



**HAL**  
open science

# Etude du rôle de facteurs génétiques et épigénétiques dans l'homéostasie et la fonction des cellules pancréatiques

Evans Quilichini

► **To cite this version:**

Evans Quilichini. Etude du rôle de facteurs génétiques et épigénétiques dans l'homéostasie et la fonction des cellules pancréatiques. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066219 . tel-02301988

**HAL Id: tel-02301988**

**<https://theses.hal.science/tel-02301988>**

Submitted on 1 Oct 2019

**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.

# Université Pierre et Marie Curie

École Doctorale « Complexité du Vivant »

*CNRS UMR7622*

## **Étude du rôle de facteurs génétiques et épigénétiques dans l'homéostasie et la fonction des cellules pancréatiques**

Par Evans Quilichini

**Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire**

Présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2017

Devant un jury composé de :

Monsieur Michel Raymondjean  
Madame Anne Grapin-Botton  
Madame Christine Perret  
Monsieur Bertrand Blondeau  
Monsieur Bertrand Duvillié  
Madame Cécile Haumaitre

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directrice de thèse



## REMERCIEMENTS

*Je souhaite tout d'abord remercier les membres de jury, Michel Raymondjean, Anne Grapin-Botton, Christine Perret, Bertrand Blondeau et Bertrand Duvillié, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Je tiens à remercier vivement et sincèrement Cécile Haumaitre pour la confiance qu'elle m'a accordée en m'accueillant dans son équipe et en me confiant ce projet de recherche. Je la remercie pour l'encadrement rigoureux et bienveillant qu'elle m'a assuré durant ces trois années. Je lui suis reconnaissant de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de sa grande compétence, de son dynamisme et de son efficacité professionnels qui sont exemplaires à mes yeux.*

*Un immense merci à Mélanie Fabre pour sa complicité, son enthousiasme et son écoute. Partager son bureau et travailler à ses côtés étaient un réel plaisir. Je lui souhaite de s'épanouir dans sa prochaine équipe et j'espère avoir l'occasion de la recroiser au détour d'une rue bordelaise.*

*Je remercie Edouard Manzoni pour sa grande aide technique aux génotypages, ceux-ci ponctués d'adroites réflexions introspectives !*

*Merci à Ozge Ozguc et Lucie Morillon pour la motivation et la rigueur qu'elles ont démontrées durant leur stage. Je leur souhaite une très belle réussite professionnelle.*

*J'adresse mes remerciements à Silvia Cereghini, toujours disponible en cas d'imprévu ! Merci pour son aide et ses conseils formateurs.*

*Merci à Edwige Declerc pour sa participation efficace aux coupes et colorations histologiques. Merci également pour son aide précieuse dans l'identification des souris de l'animalerie C8.*

*Je souhaite remercier Sylvie Schneider-Maunoury pour sa grande expertise scientifique dans l'analyse et la correction de mes rapports et présentations. Merci pour l'aide et le soutien qu'elle m'a régulièrement proposés.*

*Merci à Bertrand Blondeau et ses collègues, Ghislaine Guillemain et Emilie Courty, pour nos collaborations enrichissantes.*

*Je remercie Vincent Galy pour son aide (sollicitée à plusieurs reprises !) dans le maniement de l'apotome. Merci pour la confiance qu'il m'a accordée en m'en déléguant la gestion.*

*Merci à Valérie Bello de m'avoir donné l'opportunité de découvrir le monde de l'enseignement.*

*Je remercie le personnel de l'animalerie B8, et plus particulièrement Odile Favière, pour son efficacité dans la gestion de nos différentes lignées de souris.*

*Merci à l'ensemble de l'équipe SSM (Sylvie, Christine, Marie, Isabelle, François, Martin, Alexis, Alice, Ines, Abraham, Antoine) pour les bons moments partagés autour de boissons, gâteaux et spécialités culinaires plus appétissantes les unes que les autres.*

*Enfin, mes remerciements vont à ma famille et mes amis qui, avec cette question récurrente, « comment vont tes souris ? », m'ont souvent rappelé un retard dans la gestion des registres ! Merci à mes parents pour leur soutien et leurs encouragements permanents. Merci à mes tantes, oncles, cousins et à ma belle-famille pour leur affection sans cesse renouvelée. Merci à Sarah, qui a tenu le rôle le plus important dans cette aventure, et d'ailleurs sans qui celle-ci n'aurait probablement pas eu lieu ! 🙏*

*Merci à tous.*

## RÉSUMÉ

Les tissus exocrine et endocrine du pancréas sont respectivement impliqués dans la digestion alimentaire et le contrôle de la glycémie. Cette diversité fonctionnelle repose sur des facteurs transcriptionnels et épigénétiques qui assurent une régulation coordonnée de l'identité et de la fonction des cellules. La dérégulation de ces facteurs est potentiellement pathologique. Le cancer du pancréas est classiquement initié par des métaplasie acinaires, et le diabète est lié à une diminution ou une perte de cellules  $\beta$  fonctionnelles. Ma thèse vise à identifier et à caractériser des régulateurs de l'homéostasie et de la fonction des cellules du pancréas.

Notre équipe a précédemment démontré le rôle du facteur de transcription *Hnf1b* dans le développement du pancréas. Son rôle post-natal n'était, jusqu'à présent, pas documenté. Bien qu'après la naissance l'expression pancréatique de *Hnf1b* soit limitée à l'épithélium canalaire, son inactivation post-natale a de larges conséquences sur l'ensemble du compartiment exocrine. Les souris mutantes *Sox9-Cre<sup>ER</sup>;Hnf1b<sup>fl/fl</sup>* présentent d'importants défauts canaux et développent une pancréatite associée à des néoplasies intra-épithéliales.

La pathologie MODY5 (Maturity Onset Diabetes of The Young 5) est liée à des mutations hétérozygotes de *HNF1B*. Nous avons analysé le phénotype pancréatique du premier modèle murin de MODY5 (PMHnf1b) généré par insertion d'une mutation humaine chez la souris. Similairement aux patients MODY5, ces souris sont intolérantes au glucose. Leur contenu pancréatique en insuline est fortement diminué. Elles présentent une réduction du volume total des gros îlots et des cellules  $\beta$ . Des analyses embryonnaires ont révélé une diminution de l'expression du marqueur pro-endocrine *Ngn3* suggérant une étiologie développementale. Sur le plan exocrine, les souris PMHnf1b développent une pancréatite, en concordance avec les défauts acinaires observés chez patients MODY5.

Des études antérieures menées par notre équipe ont révélé le rôle essentiel de facteurs épigénétiques, les HDAC de classe I, dans le développement du pancréas. Basés sur l'analogie des voies qui régulent le développement et la régénération du pancréas, nous nous sommes interrogés sur le rôle des HDAC dans la régénération pancréatique. L'inactivation de HDAC3 sensibilise le tissu acinaire à l'inflammation et abroge sa régénération.

Nos études dévoilent l'implication de nouveaux mécanismes moléculaires dans la survenue de la pancréatite, du cancer du pancréas et du diabète. Ces données pourraient contribuer à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement ou la prévention des pathologies du pancréas.

## TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION .....	1
<b>I. Le pancréas .....</b>	<b>2</b>
A. Développement embryonnaire du pancréas murin .....	2
1. Mise en place du territoire présomptif du pancréas .....	2
2. Formation du pancréas primitif .....	3
3. Spécifications endocrine et exocrine .....	4
a. Spécification endocrine .....	5
b. Spécification canalaire.....	11
c. Spécification acinaire.....	15
4. Anatomie et composition définitives .....	18
B. Physiologie du pancréas.....	21
1. Physiologie exocrine.....	21
2. Physiologie endocrine.....	23
C. Pathologies du pancréas .....	26
1. Les diabètes .....	26
a. Diabète de type 1 .....	27
b. Diabète de type 2 .....	29
c. Diabète de type MODY.....	29
2. Le cancer du pancréas .....	30
a. Les différents types de cancer du pancréas.....	30
b. L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) .....	31
<b>II. Le facteur de transcription HNF1B .....</b>	<b>35</b>
A. La famille HNF1 .....	35
B. Structure du gène .....	35
C. Structure de la protéine .....	37
D. Profil d'expression embryonnaire chez la souris .....	39
E. Fonctions .....	41
1. Rôles dans la formation de l'endoderme viscéral .....	41
2. Rôles dans l'intestin .....	42
3. Rôles dans le foie et la vésicule biliaire .....	42
4. Rôles dans le pancréas .....	44
5. Rôles dans le rein et le système urogénital.....	45
F. Mutations et maladies humaines .....	47
<b>III. Les histone désacétylases .....</b>	<b>51</b>
A. Généralités sur l'épigénétique .....	51
B. Les différentes classes d'histone désacétylases .....	53
C. Rôles des histone désacétylases de classe I.....	57
1. Rôles extrapancréatiques .....	57
2. Rôles dans le pancréas .....	58
OBJECTIF DES TRAVAUX DE THÈSE.....	61
RÉSULTATS .....	63
<b>Article 1 : Pancreatic ductal deletion of Hnf1b disrupts exocrine homeostasis and leads to pancreatitis and neoplasia .....</b>	<b>65</b>
<b>Article 2 : New insights in MODY5 etiology and physiopathology with a MODY5 mouse model .....</b>	<b>109</b>
<b>Article 3 : Implication of epigenetics in pancreas development and disease (review) .....</b>	<b>131</b>

<b>Régulation épigénétique de la régénération acinaire du pancréas : rôle de HDAC3 .....</b>	<b>149</b>
A. Contexte .....	149
B. Objectif et stratégie .....	152
C. Résultats .....	153
D. Discussion .....	154
DISCUSSION GÉNÉRALE .....	157
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	171





INTRODUCTION

## I. Le pancréas

### A. Développement embryonnaire du pancréas murin

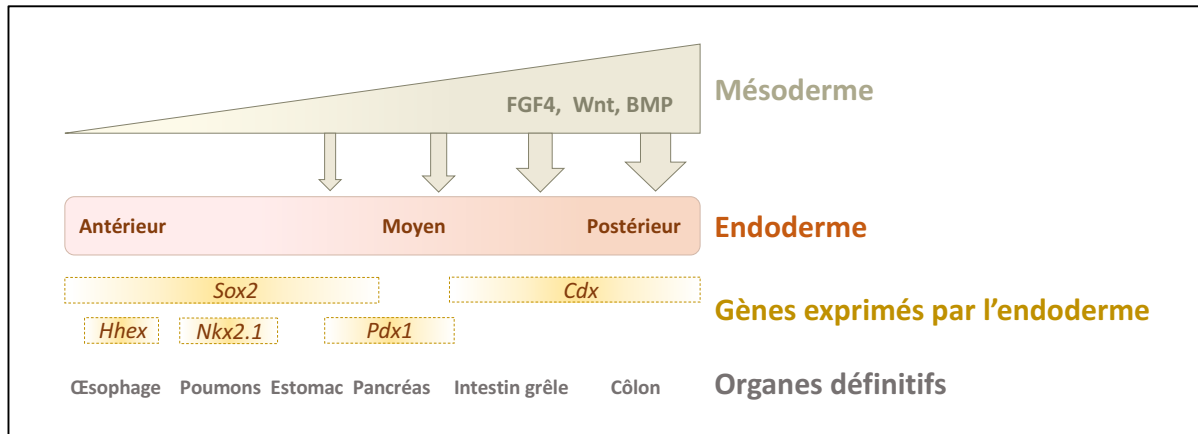
#### 1. Mise en place du territoire présomptif du pancréas

Le pancréas est un tissu d'origine endodermique. Suite à la gastrulation, la mise en place de l'axe antéro-postérieur (A-P) de l'endoderme s'effectue sous le contrôle de signaux qui proviennent du mésoderme adjacent (Figure 1). Parmi les molécules impliquées, Fibroblast Growth Factor 4 (FGF4) inhibe l'expression des facteurs de transcription pro-antérieurs *Nkx2.1* et *Hhex* selon un gradient de concentration croissant le long de l'axe A-P. De façon similaire, les voies Wnt et Bone Morphogenetic Protein (BMP) induites par le mésoderme envoient des signaux pro-antérieurs vers l'endoderme (Pan and Wright, 2011). Ainsi, progressivement, l'endoderme se régionalise et des territoires aux profils d'expression génique distincts se mettent en place. L'endoderme se nomme alors intestin primitif et s'organise en trois régions (Zorn and Wells, 2009) :

- l'intestin antérieur (*foregut*), qui exprime notamment *Hhex*, *Nkx2.1* et *Sox2*
- l'intestin moyen (*midgut*), qui exprime notamment *Pdx1* (côté antérieur)
- l'intestin postérieur (*hindgut*), qui exprime notamment *Cdx*

Chez la souris, à E8.5, sous l'influence du mésenchyme environnant, l'intestin antérieur se régionalise et amorce la mise en place des territoires présomptifs des organes respiratoire et digestif (œsophage, poumons, thyroïde, estomac, pancréas, etc.). Chez l'Homme, des malformations congénitales peuvent se manifester simultanément dans tous ces organes, apportant la preuve clinique de leur origine commune. Les intestins médian et postérieur, quant à eux, formeront respectivement l'intestin grêle et le côlon (Zorn and Wells, 2009).

À E8.5, le territoire présomptif du pancréas prend donc la forme d'une monocouche de cellules épithéliales localisée sur la partie antérieure de l'intestin primitif moyen.



**Figure 1 : Mise en place de l'axe antéro-postérieur de l'endoderme.**

## 2. Formation du pancréas primitif

Le pancréas émerge de l'intestin primitif sous la forme d'un bourgeon ventral et d'un bourgeon dorsal, tous deux induits par des structures mésodermiques différentes. Ces deux bourgeons proviennent d'une évagination puis stratification localisées de la monocouche épithéliale. Ils sont constitués de cellules progénitrices multipotentes à l'origine des futures cellules fonctionnelles du pancréas.

Le bourgeon dorsal apparaît à E9.5. Il est induit par des signaux qui proviennent de la notochorde adjacente. L'ablation de la notochorde dans des explants embryonnaires de poulets perturbe le développement du bourgeon dorsal. Activine et Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2), deux molécules sécrétées par la notochorde, inhibent la voie Sonic Hedgehog (SHH) permettant alors l'expression de *Pdx1*, gène indispensable au développement du pancréas (Hebrok et al., 1998).

Le bourgeon ventral apparaît à E10. À ce stade, l'endoderme ventral est au voisinage direct du mésoderme cardiaque qui envoie des signaux impliqués dans le développement précoce de plusieurs organes. Le mésoderme cardiaque sécrète des FGFs dont les effets sur l'endoderme ventral sont dose-dépendants. En mettant en culture des explants d'endoderme de souris, une équipe américaine a montré qu'une concentration élevée en FGF active l'expression de *Nkx2.1*, induisant les progéniteurs pulmonaires (Serls et al., 2005). Une dose moindre de FGFs active l'expression d'*Albumine* et induit les progéniteurs hépatiques. En l'absence de FGFs,

l'endoderme ventral exprime *Pdx1*. Ce résultat montre que le programme de développement pancréatique s'exprime par défaut dans l'endoderme ventral.

Moins documentés, plusieurs facteurs épigénétiques jouent pourtant un rôle important dans l'émergence des bourgeons pancréatiques. Par exemple, au niveau de l'endoderme ventral, la méthyltransférase *Ezh2* inhibe l'expression de *Pdx1* dans les territoires adjacents au bourgeon pancréatique. Chez la souris, de multiples bourgeons pancréatiques ventraux apparaissent suite à la délétion de *Ezh2*, au détriment du bourgeon hépatique dont la taille est alors diminuée (Xu et al., 2011).

Outre *Pdx1*, de nombreux facteurs de transcription sont impliqués dans l'émergence et le maintien des deux bourgeons pancréatiques, tels que *Ptf1a*, *Sox9* et *Nkx6.1*. Chez la souris, l'inactivation de chacun de leur gène provoque une diminution du pool de progéniteurs pancréatiques (Kawaguchi et al., 2002; Seymour et al., 2007). Plus tardivement, *Ptf1a* est requis pour la différenciation du tissu acinaire tandis que *Sox9* se restreint aux cellules canalaire (Seymour, 2014).

Les bourgeons pancréatiques reçoivent également des signaux du mésenchyme environnant qui sécrète FGF10 et stimule la prolifération des progéniteurs tout en les maintenant dans un état indifférencié par la voie Notch (Hart et al., 2003). Cette phase de prolifération, qui s'étend de E9.5 à E12.5, est dénommée transition primaire. Elle précède la transition secondaire qui débute vers E13.5 avec les premiers événements de différenciation des progéniteurs.

### *3. Spécifications endocrine et exocrine*

Dès E11.5, la rotation de l'intestin primitif rapproche les deux bourgeons pancréatiques qui fusionnent à E12.5. Parallèlement, les cellules épithéliales des bourgeons s'arborescent pour former à E14.5 un unique tronc central duquel se déploient de nombreuses branches. Lors de ce processus d'arborescence, les cellules épithéliales s'organisent autour de microlumières disséminées dans l'ensemble du tissu. Ce mécanisme, dénommé tubulogenèse, aboutit à la formation d'un réseau complexe de canaux qui convergent vers un unique canal principal, constituant le futur compartiment canalaire du pancréas (Pan and Wright, 2011).

Ces mouvements cellulaires jouent un rôle important dans la mise en place des progéniteurs acinaires et endocrines, les deux autres types cellulaires du pancréas. Vers E12, le bourgeon épithélial se régionalise avec la mise en place de territoires aux profils d'expression distincts (Kopp et al., 2011) (Figure 2) :

- les cellules à l'apex des branches expriment notamment *Carboxypeptidase A* (CPA), *Ptf1a* et *Pdx1*. Multipotentes jusqu'à E13, elles forment par la suite les progéniteurs acinaires.
- les cellules du tronc expriment notamment *Sox9*, *Hnf1 $\beta$* , *Nkx6.1* et *Pdx1*. Ce sont les progéniteurs endocrines et canalaire, ils sont qualifiés de bipotents.

Cette ségrégation apex/tronc est principalement régulée par la voie Notch dont l'activation au niveau du tronc favorise l'expression de *Nkx6.1*, inhibant *Ptf1a* qui se restreint à l'apex (Afelik and Jensen, 2013; Schaffer et al., 2010).

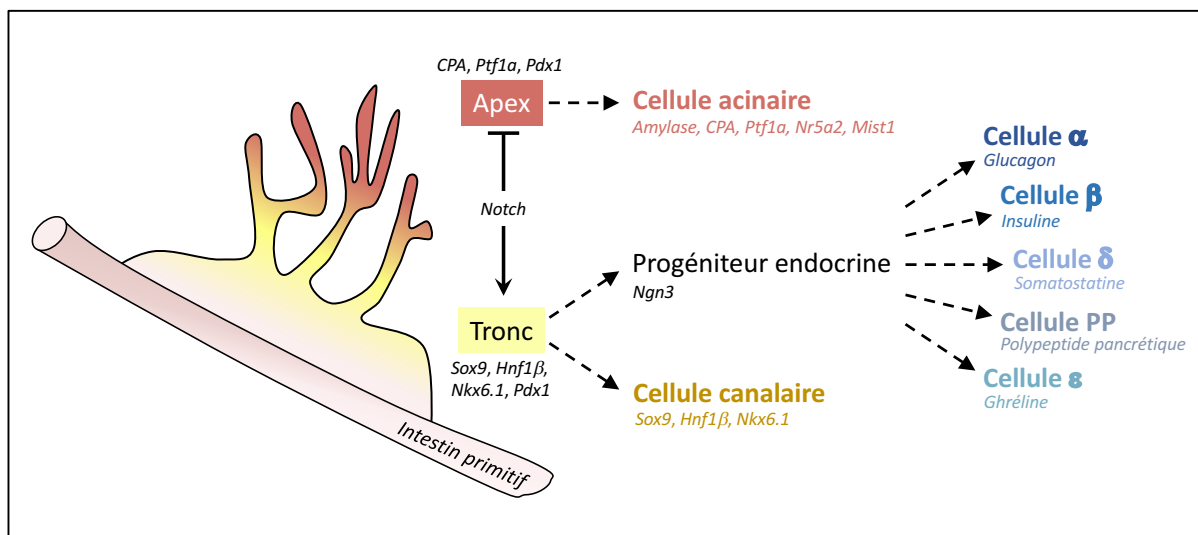


Figure 2 : Arborisation et spécifications cellulaires du bourgeon pancréatique.

## a. Spécification endocrine

### i. Engagement dans le lignage endocrine

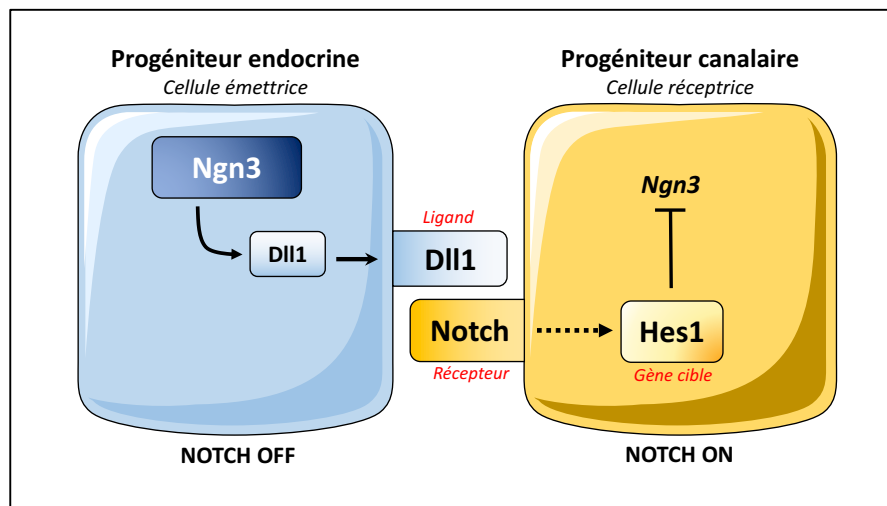
Les progéniteurs bipotents peuvent se différencier en cellules endocrines ou canalaire. Le destin endocrine est dicté par l'expression transitoire de *Neurogenin3* (*Ngn3*) vers E14.5. Des expériences de lignage cellulaire chez des souris *Ngn3-Cre<sup>ER</sup>* ont démontré que tous les sous-types de cellules endocrines proviennent de

progéniteurs  $Ngn3^+$  (Gu et al., 2002). En outre, le pancréas des souris  $Ngn3^{-/-}$  est dépourvu de cellules endocrines (Gradwohl et al., 2000).

La raison pour laquelle seules quelques cellules parmi les progéniteurs bipotents expriment  $Ngn3$  n'est aujourd'hui pas totalement comprise. Le modèle d'inhibition latérale, qui repose sur la voie Notch, permet néanmoins d'en avoir une explication partielle (Figure 3) (Afelik and Jensen, 2013) :

- $Ngn3$  induit l'expression du ligand de la voie Notch,  $Dll1$ .
- $Dll1$  induit l'expression des gènes cibles de Notch tel  $Hes1$  chez les cellules voisines.
- $Hes1$  réprime la différenciation endocrine en inhibant  $Ngn3$ .

Ce modèle permet donc de limiter le nombre de progéniteurs bipotents qui expriment  $Ngn3$  et qui formeront les cellules endocrines. Chez la souris, l'inactivation de la voie Notch induit une différenciation endocrine prématurée et excessive qui conduit à une hypoplasie pancréatique (Jensen et al., 2000).



**Figure 3 : Modèle d'inhibition latérale par la voie Notch.**

L'activation de la voie Notch permet limiter le nombre de progéniteurs endocrines parmi les progéniteurs bipotents.

L'activation de  $Ngn3$  est quant à elle régulée par différents facteurs de transcription.  $Hnf1\beta$ ,  $Hnf3$  et  $Hnf6$  sont tous trois capables de se lier à la séquence promotrice de

*Ngn3* pour en activer la transcription (De Vas et al., 2015; Lee et al., 2001; Jacquemin et al., 2000). Des facteurs épigénétiques sont également impliqués dans la régulation positive de *Ngn3*. L'inactivation conditionnelle de *Dicer*, gène essentiel à la formation des microARN, dans les progéniteurs pancréatiques multipotents, induit une perte massive de cellules endocrines attribuée à une réduction du nombre de cellules *Ngn3*<sup>+</sup> (Lynn et al., 2007).

## ii. Différenciation des sous-types cellulaires

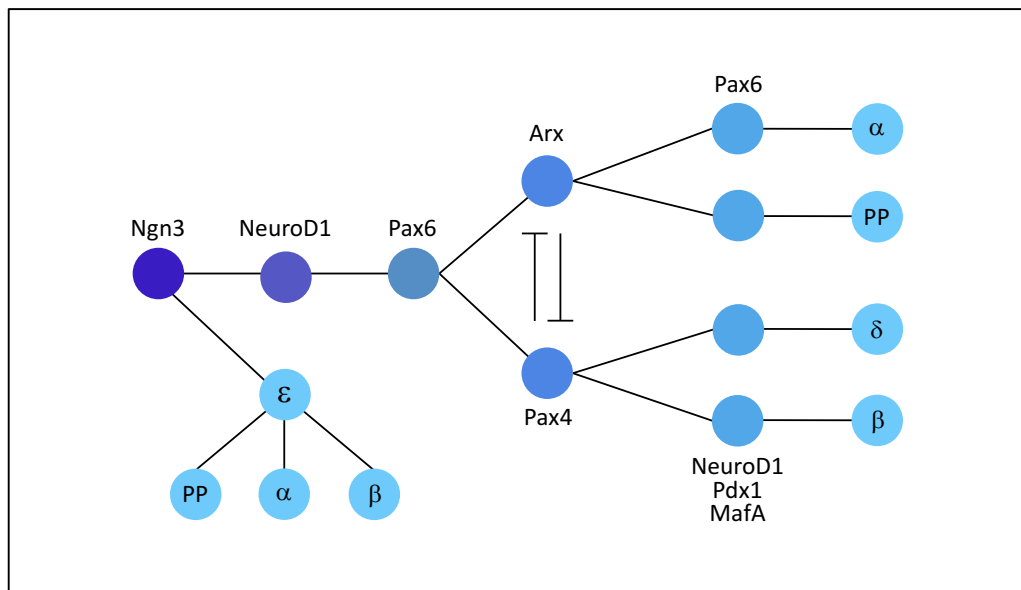
Les progéniteurs *Ngn3*<sup>+</sup> initient rapidement l'expression de nombreux facteurs de transcription dont le maintien ou la perte orienteront les cellules vers l'un des cinq lignages endocrines :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  ou PP (polypeptide pancréatique). Par exemple, NeuroD1, cible directe de *Ngn3*, active *Pax6* dont le maintien sera déterminant dans l'orientation  $\alpha$ -cellulaire (Gosmain et al., 2010). NeuroD1 interviendra également plus tard, lors de la maturation des cellules  $\beta$ , aux côtés de *Pdx1*, *MafA* et *Nkx2.2* (Gu et al., 2010; Bastidas-Ponce et al., 2017; Doyle and Sussel, 2007).

Les facteurs de transcription *Arx* et *Pax4* orientent les progéniteurs endocrines vers les lignages  $\alpha$ /PP et  $\beta$ / $\delta$  respectivement. Les souris *Pax4*<sup>-/-</sup> sont dépourvues de cellules  $\beta$  et  $\delta$ , remplacées par des cellules  $\alpha$ , et meurent d'hyperglycémie à P2. Les souris *Arx*<sup>-/-</sup> ont un phénotype opposé. Leur pancréas est amoindri en cellules  $\alpha$ , remplacées par des cellules  $\beta$  et  $\delta$ , entraînant une hypoglycémie létale à P2. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont démontré que *Arx* est capable de se lier à la séquence promotrice de *Pax4*, et réciproquement, révélant une boucle de régulation entre les deux facteurs de transcription qui s'inhibent mutuellement (Courtney et al., 2014). Des facteurs épigénétiques sont impliqués dans la balance *Arx/Pax4*. L'inhibition *ex vivo* de HDAC (Histone désacétylases) de classe IIa (HDAC4, -5 et -9) favorise l'expression de *Pax4*, induisant une augmentation du nombre de cellules  $\beta$  et  $\delta$  (Lenoir et al., 2011).

Enfin, les cellules  $\epsilon$  apparaissent via une branche indépendante de la boucle *Arx/Pax4* (Heller et al., 2005). Les facteurs qui influencent leur différenciation sont peu connus. Par lignage cellulaire, une étude de 2012 a montré que les cellules  $\epsilon$  constituent des progéniteurs  $\alpha$ , PP ou  $\beta$  (Arnes et al., 2012).



La figure 4 schématise les principales étapes du développement des sous-types endocrines du pancréas.



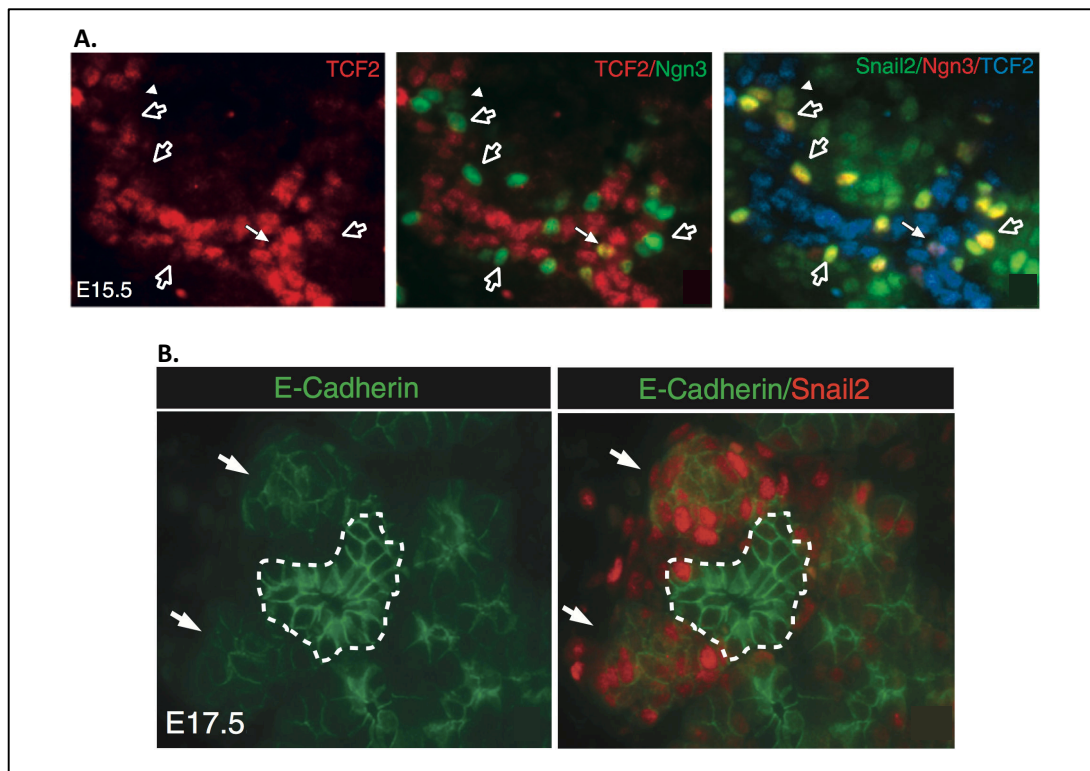
**Figure 4 : Différenciation des cellules endocrines du pancréas au cours du développement.**

### iii. Morphogenèse des îlots

Comme évoqué précédemment, les progéniteurs endocrines sont d'abord localisés dans l'épithélium du pancréas en formation. Or, chez l'adulte, les cellules endocrines sont regroupées sous forme d'îlots de Langerhans qui sont physiquement dissociées du réseau de canaux pancréatiques. Au cours du développement du pancréas, les cellules endocrines se détachent de l'épithélium pour se regrouper et coloniser l'ensemble du mésenchyme pancréatique. Ce processus, qui intervient dans le développement de nombreux organes, porte le nom de transition épithélium-mésenchyme (EMT).

Les cellules en EMT perdent progressivement leurs marqueurs épithéliaux au profit de marqueurs mésenchymateux de façon à acquérir la capacité de migrer hors de leur compartiment d'origine. Ce phénomène s'observe facilement dans le pancréas murin vers E15.5, où les cellules  $\text{Ngn3}^+$  co-expriment le marqueur épithélial E-cadhérine et le marqueur mésenchymateux Vimentine (Chiang and Melton, 2003).

Ngn3 induit l'expression de *Snail2*, protéine clé du processus de EMT. *Snail2* inhibe alors l'expression de *E-Cadhérine*, protéine transmembranaire qui participe aux jonctions intercellulaires de l'épithélium. La perte de E-Cadhérine est suffisante à la délamination des cellules Ngn3<sup>+</sup> qui pourront alors se détacher de l'épithélium pancréatique (Gouzi et al., 2011) (Figure 5).



**Figure 5. Morphogenèse des îlots de Langerhans et transition épithélium-mésenchyme.**

Extrait de (Rukstalis and Habener, 2007).

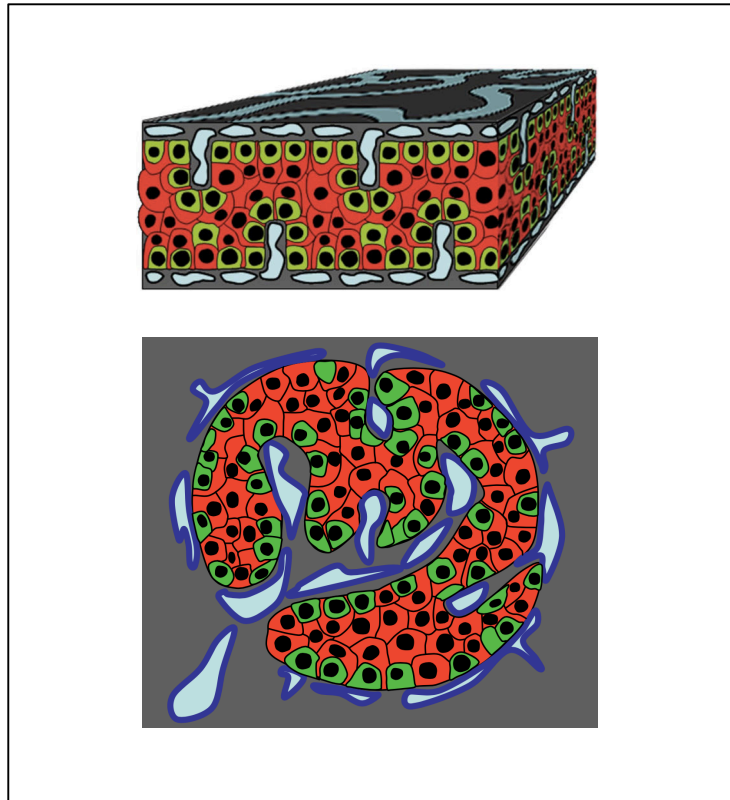
A. À E15.5, les progéniteurs endocrines Ngn3<sup>+</sup> sont inclus dans l'épithélium TCF2<sup>+</sup> (HNF1B<sup>+</sup>). Ngn3 induisant *Snail2*, les deux protéines sont colocalisées (flèches noires).

B. À E17.5, l'EMT progresse, les cellules Snail2<sup>+</sup> perdent l'expression de *E-Cadhérine* et migrent hors de l'épithélium pour former les îlots de Langerhans (flèches blanches). Les cellules épithéliales, regroupées autour des lumières tubulaires, continuent à exprimer *E-Cadhérine* (pointillés blancs).

Les processus qui régulent la migration et le regroupement des cellules endocrines sous forme d'îlots sont encore très peu documentés. Les îlots embryonnaires de souris *EGFR*<sup>-/-</sup> ne parviennent pas à s'éloigner de l'épithélium pancréatique, ce qui démontre un rôle de cette voie dans la migration des îlots (Miettinen et al., 2000). Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont des protéines impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire. L'expression des MMP est notamment

régulée par les ligands de la voie EGFR. L'activité des MMP dans les pancréas *EGFR*<sup>-/-</sup> est réduite, ce qui pourrait expliquer phénotype observé (Miettinen et al., 2000).

En fin de gestation, les îlots s'innervent et se vascularisent, facilitant leur rôle de régulateurs de la glycémie. Chez la souris, les cellules  $\beta$  occupent alors le centre des îlots tandis que les autres types cellulaires sont localisés en périphérie. Chez l'Homme, la localisation des cellules au sein des îlots a longtemps été jugée hétérogène. Une étude de 2010 a analysé la répartition tridimensionnelle des cellules endocrines au sein d'îlots humains provenant de 21 donneurs. Les petits îlots humains présenteraient une architecture identique aux îlots murins. Les gros îlots humains auraient la même structure, mais moins lisible : pour faciliter leurs interactions avec la circulation sanguine, les cellules  $\alpha$  vont préférentiellement au contact des vaisseaux sanguins qui s'infiltrent profondément dans les îlots, donnant ainsi l'impression de mixité cellulaire (Bosco et al., 2010) (Figure 6).



**Figure 6 : Modèle d'organisations endocrine et vasculaire des îlots de Langerhans humains.**

Extrait de (Bosco et al., 2010).

Les cellules  $\alpha$  (vert) occupent majoritairement la périphérie de l'îlot. Elles sont en contact avec la paroi des vaisseaux sanguins (bleu) qui s'insinuent au cœur de l'îlot. Les cellules  $\beta$  (rouge) sont localisées au centre de l'îlot. Elles présentent, pour la plupart, une extension cytoplasmique qui s'infiltré entre les cellules  $\alpha$  pour atteindre les parois vasculaires.

### b. Spécification canalaire

Motivées par l'espoir thérapeutique d'une synthèse  $\beta$ -cellulaire *in vitro*, les recherches menées sur la spécification endocrine ont généré un grand nombre de données. La spécification et l'homéostasie des cellules canalaire ont fait preuve de beaucoup moins d'attention, bien qu'impliquées dans des maladies graves telles que la pancréatite (inflammation du pancréas) et le cancer du pancréas. Les cellules canalaire proviennent du tronc bipotent de l'épithélium pancréatique. La différenciation des cellules canalaire est concomitante à celle des cellules endocrines. L'étude du développement des cellules canalaire est rendue difficile par l'absence de marqueur spécifique des cellules canalaire matures. En effet, l'expression de nombreux facteurs de transcription initialement caractéristiques du

tronc épithélial bipotent (*Hnf6*, *Hnf1β*, *Sox9*, *Glis3*) est maintenue dans les cellules canalaire finales. Par conséquent, délimiter la contribution de chaque facteur dans la différenciation ou dans l'homéostasie des cellules canalaire est délicate. L'inactivation embryonnaire et pancréatique de *Hnf6*, *Hnf1β*, *Sox9* ou *Glis3* induit des altérations canalaire telles que des canaux kystiques et une perte du cil primaire (Pierreux et al., 2006; De Vas et al., 2015; Shih et al., 2012; Kang et al., 2009).

### Cil primaire

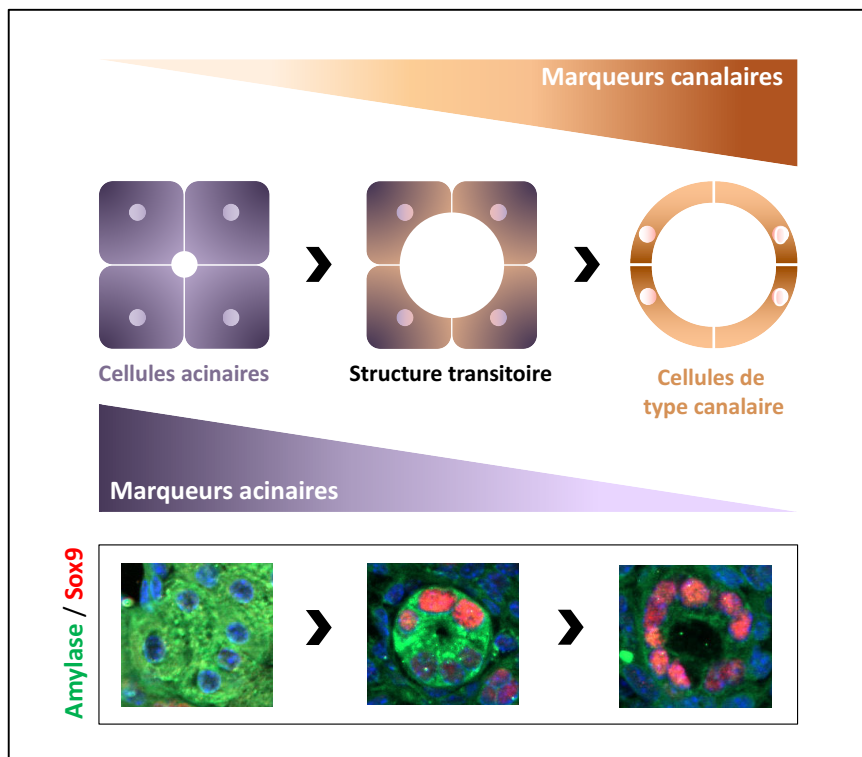
Le cil primaire est une extension de la cellule canalaire qui se projette dans la lumière tubulaire. Un cil est dit primaire lorsqu'il n'est pas motile. Les cils primaires sont constitués de neuf doublets de microtubules périphériques. Les cils motiles ont un doublet additionnel en leur centre. Les cils motiles permettent la mise en mouvement des fluides. On les retrouve notamment dans les poumons, où ils font circuler le mucus. Les cellules animales ont toutes en commun la présence d'un cil primaire, à l'exception des hépatocytes, des cellules acinaires pancréatiques et des cellules d'origine myéloïde et lymphoïde (dilorio et al., 2014). Dans le pancréas, on les trouve donc au niveau des cellules canalaire et des cellules endocrines. Les cils primaires ont longtemps été considérés comme des organelles sans fonction particulière, vestiges du développement.

L'importance du cil primaire a été mise en évidence au début des années 2000, avec l'émergence des techniques de transgénèse animale. La lignée murine mutante *Tg737*, hypomorphe pour une sous-unité du cil primaire, meurt rapidement après la naissance de polykystose rénale, démontrant un rôle essentiel du cil primaire dans le développement du rein (Pazour et al., 2000).

L'analyse de patients humains atteints de polykystose rénale (*Polycystic Kidney Disease* ou PKD) combinée aux études d'inactivation génique chez l'animal modèle ont par la suite révélé que la plupart des mutations responsables de la kystogenèse rénale sont localisées sur des gènes qui codent pour des protéines du cil primaire. Ces gènes du cil primaire sont donc communément appelés gènes kystiques (*cystic disease genes*) (Pierreux et al., 2006). Au niveau du pancréas, la présence de kystes est avérée dans environ 10% des cas de polykystose rénale, suggérant une étiologie commune (Cano et al., 2006).

Aujourd'hui, il est établi que le cil primaire est essentiel à la régulation de nombreuses voies de signalisation et qu'il peut agir comme récepteur des variations biophysiques et biochimiques de l'environnement extracellulaire. Néanmoins, son rôle dans le pancréas n'est pas totalement compris. Les récentes études menées sur le cil primaire du pancréas indiquent que sa fonction est essentielle à l'organogenèse pancréatique.

Chez la souris, l'inactivation de *Kif3a*, protéine indispensable à la ciliogenèse, dans les progéniteurs pancréatiques  $Pdx1^+$ , induit de sévères anomalies du pancréas exocrine : canaux kystiques, fibrose, lipomatose et métaplasie acino-canalaire (ADM, *acinar-to-ductal metaplasia*). L'ADM désigne un processus au cours duquel les cellules acinaires perdent l'expression des gènes qui leur sont spécifiques et adoptent un profil d'expression canalaire, avec dilatation de la lumière acinaire (Figure 7). Au niveau endocrine, l'absence de cils primaires ne semble pas avoir d'effet (Cano et al., 2006).



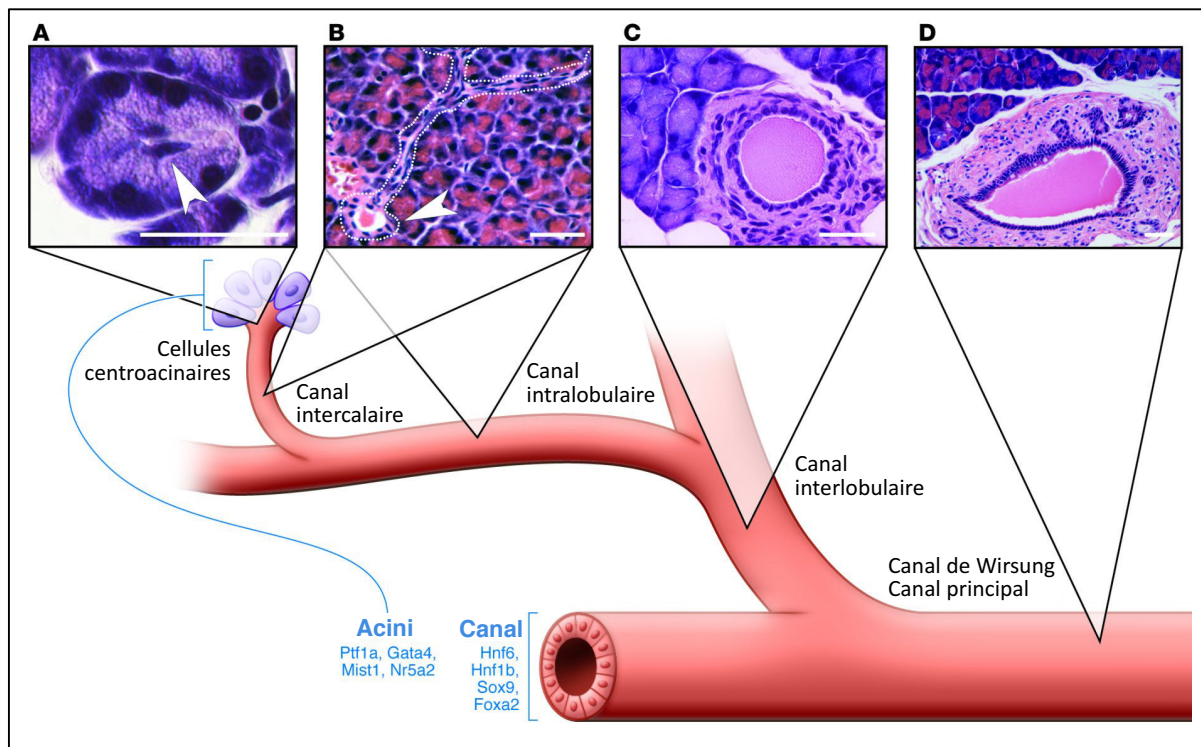
**Figure 7 : Métaplasie acino-canalaire (ADM).**

Dilatation de la lumière acinaire et perte des marqueurs acinaires au profit de marqueurs canaux.

Les pancréas des souris *Hnf6*<sup>-/-</sup> et *Pdx1-Cre;Hnf1b*<sup>fl/fl</sup> présentent des anomalies exocrines similaires aux mutants *Kif3a*, ainsi qu'une expression réduite de gènes kystiques et une absence de cils primaires. Ces résultats démontrent que Hnf6 et Hnf1β jouent un rôle important dans la formation et/ou l'homéostasie des cils pancréatiques (Pierreux et al., 2006; De Vas et al., 2015) .

### Morphologie finale

L'arborisation et la tubulogenèse de l'épithélium pancréatique embryonnaire permettent la mise en place du réseau canalaire du pancréas. Chaque canal est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales cuboïdes organisées autour d'une lumière commune. Ayant pour rôle d'acheminer les sécrétions de l'ensemble des acini du pancréas vers l'intestin, les canaux forment un réseau ramifié très élaboré, illustré dans la figure 8. Les cellules centro-acinaires (A) sont localisées à l'interface entre les acini et les canaux intercalaires (B), premiers canaux à recevoir les sécrétions acinaires. Les sécrétions des canaux intercalaires se déversent dans les canaux intralobulaires, dans les canaux interlobulaires (C), et enfin dans le canal principal ou canal de Wirsung (D), le diamètre canalaire s'élargissant en se rapprochant du canal principal.



**Figure 8 : Organisation du réseau canalaire pancréatique.**

Barre d'échelle : 10µm.

Adapté de (Reichert and Rustgi, 2011).

### c. Spécification acinaire

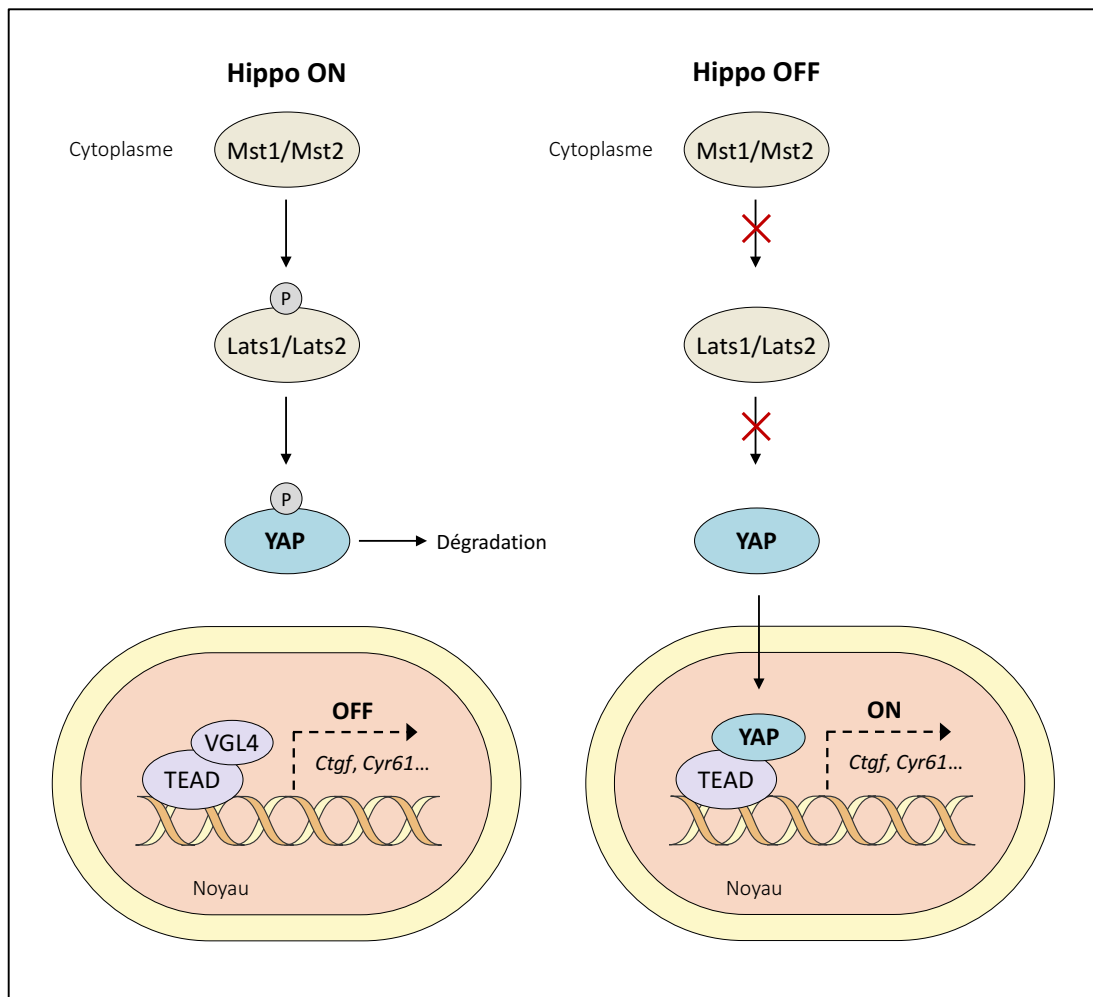
À E13.5, l'apparition des premières cellules  $Ptf1a^{+}NKX6.1^{-}$  à l'apex des branches épithéliales marque le début de la spécification acinaire. *Ptf1a* est essentiel à cette étape, comme démontré par l'absence totale de cellules acinaire chez les mutants *Ptf1a*<sup>-/-</sup> (Krapp et al., 1998). Lors de la transition primaire, *Ptf1a* forme avec E2A et Rbp-J<sub>K</sub> un complexe transcriptionnel essentiel au développement du bourgeon pancréatique (Apelqvist et al., 1999; Beres et al., 2006). Vers E13.5, *Ptf1a* s'accumule à l'apex des branches épithéliales. Le microARN miR-18a jouerait un rôle important dans cette régionalisation (Yang et al., 2012). *Ptf1a* active alors la transcription de *Rbp-J<sub>L</sub>*, paralogue de Rbp-J<sub>K</sub> qu'il remplace au sein du complexe de transcription. Le nouveau complexe formé change de profil transcriptionnel et induit l'expression des gènes spécifiques aux cellules acinaires (*Amylase*, *Elastase 1/2*, *CPA*, *Trypsine*...) (Masui et al., 2007, 2010).



Nr5a2 est également un acteur majeur de la spécification acinaire. Cible supposée de Pdx1, il est exprimé dans l'ensemble du bourgeon pancréatique lors de la transition primaire. À la fin de celle-ci, il se restreint à l'apex des branches épithéliales et active directement les expressions de *Ptf1a*, *Rbp-J<sub>L</sub>* et *GATA4*, tout en stimulant sa propre expression (Hale et al., 2014). Nr5a2 active également l'expression des proenzymes acinaires et des gènes impliqués dans la sécrétion des acini. Enfin, Nr5a2 joue un rôle important dans la prolifération des cellules acinaires qu'il stimule en induisant l'expression de *cyclin-D1*, *cyclin-E1* et *c-Myc* (Benod et al., 2011; Botrugno et al., 2004).

Suite à l'inactivation de *Nr5a2* dans les progéniteurs pancréatiques multipotents, l'expression de *Mist1* diminue (Hale et al., 2014). *Mist1* régule la polarité des cellules acinaires et participe à la communication intercellulaire en régulant l'expression de *connexin32*, sous-unité des jonctions communicantes (Pin et al., 2001; Rukstalis et al., 2003). Le pancréas des souris *Mist1*<sup>KO</sup> présente de graves altérations acinaires, liées en partie à l'activation intracellulaire des proenzymes digestives (Pin et al., 2001).

De récentes études ont démontré l'implication de la voie Hippo/YAP dans le développement et l'homéostasie du pancréas exocrine. L'activation de la voie Hippo induit la phosphorylation de la protéine YAP puis sa dégradation cytoplasmique. Lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, la protéine YAP est adressée au noyau où elle active la transcription de ses gènes cibles (Figure 9). Chez la souris, les inactivations pancréatiques de *Mst1* et *Mst2*, kinases responsables de la phosphorylation/dégradation de YAP, induisent une ADM (George et al., 2012; Gao et al., 2013).



**Figure 9 : Voie de signalisation Hippo/YAP.**

Quand la voie Hippo est active, YAP est phosphorylé dans le cytoplasme pour y être dégradé. Le complexe TEAD-VGL4 inhibe alors la transcription des gènes cibles. Quand Hippo est inactive, YAP non phosphorylé est transloqué au noyau où il déplace VGL4 et forme avec TEAD un complexe qui active la transcription des gènes cibles.

La cause de l'ADM des mutants *Mst1/2* est débattue :

- L'équipe de N. M. George suggère qu'elle provient des canaux, dont l'intégrité serait altérée suite à l'inactivation de la voie Hippo. Les acini déverseraient alors leur contenu enzymatique dans le tissu pancréatique, provoquant nécrose et inflammation (George et al., 2012).
- L'équipe de T. Gao suggère qu'elle provient des acini, dont la perte d'identité serait une conséquence directe de l'inactivation de la voie Hippo (Gao et al., 2013).

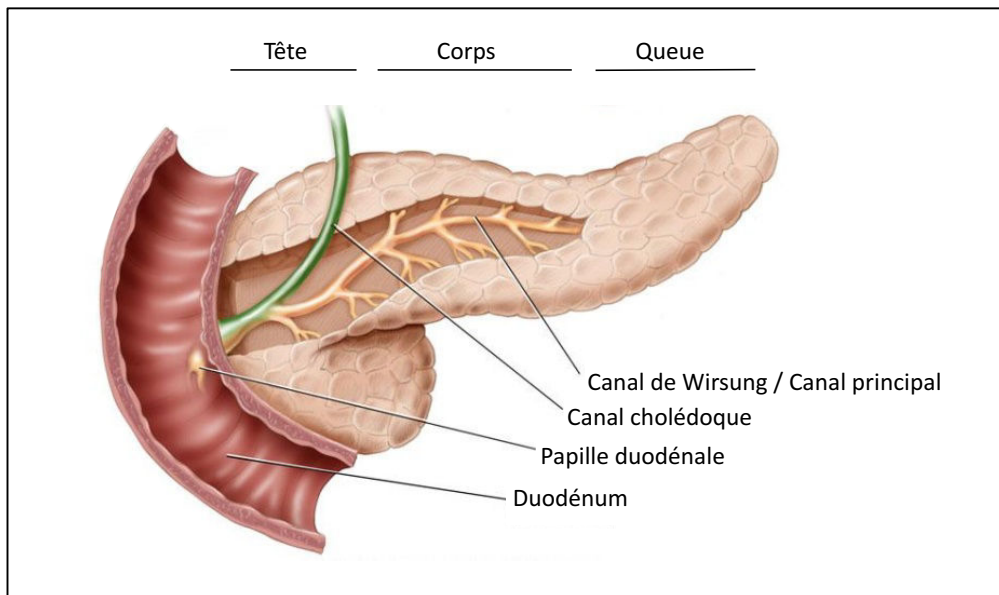
Mal régulée, ou induite de façon non appropriée, l'ADM est délétère pour le pancréas. Néanmoins, ce processus physiologique tient un rôle important dans l'homéostasie des cellules acinaires.

#### Homéostasie et régénération des cellules acinaires

Après la naissance, le maintien de l'identité des différents sous-types cellulaires est primordial au bon fonctionnement du pancréas. Le développement et l'homéostasie des cellules du pancréas ont en commun de nombreuses voies de signalisation. Par ailleurs, en cas de lésion, ces mêmes voies sont mises à contribution pour assurer la régénération de l'organe. Les cellules acinaires démontrent une solide capacité de régénération cellulaire en réponse aux atteintes qui perturbent l'intégrité du tissu. Cette régénération est assurée par prolifération des cellules acinaires subsistantes ainsi que par renouvellement cellulaire basé sur l'ADM. L'ADM permet de générer des structures épithéliales transitoires qui rappellent le développement embryonnaire lors duquel les progéniteurs pancréatiques sont induits, prolifèrent et se différencient à partir de l'épithélium pancréatique. Bien que ce processus soit bénéfique à la régénération, une ADM prolongée et/ou chronique serait susceptible de déstabiliser l'identité exocrine et d'induire des lésions cancéreuses. Le PDAC (*pancreatic ductal adenocarcinoma*), qui représente plus de 95% des cancers du pancréas, est d'ailleurs classiquement initié par des métaplasies acinaires (Reichert and Rustgi, 2011).

#### *4. Anatomie et composition définitives*

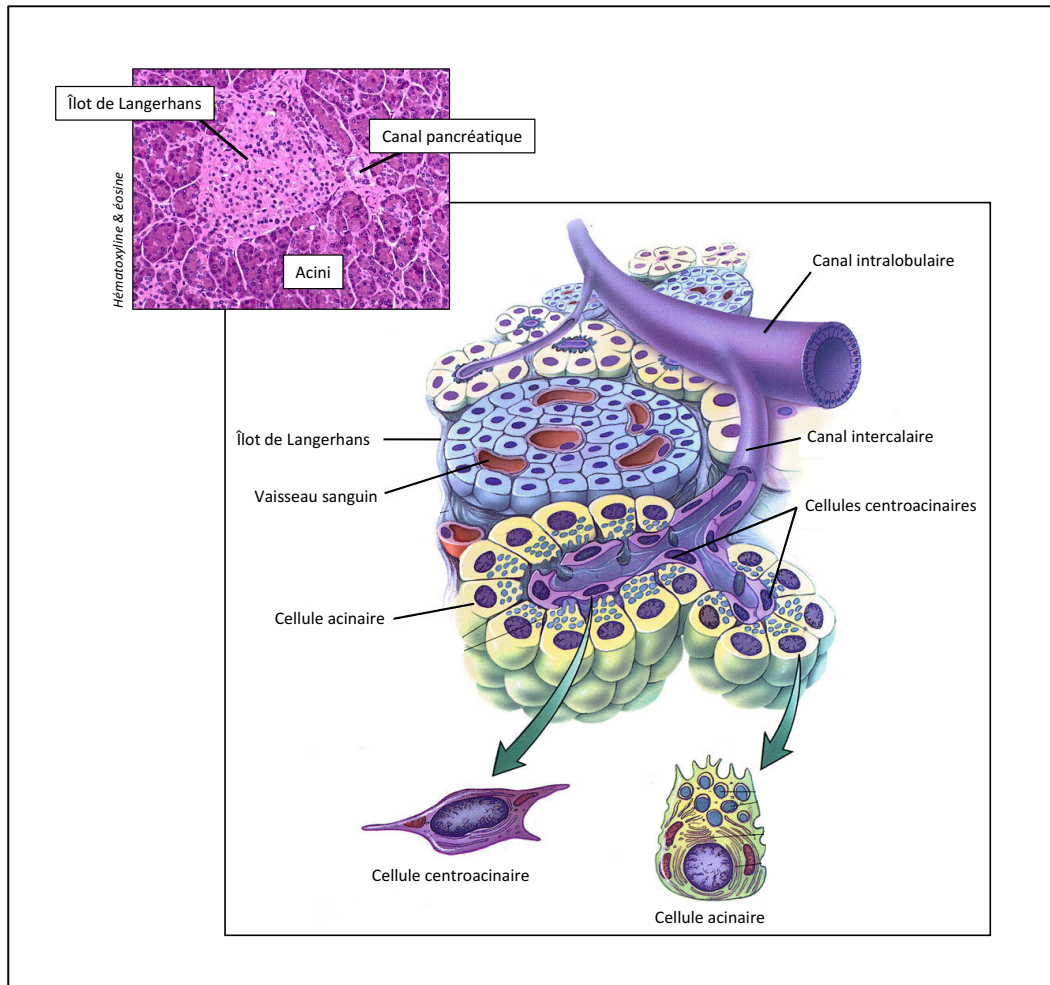
Le pancréas définitif est localisé au niveau de la partie supérieure gauche de l'abdomen, derrière l'estomac. Il s'étend latéralement et longitudinalement de la courbe du duodénum jusqu'à la rate. Le pancréas est régionalisé. La tête du pancréas est accolée au duodénum, la queue est la partie la plus éloignée de l'intestin et le corps a une position intermédiaire. Comme évoqué précédemment, toutes les ramifications canalaire du pancréas convergent vers un unique canal principal, le canal de Wirsung. Ce dernier prend contact avec l'intestin au niveau de la papille duodénale. Le canal cholédoque, qui achemine les sels biliaires, fusionne avec le canal de Wirsung en amont de sa connexion duodénale, au niveau de l'ampoule de Vater (Figure 10).



**Figure 10 : Anatomie du pancréas.**

Le tissu exocrine représente environ 98% du pancréas total. Il est composé de cellules acinaires et canaliculaires. Les cellules acinaires sont organisées en lobules dénommés acini. La lumière de chacun des acini est connectée à un canal intercalaire, permettant l'acheminement des sécrétions acinaires vers la lumière intestinale. Le tissu endocrine représente environ 2% du pancréas total. Il est composé de cellules endocrines organisées en îlots de Langerhans. Chaque îlot est abondamment vascularisé, permettant aux cellules qui le composent de déverser leurs hormones dans la circulation sanguine (Figure 11).

La proportion de chaque type cellulaire au sein des tissus exocrine et endocrine est détaillée dans la figure 12. Globalement, ces proportions sont conservées entre la souris et l'Homme. Seul le ratio « cellules  $\alpha$  / cellules  $\beta$  » apparaît plus élevé chez l'Homme.



**Figure 11 : Organisation des tissus exocrines et endocrines du pancréas.**  
Adapté de (Gartner and Hiatt, 2012).

		Pancréas humain	Pancréas murin
<b>Cellules exocrines (98%)</b>	Cellules acinaires	88%	88%
	Cellules canalaire	12%	12%
<b>Cellules endocrines (2%)</b>	Cellules $\alpha$	20-40%	10-20%
	Cellules $\beta$	50-70%	60-80%
	Cellules $\delta$	<10%	<5%
	Cellules PP	<10%	<5%
	Cellules $\epsilon$	<1%	<1%

**Figure 12 : Composition cellulaire des tissus exocrines et endocrines du pancréas.**  
Données issues de (Dolenšek et al., 2015; Lodh et al., 2014).

## B. Physiologie du pancréas

### 1. Physiologie exocrine

Le pancréas exocrine a pour rôle de participer à la digestion du bol alimentaire. Il tient deux fonctions majeures dans cet objectif :

- Neutralisation de l'acidité gastrique
- Production d'enzymes digestives

L'estomac est le premier lieu de digestion des aliments. Il produit un suc gastrique riche en acide chloridrique qui participe au fractionnement des aliments en vue de leur passage dans l'intestin. Suite à la vidange de l'estomac, le contenu stomacal très acide entre en contact avec la paroi intestinale. Pour contrecarrer cette acidité potentiellement délétère pour les cellules intestinales, le pancréas déverse dans la lumière duodénale un suc pancréatique alcalin, riche en bicarbonate. Les ions bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ) du suc pancréatique sont sécrétés par les cellules canalaire du pancréas.

En réponse à l'augmentation de l'acidité du milieu extracellulaire, les cellules duodénales synthétisent la sécrétine. Celle-ci est acheminée via la circulation sanguine vers les cellules canalaire où elle stimulera l'activation de CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). CFTR est une protéine transmembranaire exprimée sur la face apicale des cellules canalaire qui permet la sécrétion d'ions  $\text{HCO}_3^-$  et ainsi l'alcalinisation du suc pancréatique. Le pancréas des patients atteints d'une mutation du gène *CFTR* ont une fonction exocrine diminuée et un risque accru d'inflammation du pancréas (Wilschanski and Novak, 2013).

Les cellules acinaires sécrètent de nombreuses enzymes qui permettent la digestion du bol alimentaire. Ces enzymes sont classées en fonction du substrat auquel elles s'adressent (Figure 13). Pour se prémunir d'une autodigestion, les cellules acinaires synthétisent les enzymes sous une forme inactive, le zymogène, et les empaquettent dans des vésicules cytoplasmiques dénommées grains de zymogène. Les enzymes pancréatiques ne sont activées qu'à leur arrivée dans la lumière intestinale. L'entérokinase, enzyme sécrétée par les cellules de l'épithélium intestinal,

transforme le trypsinogène pancréatique en trypsine. La trypsine assure ensuite l'activation des autres zymogènes (Figure 14B).

Substrats	Enzymes
Lipides	Lipase
	Pro-phospholipase A <sub>1</sub> -A <sub>2</sub>
	Estérases non spécifiques
Protéines	Trypsinogène
	Chymotrypsinogène
	Pro-élastase
	Procarboxypeptidase A
	Procarboxypeptidase B
Polysaccharides	$\alpha$ -amylase
Acides nucléiques	Désoxyribonucléase (DNase)
	Ribonucléase (RNase)

Figure 13 : Enzymes sécrétées par les cellules acinaires du pancréas.

Les sécrétions acinaires sont régulées par différents stimuli de nature hormonale ou nerveuse et sont regroupées selon trois phases :

- La phase céphalique : la vue, l'odorat et le goût stimulent le nerf vague et la libération d'acétylcholine (ACh) au niveau des terminaisons nerveuses efférentes du pancréas. Les cellules acinaires ont à leur membrane des récepteurs muscariniques sensibles à la présence d'ACh dans le milieu extracellulaire. La stimulation de ces récepteurs induit l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire et l'exocytose des grains de zymogène.
- La phase gastrique : la gastrine, sécrétée par les cellules de la paroi de l'estomac en réponse à sa dilatation, est capable de se lier aux récepteurs de la cholécystokinine (CCK) présents à la surface des cellules acinaires. Il en

résulte une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire et l'exocytose des grains de zymogène.

- La phase intestinale : l'entrée du chyme alimentaire hautement acide dans la lumière intestinale induit la synthèse de sécrétine, qui stimule non seulement les sécrétions canalaire mais également les sécrétions acinaires en augmentant l'activité intracellulaire de l'adénylate cyclase. Par ailleurs, la présence d'acides gras et de certains acides aminés stimule la sécrétion de CCK par les cellules de l'épithélium intestinal. Suite à sa fixation sur son récepteur acinaire, la CCK induit l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire et l'exocytose des grains de zymogène (Pandol, 2010).

La figure 14 synthétise les étapes de la sécrétion et de l'activation des enzymes pancréatiques.

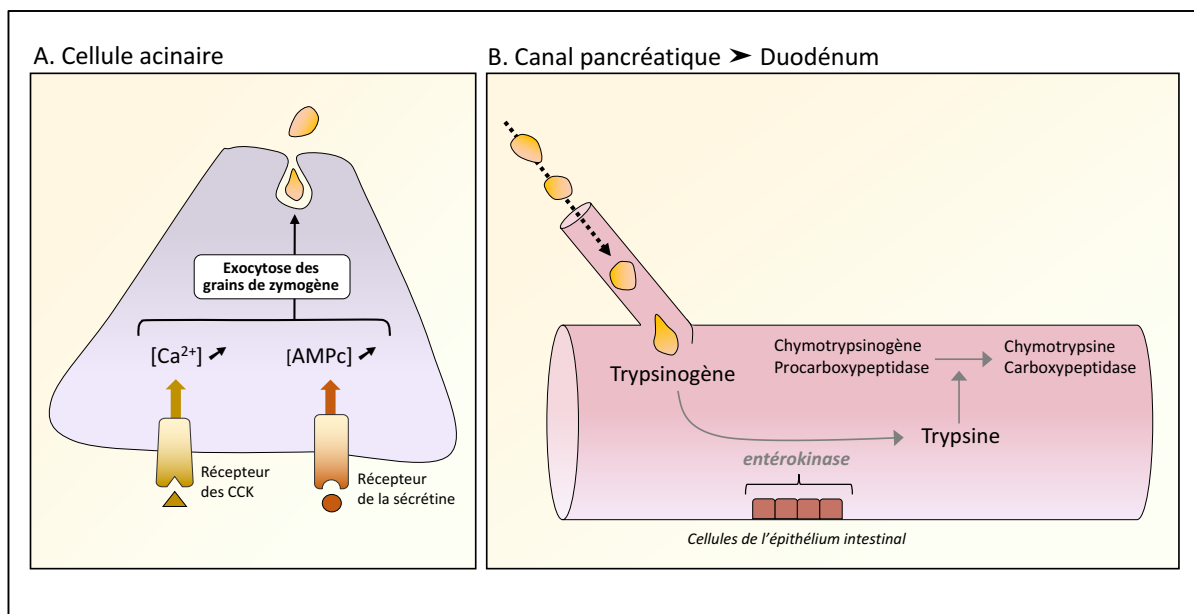


Figure 14 : Exocytose acinaire (A) et activation intestinale (B) des grains de zymogène.

## 2. Physiologie endocrine

Comme évoqué précédemment, les îlots de Langerhans assurent la fonction endocrine du pancréas. Bien qu'ils ne représentent que 2% du pancréas total, les îlots ont un rôle essentiel puisqu'ils permettent une fine régulation du taux de glucose



dans le sang appelé glycémie. Les îlots sont constitués de cinq types de cellules, les plus abondantes étant les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  qui sécrètent respectivement le glucagon et l'insuline.

Le glucagon est sécrété en réponse à un faible taux de glucose dans le sang. Il stimule la glycogénolyse et la néoglucogenèse :

- La glycogénolyse désigne la production de glucose à partir du glycogène. Le glycogène est une forme de stockage du glucose retrouvée principalement dans les cellules hépatiques et musculaires.
- La néoglucogenèse désigne la synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques. Elle a lieu essentiellement dans le foie et intervient quand les réserves en glycogène sont épuisées.

L'insuline est sécrétée en réponse à une glycémie élevée. Son action est opposée à celle du glucagon. Elle inhibe la glycogénolyse et la néoglucogenèse, et stimule la glycogénèse qui permet le stockage de glucose sous forme de glycogène.

La sécrétion d'insuline est initiée par l'entrée du glucose dans la cellule  $\beta$  via le transporteur GLUT2 (*Glucose Transporter 2*). Une fois dans le cytoplasme, le glucose est transformé en pyruvate suite à une série de réactions enzymatiques, la glycolyse. Le pyruvate formé entre alors dans la mitochondrie où il est converti en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA). L'acétyl-CoA intervient dans la première étape du cycle de Krebs qui aboutit à la production d'ATP. L'augmentation du rapport intracellulaire ATP/ADP déclenche la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants. L'augmentation intracellulaire de  $[K^+]$  induit la dépolarisation de la membrane plasmique et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. Enfin, l'augmentation intracellulaire de  $[Ca^{2+}]$  induit l'exocytose des granules d'insuline (Figure 14).

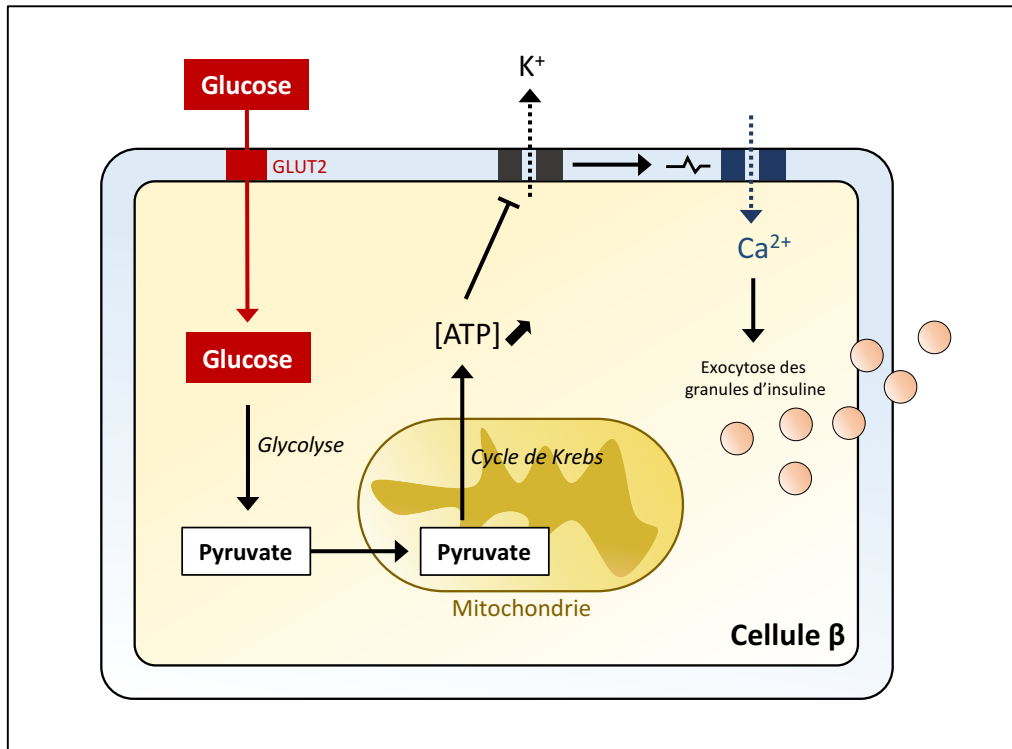


Figure 14 : Sécrétion d'insuline de la cellule β pancréatique en réponse au glucose.

Les cellules δ sécrètent la somatostatine, hormone non exclusive au pancréas puisque les cellules intestinales et neuroendocrines la synthétisent également. Sur le pancréas, la somatostatine a pour effet d'inhiber les sécrétions d'insuline, de glucagon, de polypeptide pancréatique et d'enzymes digestives (Hauge-Evans et al., 2009; Bali et al., 2006).

Les cellules PP sécrètent le polypeptide pancréatique en réponse à la prise alimentaire. Cette hormone inhibe les sécrétions du pancréas exocrine (Williams, 2014).

La ghréline, sécrétée notamment par les cellules ε du pancréas et par les cellules du fundus de l'estomac, est une hormone orexigène. Sa concentration sanguine est élevée avant les repas et diminue suite à la prise alimentaire (Müller et al., 2015).

## C. Pathologies du pancréas

### 1. Les diabètes

Le diabète est un syndrome caractérisé par une soif excessive (polydipsie) et une augmentation de la production d'urine (polyurie). On distingue le diabète sucré du diabète insipide, le premier étant marqué par la présence de glucose dans les urines, à l'inverse du second. Le diabète insipide est lié à une défaillance de la sécrétion et/ou de la reconnaissance de la vasopressine, hormone antidiurétique. Ce diabète ne faisant pas intervenir le pancréas, nous ne le présenterons pas. Dans la suite de ce manuscrit, nous emploierons le terme diabète pour désigner le diabète sucré.

En 1985, 108 millions de personnes souffraient du diabète à travers le monde. En 2014, le nombre de diabétiques était estimé à 422 millions. De récentes études prédisent un nombre de diabétiques supérieur à 700 millions en 2025. Bien que ces variations soient amplifiées par l'accroissement de la population mondiale, moins de 5% des adultes étaient concernés par le diabète en 1980, et plus de 11% le seront en 2025 (NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC), 2016).

Le diabète est défini par une hyperglycémie chronique. Chez l'Homme, la glycémie normale à jeun est comprise entre 0,7 et 1,1 grammes de glucose par litre de sang. Lorsque cette valeur est située entre 1,1 et 1,26 g/l, le patient est dit intolérant au glucose. Un diabète est diagnostiqué lorsque ce taux dépasse 1,26 g/l. Non traité, le diabète réduit drastiquement l'espérance de vie. Les complications du diabète résultent des effets délétères que le glucose exerce sur la paroi des vaisseaux sanguins et sur les nerfs. Ces complications sont classées en deux groupes :

- Les complications microangiopathiques regroupent notamment rétinopathie, néphropathie et neuropathie diabétiques.
- Les complications macroangiopathiques regroupe notamment infarctus du myocarde et accidents vasculaires cérébraux.

Les causes du diabète sont nombreuses. Elles conditionnent l'âge d'apparition de la pathologie ainsi que l'ampleur de ses manifestations. Elles permettent de diviser le diabète en plusieurs types.

Les deux types de diabète les plus fréquents sont le diabète insulino-dépendant (DID, type 1) et le diabète non insulino-dépendant (DNID, type 2), avec pour prévalences respectives environ 10% et 85% de l'ensemble des cas de diabète. Ces deux types de diabète sont polygéniques, signifiant que leur apparition implique la dérégulation de plusieurs gènes. Des facteurs environnementaux entrent également en jeu (Ali, 2013; Tuomilehto, 2013).

D'autres types de diabète peuvent être liés à la mutation d'un seul gène, ils sont dits monogéniques. Il existe deux types de diabète monogéniques : le diabète néonatal et le diabète MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young).

Le diabète néonatal apparaît dans les premières semaines de vie. Il peut être permanent ou transitoire. Sa prévalence est très faible, de l'ordre de 0,2% de tous les cas de diabète. Différentes mutations sont susceptibles d'induire un diabète néonatal, l'une d'elle se trouvant sur un gène codant une sous-unité des canaux potassiques ATP-dépendants impliqués dans la sécrétion d'insuline (Polak and Cavé, 2007).

Le diabète MODY survient au cours de l'enfance ou de l'adolescence. Il constitue 2 à 5% des cas de diabète (Messaaoui et al., 2016).

### a. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 résulte de la destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques et ainsi du manque d'insuline. Il est classiquement diagnostiqué avant 40 ans, et avant 20 ans pour la moitié des cas. Ce diabète se manifeste suite à la production d'auto-anticorps dirigés contre certains éléments de la cellule  $\beta$ , tels que le l'insuline ou le *Zinc Transporter 8* (ZnT8). La cause de cette production d'auto-anticorps n'est aujourd'hui pas connue. L'hypothèse la plus largement soutenue est l'implication d'un entérovirus dans un terrain génétiquement favorable (Christen et al., 2012).

La destruction des cellules  $\beta$  étant presque totale, l'administration d'insuline constitue la principale stratégie thérapeutique. La transplantation d'îlots de Langerhans constitue une alternative à l'injection régulière d'insuline. Néanmoins, cette approche

souffre de plusieurs inconvénients. Les techniques d'isolation et de purification d'îlots humains manquent d'efficacité, et bien qu'un pancréas humain sain contienne entre 4 et 15 millions d'îlots, seuls 100 000 à 300 000 îlots sont extraits. Les îlots sont ensuite injectés dans la veine porte et migrent dans le foie où ils s'implantent spontanément. Fragilisés par la procédure d'isolement, tous les îlots ne supportent pas la greffe, et seule une partie assurera la production d'insuline. Ainsi, pour qu'un patient retrouve une capacité de production d'insuline suffisante à une régulation autonome de sa glycémie, plusieurs donneurs sont nécessaires. Par ailleurs, le risque de rejet de la greffe est d'autant plus grand que le nombre de donneurs est élevé. Ce risque élevé de rejet, associé au renouvellement des auto-anticorps anti-cellules  $\beta$ , compromet la pérennité de la guérison : plus de la moitié des patients greffés recourent de nouveau à l'injection d'insuline 3 ans après transplantation (Tatum et al., 2017).

Enfin, le manque de donneurs constitue un obstacle majeur à cette intervention. Plusieurs alternatives thérapeutiques sont aujourd'hui à l'étude. L'une d'elles repose sur la génération de cellules  $\beta$  in vitro. Néanmoins, les protocoles de différenciation de cellules  $\beta$  à partir de cellules différenciées ou de cellules souches sont perfectibles. La plupart d'entre eux ne permettent pas d'obtenir des cellules  $\beta$  stables, fonctionnelles et capables de répondre au glucose. En 2014, l'équipe de Douglas Melton a mis au point un protocole de différenciation prometteur (Pagliuca et al., 2014). Les cellules  $\beta$  générées à partir de cellules souches humaines assurent un contrôle glycémique durable chez des souris diabétiques après transplantation. Ces cellules semblent toutefois souffrir d'une capacité de production d'insuline plus faible que les îlots humains. Ainsi, malgré de récentes avancées encourageantes, il apparaît nécessaire d'améliorer nos connaissances des signaux qui orientent et régulent la différenciation et l'homéostasie des cellules  $\beta$ , et plus globalement des îlots de Langerhans.

## b. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 est une pathologie multifactorielle. Son développement peut être lié à des gènes de prédisposition et à des facteurs comportementaux et/ou environnementaux. Ainsi, un mode de vie sédentaire, une alimentation trop riche, certaines infections virales, des traitements médicaux et des perturbations hormonales (grossesse, contraceptifs oraux, etc.) peuvent déclencher un diabète de type 2 (Murea et al., 2012). Sur le plan physiologique, ce diabète débute classiquement par une résistance progressive à l'action périphérique de l'insuline. Les tissus cibles de l'insuline (foie, muscle, tissu adipeux) captent alors moins de glucose que nécessaire et la glycémie s'élève. Face à l'hyperglycémie chronique, les cellules  $\beta$  perdent progressivement leur rôle, avec une perte de réponse au glucose parfois associée à une apoptose  $\beta$ -cellulaire (Wajchenberg, 2007). Le principal traitement indiqué aux diabétiques de type 2 repose sur la mise en place d'un mode de vie équilibré, comprenant activité physique régulière et alimentation saine. Cependant, des traitements pharmacologiques sont parfois nécessaires pour stimuler la sécrétion d'insuline (sulfonylurées, glinides, etc.) et/ou la sensibilité à l'insuline (biguanides, glitazones, etc.).

## c. Diabète de type MODY

Le MODY est un diabète non insulino-dépendant, au moins dans les premières années qui suivent son diagnostic. Sa transmission est autosomique dominante. Des cas peuvent également apparaître spontanément. Comme vu précédemment, il compte pour 2 à 5% de l'ensemble des diabètes. Néanmoins, cette prévalence est probablement sous-évaluée, le MODY pouvant être confondu avec un diabète de type 1 ou 2.

Il existe plusieurs sous-types de MODY, classés selon le gène mis en cause. La plupart des MODY sont liés à une atteinte de la cellule  $\beta$  et sont caractérisés par une intolérance au glucose modérée susceptible de s'aggraver avec l'âge. 14 sous-types de MODY (MODY1 à MODY14) sont aujourd'hui recensés. Les spectres cliniques peuvent être variés selon le sous-type considéré. Par exemple, MODY5, induit par des mutations de *HNF1B*, est généralement associé à des atteintes rénales, urogénitales et hépatiques, ainsi qu'à des dysfonctions du pancréas exocrine.

La figure 15 détaille pour chaque MODY le gène muté et la prévalence estimée parmi l'ensemble des sous-types.

MODY	Gène muté	Fréquence (% des MODY)
MODY1	<i>HNF4A</i>	5
MODY2	<i>GLUCOKINASE</i>	15 à 20
MODY3	<i>HNF1A</i>	30 à 50
MODY4	<i>PDX1</i>	<1
MODY5	<i>HNF1B</i>	5
MODY6	<i>NEUROD1</i>	<1
MODY7	<i>KLF11</i>	<1
MODY8	<i>CEL</i>	<1
MODY9	<i>PAX4</i>	<1
MODY10	<i>INSULIN</i>	<1
MODY11	<i>BLK</i>	<1
MODY12	<i>ABCC8</i>	<1
MODY13	<i>KCNJ11</i>	<1
MODY14	<i>APPL1</i>	? [Découvert en 2015]

Figure 15 : Les diabètes de type MODY.

## 2. Le cancer du pancréas

### a. Les différents types de cancer du pancréas

Le cancer du pancréas peut être d'origine exocrine (95% des cas) ou endocrine (5% des cas).

#### Exocrine

Le groupe exocrine est majoritairement représenté par l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC), qui constitue 95% des tumeurs exocrines. Les stades précoces du PDAC sont cliniquement silencieux, conduisant à un diagnostic tardif et contribuant à un très faible taux de survie à 5 ans (inférieur à 5%). Il est très résistant

aux traitements conventionnels et l'agent chimiothérapeutique standard, la gemcitabine, offre seulement un petit avantage (Cid-Arregui and Juarez, 2015).

Les autres types de cancer exocrine sont rares. Parmi eux :

- Le carcinome des cellules acinaires représente 1 à 2% des cancers du pancréas. Il touche les cellules acinaires dont la sécrétion de lipase est alors exacerbée. Des taux élevés de lipase sont ainsi détectables dans le sang du patient. Le taux de survie à 5 ans est d'environ 17% (La Rosa et al., 2015; Ploquin et al., 2015)
- Le pancréatoblastome compte pour 0,5% des cancers du pancréas exocrine. Il se manifeste classiquement chez l'enfant, et se développe généralement au niveau de la tête du pancréas provoquant une obstruction mécanique du duodénum. Au niveau moléculaire, il semble être associé à une dérégulation de la voie Wnt (Saif, 2007). Une étude de 2004 menée sur 153 patients a établi un taux de survie à 5 ans d'environ 50% (Dhebri et al., 2004)

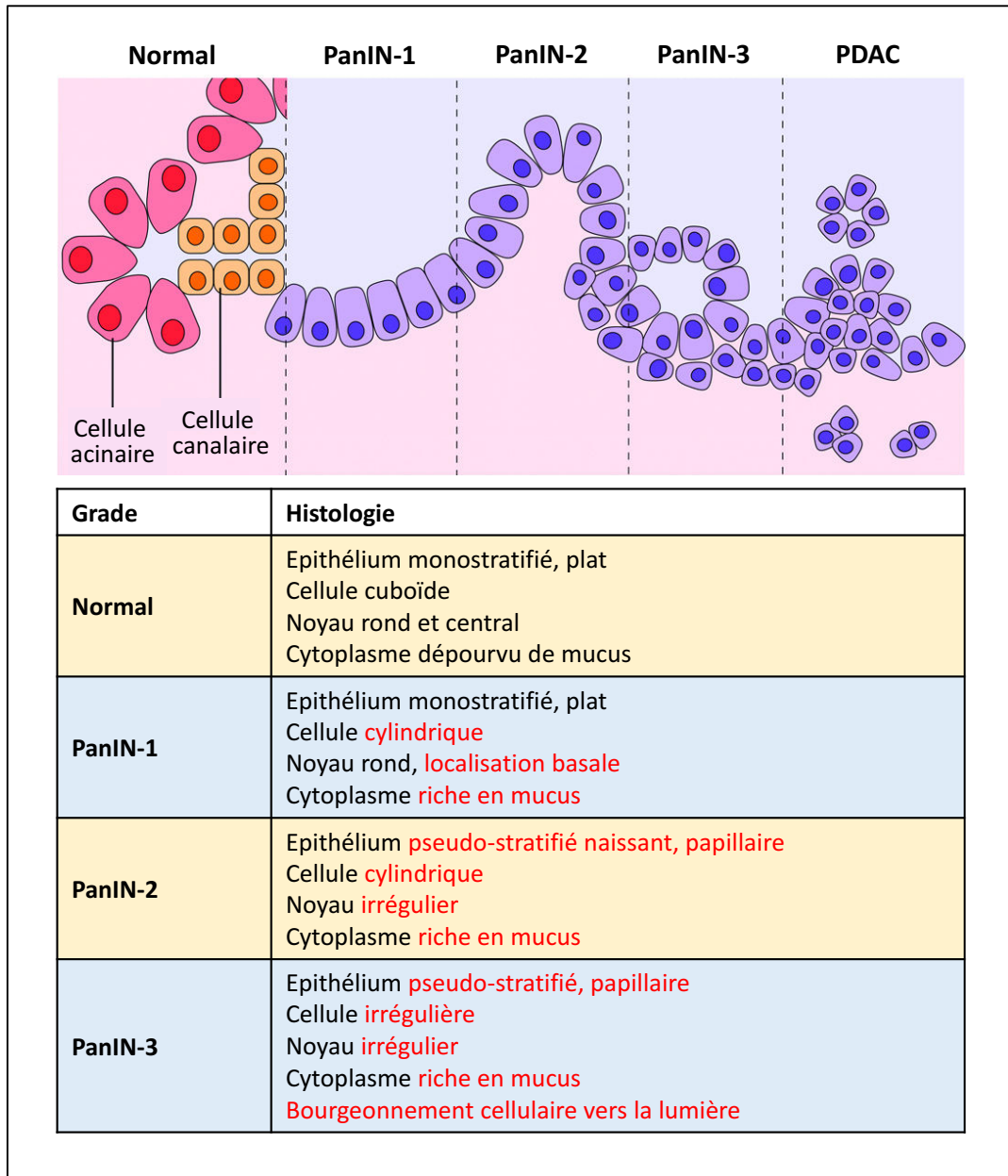
### Endocrine

Les tumeurs endocrines du pancréas peuvent être fonctionnelles ou non fonctionnelles. Les tumeurs fonctionnelles induisent une hypersécrétion hormonale. Il s'agit par exemple de l'insulinome, du glucagonome ou du somatostatine. L'hypersécrétion hormonale s'accompagne de manifestations cliniques qui permettent une détection précoce (hypoglycémie pour l'insulinome par exemple). Les tumeurs non fonctionnelles étant asymptomatiques, elles sont généralement diagnostiquées à un stade avancé, lorsqu'elles compriment ou envahissent les organes adjacents (Ro et al., 2013).

#### b. L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC)

Le PDAC se développe le plus souvent à partir de lésions néoplasiques intra-épithéliales appelées PanINs (*Pancreatic Intraepithelial Neoplasia*). Les PanINs sont classiquement classées en 3 grades (PanIN-1, -2 et -3) dont les caractéristiques histologiques sont résumées dans la figure 16 (Murtaugh, 2014).





**Figure 16 : Gradation des PanINs selon leurs caractéristiques histologiques.**

Adapté de (Murtaugh, 2014).

La mutation activatrice du proto-oncogène *KRAS* est une caractéristique commune à 90% des PanIN-1, suggérant qu'elle participe à leur initiation. Aux grades plus avancés, des mutations additionnelles apparaissent, avec notamment une perte d'expression des gènes suppresseurs de tumeur *CDKN2A*, *TP53* ou *SMAD4* (Cicenas et al., 2017).

Les PanINs étant des lésions épithéliales, leur origine a longtemps été considérée canalaire. Grâce aux modèles de souris génétiquement modifiées, cette hypothèse a été rectifiée. Alors que l'activation de *Kras* dans les cellules canalaire différenciées n'induit qu'une inflammation modérée sans aucun signe de lésion pré-cancéreuse, la même activation dans les cellules acinaires adultes conduit à l'apparition de néoplasies épithéliales. En 2012, Janel L. Kopp et al. ont démontré, par des expériences de lignage cellulaire, que les cellules canalaire Sox9<sup>+</sup> ne participent pas à la formation de PanINs, au contraire des cellules acinaires Ptf1a<sup>+</sup> (Kopp et al., 2012).

Par ailleurs, l'initiation des PanINs est généralement postérieure à l'émergence de métaplasies acino-canalaires (ADM), elles-mêmes d'origine acinaire (Zhu et al., 2007; Morris et al., 2010). Bien que la contribution aux PanINs des structures épithéliales issues d'ADM n'ait pas encore été démontrée, plusieurs résultats vont dans ce sens. Par exemple, l'inhibition de la voie EGFR chez des souris activées pour *Kras* réduit l'ADM, avec pour conséquence une diminution de l'étendue des PanINs (Ardito et al., 2012; Navas et al., 2012).

L'ADM précédant l'apparition des PanINs, elle pourrait en être un précurseur. Suite à une atteinte du pancréas, les cellules acinaires peuvent régénérer par prolifération des cellules subsistantes et par renouvellement cellulaire. Ce renouvellement s'opère suite à la mise en place d'une ADM. En effet, l'ADM permet la formation de structures épithéliales transitoires qui rappellent le développement embryonnaire lors duquel les progéniteurs pancréatiques se différencient. L'ADM mise en jeu dans le cas d'une pancréatite semble identique à l'ADM liée à la mutation de *Kras*. Néanmoins, l'ADM induite par inflammation, qu'elle soit aiguë ou chronique, n'est pas suffisante à l'initiation de PanINs, contrairement à l'ADM associée à une mutation de *Kras*. Cela indique que l'ADM seule ne peut être considérée comme initiatrice de PanINs (Reichert et al., 2016)

Bien que la mutation de *Kras* dans des cellules acinaires adultes induise l'émergence de PanINs, elle n'est pas suffisante à la formation d'un PDAC. Néanmoins, dans un contexte inflammatoire, les PanINs formées progressent spontanément vers un

PDAC. Cela suggère qu'inflammation et *Kras* ont un effet synergique sur le développement des lésions cancéreuses du pancréas (Reichert et al., 2016)

Les travaux cités ci-dessus prouvent que les néoplasies du pancréas exocrine peuvent émerger des acini, sans pour autant démontrer l'impossibilité d'une origine canalaire. Récemment, une équipe américaine a analysé les effets pro-oncogéniques de la mutation de *Kras* associée à une mutation de *P53* dans les compartiments acinaire ou canalaire. Alors que la seule mutation de *Kras* dans les canaux est sans effet, elle devient cause de PDAC lorsqu'elle est associée à la mutation de *P53*. De façon surprenante, les tumeurs formées ne semblent pas mettre en jeu de PanINs, contrairement aux tumeurs formées à partir du compartiment acinaire. Enfin, l'effet synergique entre inflammation et mutation de *Kras* a été testé dans le compartiment canalaire. Les pancréas mutants ne montrant aucun signe de néoplasie, les cellules canalaire activées pour *Kras* ne semblent pas sensibles à l'environnement inflammatoire (Bailey et al., 2016).

L'ensemble des résultats discutés dans cette partie est illustré dans la figure 16.

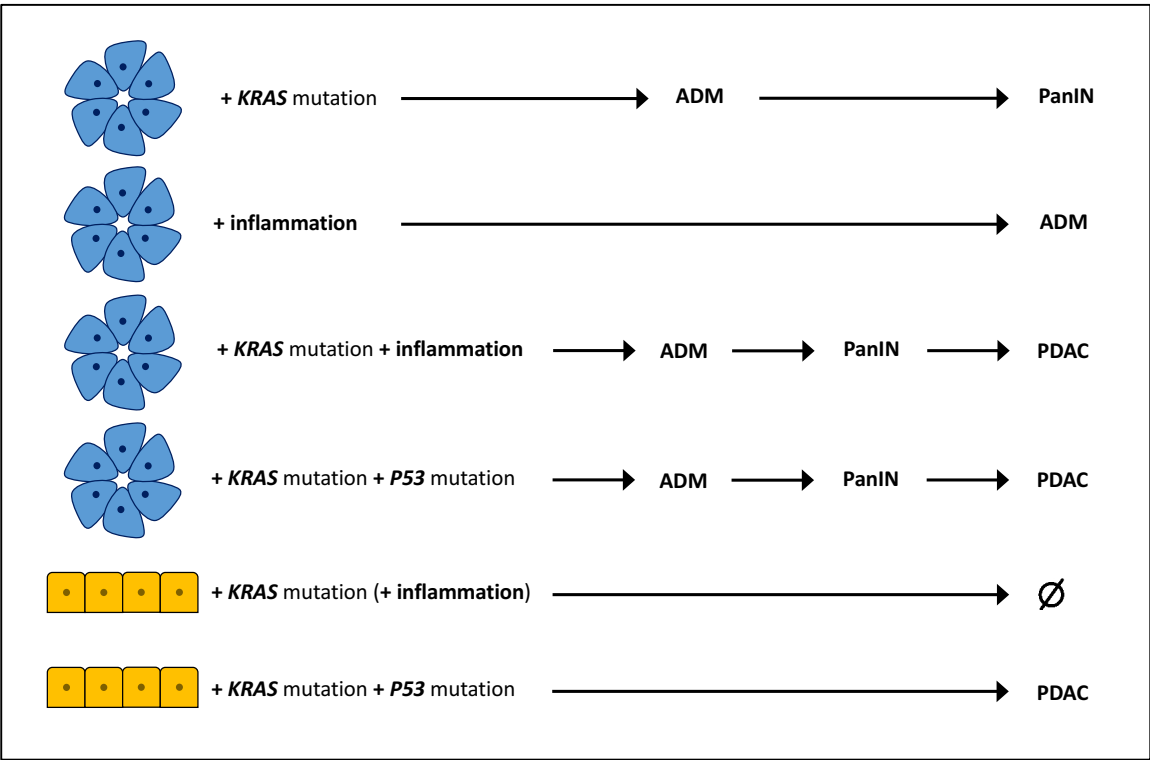


Figure 16 : Origines acinaire (bleu) ou canalaire (jaune) des métaplasies et néoplasies du pancréas exocrine mature.

## II. Le facteur de transcription HNF1B

### A. La famille HNF1

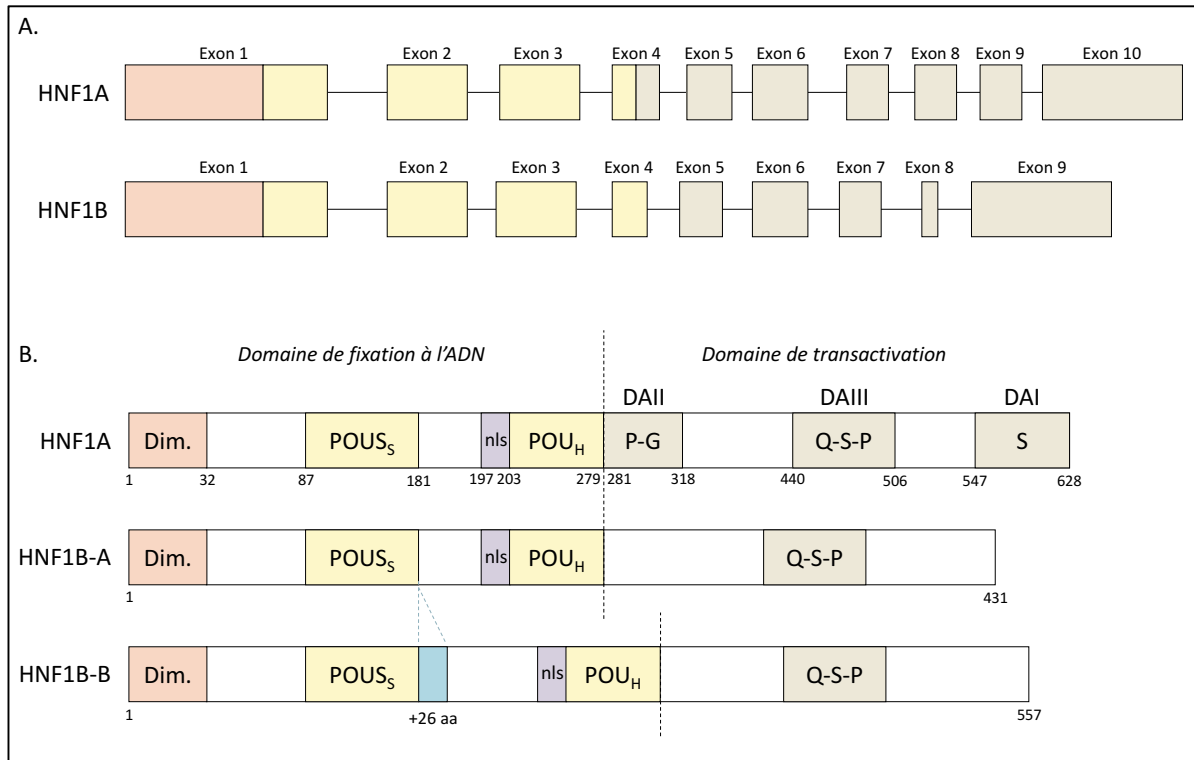
Hepatocyte Nuclear Factor 1B (HNF1B, aussi dénommé HNF1 $\beta$ , vHNF1 ou TCF2) est un facteur de transcription exprimé par les cellules de différents organes, mais presque toujours dans des structures tubulaires, par des cellules de type épithélial. Il contrôle la transcription de différents gènes au cours du développement embryonnaire et après la naissance. HNF1A (aussi dénommé HNF1 $\alpha$ , HNF1 ou TCF1) partage avec HNF1B une forte homologie de séquence (Cereghini, 1996). Ces deux facteurs de transcription forment la famille HNF1.

La famille HNF1 appartient au groupe des HNF, ensemble de facteurs de transcription initialement découverts dans le foie. La caractérisation d'HNF1A a débuté par la mise en évidence de sa capacité à se lier aux promoteurs de trois gènes hépato-spécifiques : *Albumine*,  *$\beta$ -Fibrinogène* et  *$\alpha$ 1-antitrypsine* (Cereghini et al., 1987; Courtois et al., 1987; Hardon et al., 1988). Un second facteur de transcription aux mêmes spécificités de liaison à l'ADN a ensuite été découvert dans des cellules d'hépatomes différenciés : HNF1B (Baumhueter et al., 1988; Cereghini et al., 1988). Après localisation de leur locus, plusieurs études ont révélé la présence des gènes *HNF1A* et *HNF1B* chez différentes espèces vertébrées dont le xénope, le saumon et le poisson-zèbre. Leur profil d'expression dans différents organes a également été analysé (Bartkowski et al., 1993; Demartis et al., 1994; Deryckere et al., 1995; Gong et al., 2004; Zapp et al., 1993). Ces études ont montré que la séquence de *Hnf1a* présente une plus forte homologie de séquence avec ses homologues de différentes espèces qu'avec *Hnf1b* au sein d'une même espèce. Cette observation, aussi valable pour la séquence de *Hnf1b*, suggère que les deux gènes accomplissent des fonctions distinctes mais conservées chez les vertébrés. Enfin, les invertébrés ne présentent pas d'orthologues à la famille HNF1.

### B. Structure du gène

HNF1B exerce ses fonctions sous forme de dimère. Sa grande homologie avec HNF1A lui permet de former avec celui-ci un hétérodimère. La description de la structure de HNF1B sera donc mise en parallèle avec celle de HNF1A.

Chez l'Homme, *HNF1A* est localisé sur le chromosome 12 (chromosome 5 chez la souris). Sa transcription génère un ARNm d'environ 3,3 kb qui comprend 10 exons (Bach et al., 1990; Kuo et al., 1990). *HNF1B* est localisé sur le chromosome 17 (chromosome 11 chez la souris). Il code pour un ARNm d'environ 2,8 kb avec 8 exons (Abbott et al., 1990; Bach et al., 1991). Chez l'Homme, la souris et le rat, l'épissage alternatif de *HNF1B* génère deux isoformes : *HNF1B-A* et *HNF1B-B*. *HNF1B-A* présente un exon supplémentaire de 78 nucléotides. Cet exon additionnel augmente la taille de la protéine finale de 26 acides aminés (Cereghini et al., 1992; Rey-Campos et al., 1991) (Figure 17A). Quel que soit le tissu considéré, les deux isoformes de *HNF1B* sont exprimées selon le même ratio. Cependant, *HNF1B-A* semble se lier avec une plus grande affinité sur ses séquences cibles que *HNF1B-B*. Cette différence d'affinité est probablement liée à son exon additionnel (Ringeisen et al., 1993). Il existe une troisième isoforme, *HNF1B-C*, qui est moins bien caractérisée. Elle code une protéine plus courte que les isoformes A et B : les 207 acides aminés de l'extrémité C-terminale sont remplacés par 50 acides aminés spécifiques à *HNF1B-C*. Des analyses *in vitro* ont montré que l'isoforme C jouerait un rôle de dominant négatif, inhibant l'expression de certains gènes cibles (Bach and Yaniv, 1993; Romero et al., 2006). Chez la souris, *HNF1B* est majoritairement représentée par l'isoforme *HNF1B-A* (Harries et al., 2009).



**Figure 17 : Structures génomique (A) et protéique (B) des HNF1.**

Dim. : sous-domaine de dimérisation ; DA : site de transactivation ; nls : signal de localisation nucléaire ; P-G, QSP, S : domaines riches en proline-glycine, glutamine-sérine-proline, sérine respectivement.

### C. Structure de la protéine

Les isoformes *HNF1B-A/B/C* codent des protéines de 557, 531 et 400 acides aminés respectivement. Les isoformes A et B, tout comme *HNF1A*, présentent un domaine N-terminal de fixation à l'ADN et un domaine C-terminal de transactivation (Figure 17B).

#### Domaine de fixation à l'ADN

Ce domaine N-terminal est composé de trois sous-domaines (Nicosia et al., 1990) :

- Un sous-domaine de dimérisation (DM)
- Deux sous-domaines POU, caractéristiques de la famille des gènes POU à laquelle *HNF1* appartient : un domaine POU-spécifique (POU<sub>S</sub>) et un POU-homéodomaine (POU<sub>H</sub>).

Qu'ils soient sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère, *HNF1A* et *HNF1B* se fixent aux mêmes motifs d'ADN, reflétant une grande homologie de séquences entre

les deux facteurs de transcription : 72% pour le DM, 98% pour POU<sub>S</sub> et 91% pour POU<sub>H</sub>.

Le domaine de dimérisation comprend 32 acides aminés qui forment 4 hélices  $\alpha$  caractéristiques de la famille HFNF1. Ce domaine est nécessaire et suffisant à l'homo- et l'hétérodimérisation de HNF1A et de HNF1B (Chouard et al., 1990; Frain et al., 1989; Nicosia et al., 1990; Rey-Campos et al., 1991). La mutation de ce sous-domaine induit un défaut de dimérisation et une diminution de l'affinité pour les sites de fixation à l'ADN (Chouard et al., 1990; Tomei et al., 1992).

Le sous-domaine POU<sub>H</sub> est un homéodomaine constitué de 60 acides aminés qui forment trois hélices  $\alpha$ . Le sous-domaine POU<sub>S</sub> comprend environ 75 acides aminés qui forment cinq hélices  $\alpha$  pour HNF1A et six pour HNF1B. Les interactions entre les hélices  $\alpha$  de POU<sub>H</sub> et de POU<sub>S</sub> définissent la spécificité et l'affinité de fixation à l'ADN (Ceska et al., 1993; Chi et al., 2002; Leiting et al., 1993). La région qui sépare les deux sous-domaines POU contient un signal de localisation nucléaire (NLS) nécessaire à la translocation des facteurs de transcription du cytoplasme vers le noyau (Tronche et al., 1997).

#### Domaine de transactivation

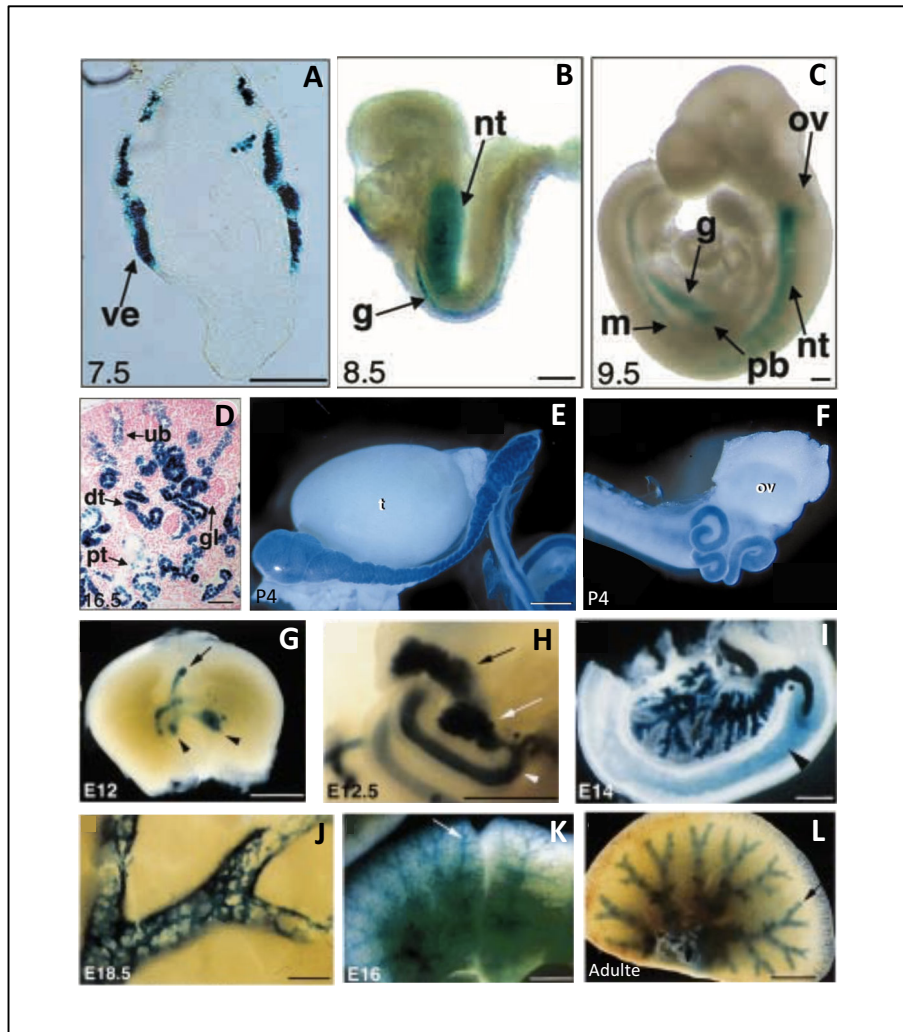
Ce domaine C-terminal est moins conservé que le domaine N-terminal, avec seulement 47% d'homologie entre HNF1A et HNF1B. L'activité de transactivation de HNF1B est localisée dans une région riche en glutamine-sérine-proline (QSP) dénommée DAIII (domaine d'activation III) (Barbacci et al., 2004; Hiesberger et al., 2005). Cette région est conservée chez HNF1A, qui présente deux sites transactivateurs supplémentaires : DAI et DAII. Néanmoins, DAII ne semble pas avoir de rôle *in vivo* (Nicosia et al., 1990; Toniatti et al., 1993). *In vitro*, HNF1A et HNF1B ont des activités transactivatrices très similaires. D'ailleurs, HNF1A permet la différenciation de l'endoderme viscéral qui fait défaut aux corps embryoides *HNF1B*<sup>-/-</sup>. Ce résultat suggère que les rôles de HNF1A et de HNF1B ne divergent pas selon leur activité transcriptionnelle mais selon leurs profils d'expression (Haumaitre et al., 2003).

L'activité transactivatrice de ces deux facteurs de transcription repose en grande partie sur le recrutement de cofacteurs et de coactivateurs. L'un des premiers cofacteurs découverts des HNF1 fut DCOH (Dimerization cofactor of HNF1). DCOH permet la stabilisation de la fixation de HNF1A sur l'ADN et améliore son activité transcriptionnelle, probablement par recrutement de coactivateurs (Johnen and Kaufman, 1997; Mendel et al., 1991; Rhee et al., 1997; Rose et al., 2000). Néanmoins, les souris inactivées pour *DCOH* ne montrent qu'une faible atténuation de l'activité de Hnf1a, avec une intolérance au glucose modérée, alors que les souris *Hnf1a*<sup>-/-</sup> sont diabétiques (Bayle et al., 2002). Des facteurs épigénétiques sont connus pour augmenter l'activité de HNF1A/B. Il s'agit essentiellement d'histone acétyltransférases telles que CBP (*CREB-binding protein*), P/CAF (*P300/CBP associated factor*), SRC-1 et RAC3 (Barbacci et al., 2004; Soutoglou et al., 2000). Par ailleurs, HNF1A est capable d'hyperacétyler les histones des promoteurs de ses propres gènes cibles de façon à en améliorer l'accès (Párrizas et al., 2001). Enfin, HNF1B a la capacité d'interagir *in vitro* et *in vivo* avec l'histone désacétylase 1 (HDAC1) (Barbacci et al., 2004). Ces données révèlent que HNF1A et -B sont impliqués dans des mécanismes de remodelage de la chromatine essentiels au contrôle de l'expression des gènes.

#### D. Profil d'expression embryonnaire chez la souris

En insérant le gène rapporteur *LacZ* au niveau de l'exon 1 de *Hnf1b* il fut possible de suivre avec précision l'évolution de ses domaines d'expression au cours du développement murin. *Hnf1b* est d'abord exprimé à E4.5 dans l'endoderme primitif. Dès E5.5, son expression est trouvée au niveau de l'endoderme pariétal et de l'endoderme viscéral proximal (embryonnaire) et distal (extraembryonnaire) (Figure 18A). On la trouve également dans les couches externes du sac vitellin jusqu'à E12. À E8.5, l'activité  $\beta$ -galactosidase est détectée dans l'intestin primitif et le tube neural (Figure 18B-C). Dès E9.5, l'expression de *Hnf1b* est trouvée dans la crête neurale et les ganglions spinaux. Au même stade, elle est également localisée dans les ébauches des dérivés de l'intestin primitif (foie, pancréas, estomac) ainsi que dans le mésonéphros et dans l'ensemble du système urogénital (Figure 18D-J). Enfin, dès E16.5, *Hnf1b* est exprimé dans les bronches et bronchioles pulmonaires (Figure 18K) (Barbacci et al., 1999; Cereghini et al., 1992; Coffinier et al., 1999a, 1999b; De Simone et al., 1991; Ott et al., 1991; Reber and Cereghini, 2001).





**Figure 18 : Expression de Hnf1b dans différents tissus.**

Suite à l'insertion du rapporteur *LacZ* dans *Hnf1b*, la détection de l'activité  $\beta$ -galactosidase permet de suivre son expression dans l'endoderme viscéral (ve) (A) ; dans l'intestin primitif (g) et le tube neural (nt) (B et C); dans la vésicule otique (ov), le bourgeon pancréatique (pb) et le mésonéphros (m) (C) ; dans le bourgeon urétéral (ub) et les divers segments du néphron (dt, pt, gl) (D) ; dans l'épididyme chez le mâle (E) et dans l'oviducte chez la femelle (F) ; dans les progéniteurs de la vésicule biliaire (G) et des bourgeons du pancréas (G et H) ; dans l'épithélium pancréatique (I, flèche : duodénum) ; dans les canaux biliaires (J) ; dans les poumons (K et L). D'après (Barbacci et al., 1999; Coffinier et al., 1999b; Reber and Cereghini, 2001)

L'expression de *Hnf1a* est plus tardive que celle de *Hnf1b*. Elle d'abord retrouvée à E8.5 dans le sac vitellin, puis dans différents organes en développement dont l'intestin, le foie, l'estomac, le pancréas (dès E10.5), le rein et le thymus (Blumenfeld et al., 1991; Cereghini et al., 1992; Nammo et al., 2002; Ott et al., 1991; Pontoglio et al., 1996).

*Hnf1a* et *Hnf1b* ont généralement des profils d'expression spatio-temporels distincts. Lorsqu'ils s'expriment dans un même tissu, il est courant de les retrouver dans des populations cellulaires différentes. Par exemple, à E12.5, *Hnf1a* est essentiellement localisé en périphérie du bourgeon pancréatique tandis que *Hnf1b* se trouve en son centre. Après la naissance, l'expression pancréatique de *Hnf1b* se limite aux canaux et celles de *Hnf1a* aux cellules acinaires et endocrines (Haumaitre et al., 2005; Nammo et al., 2008). Un scénario similaire est observé dans le rein, où l'expression de *Hnf1a* est localisée dans les tubules proximaux et celle de *Hnf1b* dans les canaux collecteurs et les tubules des néphrons. Dans le foie, *Hnf1a* est exprimé uniformément dans les hépatocytes alors que *Hnf1b* est fortement exprimé dans les canaux biliaires et faiblement dans les hépatocytes périportaux (Coffinier et al., 2002; Pontoglio et al., 1996). Enfin, dans l'intestin grêle, ces deux facteurs sont exprimés conjointement et semblent avoir des fonctions redondantes (D'Angelo et al., 2010).

## E. Fonctions

### 1. Rôles dans la formation de l'endoderme viscéral

Bien que les embryons hétérozygotes ne présentent aucun phénotype, les embryons *Hnf1b*<sup>-/-</sup> meurent avant gastrulation, vers E6.5. Cette létalité est due à une absence d'endoderme viscéral, annexe extra-embryonnaire aux fonctions nutritionnelles et hématopoïétiques. Les corps embryoïdes issus de la différenciation de cellules ES *Hnf1b*<sup>-/-</sup> perdent l'expression de marqueurs précoces de l'endoderme viscéral tels *Hnf4α*, *Albumine* et *AFP*. Ils présentent également un défaut d'activation des facteurs de transcription *Hnf1a* et *Foxa3*, ce qui contribue probablement au phénotype. Enfin, il est possible de sauver la létalité précoce des embryons *Hnf1b*<sup>-/-</sup> en greffant aux cellules ES *Hnf1b*<sup>-/-</sup> des cellules ES sauvages tétraploïdes. Les cellules tétraploïdes greffées ne participeront qu'à la formation des tissus extra-embryonnaires. Cette technique permet de générer des chimères d'agrégation tétraploïdes qui, grâce à l'apport de la composante sauvage, n'ont plus de défaut d'endoderme viscéral, montrant le rôle crucial de *Hnf1b* dans la formation de ce tissu (Barbacci et al., 1999).

## 2. Rôles dans l'intestin

La technique des chimères d'agrégation tétraploïdes sauve la létalité précoce des embryons *Hnf1b*<sup>-/-</sup> ce qui permet l'analyse du rôle de Hnf1b plus tard au cours du développement. En 2005, Cécile Haumaitre et ses collègues ont observé chez ces chimères des anomalies de régionalisation de l'intestin primitif, avec une expression ectopique de *Shh* associée à une absence d'expression de *Ihh* (*Indian hedgehog*) et de *Pdx1* au niveau des territoires de l'estomac postérieur et du duodénum (Haumaitre et al., 2005). Hnf1b est donc impliqué dans la régionalisation de l'intestin primitif et contribue ainsi au bourgeonnement des organes qui en dérivent.

Les souris *Hnf1a*<sup>-/-</sup> n'ont aucun phénotype intestinal. Par ailleurs, l'inactivation de *Hnf1b* spécifiquement dans les cellules intestinales matures n'a pas d'effet. Néanmoins, la perte concomitante des deux facteurs dans les cellules intestinales adultes est létale (D'Angelo et al., 2010). Les double-mutants meurent de déshydratation dans les jours qui suivent l'inactivation. La déshydratation constatée est due à la perte de *Slc26a3*, gène qui code un échangeur d'ion impliqué dans l'absorption intestinale de l'eau. Les auteurs de cette étude ont d'ailleurs montré que Hnf1a et Hnf1b contrôlent directement l'expression de *Slc26a3*. L'épithélium intestinal est caractérisé par un renouvellement cellulaire permanent qui requiert une coordination finement régulée des mécanismes de différenciation, prolifération, migration et mort cellulaires. Les marqueurs de différenciation terminale de l'ensemble des types cellulaires de l'épithélium intestinal sont trouvés dérégulés chez les double-mutants. La voie Notch semble contribuer au phénotype observé, *Jag1* et *Atoh1* étant des cibles directes de Hnf1a/b. Ces résultats démontrent les rôles essentiels de Hnf1a/b dans la fonction et la différenciation terminale des cellules de l'épithélium intestinal.

## 3. Rôles dans le foie et la vésicule biliaire

*Hnf1b* est exprimé dans le bourgeon hépatique dès son apparition, vers E9.5 chez la souris. Son expression se restreint rapidement à la partie postérieure du bourgeon qui est à l'origine de la vésicule biliaire. Hnf1b est ensuite détecté dans les canaux biliaires intrahépatiques (IHBD) qui envahissent progressivement le foie. Chez

l'adulte, *Hnf1b* est fortement exprimé dans les cellules épithéliales de la vésicule biliaire et plus faiblement dans les hépatocytes périportaux localisés en périphérie des lobules hépatiques (Coffinier et al., 1999b).

Les embryons *Hnf1b*<sup>-/-</sup> sauvés par agrégation tétraploïde présentent une sévère hypoplasie hépatique liée à des anomalies de spécification du foie puis à un mauvais développement du bourgeon hépatique (Lokmane et al., 2008). Ce phénotype est lié est la perte de plusieurs marqueurs clés hépatiques tels que *Hnf4α*, *Prox1*, *Foxa2*, *Alb*, *Afp*, *Hnf6* et *Ttr*. La même étude a mis en évidence un défaut de réponse de l'endoderme ventral à la voie FGF essentielle à l'induction hépatique. *Hnf1b* est donc nécessaire à l'intégration de signaux qui proviennent du mésoderme et qui dictent la spécification hépatique de l'endoderme ventral.

L'inactivation de *Hnf1b* dans le foie au début de son développement à l'aide de la lignée *Alfp-Cre;Hnf1b*<sup>fl/LacZ</sup> induit un sévère retard de croissance et une jaunisse. Ce phénotype résulte d'une atteinte de la vésicule biliaire, et plus particulièrement de son réseau canalaire (pluristratification épithéliale, dilatation canalaire). Le métabolisme des hépatocytes est aussi altéré, avec une diminution de l'expression du transporteur d'acides biliaires *OATP1* et de l'enzyme d'oxydation des acides gras *VLCAD* (Coffinier et al., 2002). Par ailleurs, une étude de 2011 a montré que l'absence de *Hnf1b* ou *Hnf6* induit des défauts de polarité épithéliale associés à une perte de cils primaires, avec diminution de l'expression du gène ciliaire *Cystin1* (Raynaud et al., 2011). Un an plus tard, trois patients porteurs de mutations hétérozygotes de *HNF1B* ont été décrits souffrant de cholestase et présentant une réduction voire une perte de cils primaires des canaux biliaires intrahépatiques (Roelandt et al., 2012).

Ces études montrent un rôle crucial de *Hnf1b* dans le développement du réseau de canaux biliaires lors de l'embryogenèse. Elles mettent aussi en lumière l'implication de *Hnf1b* dans la mise en place ou le maintien des cils primaires et de la polarité de l'épithélium biliaire. Enfin elles révèlent un rôle hépatique de *Hnf1b*, impliqué dans le métabolisme des lipides.

#### 4. Rôles dans le pancréas

*Hnf1b* est exprimé dans les premiers progéniteurs multipotents du pancréas, lorsqu'ils bourgeonnent de l'intestin primitif aux alentours E9.5 chez la souris. À la fin de la transition primaire (E12.5), *Hnf1b* est exprimé dans les progéniteurs bipotents localisés au centre du bourgeon. En périphérie, se trouvent les progéniteurs acinaires qui n'exprimeront jamais *Hnf1b*. Vers E14.5, une vague de différenciation des progéniteurs bipotents conduit à l'apparition des premières cellules canalaire matures. Dispersés dans l'épithélium en formation, les progéniteurs bipotents restants expriment *Ngn3* et perdent progressivement l'expression de *Hnf1b*, formant ainsi les progéniteurs endocrines (Maestro et al., 2003; Solar et al., 2009).

Les chimères tétraploïdes *Hnf1b*<sup>-/-</sup> ne parviennent pas démarrer l'organogenèse du pancréas. Le bourgeon pancréatique ventral est absent et le bourgeon dorsal apparaît transitoirement avant de se désagréger vers E13.5. Ce bourgeon dorsal éphémère exprime *Pdx1* mais n'exprime pas *Ptf1a*, facteur de transcription indispensable au maintien des progéniteurs pancréatiques multipotents. L'agénésie pancréatique observée est essentiellement liée aux défauts de régionalisation de l'intestin primitif (Haumaitre et al., 2005).

Dans le pancréas mature, *Hnf1b* est uniquement localisé dans l'épithélium canalaire. Néanmoins, une faible activité transcriptionnelle de son gène a été détectée dans les îlots et des lignées bêta-cellulaires. Une étude de 2004 a analysé le rôle éventuel de *Hnf1b* dans les cellules  $\beta$ , en inactivant son gène *in vivo* spécifiquement dans ces cellules au moyen des lignées *RIP-Cre* et *Hnf1b*<sup>fl/fl</sup>. Cette inactivation induit intolérance au glucose et diminution de la sécrétion d'insuline (Wang et al., 2004). En 2006, un autre groupe a analysé la lignée *RIP-Cre* indépendamment de tout croisement. Cette lignée présente à elle seule une intolérance au glucose probablement due à une anomalie de la sécrétion d'insuline, mettant en doute les travaux de Wang et ses collègues (Lee et al., 2006).

Récemment, notre équipe a étudié le rôle de *Hnf1b* dans le développement précoce du pancréas. L'inactivation de *Hnf1b* dans les progéniteurs multipotents du pancréas a été faite *in vivo* par croisement des lignées murines *Pdx1-Cre* et *Hnf1b*<sup>fl/fl</sup> (De Vas

et al., 2015). Environ 70% des souris mutantes meurent au cours de la première semaine de vie. L'analyse des pancréas mutants révèle une sévère hypoplasie pancréatique, avec perte massive des cellules acinaires, absence de cellules endocrines et altérations canalaire. Cette hypoplasie est corrélée à une diminution drastique du pool de progéniteurs multipotents, dont la prolifération est diminuée et l'apoptose augmentée en comparaison aux contrôles. La dérégulation des voies Notch et FGF, connues notamment pour leur implication dans la balance prolifération/apoptose, contribue probablement au phénotype acinaire observé. Les pancréas mutants présentent une diminution de l'expression de nombreux gènes de la maladie kystique, dont *Cys1* et *Glis3* identifiés pour la première fois comme cibles directes de Hnf1b. Ce résultat est en lien avec les défauts canaux observés (kystes, altération de la polarité, absence de cils primaires). Enfin cette étude a démontré une régulation directe de *Ngn3* par Hnf1b, expliquant l'absence de cellules endocrines chez les mutants.

Hnf1b représente donc un facteur clé de la spécification et du développement du pancréas. Lors de l'embryogenèse, il se place en amont d'un réseau de régulation complexe qui influe sur la mise en place des trois types cellulaires du pancréas.

### 5. Rôles dans le rein et le système urogénital

Les chimères tétraploïdes *Hnf1b*<sup>-/-</sup> présentent des défauts sévères d'arborisation du bourgeon urétéral, de différenciation du canal de Wolff et de formation du canal de Müller. De plus, le mésenchyme métanéphrique qui recouvre le bourgeon urétéral étant incapable de se condenser, il ne peut pas initier la néphrogenèse. Ce phénotype est lié à la dérégulation de plusieurs gènes clés du développement rénal tels que *Pax2*, *Lhx1* et *Wnt9b*, tous des cibles directes de Hnf1b. Cette étude montre que Hnf1b joue un rôle essentiel dans le développement précoce du système urogénital (Lokmane et al., 2010).

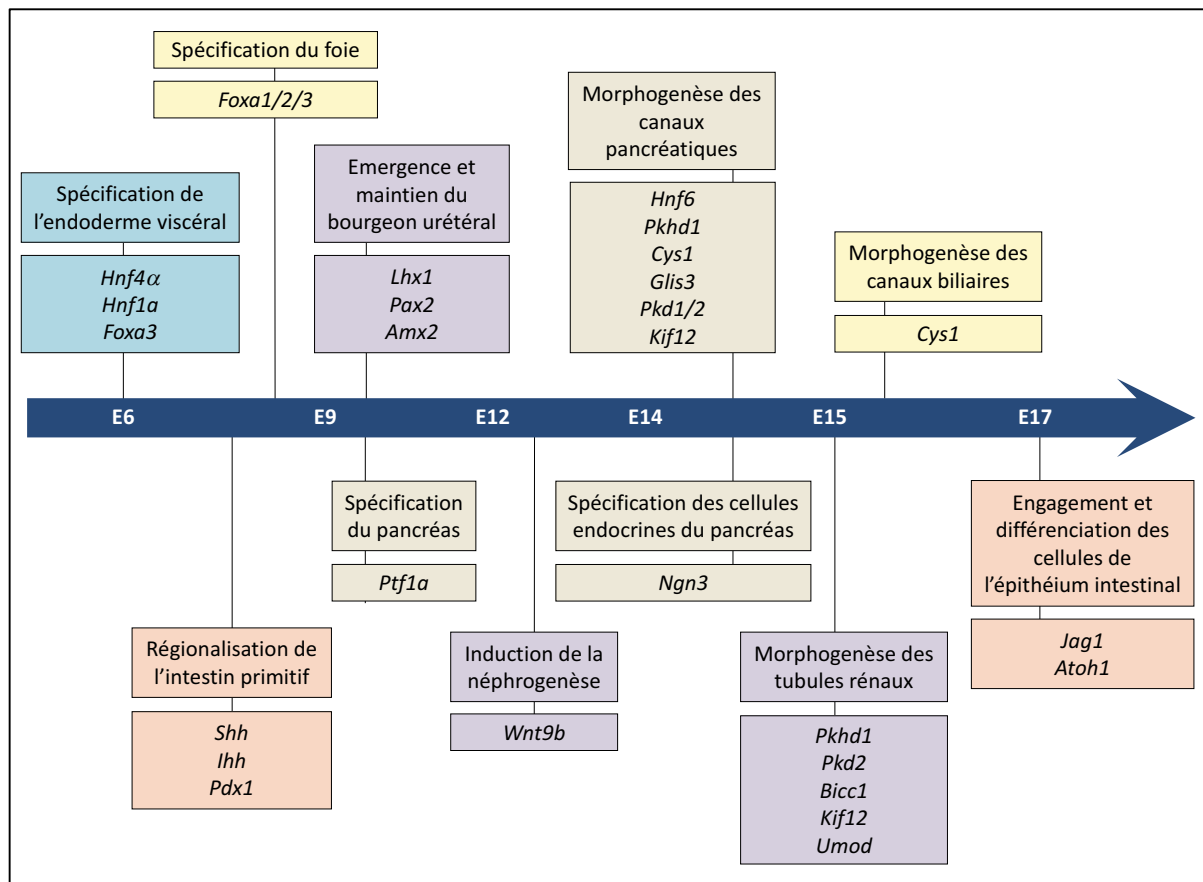
L'inactivation de *Hnf1b* dans le rein en développement induit un phénotype polykystique et une létalité de 75% à P21. Les expressions des gènes kystiques *Umod*, *Pkhd1*, *Pkhd2* et *Polaris*, identifiés comme cibles directes de Hnf1b, sont diminuées chez les mutants. Ces gènes sont notamment exprimés par le cil primaire,

ce qui suggère un lien étroit entre Hnf1b, cils primaires et kystogenèse (Gresh et al., 2004). Par ailleurs, Hnf1b induit la répression transcriptionnelle de *Socs3* dans les canaux collecteurs, favorisant l'élongation des tubules sous l'action de la voie de signalisation HGF (Ma et al., 2007). L'inactivation conditionnelle de *Hnf1b* dans les progéniteurs des néphrons entraîne une létalité précoce associée à une hypoplasie rénale. Les mutants présentent une arborisation normale mais ne développent aucun néphron. Ce défaut est associé à une diminution de l'expression de composants de la voie Notch (*Lfng*, *Dll1*, *Jag1*) et des facteurs *Irx1/2* (Heliot et al., 2013).

À partir de P10, l'élongation des tubules étant achevée, l'inactivation rénale de *Hnf1b* n'induit pas de kystes. Néanmoins, suite à une lésion, une prolifération cellulaire est nécessaire à la régénération du rein. L'absence de Hnf1b lors de cette phase de prolifération conduit alors à l'apparition de kystes (Verdeguer et al., 2010).

Hnf1b est donc nécessaire à la bonne mise en place du système uro-génital, avec un rôle essentiel dans développement rénal et le maintien de ses structures tubulaires.

La figure 19 récapitule les principales fonctions de Hnf1b au cours du développement embryonnaire de la souris.



**Figure 19 : Rôles multiples de Hnf1b dans le développement embryonnaire de la souris.**

Les gènes dont l'expression est dérégulée suite à la perte de Hnf1b sont indiqués en dessous de chaque fonction concernée.

## F. Mutations et maladies humaines

### Spectre clinique

Chez l'Homme, des mutations autosomales dominantes de *Hnf1b* sont associées au syndrome RCAD (*Renal cyst and Diabetes*). Les patients présentent un large spectre clinique incluant hypoplasie pancréatique, altérations rénales, anomalies du tractus génital et dysfonctions hépatiques. Ils souffrent également d'une intolérance au glucose d'intensité variable qui vaut au syndrome RCAD le nom de MODY5.

Les premiers signes cliniques de la pathologie se manifestent classiquement lors de l'enfance ou l'adolescence. L'atteinte n'est pas toujours généralisée et peut ne concerner que quelques-uns des organes précédemment cités. Par exemple, alors qu'une atteinte rénale est diagnostiquée chez près de 90% des patients et que



l'intolérance au glucose a une prévalence de 45%, la cooccurrence des deux symptômes n'est trouvée que chez 27% des sujets (Chen et al., 2010).

Au niveau du foie, les atteintes sont modérées avec une élévation asymptomatique des taux sériques d'alanine aminotransférase et de  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. Plusieurs patients souffrent d'une diminution des sécrétions biliaires associée à une réduction du nombre de canaux biliaires intrahépatiques et à une fibrose périportale. Dans quelques cas, une atteinte des cils primaires de l'épithélium biliaire a été constatée (El-Khairi and Vallier, 2016).

Sur le plan rénal, le défaut le plus fréquemment constaté est la présence de kystes. Une hypoplasie rénale est également souvent rencontrée. De façon moins fréquente, les patients peuvent présenter un rein en fer à cheval ou une agénésie rénale unilatérale. Ces altérations peuvent conduire à une insuffisance rénale. Enfin, une hypomagnésémie est diagnostiquée chez la moitié des enfants atteints. Elle est la conséquence directe des atteintes tubulaires, le rein jouant un rôle essentiel dans l'homéostasie du magnésium (Chauveau et al., 2013).

Des anomalies du tractus génital ont été mises en évidence chez quelques patients. Il s'agit essentiellement de malformations utérines liées à un défaut de fusion des canaux de Müller (Verhave et al., 2016)

Peu décrits, certains troubles neuropsychiatriques sembleraient être liés à des mutations de *HNF1B*. Dans une cohorte de 53 enfants porteurs d'une délétion de *HNF1B*, trois d'entre eux présentaient un retard mental associé à des troubles autistiques (Loirat et al., 2010) Dans une autre étude, des tests cytogénétiques à grande échelle ont révélé une fréquence élevée de délétion de *HNF1B* parmi une cohorte de patients atteints de troubles neurologiques. Les patients concernés souffraient d'autisme ou de schizophrénie, suggérant des liens entre *HNF1B* et ces deux pathologies (Moreno-De-Luca et al., 2010). Ces conclusions restent néanmoins controversées puisque l'ensemble des cas rapportés font état d'une délétion génomique 17q12 emportant non seulement *HNF1B* mais également des gènes contigus qui pourraient jouer un rôle dans le phénotype observé (Laffargue et al., 2015).

Au niveau du pancréas, les patients MODY5 présentent classiquement une hypoplasie pancréatique associée à des altérations des fonctions exocrine et de la cellule  $\beta$ . Une étude de 2013 a analysé les fonctions acinaires et canalaire de sept patients souffrant de MODY5. Le taux pancréatique de bicarbonates et l'activité des lipases sont trouvés significativement diminués chez les patients porteurs de la mutation. Cependant, le volume des sécrétions pancréatiques est augmenté chez ces mêmes individus. Cette étude met en évidence une altération des fonctions exocrines chez les patients MODY5 et suggère un mécanisme de compensation basé sur une hypersécrétion (Tjora et al., 2013). D'autres études ont confirmé l'atteinte exocrine en mesurant des taux diminués d'élastase fécale chez les patients MODY5 (Haldorsen et al., 2008; Dubois-Laforgue et al., 2014).

L'origine moléculaire de l'intolérance au glucose des patients MODY5 n'est pas connue. Elle semble provenir d'un défaut relatif de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Cette atteinte, de sévérité variable, peut progresser vers une insulino-dépendance (Bellanné-Chantelot et al., 2004; Bingham et al., 2000; Furuta et al., 2002; Lindner et al., 1999). *Hnf1b* n'étant pas exprimé dans la cellule  $\beta$ , l'hypothèse principale expliquant l'atteinte endocrine est basée sur un défaut du développement.

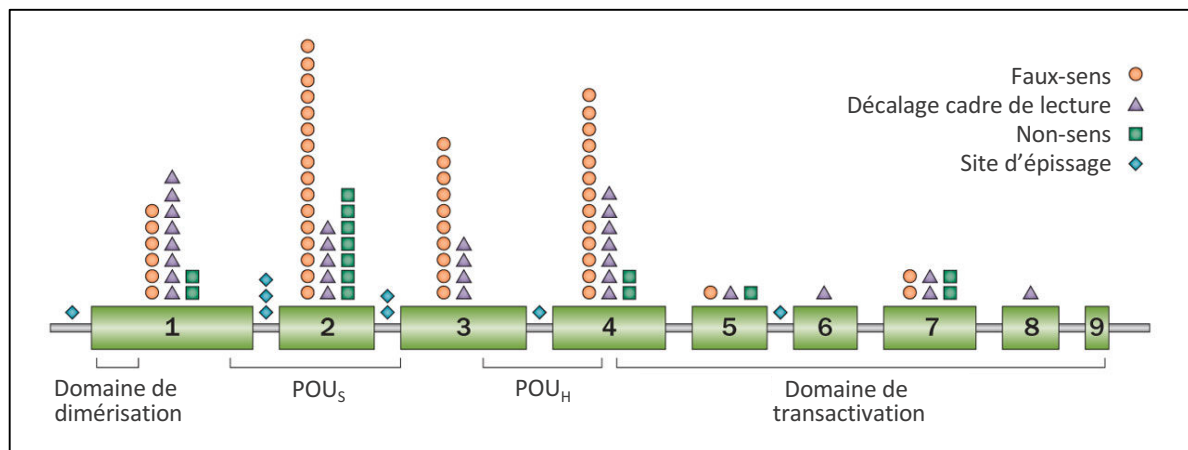
*Ngn3*, facteur clé de la différenciation endocrine, est exprimé transitoirement au cours de l'embryogenèse. *Hnf1b* est nécessaire à l'expression de *Ngn3*. Une mutation de *Hnf1b* pourrait donc perturber la mise en place des différents sous-types endocrines. L'analyse histologique de deux fœtus humains porteurs d'une mutation de *HNF1B* a d'ailleurs révélé une désorganisation des îlots, une diminution de la densité des cellules  $\beta$  et une perte d'expression de *GLUT2*. Les résultats de cette étude étayent l'hypothèse de l'origine embryonnaire du MODY5 (Haumaitre et al., 2006).

Enfin, indépendamment du RCAD, de récentes études ont montré qu'une diminution de l'expression du gène *HNF1B* est associée à un risque de cancers ovarien, de la prostate et hépatocellulaire (Ross-Adams et al., 2016; Shim et al., 2013). Par ailleurs, l'analyse de biopsies pancréatiques issues de patients atteints de PDAC a révélé un lien entre diminution de l'expression de *HNF1B* et cancer du pancréas

(Janky et al., 2016). Ces données attribuent ainsi à Hnf1b un rôle potentiel de suppresseur de tumeur dans le cancer du pancréas.

### Mutations rencontrées

Dans le cadre du MODY5, plus de 100 mutations de *Hnf1b* sont aujourd'hui recensées (Alvelos et al., 2015). Ces mutations peuvent être de tous types (faux-sens, non-sens, insertions/délétions). Une délétion totale de *HNF1B* est également possible. 65% des mutations sont localisées dans les domaines POU<sub>H</sub> et POU<sub>S</sub>. Plus rarement, elles peuvent affecter les domaines de dimérisation et de transactivation (Chen et al., 2010; Edghill et al., 2006). Il est toutefois important de signaler qu'il n'existe aucune corrélation entre la localisation de la mutation et le phénotype observé. Ainsi, des patients MODY5 d'une même famille peuvent présenter des manifestations cliniques différentes de la maladie. Il peut toutefois exister un lien entre le type de mutation et le phénotype observé. Par exemple les anomalies rénales sont préférentiellement associées à des mutations d'épissage tandis que les diabètes sont plus souvent liés des mutations non-sens.



**Figure 20 : Localisation des mutations de HNF1B chez l'Homme.**

Traduit de (Clissold et al., 2015).

Les boîtes vertes numérotées correspondent aux exons. Les domaines fonctionnels de la protéine sont indiqués sous le transcrit. Chaque symbole représente une mutation identifiée chez l'Homme.

### III. Les histone désacétylases

#### A. Généralités sur l'épigénétique

En 1942, Conrad Waddington utilisa pour la première fois le terme épigénétique pour décrire les interactions entre les gènes et leurs produits menant au phénotype d'un organisme. Depuis, la définition de l'épigénétique a évolué, et c'est aujourd'hui celle d'Arthur Riggs qui est généralement prise en compte. Elle date de 1996 et attribue à l'épigénétique les modifications transmissibles de l'expression des gènes ayant lieu sans altération de la séquence d'ADN (Choudhuri, 2011). Bien que l'état épigénétique soit transmissible, il n'est pas figé. Il est soumis à l'influence de facteurs environnementaux et de processus liés au vieillissement. Des modifications épigénétiques spécifiques sont susceptibles de conduire au développement de maladies graves comme certains cancers (Sharma et al., 2010). Ces modifications étant potentiellement réversibles, l'épigénétique ouvre de grandes perspectives thérapeutiques.

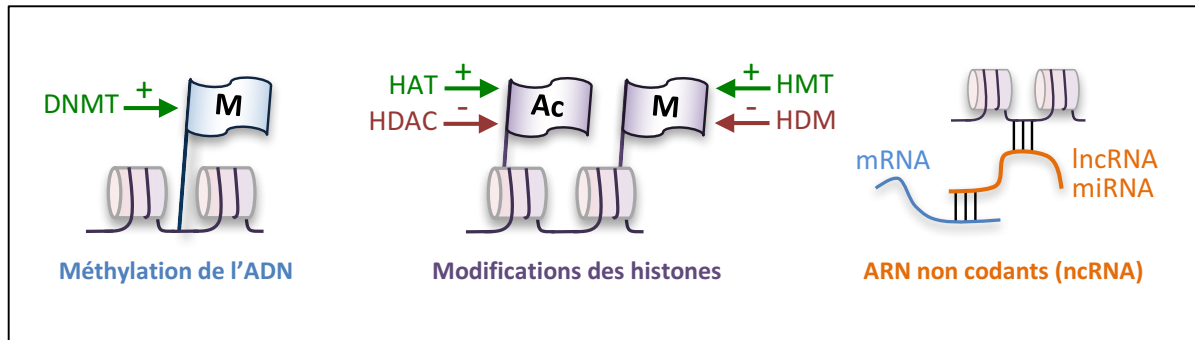
Les modifications épigénétiques sont réparties en trois groupes : la méthylation de l'ADN, les modifications chimiques des histones et les ARN non codants (ARNnc ou ncRNA) (Figure 21).

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupe méthyle au niveau d'îlots CpG (Cytosine suivie d'une Guanine). Elle joue généralement un rôle de répression de l'expression des gènes. Cet effet s'exercerait par encombrement stérique du groupe méthyle, diminuant l'accessibilité des facteurs de transcription à leur séquence cible. La réaction de méthylation de l'ADN est catalysée par les ADN méthyltransférases (DNMT).

Le génome des cellules eukaryotes est transcrit à 90%. Néanmoins, seuls 1 à 2% des transcrits sont ensuite traduits en protéines. La vaste majorité des ARN ne code donc pas pour des protéines. Ces ARN sont regroupés sous le terme d'ARN non codant (ncRNA). Les faibles niveaux d'expression des ncRNA suggèrent qu'ils participent essentiellement à des mécanismes de régulation de l'expression des gènes. Les deux groupes de ncRNA les plus largement étudiés sont les longs

ARNnc (lncRNA) et les micro-ARN (miRNA). Les miRNA ont une taille comprise en 20 et 24 nucléotides. Ils agissent en amont de la traduction, essentiellement par fixation puis déstabilisation de l'ARNm, jouant ainsi un rôle de répresseurs de l'activité des gènes. Les lncRNA ont une taille supérieure à 200 nucléotides. Leurs rôles sont multiples. Ils peuvent agir aux niveaux transcriptionnel ou traductionnel, notamment par remodelage de la chromatine, recrutement de complexes protéiques ou interaction avec d'autres ncRNA (Kaikkonen et al., 2011).

À des fins de compaction, l'ADN est enroulé autour d'histones, formant le nucléosome. Les extrémités N-terminales des histones se projettent à l'extérieur du nucléosome et sont appelées queues des histones. Les queues des histones sont accessibles à des modifications chimiques impliquées dans la régulation du degré de condensation du nucléosome. Dans un état fortement condensé, la chromatine est associée à une faible activité transcriptionnelle et porte le nom d'hétérochromatine. À l'inverse, l'euchromatine désigne une chromatine moins dense associée à une forte activité transcriptionnelle. Les modifications chimiques de la queue des histones peuvent être de différentes natures : phosphorylations, méthylations, acétylations, ubiquitylations, sumoylations, acétylations, glycosylations, etc. Outre leur impact sur la condensation de la chromatine, ces modifications jouent également un rôle dans le recrutement de complexes protéiques qui contrôlent l'expression des gènes. Ainsi, la variété des modifications chimiques associée à la diversité des résidus qu'elles peuvent toucher participent à l'abondance des possibilités de régulations possibles. Bien que les effets des modifications chimiques des histones soient difficilement prévisibles, certaines réactions peuvent avoir une influence positive ou négative sur l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription. Ainsi, l'acétylation de la queue des histones, catalysée par les histone acétyltransférases (HAT), est généralement associée à un état permissif de la chromatine. L'acétylation, réalisée sur des résidus lysine, neutralise les charges positives des extrémités N-terminales des histones. En conséquence, l'affinité des histones pour la molécule d'ADN chargée négativement diminue, induisant la relaxation de la chromatine. Une chromatine hyperacétylée est donc souvent associée à un état transcriptionnel actif. À l'inverse, la désacétylation des histones par les histone désacétylases (HDAC) entraîne généralement une compaction de la chromatine associée à une répression de la transcription.



**Figure 21 : Les trois groupes de modifications épigénétiques.**  
D'après (Quilichini and Haumaitre, 2015).

## B. Les différentes classes d'histone désacétylases

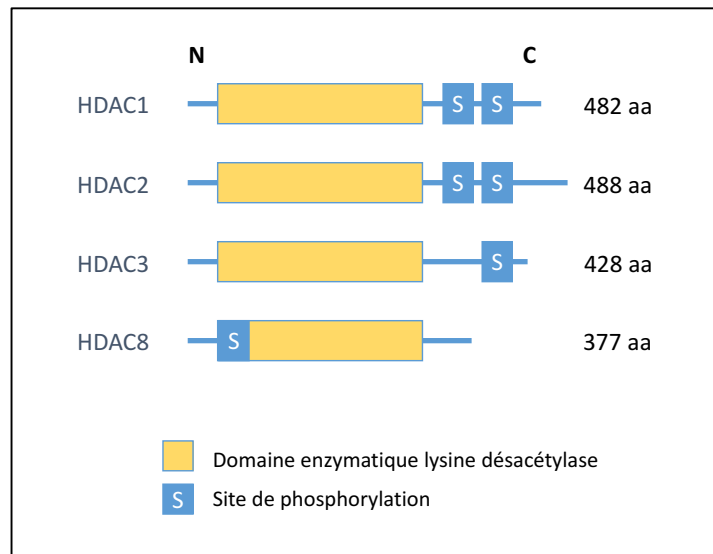
Les HDAC des mammifères sont réparties en 4 classes sur la base de leur homologie de séquence avec différentes HDAC de la levure, de leur activité catalytique et de leur cofacteur.

- Les HDAC de classe I présentent une forte homologie avec Rpd3, une histone désacétylase de la levure. Il s'agit des HDAC1, 2, 3 et 8.
- Les HDAC de classe II présentent une forte homologie avec HDA1, autre histone désacétylase de la levure. La classe IIa comprend les HDAC4, 5, 7 et 9. La classe IIb est constituée des HDAC6 et 10.
- Les HDAC de classe III sont composées de 7 sirtuines : SIRT1 à 7. Elles présentent une forte homologie avec l'histone désacétylase Sir2p de la levure. Leur activité enzymatique nécessite l'implication du cofacteur  $\text{NAD}^+$ . Toutes les autres classes sont zinc-dépendantes.
- La classe IV est représentée par HDAC11.

L'activité désacétylase des HDAC ne se limite pas aux histones. De ce fait, les HDAC sont également appelées KDAC, ou lysine désacétylases. Certaines HDAC sont ainsi présentes dans le cytoplasme où elles régulent l'activité de diverses protéines.

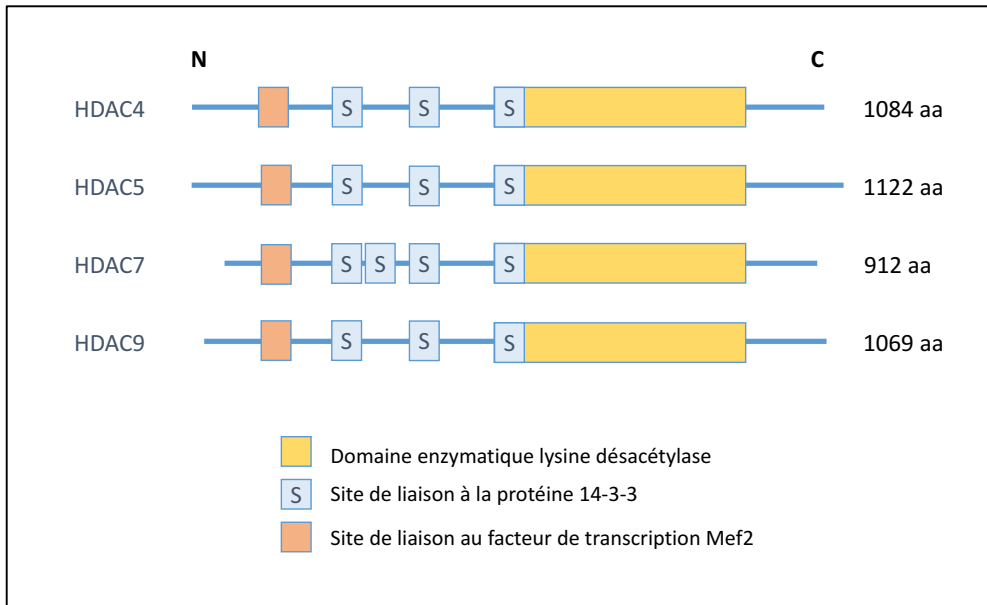
**Les HDAC de classe I** sont composées d'un domaine N-terminal qui porte l'activité désacétylase et d'un petit domaine C-terminal qui contient des sites de

phosphorylation nécessaires à leur activité (excepté pour HDAC8 dont le site de phosphorylation est N-terminal). Elles ont un profil d'expression ubiquitaire et sont retrouvées majoritairement dans le noyau où elles exercent leur fonction d'histone désacétylase. Toutes les HDAC de classe I possèdent un domaine de localisation nucléaire NLS. HDAC3 possède également un domaine d'export nucléaire NES, suggérant qu'il peut également être localisé dans le cytoplasme.



**Figure 22 : Structure des HDAC de classe I.**  
D'après (Haberland et al., 2009).

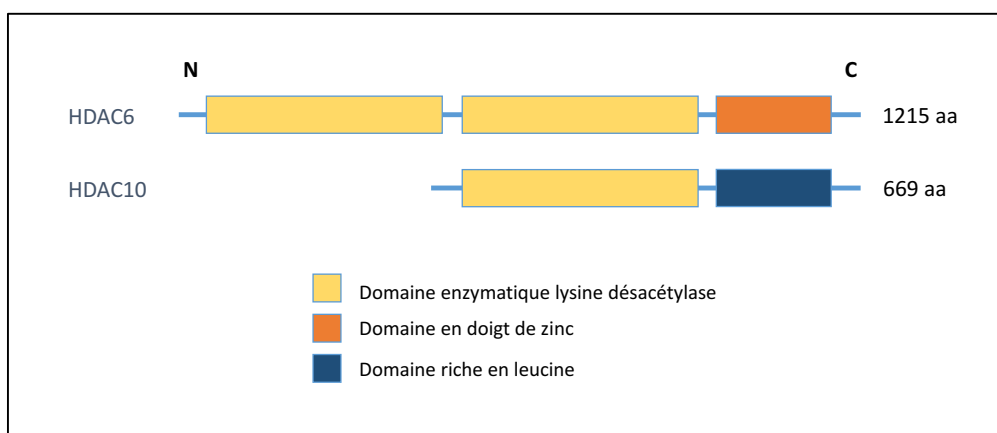
**Les HDAC de classe IIa** sont composées d'une large partie N-terminale comportant des domaines de liaison au facteur de transcription MEF2 et à la protéine chaperonne 14-3-3, cette dernière permettant une translocation du noyau vers le cytoplasme. Leur domaine catalytique est localisé en C-terminal. A l'inverse des HDAC de classe I, les HDAC de classe IIa ont un profil d'expression restreint. HDAC5 et HDAC9 sont enrichies dans les muscles et le cœur, *HDAC4* est fortement exprimée dans le cerveau et les os et *HDAC7* est principalement exprimée dans les thymocytes et les cellules endothéliales. Les HDAC de classe IIa sont trouvées dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique.



**Figure 23 : Structure des HDAC de classe IIa.**

D'après (Haberland et al., 2009).

**Les HDAC de classe IIb** regroupent HDAC6 et HDAC10. Elles ont pour particularité de présenter deux domaines enzymatiques consécutifs en N-terminal. Ces deux domaines sont fonctionnels chez HDAC6 tandis que l'un d'eux est inactif chez HDAC10. HDAC6 possède un domaine en doigt de zinc en C-terminal capable de lier les ubiquitines. Elle est enrichie dans le foie, le cœur, les reins et le pancréas. HDAC10 présente un domaine C-terminal riche en leucine. Elle est essentiellement exprimée dans le foie, le rein, la rate et le pancréas. HDAC6 et HDAC10 ont une localisation essentiellement cytoplasmique.

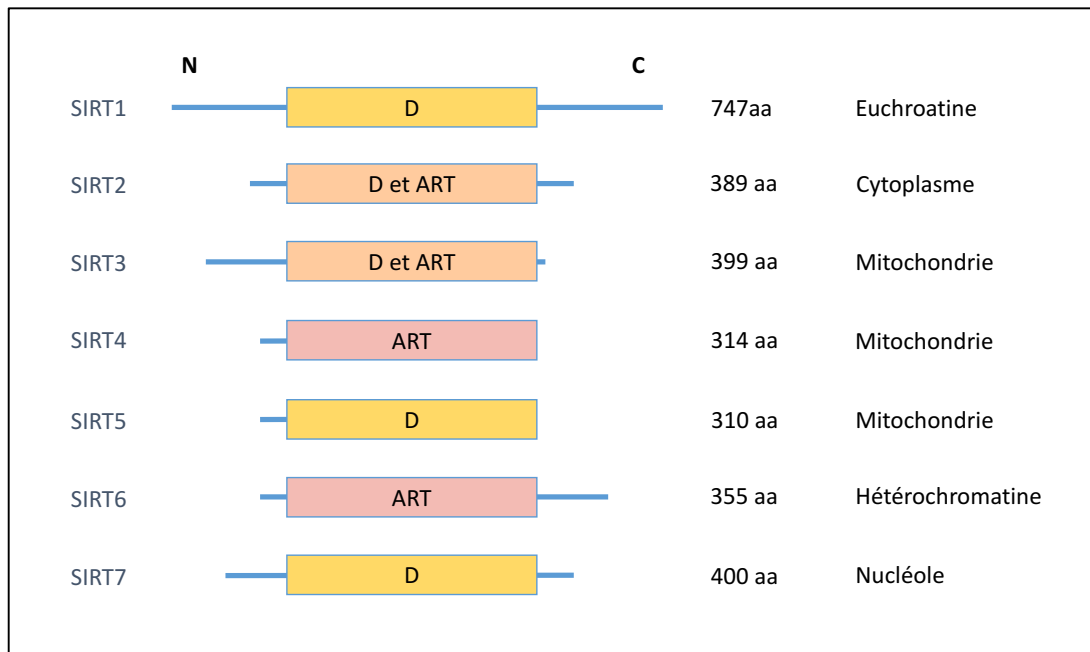


**Figure 24 : Structure des HDAC de classe IIb.**

D'après (Haberland et al., 2009).



**Les HDAC de classe III**, ou sirtuines, présentent un domaine catalytique fortement conservé qui est encadré de domaines N- et C-terminaux spécifiques à chacune d'elles. Les sirtuines diffèrent également par leur localisation sub-cellulaire (Figure 25). Contrairement aux autres classes de HDAC, certaines sirtuines ne comportent pas de fonction désacétylase, remplacée par une activité ADP-ribosyl transférase et les excluant de la plupart des tables de classification des HDAC.

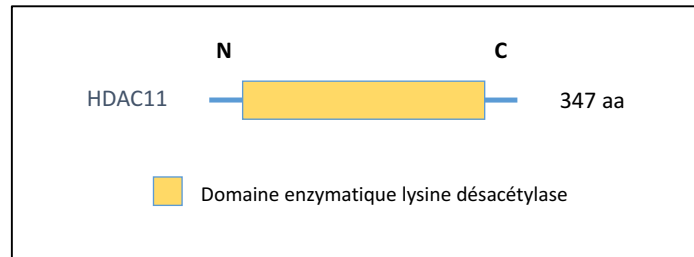


**Figure 25 : Structure des HDAC de classe III et localisation subcellulaire.**

D : Activité Désacétylase, ART : Activité ADP-Ribosyl Transférase

D'après (Kitada et al., 2013; Michan and Sinclair, 2007).

HDAC11 est l'unique représentante des **HDAC de classe IV**. Son domaine enzymatique présente de fortes homologues avec celui des HDAC de classe I et II. Elle est enrichie dans le cerveau, le muscle squelettique, le cœur et les reins. HDAC11 est trouvée dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique.



**Figure 26 : Structure de HDAC11, HDAC de classe IV.**  
D'après (Haberland et al., 2009).

### C. Rôles des histone désacétylases de classe I

Au cours des 15 dernières années, les techniques de transgénèse animale ont permis une ample identification des fonctions biologiques des histone désacétylases de classe I, avec un intérêt particulier pour les HDAC1, 2 et 3.

#### 1. Rôles extrapancréatiques

##### HDAC1 et HDAC2

Les souris *HDAC1*<sup>-/-</sup> meurent avant E10.5. Cette létalité embryonnaire est due à de sévères défauts de prolifération cellulaire associés à la surexpression de *p21*, protéine inhibitrice des CDK (Lagger et al., 2002) Chez le poisson zèbre, des mutations de *HDAC1* perturbent la neurogenèse et la spécification de la rétine en dérégulant les voies Notch et Wnt (Cunliffe, 2004; Stadler et al., 2005; Yamaguchi et al., 2005; Cunliffe and Casaccia-Bonnet, 2006). Également chez le poisson zèbre, HDAC1 semble impliqué dans les spécifications du foie et du pancréas exocrine (Noël et al., 2008).

L'inactivation globale de *HDAC2* chez la souris induit de graves défauts cardiaques : une prolifération anarchique des cardiomyocytes mène à l'obstruction du ventricule droit, causant une létalité périnatale (Montgomery et al., 2007).

Les inactivations conditionnelles de *HDAC1* ou *HDAC2* dans différents tissus tels que le muscle, le cœur ou le système nerveux n'ont aucun effet. Cela proviendrait d'une redondance fonctionnelle des deux enzymes au cours du développement tardif et de la vie post-natale (Montgomery et al., 2007). HDAC1 et HDAC2 présentent

d'ailleurs une forte homologie de séquence, d'environ 87%. Dans la plupart des tissus, les délétions concomitantes de *HDAC1* et *HDAC2* sont donc requises à l'observation d'effets phénotypiques. Ainsi, les inactivations conjointes de *HDAC1* et *HDAC2* dans le muscle squelettique conduisent une létalité périnatale de 40% liée notamment à des perturbations de la mitochondrie (Moresi et al., 2012). La même stratégie dans les oligodendrocytes en développement induit une perte totale des cellules recombinaisons (Ye et al., 2009). Enfin, dans la moelle osseuse, la double inactivation *HDAC1/2* cause une anémie (carence en hémoglobine) associée à une thrombopénie (carence en plaquettes sanguines), démontrant le rôle de ces deux facteurs dans la différenciation des lignages érythrocytaires et megacaryocytaire (Wilting et al., 2010).

### HDAC3

Les souris *HDAC3*<sup>-/-</sup> meurent avant E9.5 pour cause d'anomalies au cours de la gastrulation (Bhaskara et al., 2008; Montgomery et al., 2008). L'inactivation de *HDAC3* dans des fibroblastes embryonnaires murins mis en culture induit des défauts dans la progression du cycle cellulaire et dans la réponse aux dommages à l'ADN. Chez le poisson zèbre, l'injection d'un morpholino antisens de *HDAC3* au cours du développement a montré, comme pour le cas de *HDAC1*, un rôle de cette protéine dans la spécification du foie et du pancréas exocrine (Farooq et al., 2008). L'inactivation conditionnelle de *HDAC3* dans les cardiomyocytes engendre une sévère hypertrophie cardiaque associée à un défaut du métabolisme énergétique cardiaque (Montgomery et al., 2008). L'inactivation hépatique et post-natale de *HDAC3* induit une hépatomégalie due à une hypertrophie des hépatocytes. Ce phénotype est associé à une dérégulation de l'homéostasie métabolique du foie, avec une lipogenèse hépatique exacerbée et un défaut de stockage du glycogène (Knutson et al., 2008).

## *2. Rôles dans le pancréas*

Les études consacrées à l'analyse du rôle des HDAC dans le pancréas sont peu nombreuses. Les données actuelles reposent en grande partie sur les travaux de C. Haumaitre et ses collègues essentiellement basés sur l'utilisation d'inhibiteurs des

HDAC (HDACi). Leur équipe a d'abord mis en évidence l'expression pancréatique des HDAC de classe I et II lors de l'embryogenèse et chez l'adulte, avec une activité histone désacétylase significativement plus marquée lors du développement (Haumaitre et al., 2008). Sur la base de cette observation, ils ont analysé l'effet des HDACi sur le devenir d'explants pancréatiques embryonnaires mis en culture. Ces inhibiteurs ciblaient spécifiquement les HDAC de classe I (VPA et MS275) ou de classe I et II (TSA et NAB). Quel que soit l'inhibiteur utilisé, les traitements affectaient la différenciation exocrine en abolissant la différenciation acinaire au profit d'une différenciation canalaire. Parallèlement, les traitements induisaient une augmentation du pool de progéniteurs endocrines. Selon le traitement, la différenciation des cellules  $\beta$  et  $\delta$  était favorisée (TSA et NAB) ou atténuée (VPA et MS275) (Haumaitre et al., 2008, 2009). Enfin, dans une étude ultérieure, et par des approches *in vivo* et *ex vivo*, ils ont montré le rôle crucial des HDAC de classe II dans la régulation des lignages  $\beta$ - et  $\delta$ -cellulaires (Lenoir et al., 2011). Ces travaux ont ainsi démontré les rôles essentiels des HDAC, dont les HDAC de classe I, dans le développement embryonnaire du pancréas.

Les HDAC semblent également impliqués dans la fonction et la plasticité des cellules pancréatiques. Une étude *in vitro* a montré qu'en condition de faible concentration en glucose, HDAC1 et -2 s'associent à *Pdx1* pour inhiber la synthèse d'insuline (Mosley and Ozcan, 2004). Cela suggère que les HDAC de classe I participent à la régulation de l'homéostasie du glucose par un effet direct sur le pancréas. Récemment, une étude américaine a analysé *in vivo* le rôle des HDAC de classe I dans la régénération du pancréas exocrine. L'administration de VPA après traitement à la céruléine, composé cytotoxique spécifique des cellules acinaires, perturbe la régénération du pancréas, suggérant l'implication des HDAC de classe I dans le processus de régénération pancréatique (Eisses et al., 2015).

L'ensemble de ces analyses démontre la pléiotropie des rôles de HDAC1/2 et de HDAC3 dans le développement et la fonction de nombreux tissus, dont le pancréas. Néanmoins, les cibles moléculaires et les modes d'action de ces protéines restent faiblement documentés. L'étude des HDAC est donc incontournable à l'amélioration de nos connaissances des processus épigénétiques qui régulent le développement et la fonction du pancréas.



## OBJECTIF DES TRAVAUX DE THÈSE

Au cours de l'embryogenèse, divers facteurs génétiques et épigénétiques assurent une régulation fine du développement du pancréas. Après la naissance, nombreux de ces facteurs participent également au maintien de l'identité cellulaire qui est cruciale au fonctionnement du pancréas. L'objectif de la thèse est d'identifier des réseaux de régulation impliqués dans le développement et le maintien de l'identité et de la fonction des cellules du pancréas. La thèse s'articule en 3 parties :

**1. Régulation génétique de l'homéostasie des cellules exocrines du pancréas : rôle de Hnf1b.** De récentes études menées par notre équipe ont démontré que le facteur de transcription Hnf1b est indispensable au développement du pancréas. Après la naissance, le rôle de Hnf1b restait à élucider. Afin de caractériser le rôle de Hnf1b dans l'homéostasie des cellules exocrines, nous avons inactivé *Hnf1b* spécifiquement dans les canaux du pancréas après la naissance, à des stades ciblés chez la souris. Cette étude constitue la partie principale de la thèse et fait l'objet d'un article en cours de finalisation intitulé « *Pancreatic ductal deletion of Hnf1b disrupts exocrine homeostasis and leads to pancreatitis and neoplasia* ».

**2. Etude d'un modèle murin de MODY5.** La pathologie humaine MODY5 est associée à des mutations hétérozygotes de *HNF1B*. Or, les souris *Hnf1b*<sup>+/-</sup> ne présentent aucun défaut pancréatique. Dans le but d'améliorer la compréhension de cette pathologie, nous avons étudié le premier modèle murin de MODY5, généré par insertion hétérozygote d'une mutation identifiée chez l'Homme. Cette étude fait l'objet d'un article en préparation intitulé « *New insights in MODY5 etiology and physiopathology with a MODY5 mouse model* ».

**3. Régulation épigénétique de la régénération acinaire du pancréas : rôle de HDAC3.** Sur le plan épigénétique, notre équipe a précédemment examiné le rôle des HDAC de classe I dans le développement du pancréas. Afin de compléter cette étude, et basés sur l'analogie des voies qui régulent le développement et la régénération du pancréas, nous nous sommes interrogés sur le rôle des HDAC dans la régénération pancréatique. Nous avons analysé *in vivo*, chez la souris, la capacité de régénération des pancréas inactivés pour *HDAC3* spécifiquement dans le compartiment acinaire mature.



## RÉSULTATS





Article 1 : Pancreatic ductal deletion of Hnf1b disrupts exocrine homeostasis and leads to pancreatitis and neoplasia

*En préparation*

**Pancreatic ductal deletion of *Hnflb* disrupts exocrine homeostasis and leads to pancreatitis and neoplasia.**

Evans Quilichini<sup>1,2</sup>, Mélanie Fabre<sup>1,2</sup>, Matias De Vas<sup>1,2</sup>, Ozge Ozguc<sup>1,2</sup>, Lucie Morillon<sup>1,2</sup>  
Silvia Cereghini<sup>1,2</sup>, Edouard Manzoni<sup>1,2</sup>, Edwige Declerc<sup>1,2</sup>, Pasek Raymond Carl<sup>3</sup>, Anne  
Couvelard<sup>4</sup>, Maureen Gannon<sup>3</sup>, Cécile Haumaitre<sup>1,2\*</sup>

**Affiliations**

<sup>1</sup> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR7622, Institut de Biologie  
Paris-Seine (IBPS), Paris, France

<sup>2</sup> Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR7622-IBPS, Paris, France

<sup>3</sup> Department of Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee, USA

<sup>4</sup> INSERM U1149 - University Paris Diderot, Department of Pathology AP-HP, Bichat  
University Hospital, Paris, France

\* corresponding author, email : cecile.haumaitre@inserm.fr

## Abstract

The exocrine pancreas consists of acinar cells that produce digestive enzymes transported to the intestine through a branched ductal epithelium. Pathologies associated with the exocrine pancreas include pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). To investigate the role of pancreatic ducts in exocrine homeostasis, we inactivated *Hnf1b* *in vivo* in mouse pancreatic ductal cells postnatally. The transcription factor Hnf1b is first expressed in pancreatic progenitors, then restricted to ductal cells from late embryogenesis, whereas it is not expressed in acinar cells. We have previously shown that Hnf1b is crucial for pancreas morphogenesis but its postnatal role was still unelucidated. Interestingly, postnatal *Hnf1b* inactivation leads to chronic pancreatitis in adults. *Hnf1b* mutant pancreata display dilatation of ducts, loss of acinar cells, acinar-to-ductal metaplasia and lipomatosis. We depicted the molecular mechanisms involved, with downregulation of cystic disease-associated genes, especially *Pkhd1* and *Cys1*, loss of primary cilia, upregulation of signalling pathways such as Hippo/Yap and Notch. We also show that loss of Hnf1b in adult pancreatic ducts is associated with impaired regeneration and sensitizes acinar cells to injury-induced reprogramming. Moreover, *Hnf1b* mutants developed precursor lesions similar to pancreatic intraepithelial neoplasia (PanINs). Thus, loss of *Hnf1b* triggers pancreatitis, lipomatosis and neoplasia. Our results show that perturbed ductal homeostasis resulting from primary cilia loss leads to pancreatitis and predisposes to cancer. Our findings reveal that *Hnf1b* deficiency may contribute to diseases of the exocrine pancreas and could gain further insight into the etiology of pancreatitis and tumorigenesis.

## **Introduction**

The exocrine compartment of the pancreas secretes enzymes to contribute to food digestion. It consists of acinar cells that produce enzyme precursors and an intricate system of ducts that transport them to the duodenum. The duct epithelium secretes the fluid that carries the digestive enzymes and bicarbonate, which neutralizes gastric acids and adjusts a pH favorable for proenzyme activation in the duodenum. The pancreatic ductal tree comprises the main pancreatic duct that drains into the intestine, interlobular ducts, that link the acinar lobules to the main duct, small intralobular ducts, and fine intercalated ducts that connect to acini [1].

In vertebrates, pancreatic duct morphogenesis initiates with the formation of microlumens that coalesce and expand into a continuous luminal network. This network gives rise to “primitive ducts”, consisting of a monolayered polarized epithelium, which subsequently remodels and matures into a tubular system. Pancreas ductal development notably requires signalling pathways such as Notch pathway [2,3], the activity of transcription factors such as Hnf6 [4,5], and function of the organelle primary cilia [6,7].

Congenital alterations affecting the development or function of pancreatic ducts can lead to severe human diseases, including cystic fibrosis or pancreatitis [8]. Chronic pancreatitis is characterized by fibroinflammatory changes of the pancreatic tissue and has been shown to be a risk factor for pancreatic cancer [9]. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most lethal malignancies in humans. Pathogenesis is believed to occur through the progression of precursor lesions, and the most well described are pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN).

Despite these advances, it is clear that a more comprehensive picture of pancreatic duct differentiation and function requires identifying additional gene functions regulating this process. In the present study, we focus on the transcription factor Hnf1b. It is first expressed in pancreatic progenitors, then restricted to ductal cells from late embryogenesis, whereas it is not expressed in acinar cells [10–12]. We have previously shown that Hnf1b is crucial for duct morphogenesis during embryogenesis [12]. Here, we investigate its role in differentiated ducts after birth. We observed that loss of Hnf1b leads to dramatic decrease in specific cystic-disease gene expression, loss of the primary cilium, deregulation of Hippo/Yap pathway. Thus, Hnf1b has a crucial function in the regulatory network controlling differentiated epithelial ductal cells and maintenance of the primary cilium. *Hnf1b* mutant pancreata further display dilatation of ducts, loss of acinar cells, acinar-to-ductal metaplasia, inflammatory infiltration, fibrosis and lipomatosis. This was associated with deregulation of Hippo/Yap, EGFR, Notch, and TGF- $\beta$  signalling.

Our data reveal a crucial role of Hnf1b in the maintenance of the primary cilium in differentiated ducts. Our findings further underscore the close link between ciliary defects and pancreatitis, with altered acinar homeostasis. Moreover, our results show that loss of Hnf1b leads to pancreatic neoplasia. This study suggests that *Hnf1b* deficiency may contribute to diseases of the exocrine pancreas and could gain further insight into the etiology of pancreatitis and risk of neoplasia.

## **Material and Methods**

### *Mouse lines*

The *Hnf1b* conditional knockout ( $Hnf1b^{tm1Ics}$  denoted as  $Hnf1b^{flox/flox}$ ) carrying LoxP sites flanking exon 4 [12] and Sox9-CreER<sup>T2</sup> [13] lines have been previously described. The R26R<sup>YFP</sup> line (B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos/J) from the Jackson Laboratory was used to assess recombination efficiency. We performed a conditional deletion of *Hnf1b* in pancreatic ducts by crossing the *Hnf1b*-floxed mouse line with the tamoxifen (TM)-inducible Sox9-CreER<sup>T2</sup> line to generate Sox9-CreER;*Hnf1b*<sup>fl/fl</sup> mice referred to as mutants. *Hnf1b*<sup>fl/+</sup> or *Hnf1b*<sup>fl/fl</sup> mice were referred to as controls. Heterozygous Sox9-CreER;*Hnf1b*<sup>+/<sup>Flox</sup></sup> mice showed no phenotype (data not shown). Animal experiments were conducted in accordance with French and European ethical legal guidelines and the local ethical committee for animal care (Comité d'éthique en expérimentation animale Charles Darwin N°5, approval number N° 01508).

### *Tamoxifen treatment*

Tamoxifen (Sigma-T5648) was dissolved at 25 mg/ml in corn oil and administrated intraperitoneally to mice at a dose of 7mg/40g of mouse. For postnatal inactivation, tamoxifen injections were performed on lactating females during 3 consecutive days following birth, with 1 injection per day. Pups got tamoxifen through breast milk. Dissections were done at P8, P25, 2-months and 5-months. For adult inactivation, Tamoxifen was injected during 4 consecutive days, with 1 injection per day, to 10-weeks old mice.

### *Cerulein treatment*

2 weeks after adult *Hnf1b* inactivation with TM injections, mice were injected with cerulein (Sigma-C9026), a decapeptide analogue of pancreatic secretagogue cholecystokinin, at a dose corresponding to 75 µg/kg of mouse. Cerulein was dissolved at 1 mg/ml in NaCl and administered intraperitoneally to mice with 5 µl/g of mouse for 2 consecutive days with 7 injections per day. Dissections were done at 3 different times to follow destruction and regeneration of acinar cells: at the day of cerulein injection (day 0), at the day when acute pancreatitis was induced (day 3), and at the day when pancreas was almost regenerated in normal conditions (day 7).

### *Histology, Immunohistochemistry and Immunofluorescence*

Dissected pancreases were fixed in 4% formaldehyde overnight and embedded in paraffin. Sections (7 µm thick) were prepared, deparaffinised and rehydrated for histological stainings. For Hematoxylin & Eosin coloration, slides were colored with Harris solution (Sigma-HHS16) for 1 min and in Eosine (Sigma-HT110216) for 3 min. For Masson's Trichrome staining, slides were colored with Harris for 5min, rinsed with lithium carbonate and water, then colored with Funchsin-Ponceau for 3 min and rinsed with acidified water and 1% phosphomolibdic acid. Slides were then colored with 1% light green for 20 min and rinsed with acidified water. For Alcian Blue coloration, slides were colored with Alcian Blue solution (pH2.5) for 30 min, prepared with Alcian Blue 8GX (Sigma-A3157) in 3% acetic acid, rinsed with water and counterstaining with Nuclear Fast Red solution for 5 min. Slides were dehydrated before mounting. Sections were processed for immunofluorescence or immunohistochemistry using a previously described protocol [14]. Briefly, epitope retrieval was performed by heating the slides in a microwave in citric acid buffer (10mM, PH:6). Permeabilization was performed in PBS/TritonX-100 0,3%, and sections were incubated in



blocking solution (10% milk, 1% BSA 0.1% 10X Triton-X in PBS 1X or 1,5% Horse/Goat Serum in PBS 1X) before antibody staining. Nuclei were stained with DAPI (1/1000-Sigma) in secondary antibody staining step. For signal amplification, we used a biotinylated anti-rabbit or anti-goat antibody before staining with Steptavidin-Alexa594 or Steptavidin-Alexa488. For immunohistochemistry experiments, slides were incubated in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/50% methanol solution before blocking to eliminate endogenous peroxidase activity. The VECTASTAIN peroxidase ABC system (Vector) was used for Sox9, F4/80, vimentin and Claudin18 immunostainings. Nuclei were counterstained with Hematoxylin. Primary antibodies are listed in Table 1. Images were acquired using Zeiss Axio Observer.Z1 microscope.

#### *Quantification of duct area, Quantification of Proliferation and apoptosis*

Quantifications of Sox9<sup>+</sup> and Amylase<sup>+</sup> cells at P8 were performed with at least 2 sections per pancreas (Control, n=4; Mutant, n=4). More than 15 000 Sox9<sup>+</sup> and 22 000 Amylase<sup>+</sup> cells were counted for each genotype. The numbers of Sox9<sup>+</sup> and Amylase<sup>+</sup> cells per mm<sup>2</sup> were obtained by dividing the numbers of Sox9<sup>+</sup> and Amylase<sup>+</sup> cells by the corresponding cross-sectional areas.

Proliferation of ductal and acinar cells was determined by immunolabeling with Phospho-histone H3 (PPH3) and Sox9 or Amylase antibodies respectively. Positive cells were scored from at least 3 non-overlapping fields for each section at 10X magnification. The percentages of PPH3 positive cells was calculated by dividing the number of ductal or acinar cells stained with PPH3 by the total number of cells expressing Sox9 or Amylase. Quantification was performed with at least 2 sections per pancreas (Control, n=4; Mutant, n=4).

Acinar cell apoptosis was determined with a Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated

dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) analysis, performed using an in situ cell death detection kit (Roche Diagnostics) and followed by amylase immunostaining. Apoptosis was quantified by counting the number of labelled nuclei. The percentage of TUNEL-positive cells was calculated by dividing the number of TUNEL+/Amylase+ cells by the total number of Amylase+ acinar cells. Quantification was performed with 3 sections per pancreas (Control, n=4; Mutant, n=4). More than 100 TUNEL stained acinar cells were counted in controls and more than 800 in mutants. All countings were performed with Adobe Photoshop CS4.

#### *RNA extraction, Reverse-Transcription and quantitative PCR (RT-qPCR)*

Total RNA from adult pancreas was isolated using RNeasy Mini-kit (Qiagen) and then reverse transcribed using the superscript RT II Kit with random hexamers (Invitrogen). qPCR was performed using a SYBR Green master mix (Eurobiogreen QPCR Mix, Hi-ROX, Eurobio). Primer sequences are provided in Table 2. The method of relative quantification was used to calculate expression levels, normalized to cyclophilin A and relative to wild-type cDNA from E15.5 pancreata. Values are shown as mean+s.e.m.

#### *Statistical analysis*

Statistical significance was determined using Student's t-test or the non parametric Mann-Whitney's U test when appropriate. Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA). Differences were considered significant for  $P < 0.05$ . (NS, not significant; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

## Results

### ***Ductal deletion of Hnf1b leads to alteration of ducts associated with loss of primary cilia***

We generated Sox9-CreER;Hnf1b<sup>fl/fl</sup>;R26R<sup>YFP</sup> mutants and performed a postnatal conditional inactivation of *Hnf1b* in ductal cells during the first three days of the life of the pups (P1-P3). We analyzed the effects on pancreases dissected at P8. We assessed that *Hnf1b* inactivation was efficient by RT-qPCR, showing a 65 % decrease in *Hnf1b* expression in mutants (Fig. 1A). By immunostaining, we observed nuclear *Hnf1b* localisation in ductal structures in controls (Fig. 1B, B'), whereas loss of *Hnf1b* signal in ducts labelled with GFP was observed in mutants. In the few remaining non-targeted ducts, Hnf1b staining persisted in ductal cells not labelled with GFP (Fig. 1C, C'). These results show a high efficiency of *Hnf1b* inactivation in pancreatic ductal cells. By Hematoxylin & Eosin staining, we observed enlarged ducts in mutants (Fig. 1D, E). By immunohistochemistry of Sox9, a specific ductal cell marker, we observed in mutants enlarged ductal structures lined by Sox9+ cells, with a nuclear staining (Fig. 1F, G). With Hnf6 immunostaining, enlarged Hnf6+ ducts were also observed in mutants (Fig. 1H, I). These results show that efficient *Hnf1b* inactivation in pancreatic ducts leads to altered ductal structures. Mutant ducts not only appeared dilated but also had significantly more cells undergoing proliferation than control pancreatic ducts (1.4-fold), as shown by Sox9/phospho-histone H3 (PPH3) immunostaining quantification (Fig. 1J-L). This results in a significant increase of the ductal cell area (1.2-fold) quantified by the number of Sox9+ cells (Fig. 1M). These data indicate that Hnf1b function restricts the proliferation of duct epithelial cells.

Pancreatic ductal cells have a single cilium, and mutations affecting cilia development promote a dilated ductal phenotype or cyst formation in this organ [4,6,7]. We thus examined primary cilia in *Hnf1b* mutants. Immunostaining of acetylated  $\alpha$ -tubulin (AcTub), a

constituent of the primary cilium, revealed a loss of cilia of ductal cells in mutants (Fig. 2A, B). This was confirmed by immunostaining of Arl13b, a cilium-specific protein required to control the microtubule-based, ciliary axoneme structure, with Mucl immunostaining showing the apical border of ductal cells (Fig. 2C, D). We also performed AcTub/GFP co-immunostainings to correlate *Hnf1b* inactivation and the loss of the primary cilium at the cellular level. *Hnf1b*-inactivated ducts labeled with GFP showed no cilium (Fig. 2E-G). Importantly, this loss of primary cilium was not only seen in dilated ducts (Fig. 2F, F') but also in *Hnf1b*-inactivated non-dilated ducts (Fig. 2G, G'), strongly suggesting that loss of primary cilia was not a consequence of duct dilation. Therefore, we show that *Hnf1b* inactivation leads to loss of the primary cilium of ductal cells.

As a transcription factor, *Hnf1b* controls a network of genes involved in duct morphogenesis [12]. In order to investigate how *Hnf1b* is involved in the maintenance of the primary cilium in differentiated ducts, we further investigated expression of cystic disease genes, important ductal markers involved in ductal cell integrity and functionality by RT-qPCR (Fig. 2H). In mutants, we observed a dramatic decrease in the expression of *Cys1*, a gene responsible for congenital polycystic kidney (CPK) disease [15] and involved in ciliogenesis and polarization of cholangiocytes [16], as well as *Pkhd1*, the autosomal recessive PKD gene involved in ciliary structure and tubular architecture maintenance [17]. We previously found that *Pkhd1* and *Cys1* were direct targets of *Hnf1b* during early duct development [12]. We also found a dramatic decrease in *Spp1* expression, a gene regulated by *Hnf1b* in renal cells [18] coding a matricellular protein localized at the apical side of the epithelium of ductal cells [19]. *Prox1* is highly expressed in pancreatic ducts at late-gestation [20] and pancreas-wide inactivation of *Prox1* resulted in dilated pancreatic ducts [21]. We found a 28% decrease in *Prox1* expression in mutants, suggesting that reduced *Prox1* expression could also contribute to the dilatation of ducts observed in *Hnf1b* mutants. By

contrast, the expression of the autosomal dominant PKD gene *Pkd1* was unchanged compared to controls, such as the ductal markers Sox9, Hnf6 and CK19. Moreover, we analysed the polarity of ductal cells. Whereas Spp1/osteopontin was found apically in control ductal cells, we observed very few Spp1+ cells in mutants, confirming RT-qPCR results, with disruption of the apical staining (Fig. 2I-J'). Although control ducts showed strong apical localisation of Muc1 and PKCz in epithelial cells around the duct lumen, stainings of these apical markers in the cells lining cysts were reduced and discontinuous in mutants (Fig. 2K-N'). These results show that Hnf1b has a preminent role in the regulatory network controlling the maintenance of the primary cilium of ductal cells and tubular architecture of ducts.

The primary cilia in the pancreatic ducts are immotile and function as chemo- or mechano-sensors [22]. Cilia transduce signals from extracellular stimuli to a cellular response that regulates proliferation, differentiation, transcription, migration, polarity and tissue morphology [23]. They play an essential role in modulating signalling cascades that shape cellular responses to environmental cues to maintain proper tissue development and function. Some signalling components, including Hedgehog (Hh) and Notch, localize to pancreatic primary cilia. *Hippo*-signalling has recently been added to the growing list of signalling pathways at least partly regulated through the cilium [24]. We found no changes in Hh and Notch signalling component expression at P8 in mutants compared to controls (data not shown). The Hippo tumour-suppressor pathway is a key upstream regulator of the transcription factor YAP, limiting its activity through phosphorylation-dependent cytoplasmic retention and destabilization. A direct antagonistic interaction between ciliogenesis and YAP function has been shown [24]. Therefore, we analysed YAP localisation by immunostaining in control and mutant pancreata and observed more cells with YAP nuclear staining in *Hnf1b* mutants (Fig. 3A-B). In correlation, we analysed expression of the YAP transcriptional targets *Ctgf*, *Lamc2*, *Cyr61* and *Birc5* by RT-qPCR. We found a strong increase in *Ctgf* (1.8-fold)

and *Lamc2* expression in mutants compared to controls (Fig. 3C). We further analysed YAP localisation and performed YAP/Sox9 and YAP/Amylase co-immunostainings. Whereas YAP localized only in the nucleus of Sox9<sup>+</sup> ductal cells as expected in controls (Fig. 3D-F'), YAP localized in the nucleus of Sox9<sup>+</sup> ductal cells and also ectopically in non ductal cells in mutants (Fig. 3G-I'). Whereas we found no YAP staining in Amylase<sup>+</sup> cells in controls (Fig. 3J-L'), we observed an ectopic YAP nuclear localisation in Amylase<sup>+</sup> acinar cells in mutants (Fig. 3M-O'). These data show an upregulation of the YAP pathway in *Hnf1b* mutants.

### ***Ductal deletion of Hnf1b leads to acinar-to-ductal metaplasia, loss of acinar cells and lipomatosis***

We then investigated the consequences of the ductal structure alteration on the pancreatic tissue. We analysed the fibroblast marker  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA). While  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> cells were observed around blood vessels in control pancreata (Fig. 4A), mutants exhibited  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> fibroblasts surrounding ducts and in periacinar spaces (Fig. 4B). By histological analysis with Masson's trichrome, we observed green staining in some interstitial spaces showing a marked increase in periductal collagen deposition (Fig. 4C, D). This indicated fibrosis around ducts and a fibrotic pancreatic parenchyma. Therefore, we thought that acinar cells could be secondarily affected in mutants and undergo acinar de-differentiation leading to a lesion called acinar-to-ductal metaplasia (ADM). Whereas we found no change in acinar marker expression (Amylase, CPA, Mist1, Ptf1a, Hnf1a) by RT-qPCR at P8 (Fig. 4E), we already observed at this stage a 41% decrease in the number of Amylase<sup>+</sup> cells (Fig. 4F). We investigated signalling pathways known to be involved in ADM such as EGFR and TGF- $\beta$ . ADM induction is indeed linked to activation of EGFR signalling, upregulation of *EGFR* expression in acinar cells being observed prior to ADM [25–28]. The cytokine transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) also promotes ADM of acinar cells [29]. We found an upregulation

of *EGFR* expression (1.6-fold) in mutants, whereas *TGF $\beta$ -I* expression remained unchanged (Fig. 4G). By performing co-immunostaining of the acinar marker Amylase and the ductal marker cytokeratin (pan-CK), we observed in mutants expanded domain of pan-CK and isolated Amylase<sup>+</sup> cells linked to the Pan-CK network, suggesting preliminary signs of ADM (Fig. 4H-I'). Moreover, Amylase/PPH3 immunostaining quantifications revealed a 47% decrease in acinar cell proliferation (Fig. 4 J-L), whereas TUNEL assay showed a 15.5-fold increase in acinar cell apoptosis (Fig. 4M-O) in mutants compared to controls. Hence, *Hnf1b* loss of function promotes a loss of acinar cells due to less proliferation and increased apoptosis.

We further investigated this process and analysed *Hnf1b* mutants at a later stage, P25. We found a dramatic decrease (54%) in mutant pancreas weight, whereas mouse weight was unchanged (Fig. 5A). By Hematoxylin & Eosin and Trichrome stainings, we observed ADM structures in mutants (Fig. 5B). This correlated with a dramatic decrease in acinar marker expression quantified by RT-qPCR (89% for amylase), whereas expression of the ductal marker *Sox9* was dramatically induced (2.2-fold) (Fig. 5C). Ductal structures were more affected than at P8 as shown by the complete loss of *Muc1* apical staining in mutant ducts (Fig. 5D-E') which correlated with the dramatic decrease in *Muc1* expression observed by RT-qPCR (Fig. 5C). Moreover, we found a 55% decrease in *Hnf6* expression, which correlates with our previous finding that *Hnf6* is a direct target of *Hnf1b* during pancreas development [12]. This revealed that *Hnf6* expression is dramatically decreased in *Hnf1b* mutant ducts and we indeed observed only few remaining ductal *Hnf6*<sup>+</sup> cells in mutants compared with ductal *Sox9*<sup>+</sup> cells in mutants (Fig. 5H-K'). By Amylase/Pan-CK co-immunostainings, we found acinar structures closely connected with ductal structure and Pan-CK co-localisation with Amylase<sup>+</sup> cells in mutants (Fig. 5F-G'). As *Hnf6* and *Sox9* are ectopically induced in acinar cells in ADM [30], we analysed their localisation by

Sox9/Amylase and Hnf6/Amylase co-immunostainings and found Sox9 and Hnf6 nuclear localisation in some mutant acinar cells (Fig. 5H-K'). We also observed some area with fat cells in mutants. To differentiate whether these cells were acinar cells filled with lipids or true adipocytes, we stained pancreata with the adipocyte marker Fabp4. No duct, acinar, or islet cells were stained for Fabp4 in controls or mutants, but fat-containing cells in mutant mice were positive for Fabp4, indicating that they were indeed adipocytes (Fig. 5L-M').

Then, we analysed the signalling pathways involved. We found an upregulation of the YAP pathway in mutants, stronger than at P8, with a 8.6-fold increase in *Ctgf* and 6.3-fold increase in *Lamc2* expression. *Cyr61* was also upregulated at this stage, with a 2.8-fold increase (Fig. 5N). Thus, the YAP pathway was strongly enhanced in mutants compared to controls. The Notch pathway was shown to be activated during acinar dedifferentiation and to regulate ADM, as aberrant Notch activity in pancreatic acini promoted their transdifferentiation toward duct-like cells [31–33]. We found an upregulation of Notch pathway components (ligand, receptor, effector and target) (Fig. 5O), and especially a 2.4-fold increase in *Notch2* expression, a receptor which was described to be confined to ducts by E15.5 [34,35]. Moreover, we also observed a significant increase in *Jag1* expression, which was shown to be upregulated in expanded ducts observed in chronic pancreatitis patients [36]. At this stage, we also observed a dramatic increase (3.6-fold) in TGF- $\beta$ 1 expression in mutants and a significant increase in *p8/Nupr1* expression (Fig. 5P), a transcriptional cofactor expressed at only low levels in normal pancreata but induced in the initial phases of pancreatitis [37], as part of the selfdefense mechanism against proapoptotic insults [38].

Hence, *Hnf1b* loss of function promotes ADM, loss of acinar cells and lipomatosis in the pancreas. Moreover, the upregulation of Yap, Notch and TGF $\beta$  signalling pathways observed in *Hnf1b* mutant pancreata supports the development of pancreatitis.



### ***Ductal deletion of Hnf1b leads to chronic pancreatitis***

We further investigated the progression in adults of the pancreatic exocrine disorders associated with *Hnf1b*-deficiency. We still observed a dramatic decrease (43%) in pancreas weight at 2 months in mutants, whereas mouse weight was unchanged compared to controls (Fig. 6A). At 5 months, mouse weight was significantly decreased in mutants as a consequence of pancreatic exocrine deficiency (data not shown). The decreased pancreatic weight was correlated with a dramatic loss of acinar tissue observed by histology of pancreatic sections (Fig. 6B, C), and a dramatic decrease in acinar marker expression (around 95%, data not shown). Many lobes of *Hnf1b*-mutant pancreata were entirely devoid of acinar tissue and merely consisted of isolated ducts embedded within a large mass of fat, with infiltration of adipocytes. ADM features were clearly observed in mutants with very few acini displaying enlarged lumen scattered in the tissue (Fig. 6E) and duct-like structures characteristic of ADM (Fig. 6F). Moreover, Sox9/Amylase co-localisation revealed a strong Sox9 ectopic localisation in acinar cells demonstrating ADM (Fig. 6G-H'). We found that *Hnf1b*-deficiency leads to inflammation (Fig. 6I) and lipomatosis (Fig. 6J). F4/80 immunostaining revealed immune infiltrates consisting of macrophages in mutants (Fig. 6K, L), and correlated with a dramatic increase (7.8-fold) in *F4/80* expression measured by RTq-PCR (Fig. 6M). Extended area of adipocytes were observed in mutants with *Fabp4* immunostaining (Fig. 6N, O) and *PPAR $\gamma$*  expression, a key player in adipocyte differentiation [39], was dramatically increased (16.6-fold) (Fig. 6P). The pancreatic parenchyma of mutant was replaced by fibrosis as shown by Trichrome staining (Fig. 6Q, R). Pancreatic stellate cells (PSCs) are responsible for the development of fibrosis upon activation and TGF- $\beta$ 1 has a central importance in the activation of PSC and in driving pancreatic fibrogenesis [40]. We found a dramatic increase in *TGF- $\beta$ 1* expression (12.8-fold) in mutants compared to controls, with a ~4-fold increase in mutants compared to P25. We also observed a dramatic increase in

the expression of the desmoplasia-associated marker *Coll1A1* in mutants (10.2-fold) (Fig. 6S). We analysed the expression of Vimentin, a mesenchymal marker, expressed in both activated and quiescent PSCs. We found a strong increase in the presence of Vimentin protein in mutants (Fig. 6 T, U) correlated with a dramatic increase in *Vimentin* expression (47.7-fold) (Fig. 6V). We used  $\alpha$ -SMA as a marker of PSC activation and found a 12.8-fold increase in  $\alpha$ -SMA expression in mutants (Fig. 6V), confirming fibrogenesis. We observed an up-regulation of the other mesenchymal marker N-cadherin (5.5-fold), whereas the epithelial marker E-cadherin was dramatically downregulated (87%), showing activation of epithelial-mesenchymal transition (EMT).

Thus, *Hnf1b* mutants show extensive pancreatic fibrosis, a pathologic feature of chronic pancreatitis, up-regulation of TGF- $\beta$ 1 and *Coll1a1*, associated with chronic pancreatitis [41–43], activation of PSCs that regulate the development of pancreatitis and activation of EMT, altogether demonstrating the pancreatitis phenotype of *Hnf1b* adult mutants.

### ***Ductal deletion of Hnf1b leads to pancreatic neoplasia***

In the setting of chronic pancreatitis, activated signalling pathways play a role in ADM and in early PanIN lesions, the most common precursor of pancreatic cancer. ADM is critical in neoplastic transformation. Acinar cells can undergo the reprogramming process ADM to form PanIN [44–48]. Chronic pancreatitis has been shown to predispose to the development of pancreatic cancer [9]. Fibrosis, the major pathologic component of pancreatitis, provides the background milieu for the development of PanIN, and is a prominent pathological characteristic of pancreatic cancer [49]. We therefore investigated activation of critical signalling pathways in adult *Hnf1b* mutants and if these mutants develop PanIN lesions.

CTGF production is important for the desmoplastic stroma (proliferating fibroblasts, inflammatory cells, and excess collagen) present in pancreatic cancer [50]. Previous studies have shown a 4.5-fold increase in expression of *CTGF* in human chronic pancreatitis [51]. In total correlation, we found a 4.4-fold increase of *Ctgf* expression in adult *Hnf1b* mutants (Fig. 7A), and a strong ectopic CTGF staining in acinar cells in mutants compared to controls (Fig. 7B, C'). Moreover, we observed a strong CTGF staining in the epithelium of metaplastic ducts (Fig. 7D, D') and in PanIN (Fig. 7E, E') in *Hnf1b* mutants. *Cyr61* was recently reported to be expressed in PanIN and pancreatic cancer samples, *Cyr61* signalling being critical for EMT and promoting pancreatic carcinogenesis [52]. We found a 6.1-fold increase of *Cyr61* in *Hnf1b* mutants (Fig. 7A). *Lamc2* and *Birc5*, other markers of the Hippo/Yap pathway, were also up-regulated in adult *Hnf1b* mutants (Fig. 7A). Ectopic Notch activation is also an early event in pancreatic carcinogenesis [53]. It has been shown that Notch signalling promotes both initiation and progression of PanIN [44]. We found a strong up-regulation of Notch pathway, higher than at P25 especially for the receptor *Notch2* and the effector *Hey2*, in adult *Hnf1b* mutants (6.4-fold and 5.9-fold respectively, Fig. 7F). Aberrant activation of EGFR signalling is also an initial event in the process of carcinogenesis in the pancreas [25]. We found a strong up-regulation of EGFR in adult *Hnf1b* mutants (2.3-fold; Fig. 7G).

In correlation with these results, we performed an histological analysis and found neoplasia as low-grade PanINs in *Hnf1b* mutant pancreata (Fig. 7H). They were characterized by flat epithelial composed of tall columnar cells with basally located nuclei, a basally pseudostratified architecture and abundant supranuclear mucin. The nuclei were small and round to oval in shape. When oval the nuclei were oriented perpendicular to the basement membrane. These structures were Alcian Blue-reactive (Fig. 7I) and positive for the PanIN-specific marker *Claudin18* (Fig. J). Thus, loss of *Hnf1b* leads to pancreatic neoplasia.

We were also interested to determine if loss of *Hnf1b* in adults would sensitize acinar

cells to injury-induced reprogramming. Two weeks post-TM in adults, acute pancreatitis was induced by two consecutive days of treatment with the secretagogue cerulein, and pancreata were harvested 1 week later (D7) (Fig. 8A). We verified that *Hnf1b* inactivation was also efficient at this stage, with a 50 % decrease in *Hnf1b* expression observed in mutants (Fig. 8B). We followed *Amylase* expression by RTq-PCR at day 0 (D0), day 3 (D3) and D7 (Fig. 8C). No significant change was observed between controls and mutants at D0 and D3. Both in controls and mutants, *Amylase* expression was dramatically decreased at D3, showing the efficiency of the cerulein treatment. At D7, controls show a recovery of *Amylase* expression whereas *Amylase* expression in mutants decreased to dramatically low levels (99% decrease). Other acinar markers displayed the same pattern of expression with dramatically low levels of *CPA*, *Ptf1a*, *Mist1* and *Nr5a2* expression in mutants compared to controls at D7 (Fig. 8D). In correlation, histological analysis by hematoxylin & eosin as well as trichrome staining showed no abnormalities in controls and mutants at D0, but ADM and fibrotic stroma at D3 both in controls and mutants. Whereas control pancreata were recovered at D7, we observed persistent and strong defects in mutant pancreata characteristic of chronic pancreatitis at D7 (Fig. 8E). No large Amylase<sup>+</sup> acinar clusters were detected in mutant pancreata in contrast to controls, and co-localisation of Sox9 and Amylase was observed in almost all mutant acinar cells (Fig. 8F, G), showing widespread ADM at D7. Moreover, *Hnf1b* adult mutant mice subjected to cerulein induced pancreatitis exhibited the appearance of PanINs as shown by histology (Fig. 8 H, I), alcian-blue positive staining (Fig. 8J, K) and the PanIN-specific marker Claudin18 (Fig. 8L, M). Thus, *Hnf1b* is necessary for acinar cell regeneration and suppression of dysplasia following induced pancreatitis.

## **Discussion**

**Hnf1b, through regulation of *Pkhd1* and *Cys1*, is required for the maintenance of primary cilia in differentiated pancreatic ductal cells.**

In the present study, we investigated the role of Hnf1b in differentiated pancreatic ducts. The results show that *Hnf1b* inactivation leads to dramatic decrease in *Pkhd1* and *Cys1* expression. This is correlation with our finding that *Pkhd1* and *Cys1* are direct target of Hnf1b during pancreatic duct development at E12.5 in mice [12]. Importantly, we found that *Hnf1b* inactivation leads to loss of primary cilia in ductal cells, the microtubule-based organelles projecting from the surface of epithelial cells. *Pkhd1* and *Cys1* both play a role in the structural integrity of cilia. *Pkhd1* gene encodes Fibrocystin/Polyductin, a membrane protein localised to the primary cilium of tubular epithelial cells [54] and lack of Fibrocystin disrupted ciliogenesis in *Pkhd1*-deficient mice [55]. *Cys1* gene product, Cystin, also localises to the primary cilium and stabilizes microtubule assembly [15,56].

Primary cilia play a negative role in epithelial cell proliferation [57] by acting as chemo- or mechano-sensors [22]. In correlation with the loss of primary cilia, we found an increased proliferation of ductal cells in *Hnf1b* mutants. Moreover, this leads to duct dilatation and loss of polarity of epithelial ductal cells. Some *Hnf1b* mutant ducts were devoid of primary cilia, whereas they were not dilated, strongly suggesting that duct dilatation occurs secondary to the loss of primary cilia. Furthermore, Muc1 immunostaining was still observed in some part of dilated ducts. In correlation, we observed a decreased expression of Muc1 at P25 whereas it was unchanged at P8. This strongly suggests that loss of polarity is a consequence of duct dilatation. *Pkhd1* has been shown to be involved in the tubulogenesis and/or maintenance of duct-lumen architecture [54] and its decreased expression likely contributes to this phenotype. Likewise, dilated ducts were also reported in pancreata devoid

of the transcription factor Hnf6 [4,5]. We observed a decreased expression of *Hnf6* at P25 whereas it was unchanged at P8, showing that loss of Hnf6 contributes secondarily to the phenotype.

***Hnf1b*-inactivation in differentiated pancreatic ducts leads to chronic pancreatitis and neoplasia.**

We followed the progression of the pancreatitis and observed a decreased acinar cell proliferation coupled with an increased acinar cell apoptosis, ADM, activation of PSC and important fibrosis, inflammatory infiltration, lipomatosis. A connection between cilia defects and pancreatitis was suggested by the fact that lesions reminiscent of pancreatitis are found in approximately 10% of patients suffering from the dominant form of polycystic kidney disease [58], and the absence of pancreatic cilia during mouse embryogenesis in *Kif3a* mutants or *Tg737orpk* by results in lesions that resemble those found in patients with pancreatitis or cystic fibrosis [6,7,59]. However, the function of primary cilia in pancreatic post-natal tissue homeostasis was largely unknown. Recent molecular genetic studies have elucidated some molecular mechanisms underlying the pathogenesis of pancreatitis, which can be due to the presence of mutations of *PKHD1* gene [60], a target gene of Hnf1b we found dramatically downregulated. Moreover, we found a significant decrease in *Hnf6* expression at P25 in *Hnf1b* mutants, and pancreatitis was observed in *Hnf6* mutant animals [5], associated with the finding of shorter primary cilia of ductal cells [61]. *Prox1* was also significantly downregulated and it was previously shown that *Prox1* inactivation results in dilated pancreatic ducts and acinar-to-ductal metaplasia. *Prox1* mutant adult pancreata uncovered numerous features indicative of chronic tissue damage: acinar apoptosis, macrophage infiltration, mild fibrosis, and extensive lipomatosis [21], suggesting that reduced *Prox1* expression could also contribute to the phenotype observed in mutants. Lineage tracing

analysis showed that adipocytes of these mutant pancreata did not originate from trans-differentiated pancreatic acinar cells [21], suggesting that it may be the case also for *Hnf1b* mutants. We show here that the loss of primary cilia of ductal cells due to *Hnf1b* inactivation leads to chronic pancreatitis. Our results are also of particular interest since genes we found deregulated in *Hnf1b* mutant pancreata are also link to pancreatic neoplasia. *PKHDI* and *CYSI* mRNA levels were found significantly lower in PDAC tissues than in normal pancreatic tissues [62]. *Hnf6* loss contributed to the progression of PanIN lesions. Gene expression analyses of human pancreatic cancer revealed decreased expression of *HNF6* [63]. Loss of *Prox1* was also observed in human pancreatic cancer. *Prox1*-heterozygosis markedly increased the formation of early neoplasias [64].

**Loss of *Hnf1b* promotes chronic pancreatitis and pancreatic neoplasia via sequential activation of key signalling pathways.**

Primary cilia play critical roles in transducing extracellular signals to a cellular response that regulates proliferation, differentiation, transcription, migration, polarity and tissue morphology [23]. Because cilia have the ability to physically influence the cell cycle and manipulate signaling cascades, it has been proposed that defective cilia biogenesis could be an important step in cancer development. Loss of primary cilia is frequently observed in tumor cells, including PDAC cells, suggesting that the absence of this organelle may promote tumorigenesis through aberrant signal transduction. Ciliogenesis was found suppressed in pancreatic cancer cells and PanIN lesions [65]. We then deciphered the pathways deregulated and leading to chronic pancreatitis and neoplasia in *Hnf1b* mutants. We followed how this progressive, destructive, and inflammatory process leads to irreversible obliteration of the exocrine tissue, to its replacement by fibrous tissue, and predisposes to the development of pancreatic cancer in *Hnf1b* mutants.

First, we found an upregulation of the YAP pathway. YAP was shown to promote cell proliferation [66–68] and we indeed found an increased proliferation of ductal cells in *Hnflb* mutants. But we also found an ectopic activation of the YAP pathway in acinar cells. We found that YAP transcriptional targets were progressively overexpressed from P8 to the adult stage: CTGF and Lamc2 were upregulated as soon as P8, Cyr61 from P25 and Birc5 in adults. All of them were strongly upregulated in adults, ~4 to 10-fold. We found an increased CTGF expression in ducts and an ectopic expression of CTGF in acinar cells in *Hnflb* mutants. CTGF is involved in cell adhesion, cell migration, inflammation, tumor growth and tumor metastasis [69] and pancreatic fibrosis [70]. CTGF is indeed overexpressed in human pancreatic cancer [70,71]. Thus, fibrosis is likely caused by increased *CTGF* expression and this fibrotic microenvironment promotes PanIN in *Hnflb* mutant pancreata. Moreover, LAMC2 was recently identified as a new putative pancreatic cancer biomarker [72].

EGFR is also strongly involved in ADM induction and formation of neoplastic lesion in *Hnflb* mutants. as we found an upregulation of EGFR from P8, with more than a 2-fold upregulation in *Hnflb* adult mutants. An essential role of EGFR activation was indeed shown to promote ADM, metaplastic areas and PanIN [25,27,28,73].

From P25, ADM and metaplastic lesions are also induced by upregulation of Notch signalling in *Hnflb* mutants, ~2-fold at P25 and 6-fold in adults. Notch indeed regulates ADM and promotes both initiation and progression of PanIN [31,33,44,53,74]. From P25, fibrosis and activation of PSCs are then also promoted by upregulation of the pro-tumorigenic/fibrotic growth factor TGF- $\alpha$ 1 in *Hnflb* mutants, ~4-fold at P25 and 13-fold in adults. TGF- $\beta$  signalling is indeed pivotal in driving pancreatic fibrogenesis, for activation of PSC that regulate the development of chronic pancreatitis, and for PanIN formation [50,75,76].



**These findings give a better understanding of the etiology and the physiopathology of the human diseases «maturity onset diabetes of the young type 5» (MODY5), chronic pancreatitis and PDAC.**

*HNF1B* heretozygous mutations are notably associated with diabetes mellitus, pancreas exocrine dysfunction (pancreatitis with reduced fecal elastase concentration in 93% of these cases, fecal fat excretion) and pancreas structural anomalies (atrophy, cysts, calcification) [77]. Pancreatitis was surprising as *Hnf1b* is not expressed in acinar cells and it was proposed that this defect may be caused by dorsal pancreas agenesis. The results of the present study show that pancreatitis associated with *Hnf1b* deficiency is caused by pancreatic duct alteration. Moreover, differences observed from one patient to another could be due to impaired recovery of the pancreas in adults after injury as our results also show that *Hnf1b* deficiency sensitizes acinar cells to injury-induced reprogramming.

Studies have shown that downregulation of *HNF1B* is associated with cancer risk, including renal, prostate, ovarian and colorectal cancers, showing that HNF1B is a marker of these cancers and a potential tumor suppressor [78–85]. Pancreatic cancer is poorly characterized at genetic and non-genetic levels. Recent analyses suggested that reduced HNF1B activity may be also an important step in pancreatic tumorigenesis. Mutations in *HNF1B* have been identified as markers of pancreatic cancer risk loci through GWAS or pathway based GWAS analyses [86,87]. In PDAC tissues and pancreatic cancer cell lines, *HNF1B* was down-regulated compared to normal pancreatic tissues and this loss of expression contributed to disease aggressiveness [62,88]. Very recently, a regulatory network analysis predicted that *HNF1B* is among thousand transcription factors the top enriched master regulator of the genes expressed in the normal pancreatic tissue compared to the PDAC regulatory network [89]. Since *HNF1B* is highly expressed in normal pancreatic ductal cells and loses its expression at that level in PDAC, HNF1B could represent a key player in

PDAC carcinogenesis and progression. The present study is the first to demonstrate that loss of Hnf1b activity can induce pancreatitis and cellular changes associated with pancreatic neoplasia. We show here by which mechanisms *Hnf1b* dysfunction can lead to pancreatic neoplasia and tumorigenesis. Hnf1b appears to act as a pancreatic tumor suppressor that is important for functioning, regeneration and maintenance of the epithelial state. Insight on the role of Hnf1b in pancreatic cancer development may lead to its use as a good biomarker for early detection and prognosis. HNF1B may involve novel therapeutic targets to improve the survival of patients with PDAC. Functional restoration may provide a novel approach to inhibiting tumor growth. It may also be necessary to restore ciliogenesis by pharmacologic means in order to improve the effectiveness of other therapeutic options. Thus, these new insights offer potential novel therapeutic strategies.

### **Acknowledgements**

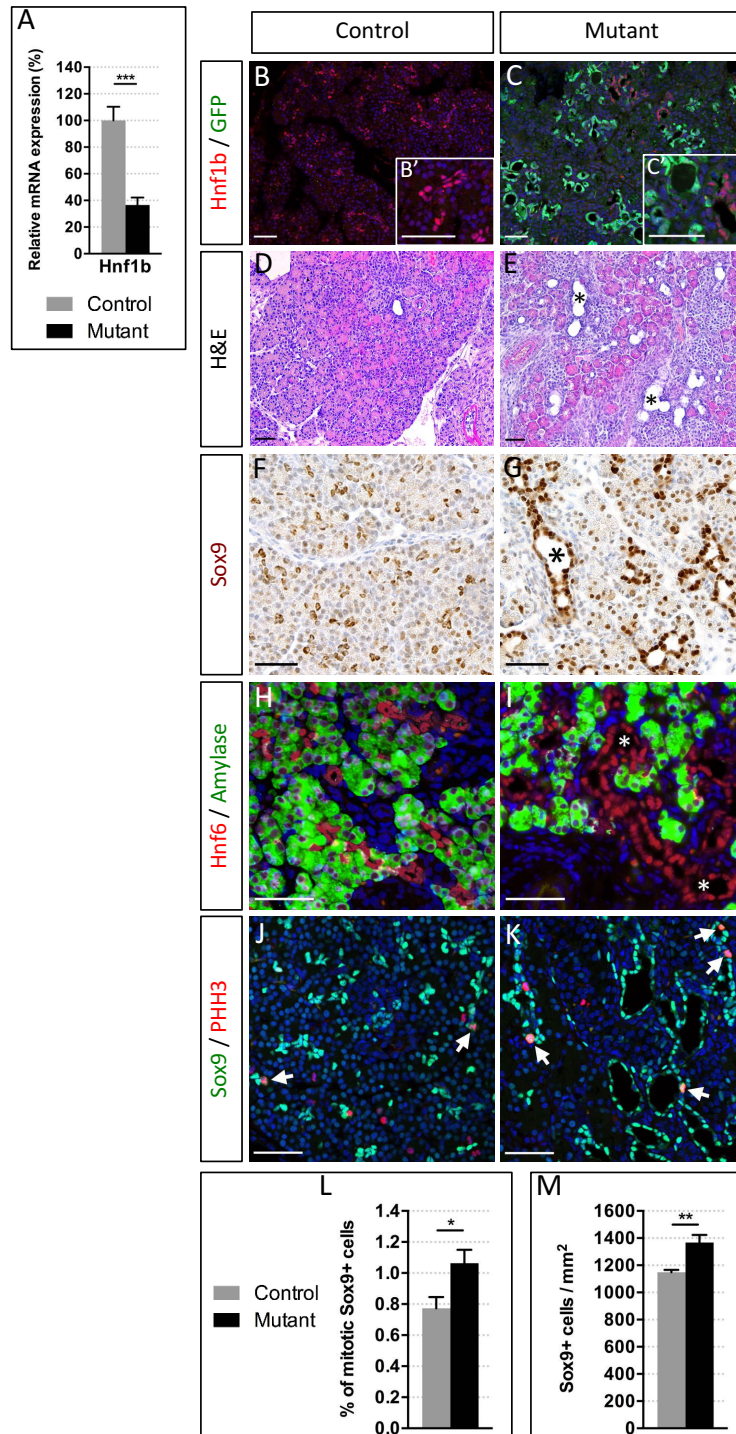
We thank mouse facilities of the UMR722-IBPS for animal care ; P. Jacquemin and F. Lemaigre (De Duve Institute, Belgium) for Hnf6 antibody.

### **Funding**

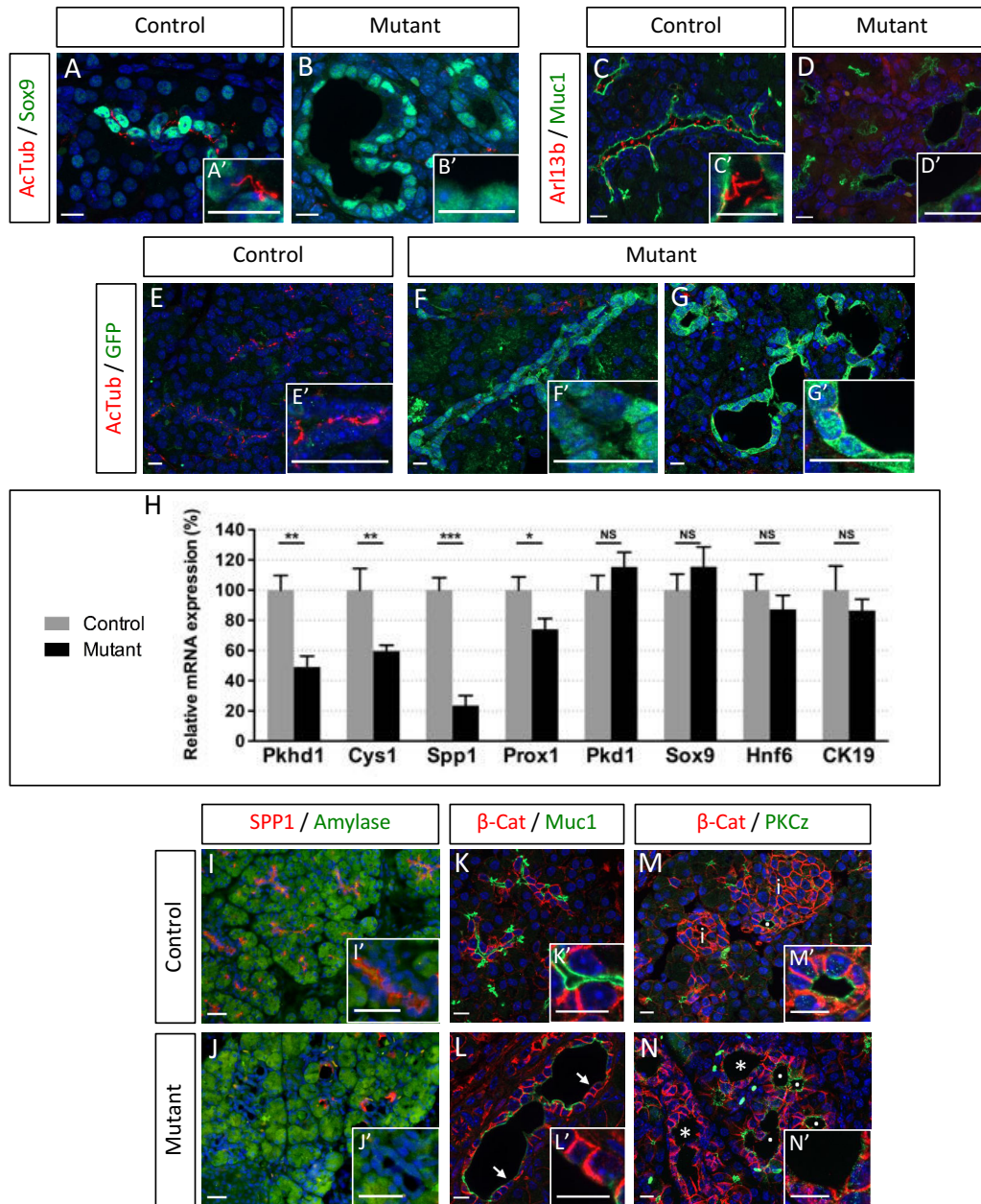
Support was received from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Universite Pierre et Marie Curie (UPMC), the GEFLUC (Les entreprises contre le Cancer), the Societe Francophone du Diabete (SFD)-Ypsomed, the programme Emergence UPMC. EQ is supported by a PhD fellowship from the French Ministère de la Recherche et de la

Technologie. MF is an assistant engineer of the CNRS. MDV was supported by a PhD student fellowship from the European Marie Curie Initial Training Network (ITN)-Biology of Liver and Pancreatic Development and Disease (BOLD). CH is a principal investigator of the Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM).

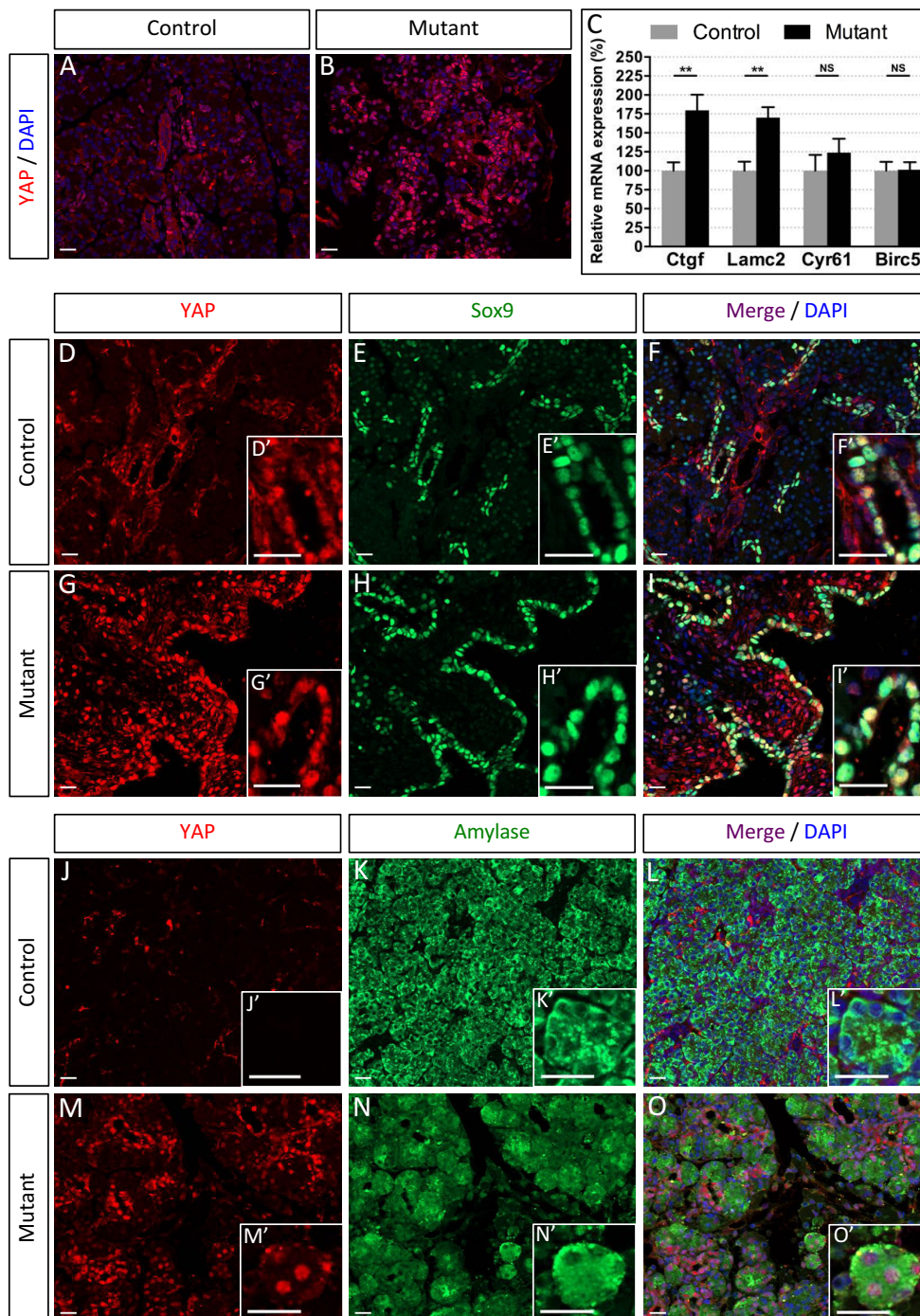
## Figures



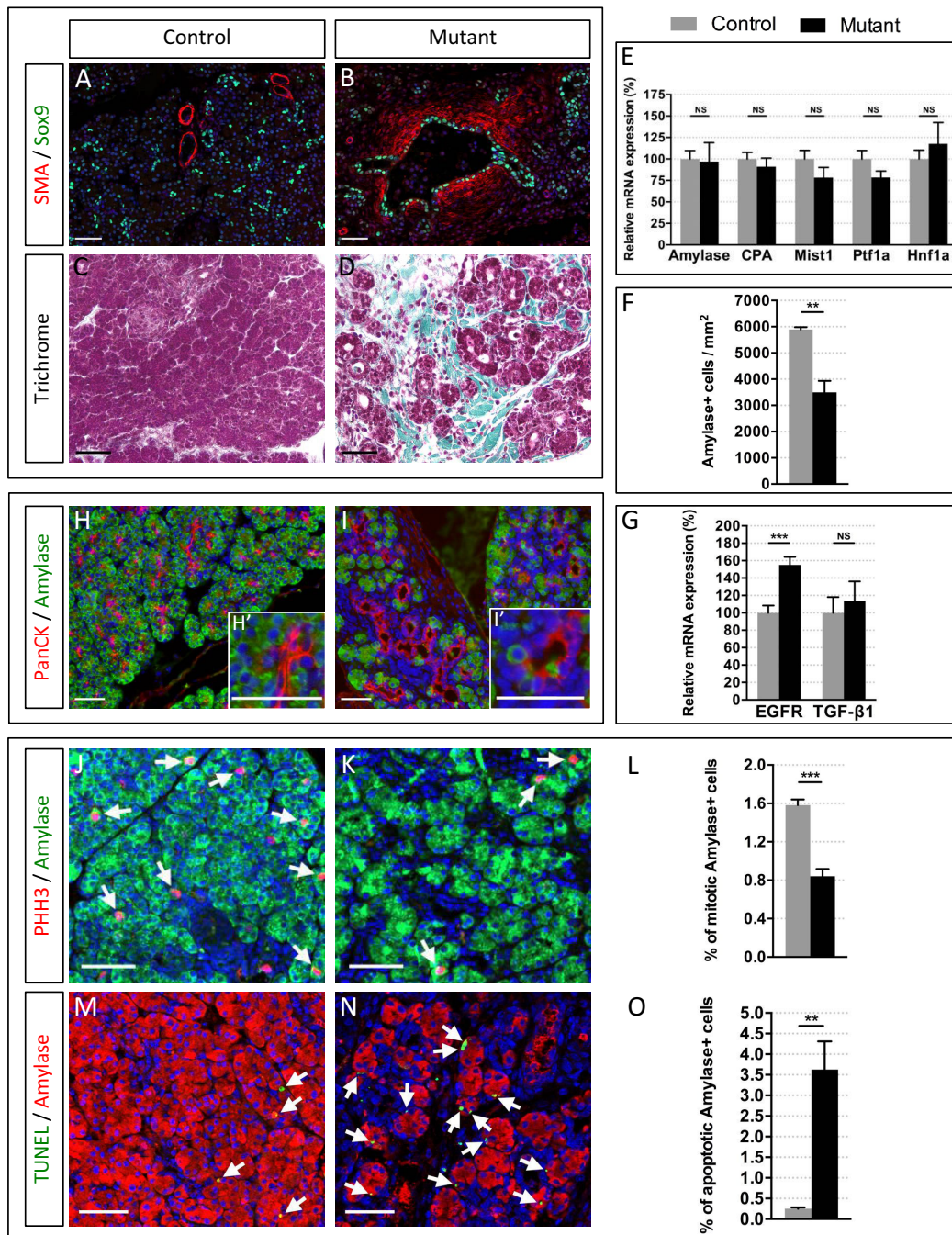
**Fig.1. *Hnf1b* inactivation in ductal cells leads to duct dilatation and increased ductal cell proliferation at P8.** (A) Analysis of *Hnf1b* inactivation efficiency by qRT-PCR of wild-type *Hnf1b* transcripts in P8 control and Sox9-Cre<sup>ERT2</sup>;*Hnf1b*<sup>fl/fl</sup> mutant pancreata (control, n=7; mutant, n=7). *Hnf1b* was inactivated in ducts in Sox9-Cre<sup>ERT2</sup>;*Hnf1b*<sup>fl/fl</sup> mice with TM injection at postnatal days P1, P2 and P3. (B, C) Analysis of *Hnf1b* inactivation efficiency in Sox9-Cre<sup>ERT2</sup>;*Hnf1b*<sup>fl/fl</sup>;*R26R*<sup>+/YFP</sup> mutant pancreata at P8 by Hnf1b (red) and GFP (green) co-immunostaining. Hnf1b+ (red) ductal cells are observed in controls. Recombination is shown by the GFP+ signal (green) in Sox9-Cre<sup>ERT2</sup>;*Hnf1b*<sup>fl/fl</sup>;*R26R*<sup>+/YFP</sup> mutant pancreata. Only a few Hnf1b+ cells are observed in the mutant, which are GFP-. (D, E) Hematoxylin and Eosin (H&E) staining of control and mutant pancreata. (F, G) Sox9 (brown) immunohistochemistry. (H, I) Hnf6 (red) and Amylase (green) immunostaining. (J, K) Phospho-histone H3 (PHH3, red) and Sox9 (green) immunostaining. (L, M) Quantification of ductal Sox9+ cell proliferation and quantification of the number Sox9+ cells per area (control, n=4; mutant, n=4). Nuclei are stained with DAPI (blue). Asterisks indicate dilated ducts. Arrows indicate mitotic Sox9+ cells. \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001. Scale bars: 50  $\mu$ m.



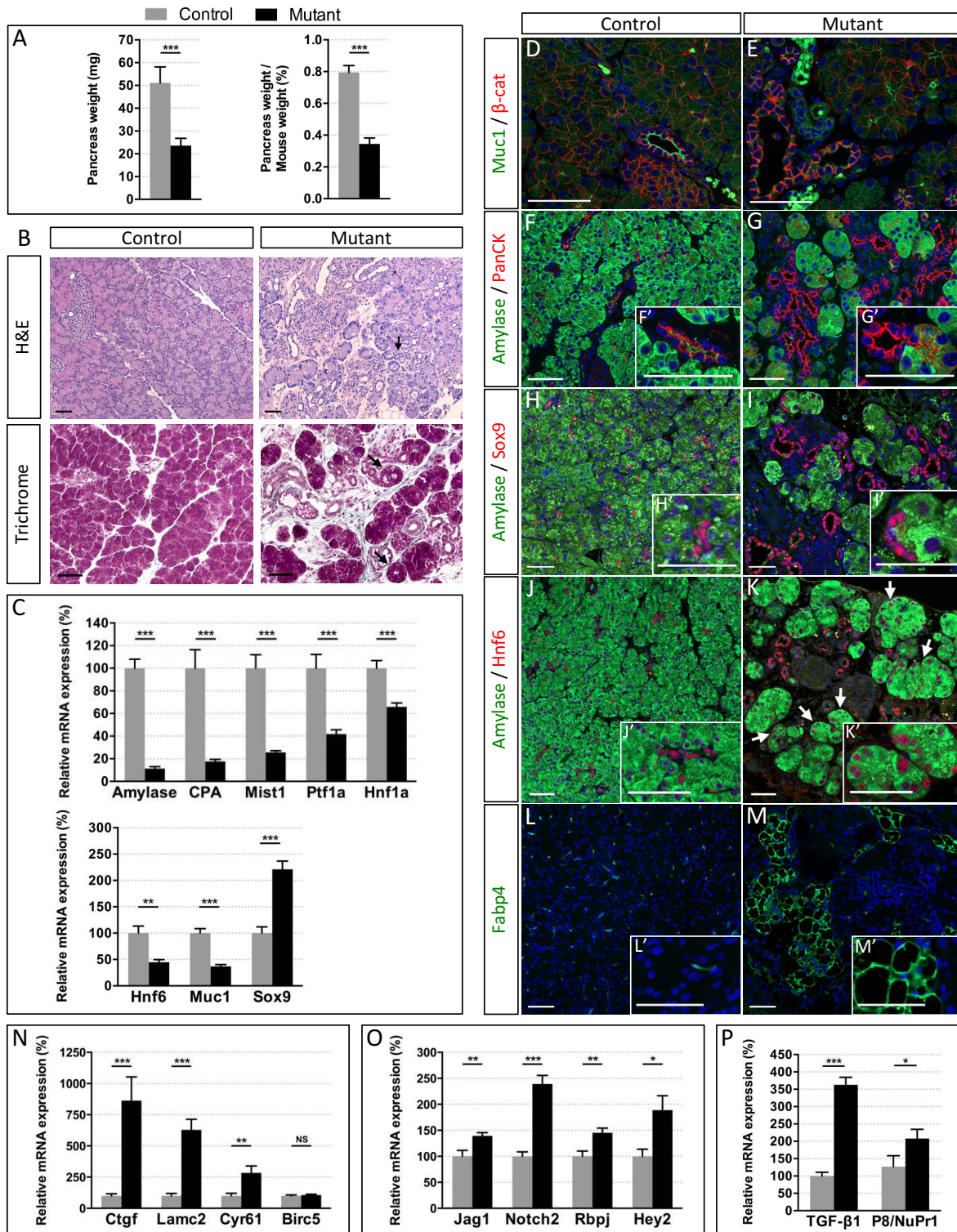
**Fig. 2. Ductal deletion of *Hnf1b* induces loss of primary cilia and subsequent loss of ductal polarity.** (A, B) Sox9 (green) and acetylated  $\alpha$ -Tubulin (Ac-Tub, red) immunostaining. (C, D) Muc1 (green) and Arl13b (red) immunostaining. Mutant ductal epithelial cells stained with Sox9 and Muc1 are devoid of primary cilia stained for Ac-Tub (B') and Arl13b (D'). (E, F, G) GFP and Ac-Tub immunostaining showing primary cilia loss in recombinant ductal cells from dilated (G') and non dilated (F') ducts. Loss of primary cilia are observed even in non dilated mutant ducts (F'). (H) qRT-PCR of ductal and cystic disease genes (control, n=7; mutant, n=7). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . (I-J') Spp1 (red) and Amylase (green) immunostaining. Loss of the apical ductal cell marker Spp1 is observed in mutant pancreata (J'). (K, L) Mucin1 (Muc1, green) and  $\beta$ -catenin ( $\beta$ -Cat, red) immunostaining. (M, N) PKCz (green) and  $\beta$ -Cat (red) immunostaining. Absence or disruption of Muc1 and PKCz apical stainings show the loss of polarity in some parts of mutant dilated ducts (L', N'). Arrows show disruption of Muc1 staining (L). Asterisks show dilated ducts with loss of PKCz apical staining (N). Nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bars: (A-G', K-N') 10  $\mu$ m; (I, J') 30  $\mu$ m.



**Fig. 3. Lack of Hnf1b leads to upregulation of the YAP pathway.** (A, B) Nuclear YAP (red) immunostaining marks ductal cells in controls (A) and more YAP+ nuclei are observed in mutants (B). (C) RT-qPCR analysis of the YAP transcriptional targets *Ctgf*, *Lamc2*, *Cyr61* and *Birc5*. (D-I) YAP (red) and Sox9 (green) immunostaining. Merged images show YAP/Sox9 colocalisation in ductal cells in control (F) and mutant (I) pancreata. (J-O) YAP (red) and Amylase (green) immunostaining. No YAP/Amylase colocalisation is present in controls (L, L'), whereas Amylase+ cells show YAP+ nuclear staining in mutants (O, O'). Nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bars: 20  $\mu$ m.

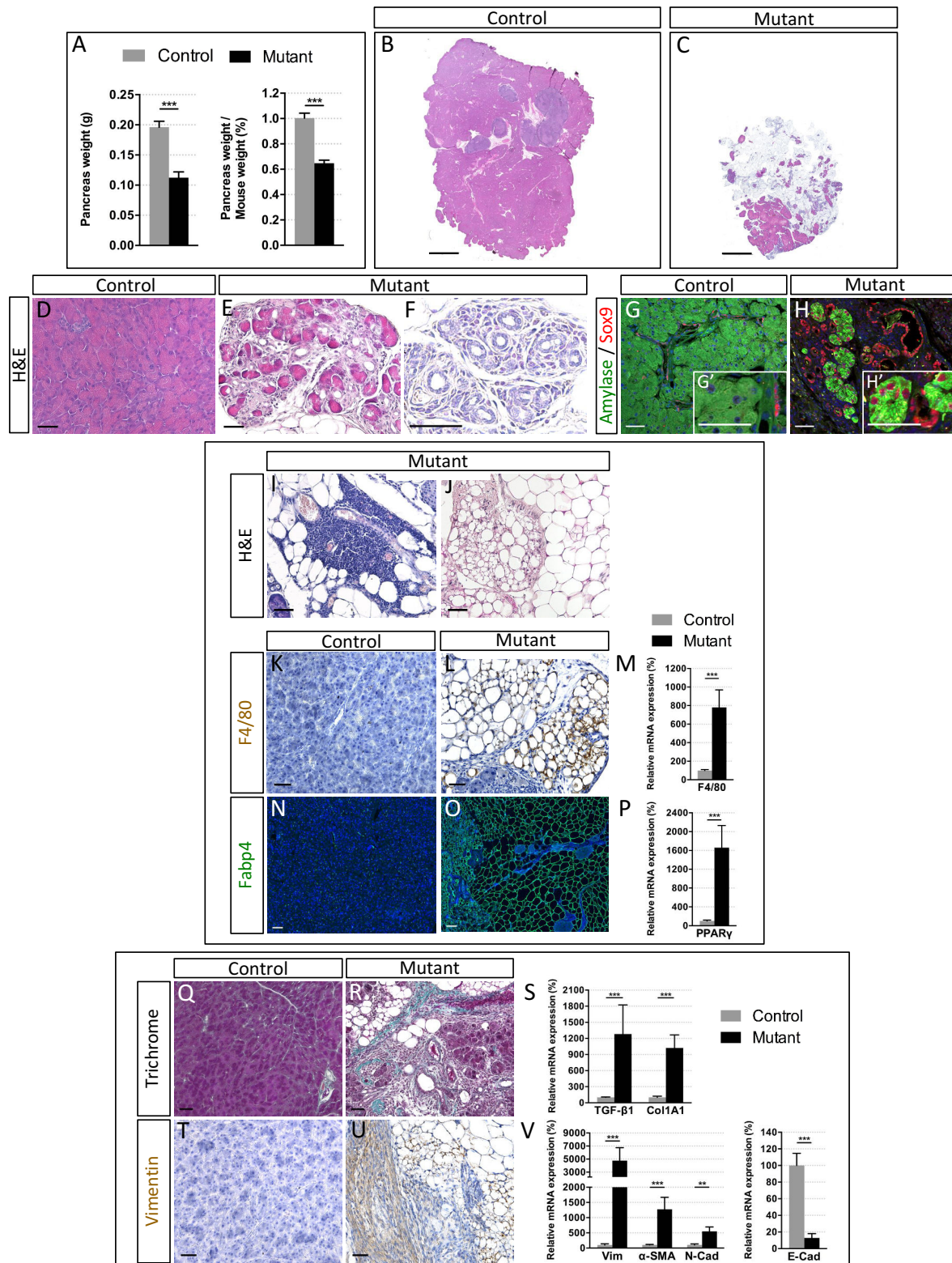


**Fig. 4. Ductal deletion of *Hnf1b* induces pancreatic fibrosis and loss of acinar cells by P8.** (A, B) Sox9 (green) and  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA, red) immunostaining. In control pancreata, SMA staining is perivascular (A), whereas periductal and periacinar staining is observed in mutants (B). (C, D) Masson's trichrome staining show collagen deposition in green in mutants. (E) qRT-PCR analysis of acinar markers (control, n=7; mutant, n=7). (F) Number of Amylase<sup>+</sup> cells per area in control and mutant pancreata (control, n=4; mutant, n=4). (G) qRT-PCR of *EGFR* and *TGF- $\beta$ 1* (control, n=7; mutant, n=7). (H, I) Amylase (green) and pan-Cytokeratin (PanCK, red) immunostaining. (J, K) Phospho-histone H3 (PHH3, red) and Amylase (green) immunostaining. Arrows indicate mitotic Amylase<sup>+</sup> cells. (L) Quantification of acinar cell proliferation (Amylase<sup>+</sup> PHH3<sup>+</sup>/Amylase<sup>+</sup> cells) (control, n=4; mutant, n=3). (M, N) TUNEL assay (green) and Amylase (red) immunostaining. Arrows indicate apoptotic Amylase<sup>+</sup> cells. Nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bars: x  $\mu$ m. (O) Quantification of acinar cell apoptosis (control, n=4; mutant, n=4). \*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001. Scale bars: 50  $\mu$ m.

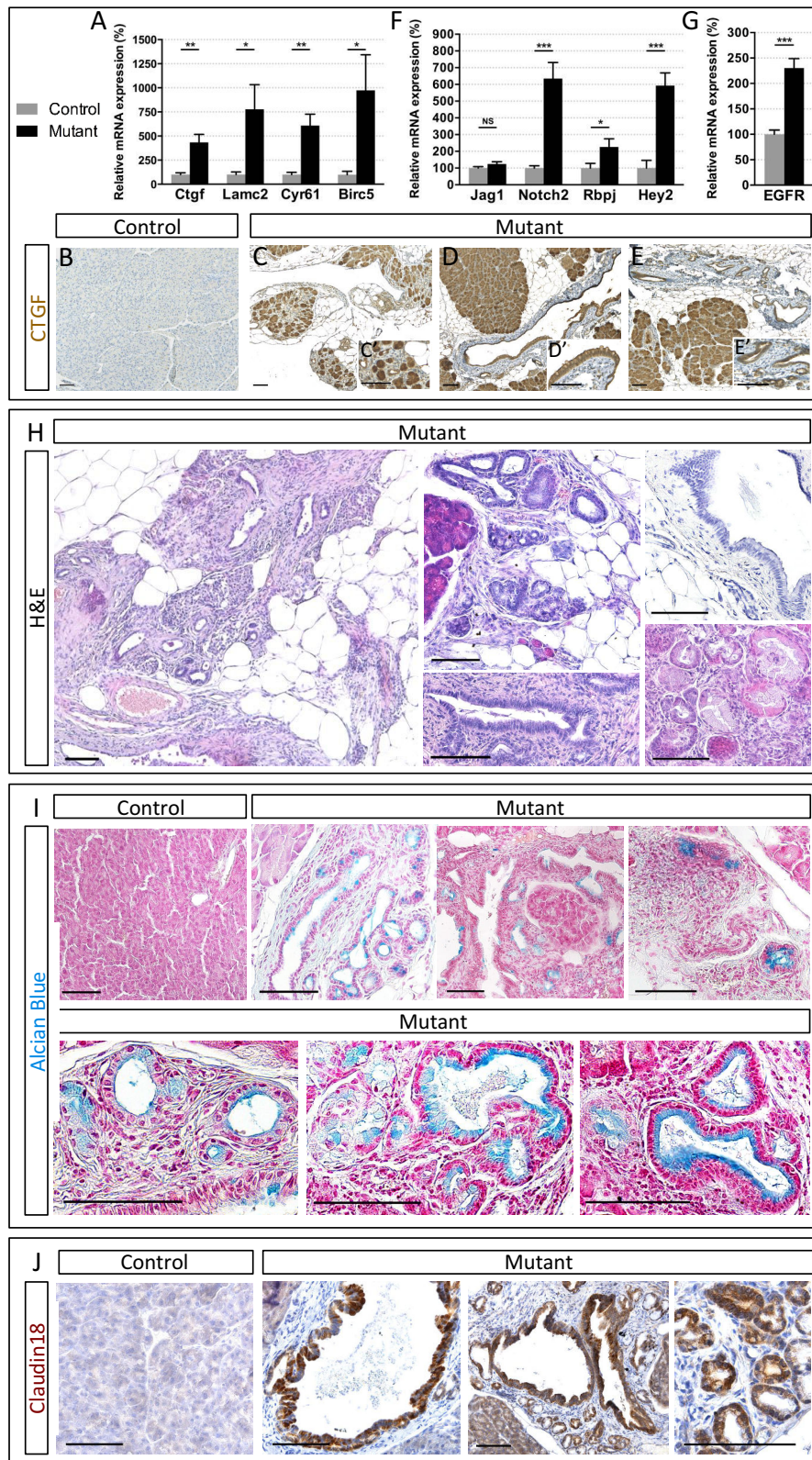


**Fig. 5. *Hnf1b* inactivation in ductal cells leads to acinar-to-ductal metaplasia (ADM) and lipomatosis at P25.** (A) Pancreas weight and relative pancreas weight/body weight of 3-weeks old mice (control, n=10; mutant, n=9). (B) H&E and Masson's trichrome stainings. Arrows show acini with increased lumen size in mutant pancreata, feature of ADM. (C) RT-qPCR of acinar markers and *Hnf6*, *Muc1*, *Sox9* genes (control, n=7; mutant, n=8). (D, E) Muc1 (green) and  $\beta$ -Cat (red) immunostaining. Muc1 staining is lost at the apical surface of epithelial ductal cells revealing polarity loss in mutants. (F, G) Amylase (green) and PanCK (red) immunostaining. (F', G') Increased PanCK localisation in acinar cells of mutant pancreata. (H, I) Amylase (green) and Sox9 (red) immunostaining. (J, K) Amylase (green) and Hnf6 (red) immunostaining. Arrows show Amylase+ cells with a nuclear Hnf6+ staining characteristic of ADM in mutant pancreata (K'). (L, M) Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4) immunostaining shows adipocytes in mutant pancreata (M'). Nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bars: 50  $\mu$ m. (N) RT-qPCR of the YAP transcriptional targets *Ctgf*, *Lamc2*, *Cyr61* and *Birc5* (control, n=7; mutant, n=8). (O) RT-qPCR of the components of Notch signalling *Jag1*, *Notch2*, *Rbpj* and *Hey2* (control, n=7; mutant, n=8). (P) RT-qPCR of *TGF- $\beta$ 1* and *P8/NuPr1* (control, n=7; mutant, n=8). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

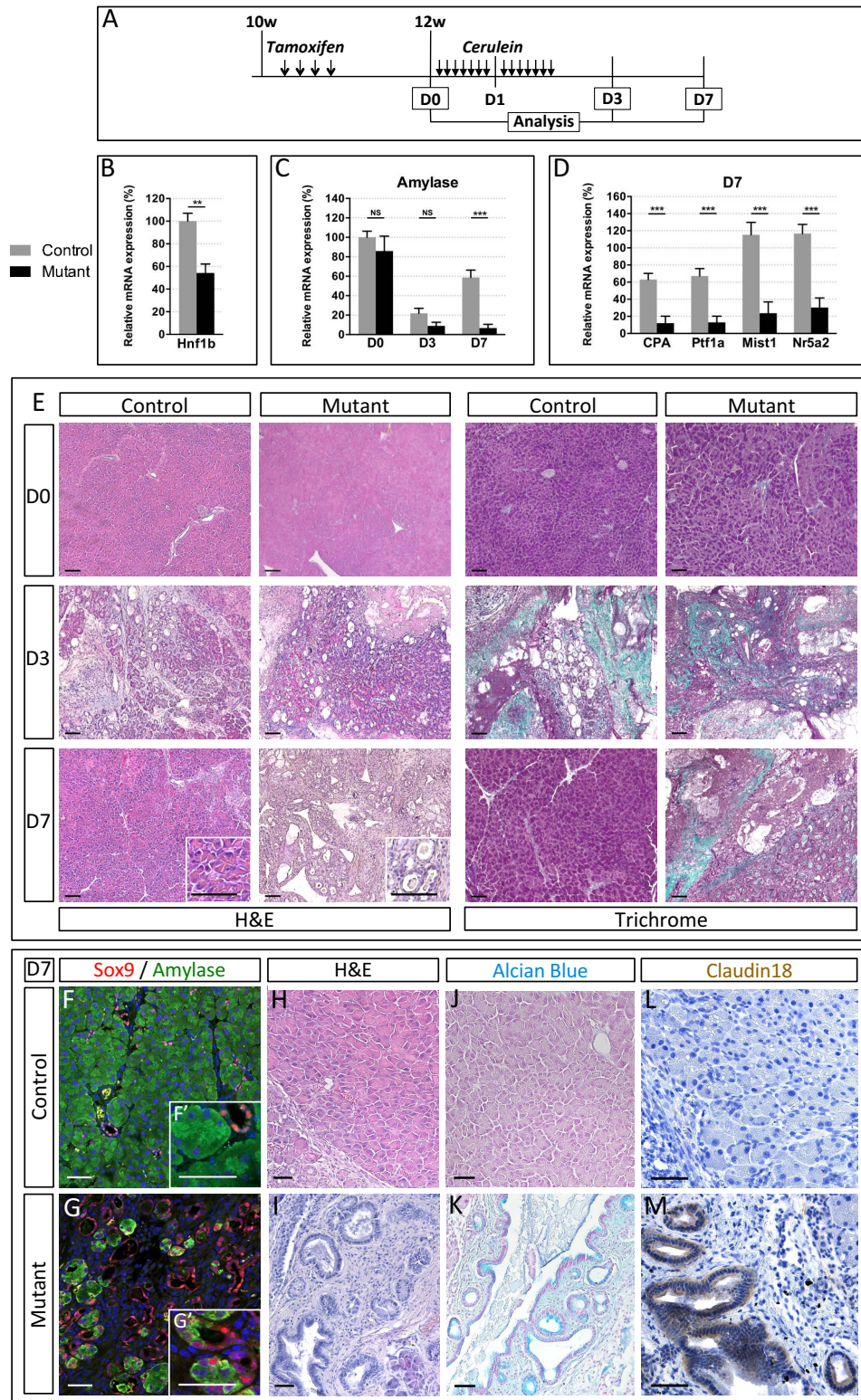




**Fig. 6. Lack of Hnf1b leads to chronic pancreatitis at 2 months.** (A) Pancreas weight and relative pancreas weight/body weight of 2-months old mice (control, n=17; mutant, n=11). (B-F) H&E staining of control and mutant pancreatic sections. Mutant pancreata display dramatic loss of acinar tissue (C) and ADM (E, F). (G, H) Amylase (green) and Sox9 (red) immunostaining. Nuclear Hnf6+ staining in Amylase+ cells is characteristic of ADM in mutant pancreata (H'). (I, J) H&E staining of mutant pancreas shows lymphocyte infiltration (I) and lipomatosis (J). (K, L) Macrophage marker F4/80 (brown) immunostaining. (M) RT-qPCR of F4/80 (control, n=9; mutant, n=5). (N, O) Adipocyte marker Fabp4 (green) immunostaining. (P) qRT-PCR of PPARγ (control, n=9; mutant, n=5). Nuclei are stained with DAPI (blue). (Q, R) Masson's trichrome staining. (S) RT-qPCR of TGF-β1 and Col1A1 (control, n=9; mutant, n=5). (T, U) Vimentin (brown) immunostaining. (V) RT-qPCR of SMA, Vimentin (Vim), N-Cad and E-Cad (control, n=9; mutant, n=5). Scale bars: (B, C) 2 mm; (D-L, Q-U) 50 μm; (N, O) 100 μm. \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.



**Fig. 7. *Hnf1b* inactivation in ductal cells leads to low-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) by 2 months.** (A) RT-qPCR analysis of the YAP transcriptional targets *Ctgf*, *Lamc2*, *Cyr61* and *Birc5* (control, n≥6; mutant, n=5). (B, E') CTGF (brown) immunostaining. A strong ectopic CTGF staining is observed in acinar cells in mutants (C, C') in the epithelium of metaplastic ducts (D, D') and in PanIN (E, E'). (F) RT-qPCR of the components of Notch signalling *Jag1*, *Notch2*, *Rbpj* and *Hey2* (control, n≥5; mutant, n≥5). (G) RT-qPCR of *EGFR* (control, n=4; mutant, n=5). (H) H&E staining of mutant pancreatic sections showing epithelial structures composed of columnar cells with abundant supranuclear cytoplasm and basally located nuclei. (I) Alcian blue staining. Columnar mutant epithelial cells revealed blue stained supranuclear mucin. (J) PanIN marker Claudin18 (brown) immunostaining. Scale bars: 100 μm. \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.



**Fig. 8. Lack of *Hnf1b* in adults leads to impaired acinar regeneration and to neoplasia following cerulein-induced pancreatitis.** (A) Experimental design. 10-week old *Sox9-Cre<sup>ERT2</sup>;Hnf1b<sup>fl/fl</sup>* and control mice were injected with tamoxifen by one daily intraperitoneal injection (i.p.) for 4 consecutive days. At 12 weeks, cerulein was administered by i.p. injections hourly, seven times a day for two consecutive days. Pancreata were harvested just before cerulein treatment (D0), 3 days (D3) and 7 days (D7) after the first cerulein injection. (B) Analysis of *Hnf1b* inactivation efficiency by RT-qPCR in adults (control, n=9; mutant, n=5). (C) RT-qPCR of *Amylase* at D0, D3 and D7 (control, n=9; mutant, 4≤n≤6). (D) RT-qPCR of the acinar markers *CPA*, *Ptf1a*, *Mist1* and *Nr5a2* at D7 (control, n=9; mutant, n=6). (E) H&E and Masson's trichrome stainings at D0, D3 and D7. (F, G) Amylase (green) and Sox9 (red) immunostaining showing widespread ADM at D7 in mutants. (H-I) H&E staining, (J, K) Alcian blue staining, (L, M) Claudin18 (brown) immunostaining, showing PanIN in mutants. Scale bars: (E) 50  $\mu$ m; (F-M) 100  $\mu$ m. \*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001.

<b>Antigen</b>	<b>Host</b>	<b>Dilution</b>	<b>Reference</b>
Amylase	Goat	1/50	Santa Cruz; sc-12821
$\alpha$ -Smooth Muscle Actin	Mouse	1/50	Sigma; C6198
Acetylated $\alpha$ -Tubulin	Mouse	1/300	Sigma; T6793
Arl13b	Mouse	1/100	Antibodies Incorporated; 75-287
$\beta$ -Catenin	Mouse	1/100	BD Biosciences; 610153
Claudin-18	Rabbit	1/250	ThermoFisher Scientific; 700178
F4/80	Rat	1/500	BioLegend; 123102
Fabp4	Rabbit	1/200	Abcam; ab13979
GFP	Chicken	1/400	Aves Labs; GFP-1020
Hnf1b	Rabbit	1/50	Santa Cruz; sc-22840
Hnf6	Guinea pig	1/500	From Frederic Lemaigre's lab
Muc1	Hamster	1/100	ThermoFisher Scientific; HM-1630-PO
Pan-CK	Mouse	1/100	Sigma; C1801
Phospho-Histone H3	Mouse	1/300	Cell Signaling; 9706
PKCzeta	Rabbit	1/500	Santa Cruz; sc-216
Sox9	Rabbit	1/100	Millipore; AB5535
SPP1 / Osteopontin	Goat	1/100	R&D Systems; AF808
Vimentin	Goat	1/100	Santa Cruz; sc-7557
YAP	Mouse	1/50	Santa Cruz; sc-101199

**Table 1. Primary antibodies.**

Name	Forward Sequence (5'-3')	Reverse Sequence (5'-3')
<i>Cyclophilin A</i>	CAGGTCTGGCATCTTGTC	TTGCTGGTCTTGCCATTCC
<i>Hnf1b</i>	GGCCTACGACCGGCAAAAGA	GGGAGACCCCTCGTTGCAAA
<i>Pkhd1</i>	TGCTCCTCAGGCAGCAATCG	ACCTGTACCCGTTGGGTGGCTT
<i>Cys1</i>	AGAGGAGCTCATGGCGAGCATT	GCCTGTGGCACAGATGCCAAGA
<i>Spp1</i>	CCCTCCCGGTGAAAGTGACTGA	GCACCAGCCATGTGGCTATAGG
<i>Prox1</i>	CGCAGAAGGACTCTCTTTGTC	GATTGGGTGATAGCCCTTCAT
<i>Pkd1</i>	GCTGCATGCCAGTTCTTTTG	TTTAAAGTGCAGAAGCCCA
<i>Sox9</i>	AAGCCGACTCCCCACATTCCTC	CGCCCTCTCGCTTCAGATCAA
<i>Hnf6</i>	CAAATCACCATCTCCAGCAG	CAGACTCCTCCTCCGGCATT
<i>Ck19</i>	ACCCTCCGAGATTACAACC	TCTGAAGTCATCTGCAGCCA
<i>CTGF</i>	GCCAACCGCAAGATCGGAGTGT	ACGGCCCATCCAGGCAA
<i>LAMC2</i>	ATTGGCTCCCAACCCAGCAGA	ACAGCTGCCATCACCTCGACA
<i>Cyr61</i>	TCTGTGAAGTGCCTCTTGT	CTGGTTCTGGGGATTTCCTG
<i>Birc5</i>	CTGATTTGGCCAGTGTTTT	CAGGGGAGTGCTTTCATATGC
<i>Amylase</i>	CTGGGTTGATATTGCCAAGG	TGCACCTTGTACCATTGTCT
<i>CPA</i>	CAACCCTGCTCAGAACTTACC	TGGACTTGACCTCCACTTCAGA
<i>Mist1</i>	TGGGCCTCCAGATCTCACCAA	CGTCACATGTGAGTTTCTCTGCT
<i>Ptf1a</i>	TTCTGAAGCACCTTTGACAGA	ACGGAGTTTCTGGACAGAGT
<i>Hnf1a</i>	GTGTAAGTGCACAGGAGGCAAA	TTCTCACGTGTCCAAGACCTA
<i>EGFR</i>	GCAGGGAGTGCCTGGAGAAATG	GTGTCTGGTCCCTGCCTGTA
<i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	AGAGGTCACCCGCGTCTAAT	GGGCACTGCTTCCCGAATGTC
<i>Muc1</i>	CTCTGGAAGACCCAGCTCCAA	CCACGGAGCCTGACCTGAACT
<i>Jag1</i>	TGCCCTCCAGGACATAGTGG	ACTCTCCCATGGTGATGCA
<i>Notch2</i>	CCTGCCAGGTTTGAAGGGA	GGGCACTCGTCGATATTCGG
<i>Rbpj</i>	GTTTTGGCGAGAGTTTGTGGAAGAT	TGGAGGCCGCTCACCAAACCT
<i>Hey2</i>	AGCGCCTTGTGAGGAAACGA	TGTAGCGTGCCAGGTAATG
<i>P8/Nupr1</i>	GAGAAGCTGCTGCCAATACC	GTGTGGTGTCTGTGGTCTGG
<i>F4/80</i>	CTTTGGCTATGGCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	GATGGAAGACCACTGCATT	AACCATTGGGTGAGCTCTTG
<i>Col1A1</i>	ACCTCAAGATGTGCCACTC	TGCTCTCTCAAACCAGAC
<i>Vimentin</i>	GGGAGAAATTGCAGGAGGAG	ATTCCACTTTGCGTTCAAGG
<i>SMA</i>	GACGCTGCTCCAGCTATGT	AGTTGGTGATGATGCCGTGT
<i>N-Cad</i>	GCTGACCACGCTCACTGCT	ATCTGCCATTACGGGGTCTA
<i>E-Cad</i>	GCAGTCCCGCTTCAGTTCC	GCCGGCCAGTGCATCCTT
<i>Nr5a2</i>	CTGCTGGACTACAG GTTTGC	CTGCCTGCTTGCTGATTGC

Table 2. Oligonucleotide sequences for qRT-PCR.

## References

1. Gittes GK. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev Biol.* 2009 Feb 1;326(1):4–35. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.10.024
2. Golson ML, Loomes KM, Oakey R, Kaestner KH. Ductal malformation and pancreatitis in mice caused by conditional *Jag1* deletion. *Gastroenterology.* 2009 May;136(5):1761–71.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.01.040
3. Yee NS, Lorent K, Pack M. Exocrine pancreas development in zebrafish. *Dev Biol.* 2005 Aug 1;284(1):84–101. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.04.035
4. Pierreux CE, Poll AV, Kemp CR, Clotman F, Maestro MA, Cordi S, et al. The transcription factor hepatocyte nuclear factor-6 controls the development of pancreatic ducts in the mouse. *Gastroenterology.* 2006 Feb;130(2):532–41. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.12.005
5. Zhang H, Ables ET, Pope CF, Washington MK, Hipkens S, Means AL, et al. Multiple, temporal-specific roles for HNF6 in pancreatic endocrine and ductal differentiation. *Mech Dev.* 2009 Dec;126(11-12):958–73. DOI: 10.1016/j.mod.2009.09.006
6. Cano DA, Sekine S, Hebrok M. Primary cilia deletion in pancreatic epithelial cells results in cyst formation and pancreatitis. *Gastroenterology.* 2006 Dec;131(6):1856–69. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.10.050
7. Zhang Q, Davenport JR, Croyle MJ, Haycraft CJ, Yoder BK. Disruption of IFT results in both exocrine and endocrine abnormalities in the pancreas of *Tg737(orpk)* mutant mice. *Lab Invest.* 2005 Jan;85(1):45–64. DOI: 10.1038/labinvest.3700207
8. Cano DA, Hebrok M, Zenker M. Pancreatic development and disease. *Gastroenterology.* 2007 Feb;132(2):745–62. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.12.054
9. Pinho AV, Chantrill L, Rooman I. Chronic pancreatitis: a path to pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2014 Apr 10;345(2):203–9. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.08.015
10. Maestro MA, Boj SF, Luco RF, Pierreux CE, Cabedo J, Servitja JM, et al. *Hnf6* and *Tcf2* (*MODY5*) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas. *Hum Mol Genet.* 2003 Dec 15;12(24):3307–14. DOI: 10.1093/hmg/ddg355
11. Solar M, Cardalda C, Houbracken I, Martín M, Maestro MA, De Medts N, et al. Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Dev Cell.* 2009 Dec;17(6):849–60. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.11.003
12. De Vas MG, Kopp JL, Heliot C, Sander M, Cereghini S, Haumaitre C. *Hnf1b* controls pancreas morphogenesis and the generation of *Ngn3+* endocrine progenitors. *Development.* 2015 Mar 1;142(5):871–82. DOI: 10.1242/dev.110759
13. Kopp JL, Dubois CL, Schaffer AE, Hao E, Shih HP, Seymour PA, et al. *Sox9+* ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas. *Development.* 2011 Feb;138(4):653–65. DOI: 10.1242/dev.056499
14. Haumaitre C, Barbacci E, Jenny M, Ott MO, Gradwohl G, Cereghini S. Lack of *TCF2/vHNF1* in mice leads to pancreas agenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Feb 1;102(5):1490–5. DOI: 10.1073/pnas.0405776102
15. Tao B, Bu S, Yang Z, Siroky B, Kappes JC, Kispert A, et al. Cystin localizes to primary cilia via membrane microdomains and a targeting motif. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Dec;20(12):2570–80. DOI: 10.1681/ASN.2009020188
16. Raynaud P, Tate J, Callens C, Cordi S, Vandersmissen P, Carpentier R, et al. A classification of ductal plate malformations based on distinct pathogenic mechanisms of biliary dysmorphogenesis. *Hepatology.* 2011 Jun;53(6):1959–66. DOI: 10.1002/hep.24292

17. Masyuk TV, Huang BQ, Ward CJ, Masyuk AI, Yuan D, Splinter PL, et al. Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat. *Gastroenterology*. 2003 Nov;125(5):1303–10. DOI: 10.1016/j.gastro.2003.09.001
18. Senkel S, Lucas B, Klein-Hitpass L, Ryffel GU. Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Dec 20;1731(3):179–90. DOI: 10.1016/j.bbaexp.2005.10.003
19. Kilic G, Wang J, Sosa-Pineda B. Osteopontin is a novel marker of pancreatic ductal tissues and of undifferentiated pancreatic precursors in mice. *Dev Dyn*. 2006 Jun;235(6):1659–67. DOI: 10.1002/dvdy.20729
20. Wang J, Kilic G, Aydin M, Burke Z, Oliver G, Sosa-Pineda B. Prox1 activity controls pancreas morphogenesis and participates in the production of “secondary transition” pancreatic endocrine cells. *Dev Biol*. 2005 Oct 1;286(1):182–94. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.07.021
21. Westmoreland JJ, Kilic G, Sartain C, Sirma S, Blain J, Rehg J, et al. Pancreas-specific deletion of Prox1 affects development and disrupts homeostasis of the exocrine pancreas. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):999–1009.e6. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.12.007
22. Davenport JR, Yoder BK. An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Dec;289(6):F1159–69. DOI: 10.1152/ajprenal.00118.2005
23. Oh EC, Katsanis N. Cilia in vertebrate development and disease. *Development*. 2012 Feb;139(3):443–8. DOI: 10.1242/dev.050054
24. Basten SG, Giles RH. Functional aspects of primary cilia in signaling, cell cycle and tumorigenesis. *Cilia*. 2013 Apr 29;2(1):6. DOI: 10.1186/2046-2530-2-6
25. Wagner M, Lührs H, Klöppel G, Adler G, Schmid RM. Malignant transformation of duct-like cells originating from acini in transforming growth factor  $\alpha$  transgenic mice. *Gastroenterology*. 1998 Nov 1;115(5):1254–62. DOI: 10.1016/S0016-5085(98)70098-8
26. Means AL, Meszoely IM, Suzuki K, Miyamoto Y, Rustgi AK, Coffey RJ, et al. Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development*. 2005 Aug;132(16):3767–76. DOI: 10.1242/dev.01925
27. Ardito CM, Grüner BM, Takeuchi KK, Lubeseder-Martellato C, Teichmann N, Mazur PK, et al. EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2012 Sep 11;22(3):304–17. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.07.024
28. Navas C, Hernández-Porras I, Schuhmacher AJ, Sibilía M, Guerra C, Barbacid M. EGF receptor signaling is essential for k-ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2012 Sep 11;22(3):318–30. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.08.001
29. Liu J, Akanuma N, Liu C, Naji A, Halff GA, Washburn WK, et al. TGF- $\beta$ 1 promotes acinar to ductal metaplasia of human pancreatic acinar cells. *Sci Rep*. 2016 Aug 3;6:30904. DOI: 10.1038/srep30904
30. Prévot P-P, Simion A, Grimont A, Colletti M, Khalailah A, Van den Steen G, et al. Role of the ductal transcription factors HNF6 and Sox9 in pancreatic acinar-to-ductal metaplasia. *Gut*. 2012 Dec;61(12):1723–32. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300266
31. Miyamoto Y, Maitra A, Ghosh B, Zechner U, Argani P, Iacobuzio-Donahue CA, et al. Notch mediates TGF $\alpha$ -induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2003 Jun;3(6):565–76. DOI: 10.1016/S1535-6108(03)00140-5
32. Jensen JN, Cameron E, Garay MVR, Starkey TW, Gianani R, Jensen J. Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology*. 2005 Mar;128(3):728–41. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.12.008
33. Feldmann G, Maitra A. Molecular genetics of pancreatic ductal adenocarcinomas and recent implications for translational efforts. *J Mol Diagn*. 2008 Mar;10(2):111–22. DOI: 10.2353/jmoldx.2008.070115

34. Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, et al. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature*. 1999 Aug 26;400(6747):877–81. DOI: 10.1038/23716
35. Lammert E, Brown J, Melton DA. Notch gene expression during pancreatic organogenesis. *Mechanisms of Development*. 2000 Jun 1;94(1–2):199–203. DOI: 10.1016/S0925-4773(00)00317-8
36. Bhanot U, Köhntop R, Hasel C, Möller P. Evidence of Notch pathway activation in the ectopic ducts of chronic pancreatitis. *J Pathol*. 2008 Feb;214(3):312–9. DOI: 10.1002/path.2293
37. Mallo GV, Fiedler F, Calvo EL, Ortiz EM, Vasseur S, Keim V, et al. Cloning and Expression of the Rat p8 cDNA, a New Gene Activated in Pancreas during the Acute Phase of Pancreatitis, Pancreatic Development, and Regeneration, and Which Promotes Cellular Growth. *J Biol Chem*. 1997 Dec 19;272(51):32360–9. DOI: 10.1074/jbc.272.51.32360
38. Motoo Y, Iovanna JL, Mallo GV, Su S-B, Xie M-J, Sawabu N. p8 Expression Is Induced in Acinar Cells During Chronic Pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2001 Aug 1;46(8):1640–6. DOI: 10.1023/A:1010637100933
39. Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett*. 2010 Aug 4;584(15):3242–9. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.06.010
40. Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. *Front Physiol*. 2012;3:344. DOI: 10.3389/fphys.2012.00344
41. Fukumura Y, Suda K, Mitani K, Takase M, Kumasaka T. Expression of transforming growth factor beta by small duct epithelium in chronic, cancer-associated, obstructive pancreatitis: an in situ hybridization study and review of the literature. *Pancreas*. 2007 Nov;35(4):353–7. DOI: 10.1097/mpa.0b013e318073cf98
42. Van Laethem JL, Deviere J, Resibois A, Rickaert F, Vertongen P, Ohtani H, et al. Localization of transforming growth factor beta 1 and its latent binding protein in human chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1995 Jun;108(6):1873–81. DOI: 10.1016/0016-5085(95)90152-3
43. Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL, Crawford DH, et al. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol*. 1999 Oct;155(4):1087–95. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65211-X
44. De La O J-P, Emerson LL, Goodman JL, Froebe SC, Illum BE, Curtis AB, et al. Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Dec 2;105(48):18907–12. DOI: 10.1073/pnas.0810111105
45. Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Pérez-Gallego L, et al. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell*. 2007 Mar;11(3):291–302. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.01.012
46. Habbe N, Shi G, Meguid RA, Fendrich V, Esni F, Chen H, et al. Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Dec 2;105(48):18913–8. DOI: 10.1073/pnas.0810097105
47. Morris JP, Cano DA, Sekine S, Wang SC, Hebrok M. Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J Clin Invest*. 2010 Feb;120(2):508–20. DOI: 10.1172/JCI40045
48. Zhu L, Shi G, Schmidt CM, Hruban RH, Konieczny SF. Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol*. 2007 Jul;171(1):263–73. DOI: 10.2353/ajpath.2007.061176
49. Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology*. 2007 Apr;132(4):1557–73. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.03.001
50. Korc M. Pancreatic cancer-associated stroma production. *Am J Surg*. 2007 Oct;194(4



Suppl):S84–6. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2007.05.004

51. Wenger C, Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Menke A, Hameister H, et al. Expression and differential regulation of connective tissue growth factor in pancreatic cancer cells. *Oncogene*. 1999 Jan 28;18(4):1073–80. DOI: 10.1038/sj.onc.1202395
52. Haque I, Mehta S, Majumder M, Dhar K, De A, McGregor D, et al. Cyr61/CCN1 signaling is critical for epithelial-mesenchymal transition and stemness and promotes pancreatic carcinogenesis. *Mol Cancer*. 2011 Jan 13;10:8. DOI: 10.1186/1476-4598-10-8
53. Leach SD. Epithelial differentiation in pancreatic development and neoplasia: new niches for nestin and Notch. *J Clin Gastroenterol*. 2005 Apr;39(4 Suppl 2):S78–82. DOI: 10.1097/01.mcg.0000155547.83901.a3
54. Zhang M-Z, Mai W, Li C, Cho S, Hao C, Moeckel G, et al. PKHD1 protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells. *PNAS*. 2004 Feb 24;101(8):2311–6. DOI: 10.1073/pnas.0400073101
55. Kim I, Fu Y, Hui K, Moeckel G, Mai W, Li C, et al. Fibrocystin/polyductin modulates renal tubular formation by regulating polycystin-2 expression and function. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Mar;19(3):455–68. DOI: 10.1681/ASN.2007070770
56. Hou X, Mrug M, Yoder BK, Lefkowitz EJ, Kremmidiotis G, D'Eustachio P, et al. Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest*. 2002 Feb;109(4):533–40. DOI: 10.1172/JCI14099
57. Pugacheva EN, Jablonski SA, Hartman TR, Henske EP, Golemis EA. HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1351–63. DOI: 10.1016/j.cell.2007.04.035
58. Başar O, Ibiş M, Uçar E, Ertuğrul I, Yolcu OF, Köklü S, et al. Recurrent pancreatitis in a patient with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Pancreatol*. 2006;6(1-2):160–2. DOI: 10.1159/000090258
59. Cano DA, Murcia NS, Pazour GJ, Hebrok M. Orpk mouse model of polycystic kidney disease reveals essential role of primary cilia in pancreatic tissue organization. *Development*. 2004 Jul;131(14):3457–67. DOI: 10.1242/dev.01189
60. Dong F, Chen Q-Q, Zhuang Z-H, He Q-L, Wang F-Q, Liu Q-C, et al. Multiple gene mutations in patients with type 2 autoimmune pancreatitis and its clinical features. *Cent Eur J Immunol*. 2014;39(1):77–82. DOI: 10.5114/ceji.2014.42129
61. Augereau C, Collet L, Vargiu P, Guerra C, Ortega S, Lemaigre FP, et al. Chronic pancreatitis and lipomatosis are associated with defective function of ciliary genes in pancreatic ductal cells. *Hum Mol Genet*. 2016 Oct 7; DOI: 10.1093/hmg/ddw332
62. Jiang X, Zhang W, Kaye H, Zheng P, Giese NA, Friess H, et al. Loss of ONECUT1 expression in human pancreatic cancer cells. *Oncol Rep*. 2008 Jan;19(1):157–63. DOI: 10.3892/or.19.1.157
63. Pekala KR, Ma X, Kropp PA, Petersen CP, Hudgens CW, Chung CH, et al. Loss of HNF6 expression correlates with human pancreatic cancer progression. *Lab Invest*. 2014 May;94(5):517–27. DOI: 10.1038/labinvest.2014.47
64. Drosos Y, Neale G, Ye J, Paul L, Kuliyeve E, Maitra A, et al. Prox1-Heterozygosity Sensitizes the Pancreas to Oncogenic Kras-Induced Neoplastic Transformation. *Neoplasia*. 2016 Mar;18(3):172–84. DOI: 10.1016/j.neo.2016.02.002
65. Seeley ES, Carrière C, Goetze T, Longnecker DS, Korc M. Pancreatic cancer and precursor pancreatic intraepithelial neoplasia lesions are devoid of primary cilia. *Cancer Res*. 2009 Jan 15;69(2):422–30. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1290
66. Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development*. 2011 Jan;138(1):9–22. DOI: 10.1242/dev.045500
67. Zhao B, Tumaneng K, Guan K-L. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration

- and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol.* 2011 Aug 1;13(8):877–83. DOI: 10.1038/ncb2303
68. Halder G, Dupont S, Piccolo S. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Sep;13(9):591–600. DOI: 10.1038/nrm3416
  69. Dornhöfer N, Spong S, Bennewith K, Salim A, Klaus S, Kambham N, et al. Connective tissue growth factor-specific monoclonal antibody therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 2006 Jun 1;66(11):5816–27. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0081
  70. Di Mola FF, Friess H, Martignoni ME, Di Sebastiano P, Zimmermann A, Innocenti P, et al. Connective tissue growth factor is a regulator for fibrosis in human chronic pancreatitis. *Ann Surg.* 1999 Jul;230(1):63–71. DOI: 10.1097/0000658-199907000-00010
  71. Bennewith KL, Huang X, Ham CM, Graves EE, Erler JT, Kambham N, et al. The role of tumor cell-derived connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in pancreatic tumor growth. *Cancer Res.* 2009 Feb 1;69(3):775–84. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0987
  72. Kosanam H, Prassas I, Chrystoja CC, Soleas I, Chan A, Dimitromanolakis A, et al. Laminin, gamma 2 (LAMC2): a promising new putative pancreatic cancer biomarker identified by proteomic analysis of pancreatic adenocarcinoma tissues. *Mol Cell Proteomics.* 2013 Oct;12(10):2820–32. DOI: 10.1074/mcp.M112.023507
  73. Siveke JT, Einwächter H, Sipos B, Lubeseder-Martellato C, Klöppel G, Schmid RM. Concomitant pancreatic activation of Kras(G12D) and Tgfa results in cystic papillary neoplasms reminiscent of human IPMN. *Cancer Cell.* 2007 Sep;12(3):266–79. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.08.002
  74. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2000 Aug;6(8):2969–72.
  75. Friess H, Lu Z, Riesle E, Uhl W, Bründler AM, Horvath L, et al. Enhanced expression of TGF-beta<sub>s</sub> and their receptors in human acute pancreatitis. *Ann Surg.* 1998 Jan;227(1):95–104. DOI: 10.1097/0000658-199801000-00014
  76. Apte MV, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, et al. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut.* 1999 Apr 1;44(4):534–41. DOI: 10.1136/gut.44.4.534
  77. Chen Y-Z, Gao Q, Zhao X-Z, Chen Y-Z, Bennett CL, Xiong X-S, et al. Systematic review of TCF2 anomalies in renal cysts and diabetes syndrome/maturity onset diabetes of the young type 5. *Chin Med J.* 2010 Nov 1;123(22):3326–33. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.22.029
  78. Grisanzio C, Werner L, Takeda D, Awoyemi BC, Pomerantz MM, Yamada H, et al. Genetic and functional analyses implicate the NUDT11, HNF1B, and SLC22A3 genes in prostate cancer pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012 Jul 10;109(28):11252–7. DOI: 10.1073/pnas.1200853109
  79. Berndt SI, Sampson J, Yeager M, Jacobs KB, Wang Z, Hutchinson A, et al. Large-scale fine mapping of the HNF1B locus and prostate cancer risk. *Hum Mol Genet.* 2011 Aug 15;20(16):3322–9. DOI: 10.1093/hmg/ddr213
  80. Wang C-C, Mao T-L, Yang W-C, Jeng Y-M. Underexpression of hepatocyte nuclear factor-1β in chromophobe renal cell carcinoma. *Histopathology.* 2013 Mar;62(4):589–94. DOI: 10.1111/his.12026
  81. Cuff J, Salari K, Clarke N, Esheba GE, Forster AD, Huang S, et al. Integrative bioinformatics links HNF1B with clear cell carcinoma and tumor-associated thrombosis. *PLoS ONE.* 2013;8(9):e74562. DOI: 10.1371/journal.pone.0074562
  82. Worley MJ, Welch WR, Berkowitz RS, Ng S-W. Endometriosis-associated ovarian cancer: a review of pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2013 Mar 6;14(3):5367–79. DOI: 10.3390/ijms14035367
  83. Buchner A, Castro M, Hennig A, Popp T, Assmann G, Stief CG, et al. Downregulation of HNF-1B in renal cell carcinoma is associated with tumor progression and poor prognosis. *Urology.* 2010 Aug;76(2):507.e6–11. DOI: 10.1016/j.urology.2010.03.042

84. Terasawa K, Toyota M, Sagae S, Ogi K, Suzuki H, Sonoda T, et al. Epigenetic inactivation of TCF2 in ovarian cancer and various cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2006 Mar 27;94(6):914–21. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602984
85. Silva TD, Vidigal VM, Felipe AV, DE Lima JM, Neto RA, Saad SS, et al. DNA methylation as an epigenetic biomarker in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2013 Dec;6(6):1687–92. DOI: 10.3892/ol.2013.1606
86. Petersen GM, Amundadottir L, Fuchs CS, Kraft P, Stolzenberg-Solomon RZ, Jacobs KB, et al. A genome-wide association study identifies pancreatic cancer susceptibility loci on chromosomes 13q22.1, 1q32.1 and 5p15.33. *Nat Genet*. 2010 Mar;42(3):224–8. DOI: 10.1038/ng.522
87. Li D, Duell EJ, Yu K, Risch HA, Olson SH, Kooperberg C, et al. Pathway analysis of genome-wide association study data highlights pancreatic development genes as susceptibility factors for pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2012 Jul;33(7):1384–90. DOI: 10.1093/carcin/bgs151
88. Hoskins JW, Jia J, Flandez M, Parikh H, Xiao W, Collins I, et al. Transcriptome analysis of pancreatic cancer reveals a tumor suppressor function for HNF1A. *Carcinogenesis*. 2014 Sep 18;bgu193. DOI: 10.1093/carcin/bgu193
89. Janky R, Binda MM, Allemeersch J, Van den Broeck A, Govaere O, Swinnen JV, et al. Prognostic relevance of molecular subtypes and master regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2016 Aug 12;16:632. DOI: 10.1186/s12885-016-2540-6





Article 2 : New insights in MODY5 etiology and physiopathology with  
a MODY5 mouse model

*En préparation*

## **New insights in MODY5 etiology and physiopathology with a MODY5 mouse model.**

Evans Quilichini<sup>1,2,\*</sup>, Mélanie Fabre<sup>1,2,\*</sup>, Christoffer Nord<sup>3</sup>, Axelle LeMarec<sup>1,2</sup>, Madeline Bucher<sup>1,2</sup>, Silvia Cereghini<sup>1,2</sup>, Ulf Alghren<sup>3</sup>, Cécile Haumaitre<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR7622, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Paris, France.

<sup>2</sup> Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR7622-IBPS, Paris, France.

<sup>3</sup> Umeå Centre for Molecular Medicine, Umeå University, Sweden

\* These authors equally contributed to this work.

**Maturity Onset Diabetes of the Young 5 (MODY5) is due to heterozygous mutations or deletion of *HNF1B*. However, mice heterozygous for *Hnf1b* in mice have no phenotype. Here, we investigate the pancreatic phenotype of a unique MODY5 mouse model generated by heterozygous insertion of a human HNF1B splicing point mutation in the mouse genome. The so-called Point Mutation *Hnf1b* (PM*Hnf1b*) mice display the same phenotype as MODY5 patients including impaired glucose tolerance. We found a 60% decrease in pancreatic insulin content associated with a 30% decrease in total large islet volume and a 20% decrease in total  $\beta$ -cell volume. These defects were associated with embryonic downregulation of the pro-endocrine gene *Ngn3*, suggesting a developmental etiology. As MODY5 patients, PM*Hnf1b* displayed a hypoplastic pancreas. We observed a progressive alteration of the exocrine pancreas leading to a pancreatitis-like phenotype with dysregulation of Hippo, TGF $\beta$  and Notch signalling pathways. Additionally, acinar cell regeneration was impaired in PM*Hnf1b* following cerulein-induced pancreatitis. In conclusion, PM*Hnf1b* mice is a suitable experimental model of MODY5 and represents a convenient tool for the molecular study of this syndrome.**

### **INTRODUCTION**

In 1960, Fajans described for the first time cases of mild diabetes mellitus among young and lean patients (Fajans and Conn, 1960). Fifteen years later, he and Tattersall introduced the acronym MODY (Maturity Onset Diabetes Of the Young) to define a dominantly inherited form of diabetes mellitus characterised by fasting hyperglycemia and usually diagnosed in children or young adults (Tattersall and Fajans, 1975). The later genetic studies revealed that MODY results from heterozygous defects in single genes affecting  $\beta$ -cell function. Mutations in fourteen genes have been shown to lead to this monogenic diabetes. The most common causes of MODY are mutations in *HNF1A* (MODY3) and *GCK* (MODY2), and rather less commonly in *HNF4A* (MODY1) and *HNF1B* (MODY5) (Anik et al., 2015).

The first *HNF1B* mutation associated with MODY has been reported in 1997, in a Japanese family with a nonsense mutation in codon 177 (Horikawa et al., 1997). Today, more

than a hundred *HNF1B* mutations are known to cause MODY5 (Alvelos et al., 2015). The *HNF1B* gene contains 9 exons. Most of the identified mutations localize to the first four exons. Exons 2 and 4, and the intron 2 splice site, are hotspot mutation sites (Chen et al., 2010). *HNF1B* deletions are also widely abundant. Although initially characterised by an autosomal dominant inheritance, MODY5-related mutations often arise spontaneously (Ulinski et al., 2006). Importantly, there is no association between the mutated domain and the phenotype observed, and even patients of the same family can present different clinical manifestations of the disease (Edghill et al., 2006).

*HNF1B*-associated disease is a multi-system disorder, affecting not only pancreas but also kidney, liver and genital tract. Renal cysts and diabetes mellitus are the mostly observed features, affecting respectively 90% and 45% of MODY5 patients, conferring MODY5 the name of RCAD (Renal Cysts And Diabetes) syndrome (Chen et al., 2010). Pancreatic defects in MODY5 affect both exocrine and endocrine tissues. Pancreatic hypoplasia has been described in several patients and is often associated with both ductal and acinar dysfunction (Haldorsen et al., 2008; Tjora et al., 2013). *HNF1B* mutation carriers display a fasting hyperglycemia and a reduced insulin response to glucose. Although various degrees of glycemic control, patients usually require insulin therapy in the first years following diagnosis (Lindner et al., 1999; Bingham et al., 2000; Furuta et al., 2002; Bellanné-Chantelot et al., 2004).

*HNF1B* has important functions in pancreas development. It is expressed in pancreatic multipotent progenitors by E9.5 in mouse. During the secondary transition, it becomes restricted to bipotent progenitors. After birth, *Hnf1b* is only expressed in ductal cells (Haumaitre et al., 2005; Maestro et al., 2003; Nammo et al., 2008). When devoid of *Hnf1b*, pancreatic buds fail to develop properly, leading to pancreas hypoplasia associated with cystic ducts, drastic loss of acinar cells and lack of endocrine cells. This study demonstrated that *Hnf1b* is required for *Neurogenin3* (*Ngn3*) expression, *Ngn3* being a direct target of *Hnf1b* (De Vas et al., 2015). Neonatal inactivation of *Hnf1b* leads to several ductal defects including loss of primary cilia, polarity defects and dilated ducts. Subsequently, mutant mice display pancreatitis with macrophage infiltration, fibrosis, lipomatosis, acinar cell loss and acinar-to-ductal metaplasia (Quilichini et al., in preparation).

*Hnf1b* heterozygous mutants do not exhibit any phenotype, while *Hnf1b* inactivation in pancreatic buds is lethal (Barbacci et al., 1999; De Vas et al., 2015; Haumaitre et al., 2005). Therefore, a suitable mouse model is missing to depict a molecular view of MODY5 whose description is mainly performed through isolated human case reports. Here, we present a new MODY5 mouse model generated through insertion of a *HNF1B* human mutation already identified in several patients (Bellanné-Chantelot et al., 2004; Bingham et al., 2003; Harries et al., 2004; Thomas et al., 2008). We tested this mouse model, called PMHNF1B (Point Mutation HNF1, abbreviated as PM), for glucose tolerance, insulin sensitivity, pancreatic insulin content, insulin secretion from isolated islets, quantitative distribution of islets in the whole pancreas through Optical Projection Tomography (OPT). Expression of endocrine markers was also analysed in embryonic pancreases. Exocrine component was investigated as well. Expression of the main acinar and ductal markers, the related signalling pathways implied in their regulation, and pancreas regeneration of PM mice following cerulein-induced acute pancreatitis were analysed.



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cerulein treatment**

Mice were injected with cerulein (Sigma-C9026), a decapeptide analogue of pancreatic secretagogue cholecystokinin, at a dose corresponding to 75 µg/kg of mouse. Cerulein was dissolved at 1 mg/ml in NaCl and administered intraperitoneally to mice with 5 µl/g of mouse for 2 consecutive days with 7 injections per day. Dissections were done at 3 different times to follow destruction and regeneration of acinar cells: at the day of cerulein injection (day 0), at the day when acute pancreatitis was induced (day 3), and at the day when pancreas was almost regenerated in normal conditions (day 7).

### **Histology, Immunohistochemistry and Immunofluorescence**

Dissected pancreases were fixed in 4% formaldehyde overnight and embedded in paraffin. Sections (7 µm thick) were prepared, deparaffinised and rehydrated for histological stainings. For Hematoxylin & Eosin coloration, slides were colored with Harris solution (Sigma-HHS16) for 1 min and in Eosine (Sigma-HT110216) for 3 min. Slides were dehydrated before mounting. Sections were processed for immunofluorescence or immunohistochemistry using a previously described protocol (Haumaitre et al., 2005). Briefly, epitope retrieval was performed by heating the slides in a microwave in citric acid buffer (10mM, PH:6). Permeabilization was performed in PBS/TritonX-100 0,3%, and sections were incubated in blocking solution (10% milk, 1% BSA 0.1% 10X Triton-X in PBS 1X or 1,5% Horse/Goat Serum in PBS 1X) before antibody staining. Nuclei were stained with DAPI (1/1000-Sigma) in secondary antibody staining step. For signal amplification, we used a biotinylated anti-rabbit or anti-goat antibody before staining with Steptavidin-Alexa594 or Steptavidin-Alexa488. For immunohistochemistry experiments, slides were incubated in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/50% methanol solution before blocking to eliminate endogenous peroxidase activity. The VECTASTAIN peroxidase ABC system (Vector) was used for Sox9, F4/80 and vimentin immunostainings. Nuclei were counterstained with Hematoxylin. Samples were viewed on a Nikon Eclipse E800 fluorescent microscope and images were acquired with a Nikon digital camera DXM1200F or a Zeiss Axio Observer.Z1 microscope.

### **RNA extraction, Reverse-Transcription and quantitative PCR (RT-qPCR)**

Total RNA from embryonic or adult pancreas was isolated using RNeasy Mini-kit (Qiagen) and then reverse transcribed using the superscript RT II Kit with random hexamers (Invitrogen). qPCR was performed using a SYBR Green master mix (Eurobiogreen QPCR Mix, Hi-ROX, Eurobio). The method of relative quantification was used to calculate expression levels, normalized to cyclophilin A and relative to wild-type cDNA from E15.5 pancreases. Values are shown as mean+s.e.m.

### **Mouse transgenic line**

Generation of the PMHNF1B (Point Mutation HNF1B) mouse line was carried out by the Institut Clinique de la Souris (Strasbourg, France) and will be described in detail in another study (S. Cereghini and colleagues, in preparation). Briefly, the HNF1B human mutation

located in the splice donor site of exon 2 c.544+1G>T (IVS2nt+1G>T) was introduced into the genome of 129 mouse strain ES cells by targeted homologous recombination. ES clones having undergone successful homologous recombination were selected by G418 resistance and injected in a C57BL/6 host blastocyst. The chimeric mice were mated with C57BL/6 mice and heterozygous germline transmission of the mutation was confirmed by PCR analysis. Western-Blot analysis revealed a 37% to 58% decrease in Hnf1b level in PM mouse kidney, depending of the assessed developmental stage (S. Cereghini and colleagues, in preparation).

### **Insulin sensitivity test**

After a 6-hour fast, insulin (1 unit/kg body weight) was injected intraperitoneally. Blood glucose levels were measured before and 15, 30, 60, and 120 min after injection.

### **Intraperitoneal glucose tolerance test**

Glucose (2 g/kg body weight) was injected intraperitoneally to overnight fasted mice, and blood glucose levels were measured before and 15, 30, 60, and 120 min after injection.

### **Pancreatic insulin content**

After a 4-hour fast, insulin content from whole pancreas was extracted in acidic ethanol (2% HCl in 80% ethanol) and assayed by ELISA kit (EUROBIO).

### **Mouse islet isolation and cell culture**

Mouse islets were isolated with collagenase solution (1 mg/mL, Sigma-Aldrich), separated on Histopaque (Sigma-Aldrich) gradient, and handpicked under a binocular microscope. Islets were cultured in RPMI supplemented with Glutamax, 10% fetal calf serum and 1% penicillin and streptomycin. After an overnight recovery in islet medium, insulin secretion assays were performed at various concentrations of glucose by ELISA kit (EUROBIO).

### **Optical Projection Tomography (OPT)**

Pancreas were fixed 4% paraformaldehyde for 2,5 hours and washed with PBS. Then, samples were dehydrated in methanol and stored at -20°C until shipping to Ulf Ahlgren's lab (Umea Center for Molecular Medecine, Sweden). OPT imaging protocol is detailed in (Hörnblad et al., 2011).

### **Statistical analysis**

Statistical significance was determined using Student's t-test or the non parametric Mann-Whitney's U test when appropriate. Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA). Differences were considered significant for  $P < 0.05$ . (NS, not significant; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

## RESULTS

**Impaired glucose tolerance with no insulin resistance in PM mice.** In order to assess glucose homeostasis of animals, we performed intraperitoneal glucose tolerance tests (IPGTT) on overnight-fasted PM mice and their control littermates. Following glucose load, the blood glucose level was significantly higher at 15, 30, 60, 90 and 120 min in 12- and 24-week-old PM mice than in controls. The corresponding AUC were significantly higher in PM than in control mice (Fig. 1B, C). Glucose level of 6-week-old PM mice was only significantly increased at 60 min in comparison to controls (Fig. 1A). PM mice display also higher glucose level than controls in both fed and fasted states (Fig. 1D, E). Thus, glucose-intolerance of PM mice is first observed at 6 weeks and progresses throughout adulthood. To determine whether increased glucose levels might be due to increased insulin resistance, insulin tolerance tests (ITT) were performed on 24-week-old animals. The ITT revealed no difference in peripheral insulin sensitivity between PM and control mice (Fig. 1F). These results indicate that the increased blood glucose level in PM mice is not due to insulin resistance of peripheral organs.

**Pancreatic insulin content of PM mice is decreased, but islet insulin secretion is not altered.** To further investigate the cause of glucose intolerance in PM mice, the total insulin content of adult pancreas was analysed. We found a 60% decrease in pancreatic insulin content in PM mice in comparison to controls (Fig. 2A). This result confirms that the glucose intolerance observed is associated with pancreatic defects. Then, we examined glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) as a measure of islet/ $\beta$ -cell function. Isolated islets were incubated with a basal (2.8 mM) or a high (16.7 mM) concentration of glucose. In both conditions, PM islets secreted similar levels of insulin as control islets (Fig. 2B). Expression of the main  $\beta$ -cell markers was also assessed from isolated islets but did not reveal any differences between PM and controls (Fig. 2C). Thus, adult  $\beta$ -cells of PM mice appeared fully glucose-responsive, showing that the decrease of pancreatic insulin content observed in PM mice is not due to  $\beta$ -cell dysfunction.

**PM mice have reduced volume and number of large islets.** Then, we speculated that the decreased insulin content of PM pancreas was due to altered islet/ $\beta$ -cells number and/or size. To assess this parameter, PFA-fixed pancreas were processed for Optical Projection Tomography (OPT) imaging. We found a 28% decrease in large islet volume associated with significant decrease of large islet number and volume per islet in 4-month-old PM pancreas (Fig. 3C, D, E). This was correlated with a 20% decrease in total  $\beta$ -cell volume (data not shown). We found no difference in small and medium islet number and size (Fig 3E). Finally, PM mice display a 60% decrease in pancreatic insulin content associated with a ~30% decrease in large islet volume.

**Endocrine markers are downregulated during PM pancreas development.** We have shown that glucose intolerance of PM mice is associated with a decrease of large islets, both in size and volume. However, in adult, islets do not express *Hnf1b* which is restricted to

ductal cells (Haumaitre et al., 2005; Maestro et al., 2003; Nammo et al., 2008). Based on the essential roles of *Hnf1b* in pancreas organogenesis and in endocrine commitment (De Vas et al., 2015), we hypothesized that endocrine defects observed in PM could be due to impaired islet development. We found a 36% and a 34% decrease in *Ngn3* expression at E15.5 and E17.5 respectively in PM pancreas compared to controls (Fig. 4A). This result is consistent with the fact that *Hnf1b* is a direct activator of *Ngn3* expression (De Vas et al., 2015). The expression of the main endocrine markers (NeuroD1, Insulin, Glucagon, Somatostatin) was also analysed. We found an average of 35% decrease in expression of these markers at E17.5 (Fig. 4B), whereas acinar and ductal marker expressions were unchanged. Thus, PM mice display altered endocrine development, which is probably at the onset of glucose-intolerance.

**Exocrine pancreas of PM mice is altered.** As MODY5 patients suffer from exocrine dysfunctions (Tjora et al., 2013), we investigated the ductal and acinar compartment features of PM mice. *Hnf1b* expression being restricted to ductal cells during adulthood, we first analysed the pancreatic ductal cells. Neonatal inactivation of *Hnf1b* leads to loss of ductal primary cilia and acinar cell loss (Quilichini et al., in preparation). At 3 months, PM ducts had fewer and shorter primary cilia than control ducts (Fig. 5A, B). Even though we found no evidence of acinar architecture defects at this stage (Fig. 5C-F), we measured a 47% decrease in proliferation rate of Amylase<sup>+</sup> cells (Fig. 5E-G). At 13 months, PM acinar cells were strongly affected, only few acinar lobules were remaining in the whole pancreas. RT-qPCR analyses revealed an average of 80% decrease in acinar marker (Amylase, CPA, Ptf1a, Nr5a2, Mist1) expression (Fig. 5J). This result correlated with a progressive decrease in [pancreas weight]/[body weight] ratio, ranging from -19% at 5 months to -38% at 12 months (Fig. 5K). OPT analysis revealed a 18% decrease in pancreas volume at 4 months (data not shown), confirming that PM pancreas were hypoplastic.

**PM mice exhibit a pancreatitis-like phenotype.** The exocrine tissue of 13-month-old PM mice was extensively filled with adipocytes as shown by the immunostaining of *Fabp4* (Fig. 6A, B). This correlates with the high upregulation (25.7-fold) of *PPARG*, a key player in adipocyte differentiation (Fig. 6C). F4/80 immunostaining revealed immune infiltrates consisting of macrophages in PM, and correlated with an increase (7.4-fold) in *F4/80* gene expression (Fig. 6D-F). *TGF-β1* and *P8-NuPr1* are known to be induced in the initial phases of pancreatitis (Friess et al., 1998; Mallo et al., 1997; Motoo et al., 2001). We observed a significant increase (7.4-fold) in *TGF-β1* expression (Fig. 6H). Surprisingly, *P8/NuPr1* expression was found downregulated (-80%) in PM mice (Fig. 6G). *TGF-β1* being a master regulator of fibrogenesis, we next investigated if PM pancreas were fibrotic. We found a strong increase in the presence of the mesenchymal marker Vimentin correlated with a strong increase (11.8-fold) in *Vimentin* gene expression (Fig. 6I, K). Several fibrosis marker genes (N-Cadherin, *Coll1a1*,  $\alpha$ -SMA) were also highly upregulated (3.9-fold, 10.4-fold, 15.1-fold respectively) in PM. These data prove that 13-month-old PM mice display pancreas fibrosis. Acinar-to-ductal metaplasia (ADM) is an important component of pancreatitis. To address the presence of acinar-ductal metaplastic lesions in PM pancreas, we immunostained pancreatic tissue for the ductal nuclear protein *Sox9* and the acinar cytoplasmic protein Amylase. We found co-expression of *Sox9* and *Amylase* in some PM acinar cells, which demonstrates the

ADM (Fig. 6O-Q). This result was confirmed by histological observation of hematoxylin-eosin stained pancreas revealing duct-like structures within the acinar tissue (Fig. 6L-M). The Notch pathway was shown to regulate ADM, as aberrant Notch activity in pancreatic acini promotes their transdifferentiation toward duct-like cells (Miyamoto et al., 2003; Sawey et al., 2007). Notch2 and RbpJ, respectively receptor and effector of the Notch pathway, were found upregulated (3-fold) in PM pancreas. We previously found that the Hippo pathway was deregulated following neonatal inactivation of *Hnf1b*, contributing to pancreatitis-like phenotype in *Hnf1b* mutant mice (Quilichini et al., in preparation). In PM, we found a strong and ectopic *Ctgf* staining in PM acinar cells, in correlation with the upregulation of *Ctgf* (8.1-fold) and *Cyr61* (12.1-fold) (Fig. 6R-T). Thus, PM pancreas exhibits acinar cell loss, lipomatosis, macrophage infiltration, fibrosis and ADM. All these defects are classical features of pancreatitis. We suggest that Hippo and Notch pathways contribute to the exocrine alterations of PM mice.

**Acinar cell regeneration is impaired in young PM mice.** As previously described, we found no obvious acinar defects in 3-month-old PM mice, except a decrease in mitotic activity which probably contributes to the later acinar cell loss. Neonatal *Hnf1b* inactivation was shown to impair acinar cell regeneration following cerulein-induced pancreatitis (Quilichini et al. in preparation). We expected a similar result in PM mice. Acute pancreatitis was induced by two consecutive days of treatment with the secretagogue cerulein, and pancreata were harvested three days (D3) and one week later (D7) (Fig. 7A). We followed acinar regeneration by Amylase-Sox9 immunostaining. As expected, before cerulein treatment (D0), we found no difference between control and PM pancreas (Fig. 7B, C). At D3, both control and PM pancreas exhibited widespread ADM revealed by co-localisation of Sox9 and Amylase in almost all acinar cells (Fig. 7D, E). Whereas control pancreas were recovered at D7, many ADM areas were still observed in PM (Fig. 7F, G). This result demonstrates an impaired regenerative capacity of PM acinar cells.

## DISCUSSION

To date, investigating MODY5 pathology was complex due to the scarcity of patients, the high phenotypic heterogeneity and the lack of suitable mouse model. In this study, we described a new murine model of MODY5 established by insertion of a human *HNF1B* splicing point mutation in the mouse genome. This MODY5 mouse model, called PMHnf1b, displays the classical defects observed in MODY5 patients including renal and pancreatic abnormalities. The renal disorders of PM mice will be described in another study (S. Cereghini et al., unpublished). Here, we attempted to deliver a general phenotypic description of pancreatic defects displayed by PM mice and to provide molecular clues to understand the etiology and the physiopathology of MODY5. As MODY5 patients suffer from endocrine and exocrine dysfunctions, we investigated both compartments.

The main endocrine findings of our study are: 1) PM mice are glucose intolerant by 6 weeks, and it progresses with age. 2) Fed and fasted glycemia of PM mice are significantly

higher than controls. 3) Glucose intolerance is not due to peripheral resistance to insulin. 4) The insulin content of PM pancreas is decreased by 60%. 5) Glucose-stimulated insulin secretion is not altered in cultured isolated islets. 6) Large islets of PM mice are fewer and smaller than the control ones. 7) Expressions of *Ngn3* and other endocrine markers are reduced during pancreas development.

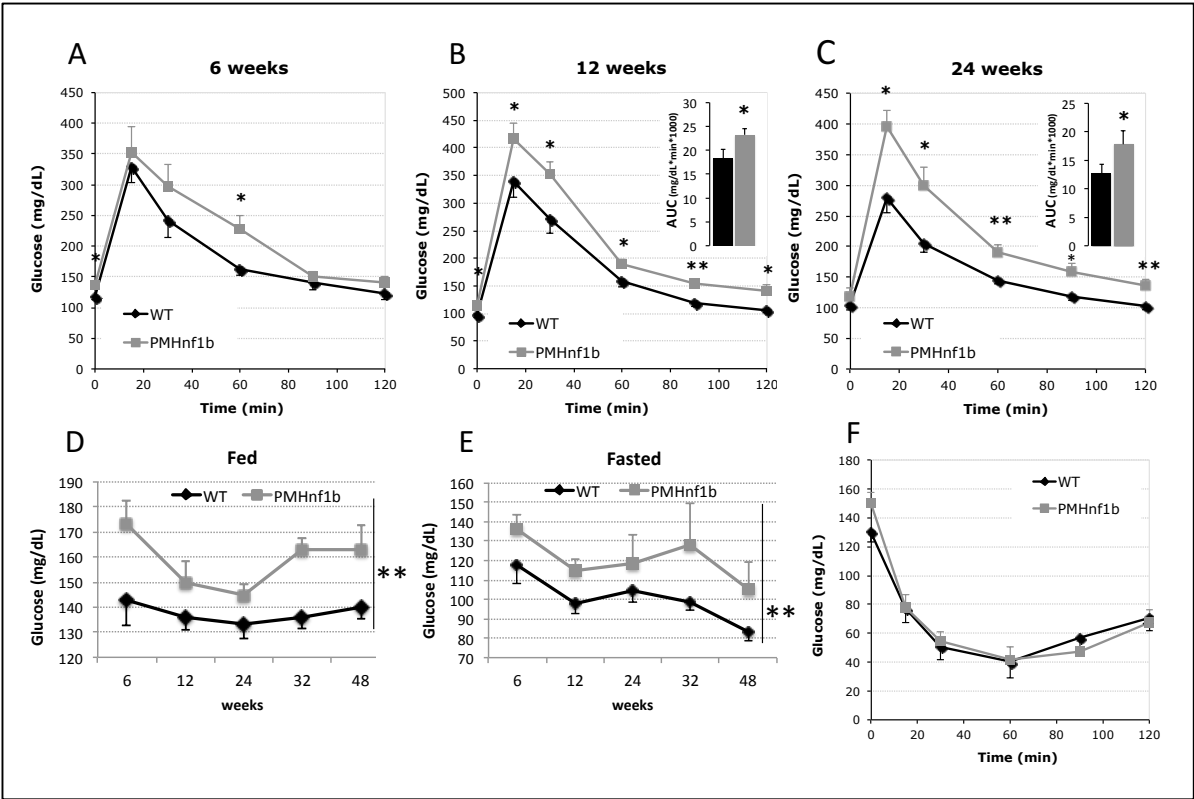
The glucose intolerance observed in PM mice correlates with the results of oral and intravenous glucose tolerance tests in individual MODY5 patients which have shown reduced insulin response to glucose (Bellanné-Chantelot et al., 2004; Bingham et al., 2000; Furuta et al., 2002; Lindner et al., 1999). The progression of the glucose intolerance towards a diabetic profile is not only shown in PM mice but also in MODY5 patients who require an insulin treatment in the years following diagnosis. The fasting hyperglycemia found in PM mice is a typical feature of MODY5 patients. In a 2006 study, a hyperinsulinemic-euglycemic clamp was performed on six HNF1B-mutation carriers and controls to assess their peripheral tissue insulin sensitivity. It showed no difference in insulin-stimulated glucose uptake but revealed reduced insulin sensitivity of endogenous glucose production in subjects with *HNF1B* mutations. This defect was suggested to be due to abnormal hepatic function, HNF1B being expressed in the liver during its development and in adulthood (Brackenridge et al., 2006). We found no difference in peripheral insulin sensitivity between control and PM mice. However, the ITT does not differentiate peripheral vs hepatic insulin resistance so the results are consistent in both studies (Patarrão et al., 2014). A highly debated topic is whether islet size affects islet functionality. It is known that in mammals the typical size of islets is similar regardless the species. Thus, the number of islets, but not the islet size, increases with the body size. In the light of these data, it was proposed there is an ideal islet size which allows optimal endocrine function (Jo et al., 2007). Subjects with type 2 diabetes display a preferential loss of large islets, indicating large islets ensure critical roles in the regulation of glucose levels (Jo et al., 2012; Kilimnik et al., 2011). We showed PM mice exhibit a ~30% decrease in large islet volume. We suggest that the partial loss of large islets contribute to the significant decrease in pancreatic insulin content of PM pancreas. Another study showed a 30% decrease in total  $\beta$ -cell mass of type 2 diabetic people (Sakuraba et al., 2002). By OPT, we found a 20% decrease in total  $\beta$ -cell volume of PM mice, which probably contributes to the reduced insulin content. Importantly, *Hnf1b* is not expressed in  $\beta$ -cells, nor in islets. Based on its crucial role in the regulation of *Ngn3* expression (De Vas et al., 2015), we speculated that the endocrine defects of PM mice appear during islet development. We found a significant decrease in *Ngn3* and other endocrine marker expression in E15.5-E17.5 embryonic pancreata, suggesting MODY5 is due to developmental defects.

MODY5 patients display a hypoplastic pancreas associated with altered acinar and ductal functions (Tjora et al., 2013). PM mice also exhibit exocrine anomalies, although they appear later than the endocrine defects. RT-qPCR analyses of ductal and acinar marker expressions showed no difference between PM and control mice at E17.5. Three months after birth, PM ductal cells had fewer and shorter cilia than controls. Cilium defects were also described in *Hnf1b*-inactivated pancreas, and were correlated with a dramatic loss of acinar cells (De Vas et al, 2015; Quilichini et. al, in preparation). Although we did not find obvious acinar defects in PM mice at this stage, we found a significant decrease in the rate of acinar cell proliferation that we considered as a first step towards a further deterioration. From five

to twelve months, the weight of PM pancreas strongly decreased, probably due to progressive loss of acinar cells. At thirteen months, only few acini were remaining, and the major part of the pancreatic tissue was occupied by adipocytes. As *Hnf1b* ductal inactivation was shown to lead to a pancreatitis-like phenotype, we investigated the major features of pancreas inflammation. As expected, thirteen-month-old pancreas displayed fibrosis, macrophage infiltration and acinar-to-ductal metaplasia. This was associated with Hippo, TGF $\beta$  and Notch pathway deregulation, both implied in pancreatitis events. Neonatal inactivation of *Hnf1b* was shown to induce pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN). Nevertheless, we found no neoplastic lesion in PM pancreata. *P8/Nupr1* is a transcription cofactor whose expression is usually induced by pancreatitis and several other cell stresses (Iovanna, 2002). Genetic inactivation of *P8/Nupr1* in mice impairs Kras-induced PanIN, suggesting it acts as a pro-neoplastic factor (Grasso et al., 2014, 2015). *P8/Nupr1* is strongly induced following ductal inactivation of *Hnf1b* (Quilichini et al., in preparation), but its expression is reduced in PMHnf1b mice. This could explain the absence of PanIN lesion in our MODY5 mouse model.

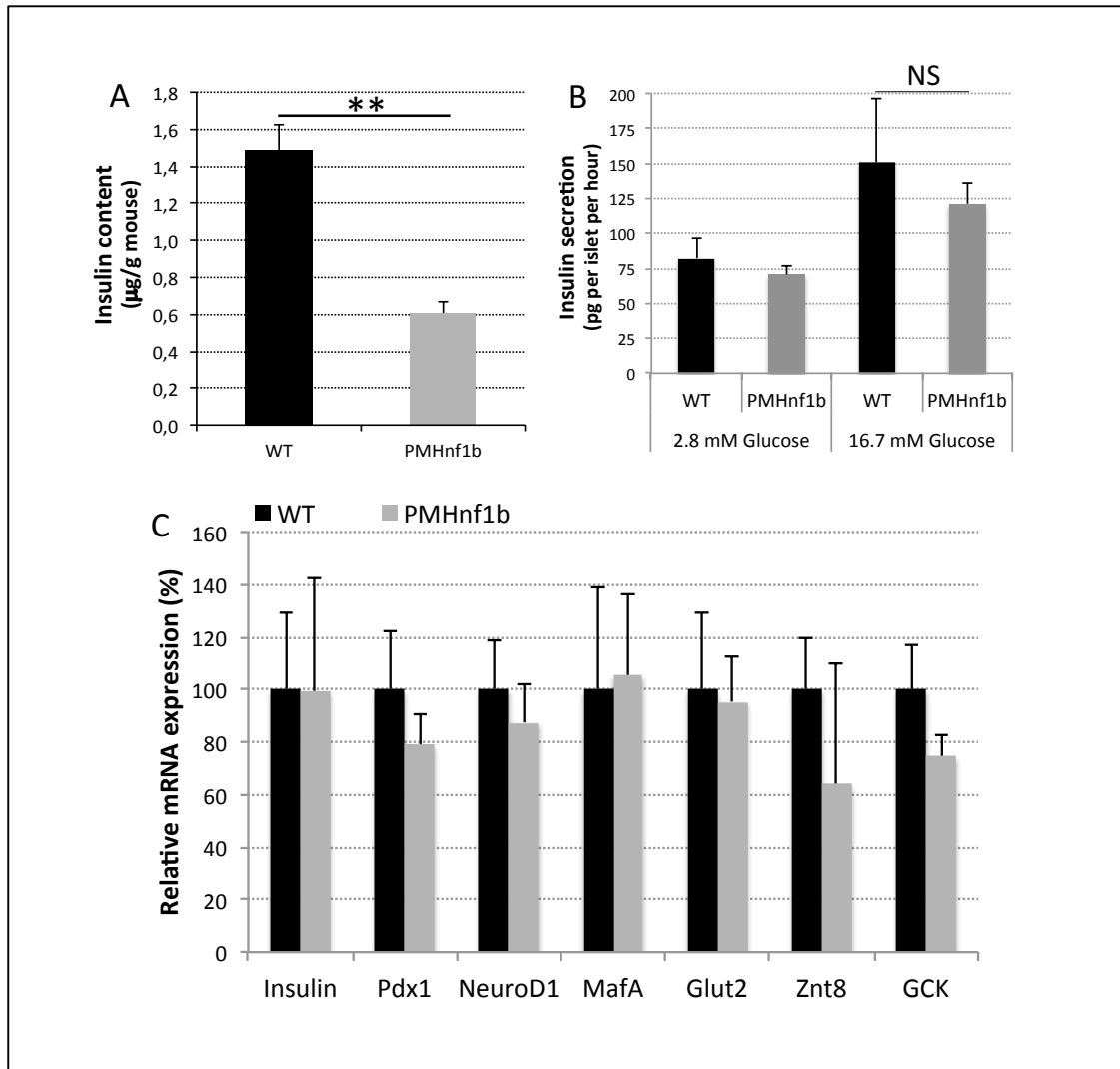
Altogether, these data show that PMHnf1b mice are a suitable model for the study of MODY5 and furnish new insights in the etiology and the pathophysiology of this disease.

**FIGURES**

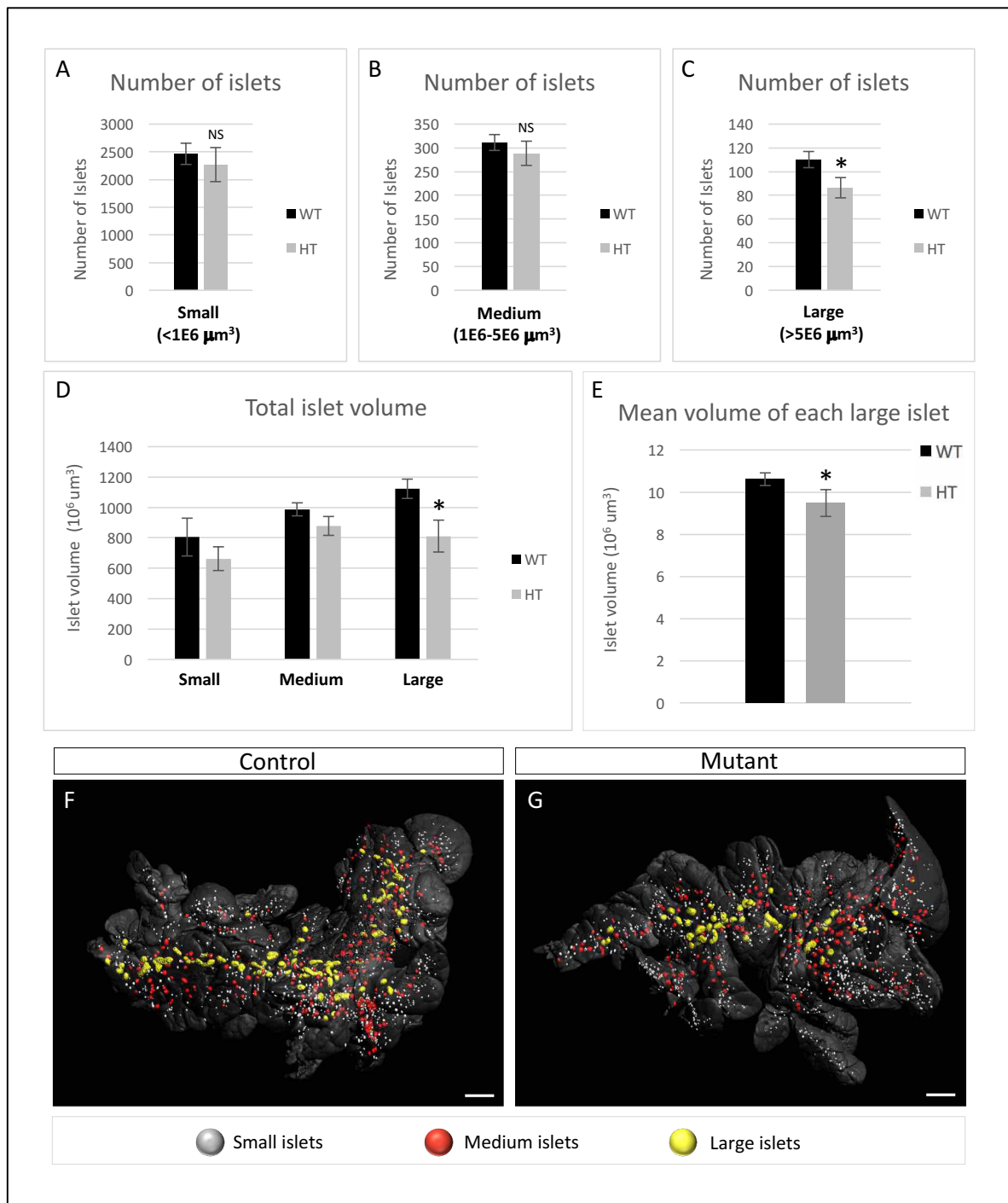


**Fig. 1. PMHnf1b mice are glucose intolerant and not insulin-resistant.** (A, B, C) Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) in 6, 12 and 24-week-old animals comparing control (black line) and PMHnf1b mice (grey line). The corresponding area under the curve (AUC) is illustrated for 12 and 24-week-old animals. (D) Evolution of morning fed blood glucose values of control (black line) and PMHnf1b (grey line) mice between 6 weeks and 48 weeks. (E) Evolution of overnight-fasted blood glucose values of control (black line) and PMHnf1b (grey line) mice between 6 weeks and 48 weeks. (F) Insulin tolerance test (ITT) in 24-week-old animals comparing control (black line) and PMHnf1b mice (grey line) (control, n=8; PMHnf1b, n=6).

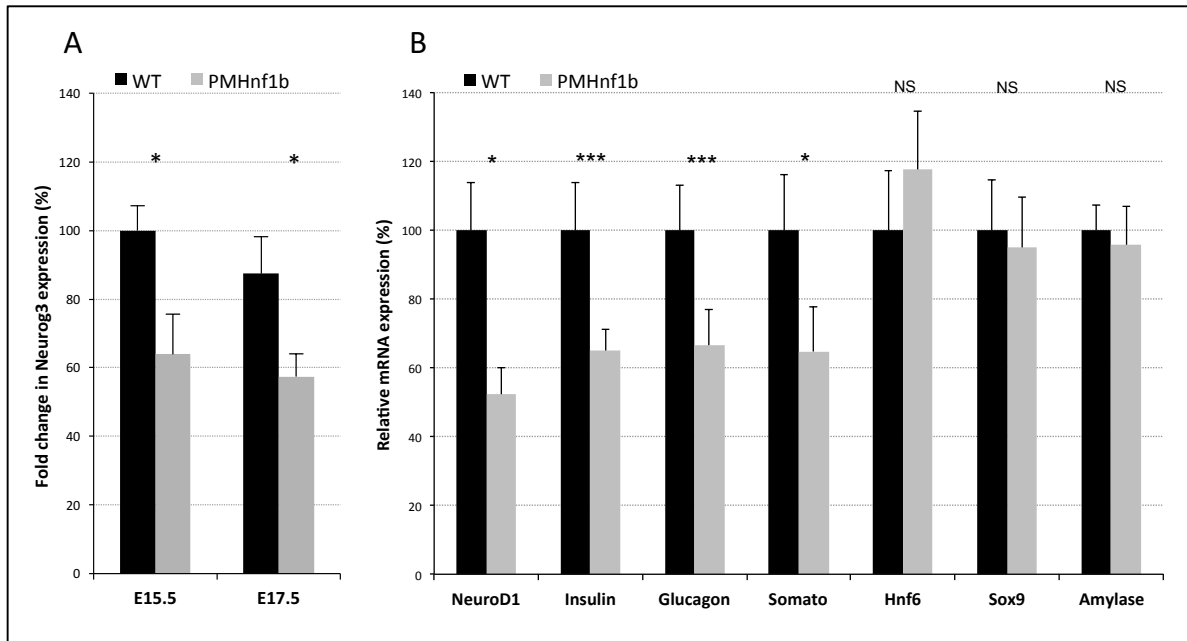




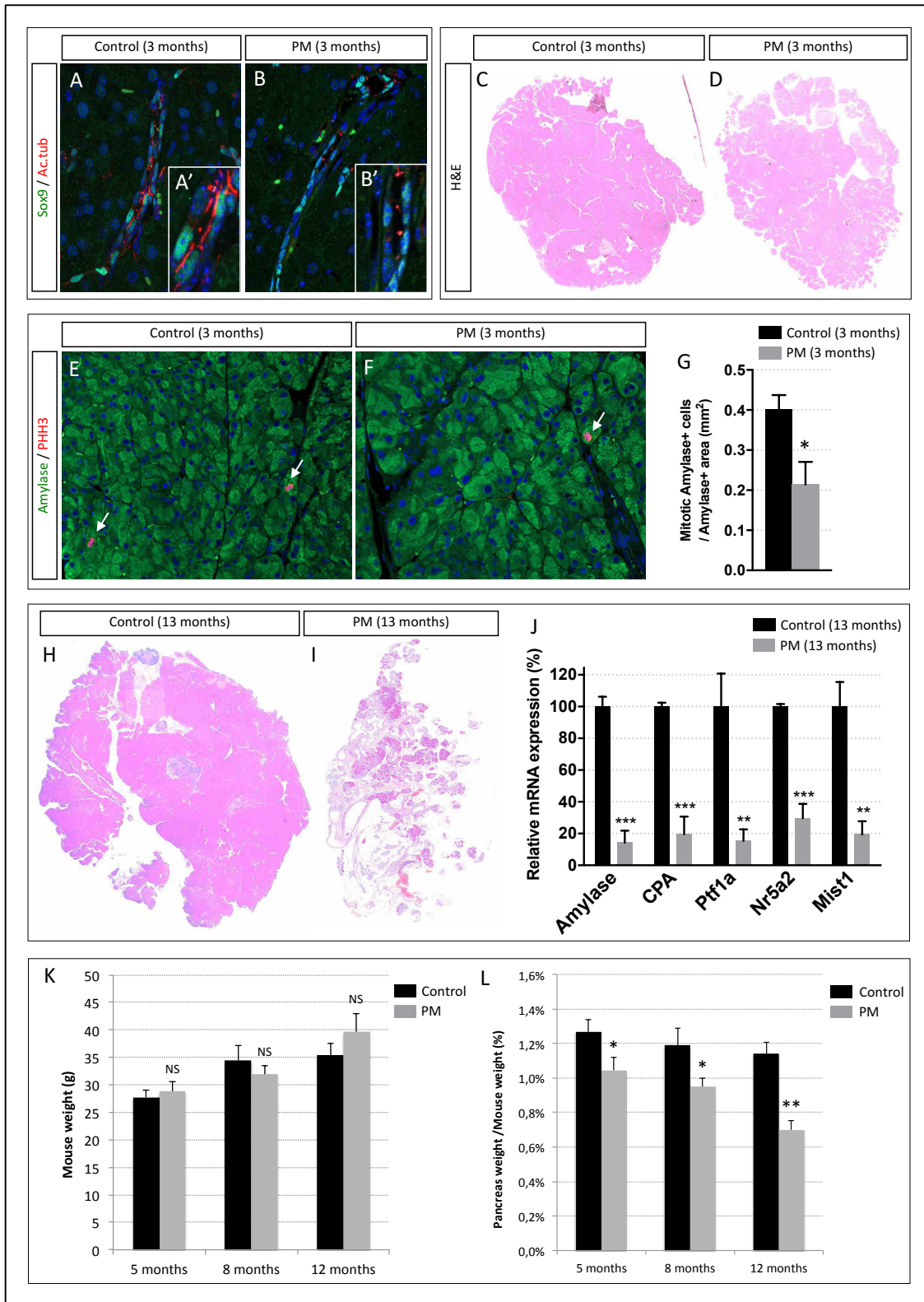
**Fig. 2. Decreased pancreatic insulin content but no change in glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and  $\beta$ -cell marker expression in PMHnf1b mice.** (A) Pancreatic insulin content was measured in control (black, n=3) and PMHnf1b (grey, n=7) mice. (B) Isolated islets from control (black, n=8) and PMHnf1b (grey, n=7) mice were cultured in basal (2.8 mM glucose) or glucose-stimulated (16.7 mM glucose) conditions. (C) RT-qPCR analysis of several  $\beta$ -cell markers in control (black, n=7) or PMHnf1b (grey, n=6) isolated islets (NS for all markers).



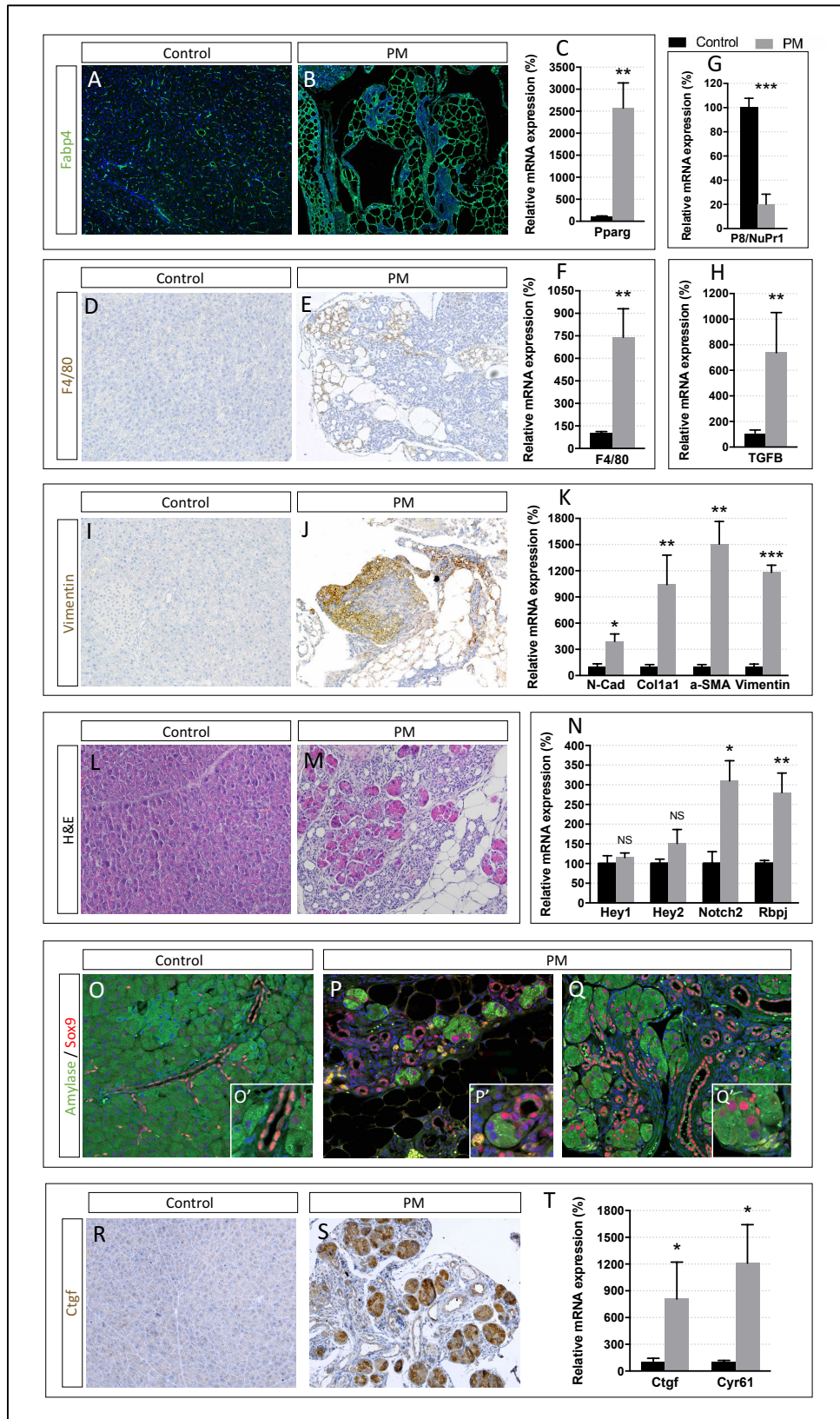
**Fig. 3. PMHnf1b mice have fewer and smaller large islets than controls, resulting in decreased total islet volume.** (A-C) Quantification of small, medium and large islet numbers by Optical Projection Tomography (OPT) in control (black) and PMHnf1b (grey) 4-month-old mice. (D) Quantification of small, medium and large islet total volumes. (E) Mean volume of each large islet determined by the ratio of large islet volume to large islet number (control, n=7; PMHnf1b, n=7). (F, G) Iso-surface rendered OPT images of representative control and mutant pancreas. Individual islet volumes are reconstructed based on the signal from insulin-specific antibodies and have been pseudo colored to highlight the distribution of small ( $<1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  [white]), intermediate ( $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  [red]), and large ( $>5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  [yellow]) islets. Scale bars: 1 mm.



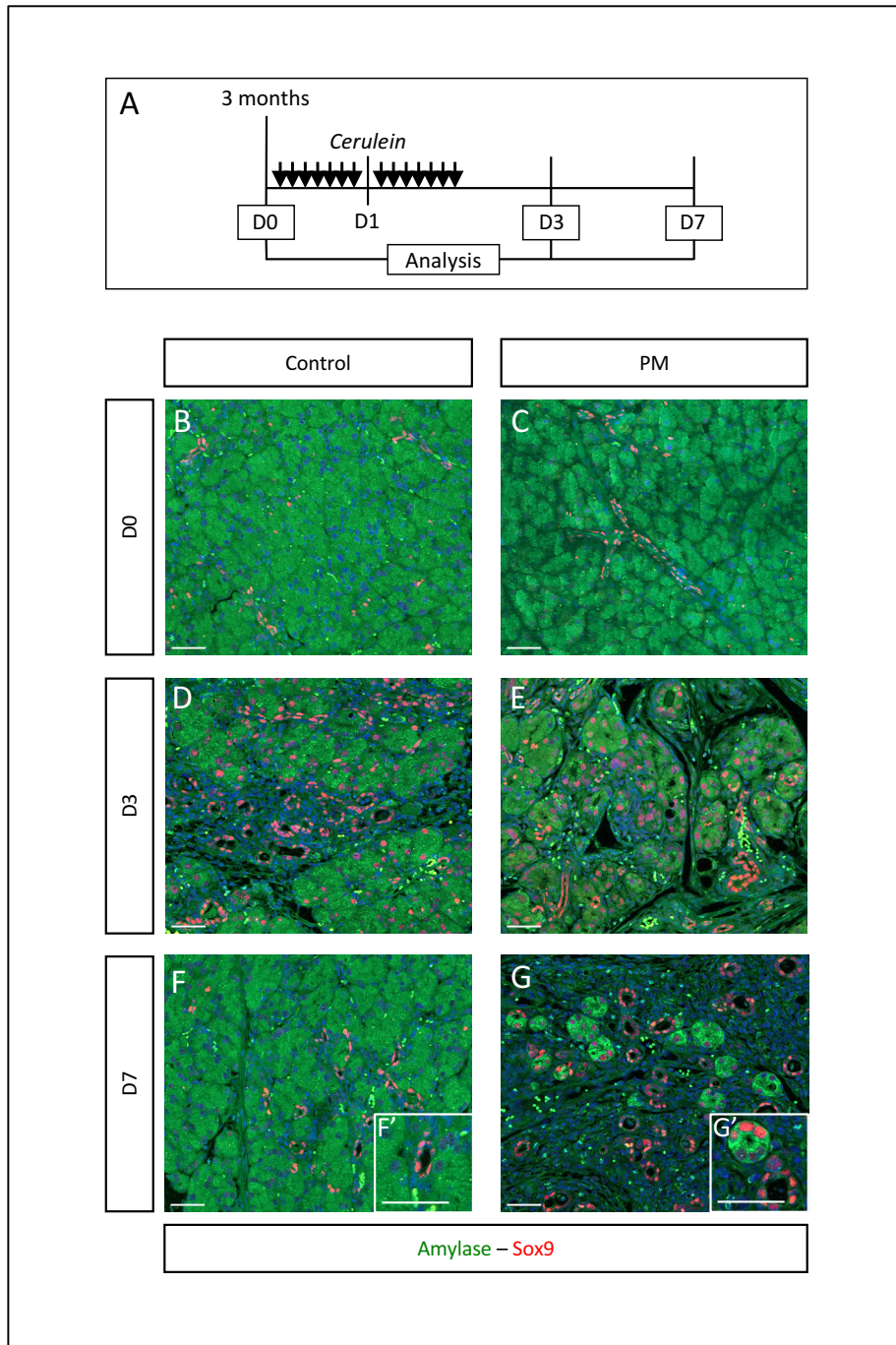
**Fig. 4. Decreased *Ngn3* and endocrine marker expressions in PMHnf1b embryonic pancreas.** (A) RT-qPCR analysis of *Neurogenin3* (*Ngn3*) in control (black) and PMHnf1b (grey) pancreas at E15.5 (control, n=4; PMHnf1b, n=5) and E17.5 (control, n=5; PMHnf1b, n=3). (B) RT-qPCR analysis of endocrine marker genes (*NeuroD1*, *Insulin*, *Glucagon*, *Somatostatin*), ductal marker genes (*Hnf6*, *Sox9*) and acinar marker gene (*Amylase*) in control (black, n=17) and PMHnf1b (grey, n=17) mice at E17.5.



**Fig. 5. PMHnf1b pancreas display shortened primary cilia in early life and acinar cell loss in later life.** (A, B) Sox9 (green) and acetylated  $\alpha$ -Tubulin (Ac.Tub, red) immunostaining at 3 months (C, D). Hematoxylin and eosin staining of pancreatic sections from 3-month-old mice. (E, F) Phospho-histone H3 (PHH3, red) and Amylase (green) immunostaining. Arrows indicate mitotic Amylase<sup>+</sup> cells. Quantification of acinar cell proliferation (Amylase<sup>+</sup> PHH3<sup>+</sup>/Amylase<sup>+</sup> cells) in control (black, n=3) and PMHnf1b (grey, n=3) 3-month-old mice. (H, I) Hematoxylin and eosin staining of pancreatic sections from 13-month-old mice. (J) RT-qPCR analysis of acinar marker genes in control (black, n=4) and PMHnf1b (grey, n=6) 13-month-old mice. (K, L) Evolution of mouse weight and relative pancreas weight/body weight of control (black) and PMHnf1b (grey) mice from 5 months to 12 months (5 months: control, n=16; PMHnf1b = 15) (8 months: control, n=4; PMHnf1b, n=9) (12 months: control, n=4; PMHnf1b, n=4).



**Fig. 6. 13-month-old PMHnf1b mice show pancreatitis-like phenotype.** (A, B) Adipocyte marker Fabp4 (green) immunostaining. (C) RT-qPCR of *Pparg*. (D, E) Macrophage marker F4/80 (brown) immunostaining. (F) RT-qPCR of *F4/80*. (G) RT-qPCR of *P8/NuPr1*. (H) RT-qPCR of *TGF-beta* (*TGFB*). (I, J) Vimentin (brown) immunostaining. (K) RT-qPCR of *N-Cadherin* (*N-Cad*), *Collagen type I alpha 1* (*Col1a1*), *Alpha-smooth muscle actin* (*a-SMA*) and *Vimentin*. (L, M) Hematoxylin and eosin staining of control and PMHnf1b pancreatic sections. (N) RT-qPCR of some components of Notch signalling pathway. (O-Q) Amylase (green) and Sox9 (red) immunostaining. (R, S) CTGF (brown) immunostaining. (T) RT-qPCR of Hippo/Yap target genes *Ctgf* and *Cyr61* (control, n=4; PMHnf1b, n=6).



**Fig. 7. Impaired acinar regeneration in PMHnf1b mice.** (A) Experimental design. 3-month-old control and PMHnf1b mice were injected with cerulein hourly, seven times a day for two consecutive days. Pancreata were harvested just before cerulein treatment (D0), 3 days (D3) and 7 days (D7) after the first cerulein injection. (B-G) Amylase (green) and Sox9 (red) immunostaining. Scale bars: 50 $\mu$ m.

## REFERENCES

- Alvelos, M.I., Rodrigues, M., Lobo, L., Medeira, A., Sousa, A.B., Simão, C., and Lemos, M.C. (2015). A Novel Mutation of the HNF1B Gene Associated With Hypoplastic Glomerulocystic Kidney Disease and Neonatal Renal Failure. *Medicine (Baltimore)* 94.
- Anık, A., Çatlı, G., Abacı, A., and Böber, E. (2015). Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* 28, 251–263.
- Barbacci, E., Reber, M., Ott, M.O., Breillat, C., Huetz, F., and Cereghini, S. (1999). Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Dev. Camb. Engl.* 126, 4795–4805.
- Bellanné-Chantelot, C., Chauveau, D., Gautier, J.-F., Dubois-Laforgue, D., Clauin, S., Beaufils, S., Wilhelm, J.-M., Boitard, C., Noël, L.-H., Velho, G., et al. (2004). Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann. Intern. Med.* 140, 510–517.
- Bingham, C., Ellard, S., Allen, L., Bulman, M., Shepherd, M., Frayling, T., Berry, P.J., Clark, P.M., Lindner, T., Bell, G.I., et al. (2000). Abnormal nephron development associated with a frameshift mutation in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1 beta. *Kidney Int.* 57, 898–907.
- Bingham, C., Ellard, S., van't Hoff, W.G., Simmonds, H.A., Marinaki, A.M., Badman, M.K., Winocour, P.H., Stride, A., Lockwood, C.R., Nicholls, A.J., et al. (2003). Atypical familial juvenile hyperuricemic nephropathy associated with a hepatocyte nuclear factor-1beta gene mutation. *Kidney Int.* 63, 1645–1651.
- Brackenridge, A., Pearson, E.R., Shojaee-Moradie, F., Hattersley, A.T., Russell-Jones, D., and Umpleby, A.M. (2006). Contrasting insulin sensitivity of endogenous glucose production rate in subjects with hepatocyte nuclear factor-1beta and -1alpha mutations. *Diabetes* 55, 405–411.
- Chen, Y.-Z., Gao, Q., Zhao, X.-Z., Chen, Y.-Z., Bennett, C.L., Xiong, X.-S., Mei, C.-L., Shi, Y.-Q., and Chen, X.-M. (2010). Systematic review of TCF2 anomalies in renal cysts and diabetes syndrome/maturity onset diabetes of the young type 5. *Chin. Med. J. (Engl.)* 123, 3326–3333.
- De Vas, M.G., Kopp, J.L., Heliot, C., Sander, M., Cereghini, S., and Haumaitre, C. (2015). Hnf1b controls pancreas morphogenesis and the generation of Ngn3+ endocrine progenitors. *Dev. Camb. Engl.* 142, 871–882.
- Edghill, E.L., Bingham, C., Ellard, S., and Hattersley, A.T. (2006). Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes. *J. Med. Genet.* 43, 84–90.
- Fajans, S.S., and Conn, J.W. (1960). Tolbutamide-induced improvement in carbohydrate tolerance of young people with mild diabetes mellitus. *Diabetes* 9, 83–88.

- Friess, H., Lu, Z., Riesle, E., Uhl, W., Bründler, A.M., Horvath, L., Gold, L.I., Korc, M., and Büchler, M.W. (1998). Enhanced expression of TGF-betas and their receptors in human acute pancreatitis. *Ann. Surg.* 227, 95–104.
- Furuta, H., Furuta, M., Sanke, T., Ekawa, K., Hanabusa, T., Nishi, M., Sasaki, H., and Nanjo, K. (2002). Nonsense and Missense Mutations in the Human Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$  Gene (TCF2) and Their Relation to Type 2 Diabetes in Japanese. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3859–3863.
- Grasso, D., Garcia, M.N., Hamidi, T., Cano, C., Calvo, E., Lomberk, G., Urrutia, R., and Iovanna, J.L. (2014). Genetic inactivation of the pancreatitis-inducible gene *Nupr1* impairs PanIN formation by modulating *Kras*(G12D)-induced senescence. *Cell Death Differ.* 21, 1633–1641.
- Grasso, D., Bintz, J., Lomberk, G., Molejon, M.I., Loncle, C., Garcia, M.N., Lopez, M.B., Urrutia, R., and Iovanna, J.L. (2015). Pivotal Role of the Chromatin Protein *Nupr1* in *Kras*-Induced Senescence and Transformation. *Sci. Rep.* 5, srep17549.
- Haldorsen, I.S., Vesterhus, M., Raeder, H., Jensen, D.K., Søvik, O., Molven, A., and Njølstad, P.R. (2008). Lack of pancreatic body and tail in HNF1B mutation carriers. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 25, 782–787.
- Harries, L.W., Ellard, S., Jones, R.W.A., Hattersley, A.T., and Bingham, C. (2004). Abnormal splicing of hepatocyte nuclear factor-1 beta in the renal cysts and diabetes syndrome. *Diabetologia* 47, 937–942.
- Haumaitre, C., Barbacci, E., Jenny, M., Ott, M.O., Gradwohl, G., and Cereghini, S. (2005). Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1490–1495.
- Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., Furuta, H., Hinokio, Y., Cockburn, B.N., Lindner, T., Yamagata, K., Ogata, M., Tomonaga, O., et al. (1997). Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat. Genet.* 17, 384–385.
- Hörnblad, A., Cheddad, A., and Ahlgren, U. (2011). An improved protocol for optical projection tomography imaging reveals lobular heterogeneities in pancreatic islet and  $\beta$ -cell mass distribution. *Islets* 3, 204–208.
- Iovanna, J.L. (2002). Expression of the stress-associated protein p8 is a requisite for tumor development. *Int. J. Gastrointest. Cancer* 31, 89–98.
- Jo, J., Choi, M.Y., and Koh, D.-S. (2007). Size Distribution of Mouse Langerhans Islets. *Biophys. J.* 93, 2655–2666.
- Jo, J., Hara, M., Ahlgren, U., Sorenson, R., and Periwal, V. (2012). Mathematical models of pancreatic islet size distributions. *Islets* 4, 10–19.
- Kilimnik, G., Zhao, B., Jo, J., Periwal, V., Witkowski, P., Misawa, R., and Hara, M. (2011). Altered Islet Composition and Disproportionate Loss of Large Islets in Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS ONE* 6.



- Lindner, T.H., Njolstad, P.R., Horikawa, Y., Bostad, L., Bell, G.I., and Sovik, O. (1999). A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2001–2008.
- Maestro, M.A., Boj, S.F., Luco, R.F., Pierreux, C.E., Cabedo, J., Servitja, J.M., German, M.S., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P., and Ferrer, J. (2003). Hnf6 and Tcf2 (MODY5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas. *Hum. Mol. Genet.* 12, 3307–3314.
- Mallo, G.V., Fiedler, F., Calvo, E.L., Ortiz, E.M., Vasseur, S., Keim, V., Morisset, J., and Iovanna, J.L. (1997). Cloning and Expression of the Rat p8 cDNA, a New Gene Activated in Pancreas during the Acute Phase of Pancreatitis, Pancreatic Development, and Regeneration, and Which Promotes Cellular Growth. *J. Biol. Chem.* 272, 32360–32369.
- Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C.A., Sriuranpong, V., Iso, T., Meszoely, I.M., Wolfe, M.S., et al. (2003). Notch mediates TGF $\alpha$ -induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 3, 565–576.
- Motoo, Y., Iovanna, J.L., Mallo, G.V., Su, S.-B., Xie, M.-J., and Sawabu, N. (2001). p8 Expression Is Induced in Acinar Cells During Chronic Pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* 46, 1640–1646.
- Nammo, T., Yamagata, K., Tanaka, T., Kodama, T., Sladek, F.M., Fukui, K., Katsube, F., Sato, Y., Miyagawa, J.-I., and Shimomura, I. (2008). Expression of HNF-4 $\alpha$  (MODY1), HNF-1 $\beta$  (MODY5), and HNF-1 $\alpha$  (MODY3) proteins in the developing mouse pancreas. *Gene Expr. Patterns GEP* 8, 96–106.
- Patarrão, R.S., Wayne Lutt, W., and Paula Macedo, M. (2014). Assessment of methods and indexes of insulin sensitivity. *Rev. Port. Endocrinol. Diabetes E Metab.* 9, 65–73.
- Sakuraba, H., Mizukami, H., Yagihashi, N., Wada, R., Hanyu, C., and Yagihashi, S. (2002). Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45, 85–96.
- Sawey, E.T., Johnson, J.A., and Crawford, H.C. (2007). Matrix metalloproteinase 7 controls pancreatic acinar cell transdifferentiation by activating the Notch signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19327–19332.
- Tattersall, R.B., and Fajans, S.S. (1975). A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes* 24, 44–53.
- Thomas, C.P., Erlandson, J.C., Edghill, E.L., Hattersley, A.T., and Stolpen, A.H. (2008). A genetic syndrome of chronic renal failure with multiple renal cysts and early onset diabetes. *Kidney Int.* 74, 1094–1099.
- Tjora, E., Wathle, G., Erchinger, F., Engjom, T., Molven, A., Aksnes, L., Haldorsen,

I.S., Dimceovski, G., Raeder, H., and Njølstad, P.R. (2013). Exocrine pancreatic function in hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$ -maturity-onset diabetes of the young (HNF1B-MODY) is only moderately reduced: compensatory hypersecretion from a hypoplastic pancreas. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 30, 946–955.

Ulinski, T., Lescure, S., Beaufile, S., Guignon, V., Decramer, S., Morin, D., Clauin, S., Deschênes, G., Bouissou, F., Bensman, A., et al. (2006). Renal phenotypes related to hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) mutations in a pediatric cohort. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 17, 497–503.



## Article 3 : Implication of epigenetics in pancreas development and disease (review)

*Publié*



Contents lists available at ScienceDirect

## Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/beem](http://www.elsevier.com/locate/beem)



6

### Implication of epigenetics in pancreas development and disease



Evans Quilichini, PhD Student <sup>a, b</sup>,  
Cécile Haumaitre, PhD, Principal Investigator <sup>a, b, c, \*</sup>

<sup>a</sup> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR7622, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Paris F-75005, France

<sup>b</sup> Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR7622-IBPS, Paris F-75005, France

<sup>c</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), France

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Available online 23 October 2015

##### Keywords:

epigenetics  
pancreas development  
β-cells  
DNA methylation  
histone modifications  
non-coding RNAs  
stem cell differentiation  
diabetes  
pancreatic cancer

Pancreas development is controlled by a complex interaction of signaling pathways and transcription factor networks that determine pancreatic specification and differentiation of exocrine and endocrine cells. Epigenetics adds a new layer of gene regulation. DNA methylation, histone modifications and non-coding RNAs recently appeared as important epigenetic factors regulating pancreas development. In this review, we report recent findings obtained by analyses in model organisms as well as genome-wide approaches that demonstrate the role of these epigenetic regulators in the control of exocrine and endocrine cell differentiation, identity, function, proliferation and regeneration. We also highlight how altered epigenetic processes contribute to pancreatic disorders: diabetes and pancreatic cancer. Uncovering these epigenetic events can help to better understand these diseases, provide novel therapeutical targets for their treatment, and improve cell-based therapies for diabetes.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### Introduction

The pancreas originates from the embryonic foregut endoderm. Pancreas development is based on a series of lineage decisions, giving rise to endocrine and exocrine cells. The exocrine pancreas consists of

\* Corresponding author. UMR 7622, CNRS, UPMC, IBPS, Department of Developmental Biology, 9 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France. Tel.: +33 1 44 27 21 51; Fax: +33 1 44 27 34 45.

E-mail address: [cecile.haumaitre@inserm.fr](mailto:cecile.haumaitre@inserm.fr) (C. Haumaitre).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2015.10.010>

1521-690X/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

acinar cells that secrete digestive enzymes into the ductal network. Islets of Langerhans containing hormone-producing endocrine cells, including  $\beta$  (insulin),  $\alpha$  (glucagon) and  $\delta$  (somatostatin) cells, maintain glucose homeostasis. Transcription factors (TFs) play dominant roles in instructing this differentiation program, such as Pdx1 required for the specification of multipotent pancreatic progenitor cells (MPCs), and Neurog3 specifying endocrine precursors (reviewed in Ref. [1]). However, less is known about the epigenetic mechanisms that coordinately regulate pancreatic lineage determination and cell-fate decisions.

Epigenetics refers to heritable changes in gene expression patterns without alteration of the underlying DNA sequence. DNA methylation, histone modifications and non-coding RNAs (ncRNAs) are currently considered as epigenetic mechanisms. (i) DNA methylation occurs at cytosine-guanine (CpG) sites and is associated with gene silencing in a cell-type-dependent manner. The DNA methylation profile is established and maintained by DNA methyltransferases (DNMTs): Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b, and changes dynamically during development [2]. (ii) Post-translational modifications of histones modulate chromatin structure and regulate accessibility of genes to TFs by formation of permissive or repressive states. Histone-modifying enzymes promote the addition or the loss of specific marks such as methylation, acetylation or ubiquitination. Histone methylation is catalyzed by histone methyltransferases (HMTs), whereas the reverse reaction is promoted by histone demethylases (HDMs). Polycomb-group (PcG) proteins form two families of complexes, Polycomb-repressive complex 1 (PRC1) and PRC2, and establish key repressive histone methylation marks. PRC2 comprises Ezh2, which catalyzes the trimethylation of histone H3 lysine 27 (H3K27me3), a repressive histone mark. PRC1 includes Bmi1 and Ring1b, catalyzing H2AK119 ubiquitination. Histone methylation can also be associated with transcriptional activation. H3K4me3, catalyzed by Trithorax-group (TrxG) proteins, is a prominent active histone mark [3]. Histone acetylation, mediated by histone acetyltransferases (HATs), prevents chromatin condensation, thus allowing transcriptional activation. Conversely, removal of acetyl groups leads to chromatin compaction resulting in transcriptional repression. Deacetylation is mediated by histone deacetylases (HDACs), which are grouped into different classes such as class I (Hdac1, -2, -3, -8) and class IIa (Hdac4, -5, -7, -9) [4]. (iii) ncRNAs refer to a large cluster of RNAs which are not translated into proteins. They include microRNAs (miRNAs, <20 nucleotides) and long ncRNAs (lncRNAs, >200 nucleotides), whose expression is tissue and stage specific. MiRNAs alter mRNA stability, and even though they are not considered a true epigenetic mechanism, they interact with epigenetic regulators such as Dnmt3, Ezh2 and Hdac1. Long ncRNAs bind to TFs and recruit chromatin-modifying complexes [5].

In this review, we first present implication of these epigenetic factors along the steps of pancreas development. Then, we depict the epigenetic mechanisms ensuring maintenance of pancreatic cell identity, function and regeneration. We discuss epigenetic regulation of stem cell differentiation and reprogramming. Finally, we highlight importance of epigenetics in disease: diabetes and pancreatic cancer. For each part, DNA methylation, histone-modifications and ncRNAs are described sequentially. Implication of epigenetics in pancreas development, function and disease is illustrated in Fig. 1. The main epigenetic regulators are summarized in Table 1.

### Epigenetics of pancreas development

#### *Epigenetic mechanisms regulating differentiation of embryonic stem (ES) cells to multipotent pancreatic progenitor cells (MPCs)*

Chromatin reorganization controls accessibility for TFs and prepare ES cells to respond to signals, thus allowing differentiation along a particular lineage, such as the endoderm. DNA methylation ensures the proper spatial and temporal developmental gene regulation by TFs contributing to the restriction of the differentiation potential. As an example, loss of DNA methylation allowed the conversion of mesoderm cells to endoderm cells in response to the TF Gata4 in *Dnmt1*- and *Dnmt3a/Dnmt3b*-deficient mesoderm cells [6].

Genome-wide studies have revealed that the promoters of lineage regulators in ES cells contain bivalent chromatin domains that harbor both repressive (H3K27me3) and active (H3K4me3) marks. This bivalent chromatin profile keeps lineage regulators poised for rapid activation and plays important

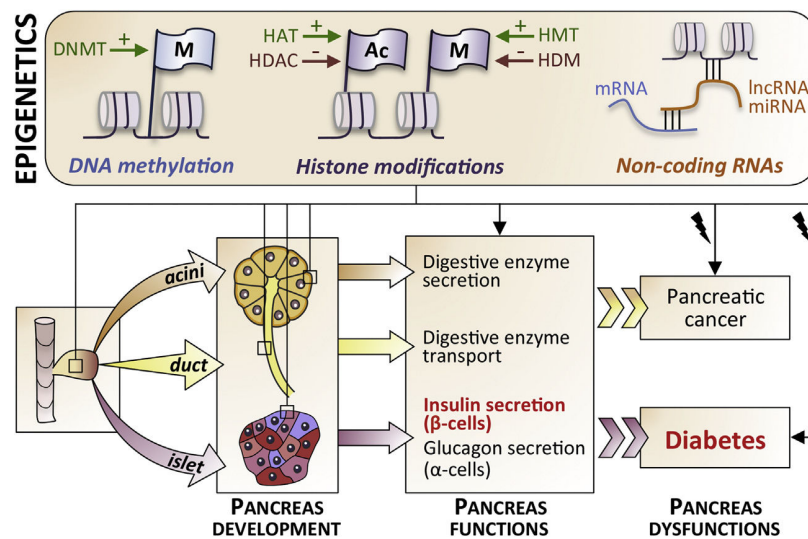


Fig. 1. Implication of epigenetics in pancreas development, function and disease.

roles in maintaining the balance between self-renewal and differentiation. In response to differentiation cues, the bivalent domains are resolved with the removal of H3K27me3 and activation of lineage-specific developmental genes, by the HDMs Kdm6a (Utx) and Kdm6b (Jmjd3) that play an important role in endoderm differentiation [7]. Kdm6b sequentially associates with two T-box factors, Tbx3 and Eomes, leading to a spatial reorganization of the chromatin at the Eomes locus and response to Activin signaling, thus driving ES cell differentiation towards the definitive endoderm lineage [8]. Kdm6a and Kdm6b also contribute to definitive endoderm differentiation through modulation of the WNT pathway, by sequentially activating Wnt3 and Dkk1 [9]. Liver and pancreas progenitors arise from foregut endoderm and their regulatory elements exhibit distinct functional pre-pattern of chromatin states in undifferentiated endoderm cells. The H3K27me3 repressive mark was enriched at the pancreas elements such as Pdx1, by contrast with the liver elements. The H3K27 methyltransferase Ezh2 indirectly promotes the liver program by restraining the differentiation of endoderm cells into the pancreatic lineage. In parallel, a pathway by which the BMP signal recruits the HAT P300 results in histone acetylation at liver target elements and enhances liver bud emergence [10]. Hdac1 mediates also a fate switch, being required for establishing hepatic and exocrine pancreatic fates at the expense of non-hepatic foregut endoderm in zebrafish [11].

Epigenetic regulation occurs at the stage of MPCs. Pancreas development is abrogated when *Dnmt1* is deleted from MPCs. *Dnmt1* represses the *p53* regulatory region to maintain MPC survival [12]. Another study investigated the influence of the Swi/Snf chromatin remodeler, composed of the two core ATPase subunits, Brg1 and Brm [13]. Conditional inactivation of *Brg1* in MPCs leads to a normal but hypoplastic pancreas. Brg1 probably decreases Pdx1<sup>+</sup> MPC number by affecting their proliferative capacity, through Pdx1 recruitment of Swi/Snf to progenitor target genes [14]. The RNAi machinery has also a role in maintaining MPCs, as conditional inactivation of the miRNA processing enzyme *Dicer1* in MPCs leads to pancreas agenesis and neonatal death [15].

#### Epigenetic mechanisms regulating differentiation of MPCs to exocrine cells

The role of DNA methylation in exocrine cell differentiation was assessed by knockdown of *Dnmt1* in zebrafish embryos, showing that *Dnmt1* is required for acinar cell survival but not for pancreatic duct or endocrine cell formation [16,17].

**Table 1**  
Main epigenetic regulators cited in the text.

Epigenetic mechanism	Epigenetic mark	Regulated by	Function
<b>DNA METHYLATION</b>			
DNA methylation	/	DNA methyltransferases (DNMTs): DNMT1, DNMT3A, DNMT3B	Repression
DNA demethylation	/	TET family proteins	Activation
<b>HISTONE MODIFICATIONS</b>			
Histone methylation	H3K27me3	Polycomb-Repressive Complexes (PRC1 and PRC2); Histone methyltransferase (HMT) EZH2 (in PRC2)	Repression
Histone ubiquitination	H2AK119ub1	BMI and RING1B (in PRC1)	Repression
Histone methylation	H3K4me1/me2 H3K4me3	HMT SET7/9 Trithorax-group (TrxG) proteins: HMT MLL1	Activation Activation
Histone demethylation	H3K27	Histone demethylases (HDMs): KDM6A (UTX) and KDM6B (JM3)	Activation
Histone acetylation	H3K4ac/H3K27ac	Histone acetyltransferases (HATs)	Activation
Histone deacetylation	/	Histone deacetylases (HDACs)	Repression
<b>CHROMATIN REMODELING</b>			
Nucleosome remodeling	/	SWI/SNF Complex: BRG1 and BRM	Activ./Repress.
<b>NON-CODING RNAs</b>			
miRNA	/	Endonuclease Dicer (governs miRNA processing)	Activ./Repress.

HDACs are involved in acinar cell differentiation. Treatment of embryonic pancreas explants with HDAC inhibitors (HDACi) suppresses acinar differentiation, whereas ductal and endocrine cell fates are promoted. This demonstrates that modulation of acetylation by HDAC inhibition regulates pancreatic cell fate decision from MPCs [18]. Hdac1 is required for exocrine differentiation in zebrafish [11]. Hdac1 plays a proliferative role in acinar and ductal morphogenesis, mediating cell cycle progression through modulation of the expression of cyclin-dependant kinase (CDK) inhibitors and the SHH pathway components [19].

MiRNAs also control acinar cell differentiation. Conditional inactivation of *Dicer* in acinar cells has shown that miRNAs are required to establish acinar cell differentiation, and maintain acinar cell morphology and polarity. Let-7b and miR-495 repress the TF Hnf6, constituting a critical network that ensure acinar homeostasis, by driving differentiation of acinar cells while repressing hepatic gene expression [20]. MiR-18a plays also a fine-tuning role in acinar cell differentiation, by regulating expression of the TF Ptf1a in MPCs and acinar cells [21].

#### *Epigenetic mechanisms regulating differentiation of MPCs to endocrine cells*

A genome-wide analysis of the repressive mark H3K27me3 was performed during pancreatic endocrine specification, by comparing endoderm cells, pancreas progenitors, and endocrine progenitors from mouse embryos at different stages. H3K27me3 domains increase in number during endocrine progenitor development in vivo. In correlation, *Ezh2* that catalyzes H3K27me3 restrains the induction of the endocrine commitment step, as deletion of *Ezh2* at the pancreas progenitor stage enhances the production of endocrine progenitors and  $\beta$ -cells. Moreover, inhibition of *Ezh2* activity in embryonic pancreas explants increases endocrine progenitors [22]. Ring1b establishes repressed states that refine the neuroendocrine phenotype of islets and prevent inappropriate gene expression in differentiated cells. Ring1b bookmarks selected target genes in MPCs to establish transcriptional repression of genes that are later locked in a stably repressed state through Ring1b-independent mechanisms in differentiated  $\beta$ -cells [23].

Endocrine differentiation is also controlled by HDACs, since inhibiting HDAC enhances endocrine differentiation. Treatment of embryonic pancreas explants with HDACi promotes the Neurog3 pro-



endocrine lineage, leading to an increased pool of endocrine progenitors. Moreover, TSA and NaB treatment increases  $\beta$ -cells [18,24]. The role of class IIa HDACs was explored and their expression was found restricted to  $\beta$ - and  $\delta$ -cells. An increased  $\beta$ -cell and/or  $\delta$ -cell mass was found in *Hdac4*, -5 and -9 mutant pancreases. Treatment of pancreatic explants with the class IIa HDACi MC1568 enhances expression of Pax4, a key TF required for proper  $\beta$ - and  $\delta$ -cell differentiation, and amplifies the pool of  $\beta$ - and  $\delta$ -cells. Conversely, *Hdac4* and *Hdac5* overexpression shows a decreased pool of  $\beta$ - and  $\delta$ -cells. Thus, a dynamic change in histone acetylation is important for the specification of the different endocrine cell subtypes and *Hdac4*, -5, -9 are key epigenetic regulators of  $\beta$ - and  $\delta$ -cell differentiation [25]. Another epigenetic complex, composed of the TF Nkx2.2, Dnmt3a and the repressor Grg3, regulates endocrine cell subtype differentiation. At embryonic day 13.5 (E13.5), Grg3-mediated Nkx2.2 repressor activity influences the competency of the Neurog3<sup>+</sup> endocrine progenitor to differentiate into  $\epsilon$ - versus  $\beta$ -cells [26].

MiRNAs are required for endocrine cell maturation. Conditional deletion of *Dicer* in MPCs causes a loss of endocrine cells, attributed to a reduced number of Neurog3<sup>+</sup> cells [15]. Deletion of *Dicer* in endocrine progenitors leads to islet morphological defects in the neonatal period, loss of insulin expression and diabetes [27]. A role for miR-375 was determined in pancreatic islet development in zebrafish [28]. MiR-7, specifically expressed in endocrine precursors and in mature endocrine cells, acts to limit *Pax6* expression, a TF pivotal in hormone-producing cell type differentiation, allowing precise endocrine cell maturation [29]. A study highlighted a link between miRNA, DNA demethylation, and endocrine cell differentiation. MiR-26a is able to directly target Ten eleven translocation (TET) enzymes, recently identified to mediate DNA demethylation, and then modulates 5-hydroxymethylcytosine levels (5hmC). Regulation of TETs by miR-26a promotes differentiation and proliferation of endocrine cells. TETs are downregulated in islets during postnatal differentiation, whereas miR-26a is upregulated. Overexpression of miR-26a in mice increases postnatal islet cell number [30]. LncRNAs appear also to have a role in islet maturation as more than one thousand lncRNAs were found conserved in mouse and human islets. Remarkably, 55% of identified lncRNAs were islet specific and developmentally regulated [31,32].

### Epigenetics and pancreas plasticity

#### *Epigenetic mechanisms regulating maintenance of exocrine cell identity and regeneration*

Epigenetic mechanisms are involved in the morphogenetic plasticity of exocrine cells, essential in differentiation and tumorigenesis processes. Acinar cells display a robust capacity to undergo regeneration and renewal in response to insults that disrupt tissue integrity. Pancreatic injury triggers a regenerative program, which is crucial for pancreas recovery. This program is critical for the maintenance of tissue homeostasis as sustained engagement of tissue repair mechanisms is linked to neoplasia. Loss of acinar cell identity during pancreatic injury leads to acinar-to-ductal metaplasia (ADM). Chronic exposure to injury and regeneration in the pancreas is associated with high neoplastic risk. The process of regeneration associated with acute or chronic pancreatic injury involves an induction of *Bmi1* expression in acinar cells, this member of the PRC1 complex being normally not expressed in adult acinar cells. Moreover, *Bmi1* plays a role in preneoplastic states in the pancreas and in tumor development. In areas of chronic pancreatic damage, *Bmi1* expression correlates with increased cell proliferation and ADM [33]. *Ezh2* is required for acinar cell regeneration. *Ezh2* is upregulated following pancreatic injury and conditional inactivation of *Ezh2* in acinar cells results in a defective regenerative response to cerulein-induced injury in mice, with persistence of metaplastic lesions reflecting their compromised proliferation. *Ezh2* is indeed required to maintain gene silencing of the *p16<sup>INK4A</sup>* cell cycle inhibitor in the metaplastic epithelium of the regenerating pancreas. *Ezh2* restricts neoplastic progression through homeostatic mechanisms that control regeneration and prevent inflammation [34].

#### *Epigenetic mechanisms regulating endocrine cell identity and function*

Islet cells display a cell-type epigenomic plasticity. A human cell-type specific study of histone methylation signatures, by ChIP-sequencing and RNA-sequencing, determined the epigenetic and

transcriptional landscape of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells. In contrast to  $\beta$ -cells, differentiated  $\alpha$ -cells exhibit many genes marked bivalently (with activating H3K4me3 and repressing H3K27me3 marks), and a cell-fate conversion of  $\alpha$ - to  $\beta$ -cells can be promoted by manipulating the histone methylation signature of human islets [35]. In differentiated  $\beta$ -cells, the epigenetic landscape needs to be actively maintained to stabilize cellular identity and DNA methylation is essential for repression of  $\alpha$ -cell lineage genes. An active repression of *Arx*, a major regulator of  $\alpha$ -cell, is required to maintain  $\beta$ -cell identity. Deletion of *Dnmt1* or *Dnmt3a* leads to derepression of *Arx*, and  $\beta$ - to  $\alpha$ -cell conversion. In  $\beta$ -cells, Nkx2.2 binds the hypermethylated promoter of *Arx*, in a complex with Dnmt3a and preferentially recruits Grg3 and Hdac1 to repress *Arx* transcription [26]. In addition, methylated region of the *Arx* locus in  $\beta$ -cells is bound by the methyl-binding protein MeCP2, which recruits the HMT PRMT6, that mediates histone arginine H3R2 methylation, resulting in repression of *Arx* [36]. Altogether, these studies show that, in  $\beta$ -cells, Nkx2.2, Dnmt3a, and MeCP2 coordinately bind the methylated DNA of the *Arx* promoter, recruit the histone modifiers HDAC1 and PRMT6, and repress *Arx* expression, illustrating the importance of epigenetic factors in maintaining adult  $\beta$ -cell identity.

TFs such as Pdx1 have important role in mature  $\beta$ -cell function and need chromatin-modifying factors to modulate gene transcription effectively. By the differential recruitment of HAT or HDAC, Pdx1 provides an epigenetic dynamic regulation of *Insulin* transcription in response to glucose. In  $\beta$ -cell lines, the HAT P300 cooperates with Pdx1 to facilitate *Insulin* transcription under high-stimulating glucose concentrations. Conversely, under low-inhibitory glucose levels, Pdx1 associates with Hdac1 and Hdac2 to inhibit *Insulin* transcription [37–39]. Blood glucose signaling also regulates dynamically the association of Pdx1 to the Swi/Snf chromatin remodeler. The antagonistic actions of Brg1-Swi/Snf and Brm-Swi/Snf distinctly affect target gene expression in  $\beta$ -cells and have significant implications for glucose homeostasis. Brg1-Swi/Snf serves as a coactivator of Pdx1-mediated gene expression in  $\beta$ -cells, whereas Brm-Swi/Snf acts in a corepressive manner [14]. Strongly enriched in islets, the HMT Set7/9 is necessary for the transcription of essential genes controlling glucose-stimulated insulin secretion in primary islets. Set7/9 is recruited to specific  $\beta$ -cell genes such as *Insulin* and *Glut2* through interaction with TFs such as Pdx1, leading to maintenance of the active mark H3K4me2 [40]. Under conditions of hyperglycemia and endoplasmic reticulum stress, Set7/9 displays nuclear-to-cytoplasmic localization in  $\beta$ -cells. Exclusion of Set7/9 from the nucleus correlated with a loss of H3K4me2 at the *Insulin* promoter and a decreased  $\beta$ -cell secretory function [41].

MiRNAs are required in  $\beta$ -cells by controlling expression levels of genes essential for maintenance of  $\beta$ -cell identity and function (reviewed in [42]). A  $\beta$ -cell specific conditional inactivation of *Dicer*, resulting in a global loss of miRNAs, leads to progressive impairment of insulin secretion, glucose homeostasis and diabetes [43]. The profile of miRNAs differentially expressed in  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells was determined, as well as their potential TF targets [44]. Among them, miR-375 is a critical regulator of  $\beta$ -cell function [45], miR-26, miR-148 and miR-182 regulate *Insulin* promoter activity [46]. LncRNAs seem also to contribute to the unique regulatory environment found in islet cell-subtypes. The study that evaluated the cell-specific epigenetic and transcriptional landscape of human  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells identified 12  $\beta$ -cell-specific and 5  $\alpha$ -cell-specific lncRNAs [35]. LncRNAs appear to control  $\beta$ -cell function through the regulation of imprinted loci [47]. A  $\beta$ -cell-specific lncRNA, the lncRNA *HI-LNC25*, influences gene expression in mature  $\beta$ -cells. Depletion of *HI-LNC25* indeed decreases expression of the TF and monogenic diabetes gene *GLIS3* [31].

#### Epigenetic mechanisms regulating $\beta$ -cell proliferation and regeneration

Regulation of  $\beta$ -cell proliferation is critical to adapt to metabolic demand. For example, Menin-dependent histone methylation provides an epigenetic mechanism for controlling  $\beta$ -cell expansion during pregnancy. In pregnant mice, the hormone Prolactin reduces levels of Menin, an endocrine tumor suppressor and transcriptional regulator. Menin associates with a HMT complex, promoting H3K4me3. This maintains expression of *p27<sup>Kip1</sup>* and *p18<sup>INK4C</sup>*, which encode CDK inhibitors and prevent islet proliferation [48].

$\beta$ -cell proliferation and regeneration decrease with age and are regulated by epigenetic modifications at the *Cdkn2a* locus through PRC1, PRC2 and TrxG complexes. Expression of the cell cycle inhibitor *p16<sup>INK4a</sup>*, encoded by *Cdkn2a*, increases with age, and reduces the proliferative and regenerative

capacity of aged  $\beta$ -cells. *Ezh2* promotes  $\beta$ -cell replication, by repressing *Cdkn2a*, through H3K27me3. With age, there is a decreased expression of the two PcG proteins *Ezh2* and *Bmi1*. This is associated with a loss of repressive marks, essentially H3K27me3, decreased *Bmi1* binding, loss of H2A ubiquitination, increased recruitment of the TrxG protein *Mll1*, and a concomitant increase in H3K4me3, leading to derepression of the *Cdkn2a* locus [49,50]. During regeneration, after  $\beta$ -cell destruction with streptozotocin, increased *Bmi1* binding to the *Cdkn2a* locus coincides with decreased H3K4me3 and leads to a decrease in p16<sup>Ink4a</sup> levels, resulting in increased  $\beta$ -cell proliferation [50]. In old mice, combined knockdown of *Mll1*-containing TrxG complex with *Ezh2* overexpression increases  $\beta$ -cell replication [51]. Thus, epigenetic manipulation of these complexes or their respective histone modification marks in  $\beta$ -cells might be a useful tool for promoting  $\beta$ -cell proliferation and regeneration.

### Epigenetics of embryonic stem cell differentiation and reprogramming

In clinical practice, type 1 diabetic patient can receive islet transplantation of two or three donors, but the scarcity of islet donors has restricted this therapy. A major goal is to generate unlimited number of  $\beta$ -cells from ES cells (ESC) or human induced pluripotent stem cell (hPSC), as a renewable cell-based therapy for the treatment of diabetic patients. Several protocols based on the fundamental knowledge acquired by studying pancreatic development attempted to recapitulate these different steps from ESC to definitive endoderm (DE), primitive gut tube (GT), pancreatic endoderm (PE), endocrine precursors and  $\beta$ -cells. Epigenetic compounds and compounds that regulate signaling pathways help to ameliorate these protocols to produce functional  $\beta$ -cells at a sufficiently high efficiency [52–54]. The majority of protocols have failed to produce fully functional  $\beta$ -cells without an *in vivo* maturation stage in mice. Thus, understanding regulators such as epigenetic actors involved in this critical maturation stage is crucial for the therapeutic generation of  $\beta$ -cells. For example, the six lncRNAs whose expression was found only activated at this last stage could be useful [31,32]. One identified dysfunction of *in vitro*-produced  $\beta$ -cells is an inappropriate remodeled chromatin compared to primary human islets, linked to a failure to eliminate PcG-mediated repression on endocrine-specific genes, thus identifying a possible strategy for improving cell differentiation [55]. Finally, precise modifications of epigenetic profiles may allow conversion of pancreatic cells into bona fide  $\beta$ -cells.

These protocols can also help to understand the epigenetic mechanisms that orchestrate remodeling of the chromatin landscape and drive the different steps of differentiation. Epigenetic regulation of gene enhancer elements is important for establishing cell identity. Histone H3K27ac distinguishes active enhancers from unmarked (i.e. inactive, lacking all of the features associated with the active enhancer state), or poised enhancer, carrying H3K4me1 in the absence of H3K27ac [56]. Poised enhancers are important for the plasticity of developmental decisions. They can acquire the signature of active enhancers in response to environmental or developmental stimuli. These regulatory events at enhancers contribute to the specific gene expression programs that determine cell state and the potential for differentiation into new cell types. They might facilitate cell reprogramming strategies for use in regenerative medicine [57,58]. A study mapped enhancer-related histone modifications during human ESCs differentiation toward the pancreatic fate at defined stages (from ESCs to PE) [59]. Classes of active enhancers (H3K4me1, H3K27ac) and poised enhancers (only H3K4me1) were defined. Interestingly, a poised enhancer landscape linked to genes of multiple GT-derived lineages is gained during the transition of DE to GT. Analysis of active enhancers in human islets determined that enhancers of endocrine-cell genes are pre-marked in PE, prior to terminal differentiation. This study allows the identification of a poised chromatin state at enhancers as a mechanism by which progenitor cells acquire developmental competence. These findings have also implications for differentiation protocols, as cells have to acquire the transcriptional competence to appropriately respond to instructive signals given by compounds [59].

Cellular reprogramming of somatic cells is an alternative strategy to generate  $\beta$ -cells. Altering chromatin modification state of a human cell may enhance conversion to insulin-secreting cells. For example, a study achieved the direct conversion of adult human skin fibroblasts into insulin-secreting cells, avoiding a stable pluripotent stage and transgenic modification. Adult human skin fibroblasts were exposed to a DNMTi followed by a three-step protocol for the induction of pancreatic endocrine differentiation [60]. In another protocol, epigenetic modulating factors (a HDACi and a DNMTi) with

overexpression and silencing of genes important for pancreatic endocrine development were used on primary human dermal fibroblasts to transdifferentiate into islet-like cells that decrease glycemic levels in diabetic mice [61].

A major aspect of cellular reprogramming concerns the stability of epigenetic information, which is relevant to the functionality and safety of reprogrammed hPSC. hPSC showed a potentially high degree of imprint instability during reprogramming due to epigenetic alterations related to DNA methylation and regulation of imprinted genes [62]. Further studies will be required to resolve this question.

### Epigenetic mechanisms involved in diabetes

Type 2 diabetes (T2D) is associated with a reduction in  $\beta$ -cell mass and impaired  $\beta$ -cell function. Genome-wide association studies (GWAS) have identified more than 70 loci robustly associated with T2D risk, but that explain only ~11% of T2D cases. Most of the causal single nucleotide polymorphisms (SNPs) fall outside coding genes, suggesting that epigenetics is important for the pathophysiology of T2D [63].

Environment can affect gene expression through epigenetics. Animal models of prenatal under-nutrition showed that rats exposed to intrauterine growth retardation (IUGR) develop T2D in the adulthood due to a self-propagating epigenetic silencing cycle of the *Pdx1* locus. In this model, *Pdx1* expression is decreased due to histone deacetylation and chromatin remodeling. Hdac1 is recruited and decreases histone acetylation. The recruitment of a HMT increases H3K9me2, repressing *Pdx1*. The phenomenon is reversible in neonatal islets with HDACi treatment but not in adult, where DNA methylation locks the promoter into a silenced state, resulting in diabetes [64]. The TF and monogenic diabetes gene *Hnf4a* is epigenetically regulated by maternal diet and aging in rat islets. A progressive epigenetic silencing of the entire *Hnf4a* locus in islets prevents enhancer–promoter interaction and increases the risk of T2D [65]. Tissue-specific methylation and parental imprinting of the growth factor receptor-bound protein 10 (*GRB10*) gene, a negative regulator of insulin signaling, influence glucose metabolism and contribute to T2D. Interestingly, allelic imbalance was observed with different effects on glucose metabolism, if the allele of the *GRB10* variant was transmitted from fathers or mothers [66].

Altered DNA methylation at promoters of genes critical for  $\beta$ -cell function contributes to T2D. Increased DNA methylation at promoters of *PDX1* and *PPARGC1A* associates with decreased gene expression and reduced insulin secretion in islets from T2D patients [67,68]. Global DNA methylation and gene expression analyses from islets from T2D and non-diabetic donors reveal that 96% of the sites showing differential methylation in T2D islets display decreased methylation, including genes related to signaling pathways essential for  $\beta$ -cell adaptation and apoptosis, such as *CDK5R1* (Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit 1). It encodes a direct activator of CDK5, leading to decreased transcription of *Pdx1* and *Insulin*. By contrast, a minority of genes are hypermethylated and silenced in islets from T2D donors, such as *PAX4*, essential for  $\beta$ -cells. Aberrant methylation contributes to a loss of  $\beta$ -cell identity under pathophysiological conditions [69]. Another recent study described the human methylome and transcriptome in islets from T2D donors, providing a detailed map of the global DNA methylation pattern in islets,  $\beta$ - and  $\alpha$ -cells. 75% of the differentially expressed genes show a decreased methylation, associated with increased gene expression in T2D islets. Candidate genes affecting  $\beta$ - and  $\alpha$ -cells were identified, such as *CDKN1A* and *EXOC3L2*, which regulate  $\beta$ -cell proliferation and exocytosis, respectively [70]. SNPs identified as T2D risk variants might introduce or remove a CpG dinucleotide, a mechanism through which they can influence DNA methylation patterns, thus affecting gene function and contributing to the disease [71]. TFs interact functionally with the epigenome and dysregulation of islet enhancers is relevant to the mechanisms underlying T2D. Many variants associated with T2D reside in clusters of enhancers that form physical three-dimensional chromatin domains and abolish enhancer activity [72].

The epigenetic architecture of human islets was analyzed by ChIP-seq to create genome-wide maps of histone modifications associated with gene activation (H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K79me2) and repression (H3K27me3). These epigenomic maps can serve to understand the epigenetic basis of T2D [73,74]. A study compared the histone methylation profile of purified  $\beta$ -cells to the one of MPCs, and differentiated cells including acinar, liver and neural tissue. An important epigenetic event consists in a selective removal of the repressive mark H3K27me3 in a core developmental program that enables

$\beta$ -cells to acquire a neural gene activity state. The finding that a dynamic regulation of PcG repression program shapes the identity of  $\beta$ -cells provides a baseline to investigate how perturbations of the  $\beta$ -cell epigenome can contribute to the development of T2D [75].

MiRNAs and their epigenetic control by DNA methylation contribute to the pathogenesis of T2D. A cluster of miRNAs in the imprinted locus *DLK1-MEG3* is specifically expressed in human  $\beta$ -cells. Downregulation of this miRNA cluster observed in T2D islets from donors correlates with hypermethylation of its promoter. The ncRNA gene *MEG3* is also downregulated in T2D islets [76]. Furthermore, a miR-7 genomic circuit was shown to regulate insulin granule exocytosis in  $\beta$ -cells. MiR-7a levels were found decreased in diabetic mouse models and in T2D islets [77]. A decrease in miR-30d expression is also observed in the islets of diabetic mice. MiR-30d protects cells from TNF- $\alpha$  suppression of Insulin transcription [78]. MiR-185 is downregulated in the islets of diabetic patients and mice. MiR-185 promotes insulin secretion and  $\beta$ -cell growth by targeting SOCS3 and regulating Stat3 pathway [79]. Islet enriched miRNAs could serve as blood marker to detect  $\beta$ -cell death and predict diabetes. The levels of circulating miR-101, miR-375 and miR-802 are increased in T2D patients and may become new biomarkers for T2D [80,81]. Several lncRNAs are found dysregulated in islets from T2D subjects, and one lncRNA regulates *GLIS3*, showing that lncRNAs have the ability to control important diabetes genes [31]. The fact that lncRNAs have the potential to regulate gene expression and cellular identity in  $\beta$ -cells offers the opportunity to better understand T2D etiology and novel targets for treatment [47,82].

### Epigenetic mechanisms involved in pancreatic cancer

In up to 95% cases, pancreatic cancer arises in exocrine cells, the most common being pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). It arises from precursor lesions, including pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and intraductal papillary mucinous neoplasia (IPMN) [83]. The role of *Kras* as an initiating cancer mutation is one of the best established mechanism required for the development of pancreatic cancer. In addition to an accumulation of somatic mutations that affect the DNA sequence directly, epigenetic reprogramming can lead to an increased cell growth and survival, and contribute to tumorigenesis.

DNA methylation of tumor suppressor gene promoter sites is a major epigenetic mechanism, which plays a role in tumorigenesis. *APC*, *BRCA1*, *p16<sup>INK4a</sup>* are the most frequently methylated gene promoter regions in human pancreatic neoplasms [84]. Genome-wide patterns of DNA methylation in PDAC reveal an enrichment of aberrantly methylated genes involved in key mechanisms: TGF- $\beta$ , WNT, integrin signaling, cell adhesion, stellate cell activation. Another analysis suggests an epigenetic suppression of SLIT-ROBO signaling and upregulation of *MET* and *ITGA2* [85]. Epigenetic silencing of *EYA2*, associated with promoter methylation and histone deacetylation, promotes tumor growth, whereas overexpression in mice limits the growth and metastases of PDAC [86]. Downregulation of *WNK2* by promoter hypermethylation is observed in PanIN and in a PDAC mouse model, enhancing tumor cell growth via the ERK–MAPK pathway [87]. Aberrant DNA methylation of miRNAs occurs in PDAC. MiR-615-5p is silenced in PDAC cell lines by promoter hypermethylation, which limited its inhibition on *IGF2*, thereby contributing to tumor growth and invasion [88]. PDAC have patterns of gene methylation that differ from pancreatic endocrine tumors (pNET). Analysis of the epigenome of pNET tissue also identified mutations of the chromatin-remodeling genes *ATRX/DAXX* and inactivating mutations of *MEN1*, encoding menin [89].

PDAC involves an increased expression of *DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B*. A cooperation between *DNMT1* and *HDAC1* was suggested, DNA methylation initiating the repression, which is then executed by histone deacetylation. Increased expression levels of *DNMT1* and *HDAC1* are found from precancerous lesions to pancreatic cancer, and reflect the malignancy of PDAC [90]. *HDAC1* contributes to the uncontrolled proliferation during pancreatic tumorigenesis. The developmental events described above, in which *Hdac1* mediates cell cycle progression through modulation of the expression of CDK inhibitors and the SHH pathway components, are recapitulated in human PDAC cells [19]. Expression of *Sin3b*, encoding proteins of the *Hdac1/2* repression complex, was also found upregulated in a mouse model of PDAC [91]. *Sin3b* inactivation in mice leads to delayed PDAC progression, associated with impaired inflammatory response [92]. Moreover, *Sin3b* was found as a novel direct target of *Bmi1*

forming an essential epigenetic complex of cellular senescence. Upon oncogenic stress, Bmi1 dissociates from the *Sin3b* locus, resulting in increased *Sin3b* expression and entry into cellular senescence through derepression of the *Cdkn2* locus [93]. Brg1 is also a critical epigenetic regulator of genes important for IPMN and PDAC progression. Acinar deletion of *Brg1* in mice cooperates with oncogenic Kras to form cystic neoplastic lesions that resemble human IPMN and progress to PDAC. Enrichment for H3K27Me3 mark on the promoters of several genes is associated with reduced expression of these genes in Brg1-depleted IPMN–PDAC cells [13]. Methyl-CpG binding domain protein 1 (MBD1) promotes pancreatic cell invasion. MBD1 forms a complex with Twist and NAD-dependent deacetylase SIRT-1 on the *CDH1* promoter, which results in epigenetic downregulation of *E-cadherin* and increased epithelial-to-mesenchymal transition [94]. *Bmi1*, *Ring1b* and *Ezh2* are upregulated in PDAC, and H2AK119Ub1 and H3K27Me3 marks may serve as discriminatory biomarkers for PDAC staging [33,95]. The genomic landscape of PDAC human cell lines, explored by ChIP-seq and RNA-seq, reveals regions with an enrichment of positive marks (H3K4me1, H3K4me3, RNA Pol II) and a depletion of negative marks (H3K27me3), in correlation with gene expression. Global analyses of epigenetic marks and transcribed sequences can contribute to understand the mechanisms underlying PDAC. In this study, *ALDH1A3* was upregulated and identified as a novel candidate gene for PDAC [96].

Misexpression of miRNAs is commonly observed in PDAC and its precursor lesions (reviewed in [97]). For example, miR-21 and miR-155 are upregulated in IPMNs and their expression correlates with histological features of progression [98]. By contrast, lower levels of miR-101 can be a trigger for the adenocarcinoma sequence of IPMN, by upregulation of *EZH2* [99].

Thus, epigenetic modifications contribute to the pathogenesis of T2D and to malignant cellular transformation. Therefore, the use of novel targeted epigenetic therapies is very attractive, and may be promising due to the relative reversibility of DNA methylation and chromatin modifications.

#### Practice points

- Specific epigenetic marks can predict cell fate during development.
- Epigenetics has essential roles in pancreatic cell differentiation, maintenance of identity and function.
- Endocrine pancreas displays an inter-cellular plasticity highlighted by bivalent epigenetic marks.
- Epigenetic modifications enhance stem cell differentiation and reprogramming efficiency to pancreatic cells.
- Alteration of pancreatic cell epigenetic landscape can induce diabetes or pancreatic cancer.
- Epigenetic regulation confers cellular plasticity to the pancreas, linked to pancreas regeneration and pancreatic diseases. Knowledge and manipulation of epigenetics can drive reprogramming of pancreatic cells, while controlling the risks of cancer.

#### Research agenda

- Further analyses of epigenetic regulation of acinar and ductal cells
- Epigenomic maps of isolated pancreatic cell populations
- Identify epigenetic marks and epigenetic regulators that facilitate pancreatic differentiation. Target them by epigenetic editing to improve in vitro  $\beta$ -cell differentiation protocols from hPSC and direct reprogramming to  $\beta$ -cells
- Genome-wide analyses to identify non-coding variants that contribute to T2D and develop novel therapies for T2D

**Table 2**  
Studies of the roles of epigenetic actors in pancreas development and  $\beta$ -cell function.

Dev. Stage	Experiment	Cell/organism	Phenotype	Ref
<b>From ES cells to pancreatic progenitors</b>	<i>Dnmt3a</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Dnmt3b</i> <sup>-/-</sup>	Mouse ES cells	Lineage conversion from mesoderm to endoderm	[6]
	double-knock-out <i>KDM6A</i> or <i>KDM6B</i> knock-down	Human ES cells	Impaired endoderm differentiation, rescued by sequential treatment with WNT agonist and antagonist	[9]
	<i>FoxA3-Cre</i> ; <i>Ezh2</i> <sup>fl/fl</sup>	Mouse	Expanded pancreatic progenitor domain at the expense of liver development	[10]
	<i>P300</i> <sup>+/-</sup>	Mouse	Decreased specification of liver over pancreas progenitors	[10]
	<i>Hdac1</i> <sup>s436</sup>	Zebrafish	Hepatic and exocrine pancreatic specification and differentiation severely affected, expanded foregut tissue	[11]
	<i>Pdx1-Cre</i> ; <i>Dnmt1</i> <sup>fl/fl</sup>	Mouse	Pancreas agenesis due to apoptosis of pancreatic progenitors, rescued by haploinsufficiency of p53	[12]
	<i>Ptf1a-Cre</i> ; <i>Brg1</i> <sup>fl/fl</sup>	Mouse	Hypoplastic pancreas	[13]
	<i>Pdx1-Cre</i> ; <i>Dicer</i> <sup>fl/fl</sup>	Mouse	Pancreas agenesis	[15]
<b>From pancreatic progenitors to exocrine cells</b>	<i>Dnmt1</i> knock-down	Zebrafish	Defects in exocrine pancreas differentiation	[16]
	<i>Dnmt1</i> <sup>s872</sup> or <i>Dnmt1</i> <sup>s904</sup>	Zebrafish	Acinar cells apoptosis, no duct or endocrine defects	[17]
	HDAC inhibitors	Mouse	Decreased acinar differentiation in pancreatic explants	[18]
	<i>Hdac1</i> <sup>s436</sup>	Zebrafish	Defects in exocrine pancreas specification and differentiation	[11]
	<i>Hdac1</i> <sup>hi1618</sup>	Zebrafish	Growth arrest and dysmorphogenesis of exocrine pancreas	[19]
	<i>Foxa3-Cre</i> ; <i>Dicer</i> <sup>fl/-</sup> or <i>Ela-Cre</i> ; <i>Dicer</i> <sup>fl/-</sup>	Mouse	Impaired acinar cell differentiation	[20]
<b>From pancreatic progenitors to endocrine cells</b>	<i>Pdx1-Cre</i> ; <i>Ezh2</i> <sup>fl/fl</sup>	Mouse	Increased endocrine progenitors	[22]
	EZH2 inhibitors	Human ES cells	Increased endocrine progenitors in hESCs and pancreatic explants	[22]
	<i>Pdx1-Cre</i> ; <i>Ring1b</i> <sup>fl/fl</sup>   <i>Ins-Cre</i> ; <i>Ring1b</i> <sup>fl/fl</sup>	Mouse	Transcriptional derepression of a subset of direct <i>Ring1b</i> target genes in differentiated islet cells/no derepression	[23]
	HDAC inhibitors	Rat	Increased endocrine progenitors	[18]
	<i>Hdac4</i> <sup>-/-</sup>	Mouse	Increased $\delta$ -cells	[25]
	<i>Hdac5</i> <sup>-/-</sup>	Mouse	Increased $\beta$ - and $\delta$ -cells	[25]
	<i>Hdac9</i> <sup>-/-</sup>	Mouse	Increased $\beta$ -cells	[25]
<i>Hdac4</i> and <i>Hdac5</i> overexpression	Rat	Increased $\beta$ -cells	[25]	

(continued on next page)

**Table 2** (continued)

Dev. Stage	Experiment	Cell/organism	Phenotype	Ref
	<i>Nkx2.2<sup>TNmut/TNmut</sup></i>	Mouse	Decreased pool of $\beta$ - and $\delta$ -cells in pancreatic explants	[26]
	<i>Pdx1-Cre; Dicer<sup>f/f</sup></i>	Mouse	Decreased $\beta$ -cells and increased $\epsilon$ -cells	[15]
	<i>Pdx1-Cre; Dicer<sup>f/f</sup></i>	Mouse	Impaired development of endocrine cells, especially $\beta$ -cells	[27]
	<i>Ngn3-Cre; Dicer<sup>f/f</sup></i>	Mouse	Decreased endocrine cell mass in 2-week-old mice	[28]
	MiR-375 knock-down	Zebrafish	Aberrant migration of pancreatic islets	[29]
	MiR-7 overexpression	Mouse	<i>Pax6</i> downregulation and inhibition of $\alpha$ - and $\beta$ -cell differentiation	[29]
	MiR-7 knockdown	Mouse	<i>Pax6</i> upregulation and enhancement of $\alpha$ - and $\beta$ -cell differentiation	[29]
	MiR-26a overexpression	Mouse	Increased islet cell number	[30]
<b>Mature <math>\beta</math>-cells</b>	HMT inhibitor	Human islets	Reprogramming of $\alpha$ - to $\beta$ -cells	[35]
	<i>Ins-Cre; Dnmt3a<sup>f/f</sup></i>	Mouse	Ectopic expression of <i>Arx</i> in $\beta$ -cells, reprogramming of $\beta$ - to $\alpha$ -cells	[26]
	<i>Nkx2.2<sup>TNmut/TNmut</sup></i>	Mouse	Ectopic expression of <i>Arx</i> in $\beta$ -cells, reprogramming of $\beta$ - to $\alpha$ -cells	[26]
	<i>Rip-Cre; Dnmt1<sup>f/f</sup></i>	Mouse	Reprogramming of $\beta$ -cells to $\alpha$ -cells	[36]
	<i>Brg1</i> knock-down <i>Brm</i> knock-down	INS-1 $\beta$ -cells	Decreased <i>Insulin</i> , <i>MafA</i> and <i>Glut2</i> expression	[14]
	<i>Set7/9</i> knock-down	Mouse islets	Increased <i>Insulin</i> , <i>MafB</i> , <i>Glut2</i> and <i>Ucn3</i> expression	[40]
	<i>RIP-Cre; Dicer<sup>f/f</sup></i>	Mouse	Defects in insulin secretion	[43]
	<i>MiR-375 KO</i>	Mouse	Reduced $\beta$ -cell mass and impaired glucose secretion	[45]
	<i>MiR-26</i> , <i>miR-182</i> , <i>miR-148</i> knock-down	MIN6 $\beta$ -cells	Increased $\alpha$ -cell number and decreased $\beta$ -cell mass due to impaired $\beta$ -cell proliferation, hyperglycemia	[46]
	<i>RIP-rtTA; Men1</i> ( <i>Men1</i> overexpression)	Mouse islets	Decreased <i>Insulin</i> expression	[48]
	<i>RIP-Cre; Ezh2<sup>f/f</sup></i>	Mouse	Impaired maternal $\beta$ -cell expansion during pregnancy	[49]
	<i>Bmi<sup>-/-</sup></i>	Mouse	Accelerated loss of H3K27me3 repression at <i>Cdkn2a</i> , premature p16INK4a expression, reduced $\beta$ -cell proliferation and mass, mild diabetes and impaired $\beta$ -cell regeneration	[50]



**Table 2** (continued)

Dev. Stage	Experiment	Cell/organism	Phenotype	Ref
	RIP-rtTA; Ezh2TG (Ezh2 overexpression)	Mouse	Reduced $\beta$ -cell proliferation in young mice and impaired $\beta$ -cell regeneration Increased $\beta$ -cell replication in young mice	[51]

### Summary

The recent findings presented in this review demonstrate that epigenetic mechanisms are important regulators of pancreas development and function (summarized in Table 2). DNA methyltransferases, histone modifiers and ncRNAs regulate gene expression and, with TFs, coordinately control cell-fate decisions and the pancreatic differentiation program. These epigenetic actors drive differentiation of endoderm cells into the pancreatic lineage. Then, they are required for initiating acinar cell differentiation and maintaining acinar cell identity and homeostasis. As some embryonic mechanisms are recapitulated in the process of recovery or tumorigenesis, these epigenetic mechanisms are also involved during tissue regeneration, and can contribute to neoplasia. A repressive epigenetic state seems to be required in acinar cells, and an alteration of these epigenetic mechanisms can initiate and promote pancreatic cancer. These epigenetic actors are required for endocrine cell differentiation. Inhibition of different histone-modifying enzyme activity enhances the pro-endocrine lineage. Histone-modifying enzymes and miRNAs are required to repress a neuronal fate in endocrine cells. Finally, these epigenetic actors are required for  $\beta$ -cell differentiation, function, proliferation and maintenance of identity. High epigenomic plasticity allows endocrine cell-subtype reprogramming. Genome-wide analyses provide epigenomic maps that can serve as a resource for understanding the pancreatic differentiation steps and the epigenetic basis of pancreatic cancer and diabetes. These fundamental and clinical observations of epigenetic mechanisms provide new insights in the understanding of pancreas development and diseases. These epigenetic marks or actors can serve as disease biomarkers and potentially as therapeutic targets and could promote the design of new therapeutic strategies.

### Conflict of interest

None.

### Acknowledgments

We apologize to our colleagues whose work could not be cited due to space limitations. E.Q. is recipient of a PhD student fellowship from the Ministère de la Recherche. C.H. is an investigator of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). Support was received from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université Pierre et Marie Curie (UPMC), the programme Emergence UPMC, the Société Francophone du Diabète (SFD)-Ypsomed, the GEFLUC (Les entreprises contre le Cancer).

### References

- [1] Pan FC, Wright C. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn* 2011;240:530–65.
- [2] Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2013;14:204–20.
- [3] Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, et al. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 2007;128:735–45.
- [4] Delcuve GP, Khan DH, Davie JR. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin Epigenetics* 2012;4:5.
- [5] Holoch D, Moazed D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet* 2015;16:71–84.
- [6] Oda M, Kumaki Y, Shigeta M, et al. DNA methylation restricts lineage-specific functions of transcription factor Gata4 during embryonic stem cell differentiation. *PLoS Genet* 2013;9:e1003574.
- [7] Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 2007;448:553–60.

- [8] Kartikasari AER, Zhou JX, Kanji MS, et al. The histone demethylase Jmjd3 sequentially associates with the transcription factors Tbx3 and Eomes to drive endoderm differentiation. *EMBO J* 2013;32:1393–408.
- [9] Jiang W, Wang J, Zhang Y. Histone H3K27me3 demethylases KDM6A and KDM6B modulate definitive endoderm differentiation from human ESCs by regulating WNT signaling pathway. *Cell Res* 2013;23:122–30.
- \*[10] Xu C-R, Cole PA, Meyers DJ, et al. Chromatin “prepattern” and histone modifiers in a fate choice for liver and pancreas. *Science* 2011;332:963–6.
- [11] Noël ES, Casal-Sueiro A, Busch-Nentwich E, et al. Organ-specific requirements for Hdac1 in liver and pancreas formation. *Dev Biol* 2008;322:237–50.
- \*[12] Georgia S, Kanji M, Bhushan A. DNMT1 represses p53 to maintain progenitor cell survival during pancreatic organogenesis. *Genes Dev* 2013;27:372–7.
- [13] Von Figura G, Fukuda A, Roy N, et al. The chromatin regulator Brg1 suppresses formation of intraductal papillary mucinous neoplasm and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Cell Biol* 2014;16:255–67.
- [14] McKenna B, Guo M, Reynolds A, et al. Dynamic recruitment of functionally distinct Swi/Snf chromatin remodeling complexes modulates Pdx1 activity in islet  $\beta$  cells. *Cell Rep* 2015;10:2032–42.
- [15] Lynn FC, Skewes-Cox P, Kosaka Y, et al. MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* 2007;56:2938–45.
- [16] Rai K, Nadauld LD, Chidester S, et al. Zebra fish Dnmt1 and Suv39h1 regulate organ-specific terminal differentiation during development. *Mol Cell Biol* 2006;26:7077–85.
- [17] Anderson RM, Bosch JA, Goll MG, et al. Loss of Dnmt1 catalytic activity reveals multiple roles for DNA methylation during pancreas development and regeneration. *Dev Biol* 2009;334:213–23.
- [18] Haumaitre C, Lenoir O, Scharfmann R. Histone deacetylase inhibitors modify pancreatic cell fate determination and amplify endocrine progenitors. *Mol Cell Biol* 2008;28:6373–83.
- [19] Zhou W, Liang I-C, Yee NS. Histone deacetylase 1 is required for exocrine pancreatic epithelial proliferation in development and cancer. *Cancer Biol Ther* 2011;11:659–70.
- [20] Prévot P-P, Augereau C, Simion A, et al. Let-7b and miR-495 stimulate differentiation and prevent metaplasia of pancreatic acinar cells by repressing HNF6. *Gastroenterology* 2013;145: 668–78.e3.
- [21] Yang Y, Ding L, An Y, et al. MiR-18a regulates expression of the pancreatic transcription factor Ptf1a in pancreatic progenitor and acinar cells. *FEBS Lett* 2012;586:422–7.
- \*[22] Xu C-R, Li L-C, Donahue G, et al. Dynamics of genomic H3K27me3 domains and role of EZH2 during pancreatic endocrine specification. *EMBO J* 2014;33:2157–70.
- [23] Van Arensbergen J, García-Hurtado J, Maestro MA, et al. Ring1b bookmarks genes in pancreatic embryonic progenitors for repression in adult  $\beta$  cells. *Genes Dev* 2013;27:52–63.
- [24] Haumaitre C, Lenoir O, Scharfmann R. Directing cell differentiation with small-molecule histone deacetylase inhibitors: the example of promoting pancreatic endocrine cells. *Cell Cycle* 2009;8:536–44.
- [25] Lenoir O, Flosseau K, Ma FX, et al. Specific control of pancreatic endocrine  $\beta$ - and  $\delta$ -cell mass by class IIa histone deacetylases HDAC4, HDAC5, and HDAC9. *Diabetes* 2011;60:2861–71.
- [26] Papizan JB, Singer RA, Tschen S-I, et al. Nkx2.2 repressor complex regulates islet  $\beta$ -cell specification and prevents  $\beta$ -to- $\alpha$ -cell reprogramming. *Genes Dev* 2011;25:2291–305.
- [27] Kanji MS, Martin MG, Bhushan A. Dicer1 is required to repress neuronal fate during endocrine cell maturation. *Diabetes* 2013;62:1602–11.
- [28] Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, et al. Targeted inhibition of miRNA maturation with Morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 2007;5.
- [29] Kredon-Russo S, Mandelbaum AD, Ness A, et al. Pancreas-enriched miRNA refines endocrine cell differentiation. *Development* 2012;139:3021–31.
- [30] Fu X, Jin L, Wang X, et al. MicroRNA-26a targets ten eleven translocation enzymes and is regulated during pancreatic cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:17892–7.
- \*[31] Morán I, Akerman I, van de Bunt M, et al. Human  $\beta$  cell transcriptome analysis uncovers lncRNAs that are tissue-specific, dynamically regulated, and abnormally expressed in type 2 diabetes. *Cell Metab* 2012;16:435–48.
- [32] Ku GM, Kim H, Vaughn IW, et al. Research resource: RNA-Seq reveals unique features of the pancreatic  $\beta$ -cell transcriptome. *Mol Endocrinol* 2012;26:1783–92.
- [33] Martínez-Romero C, Rooman I, Skoudy A, et al. The epigenetic regulators Bmi1 and Ring1B are differentially regulated in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol* 2009;219:205–13.
- [34] Clair JM-S, Soydaner-Azeloglu R, Lee KE, et al. EZH2 couples pancreatic regeneration to neoplastic progression. *Genes Dev* 2012;26:439–44.
- \*[35] Bramswig NC, Everett LJ, Schug J, et al. Epigenomic plasticity enables human pancreatic  $\alpha$  to  $\beta$  cell reprogramming. *J Clin Invest* 2013;123:1275–84.
- [36] Dhawan S, Georgia S, Tschen S, et al. Pancreatic beta cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of *Arx*. *Dev Cell* 2011;20:419–29.
- [37] Mosley AL, Ozcan S. Glucose regulates insulin gene transcription by hyperacetylation of histone h4. *J Biol Chem* 2003; 278:19660–6.
- [38] Wang H-W, Breslin MB, Lan MS. Pdx-1 modulates histone H4 acetylation and insulin gene expression in terminally differentiated alpha-TC-1 cells. *Pancreas* 2007;34:248–53.
- [39] Mosley AL, Ozcan S. The pancreatic duodenal homeobox-1 protein (Pdx-1) interacts with histone deacetylases Hdac-1 and Hdac-2 on low levels of glucose. *J Biol Chem* 2004;279:54241–7.
- [40] Deering TG, Ogihara T, Trace AP, et al. Methyltransferase Set7/9 maintains transcription and euchromatin structure at islet-enriched genes. *Diabetes* 2009;58:185–93.
- [41] Evans-Molina C, Robbins RD, Kono T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation restores islet function in diabetic mice through reduction of endoplasmic reticulum stress and maintenance of euchromatin structure. *Mol Cell Biol* 2009;29:2053–67.
- [42] Singer RA, Arnes L, Sussel L. Noncoding RNAs in  $\beta$  cell biology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2015;22:77–85.

- [43] Kalis M, Bolmeson C, Esguerra JLS, et al. Beta-cell specific deletion of *Dicer1* leads to defective insulin secretion and diabetes mellitus. *PLoS One* 2011;6:e29166.
- [44] Klein D, Misawa R, Bravo-Egana V, et al. MicroRNA expression in alpha and beta cells of human pancreatic islets. *PLoS One* 2013;8:e55064.
- [45] Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, et al. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:5813–8.
- [46] Melkman-Zehavi T, Oren R, Kredon-Russo S, et al. miRNAs control insulin content in pancreatic  $\beta$ -cells via downregulation of transcriptional repressors. *EMBO J* 2011;30:835–45.
- [47] Pullen TJ, Rutter GA. Roles of lncRNAs in pancreatic beta cell identity and diabetes susceptibility. *Front Genet* 2014;5:193.
- [48] Karnik SK, Chen H, McLean GW, et al. Menin controls growth of pancreatic beta-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. *Science* 2007;318:806–9.
- [49] Chen H, Gu X, Su I-Hsi, et al. Polycomb protein Ezh2 regulates pancreatic beta-cell *Ink4a/Arf* expression and regeneration in diabetes mellitus. *Genes Dev* 2009;23:975–85.
- [50] Dhawan S, Tschen S-I, Bhushan A. Bmi-1 regulates the *Ink4a/Arf* locus to control pancreatic  $\beta$ -cell proliferation. *Genes Dev* 2009;23:906–11.
- \*[51] Zhou JX, Dhawan S, Fu H, et al. Combined modulation of polycomb and trithorax genes rejuvenates  $\beta$  cell replication. *J Clin Invest* 2013;123:4849–58.
- [52] Schiesser JV, Wells JM. Generation of  $\beta$  cells from human pluripotent stem cells: are we there yet? *Ann N Y Acad Sci* 2014;1311:124–37.
- [53] Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, et al. Generation of functional human pancreatic  $\beta$  cells in vitro. *Cell* 2014;159:428–39.
- [54] Rezaia A, Bruin JE, Arora P, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotech* 2014;32:1121–33.
- [55] Xie R, Everett LJ, Lim H-W, et al. Dynamic chromatin remodeling mediated by polycomb proteins orchestrates pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2013;12:224–37.
- [56] Zentner GE, Tesar PJ, Scacheri PC. Epigenetic signatures distinguish multiple classes of enhancers with distinct cellular functions. *Genome Res* 2011;21:1273–83.
- [57] Ong C-T, Corces VG. Enhancers: emerging roles in cell fate specification. *EMBO Rep* 2012;13:423–30.
- [58] Papp B, Plath K. Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell* 2013;152:1324–43.
- [59] Wang A, Yue F, Li Y, et al. Epigenetic priming of enhancers predicts developmental competence of hESC-derived endodermal lineage intermediates. *Cell Stem Cell* 2015;16:386–99.
- \*[60] Pennarossa G, Maffei S, Campagnol M, et al. Brief demethylation step allows the conversion of adult human skin fibroblasts into insulin-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:8948–53.
- [61] Katz LS, Geras-Raaka E, Gershengorn MC. Reprogramming adult human dermal fibroblasts to islet-like cells by epigenetic modification coupled to transcription factor modulation. *Stem Cells Dev* 2013;22:2551–60.
- [62] Johannesson B, Sagi I, Gore A, et al. Comparable frequencies of coding mutations and loss of imprinting in human pluripotent cells derived by nuclear transfer and defined factors. *Cell Stem Cell* 2014;15:634–42.
- \*[63] DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium, Asian Genetic Epidemiology Network Type 2 Diabetes (AGEN-T2D) Consortium, South Asian Type 2 Diabetes (SAT2D) Consortium, et al. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet* 2014;46:234–44.
- [64] Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, et al. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of *Pdx1*. *J Clin Invest* 2008;118:2316–24.
- [65] Sandovici I, Smith NH, Nitert MD, et al. Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the *Hnf4a* gene in rat pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:5449–54.
- [66] Prokopenko I, Poon W, Mägi R, et al. A central role for *GRB10* in regulation of islet function in man. *PLoS Genet* 2014;10:e1004235.
- [67] Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, et al. Increased DNA methylation and decreased expression of *PDX-1* in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol* 2012;26:1203–12.
- [68] Ling C, Del Guerra S, Lupi R, et al. Epigenetic regulation of *PPARGC1A* in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia* 2008;51:615–22.
- [69] Volkmar M, Dedeurwaerder S, Cunha DA, et al. DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *EMBO J* 2012;31:1405–26.
- \*[70] Dayeh T, Volkov P, Salö S, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of human pancreatic islets from type 2 diabetic and non-diabetic donors identifies candidate genes that influence insulin secretion. *PLoS Genet* 2014;10.
- [71] Dayeh TA, Olsson AH, Volkov P, et al. Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets. *Diabetologia* 2013;56:1036–46.
- [72] Pasquali L, Gaulton KJ, Rodríguez-Seguí SA, et al. Pancreatic islet enhancer clusters enriched in type 2 diabetes risk-associated variants. *Nat Genet* 2014;46:136–43.
- [73] Bhandare R, Schug J, Le Lay J, et al. Genome-wide analysis of histone modifications in human pancreatic islets. *Genome Res* 2010;20:428–33.
- [74] Stitzel ML, Sethupathy P, Pearson DS, et al. Global epigenomic analysis of primary human pancreatic islets provides insights into type 2 diabetes susceptibility loci. *Cell Metab* 2010;12:443–55.
- [75] Van Arensbergen J, García-Hurtado J, Moran I, et al. Derepression of polycomb targets during pancreatic organogenesis allows insulin-producing beta-cells to adopt a neural gene activity program. *Genome Res* 2010;20:722–32.
- \*[76] Kameswaran V, Bramswig NC, McKenna LB, et al. Epigenetic regulation of the *DLK1-MEG3* microRNA cluster in human type 2 diabetic islets. *Cell Metab* 2014;19:135–45.
- [77] Latreille M, Hausser J, Stützer I, et al. MicroRNA-7a regulates pancreatic  $\beta$  cell function. *J Clin Invest* 2014;124:2722–35.
- [78] Zhao X, Mohan R, Özcan S, et al. MicroRNA-30d induces insulin transcription factor *MafA* and insulin production by targeting mitogen-activated protein 4 kinase 4 (*MAP4K4*) in pancreatic  $\beta$ -cells. *J Biol Chem* 2012;287:31155–64.

- [79] Bao L, Fu X, Si M, et al. MicroRNA-185 targets SOCS3 to inhibit beta-cell dysfunction in diabetes. *PLoS One* 2015;10: e0116067.
- [80] Erener S, Mojibian M, Fox JK, et al. Circulating miR-375 as a biomarker of  $\beta$ -cell death and diabetes in mice. *Endocrinology* 2013;154:603–8.
- [81] Higuchi C, Nakatsuka A, Eguchi J, et al. Identification of circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as biomarkers for type 2 diabetes. *Metab Clin Exp* 2015;64:489–97.
- [82] Kameswaran V, Kaestner KH. The missing lnc(RNA) between the pancreatic  $\beta$ -cell and diabetes. *Front Genet* 2014;5:200.
- [83] Guerra C, Barbacid M. Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Mol Oncol* 2013;7:232–47.
- [84] Guo M, Jia Y, Yu Z, et al. Epigenetic changes associated with neoplasms of the exocrine and endocrine pancreas. *Discov Med* 2014;17:67–73.
- [85] Nones K, Waddell N, Song S, et al. Genome-wide DNA methylation patterns in pancreatic ductal adenocarcinoma reveal epigenetic deregulation of SLIT-ROBO, ITGA2 and MET signaling. *Int J Cancer* 2014;135:1110–8.
- [86] Vincent A, Hong S-M, Hu C, et al. Epigenetic silencing of EYA2 in pancreatic adenocarcinomas promotes tumor growth. *Oncotarget* 2014;5:2575–87.
- [87] Dutruel C, Bergmann F, Rooman I, et al. Early epigenetic downregulation of WNK2 kinase during pancreatic ductal adenocarcinoma development. *Oncogene* 2014;33:3401–10.
- [88] Gao W, Gu Y, Li Z, et al. miR-615-5p is epigenetically inactivated and functions as a tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2015;34:1629–40.
- [89] Jiao Y, Shi C, Edil BH, et al. DAXX/ATRX, MEN1 and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* 2011;331:1199–203.
- [90] Wang W, Gao J, Man X-H, et al. Significance of DNA methyltransferase-1 and histone deacetylase-1 in pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2009;21:1439–47.
- [91] Grandinetti KB, Jelinic P, DiMauro T, et al. Sin3B expression is required for cellular senescence and is up-regulated upon oncogenic stress. *Cancer Res* 2009;69:6430–7.
- [92] Rielland M, Cantor DJ, Graveline R, et al. Senescence-associated SIN3B promotes inflammation and pancreatic cancer progression. *J Clin Invest* 2014;124:2125–35.
- [93] DiMauro T, Cantor DJ, Bainor AJ, et al. Transcriptional repression of Sin3B by Bmi-1 prevents cellular senescence and is relieved by oncogene activation. *Oncogene* 2015;34:4011–7.
- [94] Xu J, Zhu W, Xu W, et al. Up-regulation of MBD1 promotes pancreatic cancer cell epithelial-mesenchymal transition and invasion by epigenetic down-regulation of E-cadherin. *Curr Mol Med* 2013;13:387–400.
- [95] Chen S, Chen J, Zhan Q, et al. H2AK119Ub1 and H3K27Me3 in molecular staging for survival prediction of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 2014;5:10421–33.
- [96] Jia J, Parikh H, Xiao W, et al. An integrated transcriptome and epigenome analysis identifies a novel candidate gene for pancreatic cancer. *BMC Med Genomics* 2013;6:33.
- [97] Park JY, Helm J, Coppola D, et al. MicroRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2011;17:817–27.
- [98] Caponi S, Funel N, Frampton AE, et al. The good, the bad and the ugly: a tale of miR-101, miR-21 and miR-155 in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms. *Ann Oncol* 2013;24:734–41.
- [99] Nakahara O, Takamori H, Iwatsuki M, et al. Carcinogenesis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: loss of microRNA-101 promotes overexpression of histone methyltransferase EZH2. *Ann Surg Oncol* 2012;19(Suppl. 3): S565–71.



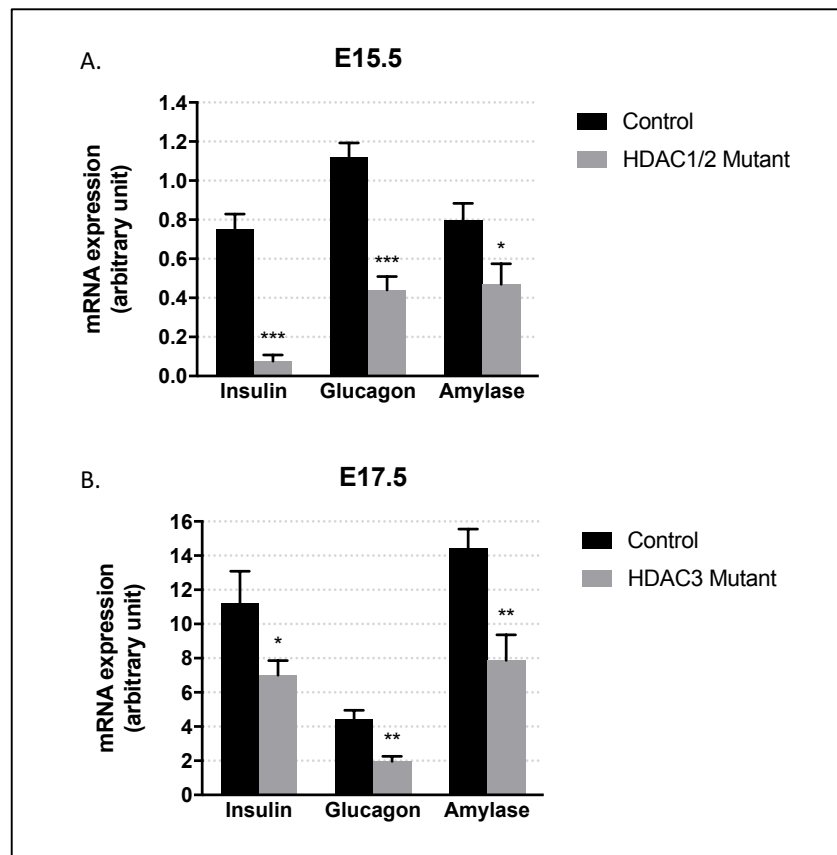
## Régulation épigénétique de la régénération acinaire du pancréas : rôle de HDAC3

### A. Contexte

#### 1. Résultats préliminaires : rôle des HDAC de classe I dans le développement du pancréas

Au cours de l'embryogenèse, de nombreux mécanismes épigénétiques tiennent un rôle majeur dans la spécification des lignages cellulaires. Les histone acétyltransférases (HAT) et histone désacétylases (HDAC) peuvent moduler l'état de compaction de la chromatine et ainsi participer à la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Décrits en introduction, les travaux de C. Haumaitre et ses collègues ont montré que la spécification des lignages pancréatiques pouvait être modulée par traitement avec des inhibiteurs des HDAC (Haumaitre et al., 2008, 2009). Ces études *ex vivo* ont révélé l'implication des HDAC dans le développement du pancréas.

Plus récemment, notre équipe a examiné *in vivo* les rôles des HDAC de classe I dans le développement des cellules endocrines et exocrines du pancréas (résultats non publiés). Les inactivations conditionnelles de *HDAC1*, *2* et *3* dans les progéniteurs pancréatiques multipotents ont été réalisées par le système Cre-Lox inducible avec les lignées *Pdx1-Cre*, *HDAC1<sup>fl/fl</sup>*, *HDAC2<sup>fl/fl</sup>* et *HDAC3<sup>fl/fl</sup>*. *HDAC1* et *2* ayant des fonctions redondantes, elles ont été inactivées simultanément. Les inactivations de *HDAC1/2* et de *HDAC3* induisent respectivement une agénésie et une forte hypoplasie pancréatiques, toutes associées à une mortalité post-natale précoce. Dans les deux cas, l'expression des principaux marqueurs endocrines et acinaires est fortement diminuée au cours du développement (Fig. 1), suggérant un rôle essentiel des HDAC de classe I dans la prolifération, la survie et la différenciation des progéniteurs pancréatiques.



**Fig. 1. Les inactivations pancréatiques de *HDAC1/2* et de *HDAC3* perturbent le développement des cellules exocrines et endocrines.** (A) RT-qPCR d'*Insuline* (-90%), *Glucagon* (-60%) et *Amylase* (-45%) chez les souris *Pdx1-Cre;HDAC1<sup>fl/fl</sup>;HDAC2<sup>fl/fl</sup>* (n=4) et leurs contrôles (n=10) à E15.5. (B) RT-qPCR d'*Insuline* (-40%), *Glucagon* (-60%) et *Amylase* (-45%) chez les souris *Pdx1-Cre;HDAC3<sup>fl/fl</sup>* (n=7) et leurs contrôles (n=9) à E17.5.

## 2. Analogies entre développement et régénération des cellules acinaires

Plusieurs voies de signalisation et facteurs de transcription dirigent le développement du pancréas de façon coordonnée. Au cours de la régénération du pancréas exocrine, certains de ces signaux du développement sont induits par les cellules acinaires qui adoptent alors un profil d'expression de type canalaire, similaire à celui des progéniteurs pancréatiques multipotents (Jensen et al., 2005). Ce processus, déjà évoqué en introduction, est dénommé métaplasie acino-canalaire (ADM). Parmi les facteurs de transcription impliqués, *Pdx1* est exprimé dès le début du développement du pancréas, dans les bourgeons épithéliaux en formation. Chez l'adulte, son expression n'est détectée dans aucune cellule exocrine. Suite à une lésion, les cellules acinaires subsistantes engagent l'expression de *Pdx1*, suggérant l'implication de signaux du développement dans la régénération du pancréas (Jensen et al., 2005).

Au cours du développement du pancréas, la voie de signalisation Notch inhibe la différenciation acinaire au profit des lignages endocrine et canalaire (Afelik and Jensen, 2013; Schaffer et al., 2010). Chez la souris, l'inactivation pancréatique de *Notch1* perturbe la régénération acinaire suite à un traitement à la céruléine. Les structures métaplasiques *Pdx1*<sup>+</sup> des souris *Ptf1a-Cre;Notch1<sup>fl/fl</sup>* sont persistantes, tandis que celles des contrôles se résorbent quelques jours après traitement. (Siveke et al., 2008). Ce résultat démontre l'implication de la voie Notch dans la régénération acinaire.

Un résultat similaire a été observé dans un modèle d'inactivation de la voie Hedgehog, dont l'inhibition au cours du développement est essentielle à l'expression de *Pdx1* (Hebrok et al., 1998). Chez la souris, l'inactivation de *Smo* dans les cellules acinaires matures perturbe la résorption de l'ADM mise en place au cours de la régénération (Fendrich et al., 2008). La voie Hedgehog contribue donc également à la régénération acinaire.

Les mêmes expériences ont été menées sur des facteurs de transcription essentiels à l'organogenèse du pancréas. De façon identique à *Notch1* et *Smo*, l'inactivation pancréatique de *Nr5a2*, acteur majeur de la spécification acinaire, bloque la redifférenciation acinaire des cellules métaplasiques après inflammation (von Figura et al., 2014).

Au cours de l'embryogenèse, le facteur de transcription *Mist1* contribue à la différenciation terminale des acini (Pin et al., 2001). Les souris *Mist1<sup>KO</sup>* présentent une sensibilité accrue à la pancréatite, avec une réponse inflammatoire et une nécrose exacerbées en comparaison des contrôles suite à un traitement à la céruléine (Kowalik et al., 2007). Ce résultat démontre l'implication des acteurs du développement non seulement dans la phase de régénération, mais également dans la phase d'inflammation du pancréas exocrine.

L'ensemble de ces données révèle des fortes analogies entre les mécanismes du développement et de la régénération acinaires.



## B. Objectif et stratégie

Basés sur le rôle précédemment démontré des HDAC de classe I dans le développement du pancréas, nous nous sommes interrogés sur leur implication dans la régénération acinaire. Nous nous sommes focalisés sur HDAC3 dont nous avons inactivé le gène *in vivo* dans les cellules acinaires matures chez la souris. Cette inactivation a été réalisée par le système Cre-Lox inducible avec les lignées *Ptf1a-Cre<sup>ER</sup>* et *Hdac3<sup>fl/fl</sup>*. L'expression de la recombinase a été induite par injections intrapéritonéales de tamoxifène chez des souris âgées d'environ deux mois.

Dix jours après inactivation de *HDAC3*, une pancréatite aigüe a été induite par injections intrapéritonéales de céruléine. La céruléine est un analogue de la cholésystokinine qui stimule directement la production et la sécrétion des proenzymes acinaires chez le rongeur. Lorsqu'elle est administrée à des doses supra-physiologiques, la céruléine induit une production excessive de proenzymes, conduisant à leur activation intracellulaire et à l'autodigestion des cellules acinaires (Hyun and Lee, 2014).

Le suivi de la régénération du pancréas a été réalisé par RT-qPCR, en mesurant les cinétiques d'expression des principaux marqueurs acinaires.

La procédure expérimentale, similaire à celle mis en œuvre dans le projet d'inactivation de *Hnf1b*, est illustrée dans la figure 2.

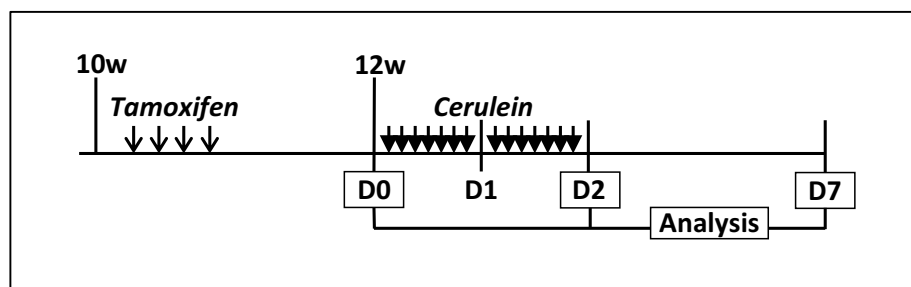


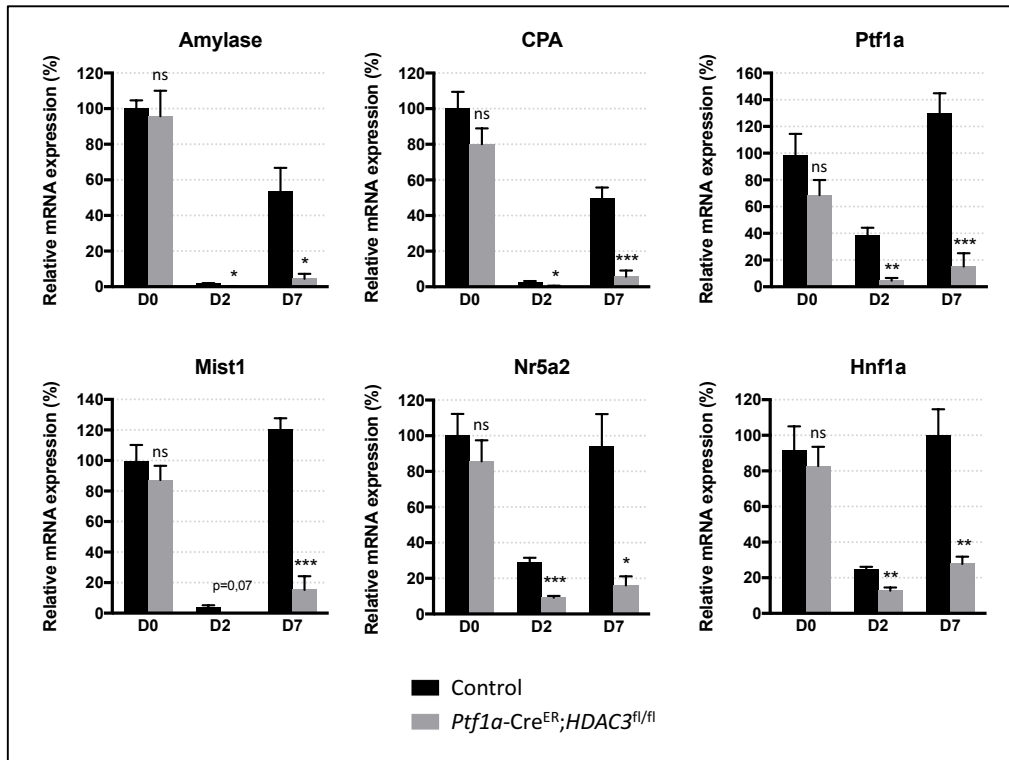
Fig. 2. Etude du rôle de HDAC3 dans la régénération acinaire : procédure expérimentale.

## C. Résultats

Avant traitement à la céruléine (D0), les souris contrôles et inactivées pour *HDAC3* expriment les principaux marqueurs acinaires à des niveaux similaires. En condition normale, *HDAC3* ne semble donc pas impliqué dans le maintien de l'identité acinaire (Figure 3).

Deux jours après traitement à la céruléine (D2), les pancréas contrôles et mutants sont largement dégradés. Dans les deux groupes, l'expression des marqueurs acinaires est drastiquement diminuée. Déjà très marquée chez les contrôles, l'atteinte acinaire l'est encore davantage chez les mutants. Par exemple, à D2, l'expression de *Nr5a2* est diminuée de 70% chez les contrôles, comparativement à D0. Cette diminution atteint 90% chez les mutants. Quel que soit le marqueur acinaire considéré, les pancréas mutants sont plus affectés que les pancréas contrôles. Ce résultat indique que la perte de *HDAC3* potentialise l'effet pro-inflammatoire de la céruléine (Figure 3).

Sept jours après traitement à la céruléine (D7), les pancréas contrôles sont régénérés et la plupart des marqueurs acinaires retrouvent un niveau d'expression similaire à celui d'avant traitement. Il est alors intéressant de noter que l'expression des enzymes acinaires *Amylase* et *CPA* est plus lente à se rétablir que l'expression des facteurs de transcription *Ptf1a*, *Mist1*, *Nr5a2* et *Hnf1a* (~50% contre ~100% d'expression retrouvée à D7 respectivement). À l'inverse, dans le cas des pancréas inactivés pour *HDAC3*, les marqueurs acinaires ont un niveau d'expression similaire à celui observé à D2. Ainsi, à D7, l'expression des marqueurs acinaires mesurée chez les mutants est significativement inférieure à celle des contrôles, quel que soit le marqueur considéré (-80% en moyenne). Ce résultat démontre que *HDAC3* participe à la régénération du compartiment acinaire (Figure 3).



**Fig.3. L'inactivation de HDAC3 amplifie la réponse inflammatoire et entrave la régénération acinaire.** RT-qPCR des principaux marqueurs acinaires à D0, D2 et D7 chez les souris *Ptf1a-Cre<sup>ER</sup>;HDAC3<sup>fl/fl</sup>* (n≥5) et leurs contrôles (n≥5).

#### D. Discussion

Nous nous sommes interrogés sur le rôle potentiel des HDAC de classe I, et plus particulièrement de HDAC3, dans la régénération des cellules acinaires. Nous avons inactivé *HDAC3 in vivo* spécifiquement dans les cellules acinaires matures avant induction d'une pancréatite aiguë. Cette étude a démontré que dans un contexte déficient en HDAC3, le tissu acinaire présente non seulement une sensibilité accrue à l'inflammation mais également une capacité de régénération diminuée.

Ces résultats se corrént avec les analyses de J.F. Eisses et al. qui ont montré que le VPA, inhibiteur des HDAC de classe 1, perturbe la régénération acinaire (Eisses et al., 2015). Dans une démarche similaire à la nôtre, ils ont administré du VPA à des souris préalablement traitées à la céruléine. Trois jours après traitement, ils ont observé un nombre accru de structures métaplasiques chez les souris ayant reçu l'inhibiteur, suggérant que la perte des HDAC de classe I potentialise les effets de la

céroléine. Sept jours après traitement, ils ont constaté une persistance des structures métaplasiques chez les souris soumises au VPA, contrairement aux contrôles alors largement régénérés. Cette étude souffre néanmoins d'une contrainte expérimentale majeure liée à l'utilisation du VPA qui ne cible pas seulement les cellules acinaires, ni même uniquement les cellules pancréatiques, mais l'organisme dans son ensemble. En outre, plusieurs effets délétères des HDACi ont été recensés sur le métabolisme du foie et des reins (Subramanian et al., 2010), effets qui pourraient contribuer de façon indirecte à la perturbation de la régénération du pancréas.

Les HDAC ont un large spectre d'action qui les implique dans la régulation de gènes pro- et anti-inflammatoires (Das Gupta et al., 2016). Parmi les HDAC aux rôles anti-inflammatoires, les HDAC de classe I sont les plus documentés. Par exemple, HDAC1 est un régulateur négatif de la voie des *Toll-like receptors* (Shakespear et al., 2011), HDAC2 participe à la répression de l'*interleukine-6* (Zhang et al., 2015) et HDAC3 contribue à l'inhibition de la réponse inflammatoire NF- $\kappa$ B-dépendante (Sadler et al., 2015). Dans notre étude, la perte de HDAC3 pourrait donc contribuer à l'activation et au maintien de voies pro-inflammatoires, perturbant la régénération acinaire.

En conclusion, HDAC3 apparaît essentiel non seulement au développement du pancréas mais également à sa régénération. Cette étude met en évidence l'implication des HDAC dans la réponse aux lésions inflammatoires du pancréas et ouvre ainsi des perspectives thérapeutiques basées sur la modulation des marques épigénétiques.



## DISCUSSION GÉNÉRALE

Le développement du pancréas aboutit à la mise en place de populations cellulaires aux fonctions variées, allant de la sécrétion d'enzymes digestives à la production d'hormones régulatrices de la glycémie. Cette hétérogénéité fonctionnelle s'amorce au cours de la différenciation des progéniteurs pancréatiques multipotents, lors de laquelle plusieurs facteurs transcriptionnels et épigénétiques assurent une régulation coordonnée des programmes de différenciation. À maturité, chaque type cellulaire est caractérisé par un profil d'expression distinct, essentiel à ses fonctions et au maintien de son identité. La compréhension des mécanismes qui préservent l'identité des cellules est cruciale sur les plans fondamental et clinique. *In vivo*, la perte d'identité cellulaire peut constituer une étape préliminaire au développement tumoral (Roy and Hebrok, 2015). *In vitro*, ces mêmes signaux pourraient être contrôlés à des fins de reprogrammation cellulaire, ouvrant le champ de la médecine régénérative (Cherry and Daley, 2012).

Mes travaux de thèse portent principalement sur l'étude de *Hnf1b*, gène dont le rôle au cours du développement du pancréas a récemment été démontré par notre équipe. Après la naissance, les fonctions pancréatiques de *Hnf1b* n'étant pas documentées, nous avons examiné son implication dans l'homéostasie des cellules exocrines. Sur le plan endocrine, des mutations humaines de *HNF1B* sont associées à un diabète d'apparition précoce, le MODY5. Pour faciliter son étude, le premier modèle murin de cette pathologie a été généré au laboratoire. La seconde partie de la thèse porte sur la caractérisation du phénotype pancréatique de ce modèle. Plusieurs mécanismes épigénétiques tiennent un rôle majeur dans le développement du pancréas. Notre équipe a précédemment démontré *in vivo* la contribution essentielle des HDAC de classe I au développement des cellules endocrines et exocrines du pancréas. Le développement et la régénération du pancréas faisant intervenir des voies de signalisation communes, nous avons examiné le rôle de HDAC3 dans la régénération du pancréas.

Les résultats issus de l'ensemble de mes travaux de thèse contribueront à l'identification et à la caractérisation de signaux qui régulent l'homéostasie et la fonction des cellules du pancréas.

## **Hnf1b, facteur clé de l'organogenèse du pancréas**

La létalité précoce des embryons déficients pour *Hnf1b* démontre le rôle majeur de ce facteur de transcription dans l'embryogenèse (Barbacci et al., 1999; Coffinier et al., 1999b). Son profil d'expression, essentiellement épithélial, l'implique dans le développement précoce de nombreux organes tubulaires tels que le pancréas, le foie, les poumons et les reins.

Lors de l'embryogenèse, et suite à la délimitation de son territoire présomptif, le pancréas émerge de l'intestin primitif sous la forme d'un bourgeon épithélial. *Hnf1b* est exprimé dans l'ensemble de ce bourgeon qui est alors constitué de progéniteurs multipotents (MPC). La taille finale du pancréas est conditionnée par la taille du pool de MPC (Stanger et al., 2007). Lorsqu'ils sont inactivés pour *Hnf1b*, les MPC perdent leurs capacités de prolifération et entrent en apoptose, causant une hypoplasie pancréatique sévère à la naissance (De Vas et al., 2015). Cette étude a démontré un rôle essentiel de *Hnf1b* dans le contrôle de la balance prolifération/apoptose des MPC.

Après prolifération, les MPC entament leur différenciation, ceux du tronc continueront à exprimer *Hnf1b* et formeront les progéniteurs bipotents tandis que ceux de l'extrémité perdront l'expression de *Hnf1b* et formeront les progéniteurs acinaires. Ces progéniteurs acinaires, et les cellules acinaires matures qui en dérivent, n'exprimeront pas *Hnf1b*.

Les progéniteurs bipotents se scinderont en deux populations, l'une formera les progéniteurs endocrines, l'autre sera à l'origine des cellules canalaire. À cette étape, l'expression de *Hnf1b* est cruciale puisqu'elle induit directement *Ngn3*, facteur clé de la spécification endocrine. Inactivé pour *Hnf1b*, le pancréas en formation ne génère aucune cellule endocrine (De Vas et al., 2015). Les cellules *Ngn3*<sup>+</sup> perdent ensuite l'expression de *Hnf1b* qui ne sera détectée dans aucune cellule endocrine mature.



Les progéniteurs bipotents qui ont échappé à l'induction de *Ngn3* conservent l'expression de *Hnf1b* et formeront le réseau canalaire définitif. Après la naissance, seules les cellules canalaire expriment *Hnf1b*.

### **Les cellules canalaire *Hnf1b*<sup>+</sup> participent à l'homéostasie des cellules acinaires**

La première partie de mes travaux de thèse porte sur l'étude du rôle pancréatique de *Hnf1b* après la naissance. L'inactivation néonatale de *Hnf1b* induit des défauts canalaire précoces qui regroupent perte de cils primaires, dilatation canalaire et altération de polarité. *Pkhd1* et *Cys1*, cibles directes de *Hnf1b*, codent pour des protéines structurales du cil primaire. Leur expression étant diminuée chez les mutants, nous suggérons qu'elles contribuent au défaut ciliaire. L'inactivation embryonnaire de *Kif3a*, protéine du cil primaire, est d'ailleurs à l'origine de défauts exocrines similaires à ceux des mutants *Hnf1b* (Cano et al., 2006). *Hnf1b* est donc essentiel au maintien du cil primaire et de l'intégrité canalaire.

La voie Hippo-YAP, régulée en partie par le cil primaire, est précocément dérégulée chez nos mutants *Hnf1b*. De façon surprenante, alors que les cellules acinaires sont dépourvues de cils et n'expriment pas *Hnf1b*, nous avons observé une activation ectopique de YAP dans les cellules acinaires mutantes. Plusieurs études indiquent que la voie Hippo-Yap est capable d'interagir avec son environnement par contact cellulaire direct ou sécrétion de facteurs extracellulaires, propageant ainsi l'activation de YAP aux cellules avoisinantes (Gumbiner and Kim, 2014). Gène cible de YAP, *Ctgf* est précocément augmentée chez les mutants *Hnf1b*. *Ctgf* étant une protéine sécrétée, nous suggérons qu'elle est à l'origine de l'activation paracrine de YAP dans les cellules acinaires.

Trois semaines après l'inactivation néonatale de *Hnf1b*, le compartiment acinaire montre des signes de métaplasie, de fibrose et d'inflammation qui s'apparentent à une pancréatite. Au même stade, les acteurs de la voie Notch sont surexprimés chez les mutants. De récentes études ont révélé des liens étroits entre les voies Notch et Hippo. Par exemple, dans les cellules de la crête neurale, l'activation de voie Notch

est dirigée par YAP qui interagit directement avec le *Notch intracellular domain* (NICD) (Manderfield et al., 2015). Dans les cellules hépatiques, YAP régule également la voie Notch en contrôlant directement l'expression de *Notch2* (Yimlamai et al., 2014). Ces données indiquent que la voie Hippo est un modulateur de la voie Notch, suggérant que la suractivation précoce de YAP observée chez les mutants *Hnf1b* participe à la dérégulation des acteurs de la voie Notch constatée par la suite.

Les voies Hippo et Notch sont largement décrites pour leur implication dans les fibrogenèses hépatique et rénale (Bansal et al., 2015; Chen et al., 2009; Edeling et al., 2016; Mannaerts et al., 2015). Ces deux voies pourraient donc contribuer à la mise en place de la fibrose pancréatique observée chez nos mutants. Hippo et Notch sont également impliquées dans la survenue de métaplasies acino-canaliaires. L'expression constitutive de *Notch2* dans le pancréas de souris adultes cause une ADM (Brodylo et al., 2011). Des métaplasies acino-canaliaires sont également constatées suite à l'activation ectopique de Notch dans des explants pancréatiques (Miyamoto et al., 2003; Sawey et al., 2007). Évoquée en introduction, la suractivation de la voie Hippo au début du développement du pancréas induit une ADM (Gao et al., 2013; George et al., 2012). Enfin, plusieurs études ont démontré l'implication de la voie Notch dans la régulation de l'inflammation tissulaire (Fung et al., 2007; Wei et al., 2011, 2016). Ainsi, nous suggérons que les dérégulations des voies Hippo et Notch contribuent à la mise en place d'une pancréatite chez les mutants *Hnf1b*.

Ces résultats démontrent que l'expression de *Hnf1b*, dont dépend la bonne intégrité des canaux, est essentielle au maintien de l'identité acinaire.

### **L'inactivation de *Hnf1b* améliore la tolérance au glucose**

À deux mois, le compartiment exocrine des mutants *Hnf1b* est largement affecté. La majeure partie du pancréas est envahie par des adipocytes entre lesquels des macrophages s'accumulent, et seuls quelques acini persistent. De façon surprenante, le compartiment endocrine ne semble pas affecté par cet environnement inflammatoire, les îlots mutants paraissant normaux. En outre, les IPGTT menées sur les mutants révèlent une tolérance au glucose améliorée en

comparaison des contrôles (résultats non montrés). *Hnf1b* et *Sox9* sont exprimés dans les canaux biliaires intrahépatiques (Coffinier et al., 1999b; Delous et al., 2012). Le foie des souris *Sox9-Cre<sup>ER</sup>;Hnf1b<sup>fl/fl</sup>* est probablement affecté par l'inactivation de *Hnf1b*. L'inactivation hépato-biliaire de *Hnf1b* pourrait donc avoir un effet bénéfique sur le contrôle de la glycémie. Nous pourrions également envisager que, défaits de leur environnement acinaire, les îlots ont une accessibilité améliorée à l'oxygène et aux nutriments qui leur parviennent, stimulant leur métabolisme et leur activité cellulaires.

### **Hnf1b, gène de suppresseur de tumeur**

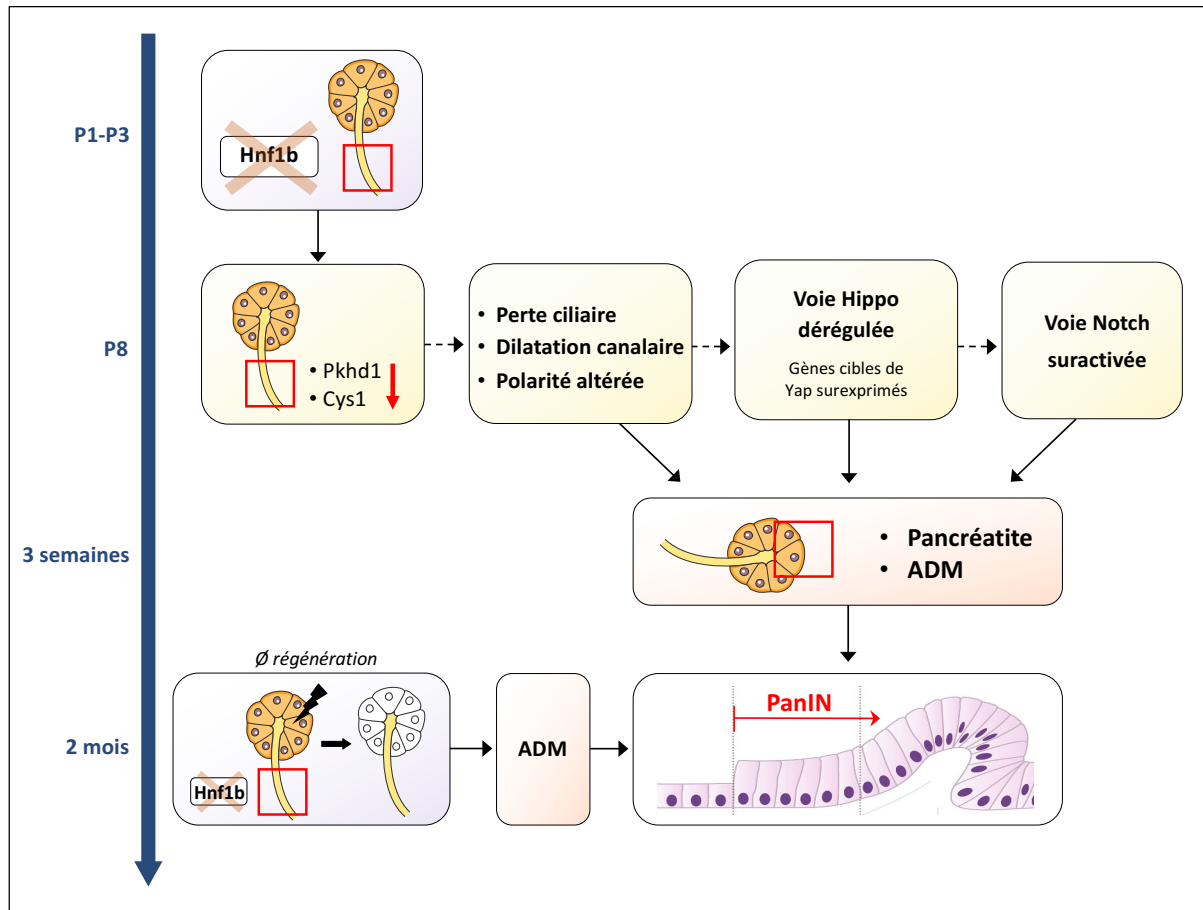
La pancréatite chronique est un facteur qui favorise l'initiation des PanINs, lésions pré-cancéreuses du pancréas. L'analyse histologique des pancréas mutants a révélé la présence des structures épithéliales anormales (pluristratification, allongement cellulaire) indicatrices de PanINs. Par coloration au bleu alcian, nous avons mis en évidence la sécrétion de mucus par certaines de ces structures, démontrant une néoplasie. Par RT-qPCR, nous avons constaté chez les mutants *Hnf1b* une induction de N-Cadhérine et une perte de E-Cadhérine. Cette conversion est associée aux premiers stades d'une invasion tumorale. L'inactivation post-natale de *Hnf1b* est donc suffisante à l'induction de lésions pré-cancéreuses du pancréas.

Nous pensons que cette inactivation pourrait participer à l'émergence d'un PDAC ainsi qu'à son aggravation. Plus de 90% des patients atteints de PDAC présentent une mutation activatrice de l'oncogène *KRAS* (Eser et al., 2014). Néanmoins, cette mutation n'est pas suffisante pour initier une tumeur. En effet, dans une population pancréatique où toutes les cellules expriment l'oncogène *Kras* activé, les lésions n'apparaissent que dans des régions isolées au milieu d'un tissu apparemment normal. Cela suggère que d'autres acteurs interviennent et sont requis pour permettre à *Kras* d'induire son effet. *Hnf1b* a déjà été identifié comme un marqueur pronostique du cancer ovarien (Shen et al., 2013), du cancer de la prostate (Grisanzio et al., 2012) et du cancer hépatocellulaire (Shim et al., 2013). De plus, l'analyse du profil d'expression génique de nombreuses tumeurs pancréatiques humaines révèle dans la grande majorité des cas une diminution de l'expression de

*HNF1B* (Hoskins et al., 2014; Janky et al., 2016). Pour tester le rôle anti-tumoral de HNF1B, nous pourrions inactiver *Hnf1b* dans un contexte où l'oncogène *Kras* est activé de manière constitutive. Cette expérience pourrait être réalisée avec la lignée de souris « Ela-rtTA ; TetO-Flp ; FRT-Stop-FRT-KrasG12V » abrégée « ElaKras » présente au laboratoire (acquise en collaboration avec le Dr M. Barbacid, CNIO, Madrid, Espagne). Chez cette lignée, l'activation acinaire de *Kras* est conditionnée par le système inductible TET-OFF qui permet de cibler le stade de survenue de la mutation. Les souris *Sox9-Cre<sup>ER</sup>;Hnf1b<sup>fl/fl</sup>* (TM P1-P3) développent spontanément des PanINs. Sans intervention, elles ne forment pas de PDAC. En cumulant l'inactivation de *Hnf1b* et l'activation de *Kras*, nous pensons que les souris ElaKras;*Sox9-Cre<sup>ER</sup>;Hnf1b<sup>fl/fl</sup>* développeront un PDAC, ce qui démontrerait que *Hnf1b* joue un rôle de suppresseur de tumeur dans le pancréas. Ce projet est en cours de réalisation.

L'inactivation de *Hnf1b* a également été entreprise chez la souris adulte. Les souris *Sox9-Cre<sup>ER</sup>;Hnf1b<sup>fl/fl</sup>* ont été injectées au tamoxifène à l'âge de six semaines et leur pancréas analysé à neuf semaines et cinq mois. Nos observations histologiques et moléculaires n'ont révélé aucune différence entre pancréas contrôles et mutants. Ce résultat indique que la potentialité des canaux à réguler l'homéostasie acinaire n'est maintenue que dans une période post-natale réduite. En réponse aux lésions tissulaires, les cellules exocrines recourent à des voies du développement pour régénérer. L'inactivation de *Hnf1b* perturbe la régénération acinaire, entravant la résorption des structures métaplasiques. La persistance de l'état inflammatoire liée à la perte de *Hnf1b* mène à l'émergence rapide de PanINs. Ces résultats démontrent que *Hnf1b* est essentiel à l'homéostasie acinaire, y compris chez l'adulte, et que son absence favorise l'émergence de structures néoplasiques dans un contexte inflammatoire.

Ces données démontrent un rôle inédit de *Hnf1b* dans la survenue de lésions pré-cancéreuses du pancréas, et ouvrent ainsi des perspectives nouvelles dans la prévention et le traitement des tumeurs pancréatiques.



**Schéma de conclusion (Article 1).**

L'inactivation post-natale de *Hnf1b* conduit à l'émergence de PanINs.

## La lignée PMHnf1b, premier modèle murin de MODY5

La lignée *Sox9-Cre<sup>ER</sup>;Hnf1b<sup>fl/fl</sup>* est un outil efficace à l'avancée de la compréhension du rôle de Hnf1b dans le pancréas. Néanmoins, les souris *Hnf1b<sup>+/-</sup>* ne présentent aucun défaut pancréatique. La pathologie humaine MODY5 est pourtant induite par des mutations hétérozygotes de *HNF1B*. Les anomalies cliniques observées chez les patients MODY5 reflètent en partie les rôles joués par HNF1B dans les phases d'organogenèse précoce du tractus génital, des reins, des canaux biliaires et du pancréas. L'atteinte pancréatique est caractérisée par un diabète de survenue précoce, une hypoplasie du pancréas et des fonctions exocrines altérées. La faible prévalence du MODY5 est limitante à l'étude de cette pathologie qui est aujourd'hui essentiellement décrite par le biais de rapports de cas isolés. Le premier modèle murin de diabète MODY5 a été créé au laboratoire en insérant chez la souris une mutation identifiée chez plusieurs patients MODY5. Les souris PMHnf1b sont intolérantes au glucose et ont un contenu pancréatique en insuline fortement diminué. Leur pancréas est appauvri en gros îlots et en cellules  $\beta$ . La relation entre taille et fonction des îlots est un sujet débattu. Bien que les patients diabétiques de type 2 présentent une diminution du nombre de gros îlots (Jo et al., 2012; Kilimnik et al., 2011), quelques études *ex vivo* indiquent que les petits îlots sont ceux qui répondent le mieux à la stimulation du glucose (Huang et al., 2011; Huang and Stehno-Bittel, 2015). Néanmoins, les protocoles d'isolation et de culture des îlots sont déterminants dans la viabilité insulaire, et les auteurs de ces études suggèrent qu'une meilleure tolérance des petits vs des gros îlots à ces procédures pourrait constituer un biais expérimental.

Des approches de mutagenèse aléatoire ont permis d'identifier chez le poisson zèbre trois mutations de *Hnf1b* donnant lieu à des défauts rénaux et pancréatiques. Ces défauts apparaissent dans les étape précoces d'organogenèse, suggérant que le MODY5 est liée à des anomalies du développement (Sun and Hopkins, 2001). Le poisson zèbre est toutefois peu adapté aux études métaboliques, limitant l'étude de cette pathologie chez ce modèle. Chez l'homme, l'analyse d'embryons porteurs de mutations de *HNF1B* a également révélé des défaut précoces dans la mise en place du compartiment endocrine (Haumaitre et al., 2006). Enfin, les souris PMHnf1b

présentent une expression diminuée des principaux marqueurs endocrines dès E15.5, confirmant l'étiologie embryonnaire du MODY5.

Outre la spécification et la différenciation des sous-types endocrines, la migration des progéniteurs endocrines hors de l'épithélium pancréatique en développement est cruciale au développement des îlots. L'inactivation pancréatique de *Hnf1b* à E14.5 induit un défaut de migration des îlots ainsi que des anomalies dans la répartition des différents sous-types endocrines, les cellules  $\alpha$  se trouvant non plus en périphérie mais au centre des îlots (De Vas, résultat non publié). Sur la base de ces observations, et compte tenu du profil d'expression épithélial de *Hnf1b*, nous suggérons que *Hnf1b* est impliqué dans la transition épithélium-mésenchyme (EMT) des îlots. L'EMT entretient d'ailleurs des liens étroits avec la voie Hippo (Dai et al., 2016; Ltd, 2014; Wang et al., 2015), trouvée dérégulée suite à l'inactivation néonatale de *Hnf1b*. En outre, *Ctgf*, gène cible de Yap, participe à la régulation de l'adhésion/migration cellulaire et à la production/dégradation de la matrice extracellulaire dans différents systèmes (Babic et al., 1999; Chen et al., 2001; Fan and Karnovsky, 2002). Aussi, l'inactivation de *Ctgf* chez la souris perturbe la formation des îlots (Crawford et al., 2009). La diminution du volume et du nombre des gros îlots pourrait donc s'expliquer par des défauts d'EMT chez les souris PMHnf1b.

La lignée PMHnf1b souffre également de défauts exocrines majeurs, bien que d'apparition plus tardive que les anomalies endocrines. Ce résultat est en accord avec les observations d'hypoplasie pancréatique et de dysfonctions exocrines faites chez les patients MODY5 (Tjora et al., 2013). Vers douze mois, le pancréas exocrine des souris PMHnf1b présente les principales caractéristiques d'une pancréatite et cumule fibrose, infiltration de macrophages, lipomatose et ADM. Bien qu'une atteinte ciliaire ait également été constatée, celle-ci semble bien plus modérée que chez les souris inactivées pour *Hnf1b*. Aussi, l'absence de dilatation canalaire différencie les deux phénotypes et permet d'exclure l'hypothèse d'une fuite du contenu canalaire à l'origine de l'inflammation chez les souris *Sox9-Cre<sup>ER</sup>;Hnf1b<sup>fl/fl</sup>*.

En conclusion, la lignée PMHnf1b constitue un modèle fiable d'étude de la maladie humaine MODY5 et conduit à des avancées majeures dans la compréhension de son étiologie et de sa physiopathologie.

### **Régénération du pancréas exocrine et HDAC3**

La pancréatite est généralement liée à l'activation inappropriée des enzymes acinaires, induisant autodigestion, nécrose et inflammation du pancréas (Cosen-Binker and Gaisano, 2007; Dixit et al., 2016). Chez la souris, l'inactivation de *trypsinogène-7* diminue de moitié la nécrose acinaire qui intervient suite l'induction d'une pancréatite aiguë (Dawra et al., 2011). Néanmoins, sur le plan clinique, les inhibiteurs de protéases acinaires se révèlent inefficaces dans le traitement de cette pathologie (Singh and Chari, 2005). La médecine régénérative constitue une autre approche thérapeutique. Elle se base sur la génération *in vitro* de nouvelles population cellulaires destinées à la transplantation ou sur la stimulation des mécanismes endogènes de régénération (Mao and Mooney, 2015).

Plusieurs espèces animales présentent d'impressionnantes aptitudes à la régénération cellulaire. Par exemple, les hydres, appartenant à l'embranchement des cnidaires, sont capables de reconstituer un individu complet à partir de simples fragments tissulaires. L'axolotl peut quant à lui aisément reformer des membres ou organes amputés (Tanaka and Reddien, 2011). Chez les mammifères, les capacités régénératives sont nettement plus restreintes puisqu'elle ne se limitent qu'à quelques organes et déclinent rapidement après la naissance (Forbes and Rosenthal, 2014).

Chez le rongeur, le foie régénère sept à dix jours après ablation partielle de 70% (Forbes and Rosenthal, 2014). La régénération hépatique survient également chez l'Homme, et s'étend généralement sur une période de six à huit semaines selon l'étendue des lésions (Yamanaka et al., 1993). Le cœur présente aussi des propriétés régénératrices, bien qu'essentiellement limitées au stade néonatal (Porrello et al., 2011; Haubner et al., 2016). Chez la souris, la ligation artérielle constitue un modèle de lésion cardiaque expérimentale. Privés d'oxygène, une grande partie des hépatocytes meurt d'ischémie quatre jours après ligation. Les jeunes souris recouvrent la totalité de leur tissu cardiaque sept jours après ligation artérielle (Haubner et al., 2012). Au niveau pancréatique, la destruction partielle des cellules  $\beta$  est également suivie d'une régénération, qui s'opère essentiellement par prolifération des cellules  $\beta$  subsistantes. Bien qu'une néogenèse  $\beta$ -cellulaire semble contribuer à ce processus, son occurrence chez la souris adulte est débattue



(Migliorini et al., 2014; Xiao et al., 2013; Yu et al., 2016). Enfin, comme discuté précédemment, le pancréas exocrine murin présente de vastes capacités régénératives. La régénération du pancréas exocrine fait notamment intervenir les voies Notch, Wnt/ $\beta$ -caténine et Hedgehog, toutes essentielles au développement du pancréas (Murtaugh and Keefe, 2015). Des mécanismes épigénétiques tiennent aussi un rôle important dans la régénération exocrine. Par exemple, l'inactivation pancréatique de l'histone méthyltransférase *EZH2* perturbe la régénération acinaire après induction d'une pancréatite (Mallen-St Clair et al., 2012).

Plusieurs études *ex vivo* et *in vivo* ont démontré que les histone désacétylases de classe I ont un rôle majeur dans la prolifération, la spécification et la différenciation des progéniteurs pancréatiques (Haumaitre et al., 2008, 2009; Lenoir et al., 2011). Nous avons examiné le rôle d'une HDAC de classe I, HDAC3, dans la régénération acinaire. L'inactivation pancréatique de *HDAC3* potentialise les effets inflammatoires de la céruléine et entrave la régénération acinaire. Nous pensons que la perte de *HDAC3* est associée à la persistance de structures métaplasiques après inflammation. Nous prévoyons de tester cette hypothèse par des analyses histologiques et immunohistochimiques. La modulation des marques épigénétiques constitue donc une perspective thérapeutique prometteuse dans le traitement des lésions inflammatoires du pancréas.

## **Conclusion générale**

Mon travail de thèse, grâce à des approches fonctionnelles basées sur différents modèles murins, apporte des informations importantes sur les mécanismes transcriptionnels et épigénétiques qui régulent l'identité et la fonction des cellules du pancréas. Sur le plan clinique, nous anticipons que la perte d'expression de *Hnf1b* pourrait être utilisée comme biomarqueur de gradation du PDAC nécessaire au diagnostic précoce de la maladie. La restauration de l'expression de *HNF1B* pourrait constituer une nouvelle stratégie d'inhibition de la croissance tumorale. Enfin, l'ensemble de ces données pourrait contribuer à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement ou la prévention du diabète, de la pancréatite et du cancer du pancréas.





## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, C., Piaggio, G., Ammendola, R., Solomon, E., Povey, S., Gounari, F., De Simone, V., and Cortese, R. (1990). Mapping of the gene TCF2 coding for the transcription factor LFB3 to human chromosome 17 by polymerase chain reaction. *Genomics* 8, 165–167.
- Afelik, S., and Jensen, J. (2013). Notch signaling in the pancreas: patterning and cell fate specification. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2, 531–544.
- Ali, O. (2013). Genetics of type 2 diabetes. *World J. Diabetes* 4, 114–123.
- Alvelos, M.I., Rodrigues, M., Lobo, L., Medeira, A., Sousa, A.B., Simão, C., and Lemos, M.C. (2015). A Novel Mutation of the HNF1B Gene Associated With Hypoplastic Glomerulocystic Kidney Disease and Neonatal Renal Failure. *Medicine (Baltimore)* 94.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D.J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U., and Edlund, H. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400, 877–881.
- Ardito, C.M., Grüner, B.M., Takeuchi, K.K., Lubeseder-Martellato, C., Teichmann, N., Mazur, P.K., DelGiorno, K.E., Carpenter, E.S., Halbrook, C.J., Hall, J.C., et al. (2012). EGF Receptor is Required for KRAS-induced Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer Cell* 22, 304–317.
- Arnes, L., Hill, J.T., Gross, S., Magnuson, M.A., and Sussel, L. (2012). Ghrelin Expression in the Mouse Pancreas Defines a Unique Multipotent Progenitor Population. *PLoS ONE* 7.
- Babic, A.M., Chen, C.C., and Lau, L.F. (1999). Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2958–2966.
- Bach, I., and Yaniv, M. (1993). More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *EMBO J.* 12, 4229–4242.
- Bach, I., Galcheva-Gargova, Z., Mattei, M.-G., Simon-Chazottes, D., Guénet, J.-L., Cereghini, S., and Yaniv, M. (1990). Cloning of human hepatic nuclear factor 1 (HNF1) and chromosomal localization of its gene in man and mouse. *Genomics* 8, 155–164.
- Bach, I., Mattei, M.G., Cereghini, S., and Yaniv, M. (1991). Two members of an HNF1 homeoprotein family are expressed in human liver. *Nucleic Acids Res.* 19, 3553–3559.
- Bailey, J.M., Hendley, A.M., Lafaro, K.J., Pruski, M.A., Jones, N.C., Alsina, J., Younes, M., Maitra, A., McAllister, F., Iacobuzio-Donahue, C.A., et al. (2016). p53 mutations cooperate with oncogenic Kras to promote adenocarcinoma from pancreatic ductal cells. *Oncogene* 35, 4282–4288.
- Bali, M.A., Golstein, P., Devière, J., Chatterjee, N., and Matos, C. (2006). Evaluation of somatostatin inhibitory effect on pancreatic exocrine function using secretin-enhanced dynamic magnetic resonance cholangiopancreatography: a crossover, randomized, double blind, placebo-controlled study. *Pancreas* 32, 346–350.
- Bansal, R., van Baarlen, J., Storm, G., and Prakash, J. (2015). The interplay of the Notch signaling in hepatic stellate cells and macrophages determines the fate of liver fibrogenesis. *Sci. Rep.* 5.

- Barbacci, E., Reber, M., Ott, M.O., Breillat, C., Huetz, F., and Cereghini, S. (1999). Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 4795–4805.
- Barbacci, E., Chalkiadaki, A., Masdeu, C., Haumaitre, C., Lokmane, L., Loirat, C., Cloarec, S., Talianidis, I., Bellanne-Chantelot, C., and Cereghini, S. (2004). HNF1beta/TCF2 mutations impair transactivation potential through altered co-regulator recruitment. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 3139–3149.
- Bartkowski, S., Zapp, D., Weber, H., Eberle, G., Zoidl, C., Senkel, S., Klein-Hitpass, L., and Ryffel, G.U. (1993). Developmental regulation and tissue distribution of the liver transcription factor LFB1 (HNF1) in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 421–431.
- Bastidas-Ponce, A., Roscioni, S.S., Burtscher, I., Bader, E., Sterr, M., Bakhti, M., and Lickert, H. (2017). Foxa2 and Pdx1 cooperatively regulate postnatal maturation of pancreatic  $\beta$ -cells. *Mol. Metab.* *6*, 524–534.
- Baumhueter, S., Courtois, G., and Crabtree, G.R. (1988). A variant nuclear protein in dedifferentiated hepatoma cells binds to the same functional sequences in the beta fibrinogen gene promoter as HNF-1. *EMBO J.* *7*, 2485–2493.
- Bayle, J.H., Randazzo, F., Johnen, G., Kaufman, S., Nagy, A., Rossant, J., and Crabtree, G.R. (2002). Hyperphenylalaninemia and impaired glucose tolerance in mice lacking the bifunctional DCoH gene. *J. Biol. Chem.* *277*, 28884–28891.
- Bellanné-Chantelot, C., Chauveau, D., Gautier, J.-F., Dubois-Laforgue, D., Clauin, S., Beaufile, S., Wilhelm, J.-M., Boitard, C., Noël, L.-H., Velho, G., et al. (2004). Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann. Intern. Med.* *140*, 510–517.
- Benod, C., Vinogradova, M.V., Jouravel, N., Kim, G.E., Fletterick, R.J., and Sablin, E.P. (2011). Nuclear receptor liver receptor homologue 1 (LRH-1) regulates pancreatic cancer cell growth and proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 16927–16931.
- Beres, T.M., Masui, T., Swift, G.H., Shi, L., Henke, R.M., and MacDonald, R.J. (2006). PTF1 Is an Organ-Specific and Notch-Independent Basic Helix-Loop-Helix Complex Containing the Mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or Its Parologue, RBP-L. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 117–130.
- Bhaskara, S., Chyla, B.J., Amann, J.M., Knutson, S.K., Cortez, D., Sun, Z.-W., and Hiebert, S.W. (2008). Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control. *Mol. Cell* *30*, 61–72.
- Bingham, C., Ellard, S., Allen, L., Bulman, M., Shepherd, M., Frayling, T., Berry, P.J., Clark, P.M., Lindner, T., Bell, G.I., et al. (2000). Abnormal nephron development associated with a frameshift mutation in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$ 1. *Kidney Int.* *57*, 898–907.
- Blumenfeld, M., Maury, M., Chouard, T., Yaniv, M., and Condamine, H. (1991). Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wider distribution than products of its known target genes in developing mouse. *Dev. Camb. Engl.* *113*, 589–599.

- Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y.D., Giovannoni, L., Parnaud, G., and Berney, T. (2010). Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* *59*, 1202–1210.
- Botrugno, O.A., Fayard, E., Annicotte, J.-S., Haby, C., Brennan, T., Wendling, O., Tanaka, T., Kodama, T., Thomas, W., Auwerx, J., et al. (2004). Synergy between LRH-1 and  $\beta$ -Catenin Induces G1 Cyclin-Mediated Cell Proliferation. *Mol. Cell* *15*, 499–509.
- Brodylo, R.L., Lee, M., Lubeseder-Martellato, C., Mazur, P.K., Hampel, F., Zimmer-Strobel, U., Strobel, L.J., Schmid, R.M., and Siveke, J.T. (2011). Abstract A32: Notch pathway regulates pancreatic acinar-to-ductal metaplasia. *Cancer Res.* *71*, A32–A32.
- Cano, D.A., Sekine, S., and Hebrok, M. (2006). Primary cilia deletion in pancreatic epithelial cells results in cyst formation and pancreatitis. *Gastroenterology* *131*, 1856–1869.
- Cereghini, S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *10*, 267–282.
- Cereghini, S., Raymondjean, M., Carranca, A.G., Herbomel, P., and Yaniv, M. (1987). Factors involved in control of tissue-specific expression of albumin gene. *Cell* *50*, 627–638.
- Cereghini, S., Blumenfeld, M., and Yaniv, M. (1988). A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. *Genes Dev.* *2*, 957–974.
- Cereghini, S., Ott, M.O., Power, S., and Maury, M. (1992). Expression patterns of vHNF1 and HNF1 homeoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles. *Dev. Camb. Engl.* *116*, 783–797.
- Ceska, T.A., Lamers, M., Monaci, P., Nicosia, A., Cortese, R., and Suck, D. (1993). The X-ray structure of an atypical homeodomain present in the rat liver transcription factor LFB1/HNF1 and implications for DNA binding. *EMBO J.* *12*, 1805–1810.
- Chauveau, D., Faguer, S., Bandin, F., Guigonis, V., Chassaing, N., and Decramer, S. (2013). [HNF1B-related disease: paradigm of a developmental gene and unexpected recognition of a new renal disease]. *Nephrol. Ther.* *9*, 393–397.
- Chen, C.C., Chen, N., and Lau, L.F. (2001). The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *276*, 10443–10452.
- Chen, X.-M., Qi, W., and Pollock, C.A. (2009). CTGF and chronic kidney fibrosis. *Front. Biosci. Sch. Ed.* *1*, 132–141.
- Chen, Y.-Z., Gao, Q., Zhao, X.-Z., Chen, Y.-Z., Bennett, C.L., Xiong, X.-S., Mei, C.-L., Shi, Y.-Q., and Chen, X.-M. (2010). Systematic review of TCF2 anomalies in renal cysts and diabetes syndrome/maturity onset diabetes of the young type 5. *Chin. Med. J. (Engl.)* *123*, 3326–3333.
- Cherry, A.B.C., and Daley, G.Q. (2012). Reprogramming cellular identity for regenerative medicine. *Cell* *148*, 1110–1122.

- Chi, Y.-I., Frantz, J.D., Oh, B.-C., Hansen, L., Dhe-Paganon, S., and Shoelson, S.E. (2002). Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1alpha. *Mol. Cell* *10*, 1129–1137.
- Chiang, M.-K., and Melton, D.A. (2003). Single-cell transcript analysis of pancreas development. *Dev. Cell* *4*, 383–393.
- Chouard, T., Blumenfeld, M., Bach, I., Vandekerckhove, J., Cereghini, S., and Yaniv, M. (1990). A distal dimerization domain is essential for DNA-binding by the atypical HNF1 homeodomain. *Nucleic Acids Res.* *18*, 5853–5863.
- Choudhuri, S. (2011). From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. *Toxicol. Mech. Methods* *21*, 252–274.
- Christen, U., Bender, C., and von Herrath, M.G. (2012). Infection as a cause of type 1 diabetes? *Curr. Opin. Rheumatol.* *24*, 417–423.
- Cicenas, J., Kvederaviciute, K., Meskinyte, I., Meskinyte-Kausiliene, E., Skeberdyte, A., and Cicenas, J. (2017). KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Cancers* *9*.
- Cid-Arregui, A., and Juarez, V. (2015). Perspectives in the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol. WJG* *21*, 9297–9316.
- Clissold, R.L., Hamilton, A.J., Hattersley, A.T., Ellard, S., and Bingham, C. (2015). HNF1B-associated renal and extra-renal disease—an expanding clinical spectrum. *Nat. Rev. Nephrol.* *11*, 102–112.
- Coffinier, C., Thépot, D., Babinet, C., Yaniv, M., and Barra, J. (1999a). Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 4785–4794.
- Coffinier, C., Barra, J., Babinet, C., and Yaniv, M. (1999b). Expression of the vHNF1/HNF1β homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mech. Dev.* *89*, 211–213.
- Coffinier, C., Gresh, L., Fiette, L., Tronche, F., Schütz, G., Babinet, C., Pontoglio, M., Yaniv, M., and Barra, J. (2002). Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 1829–1838.
- Cosen-Binker, L.I., and Gaisano, H.Y. (2007). Recent insights into the cellular mechanisms of acute pancreatitis. *Can. J. Gastroenterol.* *21*, 19–24.
- Courtney, M., Rabe, T., Collombat, P., and Mansouri, A. (2014). Pax4 and Arx Represent Crucial Regulators of the Development of the Endocrine Pancreas.
- Courtois, G., Morgan, J.G., Campbell, L.A., Fourel, G., and Crabtree, G.R. (1987). Interaction of a liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha 1-antitrypsin promoters. *Science* *238*, 688–692.
- Crawford, L.A., Guney, M.A., Oh, Y.A., Deyoung, R.A., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Yancopoulos, G.D., Lyons, K.M., Brigstock, D.R., Economides, A., et al. (2009). Connective tissue growth factor (CTGF) inactivation leads to defects in islet cell lineage



- allocation and beta-cell proliferation during embryogenesis. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *23*, 324–336.
- Cunliffe, V.T. (2004). Histone deacetylase 1 is required to repress Notch target gene expression during zebrafish neurogenesis and to maintain the production of motoneurons in response to hedgehog signalling. *Development* *131*, 2983–2995.
- Cunliffe, V.T., and Casaccia-Bonnel, P. (2006). Histone deacetylase 1 is essential for oligodendrocyte specification in the zebrafish CNS. *Mech. Dev.* *123*, 24–30.
- Dai, H., Zhang, Y., Yuan, L., Wu, J., Ma, L., and Shi, H. (2016). CTGF mediates high-glucose induced epithelial-mesenchymal transition through activation of  $\beta$ -catenin in podocytes. *Ren. Fail.* *38*, 1711–1716.
- D'Angelo, A., Bluteau, O., Garcia-Gonzalez, M.A., Gresh, L., Doyen, A., Garbay, S., Robine, S., and Pontoglio, M. (2010). Hepatocyte nuclear factor 1alpha and beta control terminal differentiation and cell fate commitment in the gut epithelium. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 1573–1582.
- Das Gupta, K., Shakespear, M.R., Iyer, A., Fairlie, D.P., and Sweet, M.J. (2016). Histone deacetylases in monocyte/macrophage development, activation and metabolism: refining HDAC targets for inflammatory and infectious diseases. *Clin. Transl. Immunol.* *5*, e62.
- Dawra, R., Sah, R.P., Dudeja, V., Rishi, L., Talukdar, R., Garg, P., and Saluja, A.K. (2011). Intra-acinar trypsinogen activation mediates early stages of pancreatic injury but not inflammation in mice with acute pancreatitis. *Gastroenterology* *141*, 2210–2217.e2.
- De Simone, V., De Magistris, L., Lazzaro, D., Gerstner, J., Monaci, P., Nicosia, A., and Cortese, R. (1991). LFB3, a heterodimer-forming homeoprotein of the LFB1 family, is expressed in specialized epithelia. *EMBO J.* *10*, 1435–1443.
- De Vas, M.G., Kopp, J.L., Heliot, C., Sander, M., Cereghini, S., and Haumaitre, C. (2015). Hnf1b controls pancreas morphogenesis and the generation of Ngn3+ endocrine progenitors. *Dev. Camb. Engl.* *142*, 871–882.
- Delous, M., Yin, C., Shin, D., Ninov, N., Carten, J.D., Pan, L., Ma, T.P., Farber, S.A., Moens, C.B., and Stainier, D.Y.R. (2012). *sox9b* Is a Key Regulator of Pancreaticobiliary Ductal System Development. *PLOS Genet.* *8*, e1002754.
- Demartis, A., Maffei, M., Vignali, R., Barsacchi, G., and De Simone, V. (1994). Cloning and developmental expression of LFB3/HNF1 beta transcription factor in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* *47*, 19–28.
- Deryckere, F., Byrnes, L., Wagner, A., McMorrow, T., and Gannon, F. (1995). Salmon HNF1: cDNA sequence, evolution, tissue specificity and binding to the salmon serum albumin promoter. *J. Mol. Biol.* *247*, 1–10.
- Dhebri, A.R., Connor, S., Campbell, F., Ghaneh, P., Sutton, R., and Neoptolemos, J.P. (2004). Diagnosis, treatment and outcome of pancreatoblastoma. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* *4*, 441-451-453.
- dilorio, P., Rittenhouse, A.R., Bortell, R., and Jurczyk, A. (2014). Role of cilia in normal pancreas function and in diseased states. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* *102*, 126–138.

- Dixit, A., Dawra, R.K., and Saluja, V.D. and A.K. (2016). Role of trypsinogen activation in genesis of pancreatitis. *Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowl. Base*.
- Dolenšek, J., Rupnik, M.S., and Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* 7.
- Doyle, M.J., and Sussel, L. (2007). Nkx2.2 Regulates  $\beta$ -Cell Function in the Mature Islet. *Diabetes* 56, 1999–2007.
- Dubois-Laforgue, D., Bellanné-Chantelot, C., Subra, J.-F., and Timsit, J. (2014). Pectus excavatum is part of the clinical spectrum of HNF1B MODY5. *Diabetes Care* 37, e72-73.
- Edeling, M., Ragi, G., Huang, S., Pavenstädt, H., and Susztak, K. (2016). Developmental signalling pathways in renal fibrosis: the roles of Notch, Wnt and Hedgehog. *Nat. Rev. Nephrol.* 12, 426–439.
- Edghill, E.L., Bingham, C., Ellard, S., and Hattersley, A.T. (2006). Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes. *J. Med. Genet.* 43, 84–90.
- Eisses, J.F., Criscimanna, A., Dionise, Z.R., Orabi, A.I., Javed, T.A., Sarwar, S., Jin, S., Zhou, L., Singh, S., Poddar, M., et al. (2015). Valproic Acid Limits Pancreatic Recovery after Pancreatitis by Inhibiting Histone Deacetylases and Preventing Acinar Redifferentiation Programs. *Am. J. Pathol.* 185, 3304–3315.
- El-Khairi, R., and Vallier, L. (2016). The role of hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$  in disease and development. *Diabetes Obes. Metab.* 18, 23–32.
- Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G., and Saur, D. (2014). Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 111, 817–822.
- Fan, W.-H., and Karnovsky, M.J. (2002). Increased MMP-2 expression in connective tissue growth factor over-expression vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 277, 9800–9805.
- Farooq, M., Sulochana, K.N., Pan, X., To, J., Sheng, D., Gong, Z., and Ge, R. (2008). Histone deacetylase 3 (hdac3) is specifically required for liver development in zebrafish. *Dev. Biol.* 317, 336–353.
- Fendrich, V., Esni, F., Garay, M.V.R., Feldmann, G., Habbe, N., Jensen, J.N., Dor, Y., Stoffers, D., Jensen, J., Leach, S.D., et al. (2008). Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas. *Gastroenterology* 135, 621–631.
- von Figura, G., Morris, J.P., Wright, C.V.E., and Hebrok, M. (2014). Nr5a2 maintains acinar cell differentiation and constrains oncogenic Kras-mediated pancreatic neoplastic initiation. *Gut* 63, 656–664.
- Forbes, S.J., and Rosenthal, N. (2014). Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat. Med.* 20, 857–869.
- Frain, M., Swart, G., Monaci, P., Nicosia, A., Stämpfli, S., Frank, R., and Cortese, R. (1989). The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. *Cell* 59, 145–157.

- Fung, E., Tang, S.-M.T., Canner, J.P., Morishige, K., Arboleda-Velasquez, J.F., Cardoso, A.A., Carlesso, N., Aster, J.C., and Aikawa, M. (2007). Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation. *Circulation* *115*, 2948–2956.
- Furuta, H., Furuta, M., Sanke, T., Ekawa, K., Hanabusa, T., Nishi, M., Sasaki, H., and Nanjo, K. (2002). Nonsense and Missense Mutations in the Human Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$  Gene (TCF2) and Their Relation to Type 2 Diabetes in Japanese. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 3859–3863.
- Gao, T., Zhou, D., Yang, C., Singh, T., Penzo-Méndez, A., Maddipati, R., Tzatsos, A., Bardeesy, N., Avruch, J., and Stanger, B.Z. (2013). Hippo signaling regulates differentiation and maintenance in the exocrine pancreas. *Gastroenterology* *144*, 1543–1553, 1553.e1.
- Gartner, L.P., and Hiatt, J.L. (2012). *Color Atlas and Text of Histology* (Lippincott Williams & Wilkins).
- George, N.M., Day, C.E., Boerner, B.P., Johnson, R.L., and Sarvetnick, N.E. (2012). Hippo Signaling Regulates Pancreas Development through Inactivation of Yap. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 5116–5128.
- Gong, H.-Y., Lin, C.J.-F., Chen, M.H.-C., Hu, M.-C., Lin, G.-H., Zhou, Y., Zon, L.I., and Wu, J.-L. (2004). Two distinct teleost hepatocyte nuclear factor 1 genes, hnf1 $\alpha$ /tcf1 and hnf1 $\beta$ /tcf2, abundantly expressed in liver, pancreas, gut and kidney of zebrafish. *Gene* *338*, 35–46.
- Gosmain, Y., Marthinet, E., Cheyssac, C., Guérardel, A., Mamin, A., Katz, L.S., Bouzakri, K., and Philippe, J. (2010). Pax6 controls the expression of critical genes involved in pancreatic  $\alpha$  cell differentiation and function. *J. Biol. Chem.* *285*, 33381–33393.
- Gouzi, M., Kim, Y.H., Katsumoto, K., Johansson, K., and Grapin-Botton, A. (2011). Neurogenin3 initiates stepwise delamination of differentiating endocrine cells during pancreas development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *240*, 589–604.
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., and Guillemot, F. (2000). neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 1607–1611.
- Gresh, L., Fischer, E., Reimann, A., Tanguy, M., Garbay, S., Shao, X., Hiesberger, T., Fiette, L., Igarashi, P., Yaniv, M., et al. (2004). A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J.* *23*, 1657–1668.
- Grisanzio, C., Werner, L., Takeda, D., Awoyemi, B.C., Pomerantz, M.M., Yamada, H., Sooriakumaran, P., Robinson, B.D., Leung, R., Schinzel, A.C., et al. (2012). Genetic and functional analyses implicate the NUDT11, HNF1B, and SLC22A3 genes in prostate cancer pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 11252–11257.
- Gu, C., Stein, G.H., Pan, N., Goebbels, S., Hörnberg, H., Nave, K.-A., Herrera, P., White, P., Kaestner, K.H., Sussel, L., et al. (2010). Pancreatic beta cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity. *Cell Metab.* *11*, 298–310.
- Gu, G., Dubauskaite, J., and Melton, D.A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 2447–2457.

- Gumbiner, B.M., and Kim, N.-G. (2014). The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth. *J. Cell Sci.* *127*, 709–717.
- Haberland, M., Montgomery, R.L., and Olson, E.N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 32–42.
- Haldorsen, I.S., Vesterhus, M., Raeder, H., Jensen, D.K., Søvik, O., Molven, A., and Njølstad, P.R. (2008). Lack of pancreatic body and tail in HNF1B mutation carriers. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* *25*, 782–787.
- Hale, M.A., Swift, G.H., Hoang, C.Q., Deering, T.G., Masui, T., Lee, Y.-K., Xue, J., and MacDonald, R.J. (2014). The nuclear hormone receptor family member NR5A2 controls aspects of multipotent progenitor cell formation and acinar differentiation during pancreatic organogenesis. *Development* *141*, 3123–3133.
- Hardon, E.M., Frain, M., Paonessa, G., and Cortese, R. (1988). Two distinct factors interact with the promoter regions of several liver-specific genes. *EMBO J.* *7*, 1711–1719.
- Harries, L.W., Brown, J.E., and Gloyn, A.L. (2009). Species-specific differences in the expression of the HNF1A, HNF1B and HNF4A genes. *PLoS One* *4*, e7855.
- Hart, A., Papadopoulou, S., and Edlund, H. (2003). Fgf10 maintains notch activation, stimulates proliferation, and blocks differentiation of pancreatic epithelial cells. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *228*, 185–193.
- Haubner, B.J., Adamowicz-Brice, M., Khadayate, S., Tiefenthaler, V., Metzler, B., Aitman, T., and Penninger, J.M. (2012). Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction. *Aging* *4*, 966–977.
- Haubner, B.J., Schneider, J., Schweigmann, U., Schuetz, T., Dichtl, W., Velik-Salchner, C., Stein, J.-I., and Penninger, J.M. (2016). Functional Recovery of a Human Neonatal Heart After Severe Myocardial Infarction. *Circ. Res.* *118*, 216–221.
- Hauge-Evans, A.C., King, A.J., Carmignac, D., Richardson, C.C., Robinson, I.C.A.F., Low, M.J., Christie, M.R., Persaud, S.J., and Jones, P.M. (2009). Somatostatin Secreted by Islet  $\delta$ -Cells Fulfills Multiple Roles as a Paracrine Regulator of Islet Function. *Diabetes* *58*, 403–411.
- Haumaitre, C., Reber, M., and Cereghini, S. (2003). Functions of HNF1 Family Members in Differentiation of the Visceral Endoderm Cell Lineage. *J. Biol. Chem.* *278*, 40933–40942.
- Haumaitre, C., Barbacci, E., Jenny, M., Ott, M.O., Gradwohl, G., and Cereghini, S. (2005). Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 1490–1495.
- Haumaitre, C., Fabre, M., Cormier, S., Baumann, C., Delezoide, A.-L., and Cereghini, S. (2006). Severe pancreas hypoplasia and multicystic renal dysplasia in two human fetuses carrying novel HNF1beta/MODY5 mutations. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 2363–2375.
- Haumaitre, C., Lenoir, O., and Scharfmann, R. (2008). Histone deacetylase inhibitors modify pancreatic cell fate determination and amplify endocrine progenitors. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 6373–6383.

- Haumaitre, C., Lenoir, O., and Scharfmann, R. (2009). Directing cell differentiation with small-molecule histone deacetylase inhibitors: the example of promoting pancreatic endocrine cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 536–544.
- Hebrok, M., Kim, S.K., and Melton, D.A. (1998). Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev.* 12, 1705–1713.
- Heliot, C., Desgrange, A., Buisson, I., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Shan, J., Vainio, S., Umbhauer, M., and Cereghini, S. (2013). HNF1B controls proximal-intermediate nephron segment identity in vertebrates by regulating Notch signalling components and *Irxf1/2*. *Dev. Camb. Engl.* 140, 873–885.
- Heller, R.S., Jenny, M., Collombat, P., Mansouri, A., Tomasetto, C., Madsen, O.D., Mellitzer, G., Gradwohl, G., and Serup, P. (2005). Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Dev. Biol.* 286, 217–224.
- Hiesberger, T., Shao, X., Gourley, E., Reimann, A., Pontoglio, M., and Igarashi, P. (2005). Role of the hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) C-terminal domain in *Pkhd1* (ARPKD) gene transcription and renal cystogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 10578–10586.
- Hoskins, J.W., Jia, J., Flandez, M., Parikh, H., Xiao, W., Collins, I., Emmanuel, M.A., Ibrahim, A., Powell, J., Zhang, L., et al. (2014). Transcriptome analysis of pancreatic cancer reveals a tumor suppressor function for HNF1A. *Carcinogenesis* 35, 2670–2678.
- Huang, H.-H., and Stehno-Bittel, L. (2015). Differences in insulin biosynthesis pathway between small and large islets do not correspond to insulin secretion. *Islets* 7, e1129097.
- Huang, H.-H., Novikova, L., Williams, S.J., Smirnova, I.V., and Stehno-Bittel, L. (2011). Low insulin content of large islet population is present in situ and in isolated islets. *Islets* 3, 6–13.
- Hyun, J.J., and Lee, H.S. (2014). Experimental Models of Pancreatitis. *Clin. Endosc.* 47, 212–216.
- Jacquemin, P., Durviaux, S.M., Jensen, J., Godfraind, C., Gradwohl, G., Guillemot, F., Madsen, O.D., Carmeliet, P., Dewerchin, M., Collen, D., et al. (2000). Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene *ngn3*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4445–4454.
- Janky, R. 's, Binda, M.M., Allemeersch, J., Van den Broeck, A., Govaere, O., Swinnen, J.V., Roskams, T., Aerts, S., and Topal, B. (2016). Prognostic relevance of molecular subtypes and master regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer* 16, 632.
- Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., and Madsen, O.D. (2000). Control of endodermal endocrine development by *Hes-1*. *Nat. Genet.* 24, 36–44.
- Jensen, J.N., Cameron, E., Garay, M.V.R., Starkey, T.W., Gianani, R., and Jensen, J. (2005). Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 128, 728–741.
- Jo, J., Hara, M., Ahlgren, U., Sorenson, R., and Periwal, V. (2012). Mathematical models of pancreatic islet size distributions. *Islets* 4, 10–19.

- Johnen, G., and Kaufman, S. (1997). Studies on the enzymatic and transcriptional activity of the dimerization cofactor for hepatocyte nuclear factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 13469–13474.
- Kaikkonen, M.U., Lam, M.T.Y., and Glass, C.K. (2011). Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc. Res.* *90*, 430–440.
- Kang, H.S., Kim, Y.-S., ZeRuth, G., Beak, J.Y., Gerrish, K., Kilic, G., Sosa-Pineda, B., Jensen, J., Foley, J., and Jetten, A.M. (2009). Transcription Factor Glis3, a Novel Critical Player in the Regulation of Pancreatic  $\beta$ -Cell Development and Insulin Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 6366–6379.
- Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R.J., and Wright, C.V.E. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat. Genet.* *32*, 128–134.
- Kilimnik, G., Zhao, B., Jo, J., Periwai, V., Witkowski, P., Misawa, R., and Hara, M. (2011). Altered Islet Composition and Disproportionate Loss of Large Islets in Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS ONE* *6*.
- Kitada, M., Kume, S., Kanasaki, K., Takeda-Watanabe, A., and Koya, D. (2013). Sirtuins as possible drug targets in type 2 diabetes. *Curr. Drug Targets* *14*, 622–636.
- Knutson, S.K., Chyla, B.J., Amann, J.M., Bhaskara, S., Huppert, S.S., and Hiebert, S.W. (2008). Liver-specific deletion of histone deacetylase 3 disrupts metabolic transcriptional networks. *EMBO J.* *27*, 1017–1028.
- Kopp, J.L., Dubois, C.L., Schaffer, A.E., Hao, E., Shih, H.P., Seymour, P.A., Ma, J., and Sander, M. (2011). Sox9<sup>+</sup> ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 653–665.
- Kopp, J.L., von Figura, G., Mayes, E., Liu, F.-F., Dubois, C.L., Morris, J.P., Pan, F.C., Akiyama, H., Wright, C.V.E., Jensen, K., et al. (2012). Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* *22*, 737–750.
- Kowalik, A.S., Johnson, C.L., Chadi, S.A., Weston, J.Y., Fazio, E.N., and Pin, C.L. (2007). Mice lacking the transcription factor Mist1 exhibit an altered stress response and increased sensitivity to caerulein-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *292*, G1123-1132.
- Krapp, A., Knöfler, M., Ledermann, B., Bürki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbüchle, O., and Wellauer, P.K. (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev.* *12*, 3752–3763.
- Kuo, C.J., Conley, P.B., Hsieh, C.L., Francke, U., and Crabtree, G.R. (1990). Molecular cloning, functional expression, and chromosomal localization of mouse hepatocyte nuclear factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 9838–9842.
- La Rosa, S., Sessa, F., and Capella, C. (2015). Acinar Cell Carcinoma of the Pancreas: Overview of Clinicopathologic Features and Insights into the Molecular Pathology. *Front. Med.* *2*.

- Laffargue, F., Bourthoumieu, S., Llanas, B., Baudouin, V., Lahoche, A., Morin, D., Bessenay, L., Parscau, L.D., Cloarec, S., Delrue, M.-A., et al. (2015). Towards a new point of view on the phenotype of patients with a 17q12 microdeletion syndrome. *Arch. Dis. Child.* *100*, 259–264.
- Lagger, G., O'Carroll, D., Rembold, M., Khier, H., Tischler, J., Weitzer, G., Schuettengruber, B., Hauser, C., Brunmeir, R., Jenuwein, T., et al. (2002). Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J.* *21*, 2672–2681.
- Lee, J.C., Smith, S.B., Watada, H., Lin, J., Scheel, D., Wang, J., Mirmira, R.G., and German, M.S. (2001). Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* *50*, 928–936.
- Lee, J.-Y., Ristow, M., Lin, X., White, M.F., Magnuson, M.A., and Hennighausen, L. (2006). RIP-Cre revisited, evidence for impairments of pancreatic beta-cell function. *J. Biol. Chem.* *281*, 2649–2653.
- Leiting, B., De Francesco, R., Tomei, L., Cortese, R., Otting, G., and Wüthrich, K. (1993). The three-dimensional NMR-solution structure of the polypeptide fragment 195-286 of the LFB1/HNF1 transcription factor from rat liver comprises a nonclassical homeodomain. *EMBO J.* *12*, 1797–1803.
- Lenoir, O., Flosseau, K., Ma, F.X., Blondeau, B., Mai, A., Bassel-Duby, R., Ravassard, P., Olson, E.N., Haumaitre, C., and Scharfmann, R. (2011). Specific control of pancreatic endocrine  $\beta$ - and  $\delta$ -cell mass by class IIa histone deacetylases HDAC4, HDAC5, and HDAC9. *Diabetes* *60*, 2861–2871.
- Lindner, T.H., Njolstad, P.R., Horikawa, Y., Bostad, L., Bell, G.I., and Sovik, O. (1999). A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 2001–2008.
- Lodh, S., O'Hare, E.A., and Zaghloul, N.A. (2014). Primary Cilia in Pancreatic Development and Disease. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* *102*, 139–158.
- Loirat, C., Bellanné-Chantelot, C., Husson, I., Deschênes, G., Guignonis, V., and Chabane, N. (2010). Autism in three patients with cystic or hyperechogenic kidneys and chromosome 17q12 deletion. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *25*, 3430–3433.
- Lokmane, L., Haumaitre, C., Garcia-Villalba, P., Anselme, I., Schneider-Maunoury, S., and Cereghini, S. (2008). Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification. *Development* *135*, 2777–2786.
- Lokmane, L., Heliot, C., Garcia-Villalba, P., Fabre, M., and Cereghini, S. (2010). vHNF1 functions in distinct regulatory circuits to control ureteric bud branching and early nephrogenesis. *Development* *137*, 347–357.
- Ltd, T.C. of B. (2014). Hippo signalling in EMT and metastasis. *J Cell Sci* *127*, e0704–e0704.
- Lynn, F.C., Skewes-Cox, P., Kosaka, Y., McManus, M.T., Harfe, B.D., and German, M.S. (2007). MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* *56*, 2938–2945.

- Ma, Z., Gong, Y., Patel, V., Karner, C.M., Fischer, E., Hiesberger, T., Carroll, T.J., Pontoglio, M., and Igarashi, P. (2007). Mutations of HNF-1beta inhibit epithelial morphogenesis through dysregulation of SOCS-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20386–20391.
- Maestro, M.A., Boj, S.F., Luco, R.F., Pierreux, C.E., Cabedo, J., Servitja, J.M., German, M.S., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P., and Ferrer, J. (2003). Hnf6 and Tcf2 (MODY5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 3307–3314.
- Mallen-St Clair, J., Soydaner-Azeloglu, R., Lee, K.E., Taylor, L., Livanos, A., Pylayeva-Gupta, Y., Miller, G., Margueron, R., Reinberg, D., and Bar-Sagi, D. (2012). EZH2 couples pancreatic regeneration to neoplastic progression. *Genes Dev.* *26*, 439–444.
- Manderfield, L.J., Aghajanian, H., Engleka, K.A., Lim, L.Y., Liu, F., Jain, R., Li, L., Olson, E.N., and Epstein, J.A. (2015). Hippo signaling is required for Notch-dependent smooth muscle differentiation of neural crest. *Dev. Camb. Engl.* *142*, 2962–2971.
- Mannaerts, I., Leite, S.B., Verhulst, S., Claerhout, S., Eysackers, N., Thoen, L.F.R., Hoorens, A., Reynaert, H., Halder, G., and van Grunsven, L.A. (2015). The Hippo pathway effector YAP controls mouse hepatic stellate cell activation. *J. Hepatol.* *63*, 679–688.
- Mao, A.S., and Mooney, D.J. (2015). Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 14452–14459.
- Masui, T., Long, Q., Beres, T.M., Magnuson, M.A., and MacDonald, R.J. (2007). Early pancreatic development requires the vertebrate Suppressor of Hairless (RBPJ) in the PTF1 bHLH complex. *Genes Dev.* *21*, 2629–2643.
- Masui, T., Swift, G.H., Deering, T., Shen, C., Coats, W.S., Long, Q., Elsässer, H.-P., Magnuson, M.A., and MacDonald, R.J. (2010). Replacement of Rbpj With Rbpjl in the PTF1 Complex Controls the Final Maturation of Pancreatic Acinar Cells. *Gastroenterology* *139*, 270–280.
- Mendel, D.B., Khavari, P.A., Conley, P.B., Graves, M.K., Hansen, L.P., Admon, A., and Crabtree, G.R. (1991). Characterization of a cofactor that regulates dimerization of a mammalian homeodomain protein. *Science* *254*, 1762–1767.
- Messaoui, A., Tenoutasse, S., and Dorchy, H. (2016). [Maturity onset diabetes of the young: just think about it]. *Rev. Med. Brux.* *37*, 95–100.
- Michan, S., and Sinclair, D. (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem. J.* *404*, 1–13.
- Miettinen, P.J., Huotari, M., Koivisto, T., Ustinov, J., Palgi, J., Rasilainen, S., Lehtonen, E., Keski-Oja, J., and Otonkoski, T. (2000). Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 2617–2627.
- Migliorini, A., Bader, E., and Lickert, H. (2014). Islet cell plasticity and regeneration. *Mol. Metab.* *3*, 268–274.
- Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C.A., Sriuranpong, V., Iso, T., Meszoely, I.M., Wolfe, M.S., et al. (2003). Notch mediates TGF $\alpha$ -induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* *3*, 565–576.



- Montgomery, R.L., Davis, C.A., Potthoff, M.J., Haberland, M., Fielitz, J., Qi, X., Hill, J.A., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2007). Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev.* *21*, 1790–1802.
- Montgomery, R.L., Potthoff, M.J., Haberland, M., Qi, X., Matsuzaki, S., Humphries, K.M., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2008). Maintenance of cardiac energy metabolism by histone deacetylase 3 in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 3588–3597.
- Moreno-De-Luca, D., Mulle, J.G., Kaminsky, E.B., Sanders, S.J., Myers, S.M., Adam, M.P., Pakula, A.T., Eisenhauer, N.J., Uhas, K., Weik, L., et al. (2010). Deletion 17q12 Is a Recurrent Copy Number Variant that Confers High Risk of Autism and Schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* *87*, 618–630.
- Moresi, V., Carrer, M., Grueter, C.E., Rifki, O.F., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2012). Histone deacetylases 1 and 2 regulate autophagy flux and skeletal muscle homeostasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 1649–1654.
- Morris, J.P., Cano, D.A., Sekine, S., Wang, S.C., and Hebrok, M. (2010). Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 508–520.
- Mosley, A.L., and Ozcan, S. (2004). The pancreatic duodenal homeobox-1 protein (Pdx-1) interacts with histone deacetylases Hdac-1 and Hdac-2 on low levels of glucose. *J. Biol. Chem.* *279*, 54241–54247.
- Müller, T.D., Nogueiras, R., Andermann, M.L., Andrews, Z.B., Anker, S.D., Argente, J., Batterham, R.L., Benoit, S.C., Bowers, C.Y., Broglio, F., et al. (2015). Ghrelin. *Mol. Metab.* *4*, 437–460.
- Murea, M., Ma, L., and Freedman, B.I. (2012). Genetic and environmental factors associated with type 2 diabetes and diabetic vascular complications. *Rev. Diabet. Stud. RDS* *9*, 6–22.
- Murtaugh, L.C. (2014). Pathogenesis of pancreatic cancer: lessons from animal models. *Toxicol. Pathol.* *42*, 217–228.
- Murtaugh, L.C., and Keefe, M. (2015). Regeneration and Repair of the Exocrine Pancreas. *Annu. Rev. Physiol.* *77*, 229–249.
- Nammo, T., Yamagata, K., Hamaoka, R., Zhu, Q., Akiyama, T., Gonzalez, F., Miyagawa, J., and Matsuzawa, Y. (2002). Expression profile of MODY3/HNF-1 $\alpha$  protein in the developing mouse pancreas. *Diabetologia* *45*, 1142–1153.
- Nammo, T., Yamagata, K., Tanaka, T., Kodama, T., Sladek, F.M., Fukui, K., Katsube, F., Sato, Y., Miyagawa, J.-I., and Shimomura, I. (2008). Expression of HNF-4 $\alpha$  (MODY1), HNF-1 $\beta$  (MODY5), and HNF-1 $\alpha$  (MODY3) proteins in the developing mouse pancreas. *Gene Expr. Patterns GEP* *8*, 96–106.
- Navas, C., Hernández-Porrás, I., Schuhmacher, A.J., Sibilía, M., Guerra, C., and Barbacid, M. (2012). EGF RECEPTOR SIGNALING IS ESSENTIAL FOR K-RAS ONCOGENE-DRIVEN PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA. *Cancer Cell* *22*, 318–330.
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2016). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet Lond. Engl.* *387*, 1513–1530.

- Nicosia, A., Monaci, P., Tomei, L., De Francesco, R., Nuzzo, M., Stunnenberg, H., and Cortese, R. (1990). A myosin-like dimerization helix and an extra-large homeodomain are essential elements of the tripartite DNA binding structure of LFB1. *Cell* *61*, 1225–1236.
- Noël, E.S., Casal-Sueiro, A., Busch-Nentwich, E., Verkade, H., Dong, P.D.S., Stemple, D.L., and Ober, E.A. (2008). Organ-specific requirements for Hdac1 in liver and pancreas formation. *Dev. Biol.* *322*, 237–250.
- Ott, M.O., Rey-Campos, J., Cereghini, S., and Yaniv, M. (1991). vHNF1 is expressed in epithelial cells of distinct embryonic origin during development and precedes HNF1 expression. *Mech. Dev.* *36*, 47–58.
- Pagliuca, F.W., Millman, J.R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J.H., Peterson, Q.P., Greiner, D., and Melton, D.A. (2014). Generation of functional human pancreatic  $\beta$  cells in vitro. *Cell* *159*, 428–439.
- Pan, F.C., and Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *240*, 530–565.
- Pandol, S.J. (2010). Regulation of Whole-Organ Pancreatic Secretion (Morgan & Claypool Life Sciences).
- Párrizas, M., Maestro, M.A., Boj, S.F., Paniagua, A., Casamitjana, R., Gomis, R., Rivera, F., and Ferrer, J. (2001). Hepatic nuclear factor 1-alpha directs nucleosomal hyperacetylation to its tissue-specific transcriptional targets. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 3234–3243.
- Pazour, G.J., Dickert, B.L., Vucica, Y., Seeley, E.S., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., and Cole, D.G. (2000). Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* *151*, 709–718.
- Pierreux, C.E., Poll, A.V., Kemp, C.R., Clotman, F., Maestro, M.A., Cordi, S., Ferrer, J., Leyns, L., Rousseau, G.G., and Lemaigre, F.P. (2006). The Transcription Factor Hepatocyte Nuclear Factor-6 Controls the Development of Pancreatic Ducts in the Mouse. *Gastroenterology* *130*, 532–541.
- Pin, C.L., Rukstalis, J.M., Johnson, C., and Konieczny, S.F. (2001). The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *J. Cell Biol.* *155*, 519–530.
- Ploquin, A., Baldini, C., Vuagnat, P., Makhloufi, S., Desauw, C., and Hebbar, M. (2015). Prolonged Survival in a Patient with a Pancreatic Acinar Cell Carcinoma. *Case Rep. Oncol.* *8*, 447–450.
- Polak, M., and Cavé, H. (2007). Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms. *Orphanet J. Rare Dis.* *2*, 12.
- Pontoglio, M., Barra, J., Hadchouel, M., Doyen, A., Kress, C., Bach, J.P., Babinet, C., and Yaniv, M. (1996). Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* *84*, 575–585.
- Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., and Sadek, H.A. (2011). Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. *Science* *331*, 1078–1080.

- Quilichini, E., and Haumaitre, C. (2015). Implication of epigenetics in pancreas development and disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *29*, 883–898.
- Raynaud, P., Tate, J., Callens, C., Cordi, S., Vandersmissen, P., Carpentier, R., Sempoux, C., Devuyst, O., Pierreux, C.E., Courtoy, P., et al. (2011). A classification of ductal plate malformations based on distinct pathogenic mechanisms of biliary dysmorphogenesis. *Hepatol. Baltim. Md* *53*, 1959–1966.
- Reber, M., and Cereghini, S. (2001). Variant hepatocyte nuclear factor 1 expression in the mouse genital tract. *Mech. Dev.* *100*, 75–78.
- Reichert, M., and Rustgi, A.K. (2011). Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *J. Clin. Invest.* *121*, 4572–4578.
- Reichert, M., Blume, K., Kleger, A., Hartmann, D., and von Figura, G. (2016). Developmental Pathways Direct Pancreatic Cancer Initiation from Its Cellular Origin. *Stem Cells Int.* *2016*.
- Rey-Campos, J., Chouard, T., Yaniv, M., and Cereghini, S. (1991). vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *EMBO J.* *10*, 1445–1457.
- Rhee, K.H., Stier, G., Becker, P.B., Suck, D., and Sandaltzopoulos, R. (1997). The bifunctional protein DCoH modulates interactions of the homeodomain transcription factor HNF1 with nucleic acids. *J. Mol. Biol.* *265*, 20–29.
- Ringeisen, F., Rey-Campos, J., and Yaniv, M. (1993). The transactivation potential of variant hepatocyte nuclear factor 1 is modified by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* *268*, 25706–25711.
- Ro, C., Chai, W., Yu, V.E., and Yu, R. (2013). Pancreatic neuroendocrine tumors: biology, diagnosis, and treatment. *Chin. J. Cancer* *32*, 312–324.
- Roelandt, P., Antoniou, A., Libbrecht, L., Van Steenberghe, W., Laleman, W., Verslype, C., Van der Merwe, S., Nevens, F., De Vos, R., Fischer, E., et al. (2012). HNF1B deficiency causes ciliary defects in human cholangiocytes. *Hepatol. Baltim. Md* *56*, 1178–1181.
- Romero, L., Ng, L., and Kirby, G.M. (2006). Chemical inducers of rodent glutathione s-transferases down-regulate human GSTA1 transcription through a mechanism involving variant hepatic nuclear factor 1-C. *Mol. Pharmacol.* *70*, 277–286.
- Rose, R.B., Endrizzi, J.A., Cronk, J.D., Holton, J., and Alber, T. (2000). High-resolution structure of the HNF-1 $\alpha$  dimerization domain. *Biochemistry (Mosc.)* *39*, 15062–15070.
- Ross-Adams, H., Ball, S., Lawrenson, K., Halim, S., Russell, R., Wells, C., Strand, S.H., Ørntoft, T.F., Larson, M., Armasu, S., et al. (2016). HNF1B variants associate with promoter methylation and regulate gene networks activated in prostate and ovarian cancer. *Oncotarget* *7*, 74734–74746.
- Roy, N., and Hebrok, M. (2015). Regulation of cellular identity in cancer. *Dev. Cell* *35*, 674–684.
- Rukstalis, J.M., and Habener, J.F. (2007). Snail2, a mediator of epithelial-mesenchymal transitions, expressed in progenitor cells of the developing endocrine pancreas. *Gene Expr. Patterns GEP* *7*, 471–479.

- Rukstalis, J.M., Kowalik, A., Zhu, L., Lidington, D., Pin, C.L., and Konieczny, S.F. (2003). Exocrine specific expression of Connexin32 is dependent on the basic helix-loop-helix transcription factor Mist1. *J. Cell Sci.* *116*, 3315–3325.
- Sadler, A.J., Rossello, F.J., Yu, L., Deane, J.A., Yuan, X., Wang, D., Irving, A.T., Kaparakis-Liaskos, M., Gantier, M.P., Ying, H., et al. (2015). BTB-ZF transcriptional regulator PLZF modifies chromatin to restrain inflammatory signaling programs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 1535–1540.
- Saif, M.W. (2007). Pancreatoblastoma. *JOP J. Pancreas* *8*, 55–63.
- Sawey, E.T., Johnson, J.A., and Crawford, H.C. (2007). Matrix metalloproteinase 7 controls pancreatic acinar cell transdifferentiation by activating the Notch signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 19327–19332.
- Schaffer, A.E., Freude, K.K., Nelson, S.B., and Sander, M. (2010). Ptf1a and Nkx6 transcription factors function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors. *Dev. Cell* *18*, 1022–1029.
- Serls, A.E., Doherty, S., Parvatiyar, P., Wells, J.M., and Deutsch, G.H. (2005). Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 35–47.
- Seymour, P.A. (2014). Sox9: A Master Regulator of the Pancreatic Program. *Rev. Diabet. Stud. RDS* *11*, 51–83.
- Seymour, P.A., Freude, K.K., Tran, M.N., Mayes, E.E., Jensen, J., Kist, R., Scherer, G., and Sander, M. (2007). SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1865–1870.
- Shakespeare, M.R., Halili, M.A., Irvine, K.M., Fairlie, D.P., and Sweet, M.J. (2011). Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. *Trends Immunol.* *32*, 335–343.
- Sharma, S., Kelly, T.K., and Jones, P.A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* *31*, 27–36.
- Shen, H., Fridley, B.L., Song, H., Lawrenson, K., Cunningham, J.M., Ramus, S.J., Cicek, M.S., Tyrer, J., Stram, D., Larson, M.C., et al. (2013). Epigenetic analysis leads to identification of HNF1B as a subtype-specific susceptibility gene for ovarian cancer. *Nat. Commun.* *4*, 1628.
- Shih, H.P., Kopp, J.L., Sandhu, M., Dubois, C.L., Seymour, P.A., Grapin-Botton, A., and Sander, M. (2012). A Notch-dependent molecular circuitry initiates pancreatic endocrine and ductal cell differentiation. *Development* *139*, 2488–2499.
- Shim, J.H., Lee, H.C., Han, S., Kang, H.J., Yu, E., and Lee, S.-G. (2013). Hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$  is a novel prognostic marker independent of the Milan criteria in transplantable hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis based on tissue microarrays. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* *19*, 336–345.
- Singh, V.P., and Chari, S.T. (2005). Protease inhibitors in acute pancreatitis: lessons from the bench and failed clinical trials. *Gastroenterology* *128*, 2172–2174.

- Siveke, J.T., Lubeseder-Martellato, C., Lee, M., Mazur, P.K., Nakhai, H., Radtke, F., and Schmid, R.M. (2008). Notch signaling is required for exocrine regeneration after acute pancreatitis. *Gastroenterology* *134*, 544–555.
- Solar, M., Cardalda, C., Houbracken, I., Martín, M., Maestro, M.A., De Medts, N., Xu, X., Grau, V., Heimberg, H., Bouwens, L., et al. (2009). Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Dev. Cell* *17*, 849–860.
- Soutoglou, E., Papafotiou, G., Katrakili, N., and Talianidis, I. (2000). Transcriptional Activation by Hepatocyte Nuclear Factor-1 Requires Synergism between Multiple Coactivator Proteins. *J. Biol. Chem.* *275*, 12515–12520.
- Stadler, J.A., Shkumatava, A., Norton, W.H.J., Rau, M.J., Geisler, R., Fischer, S., and Neumann, C.J. (2005). Histone deacetylase 1 is required for cell cycle exit and differentiation in the zebrafish retina. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *233*, 883–889.
- Stanger, B.Z., Tanaka, A.J., and Melton, D.A. (2007). Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature* *445*, 886–891.
- Subramanian, S., Bates, S.E., Wright, J.J., Espinoza-Delgado, I., and Piekarz, R.L. (2010). Clinical Toxicities of Histone Deacetylase Inhibitors. *Pharmaceuticals* *3*, 2751–2767.
- Sun, Z., and Hopkins, N. (2001). *vhnf1*, the MODY5 and familial GCKD-associated gene, regulates regional specification of the zebrafish gut, pronephros, and hindbrain. *Genes Dev.* *15*, 3217–3229.
- Tanaka, E., and Reddien, P.W. (2011). The cellular basis for animal regeneration. *Dev. Cell* *21*, 172–185.
- Tatum, J.A., Meneveau, M.O., and Brayman, K.L. (2017). Single-donor islet transplantation in type 1 diabetes: patient selection and special considerations. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* *10*, 73–78.
- Tjora, E., Wathle, G., Erchinger, F., Engjom, T., Molven, A., Aksnes, L., Haldorsen, I.S., Dimceovski, G., Ræder, H., and Njølstad, P.R. (2013). Exocrine pancreatic function in hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$ -maturity-onset diabetes of the young (HNF1B-MODY) is only moderately reduced: compensatory hypersecretion from a hypoplastic pancreas. *Diabet. Med.* *30*, 946–955.
- Tomei, L., Cortese, R., and De Francesco, R. (1992). A POU-A related region dictates DNA binding specificity of LFB1/HNF1 by orienting the two XL-homeodomains in the dimer. *EMBO J.* *11*, 4119–4129.
- Toniatti, C., Monaci, P., Nicosia, A., Cortese, R., and Ciliberto, G. (1993). A bipartite activation domain is responsible for the activity of transcription factor HNF1/LFB1 in cells of hepatic and nonhepatic origin. *DNA Cell Biol.* *12*, 199–208.
- Tronche, F., Ringeisen, F., Blumenfeld, M., Yaniv, M., and Pontoglio, M. (1997). Analysis of the distribution of binding sites for a tissue-specific transcription factor in the vertebrate genome. *J. Mol. Biol.* *266*, 231–245.
- Tuomilehto, J. (2013). The Emerging Global Epidemic of Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* *13*, 795–804.

- Verdeguer, F., Le Corre, S., Fischer, E., Callens, C., Garbay, S., Doyen, A., Igarashi, P., Terzi, F., and Pontoglio, M. (2010). A mitotic transcriptional switch in polycystic kidney disease. *Nat. Med.* *16*, 106–110.
- Verhave, J.C., Bech, A.P., Wetzels, J.F.M., and Nijenhuis, T. (2016). Hepatocyte Nuclear Factor 1 $\beta$ -Associated Kidney Disease: More than Renal Cysts and Diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *27*, 345–353.
- Wajchenberg, B.L. (2007). beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr. Rev.* *28*, 187–218.
- Wang, L., Coffinier, C., Thomas, M.K., Gresh, L., Eddu, G., Manor, T., Levitsky, L.L., Yaniv, M., and Rhoads, D.B. (2004). Selective deletion of the Hnf1beta (MODY5) gene in beta-cells leads to altered gene expression and defective insulin release. *Endocrinology* *145*, 3941–3949.
- Wang, Q., Xu, Z., An, Q., Jiang, D., Wang, L., Liang, B., and Li, Z. (2015). TAZ promotes epithelial to mesenchymal transition via the upregulation of connective tissue growth factor expression in neuroblastoma cells. *Mol. Med. Rep.* *11*, 982–988.
- Wei, X., Wang, J.-P., Hao, C.-Q., Yang, X.-F., Wang, L.-X., Huang, C.-X., Bai, X.-F., Lian, J.-Q., and Zhang, Y. (2016). Notch Signaling Contributes to Liver Inflammation by Regulation of Interleukin-22-Producing Cells in Hepatitis B Virus Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *6*.
- Wei, Z., Chigurupati, S., Arumugam, T.V., Jo, D.-G., Li, H., and Chan, S.L. (2011). Notch activation enhances the microglia-mediated inflammatory response associated with focal cerebral ischemia. *Stroke* *42*, 2589–2594.
- Williams, J.A. (2014). Pancreatic Polypeptide. *Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowl. Base*.
- Wilschanski, M., and Novak, I. (2013). The Cystic Fibrosis of Exocrine Pancreas. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *3*.
- Wilting, R.H., Yanover, E., Heideman, M.R., Jacobs, H., Horner, J., van der Torre, J., DePinho, R.A., and Dannenberg, J.-H. (2010). Overlapping functions of Hdac1 and Hdac2 in cell cycle regulation and haematopoiesis. *EMBO J.* *29*, 2586–2597.
- Xiao, X., Chen, Z., Shiota, C., Prasad, K., Guo, P., El-Gohary, Y., Paredes, J., Welsh, C., Wiersch, J., and Gittes, G.K. (2013). No evidence for  $\beta$  cell neogenesis in murine adult pancreas. *J. Clin. Invest.* *123*, 2207–2217.
- Xu, C.-R., Cole, P.A., Meyers, D.J., Kormish, J., Dent, S., and Zaret, K.S. (2011). Chromatin “prepattern” and histone modifiers in a fate choice for liver and pancreas. *Science* *332*, 963–966.
- Yamaguchi, M., Tonou-Fujimori, N., Komori, A., Maeda, R., Nojima, Y., Li, H., Okamoto, H., and Masai, I. (2005). Histone deacetylase 1 regulates retinal neurogenesis in zebrafish by suppressing Wnt and Notch signaling pathways. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 3027–3043.
- Yamanaka, N., Okamoto, E., Kawamura, E., Kato, T., Oriyama, T., Fujimoto, J., Furukawa, K., Tanaka, T., Tomoda, F., and Tanaka, W. (1993). Dynamics of normal and injured

- human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function. *Hepatology*. Baltimore, Md 18, 79–85.
- Yang, Y., Ding, L., An, Y., Zhang, Z., Lang, Y., Tai, S., Guo, F., and Teng, C.-B. (2012). MiR-18a regulates expression of the pancreatic transcription factor Ptf1a in pancreatic progenitor and acinar cells. *FEBS Lett.* 586, 422–427.
- Ye, F., Chen, Y., Hoang, T., Montgomery, R.L., Zhao, X., Bu, H., Hu, T., Taketo, M.M., van Es, J.H., Clevers, H., et al. (2009). HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat. Neurosci.* 12, 829–838.
- Yimlamai, D., Christodoulou, C., Galli, G.G., Yanger, K., Pepe-Mooney, B., Gurung, B., Shrestha, K., Cahan, P., Stanger, B.Z., and Camargo, F.D. (2014). Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell* 157, 1324–1338.
- Yu, K., Fischbach, S., and Xiao, X. (2016). Beta Cell Regeneration in Adult Mice: Controversy Over the Involvement of Stem Cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 11, 542–546.
- Zapp, D., Bartkowski, S., Holewa, B., Zoidl, C., Klein-Hitpass, L., and Ryffel, G.U. (1993). Elements and factors involved in tissue-specific and embryonic expression of the liver transcription factor LFB1 in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6416–6426.
- Zhang, Q., Zhao, K., Shen, Q., Han, Y., Gu, Y., Li, X., Zhao, D., Liu, Y., Wang, C., Zhang, X., et al. (2015). Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6. *Nature* 525, 389–393.
- Zhu, L., Shi, G., Schmidt, C.M., Hruban, R.H., and Konieczny, S.F. (2007). Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am. J. Pathol.* 171, 263–273.
- Zorn, A.M., and Wells, J.M. (2009). Vertebrate Endoderm Development and Organ Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 221–251.