



**HAL**  
open science

# Identification du rôle du facteur de transcription E2F1 dans la plasticité de la cellule bêta pancréatique

Xavier Gromada

► **To cite this version:**

Xavier Gromada. Identification du rôle du facteur de transcription E2F1 dans la plasticité de la cellule bêta pancréatique. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S061 . tel-04648657

**HAL Id: tel-04648657**

**<https://theses.hal.science/tel-04648657>**

Submitted on 15 Jul 2024

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

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



THESE

Pour l'obtention du grade de  
**Docteur en Sciences de l'Université de Lille**  
Discipline : Science de la Vie  
Spécialité : Biochimie et Biologie moléculaire  
Mention : Physiologie, Physiopathologie

Présentée par  
Xavier GROMADA

**Rôle du facteur de transcription E2F1 dans le maintien de l'identité et la  
fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique**

Soutenue publiquement le 03 novembre 2017

Pr Bart STAELS

Président du jury

Dr Patrick COLLOMBAT  
Dr Catherine POSTIC

Rapporteur  
Rapporteur

Dr Raphaël SCHARFMANN  
Dr Anne MUHR-TAILLEUX

Examinateur  
Examinateur

Dr Jean Sébastien ANNICOTTE

Directeur de thèse

## Remerciements

Voilà, ça fait 3 ans, c'est fini.. Normalement nous sommes arrivés au moment où tout le monde me félicite pour 3 ans de travail, du moins, j'espère que c'est ce qui arrivera. En attendant, j'espère surtout avoir l'occasion d'en faire quelque chose de bien de ce doctorat, et ce n'est pas forcément évident.. C'est quand même important d'en parler. Toujours est-il que je ne regrette pas une seconde, pas un moment et que j'aime, j'adore, je surkiffe toujours la science et surtout la recherche, c'est ça que je veux vraiment faire, je le sais, j'en suis convaincu. Rendez vous dans 10 ans pour savoir où j'en serais à ce moment !

La fin de thèse c'est surtout le moment de rappeler qu'on ne passe pas ces 3 ans seul, et que la science c'est aussi et surtout une équipe et des collaborations.

Alors, pour les courageux qui me supportent, ils savent que je préfère parler aux gens en direct.. Mais quand même, là c'est important de prendre sur soi et de l'écrire..

Donc merci à Jean Sébastien, un directeur de thèse que tout le monde rêverait d'avoir durant son doctorat. Quelqu'un qui sait faire la part des choses entre l'Humain et la rigueur qu'exige une thèse. Une personne très douée dans son domaine, et toujours à l'écoute de ses étudiants. Merci pour tout ce que tu m'as appris au niveau scientifique (en fait, à peu près tout..), au niveau humain (comme disent les jeunes ; « toi même tu sais ») et merci de m'avoir laissé cette liberté et de m'avoir permis cette diversité dans les projets que j'ai pu entreprendre.

Un merci à Charlène, qui est arrivée récemment, et qui a pris le relai sur l'animalerie et surtout sur le génotypage. Alors ça paraît anecdotique mais c'est une aide inestimable. Merci aussi pour ta rigueur, ta confiance, et surtout ta bonne humeur.

Merci à Cyril, mon ancien étudiant, mon jeune padawan maintenant thésard, et qui a toutes les clefs pour faire une très bonne thèse. Merci pour ton aide en ce dernier mois où j'étais un peu booké et où les moindres minutes furent inestimables.

Merci à Fred, le dernier arrivé, le post-doc, l'éléphant du groupe, quelqu'un aussi calme et gentil qu'adorable. J'espère que tu resteras chez Jean Sé un bon moment (pour toujours peut être..) en tout cas je suis ravi d'avoir travaillé avec toi.

Forcément, et c'est logique, merci également à Philippe Froguel, merci de m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans un aussi bon environnement, de m'avoir laissé présenter mes travaux dans chacun des congrès que j'ai pu proposer. Merci d'avoir toujours accepter la discussion lorsque je poussais la porte de votre bureau. Merci aussi de me permettre de définir mon futur dans des conditions aussi stables et enrichissantes en me proposant cette prolongation. Donc réellement, et très sincèrement, pour tout cela, merci.

Merci également à Amélie qui a toujours été très agréable et avec qui les discussions sont toujours enrichissantes. Merci pour ton écoute, ton ouverture d'esprit, tes idées et les prochaines collab prévues !

Merci à tous les membres du 3<sup>ème</sup> étage, Laure, Mathie, Raphy et Gurvan, toujours adorables et agréables durant les pauses repas, les fameux débats du midi ou concernant les discussions sur certaines manip !!

Merci aux nouveaux arrivants du bâtiment, que je commence à mieux connaître depuis quelques mois et qui sont tous super ; Manu, Manue, Medhi, Fatou, Jérôme, Vincent, Audrey, Marlène, Julie, Stéphane, Hélène, Julie, Marion, Mickaël, Véro.. J'ai essayé d'être exhaustif mais j'en ai sûrement oublié, et PARDON

Merci au secrétariat du laboratoire pour votre aide inestimable dans toutes ces tâches administratives qui me font horreur ; Mélanie, Hélène et Céline.

Merci au laboratoire de François Pattou, et surtout à Julie Kerr-Conte avec qui j'ai beaucoup discuté, j'ai pu avoir beaucoup d'interactions et qui développe de très beaux modèles. Merci à toute son équipe et surtout à Caroline, Gianni, Julien, Valéry, Ericka et Alix.

Merci au laboratoire de Bart Staëls, à tout le bâtiment JK chez qui nous étions hébergés durant mon master 2 et avec qui nous avons gardé des liens forts et qui sont tous géniaux.

Alors voilà, ça c'est c'était toute la partie « professionnelle », même si certains sont devenus maintenant des amis.

Mais forcément, un grand merci à ma famille, un grand merci à mes parents, qui m'ont toujours soutenu et à qui je dois tout, ma façon d'être, ma personnalité, et ma franchise.

Un énorme merci, un merci incommensurable même, à Sophia, ma femme, ma fiancée, ma meilleure amie, la femme la plus merveilleuse du monde. Merci de m'avoir supporté durant ces années de thèse, de m'avoir soutenu, d'avoir compris mes horaires, d'avoir compris mes week-ends loin de toi, et de m'avoir autant partagé avec le laboratoire. Je t'aime profondément et je te serais toujours reconnaissant pour tout ce que tu as fait. J'espère un jour réussir à être à la hauteur de tout ce que tu représentes pour moi.

Merci à mes amis, les vrais, ceux qu'on peut considérer comme de la famille. Merci de m'avoir permis de décompresser, de m'avoir soutenu et merci d'être là depuis toutes ces années, ces nombreuses années même, et de m'avoir supporté jusqu'à mes presque bientôt 30 ans.. (mais pas encore, il me reste une petite marge)

Pour finir, merci à chacun des membres du jury, merci à mon président de jury, d'avoir donné de votre temps pour assister à ma thèse. Je suis très fier et honoré que vous ayez pu répondre favorablement à ma demande et je vous en suis très reconnaissant. Un merci particulier à Patrick Collombat et Raphaël Scharfmann qui m'ont également accompagné durant mes CST qui ont précédé cette soutenance. Merci pour vos conseils, vos remarques et nos discussions.

Pour finir, une pensée pour mon cousin, forcément, je n'en parlerais jamais, mais forcément je penserais à toi.. « Paraît que la jeunesse est un risque à courir »

# SOMMAIRE

## Table des matières

<b>I. Le pancréas.....</b>	<b>1</b>
<b>I. Anatomie et histologie du pancréas .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Développement du pancréas.....</b>	<b>2</b>
<b>III. Physiologie du pancréas.....</b>	<b>9</b>
1. Le pancréas exocrine.....	9
2. Le pancréas endocrine .....	11
<b>II. Le diabète .....</b>	<b>21</b>
<b>I. Les diabètes monogéniques .....</b>	<b>23</b>
<b>II. Le diabète gestationnel.....</b>	<b>24</b>
<b>III. Le diabète de type 1 .....</b>	<b>25</b>
<b>IV. Le diabète de type 2.....</b>	<b>27</b>
<b>V. Différents traitements dans le cadre du diabète de type 2. ....</b>	<b>32</b>
1. Biguanides et traitements des diabètes non insulino dépendants. ....	33
2. Les analogues du GLP1 et inhibiteurs de DPP4.....	34
<b>III. Le facteur de transcription E2F1 .....</b>	<b>35</b>
<b>I. Généralités sur la famille des E2Fs .....</b>	<b>35</b>
1. Généralités.....	35
2. Structure protéique des E2Fs.....	36
3. Modulation de l'activité transcriptionnelle des E2Fs .....	38
4. Rôle et fonctions générales des E2Fs.....	40
<b>II. E2F1, un carrefour entre vie et mort cellulaire .....</b>	<b>42</b>
1. E2F1 et prolifération cellulaire .....	42
2. E2F1 et contrôle de l'apoptose .....	44
<b>III. E2F1 et ses rôles métaboliques.....</b>	<b>46</b>
1. Rôle de E2F1 au niveau du muscle et du tissu adipeux brun .....	47
2. Rôle au sein du tissu adipeux .....	48
3. Rôle de E2F1 au niveau du foie.....	50
4. Rôle de E2F1 au niveau du cerveau.....	50
5. Rôle de E2F1 dans le pancréas .....	51
<b>IV. Objectifs de mon travail de thèse .....</b>	<b>54</b>
<b>V. Matériel et Méthodes .....</b>	<b>55</b>
<b>I. Anticorps .....</b>	<b>55</b>
<b>II. Expérimentations animales.....</b>	<b>55</b>
<b>III. Immunofluorescence, Immunohistochimie et Morphométrie .....</b>	<b>56</b>
<b>IV. Études sur îlots pancréatiques isolés.....</b>	<b>57</b>
<b>V. Culture cellulaire, transfections, infections lentivirales et traitements pharmacologiques. ....</b>	<b>57</b>
<b>VI. Immunoprécipitation de la chromatine.....</b>	<b>58</b>
<b>VII. Analyse d'expression génique.....</b>	<b>58</b>
<b>VIII. Extraction des protéines et analyse par immuno-blots .....</b>	<b>59</b>
<b>IX. Données sur l'expression des îlots humains et études de corrélation.....</b>	<b>59</b>
<b>X. Analyses statistiques .....</b>	<b>60</b>
<b>VI. Résultats .....</b>	<b>61</b>
<b>I. Partie 1 : E2F1 permet le maintien d'identité de la cellule <math>\beta</math> pancréatique.....</b>	<b>61</b>
1. Les souris déficientes pour E2F1 spécifiquement dans la cellule $\beta$ pancréatique (E2F1 $\beta$ -/-) montrent un défaut fonctionnel du pancréas. ....	62

2.	L'invalidation de E2F1 dans la lignée cellulaire Min6 montre une régulation directe de E2F1 sur le facteur de transcription spécifique des cellules a pancréatique Arx.....	64
3.	Les souris E2F1 $\beta^{-/-}$ montrent une diminution importante de l'expression des gènes spécifiques de la cellule $\beta$ ainsi qu'un changement morphologique au sein de l'îlot. ....	67
4.	L'utilisation d'un inhibiteur d'E2F in vivo, confirme les effets observées chez les souris E2F1 $\beta^{-/-}$ . ....	69
5.	Le traçage des cellules $\beta$ in vivo montre que l'invalidation d'E2F1 conduit à leur conversion en un autre type cellulaire.....	70
6.	La déficience en E2F1 conduit à un changement épigénétique au niveau du promoteur d'Arx conduisant à sa dé-répression au sein de la cellule $\beta$ .....	74
7.	L'utilisation de l'E2f1 sur des îlots isolés humains présente un phénotype semblable à celui décrit chez la souris. ....	75
8.	Conclusion et discussion .....	79
<b>II.</b>	<b>E2F1 contrôle l'expression du récepteur au GLP1 (GLP1-R) au sein de la cellule <math>\beta</math> pancréatique en réponse à son environnement.....</b>	<b>82</b>
1.	La diminution de l'expression d'E2F1 entraîne la diminution du GLP1-R ainsi que la perte des effets de l'exendine-4 au sein de l'îlot pancréatique humain.....	83
2.	E2f1 régule directement l'expression du Glp1R in vitro .....	84
3.	In vivo, l'expression de E2f1 est nécessaire à l'expression du Glp1-r ainsi qu'à la réponse au glucose dans les phases précoces de sécrétion. ....	86
4.	E2f1 impact la méthylation du promoteur du Glp1-r de manière gluco dépendante....	88
5.	Conclusion et discussion .....	91
<b>VII.</b>	<b>Discussion Générale.....</b>	<b>93</b>
<b>VIII.</b>	<b>Bibliographie .....</b>	<b>99</b>
<b>IX.</b>	<b>Annexes.....</b>	<b>118</b>
1.	KAT2B is required for pancreatic $\beta$ cell adaptation to meboobic stress by controlling the unfolded protein response .....	118
2.	Cdkn2a deficiency promotes adipose tissue browning .....	119

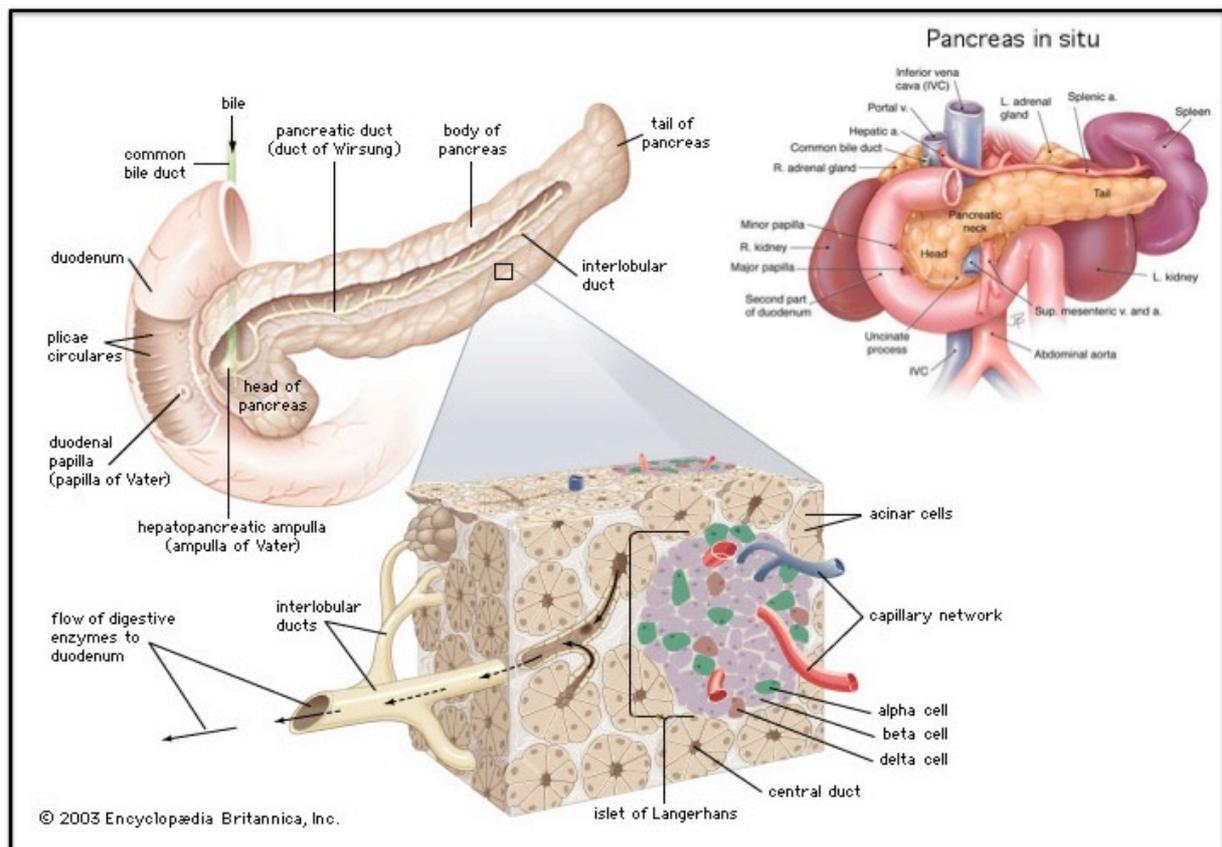
## **I. Le pancréas**

### **I. Anatomie et histologie du pancréas**

Le pancréas est un organe clé impliqué dans le maintien de l'homéostasie métabolique. Il est situé dans la cavité abdominale et mesure environ 15 cm de long pour 4 cm de large.

D'un point de vue anatomique, la tête du pancréas, située sous le foie, est bordée par le duodénum auquel elle adhère intimement. Elle est traversée par la voie biliaire principale ou canal cholédoque, dont la fonction est d'amener la bile nécessaire à la digestion des graisses. L'isthme, reliant la tête et le corps du pancréas, est la partie médiane du pancréas, la plus étroite, située juste en avant des vaisseaux de l'intestin (artère et veine mésentérique supérieure s'unissant à la veine splénique pour former la veine porte). Le corps du pancréas s'étend obliquement vers la gauche et le haut de l'abdomen en avant du rein gauche et de la glande surrénale. La queue du pancréas constitue l'extrémité gauche du pancréas. Elle est située à proximité immédiate de la rate et de ses vaisseaux. Le canal pancréatique principal, appelé canal de Wirsung, traverse le pancréas et collecte les sucs digestifs fabriqués par le pancréas exocrine pour les déverser dans le duodénum (Figure 1).

D'un point de vue histologique, le pancréas est constitué de plusieurs types cellulaires, les cellules exocrines et les cellules endocrines, fonctionnellement et morphologiquement très différentes. Les cellules exocrines et endocrines représentent, respectivement, 98% et 2% de la masse totale pancréatique (Figure 1).



**Figure 1 : Anatomie et histologie du pancréas humain (adaptée de l'encyclopédie Britannica).**

## II. Développement du pancréas

Le pancréas dorsal provient de la ligne médiane de l'endoderme située entre la troisième et la neuvième paire de somite (les somites, d'origine mésodermique, sont situés de part et d'autre du tube neural et de la chorde). Le pancréas ventral se développe à partir des deux zones latérales de l'endoderme au même niveau (Kumar M, *et al*, 2003). La zone médiane et les zones latérales de l'endoderme expriment les facteurs de transcription pancréatiques Pdx1, Nkx6-1, Nkx6-2 et Nkx2-2. Cette étape précède la fermeture du tube intestinal et intervient ainsi avant que les caractéristiques anatomiques du tissu pancréatique ne soient visibles (Pedersen JK, *et al*, 2005).

Le modelage du tube intestinal dépend de signaux provenant du mésoderme de la plaque latérale adjacente, qui sécrète des facteurs solubles comme les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), les BMPs (Bone morphogenic proteins), l'activine

et l'acide rétinoïque (RA) (Dessimoz J, *et al*, 2006) (Kumar M, *et al*, 2003). La signalisation par le RA est nécessaire pour la spécification du pancréas dorsal (Stafford D, *et al*, 2004). De plus, le RA du mésoderme signale directement à l'épithélium permettant ainsi une régionalisation de l'endoderme pancréatique (Martin M, *et al*, 2005).

De nombreuses protéines régulent spécifiquement certains stades du développement pancréatiques. Pdx1 est un facteur primordial impliqué dans la spécification du pancréas (Ahlgren U, *et al*, 1996). Bien que Pdx1 soit reconnu comme le gène le plus précoce et le plus spécifique exprimé dans l'ébauche pancréatique (Ohlsson H, *et al*, 1993), d'autres facteurs tels que Hlxb9 (Hb9), Hhex (Hex), Onecut1 (HNF6), Tcf2 (vHNF1, HNF1  $\beta$ ) et Foxa2 (HNF3) sont connus pour précéder l'expression Pdx1 chez la souris (Harrisson KA, *et al*, 1999) (Poll AV, *et al*, 2006). Cependant, ces gènes ont un spectre d'expression large et ne peuvent donc pas être utilisés comme marqueurs spécifiques du pancréas. Au jour embryonnaire 8.5 de la souris (e8,5, stade 8-10 somites), Pdx1 est exprimé au niveau ventral, précédant ainsi la fermeture de l'endoderme, illustrant que l'expression de Pdx1 dans la partie ventrale du pancréas en formation précède celle du domaine dorsal (Li H, *et al*, 1999). La première expression dorsale de Pdx1 apparaît entre e8.5 et e8.75 lors de la rotation de l'embryon, l'endoderme est alors encore étroitement associé à la notochorde (structure embryonnaire qui donnera naissance à la colonne vertébrale). La notochorde va alors fournir un signal, médié par l'activine, permettant la formation du pancréas dorsal. A e8.75-e9.0, l'expression de Pdx1 au niveau du pancréas dorsal entrainera la séparation de la notochorde et de l'endoderme. Ensuite, l'hypervascularisation va permettre la surexpression du facteur de croissance endothélial vasculaire, conduisant alors à une hyperplasie des îlots et à une induction ectopique de cellules exprimant l'insuline dans l'estomac postérieur (Ahlgren U, *et al*, 1996).

Cependant, l'initiation et les premières phases du développement du pancréas dorsal et ventral se produisent *via* différents mécanismes en raison des différents contextes tissulaires de ces derniers. Le pancréas ventral se développe en étroite association

avec l'endoderme hépatique et biliaire adjacent. Le développement des dérivés ventraux persistants de l'intestin, y compris le foie et le pancréas ventral, dépendent de l'expression endodermale du gène Homeobox, Hhex, qui va permettre de maintenir la prolifération de l'endoderme ventral définitif et contrôler la transition morphogénétique des cellules épithéliales endodermiques (Bort R, *et al*, 2006).

Au stade e9.5, à son tour, l'aorte dorsale se sépare de l'épithélium pancréatique suite à l'accumulation du mésoderme autour du bourgeon du pancréas dorsal (Slack JMW, 1995). Ce processus est essentiel pour la croissance continue du pancréas dorsal. De plus, l'expression au niveau des cellules progénitrices pancréatiques à e10.5 de plusieurs facteurs tels que Pdx1, Ptf1a, Nkx6-1, Nkx2-2, Hlxb9 et Sox9 est essentielle pour la croissance pancréatique ainsi que pour la différenciation des cellules endocrines (Seymour PA, *et al*, 2007), étape qui permettra de définir définitivement le pancréas comme un organe. Des travaux suggèrent que la taille finale du pancréas est déterminée par le nombre initial de cellules progénitrices déjà présentes à ce stade précoce (Stanger BZ, *et al*, 2007).

Après e10.5, le tissu pancréatique se développe rapidement, formant ainsi une structure ramifiée en quelques jours. Simultanément, l'expression épithéliale de Ptf1a et Nkx6-1 varie, avec des cellules en périphérie exprimant Ptf1a mais pas Nkx6-1. Cette expression différentielle devient plus marquée à e13.5 et e14.5, où l'expression de Ptf1a marque la formation d'acini, alors que Nkx6-1 se limite à la partie centrale de l'épithélium. À e12.5, suite à la rotation de l'intestin, les deux rudiments pancréatiques vont fusionner et devenir un organe interconnecté (Figure 2) (Jorgensen MC, *et al*, 2007).

La différenciation terminale de l'endoderme pancréatique en pancréas est dépendant de l'expression de différents facteurs de transcription ainsi qu'à la temporalité de celle-ci. Le pancréas évoluera alors en 2 types cellulaires distincts, le pancréas exocrine et le pancréas endocrine.

Il est important de noter que l'engagement des cellules dans une lignée particulière est contrôlé par une balance entre prolifération et différenciation. La signalisation du

récepteur Notch dans l'épithélium pancréatique inhibe en effet la différenciation exocrine et endocrinienne, tandis que l'inhibition de la signalisation de Notch entraîne une différenciation accélérée au détriment de la croissance des organes (Apelqvist A, *et al*, 1999) (Greenwood AL, *et al*, 2007).

Le changement cellulaire vers un programme endocrinien est induit par l'expression de la Neurogenine 3 (Ngn3) (Gradwohl G, *et al*, 2000). Ainsi, l'expression ectopique de Ngn3 contrôlée par le promoteur Pdx1 dans les cellules progénitrices antérieures du pancréas de souris entraîne une induction de la différenciation endocrine mais exclusivement vers les cellules  $\alpha$  (Schwitzgebel VM, *et al*, 2000).

Ces résultats suggèrent que les cellules progénitrices, au stade précoce, ont une compétence limitée pour la différenciation endocrinienne. Cependant, des données démontrent que cette capacité des cellules progénitrices change avec le temps (Johansson KA, *et al*, 2007). L'activation conditionnelle de l'expression de Ngn3 via le promoteur Pdx1 dans un fond déficient pour la Ngn3 montre que l'activation de Ngn3 à e8.75 (début de l'expression de Pdx1) entraîne la formation exclusive des cellules  $\alpha$ .

La capacité à former des cellules  $\beta$  et des cellules PP est acquise après e10.5, tandis que les cellules  $\delta$  apparaissent seulement lorsque l'activité Ngn3 est induite au stade e14.5.

Comme la Ngn3 est capable d'induire tous les sous-types endocriniens, des facteurs supplémentaires doivent être impliqués dans l'affectation spécifique du type cellulaire. Ainsi, Pax4 et Arx sont deux facteurs cruciaux identifiés comme intervenant dans ce processus.

La perte de l'un de ces gènes ou la perte simultanée de ces deux gènes chez la souris n'affecte pas le nombre total de cellules endocrines mais modifie la répartition relative des sous-types endocriniens (Collombat P, *et al*, 2003) (Collombat P, *et al*, 2005).

Les transcrits Pax4 peuvent être détectés dans le pancréas de souris par des techniques d'hybridation *in situ* à e9.5 (Sosa-Pineda B, *et al*, 1997). Au cours de

l'embryogenèse, les souris déficientes en Pax4 présentent une perte sélective des cellules  $\beta$  et des cellules  $\delta$  avec une augmentation proportionnelle concomitante du nombre de cellules  $\alpha$ , ce qui suggère que les cellules qui génèrent habituellement un devenir de type  $\beta$  ou  $\delta$  adoptent une identité  $\alpha$  en l'absence de Pax4 (Sosa-Pineda B, *et al*, 1997).

La perte de Pax4 semble bloquer la différenciation de la cellule  $\beta$  à un stade précoce, comme l'indique l'absence d'expression de Pdx1, Hlxb9 et l'expression d'insuline à partir de précurseurs endocriniens (Wang J, *et al*, 2004). En revanche, Nkx2.2 n'est pas affecté chez les souris déficientes en Pax4. De plus, la déficience en Nkx2.2 entraîne une perte similaire de l'expression de Pdx1 et Hlxb9 à partir des précurseurs endocriniens sans affecter l'expression de Pax4. Il a ainsi été suggéré que Pax4 et Nkx2.2 régulaient des voies parallèles lors de l'initiation du programme de différenciation des cellules  $\beta$  (Wang J, *et al*, 2004).

Récemment Pax4 a été montré comme étant exprimé dans les progéniteurs de tous les types endocriniens, ce qui suggère que l'expression de Pax4 est activée au début de la cascade de différenciation et que Pax4 ne serait pas responsable de la détermination des types cellulaires endocriniens (Greenwood AL, *et al*, 2007).

Enfin, il a été démontré *in vitro* que Ngn3 est capable d'activer le promoteur de Pax4 (Smith SB, *et al*, 2003).

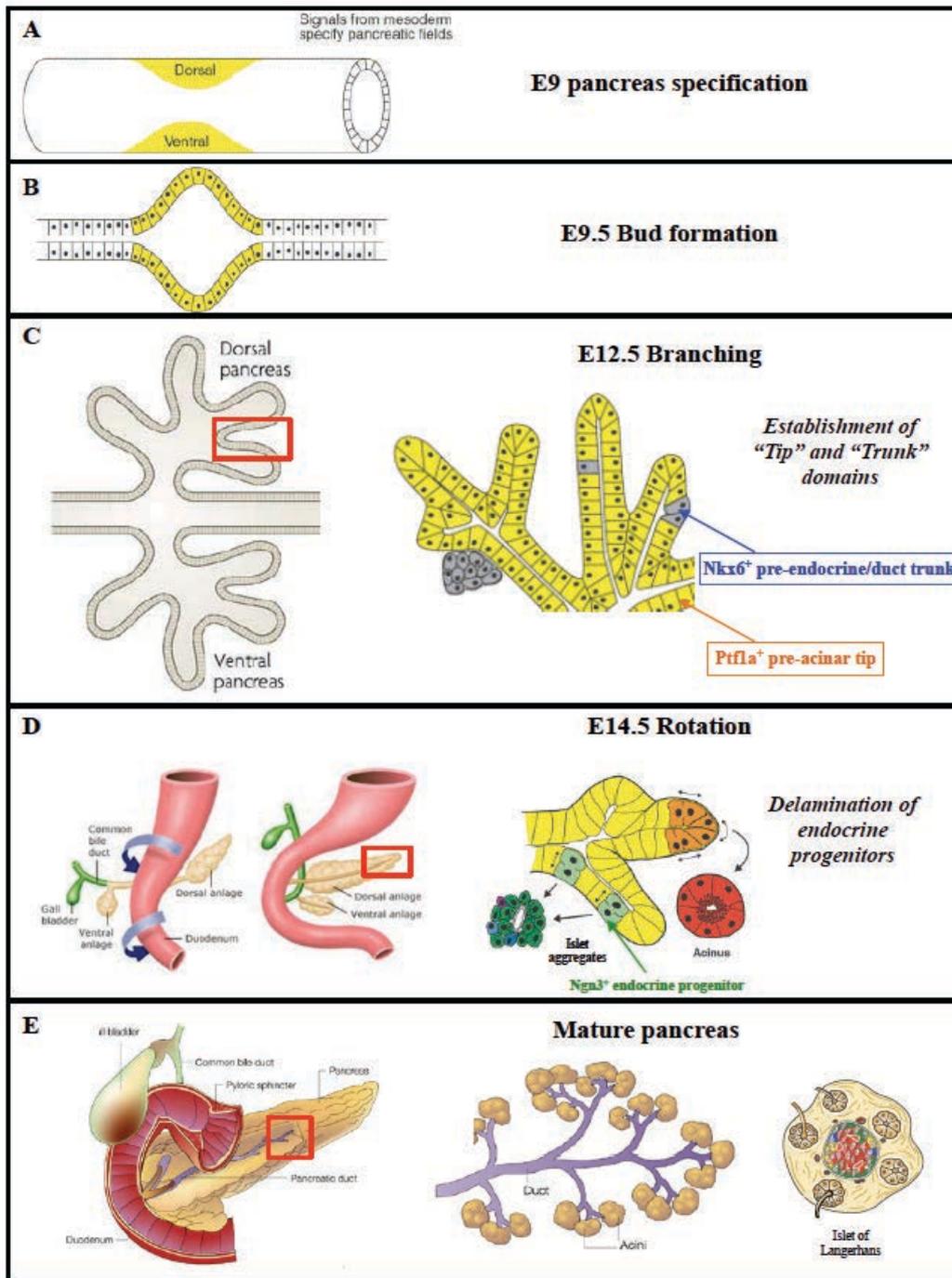
Comme Pax4, les transcripts d'Arx peuvent être détectés à e9.5 dans le pancréas de souris par hybridation *in situ*. Cependant, l'expression d'Arx au sein des souris déficientes en Ngn3 va être totalement perdue (Collombat P, *et al*, 2003).

La perte d'expression d'Arx entraîne une absence totale de cellules  $\alpha$  à e15.5, conduisant à la mort des nouveau-nés 2 jours après leur naissance, suite à une hypoglycémie.

Cependant, les premières cellules exprimant le glucagon se forment aux stades embryonnaires précédant e15.5 (Collombat P, *et al*, 2003), ce qui suggère que les cellules  $\alpha$  nées avant e15.5 disparaissent pendant le développement normal ou que la fonction d'Arx est nécessaire pour la survie ou le maintien de l'identité de ces cellules.

Les souris déficientes en Arx présentent une augmentation du nombre de cellules productrices d'insuline à partir de e15.5 et, de même, une augmentation des nombres de cellules  $\delta$  à e18.5 (Collombat P, *et al*, 2003). Ce phénotype est donc opposé aux souris déficientes en Pax4. En ce sens, il a été démontré *in vitro* que Arx et Pax4 peuvent réprimer transversalement les promoteurs de chacun, suggérant un mécanisme direct où Arx et Pax4 sont en compétition au sein des précurseurs endocriniens (Collombat P, *et al*, 2005).

L'analyse du pancréas endocrinien dans les souris déficientes pour Pax4/Arx montre que la perte simultanée des deux gènes entraîne une perte précoce des cellules  $\alpha$  et  $\beta$  (Collombat P, *et al*, 2005). Les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  sont remplacées par des cellules  $\delta$ , ce qui suggère que Pax4 agit de façon séquentielle afin de favoriser la formation d'un pool précurseur de cellules  $\beta/\delta$  et, par la suite, spécifiquement pour le développement des cellules  $\beta$  à partir de ces précurseurs.



**Figure 2 : Représentation schématique chronologique du développement pancréatique chez la souris.** (A) Création des zones pancréatiques à partir de l'endoderme intestinal. (B) Bourgeonnement des zones dorsales et ventrales de l'endoderme. (C) Prolifération des progéniteurs pancréatiques et compartimentation de l'épithélium pancréatique donnant les domaines pré-acinaire ( $Ptf1a^+$ ) et pré-endocrine ( $Nkx6^+$ ). (D) Rotation de l'intestin et fusion des deux bourgeons ventrale et dorsale en un organe unique composé de quelques îlots immatures. (E) Pancréas mature composés d'îlots matures.

### III. Physiologie du pancréas

#### 1. *Le pancréas exocrine*

Le pancréas exocrine, qui représente 98% de la masse totale du pancréas, est constitué de cellules acinaires, regroupées en acini, ainsi que de cellules ductales. Les cellules acinaires sont responsables de la sécrétion des enzymes digestives tels que l'  $\alpha$ -amylase, la carboxypeptidase, les ribonucléases ou encore la lipase (Rutter WJ, *et al*, 1968). Les cellules ductales vont principalement jouer un rôle au niveau de la sécrétion des enzymes digestives. Récemment des études ont également montré que les cellules ductales peuvent également participer à la néogenèse de cellules  $\beta$  (Zare M, *et al*, 2016).

Concernant leur origine, des études de contrôle transcriptionnel des gènes spécifiques du pancréas exocrine ont conduit à l'identification d'un complexe de liaison spécifique à leur promoteur appelé PTF1-L (Petrucco S, *et al*, 1990) (Rose SD, *et al*, 1994). Le gène *Ptf1a*, appartenant à ce complexe, permet l'expression de la composante spécifique du tissu (p48) de ce complexe et a d'abord été jugé essentiel au développement du pancréas exocrine. En effet, les souris déficientes en *Ptf1a* n'ont pas la capacité de former un pancréas exocrine (Krapp A, *et al*, 1998).

*Ptf1a* a également été montré comme étant exprimé en e9.5, plusieurs jours avant le début du développement exocrine, suggérant ainsi un rôle de *Ptf1a* au-delà de la spécification exocrine. Chez les souris *Ptf1a-cre* hétérozygotes, celles-ci n'ont pas de défaut de développement exocrine, la contribution des cellules exprimant *Ptf1a* s'étendant à la fois aux types de cellules canalaire et acinaire (Kawaguchi Y, *et al*, 2002). Ainsi, p48 joue un rôle dans les précurseurs pancréatiques non engagés et ne programme pas la destinée exocrine simplement par son expression. Dans ce contexte, une hypothèse serait que l'expression de *Ptf1a* est finement régulée par des signaux morphogénétiques (encore inconnus) dans le pancréas en développement et que les cellules précurseurs pourraient être guidées par un équilibre dynamique d'expression entre un gène pro-exocrine (tel que *Ptf1a*) et un gène pro-endocrinien (tel que *Ngn3*).

De manière intéressante, il a été montré que les cellules ductales primitives apparaissent comme des cellules "par défaut" et peuvent adopter une identité de cellules endocrines lors de l'activation d'un seul gène : Ngn3. Il est important de noter que, pour contrôler les niveaux de Ngn3 et empêcher son activation large, les cellules ductales expriment des régulateurs négatifs et positifs de ce gène, en maintenant cet équilibre ; en cas de déséquilibre, l'activation de Ngn3 conduira à la différenciation endocrinienne (Apelqvist A, *et al*, 1999) (Greenwood AL, *et al*, 2007). La voie de signalisation de Notch est de nouveau impliquée dans ce processus en réactivant Hes1, un répresseur de l'expression de Ngn3, et opérant directement sur le choix des lignées exocrine/endocrine (Jensen J, *et al*, 2000). Cependant après e15.5, les cellules ductales semblent perdre la capacité de se différencier en cellules endocrines (Kopp JL, *et al*, 2011) (Solar M, *et al*, 2009), suggérant soit que cette bipotentialité est perdue lorsque les cellules ductales deviennent matures ou que ces cellules restent «en pause» en l'absence de signaux pro-endocriniens. Des travaux récents tendent à démontrer la dernière hypothèse (Jin L, *et al*, 2013).

Enfin, dans le pancréas, MIST1 est également confiné aux cellules exocrines et à l'absence de cellules ductales (Yoshida S, *et al*, 2001). Mist1 joue un rôle dans la stabilisation du destin exocrine. Les souris Mist1<sup>-/-</sup> montrent une perte de caractéristiques différenciées des cellules exocrines, conduisant à des lésions exocrines menant à ce qui pourrait être considéré comme une forme de processus régénératif (Pin CL, *et al*, 2001).

Les cellules de ces lésions co-expriment les gènes des marqueurs ductaux et exocrines, révélant que Mist1 est nécessaire pour maintenir une identité cellulaire exocrine stable (Pin CL, *et al*, 2001). Une hypothèse serait que les activités redondantes entre Ptf1a et Mist1 assurent une activité continue des gènes exocrines. Parmi les gènes connus pour jouer un rôle dans le pancréas, Mist1 est le seul entièrement restreint aux cellules exocrines, et ainsi l'autorégulation de Mist1 pourrait stabiliser l'état exocrine.

## 2. Le pancréas endocrine

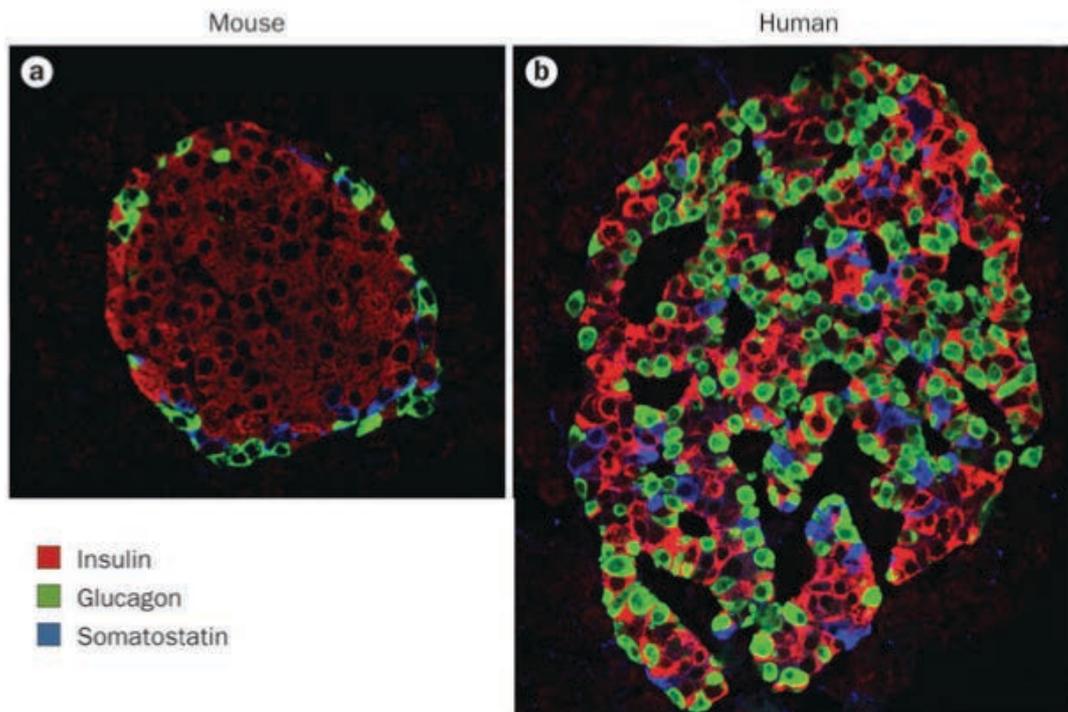
La partie endocrine représente uniquement 1 à 2% de la masse totale du pancréas. Ce faible pourcentage est dispersé à l'intérieur du pancréas en structure fonctionnelle de 100 à 200  $\mu$  m appelées îlots de Langerhans.

Au sein de chaque îlot on retrouve 5 types cellulaires différents ayant chacun une fonction sécrétrice spécifique d'une hormone donnée.

Ces 5 types cellulaires, sont, par ordre croissant de représentation au sein de l'îlot pancréatique de souris ; les cellules PP, les cellules epsilon, les cellules delta, les cellules  $\alpha$  et enfin les cellules  $\beta$ .

Les îlots de Langerhans vont être traversés par des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses, permettant la libération des différentes hormones afin d'assurer l'homéostasie glucidique (Adrian TE, *et al*, 1978), (Cao Z and Wang X, 2014), (Brereton MF, *et al*, 2015).

Il est cependant intéressant de noter que l'architecture de l'îlot varie en fonction des espèces. Cette variation peut avoir une importance majeure, et est influencée en grande partie par les besoins fonctionnels spécifiques de l'espèce ainsi qu'à la nécessité intrinsèque de sécrétions d'autres facteurs tels que le GABA ou le zinc pour l'îlot (Steiner DJ, *et al*, 2010) (Figure 3).



Nature Reviews | Endocrinology

îlots	Cellules $\alpha$	Cellules $\beta$	Cellules $\delta$	Cellules $\epsilon$	Cellules PP
souris	15%	87%	5%	rare	rare
humain	36%	54%	10%	<1%	<5%

**Figure 3 : Architecture et distribution des îlots de Langerhans chez la souris et l'Homme.** L'insuline apparaît ici en rouge, le glucagon en vert et la somatostatine en bleu. (A) Représentation d'un îlot de souris (B) Représentation d'un îlot humain. A noter la présence uniquement des cellules  $\beta$  pancréatique au centre de l'îlot chez la souris, tandis que chez l'Homme, les cellules endocrines sont dispersées de manière aléatoire au sein de la structure.

#### a) Les cellules $\epsilon$

Les cellules  $\epsilon$  sont dispersées dans le tissu exocrine primitif au début du développement foetal, mais vont ensuite se regrouper et se placer autour des îlots de Langerhans en développement, où elles restent situées chez l'adulte (Andralojc KM, *et al*, 2009).

Ces cellules vont être responsable de la sécrétion de ghréline. Celle-ci semble exercer un rôle inhibiteur tonique sur la sécrétion d'insuline, ce rôle ayant été

retrouvé chez les animaux et les Humains. En effet, la ghréline augmente de manière significative la glycémie en réduisant la sécrétion d'insuline (Broglia F, *et al*, 2001). De plus, cette hormone va augmenter la résistance à l'insuline lorsqu'elle est administrée chez l'homme (Muller AF, *et al*, 2001). La perfusion de ghréline induit de manière aiguë la lipolyse et la résistance à l'insuline indépendamment de la GH et du cortisol (Vestergaard ET, *et al*, 2008). Enfin, la sécrétion de ghréline est inhibée par l'hyperglycémie et l'insuline (Nakagawa E, *et al*, 2002), mais peut également jouer un rôle direct sur la glycogénolyse (Broglia F, *et al*, 2001).

#### *b) Les cellules PP*

Les cellules PP, pour polypeptide pancréatique, encore appelées cellules F, vont, comme leur nom l'indique, sécréter le polypeptide pancréatique.

Elles sont issues du bourgeon ventral pancréatique. La répartition des cellules PP dans la glande pancréatique n'est pas homogène. Elles se situent principalement à la périphérie des îlots pancréatiques. Mais une minorité est également trouvée dispersée parmi les cellules des segments acinaires et centro-acinaire-ductal de l'unité du pancréas (Dreiling D and Tiscornia OM, 1968).

La sécrétion de PP va être stimulée par une hypoglycémie, induite par l'insuline. Cependant le stimulus le plus puissant pour la libération de ce peptide régulateur est l'acétylcholine (Ach). Il convient également de souligner que les peptides, tel que la CCK (cholécystokinine), peut activer les récepteurs sur les cellules nerveuses et / ou les fibres et stimuler les cellules PP (Schwartz TW, 1983).

En effet, le PP va induire deux réflexes neuroendocriniens « court » et « long ». Cette induction lui permet d'induire une dépression de la tonalité cholinergique intra-pancréatique afin de moduler la réponse sécrétoire au niveau pancréatique.

En effet, le PP va permettre de réprimer la sécrétion des enzymes digestives exocrines mais également la sécrétion endocrine de la somatostatine (Tiscornia OM, *et al*, 2015).

Enfin il est intéressant de noter que la composante adrénergique du système nerveux autonome influence la sécrétion de PP. Ainsi, le blocage  $\beta$  adrénergique inhibe la libération de PP. En revanche, le blocage  $\alpha$  adrénergique améliore la sécrétion de PP. L'utilisation du blocage de cette voie, en tant que mesure

thérapeutique, à l'anesthésie locale de cette structure autonome, pourrait être une piste intéressante (Tiscornia OM, *et al*, 2015).

### c) Les cellules $\delta$

Les cellules  $\delta$  pancréatiques sécrètent l'hormone de la somatostatine (SST). La somatostatine est également connue sous le nom d'hormone inhibitrice d'hormone de croissance (GHIH) ou d'hormone inhibant la libération de somatotropine (SRIF). Dans les îlots, les cellules  $\delta$  libèrent principalement la SST-14, (la deuxième forme bio-active produite étant la SST-28, synthétisé au niveau intestinal) (Francis BH, *et al*, 1990). Les deux formes, SST-14 et SST-28 se lient à cinq sous-types de récepteurs de somatostatine (SSTR1-SSTR5) (Kumar U, *et al*, 1999). En utilisant des radioligands sélectifs SST-14-sélectif et SST-28, il a été montré que les cellules  $\beta$  possèdent des sites de liaison préférés SST-28 tandis que les cellules  $\alpha$  présentent des récepteurs préférés SST-14- (Kumar U, *et al*, 1999).

Le rôle de la SST dans le pancréas n'est pas clair. La SST peut inhiber la libération de glucagon, d'insuline et de PP ainsi que sa propre sécrétion grâce à un mécanisme de rétroaction automatique (Ipp E, *et al*, 1979). La réponse sécrétoire de l'insuline et du glucagon aux stimuli nutritifs a été améliorée *in vivo* chez les souris déficientes en SST.

La SST exogène inhibe l'exocytose des granules provenant d'îlots de rongeurs isolés et de cellules  $\alpha$  et  $\beta$  humaines (Gromada J, *et al*, 2001).

Chez les rongeurs, comme chez l'homme, la SST est sécrétée d'une manière dépendante du glucose et du  $Ca^{2+}$  (Braun M, *et al*, 2009) (Zhang Q, *et al*, 2007). Compte tenu du fait que la SST commence à être diffusée à des niveaux de glucose qui diminuent la libération de glucagon (Vieira E, *et al*, 2007), la SST agit comme une «hormone tamponante», empêchant la sur-sécrétion d'insuline ou de glucagon. Une autre hypothèse est que, à des concentrations élevées de glucose, la SST inhibe principalement la sécrétion de glucagon plutôt que la production d'insuline.

Dans les îlots de souris, les cellules  $\delta$ , comme  $\alpha$  et  $\beta$ , sont innervées par des axones parasympathiques et sympathiques, alors que chez les humains, l'innervation est moins claire (Rodriguez-Diaz R, *et al*, 2011).

En fait, les cellules  $\alpha$  humaines sécrètent l'acétylcholine, qui peut agir comme un signal paracrine pour réguler l'insuline et la libération de SST (Molina J, *et al*, 2014). Les effets de l'acétylcholine sur la sécrétion de la somatostatine sont controversés. Alors que la stimulation de la libération de somatostatine a été observée dans certaines études (Zhang Q, *et al*, 2007), d'autres études indiquent un effet inhibiteur (Hauge-Evans AC, *et al*, 2009).

Ces données suggèrent que, bien que les cellules  $\delta$  soient relativement petites, elles pourraient être des régulateurs d'une grande proportion de cellules dans l'îlot. Chez l'homme, les cellules  $\delta$  possèdent une architecture neuronale, la propagation du potentiel d'action pourrait ainsi effectivement remplir une fonction de signalisation dans les cellules  $\delta$ . Étant donné qu'il existe de nombreux contacts étroits entre les cellules  $\delta$  et les autres types de cellules, il sera intéressant de déterminer s'il existe des zones spécialisées pour la libération de la somatostatine.

En conclusion, les cellules  $\delta$  sont idéalement situées dans les îlots, avec une morphologie apparentée aux neurones, afin d'agir comme régulateurs puissants de la libération d'hormones de l'îlot. Bien que l'îlot ait seulement un nombre relativement faible de cellules  $\delta$ , elles peuvent communiquer efficacement les unes avec les autres grâce à des projections allongées. Ceci établit un réseau inhibiteur « pan-islet » pour permettre la transmission de signaux reçus des deux nerfs extrinsèques et du sang vers une population cellulaire plus importante dans l'îlot.

#### *d) Les cellules $\alpha$*

Les cellules  $\alpha$  sont issues de précurseurs endocriniens qui, sous l'action du facteur de transcription Arx, donneront une cellule mature, sécrétrice de glucagon. En l'absence d'ARX, aucune cellule  $\alpha$  ne se développe et le nombre de cellules  $\beta$  et delta augmente sans affecter le nombre total de cellules endocrines. Cela suggère que les précurseurs modifient leur destin cellulaire de  $\alpha$  vers  $\beta$  et  $\delta$  (Collombat P, *et al*, 2003). De plus, il existe une interaction réciproque concurrentielle entre ARX et PAX4, impliquée dans la décision du devenir cellulaire entre les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  (Collombat P, *et al*, 2005) (Collombat P, *et al*, 2003). Ainsi, ARX est nécessaire pour la spécification précoce de la cellule  $\alpha$  et maintient directement la masse cellulaire  $\alpha$

(Courtney M, *et al*, 2013). Arx n'est cependant pas directement impliquée dans l'expression du glucagon (Gosmain Y, *et al*, 2011).

Le glucagon, qui est l'hormone majeure sécrétée par les cellules  $\alpha$  pancréatiques, a été découvert en 1923 et nommé comme agoniste du glucose (Murlin J, *et al*, 1923) en raison de son effet d'élévation du glucose. L'expression du glucagon dans les cellules  $\alpha$  n'a été révélée qu'en 1948 (Sutherland EW et de Duve C, 1948).

Bien que le glucagon soit exclusivement produit par les cellules  $\alpha$  de l'îlot, le gène qui code le pré-proglucagon est exprimé dans de nombreuses cellules et tissus différents, y compris les cellules L de l'intestin, l'hypothalamus et le thalamus (Kieffer TJ et Habener JF 1999). Le produit de cette hormone est déterminé par la modification post-traductionnelle de la pro-hormone par des enzymes pro-hormone convertase. Les cellules  $\alpha$  pancréatiques expriment la prohormone convertase 2 (PC2), qui clive le pro-peptide pour produire du glucagon et un fragment majeur de pro-glucagon. Les lymphocytes L de l'intestin, exprime la pro-hormone convertase 1 (PC1/3) ; cette enzyme de clivage donnant naissance notamment au GLP1 (glucagon like peptide 1), GLP2 ainsi qu'à la glicentine. (Furuta *et al*, 2001)

Récemment, il a été rapporté que PC1 / 3 et GLP-1 sont co-localisés dans certaines cellules  $\alpha$  humaines, ce qui suggère que le GLP-1 est produit dans les îlots humains (Marchetti P, *et al*, 2012). Le GLP-1 exogène et circulant a deux effets sur la libération hormonale pancréatique: stimulation de la sécrétion d'insuline à partir de cellules  $\beta$  (Gromada J, *et al*, 1998) et inhibant la sécrétion de glucagon à partir de cellules  $\alpha$  (De Marinis Yz, *et al*, 2010). La contribution à ces effets *via* la production et le relargage local du GLP-1 n'a pas encore été prouvé.

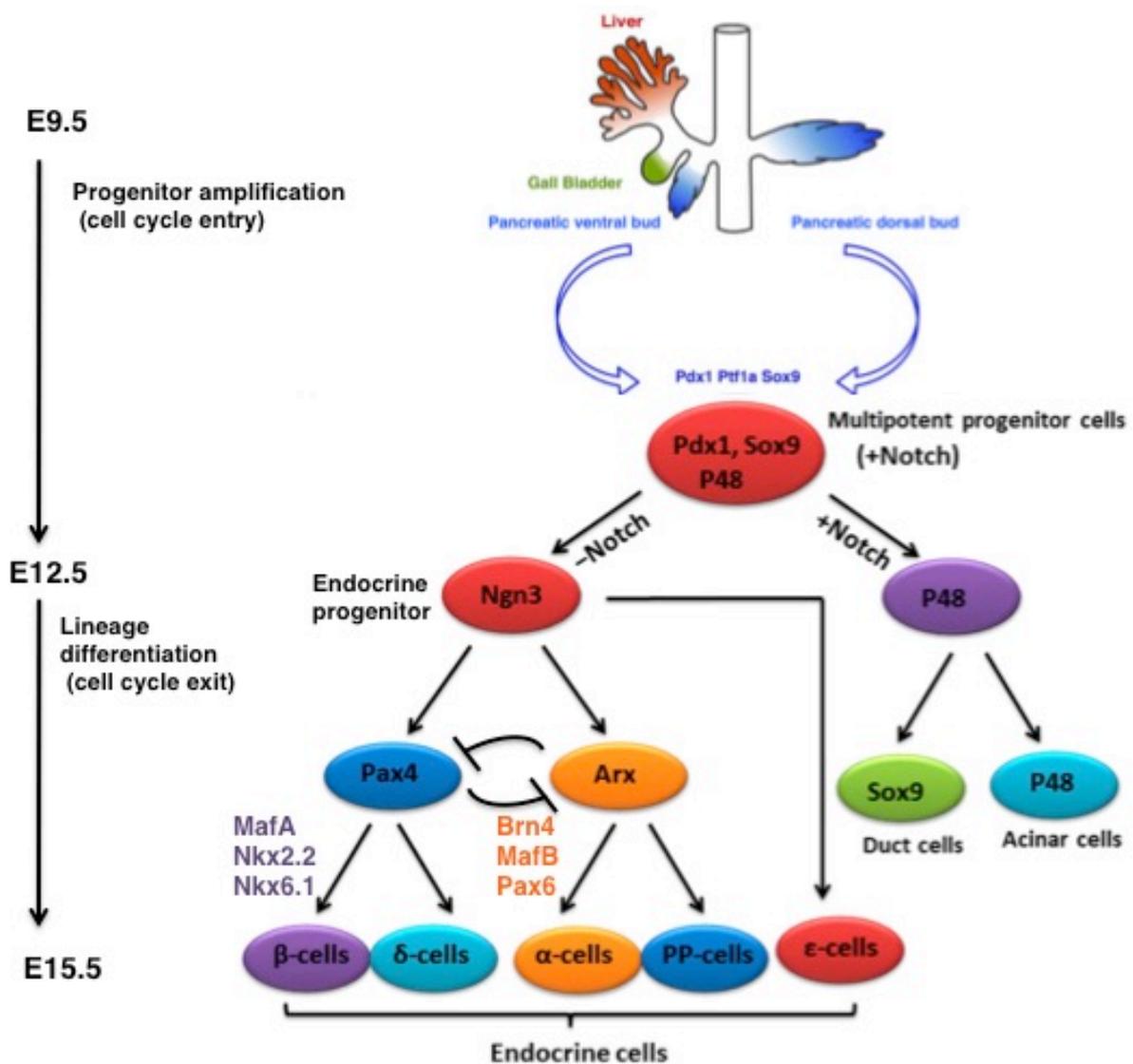
#### e) *Les cellules $\beta$*

Comme évoqué, ces dernières sont majoritaires dans l'îlot et sécrètent la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme, l'insuline.

D'un point de vue développemental, le facteur de transcription PAX4 est induit en aval de la Ngn3 (Gradwohl G, *et al*, 2000). PAX4 est, en effet, nécessaire pour le développement normal des cellules  $\beta$  et  $\delta$ .

Au cours des dernières étapes de la différenciation des cellules  $\beta$ , les facteurs de transcription MAFB et MAFA jouent un rôle important. L'expression de MAFB dans la cellule  $\beta$  précède une augmentation de l'expression de PDX1 qui marque le début de la transcription de l'insuline.

L'expression de MAFA suit peu de temps après l'expression de l'insuline (Artner I, *et al*, 2006) (Nishimura W, *et al*, 2006) et persiste dans les cellules  $\beta$  adultes. L'expression post-natale de MAFB est perdue au niveau des cellules  $\beta$  murines (Artner I, *et al*, 2010), mais pas humaines (Dai C, *et al*, 2012) (Riedel MJ, *et al*, 2012). Sur la spécification des cellules  $\beta$ , la transcription de l'insuline est initiée et maintenue par MAFB (Matsuoka TA, *et al*, 2003), PDX1 (Ohlsson H, *et al*, 1993), NEUROD1 (Naya FJ, *et al*, 1995), PAX6 (Sander M, *et al*, 1997), et MAFA (Kataoka K, *et al*, 2002). En outre, PAX4 (jusqu'à ce que son expression soit perdue chez l'adulte), NKX6.1 et PDX1 inhibent l'expression du glucagon (Ritz-Laser B, *et al*, 2002) (Schisler JC, *et al*, 2005) empêchant ainsi l'expression de glucagon par les cellules  $\beta$ .



**Figure 4 : Modèle schématique de la distribution des différents sous-types de cellules pancréatiques lors de la morphogénèse du pancréas.** Plusieurs voies de signalisation sont activées pour la spécification du devenir pancréatique. Un programme spécifique d'expression de différents facteur de transcription est également nécessaire et définit le sort des progéniteurs pancréatiques. Parmi ceux-ci, Pdx1 est nécessaire pour la détermination de progéniteurs pancréatiques, puis la Ngn3 pour la spécification du lignage endocrinien. Après l'activation de Ngn3, un réseau complexe de facteurs de transcription favorisera les différentes voies endocrines, y compris Arx et Pax4. Pax4 favorisant la voie des cellules  $\beta$  et des  $\delta$  tandis que Arx favorisera les lignées des cellules  $\alpha$  et PP. Enfin, des facteurs de transcription supplémentaires permettront le maintien des différents phénotypes de ces cellules endocrines.

Le rôle clé des cellules  $\beta$  est de produire et de sécréter de l'insuline d'une manière très fine, afin de maintenir les concentrations de glucose circulant dans la gamme

physiologique (Cavaghan et Polonsky, 2005). Parmi les nombreux composés physiologiques connus pour stimuler la sécrétion d'insuline, le glucose est de loin le plus important. L'augmentation de la libération d'insuline en réponse au glucose oral et intraveineux dépend de la dose, et de plus, la sécrétion est plus grande après l'administration par voie orale que par voie intraveineuse. Ce phénomène a été appelé effet d'incrétine (Nauck MA, *et al*, 1986) et semble être dû à la libération d'hormones gastro-intestinales et d'autres mécanismes induits par le glucose dans le tractus entérique.

La sécrétion d'insuline par la cellule  $\beta$  est dynamique. La perfusion de glucose intraveineuse détermine une réponse à l'insuline biphasique, consistant en un pic rapide (première phase, pendant quelques minutes), suivie d'une augmentation plus lente et prolongée (deuxième phase). En outre, la sécrétion d'insuline est pulsatile (Cavaghan et Polonsky, 2005).

Le transport du glucose vers le cytoplasme des cellules  $\beta$  est facilité par le transporteur de glucose 1 et 2 (GLUT1 et GLUT2). Ensuite, le glucose est rapidement phosphorylé par la glucokinase pour commencer le processus glycolytique. S'en suit des niveaux accrus d'ATP cytosoliques entraînant la fermeture des canaux KATP, la réduction de la conductance  $K^+$  et la dépolarisation de la membrane plasmique.

À son tour, la dépolarisation de la membrane plasmique induit l'ouverture des canaux  $Ca^{2+}$  voltage dépendant, provoquant une dépolarisation rapide. L'afflux de  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme de la cellule  $\beta$  mobilise les granules d'insuline, suivis de l'ancrage membranaire et de l'exocytose.

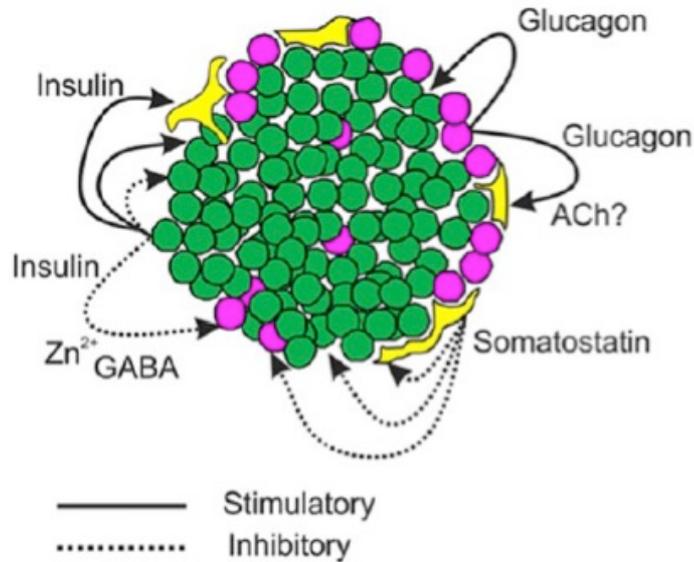
En plus du glucose, plusieurs autres composés affectent la sécrétion d'insuline de la cellule  $\beta$ . Quelques acides aminés, soit seuls ou en combinaison, induisent ou potentialisent la libération de l'hormone par des mécanismes métaboliques, des processus biophysiques, ou les deux (Newsholme P, *et al*, 2014). Certains d'entre eux (comme la leucine et le glutamate) sont métabolisés dans les mitochondries, alimentant ainsi le cycle de Krebs. L'arginine, par contre, dépolarise la membrane

plasmique après son transport dans le cytoplasme, en raison de ses charges positives. Cette dépolarisation active les canaux  $Ca^{2+}$  voltage dépendants, à leur tour, permettant l'entrée de cet ion, ce qui conduit à l'exocytose successive des granules d'insuline.

Les acides gras libres peuvent stimuler la libération d'insuline en agissant comme substrats métaboliques (modulant l'oxydation des molécules de combustible dans les mitochondries) et/ou en se liant à des récepteurs spécifiques de protéines G (GPR, en particulier GPR40 et GPR119 et GPR120) exprimé sur la membrane des cellules  $\beta$  (Warnotte C, *et al*, 1999) (Morgan NG et Dhayal S, 2009).

Enfin, le système GPR est également impliqué dans la modulation de la libération d'insuline induite par les hormones et les neurotransmetteurs. À cet égard, le rôle de l'hormone incrétine GLP-1 a été spécifiquement et largement étudié (Drucker Dj et Nauck MA, 2006). Le GLP-1 est sécrété à partir des cellules entero-endocrines après l'ingestion d'éléments nutritifs et potentialise l'insuline libérée de manière gluco-dépendante. Les mécanismes d'action du GLP-1 sur les cellules sécrétant de l'insuline passant, eux, par l'activation de l'adénylate cyclase.

Enfin, la cellule  $\beta$  est également capable de sécréter d'autres composés, comme l'amyline, le MIF (macrophage migration inhibitory) et le PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide) qui favorisent la sécrétion d'insuline (Cornu M, *et al*, 2009), mais également l'IGF2 et le FGF1, jouant eux un rôle dans la prolifération cellulaire, et enfin, le GABA, retrouvé dans 15% des granules et qui inhibe la sécrétion de glucagon (Bailey SJ, *et al*, 2007).



**Figure 5: Représentation schématique des connexions intra-îlots.** La sécrétion d'insuline (verte) et de glucagon (violet) exerce des effets paracrines sur les cellules  $\alpha$ ,  $\delta$  (jaune) et  $\beta$ . La somatostatine a des effets paracrines inhibiteurs sur tous les types cellulaires (lignes pointillées). Les produits  $\beta$  spécifiques, tels que le  $Zn^{2+}$  et le GABA peuvent affecter la fonction de la cellule  $\alpha$ , et enfin l'acétylcholine des cellules  $\alpha$  peut influencer la sécrétion de la somatostatine. (adaptée de Brereton FM, *et al*, 2015)

De part son rôle endocrine important, l'îlot de Langerhans, seule unité capable de sécréter l'hormone hypoglycémisante qu'est l'insuline, va, en cas de perte de masse fonctionnelle entrainer le développement de pathologies métaboliques importantes comme le diabète.

## II. Le diabète

Au cours des trois dernières décennies, le diabète est devenu une épidémie mondiale, avec des soins de santé et des charges économiques grimpant de façon spectaculaire (Ashcroft FM et Rorsman P, 2012) (Guariguata L, *et al*, 2014). À l'épicentre du diabète, la cellule  $\beta$  pancréatique produisant l'insuline ayant des actions hormonales essentielles pour abaisser les taux de glycémie et maintenir ainsi l'homéostasie métabolique.

Il existe ainsi différents types de diabètes. Le diabète de type 1 représente 10% des diabètes. Il entraîne une dépendance à l'insuline après la destruction auto-immune des cellules  $\beta$ . Le diabète de type 2 (DT2), plus répandue, résulte d'un trouble métabolique complexe associant résistance à l'insuline et inactivation progressive

des cellules  $\beta$ . Indépendamment de l'étiologie, les deux formes de diabète sont étayées par la perte de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose et l'hyperglycémie concomitante. Dans le cadre de la progression du DT2, l'élévation prolongée des taux de glucose et/ou d'acides gras entraîne une défaillance de la production d'insuline des cellules  $\beta$  et de la sécrétion, potentiellement suivie d'une survie cellulaire réduite ; cette condition est appelée gluco-lipo-toxicité (Poitout V, *et al*, 2010).

Bien que la mort de la cellule  $\beta$  de l'îlot soit un résultat clair dans le diabète de type 1 (DT1), des preuves récentes indiquent des mécanismes plus complexes qui affectent l'identité et la fonction de la cellule  $\beta$  dans le T2D.

Par exemple, précédemment, l'obésité et les conditions de stress à la résistance à l'insuline associées au DT2 étaient décrits comme entraînant une mort cellulaire responsable de la perte de la masse fonctionnelle des îlots.

Cependant, des preuves croissantes suggèrent que, au fur et à mesure que le DT2 progresse, la cellule  $\beta$  ne meure pas, mais perd l'expression de l'insuline, entraînant éventuellement une « dédifférenciation » vers un état progéniteur, puis vers d'autres types de cellules de l'îlot. Au minimum, il existe des preuves de la perte de l'identité des cellules  $\beta$  au cours de la maladie (Brereton MF, *et al*, 2016). Bien que moins convaincant, il existe également des preuves d'une identité endocrine altérée pendant le DT1.

Enfin les dernières recherches actuelles portent sur l'hétérogénéité des cellules  $\beta$ , suggérant collectivement qu'il existe des populations de cellules  $\beta$  au sein de l'îlot avec des fonctionnalités variables et des niveaux d'expression de ses marqueurs d'identité différents.

Il existe également, beaucoup moins répandus, les diabètes monogéniques, issus de mutations génétiques comme les MODY (maturity onset diabetes of the young) qui représentent un peu moins de 5% des DT2 (Bonfond A, et Froguel P, 2015).

Enfin, il est à noter que dans 8-9% des grossesses, un diabète gestationnel (DG) peut se développer, ce dernier pouvant évoluer en un DT2 classique post-partum.

## I. Les diabètes monogéniques

Ces derniers ont été découverts en 1985, lorsqu'un groupe d'étude de l'OMS a suggéré que le DT2 pourrait être un trouble autosomique dominant impliquant un seul gène et caractérisé par une pénétrance variable en fonction de l'obésité et du vieillissement (Vftter K, 1986). La première preuve que le DT2 impliquait une composante génétique n'a été apportée qu'en 1992, grâce à une analyse de lien familial chez des familles françaises ayant un diabète précoce, non auto-immunisé et non obèse, appelé aussi diabète à maturité chez les jeunes (MODY) (Froguel P, *et al*, 1992). Les mutations dans la GCK (codant pour la glucokinase) ont ainsi montré une forme relativement modérée de MODY.

L'identification ultérieure de 28 gènes distincts hébergeant des mutations et provoquant un diabète monogénique ont apporté des idées révolutionnaires sur la physiologie du diabète, en particulier sur la sécrétion d'insuline. Cependant, ces mutations n'affectent seulement qu'un peu moins de 5% des patients diabétiques (Shields BM, *et al*, 2010).

En d'autres termes, aucune de ces nombreuses variantes génétiques associées n'est suffisamment pénétrante pour conduire au DT2 seul. Les études jumelles ou familiales ont montré que les estimations de l'héritabilité du DT2 variaient de 30 à 70%, en fonction de l'âge du diabète et de l'état glycémique des cas (Almgren P, *et al*, 2011) (Poulsen P, *et al*, 1999). Ces études ont suggéré un rôle plus important de la génétique dans les premières phases de développement du DT2 et une plus grande contribution de l'environnement au risque de diabète chez les patients plus âgés. Plusieurs études récentes, y compris des études d'association à l'échelle du génome (GWAS), ont confirmé pleinement la nature polygénique du DT2 et ont démontré le rôle des régions génétiques dans le risque DT2.

Enfin, il est intéressant de noter que la plupart des MODY sont liés à des mutations dans des gènes intervenant dans la différenciation endocrinienne ou dans le maintien de l'identité des cellules  $\beta$ , tels que Pdx1, Ptf1a, Pax4 ou encore Notch (Bonfond A, et Froguel P, 2015).

## II. Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel (DG) est l'une des complications métaboliques les plus courantes de la grossesse. Il a été mis en évidence suite à la première évaluation systématique du test oral de tolérance au glucose par O'Sullivan et ses collègues en 1964 (Bhavadarini B, *et al*, 2016).

Le DG est défini comme « tout degré d'intolérance au glucose lors d'un début ou d'une première reconnaissance pendant la grossesse ». Dans le monde entier, la prévalence déclarée de DG varie de <1% à 28% (Jiwani A, *et al*, 2012). Ces différences peuvent être expliquées par des facteurs tels que l'origine ethnique, l'âge maternel, la génétique, l'IMC, la santé, la procédure de dépistage et les critères diagnostiques, y compris les systèmes de soins de santé. À l'échelle mondiale, l'incidence de DG devrait augmenter à mesure que la prévalence de l'obésité augmente.

Le DG disparaît habituellement après l'accouchement, mais les femmes ont un risque plus élevé de développer un DT2 par rapport aux femmes sans DG antérieur (Bellamy L, *et al*, 2009). Le risque de DT2 est associé à l'indice de masse corporelle avant la grossesse, l'âge maternel avancé et les antécédents familiaux de diabète (Rayanagoudar G, *et al*, 2016). En outre, le risque est associé au poids corporel, à l'activité physique et au régime post-partum (Bao W, *et al*, 2015).

A noter que les risques pour l'enfant sont la prématurité et l'hypocalcémie à court terme, mais également l'obésité ou encore l'intolérance au glucose à plus long terme. Enfin, les risques maternels sont, comme dit précédemment, un TD2 à long terme, mais à court terme cela peut aller de l'hypertension artérielle à la nécessité d'une césarienne lors de l'accouchement (Pedersen ALW, *et al*, 2017).

### III. Le diabète de type 1

Le DT1 représente 5 à 10% de tous les cas de diabète. Il se déclare généralement avant l'âge de 30 ans. Les taux de DT1 et d'autres maladies auto-immunes ont augmenté au cours des dernières décennies dans les pays occidentaux: on estime qu'ils doublent tous les 20 ans (Bach JF, 2012). Bien que la raison de ces taux croissants n'ait pas été clairement identifiée, beaucoup d'intérêt s'est concentré autour de l'utilisation généralisée d'anti-microbiens.

La caractéristique du DT1 est la destruction immune des cellules  $\beta$  productrices d'insuline, entraînant une dépendance à l'insuline exogène pour la survie (Herold K, *et al*, 2013). Il y a plus de 3 décennies, les premières études cliniques de la cyclosporine A l'ont rapporté comme intervenant dans la modification du cours naturel de la perte de cellules  $\beta$  chez les patients atteints d'un DT1 (Stiller CR, *et al*, 2014). Ces essais ont suivi des études d'observation antérieures qui ont identifié des auto-anticorps qui réagissent avec les cellules des îlots ainsi que dans le sérum des patients atteints de DT1 mais aussi via des études prospectives qui ont montré que la maladie auto-immune était chronique et progressive (Srikanta S, *et al*, 1983).

Les facteurs qui conduisent au développement de DT1 sont à la fois génétiques et acquis puisque le taux de concordance de DT1 est de 30 à 50% chez les jumeaux monozygotes comparativement à 10% dans les couples dizygotiques. Les formes monogéniques du diabète ont été associées à des mutations dans les gènes de réponse immunitaire.

Les patients atteints du syndrome polyendocrinien auto-immune 1 (APS1 ou APECED), causés par une mutation d'AIRE, développent un diabète auto-immun (Anderson MS, *et al*, 2005). Une auto-immunité importante, présente dans le DT1, se développe chez des patients atteints de mutations de Foxp3, nécessaires au développement et au fonctionnement des lymphocytes T régulateurs (Bennett CL, *et al*, 2001).

De plus, parmi les 25 loci les plus fortement associés à la maladie 19 impliquent des gènes candidats liés à des réponses immunitaires et 3 sont impliqués dans la fonction ou la survie des cellules  $\beta$  ([www.t1dbase.org](http://www.t1dbase.org)).

Le principal complexe d'histocompatibilité (CMH) est le locus le plus fortement associé à la maladie et explique la plupart des risques. Le locus codant la protéine tyrosine phosphatase non réceptrice 22 (PTPN22) est également liée à la maladie (Concannon P, *et al*, 2005).

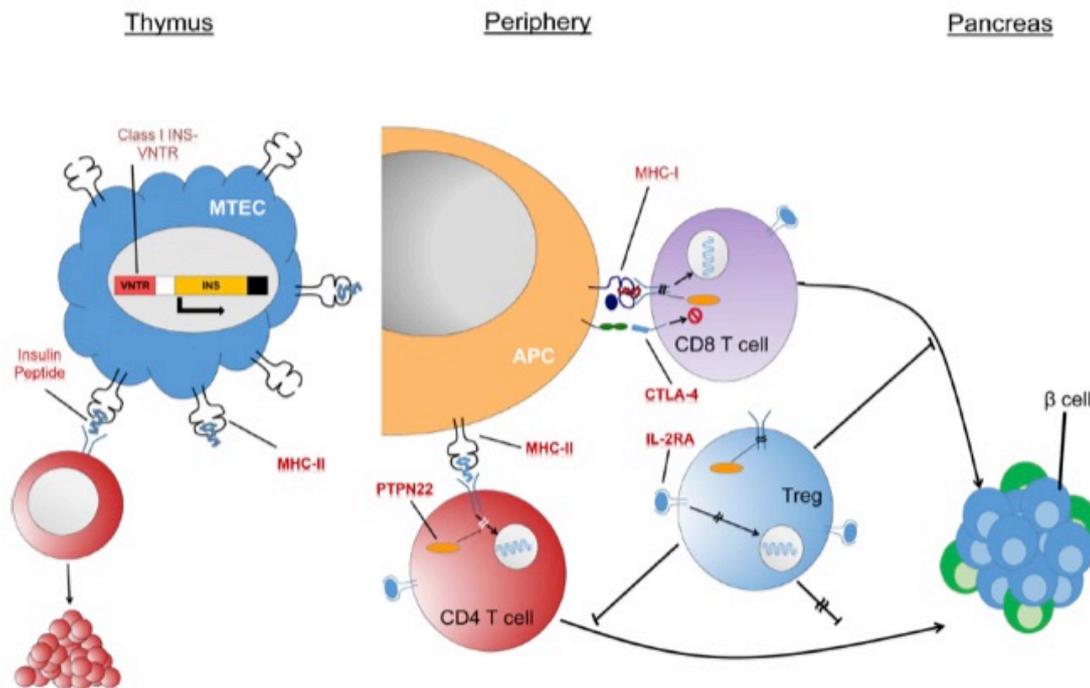
Le locus du gène codant la molécule CTLA-4 est également associé au DT1 (Ueda H, *et al*, 2003). Le CTLA-4 lie les mêmes ligands que CD28 mais dans les cellules T activées CTLA-4 va conférer un signal inhibiteur aux cellules.

Le polymorphisme dans la chaîne  $\alpha$  du récepteur IL-2 (IL-2RA) est censé affecter la signalisation IL-2 nécessaire pour les mécanismes de régulation normaux. L'IL-2 est nécessaire pour la génération de Tregs et leur survie.

Il existe également des loci associés à des gènes liés à la destruction des cellules  $\beta$  et à l'expression de l'insuline. TNFAIP3 est impliqué dans la limitation de l'apoptose médiée par NF  $\kappa$  B et TNF (Song HY, *et al*, 1996).

Une hypothèse bien établie est qu'un locus associé à des VNTR (variable number tandem repeat ; répétition en tandem d'une courte séquence nucléotidique au niveau du génome) dans le promoteur du gène de l'insuline affecte les niveaux d'expression des gènes et les variations structurelles de manière centralisée et périphérique (Pugliese A, *et al*, 1997). En effet, l'expression du gène de l'insuline est régulée par la région VNTR située en amont du site d'initiation de la traduction de l'insuline. Trois classes principales de mini-satellites VNTR sont identifiées: les allèles de classe I, de classe II et de classe III. L'allèle de classe I est associé à un risque accru pour le DT1 alors que l'allèle de classe III est protecteur.

Cette expression accrue du gène de l'insuline au niveau du thymus est censée fournir une sélection négative plus efficace des cellules T réactives à l'insuline (Vafiadis P, *et al*, 1997) (Figure 6)



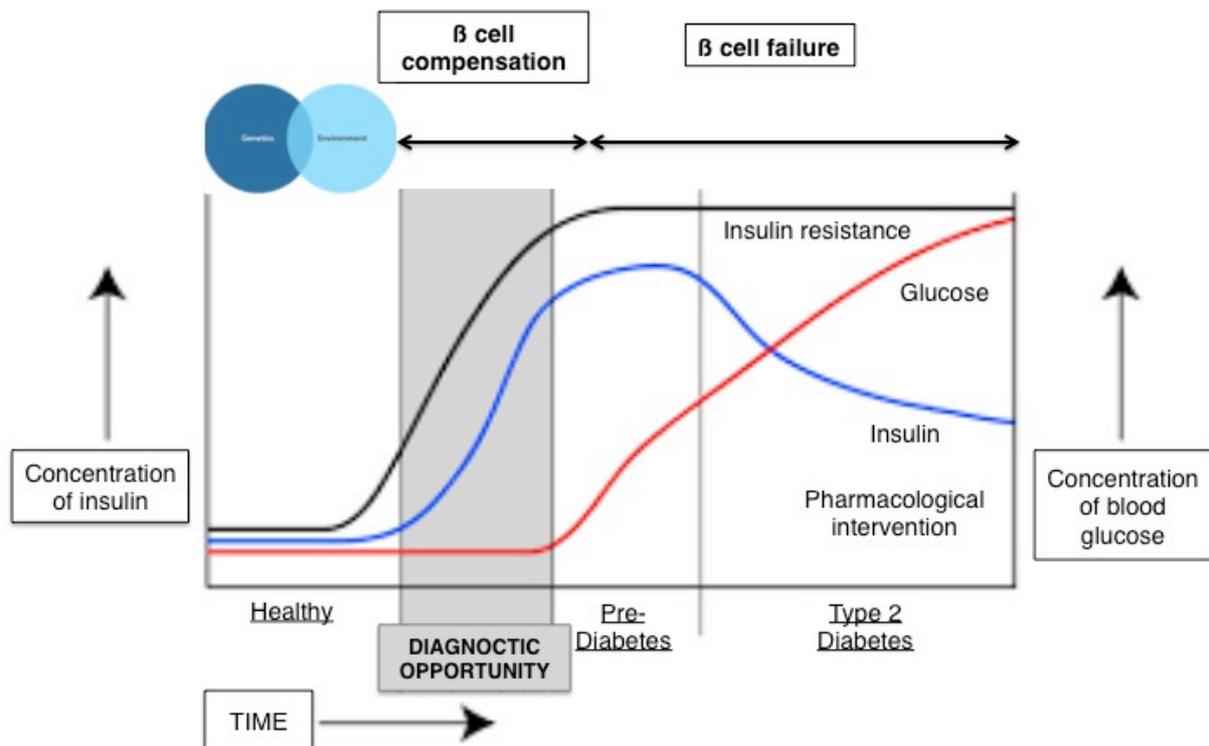
**Figure 6 : Résumé schématique des loci intervenant dans l'apparition du diabète de type 1.** Le CMH est le locus le plus important pour la maladie. L'INS-VNTR peut affecter l'expression de l'insuline par les cellules épithéliales thymiques. L'association avec IL-2 RA peut affecter la signalisation dans les cellules T-regs et T-effecteurs. Un polymorphisme du PTPN22 affecte la signalisation à travers la cellule T qui peut affecter les signaux nécessaires à l'activation de T-effecteur et Treg. CTLA-4 est un régulateur négatif. Un défaut de cette molécule peut affecter l'activation cellulaire dans la périphérie ainsi que dans le thymus.

Enfin, pour conclure, il est important de noter que certains DT1 vont se déclarer tardivement chez des patients adultes. Ces patients seront positifs aux auto-anticorps et deviendront à court terme insulino dépendants (Chatzianagnostou K, et al, 2016). Ce type particulier est appelé LADA (latent autoimmune diabetes adulthood)

#### IV. Le diabète de type 2

Le DT2 représente 80% des diabètes. Ce type de diabète est dû à une diminution significative de la masse fonctionnelle des cellules  $\beta$  pancréatiques.

Ce diabète est d'origine multifactoriel et va être issu de la résultante entre facteurs de prédisposition génétique et environnement (Figure 7).



**Figure 7 : Survenue du diabète de type 2.** Le DT2 va être provoqué par des stimuli génétiques et environnementaux. Après une phase de compensation par la cellule  $\beta$ , celle-ci va s'épuiser et la masse de cette dernière va diminuer. Ainsi la glycémie va augmenter, les cellules  $\beta$  vont perdre leur fonction et une insulino-résistance va apparaître.

Les causes moléculaires de la diminution de la masse de la cellule  $\beta$  sont encore très peu connues et plusieurs hypothèses ont vu le jour récemment.

Cette diminution de masse est attribuée, de manière minoritaire, à l'apoptose de ces dernières ; environ 3% d'apoptose au sein de l'îlot pancréatique est retrouvé (Demirtas L, *et al*, 2016).

Cependant, un nombre croissant de preuves suggère que les composants clés de l'insuffisance en cellules  $\beta$  impliquent:

- (1) la perte d'identité cellulaire, en particulier les protéines associées à la fonction cellulaire mature (tels que, l'insuline et les facteurs de transcription comme MAFA, PDX1 et NKX6.1)
- (2) dé-différenciation, définie par une régression à un état de type progéniteur ou de cellule souche.

Les nouvelles technologies actuelles ont permis de comparer les caractéristiques des cellules issues d'îlots de donneurs humains normaux à ceux qui se trouvent dans des conditions patho-physiologiques par séquençage d'ARN en cellule isolée et également par analyse épigénétique. Ainsi, il a été montré un niveau d'hétérogénéité remarquable chez les cellules  $\beta$  "insulino-positives" d'un point de vue histologique. Ces résultats suggèrent non seulement que ces sous-ensembles de cellules  $\beta$  ont des réponses différentes aux sécrétagogues d'insuline, mais que la définition de leur expression génique unique et de leurs profils épigénétique offre des possibilités de plasticité cellulaire intra-îlots.

Plus récemment, des anticorps de surface spécifique des cellules  $\beta$  ont révélé que les cellules  $\beta$  humaines peuvent être subdivisées en quatre sous-types (c-à-d., b1-b4) en fonction des niveaux de ST8SIA1 (ganglioside synthase) et CD9 (glycoprotéines de la cellule) (Dorrell C, *et al*, 2016).

Ces sous-types ont à la fois une abondance (par exemple, b1 > b4) et une activité de sécrétion d'insuline variable (c'est-à-dire b1 > b2-4) dans des conditions normales. En outre, les populations de cellules b3-b4 moins réceptives au glucose semblent de plus en plus répandues dans les échantillons d'îlots diabétiques, ce qui pourrait représenter un état d'activité compromis de la cellule  $\beta$ .

Récemment, un bio-marqueur des cellules diabétiques "défaillantes" semble impliquer l'induction de l'isoforme A3 de l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ALDH1A3) (Kim-Muller JY, *et al*, 2016). Ainsi, des niveaux de ALDH1A3 augmentés (normalement produits uniquement chez les progéniteurs pendant l'embryogenèse) ont été observés dans les cellules  $\beta$  de l'îlot adulte à partir de souris invalidées pour FoxO (1, 3a, 4) mais également dans les populations de cellules  $\beta$  dysfonctionnelles chez les souris db/db, ou déficientes en Nkx6.1 ou encore dans les modèles de souris déficientes en MafA (Taylor BL, *et al*, 2013) (Hang Y, *et al*, 2014) (Kim-Muller JY, *et al*, 2016).

Les cellules ALDH1A3<sup>+</sup> triées sont moins sensibles au glucose que les cellules dépourvues d'ALDH1A3, et possèdent des taux réduits de marqueurs de cellules  $\beta$  matures (tels que la Glucokinase, MafA), des augmentations concomitantes de

marqueurs de progéniteurs (Rfx6, Rfx7) et un dysfonctionnement mitochondrial (Kim-Muller JY, *et al*, 2016).

Sous-jacente à la notion d'hétérogénéité, les interrogations actuelles visent à comprendre si les cellules endocrines humaines existent dans un état stable, différencié dans une voie terminale ou si un niveau de plasticité cellulaire existe. Ainsi, des données probantes s'accumulent à partir d'études sur des modèles animaux dont les cellules d'îlot ont la capacité de se différencier directement en un autre type cellulaire et/ou de se différencier en une cellule progénitrice.

De façon significative, la conversion directe  $\alpha$ -vers- $\beta$  ou  $\beta$ -vers- $\alpha$  a été observée à travers le traçage des lignées endocriniennes dans plusieurs types de déficience génique de régulateurs de facteurs de transcription spécifiques tels que Arx, Pdx1, Pax4 et Dnmt1 (Collombat P, *et al*, 2007) (Dhawan S, *et al*, 2011) (Yang YP, *et al*, 2011) (Gao T, *et al*, 2014).

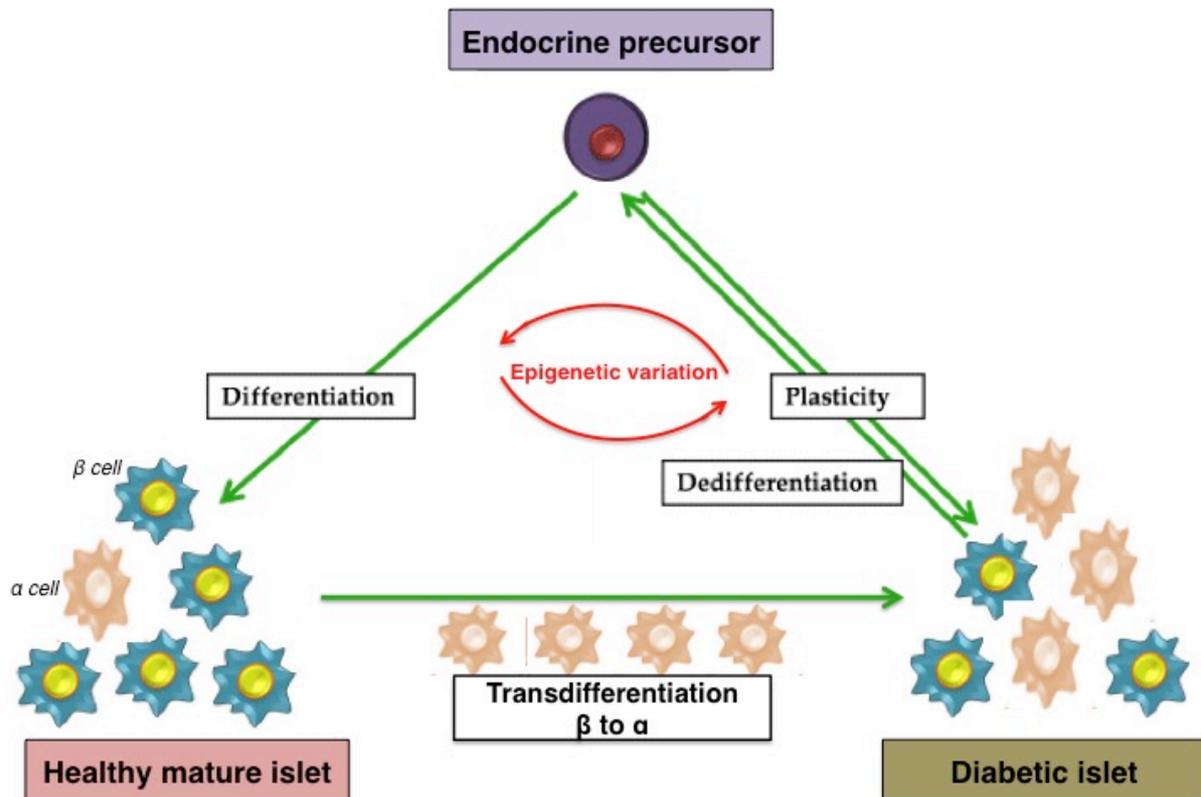
Il est probable que les mécanismes sous-jacents à la façon dont un type cellulaire de l'îlot adopte une destinée plutôt «  $\beta$ -like » impliquent des influences épigénétiques dans les loci critiques de l'îlot. Par exemple, les modifications des histones et/ou de l'ADN (telle que la méthylation) peuvent permettre l'expression de gènes spécifiques des cellules  $\beta$  dans les cellules  $\alpha$ , favorisant ainsi la conversion cellulaire.

Par séquençage de l'ARN et immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) dans des cellules  $\alpha$  et  $\beta$  humaines triées, il a été montré qu'il existe un niveau remarquable de plasticité dans les cellules  $\alpha$ , en examinant par exemple les niveaux d'activation de l'histone H3K4me3 et des marques répressives H3K27me3 (Bramswig NC, *et al*, 2013). De manière surprenante, les cellules  $\alpha$  possèdent un grand nombre des gènes des cellules  $\beta$  marqués de manière bivalente par H3K4me3 et H3K27me3, suggérant que ces gènes sont dans un état stable mais inductible. Ceux-ci correspondent à des gènes fonctionnels clés de la cellule  $\beta$ , comme MAFA, PDX1 ou le GLP1R.

Enfin, des études récentes ont montré la présence d'une population de cellules  $\beta$  immatures tout au long de la vie et formée à partir de précurseurs non  $\beta$  située dans un micro-environnement spécialisé ou « niche néo-génique » à la périphérie des îlots. Ces cellules expriment l'insuline, mais sont déficientes en autres marqueurs de cellules  $\beta$  clés et peuvent ainsi être décrites comme transcriptionnellement immatures, incapables de détecter le glucose et incapables de supporter l'influx de calcium. Cette source permanente de nouvelles cellules  $\beta$  dans les îlots en bonne santé, comparée aux cellules  $\beta$  matures co-existantes, montre des variations épigénétiques liés à ce défaut de maturation. (Van Der Meulen T, *et al*, 2017).

En effet ces résultats ont été confirmés récemment dans une étude qui a montré l'homogénéité transcriptionnelle des cellules  $\beta$  matures, mais leur variation au niveau épigénétique liée à des « stratégies » de maturation différentes. Enfin, il a été montré que la phase G0/G1 correspondait à la fenêtre où les progéniteurs en début de maturation allaient enregistrer les stimuli leur permettant d'entrer dans une voie spécifique (Qiu WL, *et al*, 2017)

Ces études ont ainsi révélé que la dé-différenciation et/ou la re-différenciation étaient des mécanismes de « sauvetage » des cellules  $\beta$  de l'îlot. Cependant, à des fins thérapeutiques, il serait intéressant d'étudier ces effets chez l'Homme. La preuve de cette possibilité n'est pas claire ou même insuffisante, ce qui peut être dû en partie à la nature relativement récente de ces observations chez la souris, mais peut également refléter des difficultés dans la disponibilité des échantillons ou encore une différence entre les espèces (MacDonald MJ, *et al*, 2011) (Dai C, *et al*, 2012).



**Figure 8 : Représentation schématique du changement de la masse  $\beta$  pancréatique au cours du diabète.** Les précurseurs endocriniens vont donner naissance aux cellules  $\alpha$  et  $\beta$  matures permettant une régulation de l'homéostasie glucidique. Des modifications épigénétiques vont entraîner des phénomènes de trans-différenciation et dé-différenciation liés à la plasticité endocrines, entraînant un changement de la masse fonctionnelle des îlots pancréatiques.

#### V. Différents traitements dans le cadre du diabète de type 2.

Afin de rétablir une normoglycémie et remédier au DT2, il est recommandé d'adopter un régime sain ainsi qu'une pratique sportive régulière. Ainsi, même dans certains cas de diabète monogéniques, comme lors d'une mutation du gène TCF7L2, il est possible de ne pas développer la maladie au cours de sa vie (Florez JC, *et al*, 2006). Néanmoins, ces actions peuvent s'avérer inefficaces et l'application d'un traitement thérapeutique est nécessaire.

Plusieurs familles composent l'arsenal thérapeutique actuel ; les biguanides, les inhibiteurs des  $\alpha$ -glucosidases, les sulfamides hypoglycémifiants, les glinides, les gliptines, les inhibiteurs SGLT2 et enfin les agonistes du GLP-1.

## 1. *Biguanides et traitements des diabètes non insulino dépendants.*

### a) *Les biguanides*

Les biguanides, dont le chef de file est la Metformine, est le traitement donné en première intention pour le DT2, surtout en cas d'obésité. Ces molécules vont inhiber la néoglucogénèse, augmenter la sensibilité à l'insuline (surtout au niveau du muscle) et également retarder l'absorption intestinale de glucose. Cependant, certains effets secondaires comme un défaut d'absorption de vitamine B12 ou encore des acidose lactiques sont assez courant, ainsi que de nombreux troubles gastro intestinaux.

### b) *Anti diabétiques non insulino dépendants.*

Les inhibiteurs des  $\alpha$ -glucosidases dont le chef de file est le Miglitol, sont principalement donnés dans le cas de diabète non insulino dépendant. Le Miglitol est un pseudo monosaccharide qui va inhiber les enzymes intestinales responsables de l'absorption du glucose et du fructose. Ainsi ces inhibiteurs vont permettre de diminuer l'hyperglycémie postprandiale ainsi que la glycémie à jeun. Enfin, les effets indésirables principaux sont les diarrhées ainsi que les douleurs abdominales.

Les sulfamides hypoglycémiantes ou encore, sulfonylurées, tel que le Glibenclamide, vont également être utilisés chez les diabétiques non insulino-dépendants.

Ils vont ainsi se fixer sur la sous-unité SUR des canaux potassiques ATP dépendant situés sur la cellule  $\beta$  pancréatique, permettant l'influx de calcium et la sécrétion massive d'insuline. La limitation de ces molécules étant donc la capacité résiduelle de l'îlot à sécréter l'insuline.

Cependant, un effet indésirable important de ces molécules sont les hypoglycémies qui seront généralement considérées comme graves et prolongées.

Les glinides, comme la Répaglinide, sont des dérivés de l'acide carbamoylméthylbenzoïque. Son mode d'action est commun à celui des sulfamides cependant, sa demi vie plus courte, lui permet de diminuer les risques d'hypoglycémie chronique.

Enfin, les inhibiteurs SGLT2 représentent la dernière classe d'antidiabétique. Comme leur nom l'indique, ils vont permettre l'inhibition du co-transporteur sodium-glucose de type 2 rénal dont l'action est donc indépendante des cellules  $\beta$ . Ce blocage va permettre de réduire la glycémie en augmentant la glycosurie. Ces inhibiteurs, tels que le Dapaglifozine ou la Serglifozine, sont utilisés en complément de toutes les classes d'anti diabétiques anti hyperglycémiant oraux ou injectables. Cependant leur utilisation est actuellement controversée. (Woo VC, *et al*, 2017) (Bonner C, *et al*, 2015).

## *2. Les analogues du GLP1 et inhibiteurs de DPP4.*

Les agonistes sont représentés par l'exénatide (ou exendine) et le liraglutide. Ces agonistes vont participer à l'augmentation de l'effet incrétine. Cet effet incrétine va conduire à la libération par l'intestin, suite à l'arrivée du bol alimentaire, de facteurs qui vont augmenter d'environ 60% la réponse sécrétoire d'insuline lorsque la glycémie est élevée.

Les 2 peptides permettant cet effet sont le GLP-1 (glucagon like peptide 1) et le GIP (glucose dependent insulintropic peptide) ; ils sont issus du clivage du proglucagon par les pro-convertases (PC1/2).

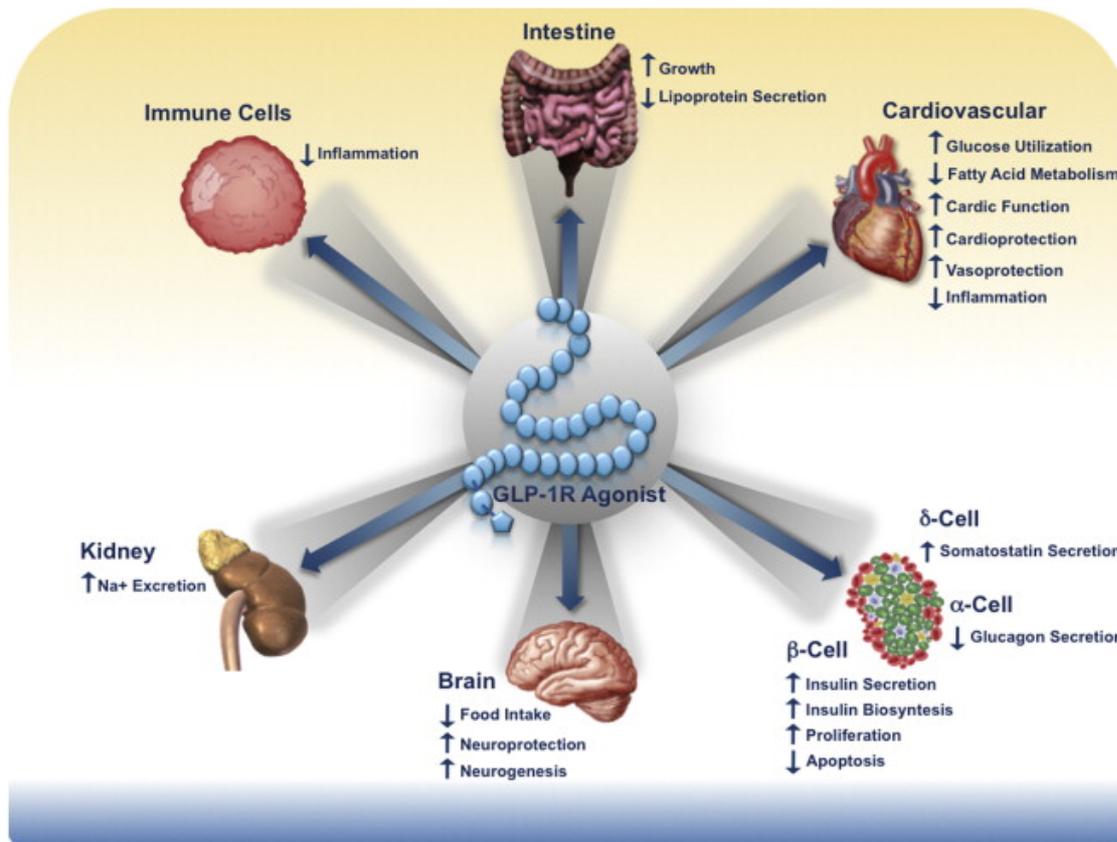
Les effets du GLP-1 sont divers. Ainsi il va permettre une stimulation de la sécrétion d'insuline en condition élevée en glucose, une réduction des taux de glucagon ou une augmentation de la synthèse d'insuline. Le GLP-1 possède également des effets au niveau du cerveau, et va permettre la diminution de la prise alimentaire (Figure 9).

Les effets secondaires vont être principalement des diarrhées à court terme, cependant les effets à très long terme ne sont toujours pas connus.

Les inhibiteurs de la DPP4, tels que la sitagliptine ou la saxagliptine, sont préconisés très souvent en association de la metformine. Comme leur nom l'indique ils vont donc inhiber la dipeptidyl peptidase 4 (DPP4). Cette enzyme intervient dans la dégradation du GLP1 ; et ainsi, l'action de ces inhibiteurs va permettre de garder un

effet incrétine plus longtemps. En ce sens, les effets de ces inhibiteurs sont essentiellement sur la glycémie postprandiale.

Les effets secondaires peuvent être importants, avec notamment des troubles musculo squelettiques ainsi que la diffusion de l'inhibiteur dans le lait maternel pour les femmes allaitantes.



**Figure 9 : Action pharmacologique directe des agonistes au GLP1-R.**  
(adaptée de Campbell JE, et al, 2013)

### III. Le facteur de transcription E2F1

#### I. Généralités sur la famille des E2Fs

##### 1. Généralités

Récemment, le facteur de transcription E2F1, d'abord connu pour son rôle dans le cycle cellulaire, a été montré comme possédant des rôles métaboliques très marqués, notamment au niveau du pancréas (Victor Aguilar et Lluís Fajás, 2010).

E2F1 a d'abord été identifié en 1986, lorsqu'il a été décrit comme un facteur de transcription lié au promoteur du gène adéno-viral E2 (Kovesdi I, *et al*, 1986).

Ce n'est qu'en 1991 que sa régulation par la protéine du rétinoblastome (Rb) suppresseur de tumeur a été décrite. Rb a d'abord été identifié comme un locus génétique associé au développement héréditaire d'une tumeur oculaire (Bagchi S, *et al*, 1991). On a ainsi constaté que Rb était une cible importante des onco-protéines exprimées par des virus tels que l'adénovirus E1A, l'antigène du virus simien 40 (SV40) et les protéines E7 du papillomavirus humain (Whyte P, *et al*, 1988) (Goodrich D, *et al*, 1991) (Johnson BA, *et al*, 2017).

L'évaluation de cette hypothèse a conduit à l'identification du facteur de transcription E2F1, la première cible cellulaire identifiée de Rb (Chellapan SP, *et al*, 1991).

E2F1 a été plus tard considéré comme un membre d'une famille de protéines étroitement liées, dont plusieurs ont été trouvées, également comme interagissant directement avec Rb. Le nombre de membres de la famille E2F identifiés a augmenté de façon constante: jusqu'à présent, huit gènes E2F humains ont été décrits et peuvent être divisés en trois catégories en fonction de leurs propriétés transcriptionnelles et de leur interaction avec les protéines « poche » (Rb, p107, p130). E2F1, 2 et 3 sont des activateurs transcriptionnels puissants qui interagissent directement avec la protéine Rb. E2F4 , 5 et 6 sont des activateurs faibles et semblent pouvoir interagir avec les trois protéines poche. E2F7 et 8 ne s'associent pas avec des protéines poche et interviennent principalement dans des phénomènes de répression transcriptionnelle.

## *2. Structure protéique des E2Fs*

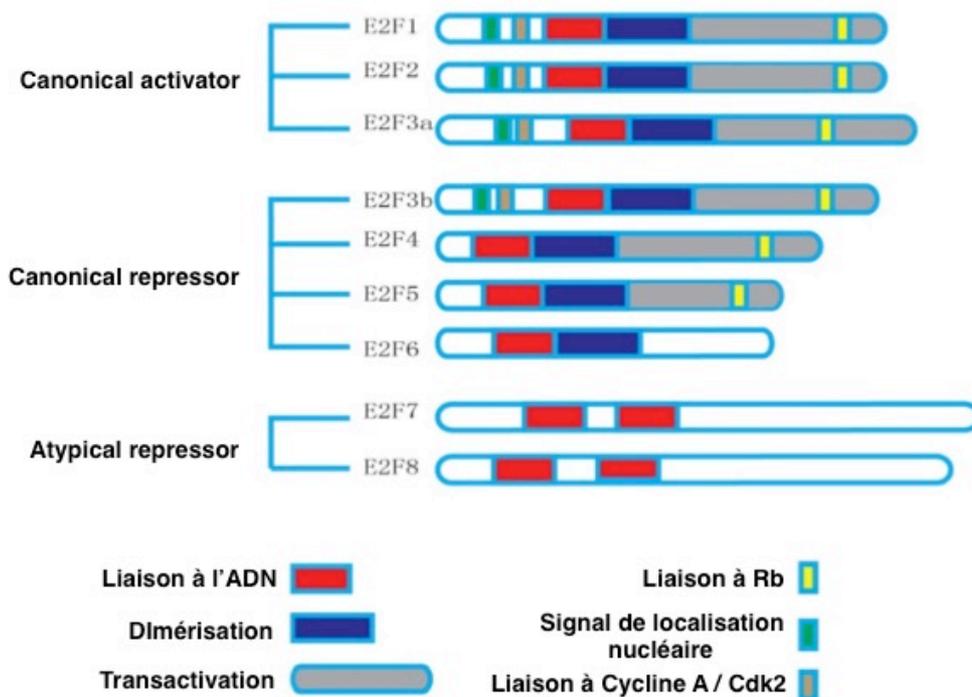
La famille des E2Fs est divisée en 2 catégories ; les E2F canoniques et atypiques (Zhan L, *et al*, 2014).

Les E2F canoniques possèdent un domaine « leucine zipper » au niveau de l'extrémité N-terminale, nécessaire pour la dimérisation avec sa protéine partenaire DP (dimerization partner). Ils possèdent également un domaine de trans-activation,

ainsi qu'un domaine de liaison à la protéine du rétinoblastome, au niveau de l'extrémité C terminale. Ce dernier étant absent pour les E2F6 à 8 (Tsantoulis PK, *et al*, 2005).

E2F1, E2F2 et E2F3 se lient principalement avec pRB, alors que E2F4 est associé à toutes les protéines poches ; pRB / p107 / p130. E2F5, lui, tend à se lier uniquement avec p130 (Zhan L, *et al*, 2014) (Figure 10).

Les E2Fs atypiques comprennent E2F7 et E2F8. Ils possèdent deux domaines distincts de liaison à l'ADN (DBD), mais ne possèdent pas de domaines d'interaction avec la protéine DP, du rétinoblastome ni de domaine de trans-activation. Ainsi, leur liaison à l'ADN est différente des autres membres E2F, et ne dépend pas de DP. E2F8 présente une grande similitude avec la structure de E2F7 et comporte deux domaines spécifiques présentant une grande ressemblance avec le domaine de liaison à l'ADN des E2F canoniques (Chen HZ, *et al*, 2009) (Figure 10).



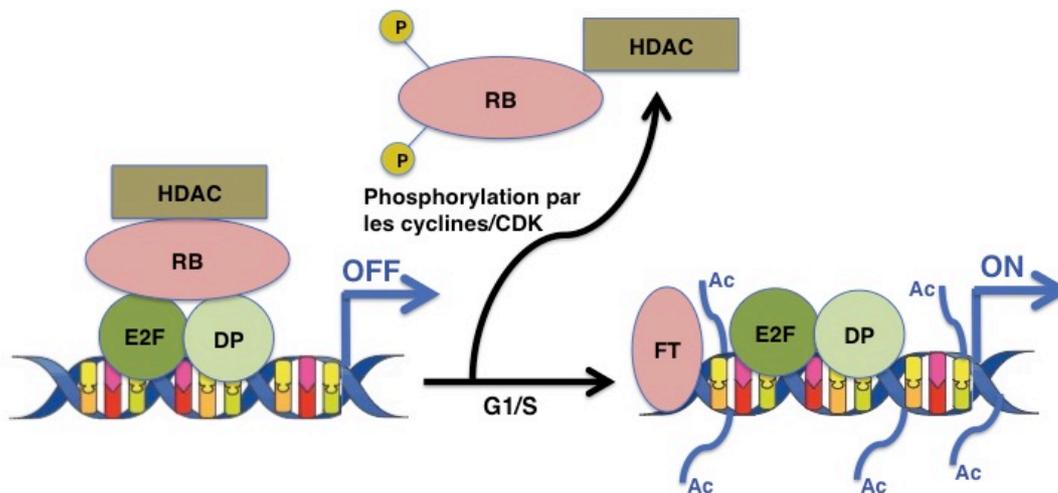
**Figure 10 : Structure des facteurs de transcriptions de la famille des E2F.**

Tous les E2F vont posséder un domaine de liaison à l'ADN, représenté ici en rouge. Le domaine nécessaire à la dimérisation apparaît ici en bleu. En jaune est représenté le domaine de liaison à Rb, appartenant à la famille des protéines poches. Enfin en gris, le domaine de liaison au cycline A / Cdk2. Les E2F canoniques vont se fixer à l'ADN sous forme d'hétérodimères avec les protéines DP, alors que les E2F atypiques se fixent à l'ADN de manière indépendante. (adapté de Lv Y, *et al*, 2017).

### 3. Modulation de l'activité transcriptionnelle des E2Fs

L'activation transcriptionnelle E2F-dépendante est exécutée par un complexe faisant intervenir RB / E2F / DP. A l'heure actuelle l'activation de cette voie au cours du cycle cellulaire est la mieux décrite.

En phase G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub>, la protéine RB, en se fixant à E2F<sub>1</sub>, va bloquer son activité transcriptionnelle. Cette inhibition se fait via le masquage du domaine de transactivation situé en C terminale des E2F (Di Stefano L, *et al*, 2003). Il est à noter que RB est également capable de recruter plusieurs protéines intervenant dans le remodelage de la chromatine, telles que les histones déacétylases et les histones méthyltransférases permettant, au complexe E2F/DP d'être soit activateur soit répresseur en fonction du contexte cellulaire et du promoteur du gène sur lequel il est fixé (Brehm A, *et al*, 1998) (Harbour JW, *et al*, 2000) (Figure 11).



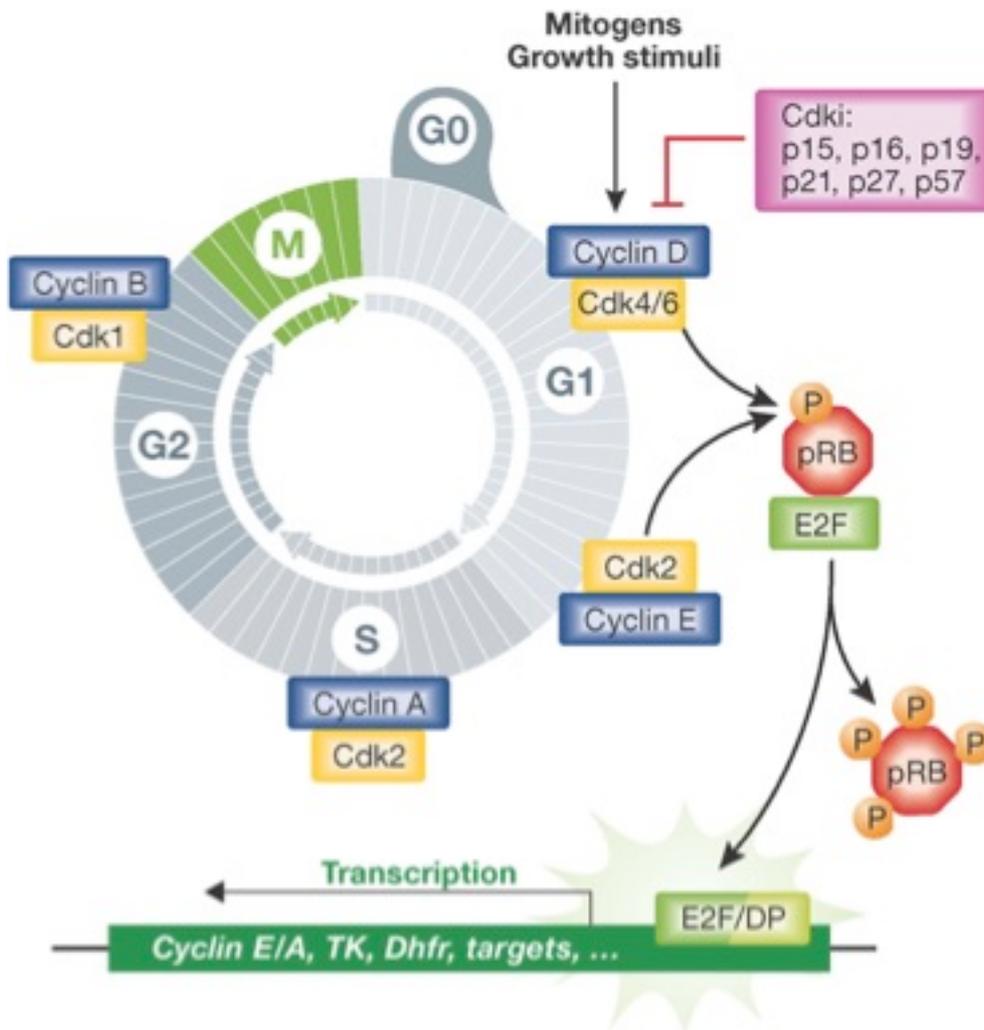
**Figure 11 : Régulation de l'activité de E2F par RB.**

Levée de la répression transcriptionnelle de RB sur le complexe E2F/DP durant la phase G<sub>1</sub>/S conduisant à la transcription des gènes cibles de ce dernier. (FT : facteur de transcription, Ac : acétylation)

L'activité transcriptionnelle va donc être modulée au cours du cycle cellulaire. Ainsi, dans la période G<sub>1</sub> à S, RB est phosphorylé par les kinases cycline-dépendantes (CDK), entraînant la dissociation de RB du complexe RB-E2F et la levée de l'inhibition des E2F. Le dimère E2F/DP est ainsi actif en phase S et permet l'expression de ses gènes cibles essentiels à l'entrée en phase S et à la réplication de l'ADN.

En phase G2 / M, les protéines inhibitrices de CDK, les CDKi, bloquent l'activité des CDK et permettent un retour à l'état hypophosphorylé de RB (Cam H, *et al*, 2003) (Giacinti C, *et al*, 2006) (Figure 12).

En raison de l'absence du domaine de liaison au rétinoblastome, E2F6 est considéré comme régulant des gènes cibles d'E2F indépendants des protéines poches (Ghazaryan S, *et al*, 2014). E2F6 n'étant pas régulé par la famille pRB, il peut réprimer la transcription par le recrutement de complexes de remodelage de la chromatine, incluant le groupe des protéines Polycomb (tel que Ezh2) aux promoteurs cibles des E2F (Attwooll C, *et al*, 2006).



**Figure 12 : Régulation moléculaire du cycle cellulaire.**

Les voies de transduction du signal induites par des stimuli mitogéniques activent le complexe cyclin D-CDK au début de la phase G1. Cela va induire une accumulation de complexe cyclin D-CDK actif pendant la phase G1. L'activation de ces complexes conduit à une inactivation partielle par phosphorylation des protéines de poche, comprenant Rb, p107 et p130. Les protéines de poche inactivées libéreront l'activité du facteur de transcription E2F et permettront ainsi l'expression de cyclines de type E, nécessaires à la transition G1 / S. Les CDK sont encore activés pendant le cycle cellulaire par des cyclines de type A pour conduire la phase de transition S jusqu'à la mitose, période connue sous le nom de phase G2 (adapté de Aguilar V, *et al*, 2010).

#### 4. Rôle et fonctions générales des E2Fs

D'un point de vue fonctionnel, les E2F se divisent en 3 catégories : les E2F canoniques dit « activateurs » ou « répresseurs », ainsi que les E2F non canoniques.

Les E2F canoniques « activateurs » sont constitués des E2F1 à E2F3a.

Ils sont nécessaires à l'activation de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire. La perte de leur expression va mener à l'arrêt du cycle. Leur surexpression dans des cellules quiescentes permettra de faire entrer ces dernières en phase S (Johnson DG, *et al*, 1993).

Le locus du gène E2F3 code pour deux protéines différentes, E2F3a et E2F3b, issues d'un épissage alternatif. E2F3a est généralement considéré comme un activateur de transcription. La surexpression de E2F3a entraîne un passage des cellules de la phase G0 à la phase S.

Les E2F canoniques « répresseurs » sont constitués des E2F3b à E2F6 (Adams MR, *et al*, 2009).

E2F4 et E2F5 sont très proches de part leur structure et possèdent principalement une activité inhibitrice. Au cours du cycle cellulaire, ils vont ainsi être retrouvés transitoirement dans le noyau lors de la phase G0/G1 et participent ainsi à la différenciation cellulaire (Humbert PO, *et al*, 2000). Cependant, récemment, E2F4 a été décrit comme ayant un rôle important dans la régulation positive de la prolifération des cardiomyocytes et également dans la régénération neuronale (Amerongen MJ, *et al*, 2010) (Sasagawa S, *et al*, 2016).

Dernier membre de ce groupe, E2F6, présente une structure unique. Il a d'abord été décrit comme ayant un rôle dans la quiescence cellulaire mais pourrait également participer à la réponse au stress lors de la réplication de l'ADN sous le contrôle de chk1 (Bertoli C, *et al*, 2013).

Le dernier groupe, appelé E2F non canonique, est constitué des E2F7 et E2F8. Ces facteurs contrôlent les gènes du cycle cellulaire à travers des homodimères ou des hétérodimères de domaines de liaison à l'ADN, fonctionnant principalement sous forme de répresseurs transcriptionnels. E2F8 est un membre récemment découvert de la famille E2F. Il partage la structure unique d'E2F7 et exerce des fonctions dans de nombreux mécanismes tels que l'angiogenèse, la lymphangiogenèse, la carcinogenèse et la polyploïdisation cellulaire (Lv Y, *et al*, 2017).

Le domaine de liaison à l'ADN des E2F reste très conservé. De nombreuses données montrent que les E2F se lient et régulent des ensembles disparates de gènes cibles via des interactions avec des cofacteurs spécifiques. La classification de ces derniers n'est pas représentative de la complexité biologique en activateur et répresseur. En fonction du contexte tissulaire, ils agiront soit comme activateur, soit comme répresseur. Cela dépendra des gènes cibles, des cofacteurs recrutés et du contexte cellulaire (Bell LA, *et al*, 2004).

## II. E2F1, un carrefour entre vie et mort cellulaire

Comprendre les fonctions diverses et dichotomiques de l'activité de E2F1 a fait l'objet d'une vaste recherche durant ces dernières années. E2F1 est en effet bivalent, et peut contrôler l'apoptose comme le fonctionnement du cycle, en fonction du contexte cellulaire.

### 1. *E2F1 et prolifération cellulaire*

Comme les fonctions d'une grande série de gènes cibles de E2F1 sont liées à la promotion de la progression du cycle cellulaire, la réplication de l'ADN et la transition de la phase G1 / S, E2F1 a été considéré comme un promoteur de tumeur, sa dérépression contribuant à une progression du cycle cellulaire non restreinte. Cependant, les mutations dans E2F1 elles-mêmes sont rares ; la base de données COSMIC répertorie 43 mutations somatiques dans E2F1, contre 1143 dans RB et 7 716 dans p53 (Bamford S, *et al*, 2004).

La surexpression de E2F1 (sous le promoteur de la kératine 5) dans les modèles de souris prédispose les animaux aux cancers, principalement de l'épithélium vaginal, de la peau et de l'estomac. Cependant, l'activité accrue de E2F1 peut entraîner l'augmentation de la transcription de p14ARF et donc l'inhibition de p53, contribuant à la formation de tumeur (Pierce MA, *et al*, 1998).

Les souris E2F1<sup>-/-</sup> montrent également un développement tumoral spontané, qui semble être spécifique de certains tissus. Les tumeurs les plus fréquentes sont les héli-angiosarcomes, les hépatocarcinomes et les tumeurs pulmonaires. Cette prédisposition à la formation de tumeurs est probablement due à la perte d'un point de contrôle de E2F1 et peut-être causée par la réduction de l'expression des gènes cibles pro-apoptotiques, soutenant ainsi un rôle de E2F1 plutôt dans la suppression tumorale (Yamasaki L, *et al*, 1996).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la perte de l'activité de E2F1 facilite la progression de la tumeur en réduisant l'apoptose cellulaire. En effet, il peut être approprié de considérer E2F1 comme une protéine impliquée dans certains points de contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose.

Des études basées sur des puces à ADN ont permis l'identification de gènes cibles de E2F1 dont la plupart sont impliqués dans la synthèse de l'ADN (Ischida S, *et al*, 2001).

En plus des cyclines, E2F1 augmente l'expression des protéines MCM2-7, du complexe Cycline E-CDK2, de la cycline A-CDK2. Autres composants du mécanisme de réplication d'ADN montrés comme étant des cibles de E2F1, l'antigène nucléaire cellulaire de prolifération (PCNA), et la topoisomérase II (qui soulage le super-enroulement et le stress de la réplication) sont des cibles directes de E2F1 (Polager S, *et al*, 2002).

De plus, la thymidine kinase (TK) et la dihydrofolate réductase (DHFR), cibles directes d'E2F1, sont toutes deux des enzymes dont les produits précurseurs nucléotidiques sont essentiels pour la réplication de l'ADN (Bandara RL, *et al*, 1993).

E2F1 régulera également d'autres facteurs de transcription, comme MYB, MYC et les « TATA box binding protein » (TBP), créant ainsi une deuxième onde de transcription requise pour la progression dans le cycle cellulaire. Il est intéressant de noter que certaines cibles de E2F1 sont requises pour la phase G2 / M malgré le fait que E2F1 soit largement inactif à ce stade. Il a été suggéré que le remodelage précoce de la chromatine par E2F1 pourrait faciliter une régulation ultérieure de ces gènes dans le

cycle cellulaire, signifiant ainsi un rôle indirect pour E2F1 dans l'expression de ces gènes cibles (Ren B, *et al*, 2001).

## 2. E2F1 et contrôle de l'apoptose

E2F1 agit à travers plusieurs voies et mécanismes pour induire l'apoptose après des dommages à l'ADN, de part la voie p53 et l'induction de p73, ainsi que par la voie apoptotique intrinsèque (Philips CA, *et al*, 1999). Une étude récente suggère également que E2F1 peut agir via PTP -PEST et SHP2 pour inhiber FAK, un facteur clef dans les voies de survie PI3K et RAS / ERK42 (Morales DL, *et al*, 2012).

P73, une protéine qui est étroitement liée à p53, est une cible transcriptionnelle essentielle d'E2F1 et un médiateur important de l'apoptose induite par E2F1. Grâce à un certain nombre de gènes cibles qui sont partagés avec p53, il peut favoriser une transcription améliorée de plusieurs arrêts apoptotiques, d'arrêt du cycle cellulaire et des gènes cibles de réparation de l'ADN. Cependant, p73 peut également agir indépendamment de p53, ce qui en fait un suppresseur de tumeur majeur dans les cellules déficientes pour p53 (Irwin M, *et al*, 2000).

De manière intéressante, E2F1 peut également réguler de manière positive un isoforme de p73 tronquée au niveau N terminale qui entrave ainsi l'activité de la liaison à l'ADN de p73. Dans les cas où cela se produit, la perte de la fonction p73 a également montré une contribution à la résistance aux médicaments (Alla V, *et al*, 2012).

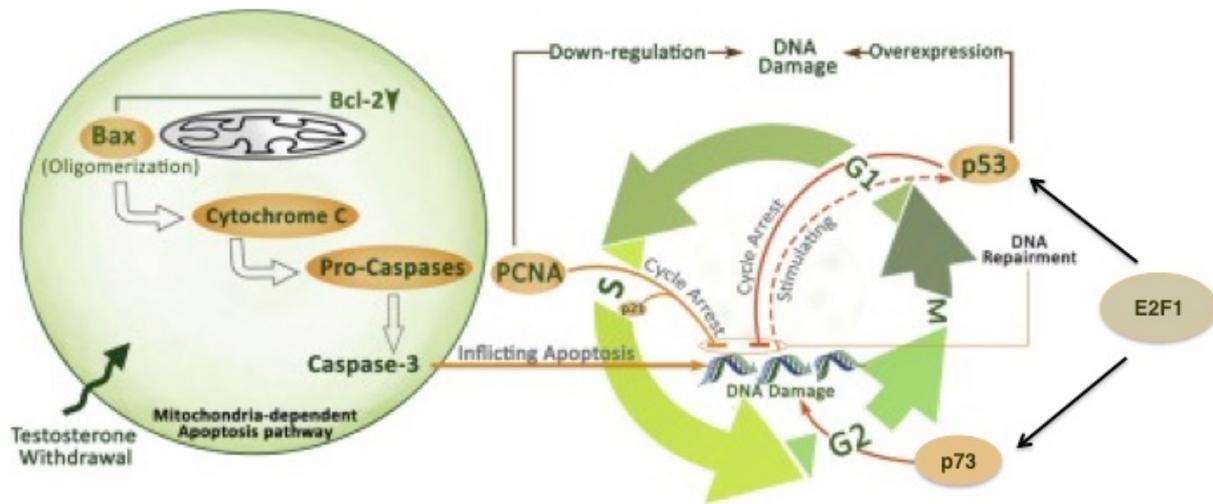
Ces exemples démontrent l'importance de l'axe E2F1-p73 dans la promotion de l'apoptose. Dans un schéma identique, une étude récente a démontré que le transporteur multi-viral ABCG2 est sous contrôle transcriptionnel de E2F1, ce qui contribue également à la chimiorésistance (Rosenfeldt MT, *et al*, 2014).

Enfin, la voie apoptotique intrinsèque est médiée par des protéines situées au niveau mitochondrial. Les protéines BCL-2, BCL-XL et MCL-1, séquestrent les protéines

pro-apoptotiques BAX et BAK pour assurer la survie cellulaire. Cependant, les protéines BH3-only (telles que BIM, NOXA et PUMA) sont mises en évidence lors du stress cellulaire et libèrent BAX/BAK. Ces derniers forment alors des oligomères, provoquant la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et la libération du cytochrome c dans le cytosol. Le cytochrome c active l'APAF1 et déclenche la formation de l'apoptosome, entraînant une auto-activation de la caspase-9 et l'initiation de la cascade des caspases. Cette série d'événements mène finalement à l'apoptose cellulaire (Tait S, *et al*, 2010).

E2F1 et p73 régulent plusieurs protéines dans cette voie, y compris BIM et NOXA. Cette double régulation en amont des protéines BH3-only par E2F1 et p73 est probablement nécessaire pour que les cellules s'engagent pleinement dans l'apoptose, en perturbant ainsi l'équilibre des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques au niveau de la mitochondrie, et marquant ainsi un «point de non retour» (Zhao Y, *et al*, 2005).

Pour conclure, E2F1 augmente également la transcription de APAF1, des caspases 3 et 7 ainsi que de SMAC/DIABLO, qui sont également libérés des mitochondries après perméabilisation de la membrane externe ciblant ainsi les IAP (inhibiteurs de l'apoptose) afin de permettre la dégradation protéasomale de ces derniers (Müller H, *et al*, 2001) (Figure 13).



**Figure 13 : Représentation de la voie pro apoptotique induite par E2F1**

E2F1 va conduire à l'apoptose via plusieurs voies et mécanismes indépendants : via la voie p53, mais également via la voie p73 ou encore la voie apoptotique dite intrinsèque et médiée par les caspases (adapté de Moshari S, *et al*, 2017).

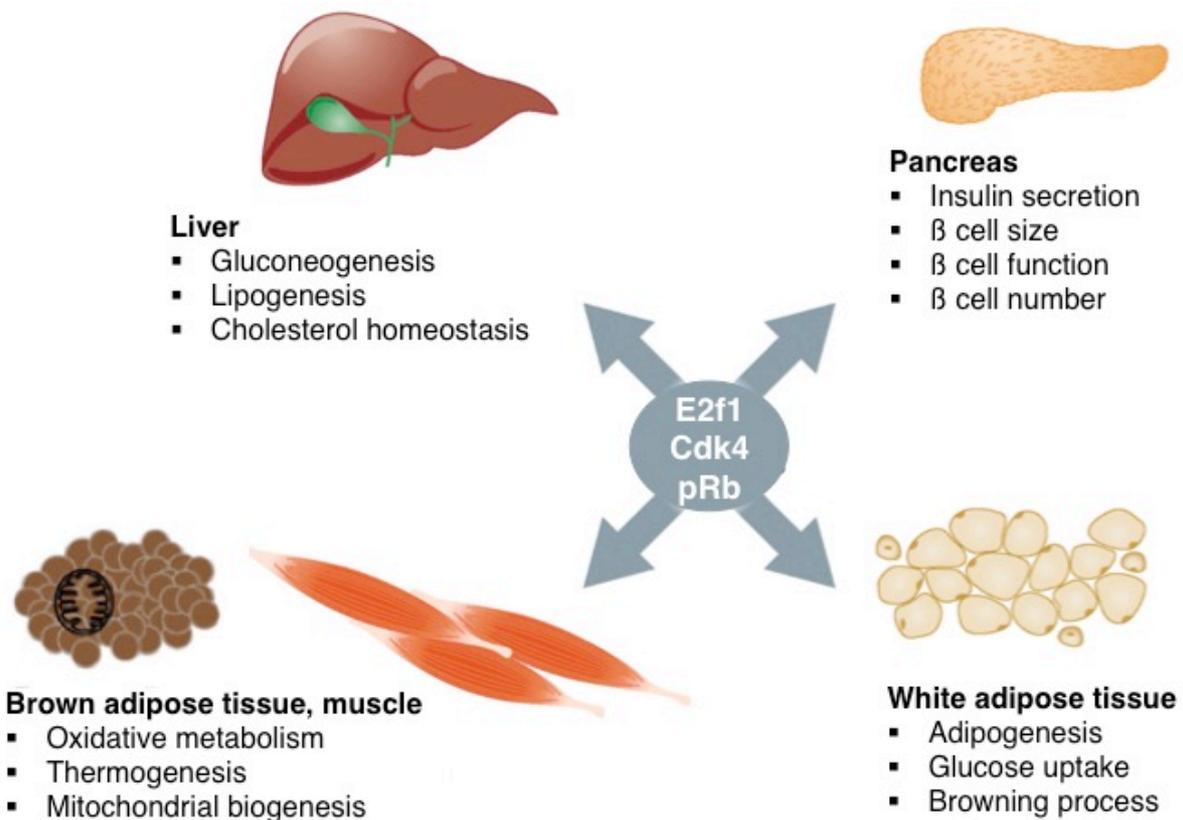
### III. E2F1 et ses rôles métaboliques

En plus de son rôle important au niveau du cycle cellulaire, E2F1 a également été décrit comme ayant un rôle métabolique important. En effet, une délétion génique d'un, des deux ou des 3 activateurs canoniques des E2F, a pu montrer que E2F1 possède un rôle métabolique marqué, en plus de son rôle prolifératif (Wenzel PL, *et al*, 2011). A l'inverse, les effets prolifératifs, en l'absence de E2F1, seront, eux, compensés par E2F2 et E2F3.

Les souris E2F1 <sup>-/-</sup> ont été générées pour la première fois en 1996, dans un contexte d'étude du cancer. Ces souris ont montré dans un premier temps, un excès de lymphocytes T, une atrophie testiculaire ainsi que le développement de nombreuses tumeurs (Yamasaki L, *et al*, 1996).

Cependant, de manière intéressante, l'étude de ce modèle a permis de mettre en évidence la répression transcriptionnelle de l'activité de E2F1 via PPAR  $\gamma$  et C/EBP (CCAAT/enhancer binding proteins). Cette répression conduit à une sortie du cycle cellulaire et à l'entrée en phase de différenciation de certains tissus, tel que le tissu adipeux (Porse BT, *et al*, 2001) (Altiok S, *et al*, 1998) (Fajas L, *et al*, 2002).

Des études plus récentes ont permis de montrer le rôle de E2F1, au niveau du muscle, du tissu adipeux brun, du foie, et enfin du cerveau (Figure 14).



**Figure 14 : E2F1 et ses rôles métaboliques.** Le facteur de transcription E2F1 va jouer des rôles métaboliques marqués, dans le foie, le pancréas, le tissu adipeux brun, mais également au sein du muscle et du tissu adipeux blanc.

### 1. Rôle de E2F1 au niveau du muscle et du tissu adipeux brun

Au niveau du muscle, et du tissu adipeux brun, E2F1, en conditions basales, réprime les gènes clés qui régulent l'homéostasie énergétique et les fonctions mitochondriales. Par conséquent, les souris E2f1  $-/-$  présentent un phénotype oxydatif marqué. Dans ce sens, une association entre E2F1 et pRb est nécessaire pour la répression des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif. Cette répression est atténuée dans un modèle où l'adaptation à la demande d'énergie est nécessaire (mise à jeun, mise au froid). Ainsi, E2F1 permet de passer du métabolisme oxydatif au métabolisme glycolytique suite à des conditions stressantes (Blanchet E, *et al*, 2013). Cette augmentation du métabolisme oxydatif chez les

souris E2F1<sup>-/-</sup> se traduit par une augmentation de la thermogénèse ainsi que de l'activité mitochondriale. En effet E2F1 va être capable de contrôler directement la transcription de gènes comme PDK4, senseur nutritif important et permettant l'inhibition de l'oxydation du glucose via la phosphorylation de la pyruvate déshydrogénase (Sugden et Holness, 2006). Enfin, E2F1 contrôle également directement l'expression de PGC1  $\alpha$ , un co-facteur crucial intervenant dans la biogénèse et la respiration mitochondriale, la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras (Scime A, *et al*, 2005).

## 2. Rôle au sein du tissu adipeux

L'adipogénèse est un système particulier, qui comporte deux événements majeurs: la prolifération des préadipocytes et la différenciation des adipocytes (revue dans Fajas, 2003). Les deux processus sont étroitement régulés et les voies qui existent entre ces derniers déterminent le phénotype adipocytaire final de la cellule.

Après plusieurs cycles d'expansion clonale, les cellules arrêtent leur prolifération et subissent une différenciation terminale des adipocytes. Une activité accrue de E2F a été observée pendant les étapes initiales de ce processus (Richon *et al*, 1997). Par conséquent, l'expression des gènes cibles classiques de E2F1 impliqués dans la prolifération cellulaire, comme la cycline D1, la cycline E ou DHFR, sont augmentés aux premiers stades de l'adipogénèse (Reichert et Eick, 1999).

Le blocage de la réintégration du cycle cellulaire avec un inhibiteur de synthèse d'ADN empêche la différenciation des adipocytes, ce qui suggère qu'une machinerie active du cycle cellulaire est nécessaire pour le processus de différenciation (Richon *et al*, 1997).

En plus de réguler l'entrée dans le cycle cellulaire au cours de la phase d'expansion clonale, il a été démontré un rôle indépendant d'E2F1 dans l'adipogénèse par la régulation de l'expression de PPAR  $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ ). Ce dernier est le régulateur principal de la différenciation des adipocytes (Fajas L, *et al*, 2002a). Ainsi l'absence d'E2F1 empêche l'adipogénèse alors que sa surexpression la stimule.

Les E2F représentent donc le lien entre les voies de signalisation proliférative, le déclenchement de l'expansion clonale et la différenciation des adipocytes terminaux par la régulation de l'expression de PPAR  $\gamma$ .

RB est un régulateur majeur de l'activité E2F1, et sa participation à l'adipogenèse pourrait donc être considérée comme évidente. Il a été montré que RB a un rôle inhibiteur aux premiers stades de la différenciation des adipocytes, par la formation d'un complexe incluant HDAC3 et inhibe ainsi l'expression génétique dépendante de PPAR  $\gamma$  et la différenciation des adipocytes (Fajas L, *et al*, 2002b). Les effets de la cycline D3 sont indépendants du contrôle de la prolifération ou de l'activité E2F1. Les cyclines D3 régulent la masse du tissu adipeux grâce à leur interaction directe avec PPAR  $\gamma$  (Sarruf DA, *et al*, 2005). D'autre part, la cycline D1 semble avoir un rôle négatif sur l'adipogenèse ; elle va réguler négativement la différenciation des adipocytes via PPAR  $\gamma$  par le recrutement de HDAC dans la région promotrice des gènes cibles de ce dernier (Fu M, *et al*, 2005).

Enfin, il est également intéressant d'étudier dans ce contexte, les régulateurs directs du cycle cellulaire. En effet, des études d'association à l'échelle du génome (GWAS) ont établi le locus CDKN2A/B en tant que point important influençant le risque génétique dans différentes maladies cardio-métaboliques (Voight BF, *et al*, 2010).

Le locus CDKN2A humain code pour p16INK4a une protéine inhibitrice de CDK (CDKI) et la protéine régulatrice p53 p14ARF (p19ARF chez la souris), alors que le gène CDKN2B code pour un autre CDKI, p15INK4b. Les produits du locus CDKN2A/B sont impliqués dans l'apoptose, la sénescence et le vieillissement. P16 et p15 sont des CDKi empêchant la liaison de CDK4/6 à Cycline D, p14ARF, lui, exerce principalement son activité antiproliférative par l'inhibition de MDM2, une ubiquitine-ligase qui module l'activité du suppresseur de tumeur p53 (Hannou SA, *et al*, 2015).

La voie CDKN2A/B va donc être impliquée dans le métabolisme de plusieurs façons et notamment en agissant sur la différenciation des adipocytes (Svensson PA, *et al*, 2014).

Au cours de ma thèse, j'ai également étudié le rôle de ce régulateur au sein du tissu adipeux. Ainsi, nous avons pu montrer que la déficience de CDKN2A protège les

souris contre l'obésité induite par un régime riche en graisse, en augmentant les dépenses énergétiques et la thermogenèse, via l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. La déficience en *Cdkn2a* est associée à une augmentation de l'expression de marqueurs de graisse brune / beige dans le tissu adipeux inguinal et améliore la respiration des cellules adipeuses primaires. *Cdkn2a* va ainsi moduler les gènes impliqués dans la production d'énergie et le métabolisme lipidique, grâce à l'activation des voies de signalisation de la protéine kinase A (Pka), *Ppargc1a* et *Prdm16*, régulateurs clés du brunissement des adipocytes. (manuscrit en annexe de cette thèse)

### 3. Rôle de *E2F1* au niveau du foie

Au niveau du foie, l'utilisation de différents modèles de souris invalidées pour *E2F1* a permis de montrer que ce facteur intervenait principalement dans la régulation de la glycolyse et de la lipogenèse hépatique. En effet, *E2F1* va contrôler directement l'expression de facteurs de transcriptions comme ChREBP (carbohydrate-responsive element binding protein) et SREBP-1c (sterol regulatory element binding transcription factor 1c), ainsi que les enzymes de la lipogenèse *de novo* tel que *Fasn*, *Scd1* ou *Acaca*. (*Fasn* : fatty acid synthetase, *Scd1* : stearyl-CoA desaturase, *Acaca* : acétyl-CoA carboxylase) (Denechaud PD, *et al*, 2016). Enfin, *E2F1* participe également à l'homéostasie du cholestérol au niveau du foie en régulant l'absorption du cholestérol cellulaire via l'activation transcriptionnelle directe de PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin 9), une enzyme qui favorise la dégradation des récepteurs des lipoprotéines de faible densité (LDLR) (Lal Q, *et al*, 2017).

### 4. Rôle de *E2F1* au niveau du cerveau

Au niveau du cerveau, et en plus précisément au niveau de l'hypothalamus (centre de contrôle de la satiété) un régime riche en graisse couplé à l'activation pharmacologique de l'AMPK, induit la phosphorylation de RB et la dé-répression du gène cible *E2F1* dans les neurones ARC situés au niveau du noyau arqué. Au sein

de cette structure, la suppression de RB dans les neurones POMC (ayant une fonction anorexigène) induit la dé-répression de E2F1, la réintégration du cycle cellulaire, l'apoptose et par conséquent un syndrome d'hyperphagie-obésité-diabète. Ces défauts peuvent être corrigés par suppression combinée de RB/E2F1. En revanche, la suppression de RB dans les neurones AGRP/NPY antagonistes (orexigène) ne montre aucun effet. Ainsi, l'axe RB/E2F1 est décrit comme un mécanisme de suppression de l'obésité dans les neurones ARC POMC (Lu Z, *et al*, 2013).

### 5. Rôle de E2F1 dans le pancréas

La perturbation de E2f1 a mis en évidence son rôle dans la régulation de l'homéostasie du glucose. E2f1 va contrôler l'expression de précurseurs endocriniens tels que Pdx1 et Ngn3, jouant ainsi un rôle direct dans le développement pancréatique (Kim and Rane, 2011). En effet, les souris E2f1<sup>-/-</sup> ont une diminution de la taille du pancréas, en raison d'une diminution de la croissance pancréatique postnatal.

D'autre part, E2F1 est également fortement exprimé dans les cellules  $\beta$  pancréatiques adultes, ce qui suggère que, en plus de contrôler le nombre de cellules  $\beta$ , cette protéine a un rôle dans la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques (Fajas J, *et al*, 2004) (Annicotte JS, *et al*, 2009).

De plus, de manière intéressante, les souris E2f1<sup>-/-</sup> montre une variation de la masse des cellules endocrines, avec une diminution du nombre de cellules  $\beta$  pancréatiques pour une augmentation concomitante du nombre de cellules  $\alpha$ . Ces observations suggèrent une implication de la voie E2f1 dans le maintien d'identité ou dans la voie de différenciation de ces cellules endocrines.

De plus, il a été récemment démontré, à la fois *in vitro* et *in vivo*, que E2F1 régule directement l'expression de Kir6.2, un composant clé du canal KATP impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les cellules  $\beta$  pancréatiques. L'expression de Kir6.2 est diminuée dans le pancréas de souris E2f1<sup>-/-</sup>, ce qui entraîne des défauts de sécrétion d'insuline chez ces souris (Figure 14).

Dans cette étude il a été montré que l'activité transcriptionnelle de E2F1 est régulée par le glucose et l'insuline à travers l'inactivation dépendante de CDK4 de la protéine pRB (Annicotte JS, *et al*, 2009).

Ces effets sont spécifiques à E2F1, alors que l'expansion des cellules  $\beta$  peut être compensée par E2F2. Les souris double mutantes pour E2f1/E2f2 présentent un diabète dû à un défaut d'insuline. En effet, tandis que E2F1 va être responsable des effets métaboliques, E2F2 va compenser les effets prolifératifs en absence de E2f1 (Iglesias I, *et al*, 2004) (Li FX, *et al*, 2003).

Les effets prolifératifs et métaboliques de l'insuline sur les cellules  $\beta$  semblent être médiés par une augmentation de l'activité CDK4 et donc de l'activité transcriptionnelle de E2F1 subséquente. Cela suggère également que la prolifération cellulaire et les réponses métaboliques sont intimement liées et régulées par les mêmes facteurs en amont. En accord avec cette hypothèse, les souris transgéniques caAKTTg qui sur-expriment spécifiquement une forme constitutivement active d'Akt dans les cellules  $\beta$  montrent une plus grande masse de cellules  $\beta$  et une augmentation du taux de prolifération avec pour conséquence une augmentation de la taille des cellules  $\beta$ . Fait intéressant, ces effets sont abrogés lorsque des souris sont élevées dans un fond génétique CDK4  $-/-$  démontrant que l'AKT induit la prolifération des cellules  $\beta$  d'une manière dépendante de CDK4 (Fatrai S, *et al*, 2006).

La voie qui mène à l'activation du Cdk4-RB-E2F1 est cependant encore inconnue. Une hypothèse pourrait conduire à la voie mTOR, essentielle à la transduction des signaux de disponibilité des éléments nutritifs (Wullschleger S, *et al*, 2006). De manière intéressante, le phénotype métabolique des souris E2F1 $-/-$  rappelle le phénotype des souris portant des mutations inactivantes pour le substrat mTOR S6K1 (Aguilar V, *et al*, 2007) (Um SH, *et al*, 2004).

Pour disséquer précisément les mécanismes de cette voie au sein du pancréas, compte tenu des nombreux effets sur les tissus périphériques, il serait crucial d'effectuer la délétion spécifique d'E2F1 au sein de la cellule  $\beta$  afin de discerner les

effets propres à ce dernier. Le pancréas est un organe clé dans l'apparition du DT2 étant donné qu'il est le seul organe du corps humain possédant des cellules sécrétrices d'insuline ; les cellules  $\beta$  pancréatiques. E2F1 pourrait donc ainsi apparaître comme un acteur clé dans l'apparition de la maladie.

#### IV. Objectifs de mon travail de thèse

Comme décrit précédemment, le dysfonctionnement des cellules  $\beta$  joue un rôle majeur dans la pathogenèse du DT2. La restauration de la masse et de la fonction des cellules  $\beta$  est donc devenue un domaine de recherche intensif. Ainsi les phénomènes de dédifférenciation des cellules  $\beta$  et / ou la transdifférenciation dans des sous-types cellulaires alternatifs représentent des mécanismes clés contribuant à la perte de l'identité des cellules  $\beta$  et de la défaillance de ces cellules pendant le DT2. Des données préliminaires du laboratoire ont démontré une diminution de la masse de cellules  $\beta$  et une augmentation concomitante du nombre de cellules  $\alpha$  chez les souris déficientes pour le régulateur du cycle cellulaire E2f1.

Le but de ce travail était donc de comprendre le rôle joué par E2F1 dans la plasticité et l'adaptation des cellules  $\beta$ . Nous avons émis l'hypothèse que la perte spécifique de l'expression ou de l'activité d'E2F1 pourrait contribuer au dysfonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques entraînant un défaut de sécrétion d'insuline par dédifférenciation des cellules  $\beta$ , favorisant ainsi la sensibilité au DT2. Dans ce sens, l'objectif de ce travail était de décoder la fonction cellulaire spécifique d'E2f1 et ses mécanismes sous-jacents dans les cellules  $\beta$  pancréatiques.

Pour répondre à ces questions, nous avons développé des modèles de souris déficientes pour *E2f1* spécifiquement dans la cellule  $\beta$ , effectué des expériences de traçage *in vivo* de ces cellules et enfin généré un modèle de surexpression spécifique de E2F1. Des études fonctionnelles (utilisant des lignées de cellules  $\beta$  de rongeurs ainsi que des îlots isolés) ont été utilisées pour disséquer les mécanismes régulés par E2F1 impliqués dans le contrôle de l'identité des cellules  $\beta$ .

## V. Matériel et Méthodes

### I. Anticorps

Les anticorps anti-INS (ab7842), anti-glucagon (ab11909), anti-EF21 (KH95) ont été fournis par Abcam. L'anticorps anti-E2F1 (clone C20, pour immunofluorescence et pour CHIP) ainsi que anti-actine (sc-1616) proviennent de Santa Cruz, les anti-IgG (ab37415 CHIP grade) de Cell Signaling. L'anticorps anti-ARX nous a été donné par le Dr. P Collombat.

### II. Expérimentations animales

Les souris ont été maintenues en élevage conformément aux directives de l'Union Européenne relatives à l'utilisation d'animaux de laboratoire. Toutes les expériences *in vivo* ont été effectuées conformément aux directives éthiques françaises pour les études d'animaux expérimentaux (accord de l'établissement n°A59-35015, Autorisation pour l'expérimentation animale n°59-350294, approbation du projet par notre comité éthique local n°CEEA 482012 et 492012 puis des dossiers APAFIS par le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche en 2017).

Les souris *E2f1* floxées ( $E2f1^{L2/L2}$ ) ont été générées par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires 129Sv (ES). Le caryotype a été vérifié et plusieurs clones de cellules ES correctement ciblés ont été injectés dans des blastocystes de fond génétique C57BL/6J. Ces blastocystes ont été transférés dans des femelles pseudo-gestantes, entraînant une descendance chimérique qui a été accouplée à des souris femelles C57BL/6J exprimant la recombinase Flp sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus (Rodriguez *et al*, 2000). Les descendants, qui ont transmis l'allèle muté, dans lesquels le marqueur de sélection a été excisé, et qui ont perdu le transgène Flp (souris  $E2f1^{L2/WT}$ ) ont été sélectionnés et rétro-croisés pendant plus de dix générations avec des souris C57BL/6J. Les souris  $E2f1^{L2/L2}$  ont ensuite été accouplées avec des souris portant le promoteur d'insuline II de rat (RIP)-Cre (Herrera, 2000) puis ensuite inter-croisées pour générer des souris  $RIPcre^{Tg/0} / E2f1^{L2/L2}$  mutantes pures.

Les souris surexprimant la forme humaine de E2f1 dans la cellule  $\beta$  (E2f1<sup>overexp</sup>) sont issus de Grouwels, et al, 2010. Les souris possédant le promoteur de l'insuline de rat (RIP)Cre ont été croisées avec des souris R26E2F1 possédant la cassette d'expression conditionnelle Rosa26-loxP-LacZ-loxP-hE2F1 (Scheijen B, et al, 2003). Les souris hétérozygotes ont été croisées afin d'obtenir des souris homozygotes RIPcre transgénique R26E2F1. Les souris simple et double transgéniques sont des souris issues d'une même portée.

Toutes les expériences ont été réalisées avec des souris mâles. Les souris ont été placées sous un cycle de lumière / obscurité de 12 heures et ont reçu une nourriture d'entretien (A04; Safe). Des expériences de phénotypage métabolique ont été effectuées selon les protocoles EMPRESS. Les tests intra-péritonéaux (ipGTT) et oraux de tolérance au glucose (OGTT) et à l'insuline (ITT) ont été effectués comme décrit précédemment (Annicotte et al, 2009) sur des animaux adultes mis à jeun 16 heures pour l'ipGTT et l'OGTT et 5 heures pour l'ITT.

Les mesures de glycémie a été réalisées avec un Accu-Check Performa (Roche Diagnostics). Les niveaux d'insuline circulant ont été dosés avec le kit ELISA Ultrasensitive Insulin (Mercodia).

### III. Immunofluorescence, Immunohistochimie et Morphométrie

L'immunofluorescence et l'immunohistochimie ont été réalisées comme décrit précédemment (Annicotte et al, 2009, Blanchet et al, 2011). Les tissus pancréatiques ont été fixés dans du formol à 10%, incorporés dans de la paraffine et sectionnés à 5  $\mu$ m. Les tissus pancréatiques issus des souris Tomato ont été fixés dans du formol 10% et incorporés dans de l'OCT et sectionnés à 10  $\mu$ m.

Pour les analyses de microscopie par immunofluorescence, après le démasquage d'antigène en utilisant un tampon citrate, des coupes pancréatiques fixées au formol de 5  $\mu$ m ont été incubées avec les anticorps indiqués.

La coloration par immunofluorescence a été révélée en utilisant des anticorps secondaires Alexa (Life Technologies) conjugués à la fluorescéine-isothiocyanate anti-lapin (pour E2F1) ou Alexa anti-cochon d'inde (pour la coloration de l'insuline), et

enfin un Alexa anti-souris (pour le glucagon) Les noyaux ont été colorés avec le Hoechst.

Pour l'analyse morphométrique, cinq à dix animaux de chaque génotype ont été analysés et les images ont été traitées et quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ par un expérimentateur en aveugle. Les sections de pancréas humains ont été obtenues chez Biochain.

#### IV. Études sur îlots pancréatiques isolés

Le tissu pancréatique humain a été récolté à partir de donneurs humains adultes non diabétiques ou DT2. L'isolement et la culture des îlots ont été réalisés comme décrit précédemment (Kerr-Conte et al., 2010). Concernant les études sur les îlots de souris, les pancréas ont été digérées par collagénase de type V (C9263, 1,5 mg / ml) pendant 10 minutes à 37°C selon le protocole établi au laboratoire (Annicotte et al., 2009). Après digestion et séparation dans un milieu à gradient de densité, les îlots sont purifiés et récupérés à la main sous un microscope.

Pour les tests de sécrétion d'insuline, environ 30 îlots sont exposés à 2,8 mM ou à 20 mM de glucose dans du tampon HEPES de bicarbonate de Krebs-Ringer contenant 0,5% de BSA sans acide gras. L'insuline libérée après 1 heure d'incubation en glucose 20mM est mesurée en utilisant le kit ELISA Ultrasensitive Insulin (Merckodia). Les données sont exprimées en pourcentage du contenu total en insuline.

Pour l'ARNm et la quantification des protéines, les îlots sont isolés comme décrit ci-dessus et congelés instantanément pour un traitement ultérieur.

#### V. Culture cellulaire, transfections, infections lentivirales et traitements pharmacologiques.

Les cellules Min6 ont été cultivées dans du DMEM (Gibco) avec 15% de sérum bovin foetal, 100 mg/ml de pénicilline-streptomycine et 55 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les cellules ont été transfectées avec le siRNA ciblant E2f1 ON-TARGETplus SMARTpool (Thermo Scientific) et du siRNA contrôle murin en utilisant le Dharmafect1 (GE Dharmacon).

Les îlots de souris et les cellules Min6 ont été traités comme décrit précédemment (Wali et al., 2014) avec HLM (10  $\mu$  M) pendant 48 heures. La transfection transitoire a été réalisée à l'aide de Lipofectamine 2000 (Life Technologies) suivant les instructions du fabricant.

Pour les infections lentivirales, les Min6 sont infectées à l'aide de l'hexadiméthrine bromide (8  $\mu$  g/mL) par des particules lentivirales contenant des shRNA (short hairpin RNA) contrôle ou ciblant E2F1 murin (MISSION SHC0002V ; MISSION shRNA – E2F1, SIGMA). 2 clones ont été testés, ciblant chacun une séquence différente du gène E2F1. 48h après infection, les cellules sont sélectionnées à la puromycine afin d'obtenir une expression stable des shRNA.

Les analyses de Luciferase ont été effectuées 48 heures après la transfection et normalisées à l'activité de la  $\beta$ -galactosidase. Les données expérimentales présentées sont issues de moyennes d'au moins trois expériences expérimentales indépendantes.

#### VI. Immunoprécipitation de la chromatine.

Les cellules sont fixées par traitement à 37°C pendant 10 minutes avec une solution contenant 1% de formaldéhyde. La fixation est stoppée par ajout de glycine 0,125M. Après lyse cellulaire, la chromatine est fragmentée en utilisant le Bioruptor 200 (Diagenode)

La chromatine purifiée est placée dans 100  $\mu$ L de tampon de dilution et incubée dans 1-3  $\mu$ g d' IgG (mouse IgG, sc-2025, vector labs, contrôle négatif), mock (tampon de lyse uniquement), d'anti acétyl lysine ou d'anticorps anti-E2f1 sur la nuit. L'ADN est ensuite purifié sur colonne à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR clean up (Macherey Nagel) puis des analyses en qPCR sont réalisées.

#### VII. Analyse d'expression génique

L'ARN total a été extrait de cellules et de tissus en utilisant le réactif TRIzol (Life Technologies) comme décrit précédemment (Annicotte *et al*, 2009; Blanchet *et al*,

2012). L'expression de l'ARNm a été mesurée après transcription inverse et qPCR en temps réel à l'aide du FastStart SYBR Green master mix (Roche) selon les recommandations du fabricant et les oligonucléotides spécifiques du gène.

Les résultats de qPCR de la souris ont été normalisés aux niveaux d'ARNm de la cyclophiline endogène, et les résultats humains ont été normalisés à la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP). Les résultats sont exprimés en tant que niveau relatif d'ARNm du gène spécifique via la formule  $2^{-\Delta Ct}$ .

#### VIII. Extraction des protéines et analyse par immuno-blots

L'immunoblot a été réalisé comme décrit précédemment (Blanchet *et al*, 2012). Les cellules sont lavées à l'aide de PBS froid et la lyse est effectuée en utilisant 50 mM de Tris-HCl (pH 8), 137 mM de NaCl, 10% de glycérol, 1% de NP-40 ainsi que des inhibiteurs de phosphatase, de protéases et de désacétylase (Sigma-Aldrich) sur glace. Le Western Blot est effectué en utilisant 40  $\mu$  g de protéines chargées sur un gel préfabriqué SDS-PAGE (Bio-Rad). Après l'électro-transfert, la membrane est bloquée pendant 1 heure à température ambiante avec du lait non gras 5% dans du tampon Tris-Tween (TTBS) à 0,1%. Les membranes sont ensuite incubées pendant une nuit à 4 ° C avec les anticorps primaires dans un tampon de blocage contenant 5% de lait non gras à la dilution spécifiée par les fabricants.

Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à l'enzyme de la peroxydase. La visualisation des bandes immuno-réactives est réalisée en utilisant le système de détection de la chimio-luminescence plus Western Blot (GE Healthcare).

La quantification de l'intensité du signal protéique est effectuée par densitométrie volumique à l'aide du logiciel ImageJ 1.47t (NIH).

#### IX. Données sur l'expression des îlots humains et études de corrélation

Pour identifier les ensembles de données transcriptomiques à partir des îlots pancréatiques humains, l'analyse GEO du NCBI est effectuée en utilisant " islet humain T2D " comme mots-clés et filtrée avec " Datasets' Trois ensembles de données ont été obtenus et deux ont été sélectionnés en fonction du nombre plus

élevé d'échantillons (GEO: GSE88778; Van Der Meulen T, *et al*, 2017; et GEO: GSE20966; Marselli *et al*, 2010). Les jeux de données ont été téléchargés à partir du GEO et analysés avec Gene Set Enrichment Analysis (GSEA; <http://software.broadinstitute.org/gsea/>) comme décrit précédemment (Ryu *et al*, 2014).

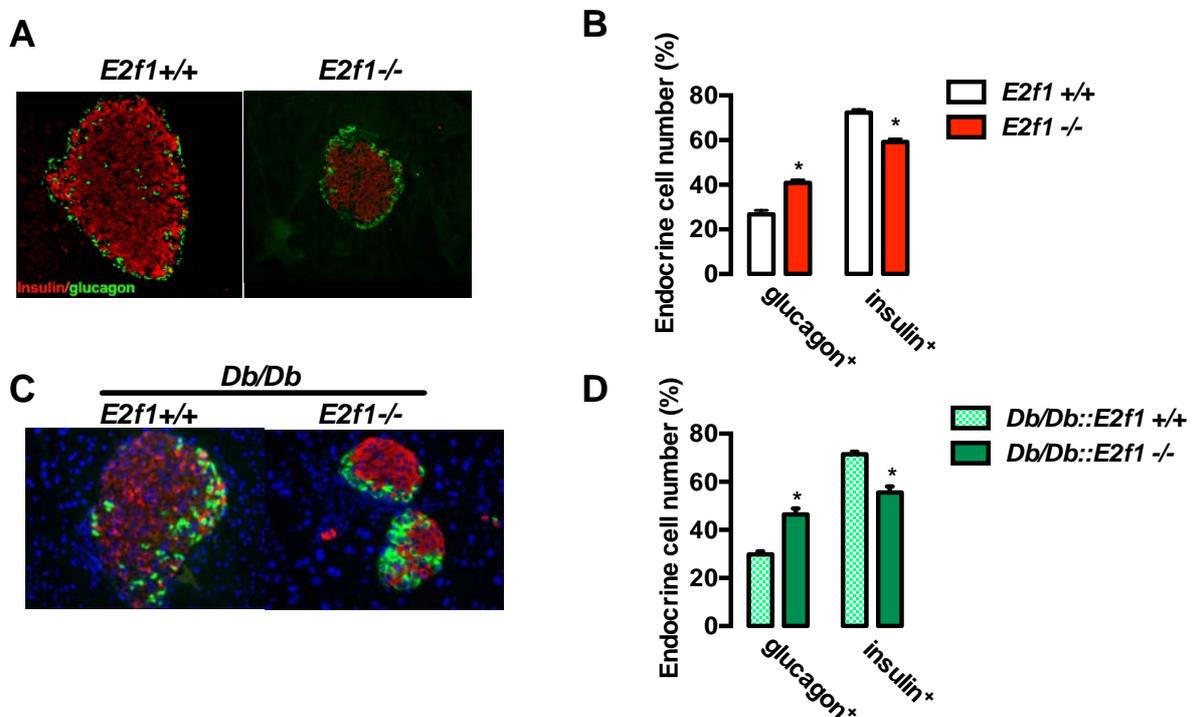
#### X. Analyses statistiques

Les données sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant un test de Student, un ANOVA one-way avec une correction de Bonferroni, ou un ANOVA two-way avec correction de Bonferroni, selon les cas, à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les différences sont considérées statistiquement significatives à  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , et \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## VI. Résultats

### I. Partie 1 : E2F1 permet le maintien d'identité de la cellule $\beta$ pancréatique.

Des travaux précédents du laboratoire ont été effectués sur un modèle de souris d'inactivation globale pour *E2f1*. Suite à des expériences d'immuno-histochimie (IHC) de marquage des cellules insuline<sup>+</sup> et glucagon<sup>+</sup>, nous avons démontré que ces souris possédaient un ratio de cellules endocrines modifié avec une diminution du nombre de cellules insuline<sup>+</sup> et une augmentation du nombre de cellules glucagon<sup>+</sup> (Figure 15A,B). Ce résultat a également été confirmé dans un modèle de souris diabétiques *Db/Db* (Figure 15C) où l'expression de *E2f1* a été invalidée (Figure 15D).



**Figure 15 : L'invalidation d'E2F1 conduit à une variation du pool des cellules endocrines.** IHC sur les souris invalidées pour E2F1, l'insuline est marquée en rouge et le glucagon en vert (A) Quantification des cellules insuline<sup>+</sup> et glucagon<sup>+</sup> dans le modèle E2F1<sup>-/-</sup> (B). IHC sur les souris invalidées pour E2F1, l'insuline est marquée en rouge et le glucagon en vert, dans un fond génétique db/db (C) Quantification des cellules insuline<sup>+</sup> et glucagon<sup>+</sup> dans le modèle db/db E2F1<sup>-/-</sup> (D).

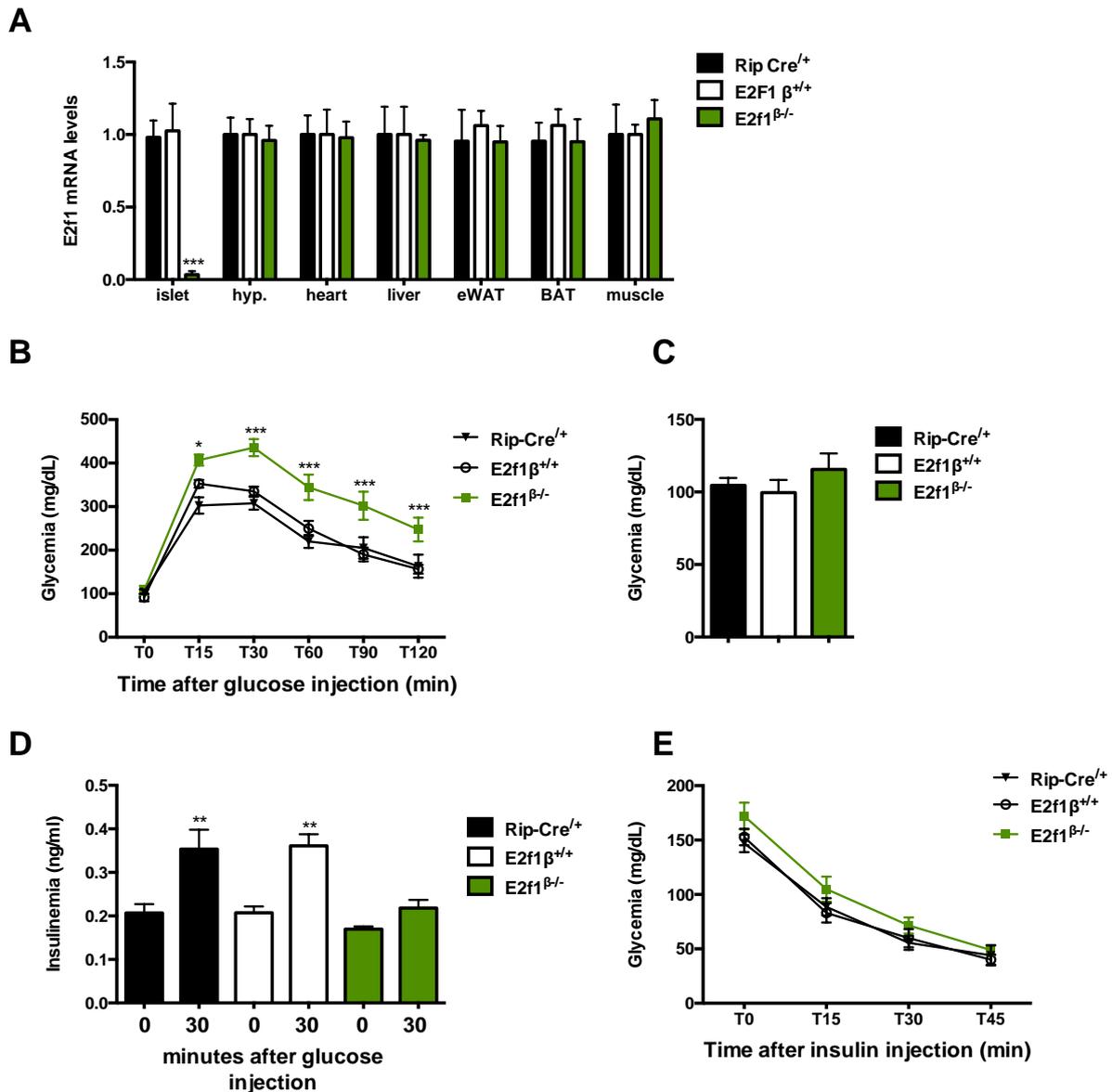
Ces observations tendent à montrer un rôle pour *E2f1* dans le devenir des cellules endocriniennes ou le maintien de leur identité. Ainsi afin de s'affranchir des effets liés à l'invalidation globale d'E2f1 au sein de l'ensemble des organes périphériques, et

comprendre le rôle précis d'E2f1, l'invalidation spécifique de ce facteur au sein de la cellule  $\beta$  a été effectuée chez la souris.

*1. Les souris déficientes pour E2F1 spécifiquement dans la cellule  $\beta$  pancréatique (E2F1  $\beta^{-/-}$ ) montrent un défaut fonctionnel du pancréas.*

Après vérification de l'invalidation spécifique de E2F1 dans notre modèle (Figure 16A), des tests métaboliques ont été effectués afin d'étudier le lien entre E2F1 et l'homéostasie du glucose.

L'invalidation de E2f1 dans la cellule  $\beta$  pancréatique entraîne une intolérance au glucose (Figure 16B), sans différence significative de la glycémie à t0 après 16h de jeûne (Figure 16C). Cette gluco-intolérance est corrélée à une incapacité de ces souris à sécréter de l'insuline après 30 minutes après un bolus de glucose (Figure 16D). Les souris E2F1  $\beta^{-/-}$  ne montrent pas de différence significative de la sensibilité à l'insuline en comparaison aux souris contrôles (Figure 16E).



**Figure 16 : Les souris E2F1 β<sup>-/-</sup> montrent un défaut fonctionnel des cellules β .** PCR quantitative sur les différents tissus issus des souris E2F1 β<sup>-/-</sup> (A). IPGTT suite à l'injection d'une solution glucosée à raison de 2g/kg (B). Glycémie des différents modèles murins après 16h de jeûne, correspondant à la glycémie t0 post IPGTT (C). Dosage de l'insuline sérique murine à t0 et t30 issue de l'IPGTT (D). Test de tolérance à l'insuline, injection d'une solution d'insuline à 0,75U/kg (E).

Suite à l'apparition d'un phénotype marqué chez les souris E2F1 β<sup>-/-</sup> lié à un défaut fonctionnel du pancréas, l'inactivation génique de E2F1 a été effectuée dans une ligne cellule β pancréatique (Min6) afin de décrypter les différents liens moléculaires sous-jacents.

## 2. L'invalidation de E2F1 dans la lignée cellulaire Min6 montre une régulation directe de E2F1 sur le facteur de transcription spécifique des cellules a pancréatique Arx.

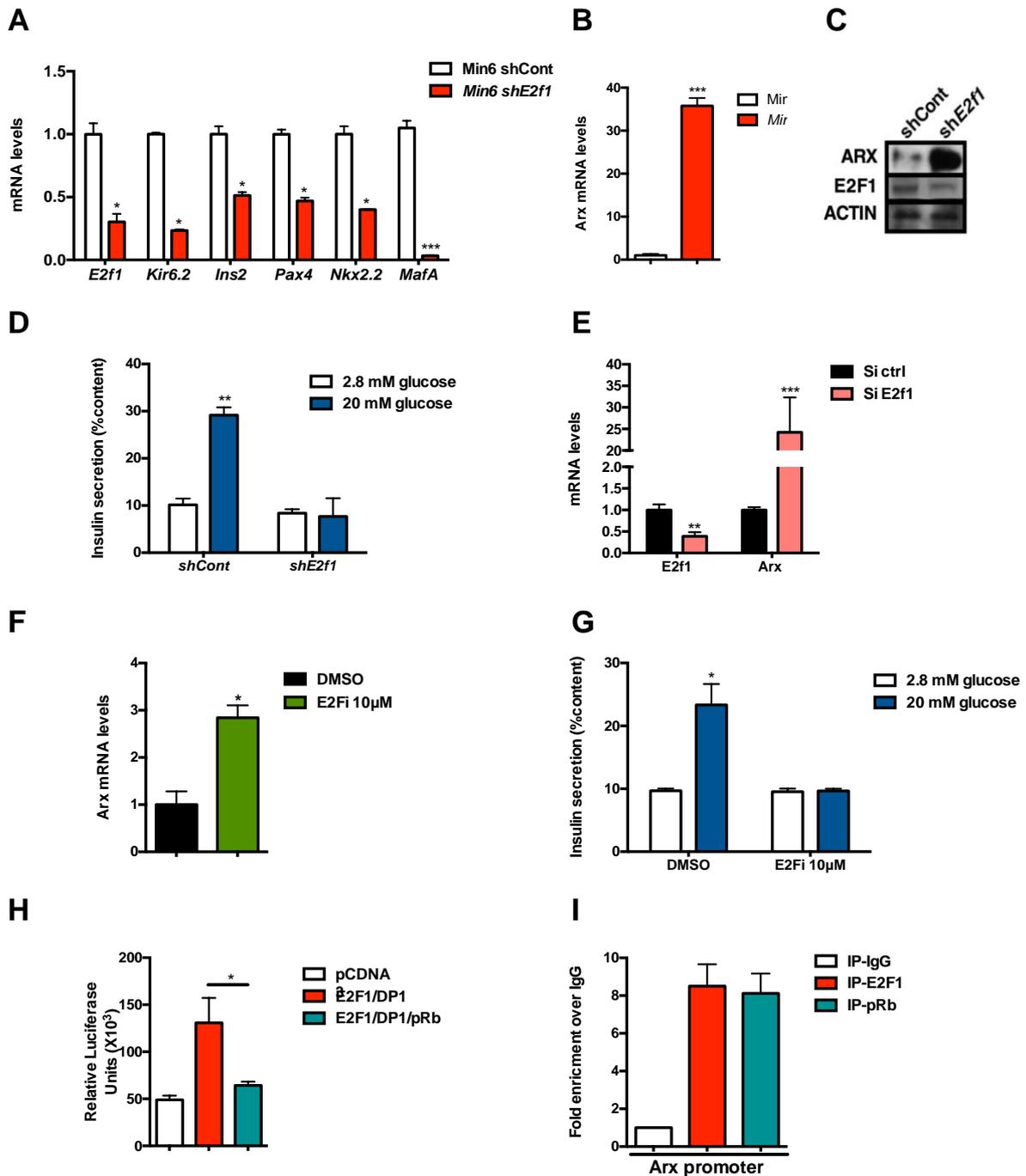
Une première approche d'invalidation de E2F1 dans la lignée Min6 a été effectuée par transduction de particules lentivirales contenant une construction « short hairpin » dirigée contre E2f1 (shE2f1) et une construction contrôle (shcont) puis création d'une lignée stable invalidée pour notre gène d'intérêt. Au niveau génique, l'invalidation d'*E2f1* va conduire à une diminution de l'expression des gènes nécessaires au le maintien de l'identité de la cellule  $\beta$  tels que *Ins*, *Pax4* ou encore *Nkx2.2* (Figure 17A). De manière surprenante, l'invalidation de *E2f1* va conduire à la réexpression dans la lignée  $\beta$  Min6 du gène spécifique de la cellule  $\alpha$ , *Arx* (Figure 17B). Ces observations sont confirmées au niveau protéique par Western Blot (Figure 17C). Enfin, pour confirmer la perte de fonction précédemment observée chez la souris, une expérience d'insulino-sécrétion en réponse au glucose (GSIS) a été effectuée. On constate l'incapacité de nos cellules à sécréter de l'insuline en condition haut glucose, en comparaison au cellules contrôles, et confirmons ainsi le phénotype murins (Figure 17D).

Dans un second temps, afin de confirmer ces observations *in vitro*, deux autres méthodes visant à diminuer l'expression de E2F1 furent utilisées. La première, via l'utilisation d'un *siRNA* dirigé contre notre gène d'intérêt démontre une augmentation de l'expression d'*Arx* suite à la diminution concomitante d'expression de E2F1 dans notre lignée Min6, confirmant les résultats précédents (Figure 17E).

Enfin, l'utilisation d'un inhibiteur dirigé contre E2F (Ma Y, *et al*, 2008) montre également un effet de dé-répression d'*Arx* au sein de ces cellules  $\beta$  murines (Figure 17F), ainsi qu'une perte de leur fonction sécrétoire (Figure 17G). L'ensemble de ces résultats converge donc vers l'hypothèse que la diminution de l'expression d'E2F1 dans la cellule  $\beta$  pancréatique murine conduit à une augmentation de l'expression d'*Arx*. Afin de déterminer si E2F1 peut réguler directement l'expression d'*Arx* au niveau de son promoteur, des expériences de transfection transitoire utilisant le gène de la luciférase cloné en aval du promoteur d'*Arx* (*Arx-luc*) ont été effectuées.

Nos résultats montrent que la transfection transitoire de l'hétérodimère E2F1/DP1 entraîne une augmentation de l'activité du promoteur Arx-Luc, et que la transfection de cet hétérodimère associée à celle de pRb conduit à la répression de l'activité Arx-luc (Figure 17H). On peut donc déduire que E2F1 est capable de moduler directement l'activité du promoteur d'Arx et d'en réguler l'expression.

Pour confirmer cette observation, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont été réalisées dans la lignée Min6. On constate ainsi une fixation de E2F1, mais également de son répresseur pRb, sur le promoteur d'Arx (Figure 17I). On peut donc en conclure que le complexe E2F1/pRb se fixe au promoteur d'Arx dans la cellule Min6, permettant ainsi sa répression.



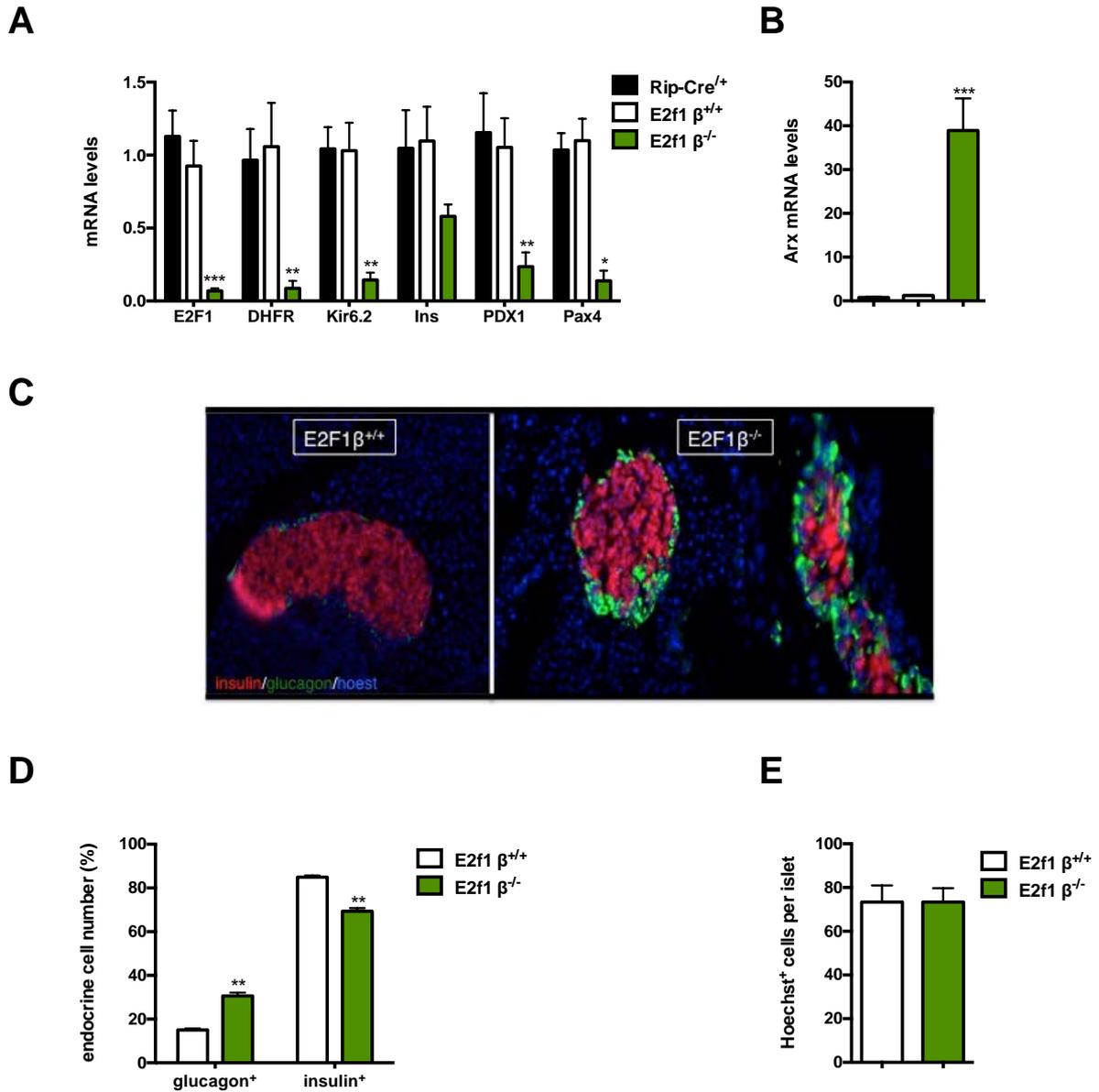
**Figure 17 : *In vitro* E2F1 contrôle de manière directe l'expression d'Arx.** PCR quantitative suite à l'inactivation de E2F1 par shRNA dans la lignée Min6 (A,B). Western blot sur la lignée stable shE2F1 (C). GSIS sur la lignée shE2F1 (D). PCR quantitative suite à l'inactivation de E2F1 par siRNA dans la lignée Min6 (E). PCR quantitative suite à l'utilisation d'un inhibiteur d'E2F sur la lignée Min6 (F). GSIS sur la lignée Min6 traitées à l'aide de l'inhibiteur E2Fi (G). Test de luciférase couplé au promoteur d'Arx, suite à la transfection de plasmide contenant, E2F1, DP1 et pRb (H). CHIP sur la lignée Min6 après immuno-précipitation d'E2F1 et de pRb (I).

Afin d'étudier le rôle de E2F1 dans le maintien de la répression d'Arx au sein de la cellule  $\beta$  dans un contexte *in vivo*, des études ont été menées dans notre modèle murin E2F1  $\beta^{-/-}$ .

*3. Les souris E2F1  $\beta^{-/-}$  montrent une diminution importante de l'expression des gènes spécifiques de la cellule  $\beta$  ainsi qu'un changement morphologique au sein de l'îlot.*

Les îlots de nos souris E2F1  $\beta^{-/-}$  ont été isolés, permettant l'étude de l'expression des différents gènes importants pour l'identité. Ainsi, on constate au sein de l'îlot de ces souris, une diminution des gènes de l'identité de la cellule  $\beta$  tels que Pdx1 ou Pax4 (Figure 18A) ainsi qu'une augmentation d'Arx (Figure 18B).

Cette variation génique au sein de l'îlot va entraîner une variation du nombre de cellules endocriniennes. En effet, après IHC sur les souris E2F1  $\beta^{-/-}$ , on constate une diminution des cellules insuline<sup>+</sup> pour une augmentation des cellules glucagon<sup>+</sup> (Figure 18D). De plus, ces cellules glucagon<sup>+</sup> additionnelles vont venir s'immiscer au centre de l'îlot, ce qui représente un changement morphologique important. En effet, chez la souris, les cellules à glucagon sont normalement cantonnées à la périphérie de l'îlot (Figure 18C). A noter également que cette modification de la masse endocrine n'a pas d'impact sur la taille de l'îlot et sur le nombre total de cellule qui le compose (Figure 18E).



**Figure 18 :** In vivo, l'invalidation d'E2F1 conduite à un changement de la masse endocrine ainsi qu'à une modification de la morphologie de l'îlot. PCR quantitative sur les îlots isolés des souris E2F1  $\beta^{-/-}$  (A, B). IHC sur les souris E2F1  $\beta^{-/-}$ , les cellules insuline<sup>+</sup> sont marquées en rouge, les glucagon<sup>+</sup> en vert (C). Quantification des cellules insuline<sup>+</sup> et glucagon<sup>+</sup> au sein de l'îlot (D). Quantification du nombre de cellules au sein de l'îlot dans les différents modèles (E).

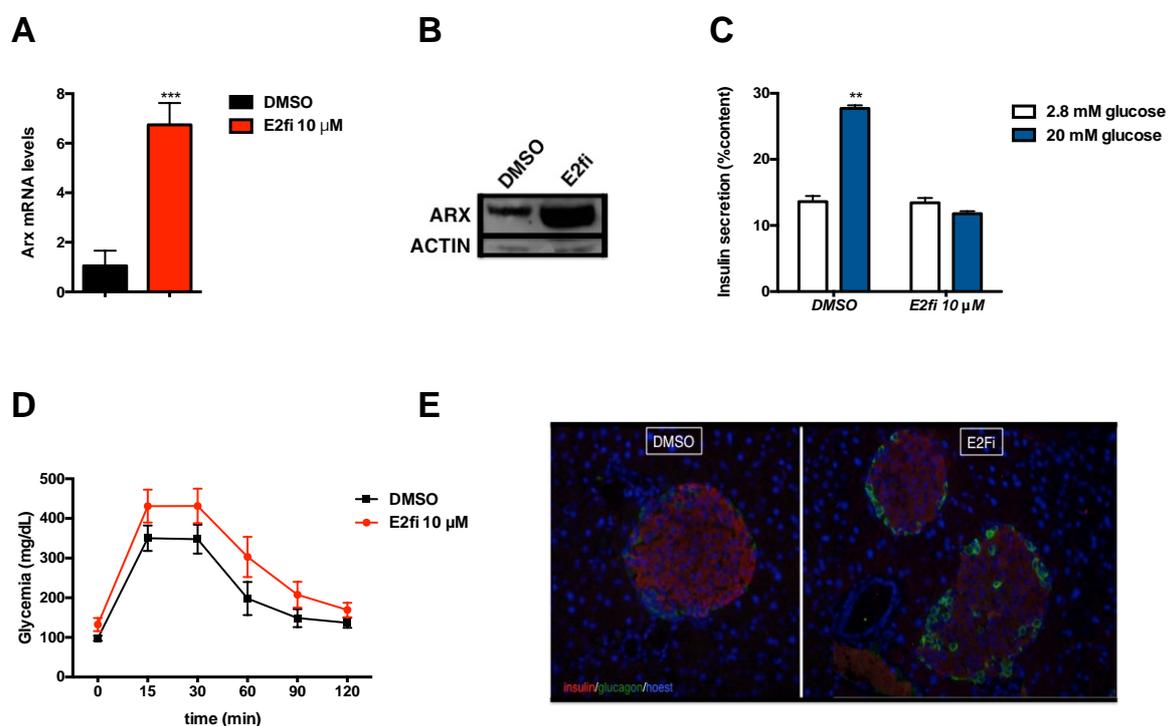
#### 4. L'utilisation d'un inhibiteur d'E2F *in vivo*, confirme les effets observés chez les souris $E2F1 \beta^{-/-}$ .

Afin de confirmer les résultats précédents, l'inhibiteur d'E2F (E2Fi) a été utilisé et des souris sauvages ont été traitées à raison de 50mg/kg durant 14 jours par injection intra-péritonéale.

L'étude génique et protéique des îlots isolés des souris traitées à l'E2Fi montre une augmentation d'Arx comme observé précédemment (Figure 19 A,B).

De plus, des expériences d'IHC montre que la diminution d'expression d'E2F1 conduit à une augmentation du nombre de cellules glucagon<sup>+</sup> ainsi qu'à un changement de la morphologie de l'îlot (Figure 19E), qui pourrait expliquer la gluco-intolérance des souris traitées à l'E2fi (Figure 19D).

Enfin, ces observations concordent également avec la perte de la fonctionnalité des cellules  $\beta$  après GSIS sur les îlots isolés (Figure 19C).



**Figure 19 : L'utilisation de l'E2Fi chez la souris confirme le phénotype observé dans les souris  $E2F1 \beta^{-/-}$ .** PCR quantitative sur les îlots de souris traitées à l'E2Fi (A). Western blot sur les îlots de ces mêmes souris (B). GSIS sur les îlots isolés de ce souris (C). IPGTT sur les souris traitées ou non à l'E2fi à raison de 2g/kg de glucose (D) IHC sur les pancréas de ces souris, les cellules insuline<sup>+</sup> sont en rouge, les cellules glucagon<sup>+</sup> sont en vert (E).

E2F1 semble donc jouer un rôle important *in vitro* comme *in vivo*, dans le maintien de la masse fonctionnelle de l'îlot. Cependant, comme décrit précédemment, ces variations de masse peuvent être dues à deux phénomènes distincts ; la trans-différenciation ou la dédifférenciation.

Afin de tenter de répondre à cette question, des souris permettant le traçage spécifique de la cellule  $\beta$  pancréatique (Rip-Cre Tomato<sup>+</sup>) ont été utilisées. Dans un premier temps ces souris ont été traitées avec l'inhibiteur E2Fi. Dans un second temps, ces souris ont été croisées avec nos souris d'intérêt E2F1  $\beta^{-/-}$ .

### *5. Le traçage des cellules $\beta$ in vivo montre que l'invalidation d'E2F1 conduit à leur conversion en un autre type cellulaire.*

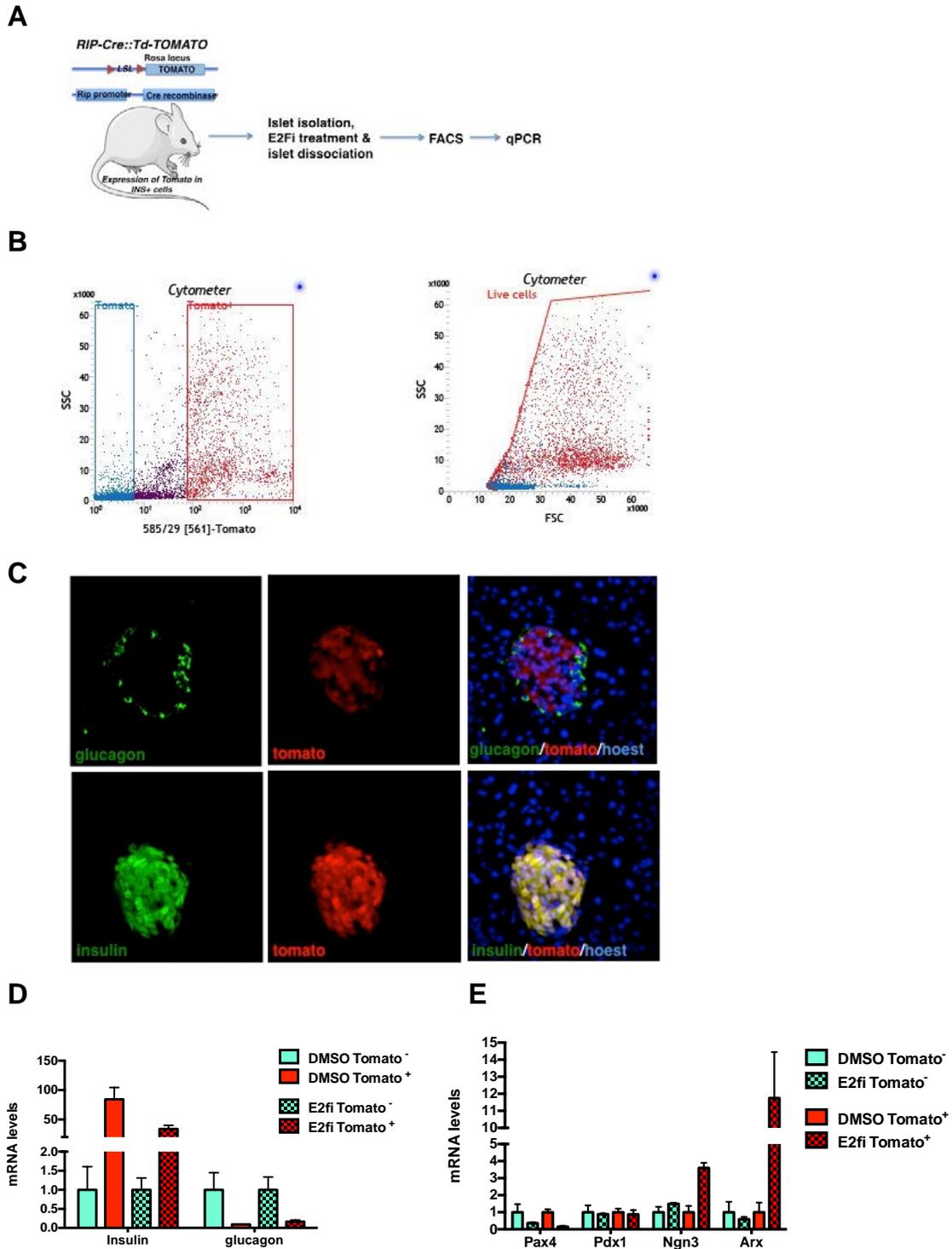
Les souris Tomato <sup>$\beta^+$</sup>  vont donc ainsi nous permettre de définir le rôle précis d'E2F1 dans le devenir de la cellule  $\beta$ . Afin d'obtenir un échantillon enrichi en cellules  $\beta$ , les îlots de souris Tomato <sup>$\beta^+$</sup>  vont être isolés, dissociés à l'aide de trypsine, puis « FACS-sorted » en fonction de la présence ou non du fluorophore endogène. Une fois récupérés, les échantillons permettront l'étude des variations géniques (Figure 20A). Des paramètres stricts ont été choisis afin d'éviter tout biais lié à l'auto-fluorescence des îlots et d'obtenir nos deux populations d'intérêt (Figure 20B).

Afin de valider définitivement le modèle de traçage, des expériences d'immunohistochimie ont été effectuées. On constate ainsi une co-localisation parfaite entre le signal Tomato (ici en rouge) et celui de l'insuline. De plus, aucun co-marquage n'existe entre la Tomato et le glucagon (Figure 20C).

Ce modèle validé, des îlots pancréatiques de souris sauvages ont été isolés, puis traités à l'E2fi durant 48h avant dissociation et tri cellulaire. On constate tout d'abord l'efficacité du tri, avec un enrichissement majeur de l'expression de l'insuline dans les échantillons Tomato <sup>$\beta^+$</sup> , et à l'inverse, une absence de celle du glucagon. L'effet miroir est observé pour les échantillons Tomato<sup>-</sup>, correspondant aux autres types

cellulaires présents dans l'îlot et représentés majoritairement par les cellules  $\alpha$  (Figure 20D).

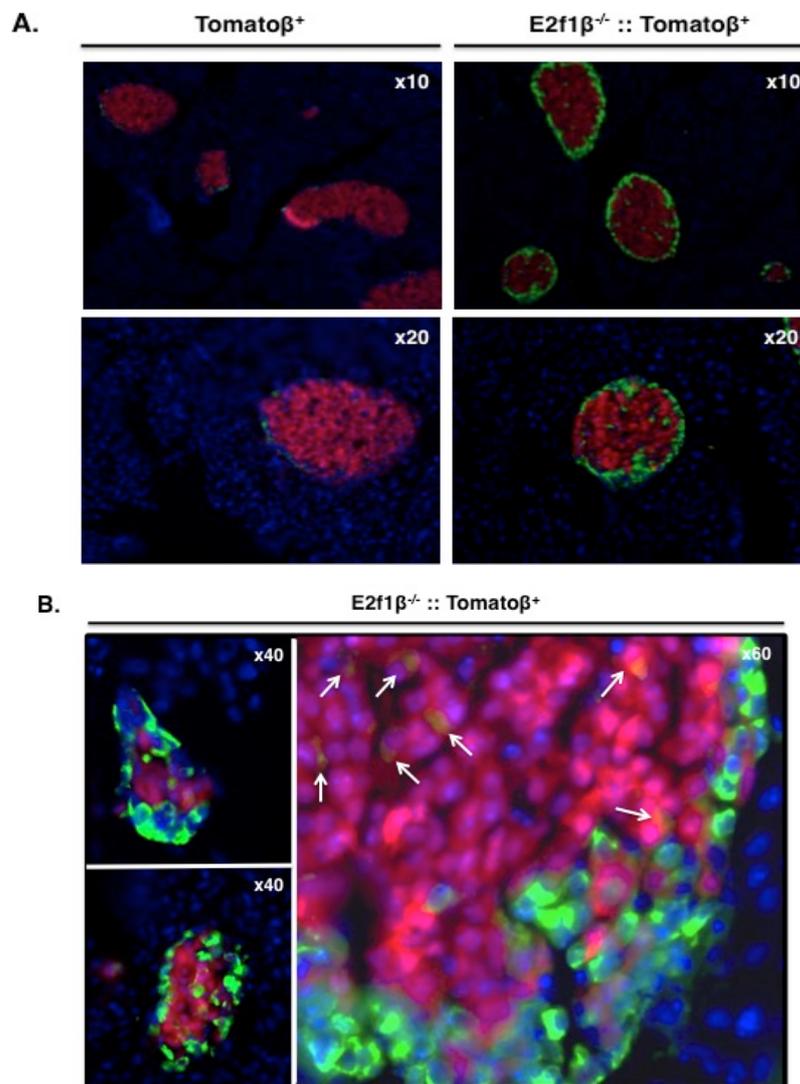
L'effet du traitement montre une diminution significative de Pax4 dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, ainsi qu'une augmentation significative de l'expression d'Arx. Il est également intéressant de noter une augmentation de la Ngn3 dans ces mêmes échantillons suite au traitement avec l'E2Fi (Figure 20E).



**Figure 20 : Validation du modèle Tomato<sup>β+</sup>.** Schématisation du processus expérimental (A). Représentation graphique des populations « FACS-sorted » (B). IHC sur des coupes pancréatiques de souris Tomato<sup>β+</sup> (C). PCR quantitative sur les échantillons β<sup>+</sup> et β<sup>-</sup> issus du tri (D, E).

Afin d'étudier précisément le changement d'identité de la cellule β, les souris Tomato<sup>β+</sup> sont croisées avec les souris E2F1 β<sup>-/-</sup>.

Ainsi, par immuno-histochimie on confirme dans un premier temps l'augmentation massive du nombre de cellule  $\alpha$  dans l'îlot pancréatique (Figure 21A). Le traçage *via* la Tomato nous permet également de constater la présence de cellules co-marquées, correspondantes à un signal glucagon + (en vert) et Tomato + (en rouge, Figure 21B). On peut donc déduire qu'un certain nombre de cellules  $\alpha$  surnuméraires proviedraient de cellules possédant précédemment l'identité  $\beta$ .



**Figure 21 : Les souris E2F1 $\beta^{-/-}$  montre une transdifférenciation des cellules  $\beta$  vers  $\alpha$ .** IHC sur des coupes pancréatiques issus des souris Tomato  $\beta^+$  et E2f1  $\beta^{-/-}$  ::Tomato  $\beta^+$ . La Tomato apparaît en rouge, le glucagon en vert (A). IHC sur des coupes pancréatiques issus des souris E2f1  $\beta^{-/-}$  ::Tomato  $\beta^+$ . La Tomato apparaît en rouge, le glucagon en vert, le jaune marque la co-localisation (B).

E2F1 entrainerait donc une trans-différenciation de certaines cellules. Comme décrit précédemment, ce changement d'identité cellulaire est très souvent associé à une

modification des marques épigénétiques situées au niveau du promoteur de certains gènes clés.

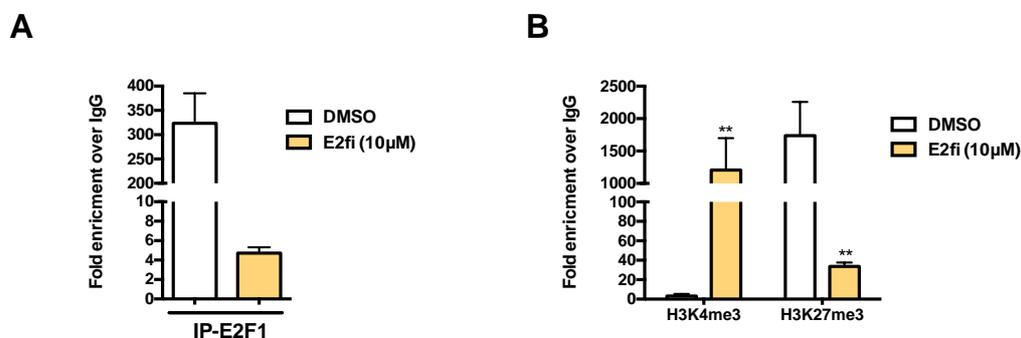
De manière intéressante, Arx est connu pour être réprimé au sein de la cellule  $\beta$  par hyper-méthylation de son promoteur. De plus, E2F1 est connu pour être capable de recruter un certains nombres de co-facteurs transcriptionnels, dont les protéines du Polycomb tel que Ezh2, qui pourrait ainsi être à l'origine de cette répression.

### 6. La déficience en E2F1 conduit à un changement épigénétique au niveau du promoteur d'Arx conduisant à sa dé-répression au sein de la cellule $\beta$ .

Pour répondre à ces questions, des expériences de ChIP ont été réalisées au sein de la lignée Min6, traitées ou non avec l'E2fi.

Ainsi, on constate la perte de la liaison d'E2F1 au promoteur d'Arx en condition de traitement avec l'inhibiteur (Figure 22A). De plus, cette perte de liaison va entraîner l'augmentation de la marque activatrice  $H_3K_4^{me3}$  et réduire la marque inhibitrice  $H_3K_{27}^{me3}$  (Figure 22B).

On peut donc en conclure que la perte de liaison d'E2F1 au promoteur d'Arx va conduire à un changement des marques d'histones traduisant une perte de sa méthylation, qui pourrait être à l'origine de sa ré-expression au sein de la cellule  $\beta$ .

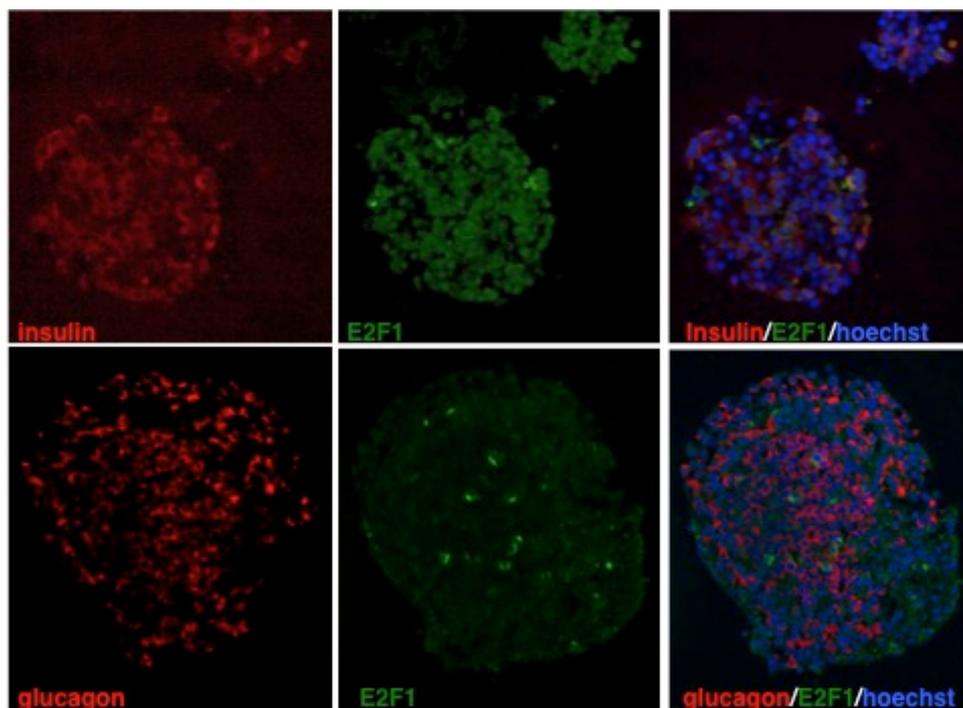


**Figure 22 : La perte de liaison d'E2F1 au promoteur d'Arx entraîne un changement des marques épigénétiques.** Chromatine-IP après IP de E2F1 au niveau du promoteur d'Arx dans la cellule Min6 (A). Chromatine-IP après IP de  $H_3K_4^{me3}$  et  $H_3K_{27}^{me3}$  au niveau du promoteur d'Arx dans la cellule Min6 (A).

En conclusion, chez la souris, E2F1 va permettre de maintenir l'identité de la cellule  $\beta$  en maintenant le facteur de transcription Arx, réprimé. Le maintien de ce statut va se faire via le recrutement potentiel de plusieurs co-facteurs permettant la présence des marques d'histones répressives.

*7. L'utilisation de l'E2f1 sur des îlots isolés humains présente un phénotype semblable à celui décrit chez la souris.*

De manière intéressante, il est important de noter que E2F1 est exprimé dans la cellule  $\beta$  humaine mais qu'il n'est pas présent dans la cellule  $\alpha$  (Figure 23). Sa présence dans l'îlot est également confirmée au niveau protéique par western blot (Figure 24A).



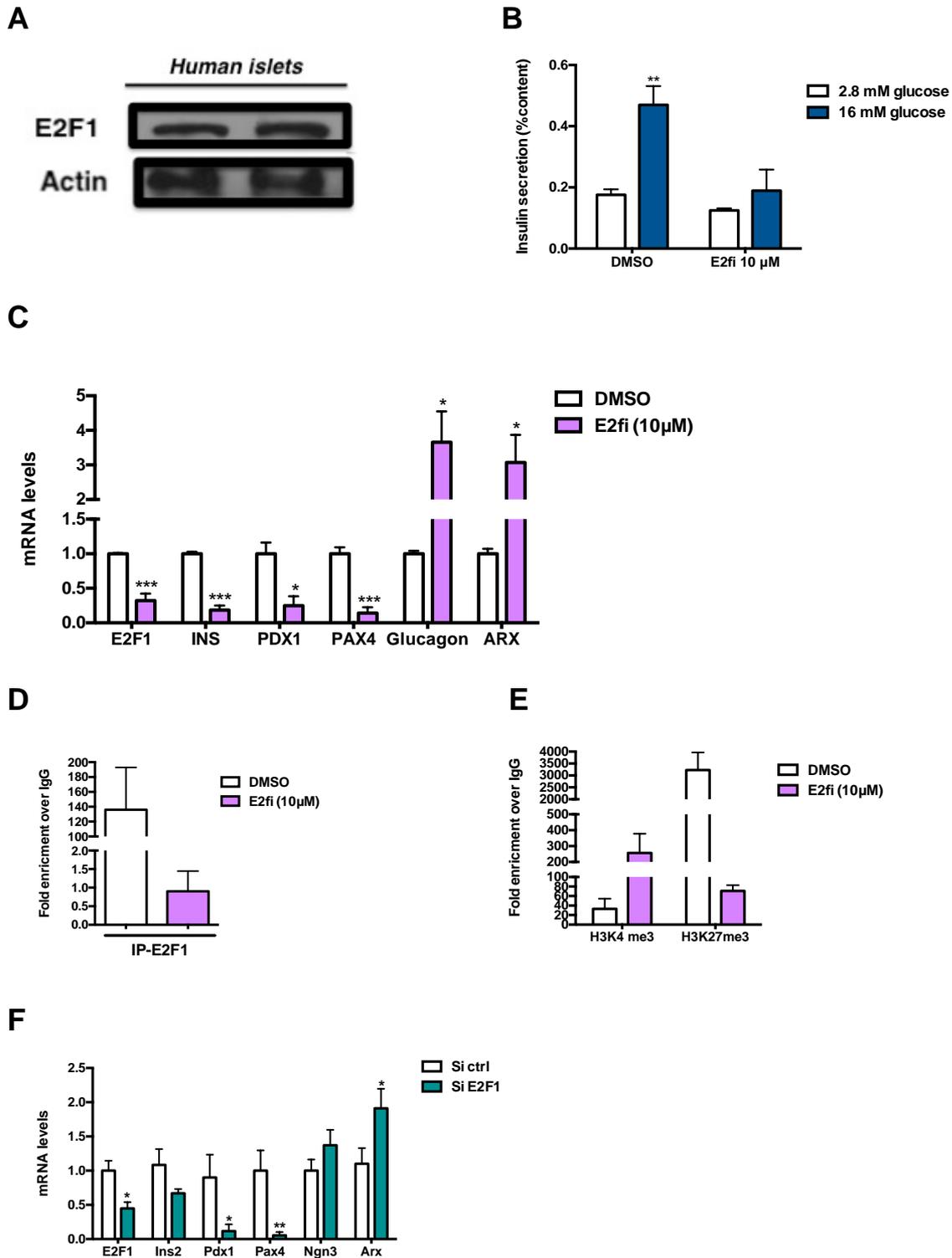
**Figure 23 : E2F1 est retrouvé au sein de la cellule  $\beta$  et absent de la cellule  $\alpha$  .** IHC sur des îlots isolés humains. L'insuline est marquée en rouge, E2F1 en vert (premier panel). Le glucagon est marqué en rouge, E2F1 en vert (second panel).

Des îlots humains de différents donneurs (une dizaine de donneurs ont été utilisés durant cette étude) ont été traités avec l'E2fi. On constate une perte de fonctionnalité de l'îlot humain à sécréter de l'insuline en conditions haut glucose (Figure 24B).

De plus, le traitement conduit également à une diminution d'expression des différents facteurs de l'identité de la cellule  $\beta$  tels que Pax4 ou Pdx1, ainsi qu'à l'augmentation de l'expression d'Arx (Figure 24C).

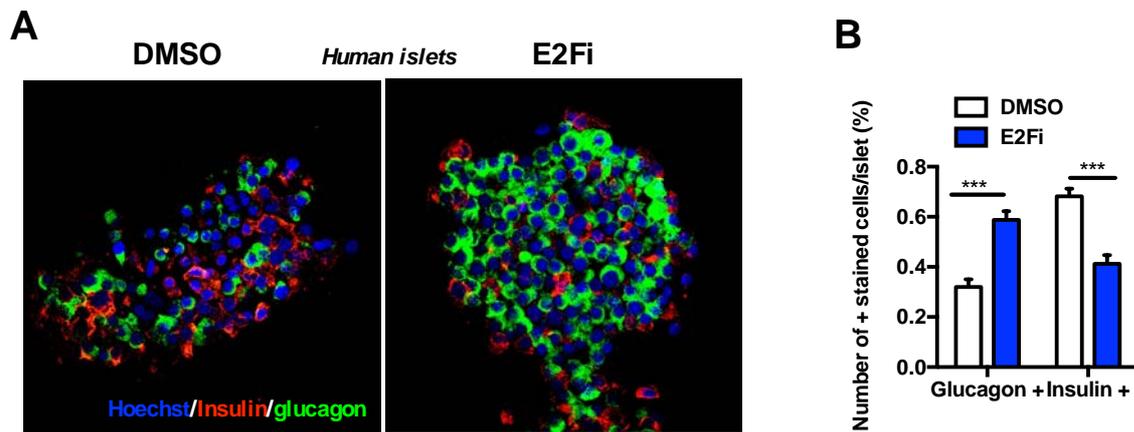
Afin de comprendre si cette régulation est directement liée à l'expression de E2F1, des expériences de ChIP ont été réalisées, comme précédemment. On constate alors que E2F1 est capable de se fixer au promoteur humain d'Arx et que l'utilisation de l'E2fi conduit à la diminution de cette liaison (Figure 24D). Cette perte de liaison va résulter en une modification des marques d'histones liées au promoteur d'ARX menant ainsi à son activation (Figure 24E).

Cependant, afin d'être sûr de la spécificité liée au phénotype observé à l'aide de l'E2fi, des expériences de siRNA dirigé contre E2F1 ont été réalisées. On constate ainsi qu'une extinction de 50% de l'expression d'E2F1 va permettre la diminution significative de Pax4 et Pdx1 ainsi que l'augmentation d'Arx, confirmant nos résultats précédents (Figure 24F).



**Figure 24 : E2F1 est important pour maintenir l'identité  $\beta$  dans l'îlot pancréatique humain.** Western-blot sur îlots isolés issus de 2 donneurs différents (A). GSIS sur îlots humains issus de 4 donneurs différents, traitées ou non à l'E2fi (B). PCR quantitative sur îlots humains issus de 4 donneurs différents, traitées ou non à l'E2fi (C). ChIP sur îlots humains issus de 3 donneurs différents, traitées ou non à l'E2fi (D, E). siRNA dirigé contre E2F1 sur îlots humains issus de 2 donneurs différents (F).

Afin de voir si ces changements d'expression ont une incidence sur la morphologie de l'îlot, des expériences d'immuno-histochimie ont été réalisées. Des îlots humains ont été traités par l'E2Fi pendant 48h et des marquages ont été effectués (Figure 25A). On constate ainsi un changement du nombre de cellule insuline<sup>+</sup>, au profit du nombre de glucagon<sup>+</sup> (Figure 25B).

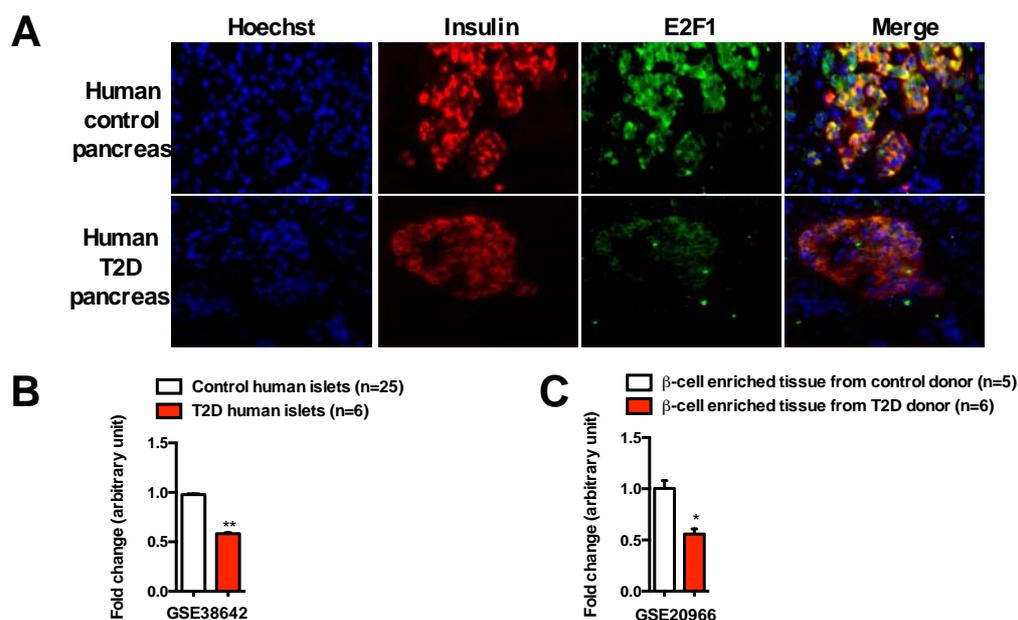


**Figure 25 : L'utilisation de l'E2Fi sur des îlots humains entraine un changement de la masse endocrine.** IHC sur îlots humains issus de 6 donneurs différents, traitées ou non à l'E2fi (A). Quantification des cellules insuline<sup>+</sup> et glucagon<sup>+</sup> au sein de des îlots humains (B).

En conclusion, la perte d'expression d'E2F1 au sein de l'îlot humain semble reproduire le phénotype précédemment obtenu chez la souris. Afin d'étudier un potentiel lien avec le développement du DT2, des marquages ont été effectués sur des coupes pancréatiques issus de patients sains et diabétiques.

On constate une perte de la co-localisation entre E2F1 et l'insuline chez les patients pathologiques (Figure 26A), Cette perte de co-localisation pourrait être expliquée en partie par les phénomènes précédemment décrits dans les îlots traités à l'E2fi.

De manière intéressante, l'utilisation de données déjà publiées (Taneera J, et al, 2012) (Marselli L, et al, 2010) à permis de montrer que les patients diabétiques avaient une diminution de l'expression de E2F1 (Figure 26B). De plus, cette diminution est retrouvée dans des échantillons enrichis en cellule  $\beta$  (Marselli L, et al, 2010) (Figure 26C).



**Figure 26 : E2F1 semble important dans le développement de la pathologie du DT2.** IHC sur coupes pancréatiques issues de donneurs sains et diabétiques, BioChain (A). Etude des niveaux d'expression d'E2F1 chez des patients diabétiques et sains issus du GSE38642 (B). Etude des niveaux d'expression d'E2F1 dans des échantillons enrichis en cellules  $\beta$  provenant de patients diabétiques et sains issus du GSE20966 (C).

## 8. Conclusion et discussion

Ce travail a permis de montrer le rôle important d'E2F1 pour l'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique mais également l'importance des marques épigénétiques, clés dans le maintien de la répression d'Arx. Ces résultats ont prouvé ce rôle chez la souris mais semblent également être pertinent dans le développement du T2D chez l'Homme (Figure 27).

Actuellement des expériences visant à l'étude de la prolifération et de l'apoptose des cellules endocrines est en cours au sein de nos modèles. De plus, compte tenu des effets post-nataux d'E2F1, des souris déficientes inductibles sont en cours de génération afin d'étudier les effets de la délétion aux différents âges de l'animal.

De manière intéressante, la temporalité semble en effet jouer un rôle important. Dans notre modèle E2F1  $\beta^{-/-}$  le vieillissement a une incidence directe sur le phénotype.

En effet, le phénotype de notre modèle de souris semble être plus marqué avec l'âge : plus la gluco-intolérance augmente, plus l'augmentation du nombre de cellules glucagon<sup>+</sup> semble être importante.

De plus, il serait intéressant d'étudier la réversibilité du traitement de l'E2Fi dans nos études humaines, mais les conditions expérimentales ne nous permettent pas de garder les îlots humains viables durant plus de 5 jours.

Enfin, pour conclure cette partie sur la dé-différenciation et la trans-différenciation. Il est à noter que dans tous nos modèles d'inactivations pour E2F1, ainsi que lors des traitements à l'E2Fi chez la souris ou l'Homme, le pourcentage de cellules perdant leur identité reste identique. En effet, la modification du pool de cellule  $\beta$  varie toujours dans une même mesure, à savoir de l'ordre de 15 à 25%. Dans la littérature, les travaux récents étudiant ces phénomènes tendent à montrer des changements d'identité cellulaire également de l'ordre de 20% (Talchai C, *et al*, 2016) (Wang Z, *et al*, 2014).

L'observation des différents sous type de cellules  $\beta$  semble démontrer que seulement certaines d'entre elles pourraient être enclin à se dédifférencier. Ce type de sous population pourrait devenir un marqueur de souffrance pancréatique, une phase précoce de dédifférenciation pourrait marquer l'entrée en phase de pré-diabète, précédant le défaut fonctionnel de l'ensemble des cellules  $\beta$ .

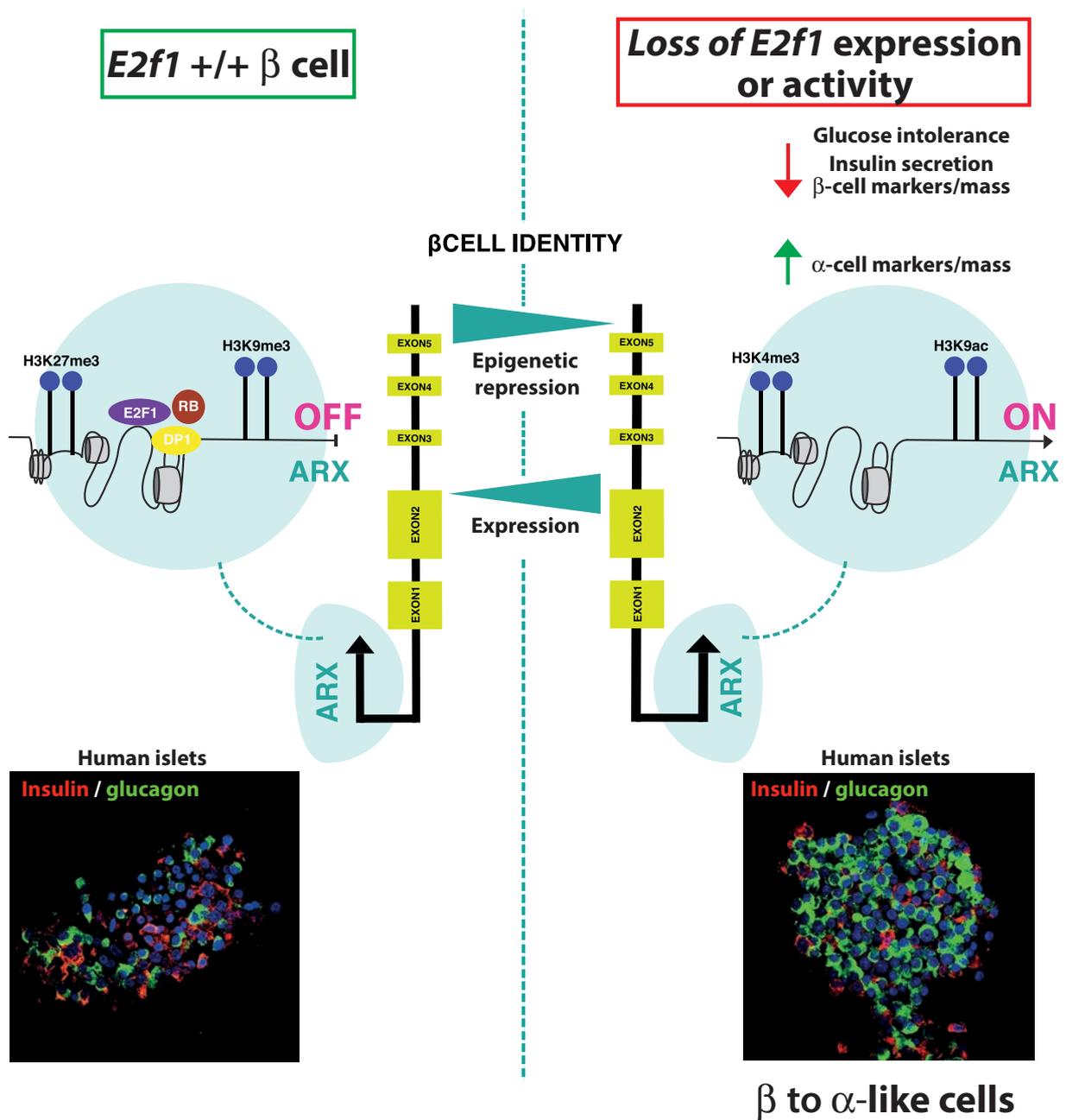


Figure 27 : Schématisation du rôle d'E2F1 dans le maintien de l'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique chez la souris et l'Homme.

II. E2F1 contrôle l'expression du récepteur au GLP1 (GLP1-R) au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique en réponse à son environnement.

Il a été montré dans une précédente étude que les patients atteints de DT2 présentent une diminution de l'expression d'E2F1 au sein de l'îlot. De plus, cette même étude a montré que le traitement des îlots de ces patients à l'aide d'un agoniste du Glp1, l'exendine 4 (ou exenatide), en 48h, permettait de retrouver un niveau quasi basal d'expression d'E2F1 accompagné d'une amélioration de la fonction  $\beta$  pancréatique (Lupi R, *et al*, 2008).

Dans un même temps, il a été montré que la déficience en Glp1-R dans des modèles murins conduisait à un changement architectural de l'îlot avec une présence anormale de cellules  $\alpha$  au centre de l'îlot (Ling Z, *et al*, 2001) De plus, une étude a montré que le GLP1 possédait des effets sur la maturation post-natale des îlots pancréatiques et que la déficience de son récepteur menait à une hyperplasie des cellules  $\alpha$  (Keddes MH, *et al*, 2009).

Ainsi, ces nombreux effets présentent de nombreux points communs avec le rôle métabolique d'E2F1 précédemment décrit. De plus, les souris  $E2f1 \beta^{-/-}$  présentent des similitudes au niveau phénotypique (tels que la morphologie de l'îlot et l'augmentation du nombre de cellules  $\alpha$ ) communes à celles retrouvées chez les souris  $Glp1R^{-/-}$ . Cependant, peu de choses sont connues sur la compréhension du fonctionnement des agonistes du Glp1 ou sur le mécanisme d'expression du Glp1-r. Il semble intéressant de comprendre si E2F1 peut jouer un rôle dans la régulation de l'expression du GLP1-r ou encore dans la réponse de la cellule  $\beta$  lors de traitement par les agonistes du Glp1.

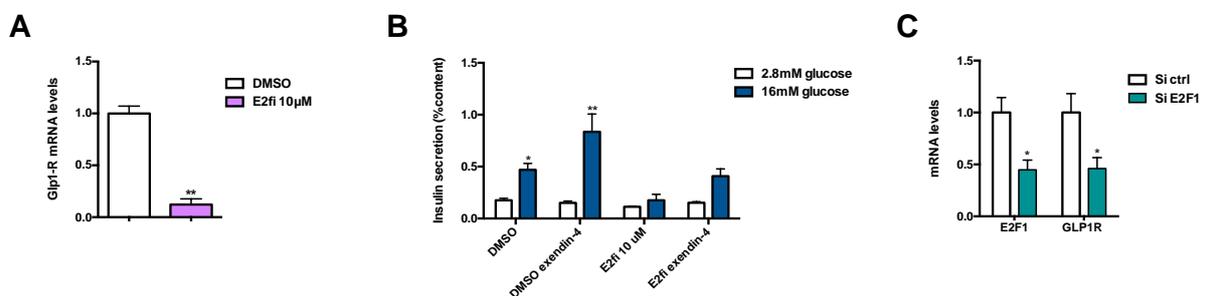
1. La diminution de l'expression d'E2F1 entraîne la diminution du GLP1-R ainsi que la perte des effets de l'exendine-4 au sein de l'îlot pancréatique humain.

Pour vérifier notre hypothèse et corroborer les observations faites par l'équipe du Dr Marchetti (Lupi R, *et al*, 2008), des îlots humains, traités ou non avec l'E2fi, ont été utilisés.

On observe ainsi que les îlots traités via notre inhibiteur vont présenter une diminution de l'expression du GLP-1R (Figure 28A).

De plus, la diminution d'expression du GLP1-R est associée à une perte de potentialisation des effets liés à l'exendine-4 sur la sécrétion d'insuline. En effet, cet agoniste GLP1 va permettre, en condition contrôle, d'induire une importante sécrétion d'insuline en réponse à une concentration élevée en glucose. Cependant, l'utilisation de notre inhibiteur sur les îlots va mener à la perte de cet effet potentialisateur de l'exenatide (Figure 28B).

Enfin, afin de confirmer spécifiquement les effets d'E2F1 sur le GLP1R, un siRNA dirigé contre E2F1 a été effectué sur des îlots pancréatiques humains. Ce dernier nous confirme ainsi que la diminution d'E2F1 va entraîner la perte d'expression du GLP1R au sein de l'îlot humain (Figure 28C).



**Figure 28 : La diminution d'E2F1 dans l'îlot humain entraîne une perte d'expression du GLP1R ainsi qu'une perte de fonctionnalité et de potentialisation de l'exenatide.** PCR quantitative sur îlots humains issus de 4 donneurs, traités ou non avec l'E2Fi (A). GSIS sur îlots humains issus de 3 donneurs, traités ou non avec l'E2Fi en condition +/- exendine-4 à 50nM (B). PCR quantitative sur îlots humains issus de 2 donneurs traités ou non avec un SiE2F1 (C).

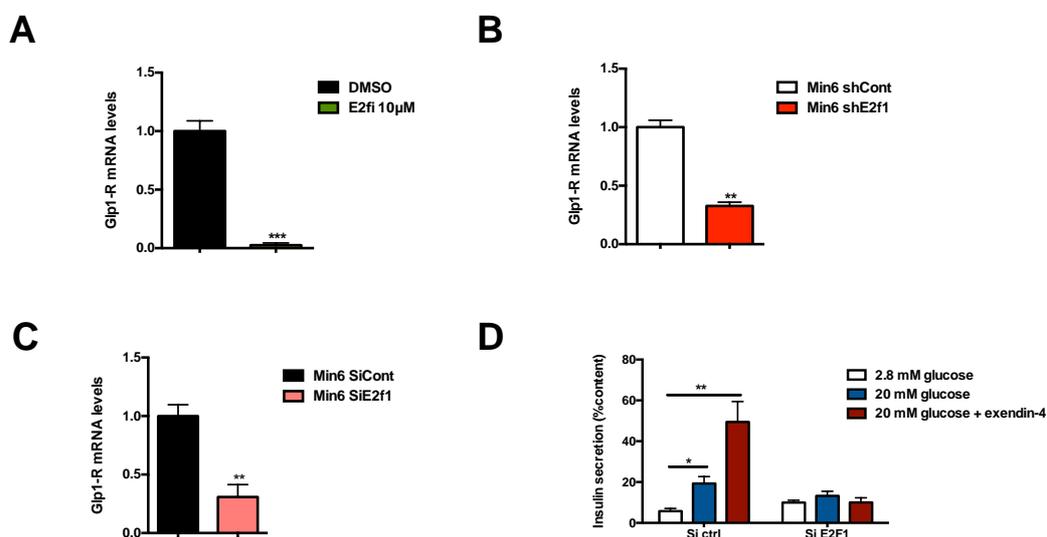
Afin de comprendre les effets d'E2F1 sur l'expression du GLP1R, des études *in vitro*, dans la lignée Min6, ont été effectuées.

## 2. E2f1 régule directement l'expression du Glp1R *in vitro*

Pour reproduire la déficience de E2F1 *in vitro*, dans la lignée cellulaire Min6, plusieurs approches ont été utilisées.

Les approches utilisant l'E2fi, ou la diminution stable d'E2F1 par shRNA, montrent une diminution de l'expression du Glp1-r associée à la diminution de l'expression d'E2f1 (Figure 29A, B).

De même, l'utilisation d'un siRNA dirigé contre E2F1 montre la diminution concomitante de l'expression du Glp1-r et d'E2f1 (Figure 29C). Enfin, on constate également que la fonction de la cellule  $\beta$  est affectée. En effet, lors d'un test de sécrétion d'insuline, on constate une incapacité à augmenter la sécrétion en réponse au glucose, ainsi qu'une incapacité à potentialiser l'effet de cette réponse via l'exénatide (Figure 29D).



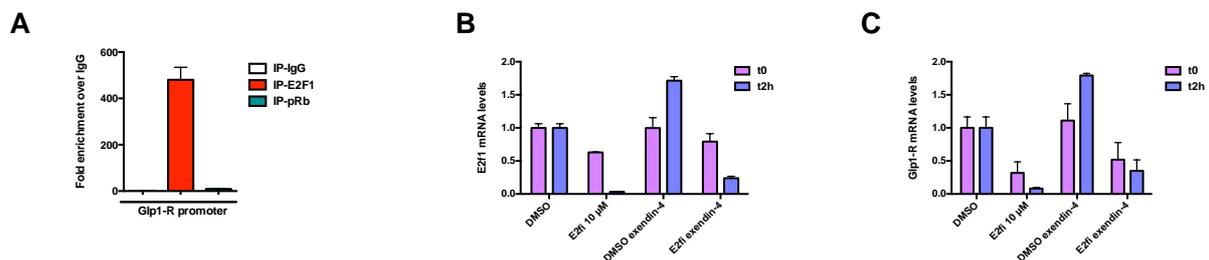
**Figure 29 : In vitro, la diminution d'expression d'E2f1 et concomitante à celle du Glp1-r et annihile les effets de l'exendine-4.** PCR quantitative sur cellules Min6, traitées ou non avec l'E2Fi (A). PCR quantitative sur cellules Min6 sur les lignées shE2f1 et shCont (B). PCR quantitative sur cellules Min6 sur les lignées siE2f1 et siCont (C). GSIS sur cellules Min6 sur les lignées siE2f1 et siCont, en présence ou non d'exendine-4 (D).

Ainsi, *in vitro*, les résultats semblent confirmer ceux précédemment décrits chez l'Homme, dans des îlots humain *ex vivo*.

Pour comprendre si E2F1 régule directement l'expression du Glp1-r, un ChIP a été réalisé dans la lignée Min6.

On constate que E2F1 se fixe sur le promoteur du récepteur au Glp1 mais pas son répresseur, pRb (Figure 30A). Ainsi E2f1 pourrait activer le promoteur du Glp1-r en cas de stimulation par son environnement.

En effet, de manière intéressante on constate que la stimulation de la lignée Min6 à l'aide d'exendine-4, va permettre d'induire une augmentation concomitante de l'expression de E2f1 et du Glp1-r. De plus, l'utilisation de notre E2fi, va empêcher ce phénomène (Figure 30 B,C).



**Figure 30 : E2f1 contrôle directement l'expression du Glp1-r, l'expression d'E2f1 est induite par l'utilisation de l'exendine-4.** ChIP sur la lignée Min6 après IP de E2f1, pRb ainsi que les IgG en contrôle négatif (A) PCR quantitative sur cellules Min6, traitées ou non avec l'E2Fi en condition +/- exendine 4 (B, C).

En conclusion, on constate, *in vitro*, que l'utilisation d'un agoniste du Glp1 induit l'augmentation de l'expression de E2f1, qui de part son action directe sur le promoteur du Glp1-r permettra l'activation de ce dernier en réponse au stimulus environnemental.

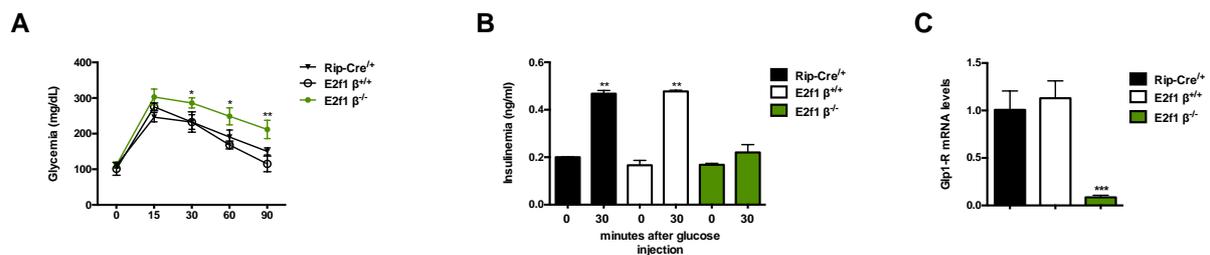
En ce sens, les souris invalidées spécifiquement pour E2F1 dans la cellule  $\beta$  pancréatique ont été utilisées afin de confirmer ces données *in vivo*. De plus, afin d'observer un potentiel « effet miroir », des souris présentant une surexpression

spécifique d'E2F1 dans la cellule  $\beta$  pancréatique (RFC  $\beta^{\text{overexp}}$ ) serviront également de modèle dans cette étude.

### 3. *In vivo*, l'expression de E2f1 est nécessaire à l'expression du Glp1-r ainsi qu'à la réponse au glucose dans les phases précoces de sécrétion.

Des tests de tolérance orale au glucose (OGTT) ont été réalisés sur les souris E2f1  $\beta^{-/-}$  afin d'observer la réponse liée à la sécrétion de Glp1.

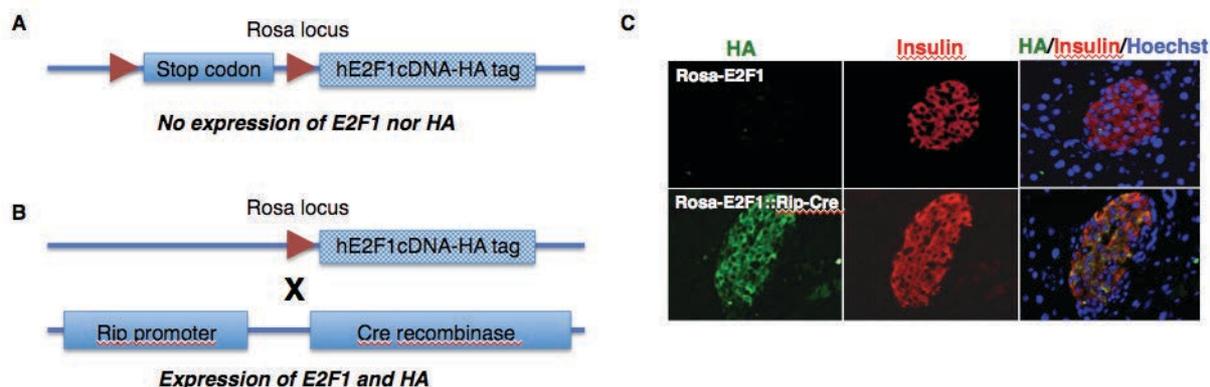
On constate une gluco-intolérance de ces souris suite à l'OGTT (Figure 31A). Ce phénomène s'accompagne d'une incapacité à augmenter la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Figure 31B). Enfin, l'isolement des ces îlots a permis de montrer un défaut d'expression du Glp1-r au sein de notre modèle d'intérêt (Figure 31C).



**Figure 31 : Le modèle E2f1 $\beta^{-/-}$  présente une gluco-intolérance suite à un OGTT lié à une diminution de l'expression du Glp1-r.** OGTT sur les souris contrôles et E2f1 $\beta^{-/-}$  à raison de 2g/kg de glucose (A). Dosage sérique de l'insuline à t0 et t30 durant l'OGTT (B). PCR quantitative sur les îlots isolés de ces souris (C).

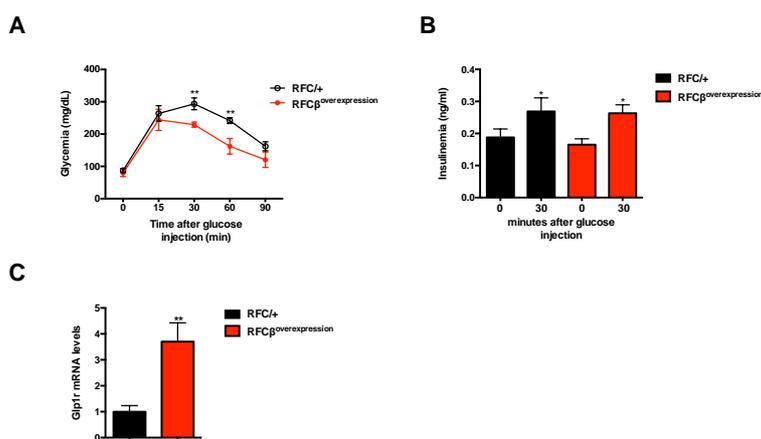
Afin de savoir si l'augmentation d'expression d'E2F1 peut, elle, avoir un effet potentialisateur sur la fonctionnalité de la cellule  $\beta$ , des souris sur-exprimant le gène E2f1 spécifiquement au sein de ces cellules ont été générées (RFC<sup>overexp</sup>). Dans ce modèle, l'expression de l'E2F1 exogène va être couplée à un tag HA afin de marquer les cellules concernées (Figure 32A,B).

Dans un premier temps, le modèle a été validé par IHC. On constate ainsi une parfaite co-localisation entre le tag HA et les cellules positives à l'insuline (Figure 32C).



**Figure 32 : Validation du modèle de sur-expression spécifique d'E2f1.** Schématisation du modèle contrôle et du modèle de sur-expression d'E2f1 (A,B). IHC sur des coupes pancréatiques issus de ces animaux. Le HA apparaît en vert, l'insuline en rouge, la co-localisation en jaune (C).

Dans un second temps, les tests d'OGTT ont été utilisés sur ce modèle. Nous montrons ainsi que la surexpression spécifique d'E2f1 va conduire à l'augmentation de la tolérance au glucose en OGTT (Figure 33A) et que cette augmentation est corrélée à une augmentation de l'expression du Glp1-r (Figure 33C). A noter cependant que l'insulinémie à t30 n'est pas supérieure à celle de nos souris contrôle (Figure 33B). Ce phénomène peut s'expliquer par le caractère précoce de l'action du Glp1. En effet, on constate que la différence majeure entre nos deux modèles murins lors de l'OGTT apparaît entre t15 et t30. Il serait sans doute intéressant de mesurer la glycémie à 20 min dans ce cas précis.



**Figure 33 : Le modèle E2f1<sup>overexp</sup> présente une amélioration de sa glucotolérance suite à un OGTT lié à une augmentation de l'expression du Glp1-r.** OGTT sur les souris contrôles et E2f1<sup>overexp</sup> à raison de 2g/kg de glucose (A). Dosage sérique de l'insuline à t0 et t30 durant l'OGTT (B). PCR quantitative sur les îlots isolés de ces souris (C).

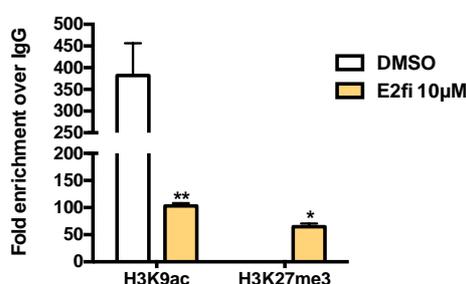
On constate que E2f1 permet *in vivo* d'influer directement sur la réponse au glucose, dans sa phase la plus précoce, en contrôlant l'expression du Glp1-r.

Cependant peu d'information sont actuellement connues sur la régulation du récepteur au Glp1, ou sur les mécanismes qui conduiront à l'augmentation de son recrutement à la membrane après traitement à l'exendine-4.

Récemment il a cependant été montré que le récepteur pouvait être régulé par des processus épigénétiques telle que la méthylation (Hall E, *et al*, 2013).

#### 4. E2f1 impact la méthylation du promoteur du Glp1-r de manière gluco dépendante.

La lignée Min6 a été traitées ou non avec notre E2fi et les marques d'histones furent mesurées par ChIP-qPCR. On constate ainsi une augmentation des marques d'histone répressives comme H<sub>3</sub>K<sub>27</sub><sup>me3</sup> en absence d'E2f1, ainsi qu'une diminution des marques activatrices (Figure 34).



**Figure 34 : La déficience d'E2f1 entraîne un changement du statut de méthylation du promoteur du Glp1-r, menant à sa répression.** ChIP sur cellules Min6 traitées ou non avec l'E2fi, après IP des marques H<sub>3</sub>K<sub>9</sub><sup>ac</sup> et H<sub>3</sub>K<sub>27</sub><sup>me3</sup>.

Cependant, nous avons montré précédemment que l'expression d'E2f1 été liée au stimulus induit par l'exendine-4. De plus, le récepteur au Glp1-r doit être activé de manière dynamique en réponse à son environnement.

Ainsi, il serait intéressant de comprendre comment l'environnement influence l'expression d'E2f1 de manière dynamique et en conséquence la transcription du Glp1-r.

Tout d'abord il est intéressant de noter que la notion de « mémoire transcriptionnelle » est de plus en plus présentée comme un mécanisme important pour certains gènes senseurs de l'environnement cellulaire (Iberg-Badeaux A, *et al*, 2017). Ainsi, par exemple, un facteur de transcription peut être induit en fonction d'un environnement riche en glucose (Ciccarelli M, *et al*, 2016). De plus, la fixation de ce dernier sur un promoteur donné va permettre d'induire une marque d'histone spécifique, qui par la suite, lors de stimuli répétés, permettront à ce promoteur d'induire sa transcription en seulement quelques minutes via le changement de ces marques d'histones (Métivier R, *et al*, 2008) (Light WH, *et al*, 2013).

D'autre part, les voies en amont pouvant réguler E2f1 sont à l'heure actuelle peu connues. Cependant, l'expression d'E2f1 a été très récemment montrée comme étant régulée par ubiquitylation (Mahanic C, *et al*, 2015) (Glorian V, *et al*, 2017), une modification post traductionnelle importante.

Ainsi, pour comprendre comment E2f1 pouvait augmenter son expression afin d'induire la transcription du *glp1-r*, des études liées à l'ubiquitylation d'E2f1 en fonction de son environnement ont été effectuées.

On constate en effet la présence de 3 sites majeurs sur la séquence protéique d'E2F1, situés dans une même région (Figure 35A).

De plus, après transfection d'un plasmide hE2F1<sup>flag</sup> dans la lignée Min6, on constate via les « input » que l'ubiquitylation totale ne varie pas en fonction du statut glucosé. Cependant, après IP de la forme humaine d'E2F1 via le flag, on constate que la protéine va, elle, être ubiquitylée en fonction de ce statut. Ainsi, E2F1 en haut glucose et haut glucose / exendine 4, va subir une ubiquitylation lui permettant de le préserver de la dégradation, entraînant un potentiel recrutement plus important sur le promoteur du *Glp-1r* lui permettant d'activer ce gène (Figure 35B).

A.



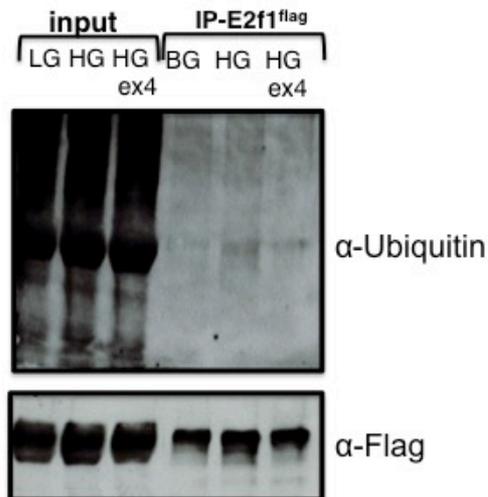
UbPred: predictor of protein ubiquitination sites



MAVAPAGGQHAPALEALLGAGALRLLDSSQIVIISTAPDVGAPQLPAAPPTGPRDSVLLFATPQAPRPAPSAPR  
 PALGRPPVKKRRLDLETDHQYLAGSSGPFRRGRGRHPGKGVKSPGKESRYETSLNLTTRKRFLELLSRADGVVDL  
 NWAAEVLKVKRRRIYDITNVLEGIQLIAKKSKNHIQWLGSHMTMVGIGKRLEGLTQDLQQLQESEQQLDHLMHICT  
 TQLQLLSESDTQRLAYVTCQDLRSIADPAEQMVIVIKAPPETQLQAVDSSSETFQISLKS**K**QGPIDVFLCPEESA  
 DGISPG**K**TSCQETSSGEDRTADSGPAGPPSPSTSPALDPSQSLLGLEQEAVLPRMGHLRVPMEEDQLSPL  
 VAADSLLEHV**K**EDFSGLLPGEFISLSPPEALDYHFGLEEGEGIRDLFDCDFGDLTPLDF \*specificity : 0.95

Protein  
sequence of  
murine E2f1

B.

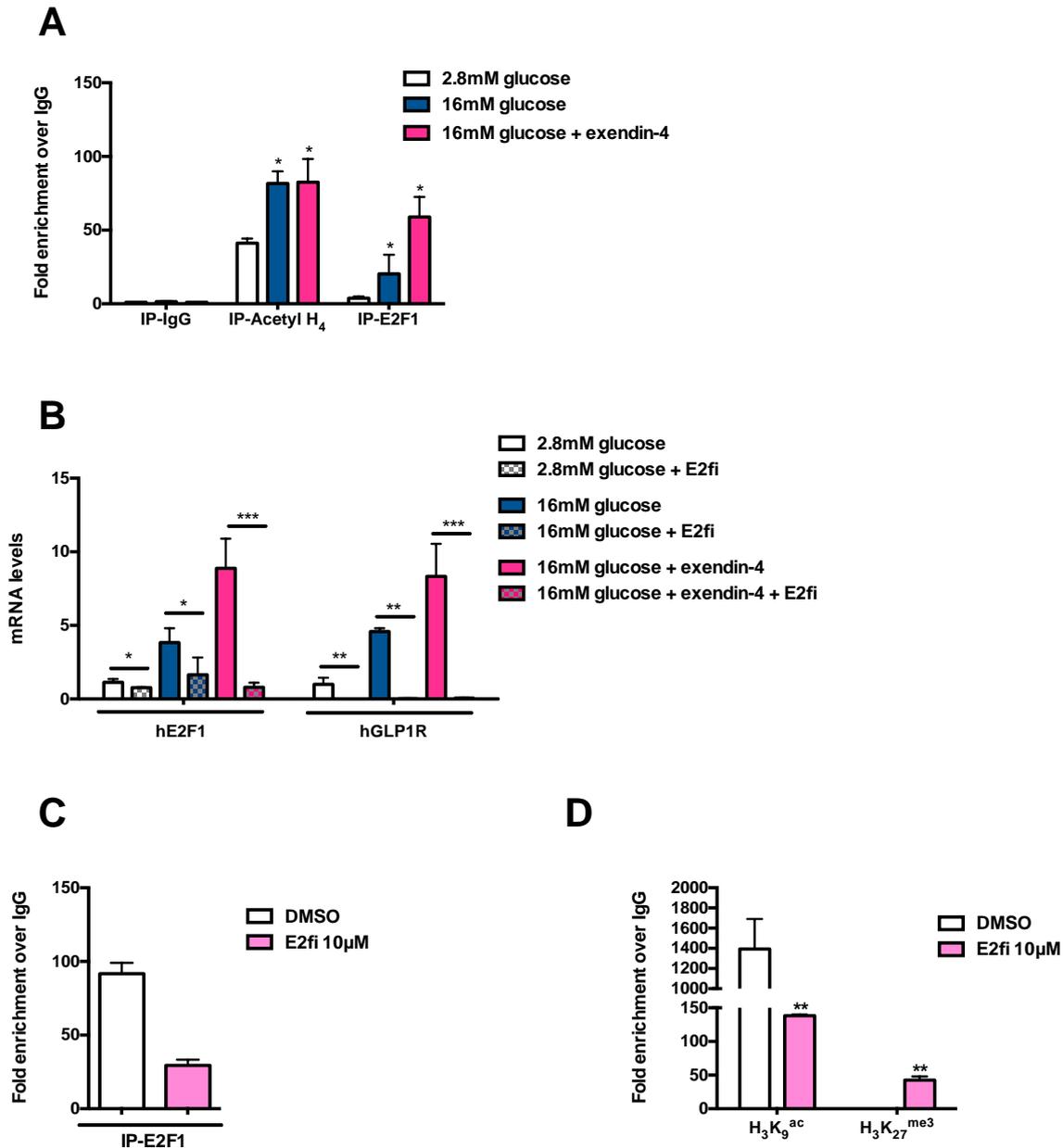


**Figure 35 : L'expression d'E2f1 est régulée par le glucose via son ubiquitinylation.** Etude bio-informatique des sites potentiels d'ubiquitinylation par UbPred (A). Western blot sur les échantillons issus de cellules Min6 transfectées par un E2f1<sup>flag</sup>, après IP flag, une révélation à l'aide d'un anticorps anti-ubiquitine est réalisé, ainsi qu'un anti flag comme contrôle (B).

Ainsi, *in vitro* nous montrons que E2f1 va voir son expression corrélée avec le statut glucosé et que ce phénomène pourrait permettre une augmentation de la transcription du *glp1r* dans ces mêmes conditions. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons utilisés des îlots humains afin de tester la pertinence de ces résultats.

On constate que dans des îlots humains, la fixation et l'activation du GLP1-R va augmenter en fonction du statut glucosé et de la stimulation par l'exenatide (Figure 36A). De plus, cette augmentation est directement corrélée à l'augmentation d'expression d'E2F1, induisant dans le même temps celle du GLP1R (Figure 36B).

Enfin, cette fixation au promoteur humain du GLP1 récepteur est corrélée au statut de méthylation de ce dernier (Figure 36C).



**Figure 36 : E2F1 contrôle la transcription du GLP1-R dans l'îlots humains de manière gluco-dépendantes.** ChIP réalisé sur des îlots humains en fonction du statut glucosé, après IP d'E2F1 et de l'acétyl H<sub>4</sub> comme marque active du promoteur (A). PCR quantitative réalisée sur des îlots humains en fonction du statut glucosé et de la présence ou non de l'E2fi (B). ChIP réalisé sur des îlots humains traités ou non à l'E2fi, après IP d'E2F1, H<sub>3</sub>K<sub>9</sub><sup>ac</sup> et H<sub>3</sub>K<sub>27</sub><sup>me3</sup> (C,D).

## 5. Conclusion et discussion

Nous montrons ici que E2F1 peut être très finement régulé. Son expression va être soumise à son environnement et plus précisément à la concentration en glucose de ce dernier. De plus E2F1 semble au cœur du mécanisme de régulation du Glp1-r par

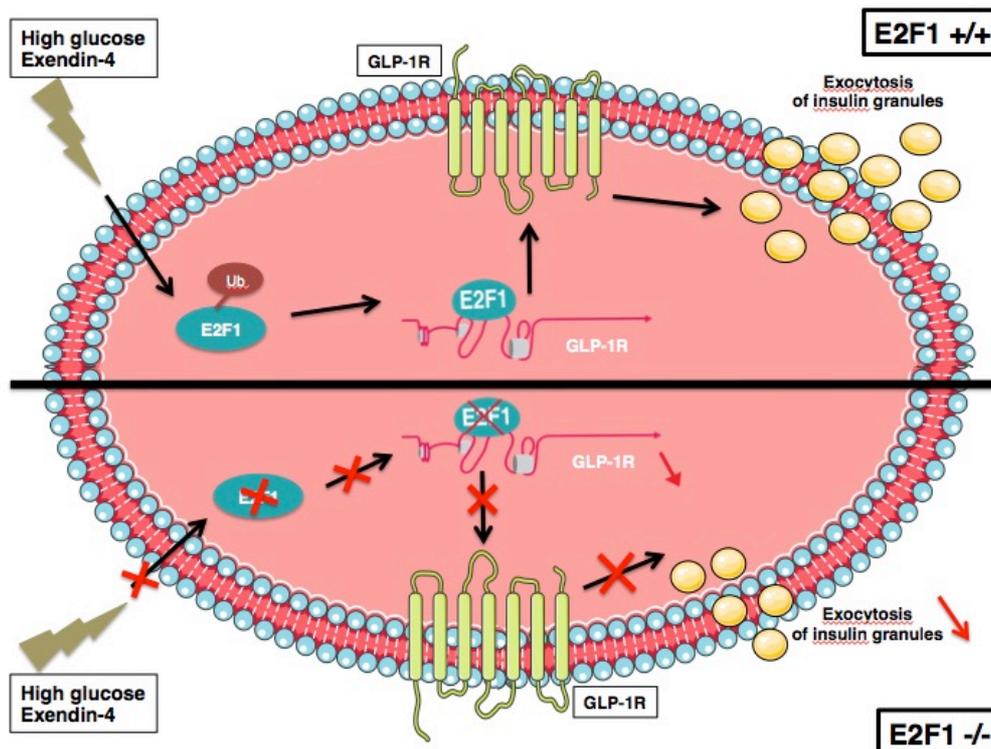
les agonistes au Glp1 tel que l'exendine-4. Ainsi il pourrait être à l'origine des observations montrant un maintien dans le temps du nombre important de récepteur au Glp1 à la membrane, suite au stimulation via ses agonistes (Roed, SN, *et al*, 2013) (Shaaban G, *et al*, 2017). Cette régulation semble liée à une modification post-traductionnelle (PTM) d'E2F1, le préservant ainsi de la dégradation (Figure 37).

Cependant il reste à comprendre quelle est la protéine, responsable de cette PTM, qui pourra réguler E2F1 et expliquer ainsi ce phénomène. On sait que l'exendin-4 peut induire l'expression de certaines classes de protéines à activité ubiquitine telle que Skp2 (Tschen SI, *et al*, 2011). Cependant rien n'est actuellement décrit au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique.

Il serait également intéressant de traiter nos souris  $E2f1\beta^{-/-}$  à l'aide d'un agoniste au Glp1 afin de confirmer la perte d'efficacité de ce dernier, ou encore de confirmer l'ubiquitinylation chez l'Homme après IP de l'E2F1 endogène.

Enfin, la littérature semble montrer que la signalisation du Glp1-r est importante pour la fonction mitochondriale et son activité (DeNicola M, *et al*, 2014) (Monji A, *et al*, 2012). En ce sens, notre modèle de souris  $E2f1\beta^{-/-}$  présente en effet une diminution de son activité mitochondriale au sein de l'îlot après utilisation de la technologie Seahorse (données non présentées).

Pour conclure, un modèle physiologique important où l'effet incrétine a un effet important est la chirurgie bariatrique. En effet, alors que les patients atteints de DT2 présentent une diminution de l'expression du GLP1R (Taneera J, *et al*, 2012), on constate, après chirurgie, un effet incrétine marqué menant à une ré-expression du récepteur au GLP1, pouvant ainsi être à l'origine de l'amélioration glycémique de ces patients (Holter MM, *et al*, 2017).



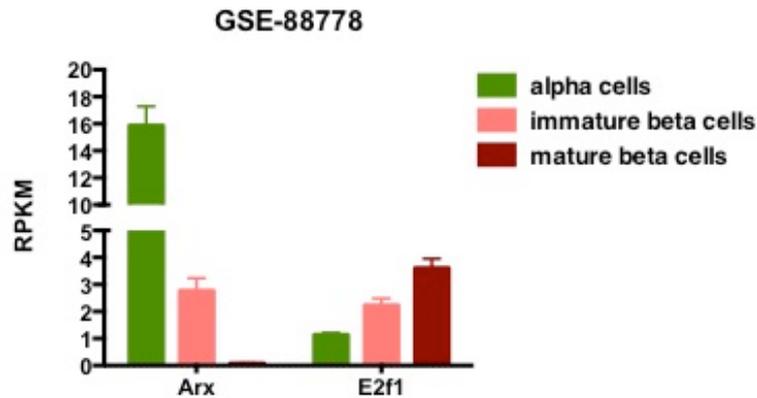
**Figure 37 : Schématisation du rôle d'E2F1 dans le mécanisme de régulation du GLP1R**

## VII. Discussion Générale

L'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit démontre que E2F1 semble être un important régulateur de l'identité cellulaire et qu'il jouerait un rôle primordial dans le maintien d'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique. En effet, nos données expérimentales montrent que E2F1 régule au niveau transcriptionnel l'expression d'ARX, de manière à le maintenir son expression dans un état « réprimée » au sein de la cellule  $\beta$ , cette répression se faisant par un maintien de son promoteur à l'état méthylée. D'un point de vue fonctionnel, E2F1 permet également de moduler l'expression du GLP1-R au sein de la cellule  $\beta$ . Cette régulation s'effectue de manière gluco-dépendante. En effet, E2F1 est capable d'augmenter sa fixation au promoteur du GLP1-R en condition haut glucose, ou encore de potentialiser l'effet des analogues du GLP1 afin de permettre une augmentation de la transcription du GLP1-R lors d'une stimulation par les incrétines.

Ce travail a ainsi permis de replacer E2F1 au centre d'un carrefour situé entre fonction et identité cellulaire. Cependant il serait intéressant d'utiliser les souris déficientes spécifiquement pour E2F1 dans la cellule  $\beta$  afin de réaliser un ChIP-seq. Cette expérience nous permettra de valider définitivement les cibles directes d'E2F1 au sein de la cellule  $\beta$ . Il pourrait également être intéressant de croiser ces données avec des données de RNA-seq obtenues sur ce même modèle et ainsi d'obtenir une signature spécifique d'E2F1 dans la régulation de l'identité de la cellule  $\beta$ . Enfin, une des dernières limites de ce travail et le traçage des cellules  $\beta$  pancréatiques humaines ainsi que la spécificité de l'inhibiteur utilisé au cours de l'étude. Des études de Chem-seq (Anders L, *et al*, 2014) pourraient ainsi nous permettre de répondre à ce dernier point, en identifiant non seulement les cibles protéiques de notre inhibiteur (par spectrométrie de masse) mais également la distribution sur la chromatine de la molécule.

Ce travail a permis également de montrer que l'expression de *E2f1*, chez la souris, mais également chez l'Homme, était majoritairement, au sein des cellules endocrines, présente dans la cellule  $\beta$  pancréatique. Compte tenu de son rôle d'inhibiteur fort du facteur Arx, il serait intéressant d'induire une sur-expression de E2F1 spécifiquement dans la cellule  $\alpha$ . En collaboration avec le Dr Collombat (Nice, France), un étude sera réalisée en croisant nos souris RFC (décrites précédemment) avec des souris Glucagon-rtTA. Ces expériences pourraient peut être permettre une répression spécifique d'Arx au sein de la cellule  $\alpha$ , permettant ainsi sa trans-différenciation en une cellule  $\beta$  pancréatique comme démontré lors d'études de ré-expression de Pax4 au sein de la cellule  $\alpha$  (Collombat, *et al*, 2005). De plus, une étude de corrélation d'expression des gènes d'*E2f1* et d'Arx tend à montrer leurs expressions inverses en fonction de l'identité cellulaire  $\alpha$  ou  $\beta$  (Van Der Meulen, *et al*, en 2017) (Figure 38).



**Figure 38 : Expression des facteurs de transcription Arx et E2f1 au cours de la trans-différenciation des cellules  $\alpha$  vers beta.** Données issues du GSE88778 en libre accès de NCBI, publiées par Van Der Meulen, T, *et al*, 2017.

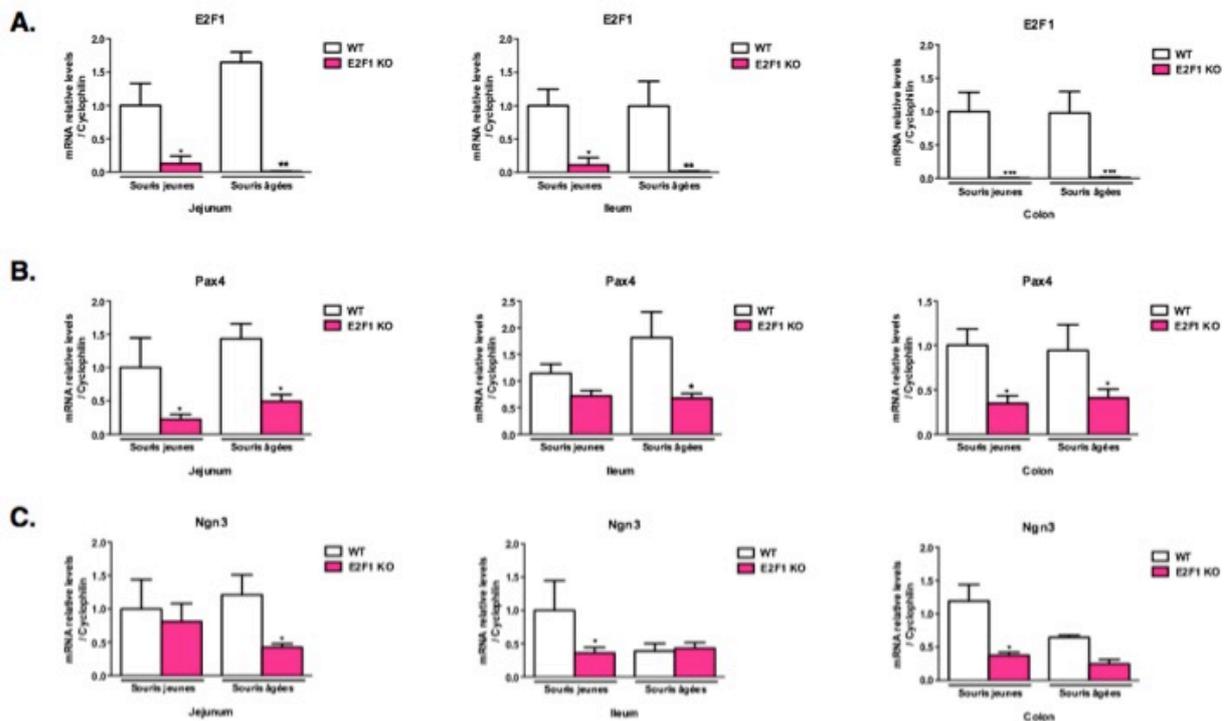
Il est également intéressant de noter, que, comme décrit précédemment, le changement de morphologie de l'îlot retrouvé chez les souris déficientes spécifiquement pour E2F1 dans la cellule  $\beta$  est commun à d'autres invalidations de gènes décrit dans la littérature. En effet, ce changement d'architecture est retrouvé chez les souris déficientes pour *Kir6.2* spécifiquement dans la cellule  $\beta$  (Seino S, *et al*, 2000). De même, la déficience en Glp1-R va entrainer également une hyperplasie des cellules  $\alpha$  pancréatiques. Ces 2 gènes ont un rôle primordial dans la fonction de la cellule  $\beta$  et sont régulés directement par E2F1.

Il serait intéressant de connaître l'équilibre précis qui existe au niveau cellulaire entre fonction et identité et de comprendre si la perte de fonction entraine la perte d'identité ou inversement.

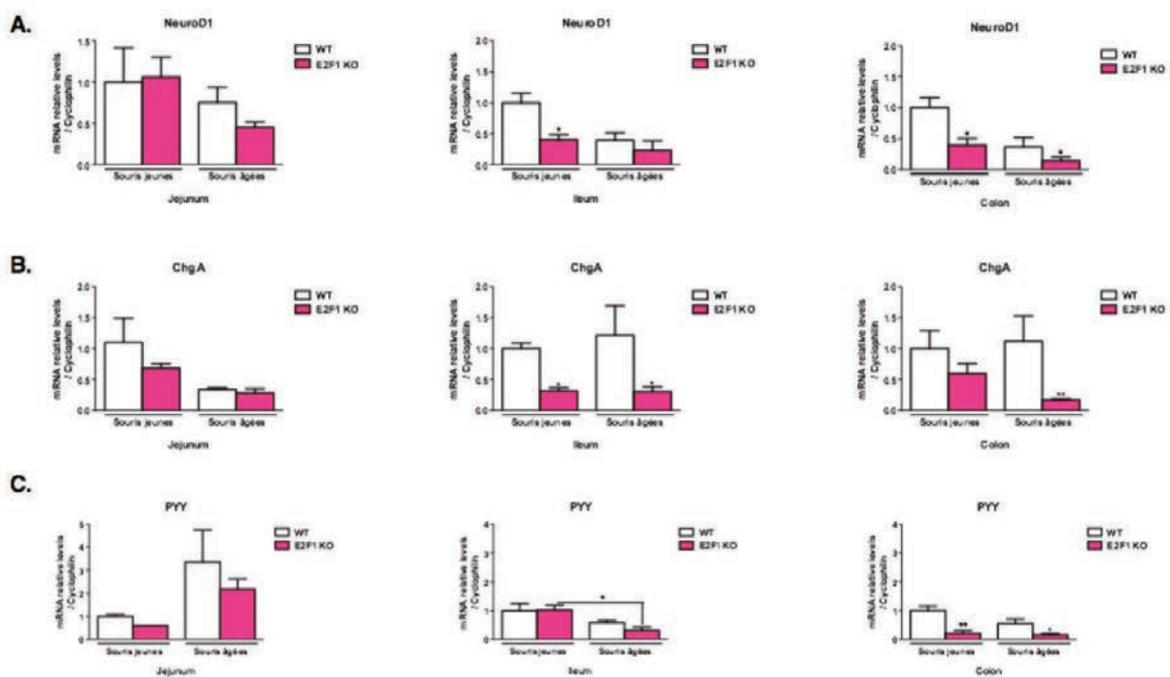
Des recherches récentes décrivent la présence de plusieurs sous population de cellules  $\beta$ , ainsi que leur hétérogénéité transcriptionnelle et épigénétique. Il serait ainsi intéressant de comprendre si ces différences peuvent influencer la plasticité cellulaire. Des données récentes ont montré que des cellules ayant perdu leur fonction sécrétrice  $\beta$ , mais capable de sécréter du glucagon, gardent leur empreinte transcriptionnelle « beta-like », ces gènes étant « en pause » et non totalement éteints (Roefs M, *et al*, 2017) .

Ainsi, la recherche actuelle dans le DT2 tend à étudier avec précision les mécanismes responsables de la trans-différenciation des cellules endocriniennes par des agents pharmacologiques, ou encore, dans des cas de DT1, d'induire une transdifférenciation du type cellulaire  $\alpha$  vers  $\beta$  (Ben Othman, *et al*, 2017). Les résultats présentés dans ce travail suggère que E2F1 pourrait également représenter un acteur clé dans ce scénario.

Pour conclure, transposer ces recherches de trans-différenciation aux autres types cellulaires permettrait d'en étudier les points communs et d'ouvrir de nouvelles possibilités thérapeutiques. Il existe en effet d'autres types cellulaires dont l'identité et la maturation sont dépendantes des mêmes facteurs de transcriptions tels que Arx, Pax4, Nkx2.2 et sensibles aux mêmes stimuli épigénétiques comme les variations des marques d'histones en H3K27 ou H3K4. Récemment des études du Dr Accili ont montré la capacité des cellules intestinales à se trans-différencier en cellules  $\beta$  pancréatiques, ouvrant ainsi la porte à des nouvelles voies thérapeutiques pour le DT1 (Talchai C *et al*, 2012 ; Bouchi R, *et al*, 2014). Ainsi, étant donné la similitude entre les souris E2F1 $\beta^{-/-}$  et les souris Foxo1 $^{-/-}$ , différents marqueurs « pan endocrine » ont été étudiés au sein des intestins de souris déficientes pour E2f1. De manière intéressante on remarque que E2f1 va agir de la même manière qu'au niveau du pancréas sur Pax4 ou Ngn3, induisant une diminution de leur expression (Fig 39A, B, C). De plus, la déficience d'E2f1 au sein de l'intestin va également conduire à la diminution de marqueurs « pan endocrine » de l'intestin tel que NeuroD1, ChgA ou encore PYY (Figure 40 A, B, C). Enfin, il est à noter que l'effet est accentué avec l'âge des animaux (6 mois versus 17 mois), mais également que l'effet augmente de l'intestin proximal vers l'intestin distal (soit du jéjunum vers le colon). Cette topographie est à mettre en parallèle avec la présence des cellules L, sécrétrices de GLP-1, qui voient leur nombre augmenter à mesure que l'on se concentre sur l'intestin distal.



**Figure 39 : La déficience d'E2f1 dans l'intestin tend à montrer une diminution significative des marqueurs de différenciation intestinaux tels que Pax4 et Ngn3.** PCR quantitative réalisée sur des intestins issus de souris E2f1<sup>-/-</sup> âgées de 6 et 17 mois. 5 souris composent chaque groupe.



**Figure 40 : La déficience d'E2f1 dans l'intestin tend à montrer une diminution significative des marqueurs « pan endocrine » tels que NeuroD1, ChgA et PYY.** PCR quantitative réalisée sur des intestins issus de souris E2f1<sup>-/-</sup> âgées de 6 et 17 mois. 5 souris composent chaque groupe.

Cependant les phénomènes de trans-différenciation donnent également naissance à d'autres pathologies, différentes du diabète, notamment au niveau du cerveau.

De nombreuses recherches actuelles visent à reprogrammer l'identité cellulaire neuronale afin de lutter contre les maladies neuro-dégénérative tel que la maladie d'Alzheimer (Smith DK, *et al*, 2016). Cette maladie présente de nombreux points commun avec le DT2. En effet, des mécanismes patho-physiologiques vont se chevaucher tels que les événements amyloïdogènes, le stress oxydatif ou encore le dysfonctionnement endothélial (De Matos, AM, *et al*, 2017).

Ces phénomènes sont également retrouvés au niveau du foie, où la plasticité cellulaire va, dans un contexte d'hépto-carcinome, conduire à l'augmentation des tumeurs, ainsi qu'à l'augmentation de leur hétérogénéité conduisant à une perte d'efficacité critique des différents traitements telle que la chimiothérapie (Cabillic F et Corlu A, 2016).

Ce processus de trans-différenciation est souvent à l'origine d'apparition des différents cancers tels que le cancer de la prostate, le cancer des poumons ou encore la leucémie (Cieslar-Pobuda A, *et al*, 2017).

Enfin, dernier organe capable d'une grande plasticité cellulaire : le tissu adipeux blanc. En effet, il a été récemment montré que ce dernier pouvait, par un phénomène nommé « brunissement », donner naissance à du tissu adipeux ayant des caractéristiques de graisse brune. Ce phénomène est lié à la stabilisation d'une protéine, Prdm16 (Ohno H, *et al*, 2012), également montré comme un régulateur du développement pancréatique (Benitez CM, *et al*, 2014).

Ce phénomène de brunissement peut être également régulé pharmacologiquement, notamment par le GABA (Jeremic N, *et al*, 2017).

## VIII. Bibliographie

1. Stafford D, Hornbruch A, Mueller PR, Prince VE. A conserved role for retinoid signaling in vertebrate pancreas development. *Development Genes and Evolution* [Internet]. 2004 Sep [cited 2017 Aug 1];214(9). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00427-004-0420-6>
2. Marchetti P, Lupi R, Bugliani M, Kirkpatrick CL, Sebastiani G, Grieco FA, et al. A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets. *Diabetologia*. 2012 Dec;55(12):3262–72.
3. Macdonald PM, Struhl G. A molecular gradient in early *Drosophila* embryos and its role in specifying the body pattern. *Nature*. 1986;324(6097):537–45.
4. Attwooll C, Oddi S, Cartwright P, Prosperini E, Agger K, Steensgaard P, et al. A Novel Repressive E2F6 Complex Containing the Polycomb Group Protein, EPC1, That Interacts with EZH2 in a Proliferation-specific Manner. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Jan 14;280(2):1199–208.
5. Rose SD, Kruse F, Swift GH, MacDonald RJ, Hammer RE. A single element of the elastase I enhancer is sufficient to direct transcription selectively to the pancreas and gut. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(3):2048–57.
6. Nishimura W, Kondo T, Salameh T, El Khattabi I, Dodge R, Bonner-Weir S, et al. A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic  $\beta$ -cells. *Developmental Biology*. 2006 May;293(2):526–39.
7. Taneera J, Lang S, Sharma A, Fadista J, Zhou Y, Ahlqvist E, et al. A Systems Genetics Approach Identifies Genes and Pathways for Type 2 Diabetes in Human Islets. *Cell Metabolism*. 2012 Jul;16(1):122–34.
8. Iberg-Badeaux A, Collombet S, Laurent B, van Oevelen C, Chin K-K, Thieffry D, et al. A transcription factor pulse can prime chromatin for heritable transcriptional memory. *Molecular and cellular biology*. 2017;37(4):e00372–16.
9. Poll AV, Pierreux CE, Lokmane L, Haumaitre C, Achouri Y, Jacquemin P, et al. A vHNF1/TCF2-HNF6 cascade regulates the transcription factor network that controls generation of pancreatic precursor cells. *Diabetes*. 2006;55(1):61–9.
10. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, others. Absence of S6K1 protects against age-and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*. 2004;431(7005):200.
11. Kim-Muller JY, Fan J, Kim YJR, Lee S-A, Ishida E, Blaner WS, et al. Aldehyde dehydrogenase 1a3 defines a subset of failing pancreatic  $\beta$  cells in diabetic mice. *Nature Communications*. 2016 Aug 30;7:12631.

12.

Brereton MF, Vergari E, Zhang Q, Clark A. A-, delta-and PP-cells: are they the architectural cornerstones of islet structure and co-ordination? *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2015;63(8):575–91.

13.

Altioik S, Xu M, and Bruce Spiegelman. PPAR $\gamma$  induces cell cycle withdrawal : inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down regulation of PP2A. *Genes and Development* 1998.11 :1987-1998.

14.

Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, others. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*. 1998;391(6667):594.

15.

Benitez CM, Qu K, Sugiyama T, Pauerstein PT, Liu Y, Tsai J, et al. An Integrated Cell Purification and Genomics Strategy Reveals Multiple Regulators of Pancreas Development. Attie A, editor. *PLoS Genetics*. 2014 Oct 16;10(10):e1004645.

16.

Reichert M, Eick D. Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation.

*Oncogene* [Internet]. 1999 [cited 2017 Aug 1];18(2). Available from:

<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authType=crawler&jrnl=09509232&AN=8917095&h=gXf6gKkn5CXjNv%2FI0P01Q4GtSN2tIq4iYHcCEexjJY%2B1tkyS5zYfatI67kKAex0RL2traDgmE7sqYPUVH3xQ%3D%3D&crl=c>

17.

Demirtas L, Guclu A, Erdur FM, Akbas EM, Ozcicek A, Onk D, et al. Apoptosis, autophagy & endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *The Indian journal of medical research*. 2016;144(4):515.

18.

Artner I, Le Lay J, Hang Y, Elghazi L, Schisler JC, Henderson E, Sosa Pineda B, Stein R. MafB an activator of the glucagon gene expressed in developing islet  $\alpha$  and  $\beta$  cells. *Diabetes*. Vol55, February 2006.

19.

Ueda H, m Howson JM, Esposito L, Heward J, others. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003;423(6939):506.

20.

Bagchi S, Weinmann R and Raychaudhuri P. The Retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the Transcription factor E2F. *Cell*, Vol 65, 1063-1072, June 14. 1991.

21.

Bellamy L, Casas JP, Hingorani A, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes : a systematic review and meta analysis. *Lancet* 373 :1773-79. 2009.

22.

Muller AF, Janssen JA, Hofland LJ, Lamberts SW, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, et al. Blockade of the growth hormone (GH) receptor unmasks rapid GH-releasing peptide-6-mediated tissue-specific insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(2):590–3.

23. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, others. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86(10) :5083-5086. 2001.
24. Jeremic N, Chaturvedi P, Tyagi SC. Browning of White Fat: Novel Insight Into Factors, Mechanisms, and Therapeutics: FAT BROWNING AND THEIR POTENTIAL AS THERAPEUTICS. *Journal of Cellular Physiology*. 2017 Jan;232(1):61–8.
25. Svensson P-A, Wahlstrand B, Olsson M, Froguel P, Falchi M, Bergman RN, et al. CDKN2B expression and subcutaneous adipose tissue expandability: Possible influence of the 9p21 atherosclerosis locus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014 Apr;446(4):1126–31.
26. Wenzel PL, Chong J-L, Sáenz-Robles MT, Ferrey A, Hagan JP, Gomez YM, et al. Cell proliferation in the absence of E2F1-3. *Developmental Biology*. 2011 Mar;351(1):35–45.
27. Bertoli C, Klier S, McGowan C, Wittenberg C, de Bruin RAM. Chk1 Inhibits E2F6 Repressor Function in Response to Replication Stress to Maintain Cell-Cycle Transcription. *Current Biology*. 2013 Sep;23(17):1629–37.
28. Jin L, Feng T, Shih HP, Zerda R, Luo A, Hsu J, et al. Colony-forming cells in the adult mouse pancreas are expandable in Matrigel and form endocrine/acinar colonies in laminin hydrogel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 Mar 5;110(10):3907–12.
29. Adams MR, Sears R, Nuckolls F, Leone G, Nevins JR. Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(10):3633–9.
30. Woo VC, Berard LD, Bajaj HS, Ekoé J-M, Senior PA. Considerations for Initiating a Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor in Individuals with Type 2 Diabetes Using Insulin. *Canadian Journal of Diabetes [Internet]*. 2017 May [cited 2017 Aug 1]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1499267117300011>
31. Jensen J, Pedersen EE, Galante P, Hald J, Heller RS, Ishibashi M, et al. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nature genetics*. 2000;24(1):36.
32. Molina J, Rodriguez-Diaz R, Fachado A, Jacques-Silva MC, Berggren P-O, Caicedo A. Control of Insulin Secretion by Cholinergic Signaling in the Human Pancreatic Islet. *Diabetes*. 2014 Aug 1;63(8):2714–26.
33. Métivier R, Gallais R, Tiffocche C, Le Péron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, et al. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature*. 2008 Mar 6;452(7183):45–50.

34.  
Fu M, Rao M, Bouras T, Wang C, Wu K, Zhang X, et al. Cyclin D1 Inhibits Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$ -mediated Adipogenesis through Histone Deacetylase Recruitment. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Apr 29;280(17):16934–41.
35.  
Sarruf DA, Iankova I, Abella A, Assou S, Miard S, Fajas L. Cyclin D3 Promotes Adipogenesis through Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor. *Molecular and Cellular Biology*. 2005 Nov 15;25(22):9985–95.
36.  
Qiu W-L, Zhang Y-W, Feng Y, Li L-C, Yang L, Xu C-R. Deciphering Pancreatic Islet  $\beta$  Cell and  $\alpha$  Cell Maturation Pathways and Characteristic Features at the Single-Cell Level. *Cell Metabolism*. 2017 May;25(5):1194–1205.e4.
37.  
Slack JM. Developmental biology of the pancreas. *Development*. 1995;121(6):1569–80.
38.  
Iglesias A, Murga M, Laresgoiti U, Skoudy A, Bernales I, Fullaondo A, et al. Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1/E2F2 double-mutant mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2004 May 15;113(10):1398–407.
39.  
Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes Mellitus and the  $\beta$  Cell: The Last Ten Years. *Cell*. 2012 Mar;148(6):1160–71.
40.  
MacDonald MJ, Longacre MJ, Stoker SW, Kendrick M, Thonpho A, Brown LJ, et al. Differences between Human and Rodent Pancreatic Islets: LOW PYRUVATE CARBOXYLASE, ATP CITRATE LYASE, AND PYRUVATE CARBOXYLATION AND HIGH GLUCOSE-STIMULATED ACETOACETATE IN HUMAN PANCREATIC ISLETS. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 May 27;286(21):18383–96.
41.  
Kedees MH, Grigoryan M, Guz Y, Teitelman G. Differential expression of glucagon and glucagon-like peptide 1 receptors in mouse pancreatic  $\alpha$  and beta cells in two models of  $\alpha$  cell hyperplasia. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009 Nov;311(1-2):69–76.
42.  
Francis BH, Baskin DG, Saunders DR, Ensinnck JW. Distribution of somatostatin-14 and somatostatin-28 gastrointestinal-pancreatic cells of rats and humans. *Gastroenterology*. 1990;99(5):1283–91.
43.  
Seino S, Iwanaga T, Nagashima K, Miki T. Diverse roles of K (ATP) channels learned from Kir6. 2 genetically engineered mice. *Diabetes*. 2000;49(3):311–8.
44.  
Glorian V, Allègre J, Berthelet J, Dumetier B, Boutanquoi P-M, Droin N, et al. DNA damage and S phase-dependent E2F1 stabilization requires the cIAP1 E3-ubiquitin ligase and is associated with K63-poly-ubiquitination on lysine 161/164 residues. *Cell Death and Disease*. 2017 May 25;8(5):e2816.

45.  
Hall E, Dayeh T, Kirkpatrick CL, Wollheim CB, Nitert MD, Ling C. DNA methylation of the glucagon-like peptide 1 receptor (GLP1R) in human pancreatic islets. *BMC medical genetics*. 2013;14(1):76.
46.  
Martín M, Gallego-Llamas J, Ribes V, Kedinger M, Niederreither K, Chambon P, et al. Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice. *Developmental Biology*. 2005 Aug;284(2):399–411.
47.  
Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA, et al. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2/M checkpoints. *Genes & development*. 2002;16(2):245–56.
48.  
Blanchet E, Annicotte J-S, Lagarrigue S, Aguilar V, Clapé C, Chavey C, et al. E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nature Cell Biology*. 2011 Aug 14;13(9):1146–52.
49.  
Phillips AC, Ernst MK, Bates S, Rice NR, Vousden KH. E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Molecular cell*. 1999;4(5):771–81.
50.  
Alla V, Kowtharapu BS, Engelmann D, Emmrich S, Schmitz U, Steder M, et al. E2F1 confers anticancer drug resistance by targeting ABC transporter family members and Bcl-2 via the p73/DNp73-miR-205 circuitry. *Cell Cycle*. 2012 Aug 15;11(16):3067–78.
51.  
Rosenfeldt MT, Bell LA, Long JS, O'prey J, Nixon C, Roberts F, et al. E2F1 drives chemotherapeutic drug resistance via ABCG2. *Oncogene*. 2014;33(32):4164.
52.  
Lai Q, Giralt A, Le May C, Zhang L, Cariou B, Denechaud P-D, et al. E2F1 inhibits circulating cholesterol clearance by regulating Pcsk9 expression in the liver. *JCI Insight* [Internet]. 2017 May 18 [cited 2017 Aug 1];2(10). Available from: <https://insight.jci.org/articles/view/89729>
53.  
Denechaud P-D, Lopez-Mejia IC, Giralt A, Lai Q, Blanchet E, Delacuisine B, et al. E2F1 mediates sustained lipogenesis and contributes to hepatic steatosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2015 Nov 30;126(1):137–50.
54.  
Chong J-L, Wenzel PL, Sáenz-Robles MT, Nair V, Ferrey A, Hagan JP, et al. E2f1–3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells. *Nature*. 2009 Dec 17;462(7275):930–4.
55.  
Humbert PO, Rogers C, Ganiatsas S, Landsberg RL, Trimarchi JM, Dandapani S, et al. E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Molecular cell*. 2000;6(2):281–91.
56.  
Van Amerongen MJ, Diehl F, Novoyatleva T, Patra C, Engel FB. E2F4 is required for cardiomyocyte proliferation. *Cardiovascular Research*. 2010 Apr 1;86(1):92–102.

57.

Sasagawa S, Nishimura Y, Hayakawa Y, Murakami S, Ashikawa Y, Yuge M, et al. E2F4 Promotes Neuronal Regeneration and Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Zebrafish. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 2016 May 9 [cited 2017 Aug 1];7. Available from:

<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphar.2016.00119/abstract>

58.

Di Stefano L, Jensen MR, Helin K. E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *The EMBO journal*. 2003;22(23):6289–98.

59.

Lv Y, Xiao J, Liu J, Xing F. E2F8 is a Potential Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Cancer*. 2017;8(7):1205–13.

60.

Fajas L, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J. E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Developmental cell*. 2002;3(1):39–49.

61.

Müller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E, et al. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes & development*. 2001;15(3):267–85.

62.

Anderson MS, Mackay F. Editorial overview: Autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*. 2015 Dec;37:v–vii.

63.

Lupi R, Mancarella R, Del Guerra S, Bugliani M, Del Prato S, Boggi U, et al. Effects of exendin-4 on islets from type 2 diabetes patients. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2008 Jun;10(6):515–9.

64.

Cam H, Dynlacht BD. Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer cell*. 2003;3(4):311–6.

65.

Chen H-Z, Tsai S-Y, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature Reviews Cancer*. 2009 Nov;9(11):785–97.

66.

Pedersen JK, Nelson SB, Jorgensen MC, Henseleit KD, Fujitani Y, Wright CVE, et al. Endodermal expression of Nkx6 genes depends differentially on Pdx1. *Developmental Biology*. 2005 Dec;288(2):487–501.

67.

Bramswig NC, Everett LJ, Schug J, Dorrell C, Liu C, Luo Y, et al. Epigenomic plasticity enables human pancreatic  $\alpha$  to  $\beta$  cell reprogramming. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(3):1275.

68.

Cleveland MH, Sawyer JM, Afelik S, Jensen J, Leach SD. Exocrine ontogenies: On the development of pancreatic acinar, ductal and centroacinar cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2012 Aug;23(6):711–9.

69.

Fatrai S, Elghazi L, Balcazar N, Cras-Meneur C, Krits I, and others. Akt induces  $\beta$  cell proliferation by regulating cyclin D1, Cyclin D2, and p21 levels and cyclin-dependent kinase-4 activity. *Diabetes*, vol 55. February 2006.

70.

Dessimoz J, Opoka R, Kordich JJ, Grapin-Botton A, Wells JM. FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior–posterior axis in vivo. *Mechanisms of Development*. 2006 Jan;123(1):42–55.

71.

Kim-Muller JY, Kim YJR, Fan J, Zhao S, Banks AS, Prentki M, et al. FoxO1 Deacetylation Decreases Fatty Acid Oxidation in  $\beta$ -Cells and Sustains Insulin Secretion in Diabetes. *Journal of Biological Chemistry*. 2016 May 6;291(19):10162–

72.

72.

Bouchi R, Foo KS, Hua H, Tsuchiya K, Ohmura Y, Sandoval PR, et al. FOXO1 inhibition yields functional insulin-producing cells in human gut organoid cultures. *Nature Communications* [Internet]. 2014 Jun 30 [cited 2017 Aug 1];5. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms5242>

73.

Froguel Ph, Vaxillaire M, Sun F, Velho G and others. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. Vol 356. 12 March 1992.

74.

Hannou SA, Wouters K, Paumelle R, Staels B. Functional genomics of the CDKN2A/B locus in cardiovascular and metabolic disease: what have we learned from GWASs? *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2015 Apr;26(4):176–84.

75.

Bandara LR, Buck VM, Zamanian M, Johnston LH, La Thangue NB. Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *The EMBO Journal*. 1993;12(11):4317.

76.

Morgan NG, Dhayal S. G-protein coupled receptors mediating long chain fatty acid signalling in the pancreatic beta-cell. *Biochemical Pharmacology*. 2009 Dec;78(12):1419–27.

77.

Talchai C, Xuan S, Kitamura T, DePinho RA, Accili D. Generation of functional insulin-producing cells in the gut by Foxo1 ablation. *Nature Genetics*. 2012 Mar 11;44(4):406–12.

78.

Sander M, Neubüser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes & development*. 1997;11(13):1662–73.

79.

Anders L, Guenther MG, Qi J, Fan ZP, Marineau JJ, Rahl PB, et al. Genome-wide localization of small molecules. *Nature Biotechnology*. 2013 Dec 15;32(1):92–6.

80.

Vestergaard ET, Gormsen LC, Jessen N, Lund S, Hansen TK, Moller N, et al. Ghrelin Infusion in Humans Induces Acute Insulin Resistance and Lipolysis Independent of Growth Hormone Signaling. *Diabetes*. 2008 Dec 1;57(12):3205–10.

81.

Andralojc KM, Mercalli A, Nowak KW, Albarello L, Calcagno R, Luzi L, et al. Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia*. 2009 Mar;52(3):486–93.

82.

Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2014 Feb;103(2):137–49.

83.

De Marinis YZ, Salehi A, Ward CE, Zhang Q, Abdulkader F, Bengtsson M, et al. GLP-1 Inhibits and Adrenaline Stimulates Glucagon Release by Differential Modulation of N- and L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel-Dependent Exocytosis. *Cell Metabolism*. 2010 Jun;11(6):543–53.

84.

Gosmain Y, Cheyssac C, Heddad Masson M, Dibner C, Philippe J. Glucagon gene expression in the endocrine pancreas: the role of the transcription factor Pax6 in  $\alpha$ -cell differentiation, glucagon biosynthesis and secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2011;13(s1):31–8.

85.

Ling Z, Wu D, Zambre Y, Flamez D, Drucker DJ, Pipeleers DG, et al. Glucagon-like peptide 1 receptor signaling influences topography of islet cells in mice. *Virchows Archiv*. 2001 Apr;438(4):382–7.

86.

Cornu M, Yang J-Y, Jaccard E, Poussin C, Widmann C, Thorens B. Glucagon-Like Peptide-1 Protects  $\alpha$ -Cells Against Apoptosis by Increasing the Activity of an Igf-2/Igf-1 Receptor Autocrine Loop. *Diabetes*. 2009 Aug 1;58(8):1816–25.

87.

Monji A, Mitsui T, Bando YK, Aoyama M, Shigeta T, Murohara T. Glucagon-like peptide-1 receptor activation reverses cardiac remodeling via normalizing cardiac steatosis and oxidative stress in type 2 diabetes. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2013 Aug 1;305(3):H295–H304.

88.

Poitout V, Amyot J, Semache M, Zarrouki B, Hagman D, Fontés G. Glucolipototoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2010 Mar;1801(3):289–98.

89.

Vieira E, Salehi A, Gylfe E. Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic  $\alpha$  cells. *Diabetologia*. 2007 Jan 5;50(2):370–9.

90.

Bailey SJ, Ravier MA, Rutter GA. Glucose-Dependent Regulation of  $\alpha$ -Aminobutyric Acid (GABAA) Receptor Expression in Mouse Pancreatic Islet  $\alpha$ -Cells. *Diabetes*. 2007 Feb 1;56(2):320–7.

91.

Ciccarelli M, Vastolo V, Albano L, Lecce M, Cabaro S, Liotti A, et al. Glucose-induced expression of the homeotic transcription factor Prep1 is associated with histone post-translational modifications in skeletal muscle. *Diabetologia*. 2016 Jan;59(1):176–86.

92.

for the Botnia Study Group, Almgren P, Lehtovirta M, Isomaa B, Sarelin L, Taskinen MR, et al. Heritability and familiarity of type 2 diabetes and related quantitative traits in the Botnia Study. *Diabetologia*. 2011 Nov;54(11):2811–9.

93.

Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance—a population-based twin study. *Diabetologia*. 1999;42(2):139–45.

94.

Bort R, Signore M, Tremblay K, Barbera JPM, Zaret KS. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Developmental Biology*. 2006 Feb;290(1):44–56.

95.

Pedersen ALW, Terkildsen Maindal H, Juul L. How to prevent type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes? A systematic review of behavioural interventions. *Primary Care Diabetes* [Internet]. 2017 Jun [cited 2017 Aug 1]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751991817300785>

96.

Dorrell C, Schug J, Canaday PS, Russ HA, Tarlow BD, Grompe MT, et al. Human islets contain four distinct subtypes of  $\beta$  cells. *Nature Communications*. 2016 Jul 11;7:11756.

97.

NAKAGAWA E, NAGAYA N, OKUMURA H, ENOMOTO M, Hideo OYA, Fumiaki ONO, et al. Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clinical Science*. 2002;103(3):325–8.

98.

Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell*. 1986;45(2):219–28.

99.

Riedel MJ, Asadi A, Wang R, Ao Z, Warnock GL, Kieffer TJ. Immunohistochemical characterisation of cells co-producing insulin and glucagon in the developing human pancreas. *Diabetologia*. 2012 Feb;55(2):372–81.

100.

Fajas L, Annicotte J-S, Miard S, Sarruf D, Watanabe M, Auwerx J. Impaired pancreatic growth,  $\beta$  cell mass, and  $\beta$  cell function in E2F1  $-/-$  mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2004 May 1;113(9):1288–95.

101.

Ghazaryan S, Sy C, Hu T, An X, Mohandas N, Fu H, et al. Inactivation of Rb and E2f8 Synergizes To Trigger Stressed DNA Replication during Erythroid Terminal Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*. 2014 Aug 1;34(15):2833–47.

102.

Pierce AM, Gimenez-Conti IB, Schneider-Broussard R, Martinez LA, Conti CJ, Johnson DG. Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and

- nullizygous for p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(15):8858–63.
- 103.
- Roefs MM, Carlotti F, Jones K, Wills H, Hamilton A, Verschoor M, et al. Increased vimentin in human  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology*. 2017 Jun;233(3):217–27.
- 104.
- Bonner C, Kerr-Conte J, Gmyr V, Queniat G, Moerman E, Thévenet J, et al. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic  $\alpha$  cells triggers glucagon secretion. *Nature Medicine*. 2015 Apr 20;21(5):512–7.
- 105.
- Zhao Y, Tan J, Zhuang L, Jiang X, Liu ET, Yu Q. Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(44):16090–5.
- 106.
- Rodriguez-Diaz R, Abdulreda MH, Formoso AL, Gans I, Ricordi C, Berggren P-O, et al. Innervation Patterns of Autonomic Axons in the Human Endocrine Pancreas. *Cell Metabolism*. 2011 Jul;14(1):45–54.
- 107.
- Tsantoulis PK, Gorgoulis VG. Involvement of E2F transcription factor family in cancer. *European Journal of Cancer*. 2005 Nov;41(16):2403–14.
- 108.
- Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *The EMBO journal*. 1993;12(11):4251.
- 109.
- Dai C, Brissova M, Hang Y, Thompson C, Poffenberger G, Shostak A, et al. Islet-enriched gene expression and glucose-induced insulin secretion in human and mouse islets. *Diabetologia*. 2012 Mar;55(3):707–18.
- 110.
- Zunft H-J. J. Peil: Grundlagen der Biomathematik. Studienreihe Biowissenschaften. 466 Seiten, 147 Abb., 55 Tab. VEB Gustav Fischer Verlag. Jena 1985. Preis: 21.80 M für die DDR. 21.80 DM für das Ausland. *Molecular Nutrition & Food Research*. 1986;30(7):700–700.
- 111.
- Johson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*. Vol 365. 23 September 1993.
- 112.
- Bell LA, Ryan KM. Life and death decisions by E2F-1. *Cell death and differentiation*. 2004;11(2):137.
- 113.
- Ben-Othman N, Vieira A, Courtney M, Record F, Gjernes E, Avolio F, et al. Long-Term GABA Administration Induces A Cell-Mediated Beta-like Cell Neogenesis. *Cell*. 2017 Jan;168(1-2):73–85.e11.
- 114.
- Bao W, Yeung E, Tobias DK, Hu FB, Vaag AA, Chavarro JE, et al. Long-term risk of type 2 diabetes mellitus in relation to BMI and weight change among women with a

history of gestational diabetes mellitus: a prospective cohort study. *Diabetologia*. 2015 Jun;58(6):1212–9.  
115.

Artner I, Hang Y, Mazur M, Yamamoto T, Guo M, Lindner J, et al. MafA and MafB regulate genes critical to  $\beta$ -cells in a unique temporal manner. *Diabetes*. 2010;59(10):2530–9.  
116.

Kataoka K, Han S, Shioda S, Hirai M, Nishizawa M, Handa H. MafA Is a Glucose-regulated and Pancreatic  $\beta$ -Cell-specific Transcriptional Activator for the Insulin Gene. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Dec 20;277(51):49903–10.  
117.

Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia*. 2010 Dec;53(12):2504–8.  
118.

Sugden MC, Holness MJ. Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2006 Jan;112(3):139–49.  
119.

Matsuoka T -a., Zhao L, Artner I, Jarrett HW, Friedman D, Means A, et al. Members of the Large Maf Transcription Family Regulate Insulin Gene Transcription in Islet Cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2003 Sep 1;23(17):6049–62.  
120.

Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010 Sep;11(9):621–32.  
121.

Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(4):1607–11.  
122.

Taylor BL, Liu F-F, Sander M. Nkx6.1 Is Essential for Maintaining the Functional State of Pancreatic Beta Cells. *Cell Reports*. 2013 Sep;4(6):1262–75.  
123.

Greenwood AL, Li S, Jones K, Melton DA. Notch signaling reveals developmental plasticity of Pax4+ pancreatic endocrine progenitors and shunts them to a duct fate. *Mechanisms of Development*. 2007 Feb;124(2):97–107.  
124.

Light WH, Brickner JH. Nuclear pore proteins regulate chromatin structure and transcriptional memory by a conserved mechanism. *Nucleus*. 2013 Sep;4(5):357–60.  
125.

Newsholme P, Cruzat V, Arfuso F, Keane K. Nutrient regulation of insulin secretion and action. *Journal of Endocrinology*. 2014 May 27;221(3):R105–R120.  
126.

Collombat P. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes & Development*. 2003 Oct 15;17(20):2591–603.

127.

Stanger BZ, Tanaka AJ, Melton DA. Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):886–91.

128.

Harrison KA, Thaler J, Pfaff SL, Gu H, Kehrl JH. Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice. *Nature genetics*. 1999;23(1):71–5.

129.

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. *Developmental Cell*. 2009 Dec;17(6):849–60.

130.

Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*. 2010;2(3):135–45.

131.

Adrian TE, Bloom SR, Hermansen K, Iversen J. Pancreatic polypeptide, glucagon and insulin secretion from the isolated perfused canine pancreas. *Diabetologia*. 1978;14(6):413–7.

132.

Schwartz TW. Pancreatic polypeptide: a hormone under vagal control. *Gastroenterology*. 1983;85(6):1411–25.

133.

Tiscornia OM, Negri GA, Otero G, López Mingorance FN, Waisman H, Tiscornia-Wasserman PG. Pancreatic polypeptide: a review of its involvement in neuro-endocrine reflexes, islet-acinar interactions and ethanol-evoked physiopathologic pancreatic gland changes. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana [Internet]*. 2015 [cited 2017 Aug 1];45(2). Available from: <http://www.redalyc.org/html/1993/199341085013/>

134.

Dhawan S, Georgia S, Tschen S, Fan G, Bhushan A. Pancreatic  $\beta$  Cell Identity Is Maintained by DNA Methylation-Mediated Repression of Arx. *Developmental Cell*. 2011 Apr;20(4):419–29.

135.

Gao T, McKenna B, Li C, Reichert M, Nguyen J, Singh T, et al. Pdx1 Maintains  $\beta$  Cell Identity and Function by Repressing an  $\alpha$  Cell Program. *Cell Metabolism*. 2014 Feb;19(2):259–71.

136.

Pologer S, Kalma Y, Berkovich E, Ginsberg D. E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene*. 21,437-446. 2002.

137.

Porse BT, Pedersen TA, Xu X, Lindberg B, and others. E2F repression by C/EBP $\alpha$  is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. *Cell*. Vol 107, 247-258. October 19 2001.

138.

Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPAR $\gamma$  agonists Induce a White-to-Brown Fat Conversion through Stabilization of PRDM16 Protein. *Cell Metabolism*. 2012 Mar;15(3):395–404.

139.

Lu Z, Marcelin G, Bauzon F, Wang H, Fu H, Le Dun S, et al. pRb is an obesity suppressor in hypothalamus and high-fat diet inhibits pRb in this location. *The EMBO journal*. 2013;32(6):844–57.

140.

Zhan L, Huang C, Meng XM, Song Y, Wu XQ, Miu CG, et al. Promising roles of mammalian E2Fs in hepatocellular carcinoma. *Cellular Signalling*. 2014 May;26(5):1075–81.

141.

Pugliese A, Zeller M, Fernandez Jr A, Zalcborg LJ, and others. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variation at the INS VNTR-IDD2 susceptibility locus for type 1 diabetes.

*Nature*.1997

142.

Rayanagoudar G, Hashi AA, Zamora J, Khan KS, Hitman GA, Thangaratnam S. Quantification of the type 2 diabetes risk in women with gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis of 95,750 women. *Diabetologia*. 2016 Jul;59(7):1403–11.

143.

Zhang Q, Bengtsson M, Partridge C, Salehi A, Braun M, Cox R, et al. R-type Ca<sup>2+</sup>-channel-evoked CICR regulates glucose-induced somatostatin secretion. *Nature Cell Biology*. 2007 Apr;9(4):453–60.

144.

Bonnefond A, Froguel P. Rare and Common Genetic Events in Type 2 Diabetes: What Should Biologists Know? *Cell Metabolism*. 2015 Mar;21(3):357–68.

145.

Shaaban G, Oriowo M, Al-Sabah S. Rate of Homologous Desensitization and Internalization of the GLP-1 Receptor. *Molecules*. 2016 Dec 26;22(1):22.

146.

Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 2006 Aug 28;25(38):5220–7.

147.

Scimè A, Grenier G, Huh MS, Gillespie MA, Bevilacqua L, Harper M-E, et al. Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1 $\alpha$ . *Cell Metabolism*. 2005 Nov;2(5):283–95.

148.

Roed SN, Wismann P, Underwood CR, Kulahin N, Iversen H, Cappelen KA, et al. Real-time trafficking and signaling of the glucagon-like peptide-1 receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014 Feb;382(2):938–49.

149.

Richon VM, Lyle RE, McGehee RE. Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(15):10117–24.

150.

Mahanic CS, Budhavarapu V, Graves JD, Li G, Lin W-C. Regulation of E2 Promoter Binding Factor 1 (E2F1) Transcriptional Activity through a Deubiquitinating Enzyme, UCH37. *Journal of Biological Chemistry*. 2015 Oct 30;290(44):26508–22.

151.

Cabillic F, Corlu A. Regulation of Transdifferentiation and Retrodifferentiation by Inflammatory Cytokines in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2016 Oct;151(4):607–15.

152.

Fajas Lluís. Adipogenesis : cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Ann Med* 2003.

153.

Ishida S, Huang E, Zuzan H, Spang R, Leone G, West M, et al. Role for E2F in Control of Both DNA Replication and Mitotic Functions as Revealed from DNA Microarray Analysis. *Molecular and Cellular Biology*. 2001 Jul 15;21(14):4684–99.

154.

Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, others. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature*. 2000;407(6804):645.

155.

Rutter WJ, Kemp JD, Bradshaw WS, Clark WR, Ronzio RA, Sanders TG. Regulation of specific protein synthesis in cytodifferentiation. *J Cell Physiol*. 1968.

156.

Aguilar V, Alliouachene S, Sotiropoulos A, Sobering A, Athea Y, Djouadi F, et al. S6 Kinase Deletion Suppresses Muscle Growth Adaptations to Nutrient Availability by Activating AMP Kinase. *Cell Metabolism*. 2007 Jun;5(6):476–87.

157.

Bhavadharini B, Uma R, Saravanan P, Mohan V. Screening and diagnosis of gestational diabetes mellitus – relevance to low and middle income countries. *Clinical Diabetes and Endocrinology [Internet]*. 2016 Dec [cited 2017 Aug 1];2(1). Available from: <http://clindiabetesendo.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40842-016-0031-y>

158.

Li H, Arber S, Jessell TM, Edlund H. Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlx9. *Nature genetics [Internet]*. 1999 [cited 2017 Aug 1];23(1). Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authType=crawler&jrnl=10614036&AN=8816492&h=ViLM4fe%2F9DKXMPJ4BTOgfVBW2FCn587ISThJXC0%2B%2B8Mvjz8CN41uXhR4gRWPzvKpdlcFjKTUst5XF%2FHJ%2Bn2sgQ%3D%3D&crl=c>

159.

Furuta M, Zhou A, Webb G, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, et al. Severe Defect in Proglucagon Processing in Islet A-cells of Prohormone Convertase 2 Null Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Jul 20;276(29):27197–202.

160.

Yoshida S, Ohbo K, Takakura A, Takebayashi H, Okada T, Abe K, et al. Sgn1, a Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Delineates the Salivary Gland Duct Cell Lineage in Mice. *Developmental Biology*. 2001 Dec;240(2):517–30.

161.

Morales L, Pena K, Kim D, Lieman J. SHP-2 and PTP-pest induction during Rb-E2F associated apoptosis. *Cellular and Molecular Biology Letters [Internet]*. 2012 Jan 1 [cited 2017 Aug 1];17(3). Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/cmb.2012.17.issue-3/s11658-012-0020-9/s11658-012-0020-9.xml>

162.

Kumar M, Jordan N, Melton D, Grapin-Botton A. Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. *Developmental Biology*. 2003 Jul;259(1):109–22.

163.

Tschen S-I, Georgia S, Dhawan S, Bhushan A. Skp2 Is Required for Incretin Hormone-Mediated  $\beta$ -Cell Proliferation. *Molecular Endocrinology*. 2011 Dec;25(12):2134–43.

164.

Gromada J, Høy M, Buschard K, Salehi A, Rorsman P. Somatostatin inhibits exocytosis in rat pancreatic  $\alpha$ -cells by Gi2-dependent activation of calcineurin and depriving of secretory granules. *The Journal of physiology*. 2001;535(2):519–32.

165.

Braun M, Ramracheya R, Amisten S, Bengtsson M, Moritoh Y, Zhang Q, et al. Somatostatin release, electrical activity, membrane currents and exocytosis in human pancreatic delta cells. *Diabetologia*. 2009 Aug;52(8):1566–78.

166.

Hauge-Evans AC, King AJ, Carmignac D, Richardson CC, Robinson ICAF, Low MJ, et al. Somatostatin Secreted by Islet  $\delta$ -Cells Fulfills Multiple Roles as a Paracrine Regulator of Islet Function. *Diabetes*. 2009 Feb 1;58(2):403–11.

167.

Seymour PA, Freude KK, Tran MN, Mayes EE, Jensen J, Kist R, et al. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(6):1865–70.

168.

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 15;138(4):653–65.

169.

Srikanta S, Ganda OP, Jackson RA, and others. Type I diabetes mellitus in monozygotic twins : chronic progressive beta cell dysfunction. *Annals of Internal Medicine*. 1983.

170.

DeNicola M, Du J, Wang Z, Yano N, Zhang L, Wang Y, et al. Stimulation of glucagon-like peptide-1 receptor through exendin-4 preserves myocardial performance and prevents cardiac remodeling in infarcted myocardium. *AJP: Endocrinology and Metabolism*. 2014 Oct 15;307(8):E630–E643.

171.

Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PI, Shuldiner AR, et al. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(3):241–50.

172.

Krapp A, Knöfler M, Ledermann B, Bürki K, Berney C, Zoerkler N, et al. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes & development*. 1998;12(23):3752–63.

173.

Pin CL, Rukstalis JM, Johnson C, Konieczny SF. The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *The Journal of Cell Biology*. 2001 Nov 12;155(4):519–30.

174.

Kim SY, Rane SG. The Cdk4-E2f1 pathway regulates early pancreas development by targeting Pdx1+ progenitors and Ngn3+ endocrine precursors. *Development*. 2011 May 15;138(10):1903–12.

175.

Annicotte J-S, Blanchet E, Chavey C, Iankova I, Costes S, Assou S, et al. The CDK4–pRB–E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nature Cell Biology*. 2009 Aug;11(8):1017–23.

176.

Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *British Journal of Cancer [Internet]*. 2004 Jun 8 [cited 2017 Aug 1]; Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.bjc.6601894>

177.

Li FX, Zhu JW, Tessem JS, Beilke J, Varella-Garcia M, Jensen J, et al. The development of diabetes in E2f1/E2f2 mutant mice reveals important roles for bone marrow-derived cells in preventing islet cell loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(22):12935–40.

178.

Petrucco S, Wellauer PK, Hagenbüchle O. The DNA-binding activity of transcription factor PTF1 parallels the synthesis of pancreas-specific mRNAs during mouse development. *Molecular and cellular biology*. 1990;10(1):254–64.

179.

Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. 1991;65(6):1053–61.

180.

Cao Z, Wang X. The endocrine role between  $\beta$  cells and intra-islet endothelial cells. *Endocrine journal*. 2014;61(7):647–54.

181.

Kieffer TJ, Francis Habener J. The glucagon-like peptides. *Endocrine reviews*. 1999;20(6):876–913.

182.

Bach J-F, Chatenoud L. The Hygiene Hypothesis: An Explanation for the Increased Frequency of Insulin-Dependent Diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012 Feb 1;2(2):a007799–a007799.

183.

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics*. 2001;27(1):20.

184.

Courtney M, Gjernes E, Druelle N, Ravaud C, Vieira A, Ben-Othman N, et al. The Inactivation of Arx in Pancreatic  $\alpha$ -Cells Triggers Their Neogenesis and Conversion into Functional  $\beta$ -Like Cells. Habener J, editor. *PLoS Genetics*. 2013 Oct 31;9(10):e1003934.

185.

Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet*. 2006;368(9548):1696–705.

186.

Hang Y, Yamamoto T, Benninger RKP, Brissova M, Guo M, Bush W, et al. The MafA Transcription Factor Becomes Essential to Islet  $\beta$ -Cells Soon After Birth. *Diabetes*. 2014 Jun 1;63(6):1994–2005.

187.

Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H. The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development*. 1996;122(5):1409–16.

188.

Schisler JC, Jensen PB, Taylor DG, Becker TC, Knop FK, Takekawa S, et al. The Nkx6. 1 homeodomain transcription factor suppresses glucagon expression and regulates glucose-stimulated insulin secretion in islet beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(20):7297–302.

189.

Ritz-Laser B, Estreicher A, Gauthier BR, Mamin A, Edlund H, Philippe J. The pancreatic beta-cell-specific transcription factor Pax-4 inhibits glucagon gene expression through Pax-6. *Diabetologia*. 2002;45(1):97–107.

190.

Johnson BA, Aloor HL, Moody CA. The Rb binding domain of HPV31 E7 is required to maintain high levels of DNA repair factors in infected cells. *Virology*. 2017 Jan;500:22–34.

191.

Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes & development*. 2000;14(19):2393–409.

192.

Goodrich DW, Wang NP, Qian Y-W, Eva Y-HL, Lee W-H. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell*. 1991;67(2):293–302.

193.

Fajas L, Egler V, Reiter R, Hansen J, Kristiansen K, Debril M-B, et al. The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPAR $\gamma$  and adipocyte differentiation. *Developmental cell*. 2002;3(6):903–10.

194.

Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CVE. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature Genetics*. 2002 Sep;32(1):128–34.

195.

Collombat P. The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the  $\beta$ - and  $\delta$ -cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development*. 2005 Jul 1;132(13):2969–80.

196.

Smith DK, He M, Zhang C-L, Zheng JC. The therapeutic potential of cell identity reprogramming for the treatment of aging-related neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology* [Internet]. 2016 Feb [cited 2017 Aug 1]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008215300678>

197.

Song HY, Rothe M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(13):6721–5.

198.

Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai M-J. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes & development*. 1995;9(8):1009–19.

199.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell*. 2006 Feb;124(3):471–84.

200.

Bramswig NC, Kaestner KH. Transcriptional regulation of  $\alpha$ -cell differentiation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2011;13(s1):13–20.

201.

Ciešlar-Pobuda A, Knoflach V, Ringh MV, Stark J, Likus W, Siemianowicz K, et al. Transdifferentiation and reprogramming: Overview of the processes, their similarities and differences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2017 Jul;1864(7):1359–69.

202.

Yamasaki L, Jacks T, Bronson R, Goillot E, Harlow E, Dyson NJ. Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell*. 1996;85(4):537–48.

203.

Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nature Genetics*. 2010 Jul;42(7):579–89.

204.

Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Pociot F, et al. Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2005;54(10):2995–3001.

205.

Herold KC, Vignali DAA, Cooke A, Bluestone JA. Type 1 diabetes: translating mechanistic observations into effective clinical outcomes. *Nature Reviews Immunology*. 2013 Mar 25;13(4):243–56.

206.

Warnotte C, Nenquin M, Henquin J-C. Unbound rather than total concentration and saturation rather than unsaturation determine the potency of fatty acids on insulin secretion. *Molecular and cellular endocrinology*. 1999;153(1):147–53.

207.

Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, and others. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nature*. 1997.

208.

Van der Meulen T, Mawla AM, DiGrucchio MR, Adams MW, Nies V, Dólleman S, et al. Virgin Beta Cells Persist throughout Life at a Neogenic Niche within Pancreatic Islets. *Cell Metabolism*. 2017 Apr;25(4):911–926.e6.

209.

Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, and others. Association between an oncogene and an anti-oncogene : the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*. 1988.

210.

Yang YP, Thorel F, Boyer DF, Herrera PL, Wright CVE. Context specific a to  $\beta$  cell reprogramming by forced Pdx1 expression. *Genes and Development*. 25 :1680-1685. 2011.

## IX. Annexes

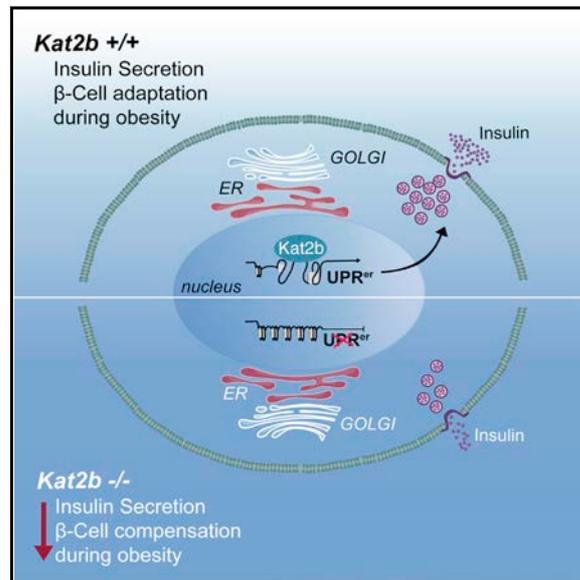
### 1. *KAT2B* is required for pancreatic $\beta$ cell adaptation to metabolic stress by controlling the unfolded protein response

Article

## Cell Reports

### KAT2B Is Required for Pancreatic Beta Cell Adaptation to Metabolic Stress by Controlling the Unfolded Protein Response

#### Graphical Abstract



#### Authors

Nabil Rabhi, Pierre-Damien Denechaud, Xavier Gromada, ..., Lluís Fajas, Philippe Froguel, Jean-Sébastien Annicotte

#### Correspondence

p.froguel@imperial.ac.uk (P.F.), jean-sebastien.annicotte@inserm.fr (J.-S.A.)

#### In Brief

Rabhi et al. reveal a role for Kat2b in the control of insulin secretion and pancreatic  $\beta$  cell adaptation to metabolic stress through cell-autonomous regulation of the unfolded protein response (UPR). These data collected demonstrate that Kat2b expression is decreased in diabetic islets and suggest molecular links among KAT2B, the UPR, and diabetes.

#### Highlights

- The expression of UPR markers is altered in diabetic islets
- Loss of *Kat2b* contributes to defective insulin secretion and  $\beta$  cell compensation
- KAT2B regulates an UPR gene program in pancreatic  $\beta$  cells
- KAT2B expression is reduced in mouse and human diabetic  $\beta$  cells

#### Accession Numbers

GSE78860

Rabhi et al., 2016, Cell Reports 15, 1–11  
May 3, 2016 ©2016 The Authors  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.079>

CellPress

## *Cdkn2a* deficiency promotes adipose tissue browning

### ***Cdkn2a* deficiency promotes adipose tissue browning**

**Nabil Rabhi<sup>1, 2, 3, 8, 9</sup>, Sarah Anissa Hannou<sup>1, 2, 3, 8</sup>, Xavier Gromada<sup>1, 2, 3, 8</sup>, Elisabet Salas<sup>1, 2, 3</sup>, Isabel C. Lopez-Mejia<sup>4</sup>, Emmanuelle Durand<sup>1, 2, 3</sup>, Iandry Rabearivelo<sup>1, 2, 3</sup>, Amélie Bonnefond<sup>1, 2, 3</sup>, Charlène Carney<sup>1, 2, 3</sup>, Emilie Caron<sup>5</sup>, Xi Yao<sup>6</sup>, Christian Dani<sup>6</sup>, Lluís Fajas<sup>4</sup>, Philippe Froguel<sup>1, 2, 3, 7, 10\*</sup> and Jean-Sébastien Annicotte<sup>1, 2, 3, 10, 11\*</sup>**

<sup>1</sup> Lille University, UMR 8199 - EGID, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> CNRS, UMR 8199, F-59000 Lille, France

<sup>3</sup> Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

<sup>4</sup> Center for Integrative Genomics, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

<sup>5</sup> INSERM, UMR S-1172, Development and Plasticity of Postnatal Brain, F-59000 Lille, France

<sup>6</sup> Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV, Faculté de Médecine, F-06107 Nice Cedex 2, France

<sup>7</sup> Departments of Genomics of Common Disease, School of Public Health, Imperial College London, Hammersmith Hospital, London W12 0NN, UK

<sup>8</sup> These authors contributed equally

<sup>9</sup> Present address: Department of Biochemistry, Boston University School of Medicine, MA02118, USA

<sup>10</sup> Senior authors

<sup>11</sup> Lead contact

\*Correspondence: jean-sebastien.annicotte@inserm.fr (J.-S. A.) and p.froguel@imperial.ac.uk (P.F.)

UMR 8199 (CNRS / Université de Lille 2 / Institut Pasteur de Lille)  
Faculté de Médecine - Pôle recherche  
1 place de Verdun  
59045 Lille Cedex - France  
Phone: +33.(0)3 74 00 81 00

Running title: *Cdkn2a* and adipose tissue browning