. De et al., 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 7(4), pp.256–69. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2090>
<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2090>.
- Masumori, N. et al., 2001. A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential. *Cancer Research*, 61(5), pp.2239–2249.
- Matkar, S., Thiel, A. & Hua, X., 2013. Menin: A scaffold protein that controls gene expression and cell signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(8), pp.394–402. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2013.05.005>.
- Maximiano, S. et al., 2016. Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 30(2), pp.75–86.
- Maximov, P.Y., Lee, T.M. & Jordan, V.C., 2013. The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. *Curr Clin Pharmacol*, 8(2), pp.135–155. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624793/pdf/CCP-8-135.pdf>.
- McDonnell, D.P., Wardell, S.E. & Norris, J.D., 2015. Oral Selective Estrogen Receptor Downregulators (SERDs), a Breakthrough Endocrine Therapy for Breast Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(12), pp.4883–4887.
- McNeal, J.E., 1968. Regional morphology and pathology of the prostate. *American Journal of Clinical Pathology*, 49(3), pp.347–357.
- Meyer, J.S. et al., 2005. Breast carcinoma malignancy grading by Bloom – Richardson system vs proliferation index : reproducibility of grade and advantages of proliferation index. ,

pp.1067–1078.

- Milne, T.A. et al., 2005. Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3), pp.749–54. Available at: http://www.pnas.org/content/102/3/749.abstract?ijkey=c65975a951c77c5c6d92d969466ee9451ba5f692&keytype2=tf_ipsecsha.
- Mohan, M. et al., 2010. Licensed to elongate: a molecular mechanism for MLL-based leukaemogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 10(10), pp.721–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20844554>.
- Monje, P. et al., 2001. Differential cellular localization of estrogen receptor α in uterine and mammary cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 181(1–2), pp.117–129.
- Montgomery, B. et al., 2014. Glucocorticoids and prostate cancer treatment: friend or foe? *Asian journal of andrology*, 16(3), pp.354–8. Available at: <http://www.ajandrology.com/article.asp?issn=1008-682X;year=2014;volume=16;issue=3;spage=354;epage=358;aulast=Montgomery>.
- Mostaghel, E.A. & Plymate, S., 2011. New Hormonal Therapies for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(3), pp.625–642.
- Mulholland, D.J. et al., 2009. Lin-Sca-1+CD49^{high} stem/progenitors are tumor-initiating cells in the Pten-null prostate cancer model. *Cancer Research*, 69(22), pp.8555–8562.
- Mulholland, D.J. et al., 2006. PTEN and GSK3 β : key regulators of progression to androgen-independent prostate cancer. *Oncogene*, 25(3), pp.329–337.
- Murai, M.J. et al., 2011. Crystal structure of menin reveals binding site for Mixed Lineage Leukemia (MLL) protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(36), pp.31742–31748.
- Nagabhushan, M. et al., 1996. Altered expression of CD44 in human prostate cancer during progression. *Am.J.Clin.Pathol.*, 106(0002–9173 (Print)), pp.647–651.
- Naito, J. et al., 2006. Expression and functional analysis of menin in a multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) patient with somatic loss of heterozygosity in chromosome 11q13 and unidentified germline mutation of the MEN1 gene. *Endocrine*, 29(3), pp.485–490. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943588>.
- Nakata, Y. et al., 2013. that plays a pivotal role in human T helper type 2 cell development c-Myb , Menin , GATA-3 , and MLL form a dynamic transcription complex that plays a pivotal role in human T helper type 2 cell development. , 116(8), pp.1280–1290.
- Nielsen, F.C., van Overeem Hansen, T. & Sørensen, C.S., 2016. Hereditary breast and ovarian

- cancer: new genes in confined pathways. *Nature Reviews Cancer*, 16(9), pp.599–612. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc.2016.72>.
- Nik-Zainal, S. et al., 2016. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, 534(7605), pp.1–20. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature17676>.
- Niu, Y. et al., 2008. Androgen receptor is a tumor suppressor and proliferator in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(34), pp.12182–12187. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18723679>.
- Niu, Y. et al., 2008. Targeting the stromal androgen receptor in primary prostate tumors at earlier stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), pp.12188–12193.
- Niu, Y.-N. & Xia, S.-J., 2009. Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer. *Asian journal of andrology*, 11(1), pp.28–35.
- Nonclercq, D. et al., 2004. Ligand-independent and agonist-mediated degradation of estrogen receptor- α in breast carcinoma cells: evidence for distinct degradative pathways. *Molecular and cellular endocrinology*, 227(1–2), pp.53–65. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720704002965>.
- O’Brien, K.M. et al., 2010. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the carolina breast cancer study. *Clinical Cancer Research*, 16(24), pp.6100–6110.
- Oliveira, D.S.M. et al., 2016. The mouse prostate: A basic anatomical and histological guideline. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(1), pp.8–13.
- Omarjee, S. et al., 2016. The molecular mechanisms underlying the ER α -36-mediated signaling in breast cancer. *Oncogene*, (August), pp.1–12. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2016.415>.
- Osborne, C.K. & Schiff, R., 2011. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annual review of medicine*, 62, pp.233–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20887199> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3656649>.
- Ottaviano, Y.L. et al., 1994. Methylation of the Estrogen Receptor Gene CpG Island Marks Loss of Estrogen Receptor Expression in Human Breast Cancer Cells. , pp.2552–2555.
- Ouyang, X. et al., 2008. Activator protein-1 transcription factors are associated with progression and recurrence of prostate cancer. *Cancer Research*, 68(7), pp.2132–2144.
- Parimi, V. et al., 2014. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review. *American journal of clinical and experimental urology*, 2(4), pp.273–85. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4297323&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Park, J.-H. et al., 2002. Prostatic Intraepithelial Neoplasia in Genetically Engineered Mice. *The American Journal of Pathology*, 161(2), pp.727–735. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1850748><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010642289>.
- Patrawala, L. et al., 2007. Hierarchical organization of prostate cancer cells in xenograft tumors: The CD44⁺ cell population is enriched in tumor-initiating cells. *Cancer Research*, 67(14), pp.6796–6805.
- Patrawala, L. et al., 2006. Highly purified CD44⁺ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene*, 25(12), pp.1696–1708.
- Pedram, A., Razandi, M. & Levin, E.R., 2006. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Molecular Endocrinology*, 20(9), pp.1996–2009.
- Penney, K.L. et al., 2013. Gleason grade progression is uncommon. *Cancer Research*, 73(16), pp.5163–5168.
- Perakakis, N. et al., 2016. Multiple endocrine neoplasia type 1 associated with a new germline men1 mutation in a family with atypical tumor phenotype. *Hormones*, 15(1), pp.113–117.
- Piecha, G., Chudek, J. & Więcek, A., 2010. Primary hyperparathyroidism in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *International journal of endocrinology*, 2010, p.928383.
- Podsypanina, K. et al., 1999. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), pp.1563–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15517&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pohar, R., 2011. Le cancer de la prostate Le cancer de la prostate. *L'actualité Pharmaceutique*, 3, pp.478–485.
- Ponglikitmongkol, M., Green, S. & Chambon, P., 1988. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *The EMBO journal*, 7(11), pp.3385–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=454836&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Qin, J. et al., 2012. The PSA⁻/lo prostate cancer cell population harbors self-renewing long-

- term tumor-propagating cells that resist castration. *Cell Stem Cell*, 10(5), pp.556–569. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.03.009>.
- Rao, J. et al., 2011. Advances in the understanding of the structure and function of ER- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α . *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(3–5), pp.231–237. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.08.004>.
- Reddy, S.D.N. et al., 2012. Metastasis-associated protein 1/histone deacetylase 4-nucleosome remodeling and deacetylase complex regulates phosphatase and tensin homolog gene expression and function. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33), pp.27843–27850.
- Richardson, G.D. et al., 2004. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *Journal of Cell Science*, 117(16), pp.3539–3545.
- Ripoche, D. et al., 2016. ActivinB is induced in insulinoma to promote tumor plasticity through a β -cell-induced dedifferentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 36(5).
- Robinson, D. et al., 2015. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*, 161(5), pp.1215–1228.
- Le Romancer, M. et al., 2011. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocrine Reviews*, 32(5), pp.597–622.
- Rulifson, I.C. et al., 2007. Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(15), pp.6247–6252.
- Rybak, A.P., Bristow, R.G. & Kapoor, A., 2015. Prostate cancer stem cells: deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget*, 6(4), pp.1900–19. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4385825&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.
- Sabnis, G.J. et al., 2011. Functional activation of the estrogen receptor- α and aromatase by the HDAC inhibitor entinostat sensitizes ER-negative tumors to letrozole. *Cancer Research*, 71(5), pp.1893–1903.
- Sakr, W.A. et al., 1994. Q @. , pp.3273–3277.
- Salmena, L., Carracedo, A. & Pandolfi, P.P., 2008. Tenets of PTEN Tumor Suppression. *Cell*, 133(3), pp.403–414.
- Sato, M. et al., 2000. A newly recognized germline mutation of MEN1 gene identified in a patient with parathyroid adenoma and carcinoma. *Endocrine*, 12(3), pp.223–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963041>.

- Saville, B. et al., 2000. Activation at GC-rich (Sp1) Promoter Elements *. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), pp.5379–5387.
- Scacheri, P.C. et al., 2006. Genome-wide analysis of menin binding provides insights into MEN1 tumorigenesis. *PLoS Genetics*, 2(4), pp.406–419.
- Schaid, D.J. et al., 1998. Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *American journal of human genetics*, 62(6), pp.1425–1438. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1377141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Schroeder, A. et al., 2014. Loss of androgen receptor expression promotes a stem-like cell phenotype in prostate cancer through STAT3 signaling. *Cancer Research*, 74(4), pp.1227–1237.
- Sciavolino, P.J. et al., 1997. Tissue-specific expression of murine Nkx3.1 in the male urogenital system. *Developmental Dynamics*, 209(1), pp.127–138.
- Seigne, C. et al., 2010. Characterisation of prostate cancer lesions in heterozygous Men1 mutant mice. *BMC Cancer*, 10, p.395. Available at: <http://content.ebscohost.com/ContentServer.asp?T=P&P=AN&K=20663219&S=R&D=mnh&EbscoContent=dGJyMMTo50Seqa440dVuOLCmr0mep69Sr6m4SbKWxWXS&ContentCustomer=dGJyMPGpsky2qLNQuczHXbnb5ofx6gAA%5Cnhttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=2066321>.
- Seigne, C. et al., 2013. High incidence of mammary intraepithelial neoplasia development in Men1-disrupted murine mammary glands. *The Journal of pathology*, 229(4), pp.546–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180448>.
- Seisen, T. et al., 2012. La prostate : Une glande au carrefour uro-génital. *Progres en Urologie*, 22(SUPPL.1), pp.S2–S6. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1166-7087\(12\)70028-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1166-7087(12)70028-3).
- Selman, S.H., 2011. The McNeal prostate: A review. *Urology*, 78(6), pp.1224–1228. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2011.07.1395>.
- Shappell, S.B. et al., 2004. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Research*, 64(6), pp.2270–2305.
- Sharma, N.L. et al., 2013. The Androgen Receptor Induces a Distinct Transcriptional Program in Castration-Resistant Prostate Cancer in Man. *Cancer Cell*, 23(1), pp.35–47. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.010>.

- Shen, M. & Abate-Shen, C., 2010. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & development*, (212), pp.1967–2000. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/content/24/18/1967.short>.
- Sherwood, E.R. et al., 1991. Differential Expression of Specific Cytokeratin Polypeptides in the Basal and Luminal Epithelia of the Human Prostate. , 314.
- Shi, A. et al., 2012. Structural insights into inhibition of the bivalent menin-MLL interaction by small molecules in leukemia. *Blood*, 120(23), pp.4461–4469.
- Shilatifard, A., 2012. NIH Public Access. , (Figure 1), pp.65–95.
- Shirley, S.H. et al., 2009. Transcriptional regulation of Estrogen receptor- α by p53 in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 69(8), pp.3405–3414.
- Siegel, R. et al., 2014. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(1), pp.9–29. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21208/full><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24399786>.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A., 2016. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 66(1), pp.7–30.
- Slany, R.K., 2005. When epigenetics kills: MLL fusion proteins in leukemia. *Hematological Oncology*, 23(1), pp.1–9.
- Song, M.S., Salmena, L. & Pandolfi, P.P., 2012. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(5), pp.283–296. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22473468>.
- Sorlie, T. et al., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pp.10869–10874. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11553815<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC58566/pdf/pq010869.pdf>.
- Sotiriou, C. & Pusztai, L., 2009. Gene-expression signatures in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 360(8), p.790–800+752. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-60849097255&partnerID=40&md5=ddaca8ebb80a94fbdfb3732e5f8f02e1><http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-60849097255&partnerID=tZOtx3y1>.
- Sowa, H. et al., 2004. Menin is required for bone morphogenetic protein 2- and transforming growth factor β -regulated osteoblastic differentiation through interaction with Smads and

- Runx2. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), pp.40267–40275.
- Stambolic, V. et al., 2000. High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten(+/-) mice. *Cancer Research*, 60(13), pp.3605–3611.
- Stanbrough, M. et al., 2001. Prostatic intraepithelial neoplasia in mice expressing an androgen receptor transgene in prostate epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pp.10823–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=58558&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Stephens, P.J. et al., 2012. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*, 486(7403), pp.400–4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11017>.
- Stewart, C. et al., 1998. Characterization of the mouse Men1 gene and its expression during development. *Oncogene*, 17(19), pp.2485–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9824159>.
- Suzuki, A. et al., 1998. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Current Biology*, 8(21), pp.1169–1178.
- Syro, L. V et al., 2012. Pituitary tumors in patients with MEN1 syndrome. *Clinics (São Paulo, Brazil)*, 67 Suppl 1, pp.43–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3328811&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tan, M.E. et al., 2014. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica*, 36(1), pp.1–21. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2014.18>.
- Tan, P.Y. et al., 2012. Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival. *Molecular and cellular biology*, 32(2), pp.399–414. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3255774&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tanaka, M. et al., 2000. Nkx3.1, a murine homolog of Drosophila bagpipe, regulates epithelial ductal branching and proliferation of the prostate and palatine glands. *Developmental Dynamics*, 219(2), pp.248–260.
- Tao, Z. et al., 2015. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(2), pp.333–338. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-014->

0459-6.

- Taylor, B.S. et al., 2010. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell*, 18(1), pp.11–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.026>.
- Taylor, R.A. et al., 2017. Germline BRCA2 mutations drive prostate cancers with distinct evolutionary trajectories. *Nature Communications*, 8, p.13671. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms13671>.
- Thomas, C. & Gustafsson, J.-Å., 2015. Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 26(9), pp.467–476. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276015001204>.
- Thomas, C. & Gustafsson, J.-Å., 2011. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nature reviews. Cancer*, 11(8), pp.597–608. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3093>.
- Thomas, M. a, Preece, D.M. & Bentel, J.M., 2010. Androgen regulation of the prostatic tumour suppressor NKX3.1 is mediated by its 3' untranslated region. *The Biochemical journal*, 425(3), pp.575–583.
- Thompson, D.A. et al., 1997. Identification of two estrogen receptor transcripts with novel 5' exons isolated from a MCF7 cDNA library. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 62(2–3), pp.143–153.
- Timms, B.G., 2008. Prostate development: A historical perspective. *Differentiation*, 76(6), pp.565–577. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00278.x>.
- Tomlins, S.A. et al., 2009. ETS Gene Fusions in Prostate Cancer: From Discovery to Daily Clinical Practice. *European Urology*, 56(2), pp.275–286.
- Tomlins, S. a et al., 2005. Recurrent Fusion of TMPRSS2 and. *Science*, 310(October), pp.644–648.
- Trotman, L.C. et al., 2003. Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biology*, 1(3), pp.385–396.
- Valeri, A. et al., 2000. Early onset and familial predisposition to prostate cancer significantly enhance the probability for breast cancer in first degree relatives. *International Journal of Cancer*, 86(6), pp.883–887.
- Vallejos, C.S. et al., 2010. Breast Cancer Classification According to Immunohistochemistry Markers: Subtypes and Association With Clinicopathologic Variables in a Peruvian Hospital Database. *Clinical Breast Cancer*, 10(4), pp.294–300. Available at: <http://dx.doi.org/10.3816/CBC.2010.n.038>.

- Verhagen, P.C.M.S. et al., 2006. The PTEN gene in locally progressive prostate cancer is preferentially inactivated by bi-allelic gene deletion. *Journal of Pathology*, 208(5), pp.699–707.
- Veronesi, U. et al., 2006. Rethinking TNM: Breast cancer TNM classification for treatment decision-making and research. *Breast*, 15(1), pp.3–8.
- Vesuna, F. et al., 2012. Twist contributes to hormone resistance in breast cancer by downregulating estrogen receptor- α . *Oncogene*, 31(27), pp.3223–3234. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.483>.
- Vincent-Salomon, A. et al., 2008. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Nature genetics*, 40(7), p.809; author reply 810–812.
- Vis, A.N. & Schröder, F.H., 2009. Key targets of hormonal treatment of prostate cancer. Part 1: The androgen receptor and steroidogenic pathways. *BJU International*, 104(4), pp.438–448.
- Visakorpi, T. et al., 1995. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nature genetics*, 9(4), pp.401–406.
- Vocke, C.D. et al., 1996. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Research*, 56(10), pp.2411–2416.
- Voeller, H.J. et al., 1997. Coding Region of NKX3 . 1 , a Prostate-Specific Homeobox Gene on 8p21 , Is Not Mutated in Human Prostate Cancers Homeobox Gene on 8p21 , Is Not . , pp.4455–4459.
- Wang, P. et al., 2016. Sensitive detection of mono- and polyclonal ESR1 mutations in primary tumors, metastatic lesions, and cell-free DNA of breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 22(5), pp.1130–1137.
- Wang, S. et al., 2003. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell*, 4(3), pp.209–221.
- Wang, S., Parsons, R. & Ittmann, M., 1998. Homozygous Subset Deletion of the PTEN Tumor Suppressor Gene in a of Prostate. *Clin Cancer Res*, 4(3), pp.811–815.
- Wang, X. et al., 2009. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature*, 461(7263), pp.495–500. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19741607%5Cnhttp://www.nature.com/nature/journal/v461/n7263/pdf/nature08361.pdf>.
- Wang, Y. et al., 2011. The tumor suppressor protein menin inhibits AKT activation by regulating its cellular localization. *Cancer Research*, 71(2), pp.371–382.

- Wang, Z. et al., 2006. A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), pp.9063–8. Available at: <http://www.pnas.org/content/103/24/9063.short>.
- Wang, Z.A. et al., 2014. Luminal Cells Are Favored as the Cell of Origin for Prostate Cancer. *Cell Reports*, 8(5), pp.1339–1346. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.002>.
- Watson, P.A., Arora, V.K. & Sawyers, C.L., 2015. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nature reviews. Cancer*, 15(12), pp.701–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26563462> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4771416>.
- Wautot, V. et al., 2002. Germline mutation profile of MEN1 in Multiple Endocrine Neoplasia type 1: Search for correlation between phenotype and the functional domains of the MEN1 protein. *Human Mutation*, 20(1), pp.35–47.
- Wiklund, F. et al., 2003. Linkage analysis of prostate cancer susceptibility: confirmation of linkage at 8p22-23. *Human genetics*, 112(4), pp.414–418.
- Wu, C.-T. et al., 2007. Increased prostate cell proliferation and loss of cell differentiation in mice lacking prostate epithelial androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), pp.12679–84. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1937526&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.
- Wuescher, L. et al., 2011. Insulin regulates menin expression, cytoplasmic localization, and interaction with FOXO1. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 301(3), pp.E474-83. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3275149&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.
- Xie, Q. et al., 2017. Dissecting cell-type-specific roles of androgen receptor in prostate homeostasis and regeneration through lineage tracing. *Nature Communications*, 8, p.14284. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms14284>.
- Xu, J. et al., 2001. Linkage and association studies of prostate cancer susceptibility: evidence for linkage at 8p22-23. *American Journal of Human Genetics*, 69(2000), pp.341–350. Available at: <file:C:/Users/xwei/Reprints/X/XuJ linkage& assoc prostate cancer.pdf>.
- Xu, J. & Genetics, the I.C. for P.C., 2000. Combined analysis of hereditary prostate cancer

- linkage to 1q24-25: results from 772 hereditary prostate cancer families from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics. *American journal of human genetics*, 66(3), pp.945–57. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712209><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1288175>.
- Xu, K. et al., 2013. NIH Public Access. , 338(6113), pp.1465–1469.
- Yan, Y. et al., 1997. Large fragment of the probasin promoter targets high levels of transgene expression to the prostate of transgenic mice. *Prostate*, 32(2), pp.129–139.
- Yan, Y., Zuo, X. & Wei, D., 2015. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem cells translational medicine*, 4(9), pp.1033–43. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26136504><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4542874>.
- Yang, X.W. et al., 2000. Transcriptional activation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells by histone deacetylase inhibition. *Cancer Research*, 60(24), pp.6890–6894. Available at: isi:000166201500026.
- Yang, Y.A. & Yu, J., 2015. Current perspectives on FOXA1 regulation of androgen receptor signaling and prostate cancer. *Genes and Diseases*, 2(2), pp.144–151. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2015.01.003>.
- Yokoyama, A. et al., 2004. Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Molecular and cellular biology*, 24(13), pp.5639–5649.
- Yokoyama, A. et al., 2005. The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell*, 123(2), pp.207–218.
- Yokoyama, A. & Cleary, M.L., 2008. Menin Critically Links MLL Proteins with LEDGF on Cancer-Associated Target Genes. *Cancer Cell*, 14(1), pp.36–46.
- Zhao, X.Y. et al., 2000. Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nature medicine*, 6(6), pp.703–706.
- Zheng, S.L. et al., 2006. Germ-line mutation of NKX3.1 cosegregates with hereditary prostate cancer and alters the homeodomain structure and function. *Cancer Research*, 66(1), pp.69–77.
- Zhou, M. et al., 2002. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 419(OCTOBER), pp.388–390. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12374981>.

Zhu, C. et al., 2011. Conditional expression of the androgen receptor induces oncogenic transformation of the mouse prostate. *Journal of Biological Chemistry*, 286(38), pp.33478–33488.