

UNIVERSITE STRASBOURG I - LOUIS PASTEUR
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

THESE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Strasbourg I
Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Jean-Sébastien ANNICOTTE
Le 16 janvier 2004

**Etude des fonctions pancréatiques du récepteur nucléaire
orphelin Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1) et du facteur de
transcription E2F1**

Directeur de Thèse :

Pr. Johan AUWERX

Membres du jury et rapporteurs :

Pr. Raphaël SCHARFMANN (Rapporteur)

Pr. Bernard THORENS (Rapporteur)

Dr. Daniel METZGER (Rapporteur)

Dr. Gérard GRADWOHL (Examineur)

À Noah
À Audrey

La première personne que j'aimerais remercier est Audrey. Son amour, sa patience, sa bonne humeur m'ont permis d'en arriver là. Son soutien de chaque instant, dans les bons comme les mauvais moments, m'a énormément aidé pendant ces années de thèse. Merci.

Noah, l'amour de ma vie (à égalité avec sa maman). Rien que de voir son sourire me remplit de joie et me fait oublier les problèmes. En tout cas, le plus beau résultat de ma thèse ! Merci pour ton innocence.

Un grand merci à mes parents, Manu, ma famille, mes beaux-parents, Séb, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes recherches.

Je tiens à remercier les Drs Johan Auwerx et Kristina Schoonjans.

Un grand grand grand merci à Stéphane Rocchi, Frédéric Picard, Lluís Fajas, Sylvie Klieber, Viviane Egler, Coralie Hologne, Stéphanie Miard, Laurent Dubuquoy, pour leur amitié, mais aussi pour l'ambiance qu'ils ont mise au labo et surtout au « Giraf' Café » et autre « Rafiot ». Le pull-over qui tourne... À refaire absolument !

Merci à tous les membres du laboratoire et aux personnes de l'IGBMC pour leur amitié et leurs conseils.

Enfin, à tous mes amis de Lille et des quatre coins de la France, du Luxembourg, d'Italie, venus nous rendre visite pendant ce périple strasbourgeois : merci.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	9
I. La superfamille des récepteurs nucléaires.....	9
I.1 Généralités.....	9
I.2 Structure des récepteurs nucléaires.....	11
I.2.1 Le domaine A/B.....	12
I.2.2 Le domaine C de liaison à l'ADN (DBD).....	12
I.2.3 Le domaine D.....	13
I.2.4 Le domaine de liaison du ligand (LBD, domaine E ou EF).....	13
I.3 Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires.....	14
II. Le Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1).....	16
II.1 Expression tissulaire et cellulaire.....	17
II.2 Ligand, modulation de son activité transcriptionnelle et régulation de son expression.....	18
II.3 Fonctions.....	19
II.3.1 Rôle au cours du développement embryonnaire.....	19
II.3.2 LRH-1 et le métabolisme du cholestérol.....	20
II.3.2.1 La synthèse d'acides biliaires.....	20
II.3.2.2 Le métabolisme des hormones stéroïdiennes.....	22
II.3.3 LRH-1 et cancer.....	23
III. Le facteur de transcription E2F1.....	24
III.1 Généralités.....	24
III.2 Structure protéique et modulation de son activité.....	24
III.3 Régulation transcriptionnelle par E2Fs.....	27
III.4 Les E2Fs activateurs.....	28
III.5 Les E2Fs répresseurs.....	29
III.6 Rôles physiologiques des E2Fs.....	30

III.7 E2F1 : gène suppresseur de tumeur ou oncogène ?.....	31
--	----

IV. Le pancréas..... 31

IV.1 Généralités.....	31
-----------------------	----

IV.2 Le développement du pancréas.....	32
--	----

IV.2.1 Régionalisation antéro-postérieure de l'endoderme.....	33
---	----

IV.2.2 Signaux extra-cellulaires, facteurs intra-cellulaires et formation des bourgeons pancréatiques.....	33
---	----

IV.2.2.1 Les signaux extra-cellulaires.....	33
---	----

IV.2.2.2 Les facteurs intra-cellulaires.....	36
--	----

IV.2.3 Prolifération de l'ébauche pancréatique : rôle des interactions mésenchyme-épithélium.....	37
--	----

IV.2.4 Différenciation des cellules endocrines et exocrines.....	39
--	----

IV.2.4.1 Différenciation des cellules endocrines.....	40
---	----

IV.2.4.1.1 Initiation de la différenciation endocrine.....	40
--	----

IV.2.4.1.2 Formation des îlots de Langerhans.....	42
---	----

IV.2.4.2 Différenciation des cellules exocrines.....	43
--	----

IV.3 Rôles du pancréas.....	45
-----------------------------	----

IV.3.1 La fonction exocrine.....	45
----------------------------------	----

IV.3.2 La fonction endocrine.....	46
-----------------------------------	----

IV.3.2.1 Généralités.....	46
---------------------------	----

IV.3.2.2 L'insuline.....	47
--------------------------	----

IV.3.2.2.1 La sécrétion d'insuline.....	47
---	----

IV.3.2.2.2 Les voies de signalisation de l'insuline.....	49
--	----

IV.3.2.2.2.1 Le récepteur à l'insuline.....	49
---	----

IV.3.2.2.2.2 La transmission du signal insulinique.....	50
---	----

IV.3.2.2.2.3 Contrôle négatif de la signalisation insulinique.....	51
--	----

IV.4 Maladies liées au dysfonctionnement pancréatique.....	52
--	----

IV.4.1 Le diabète.....	52
------------------------	----

IV.4.2 Le cancer du pancréas.....	54
-----------------------------------	----

IV.4.3 La pancréatite.....	55
----------------------------	----

BUT DU TRAVAIL..... 57

I. Etudier la régulation de l'expression de LRH-1 au cours du développement pancréatique chez la souris.....	57
II. Etudier le rôle de E2F1 dans la prolifération du pancréas et le diabète	57
TRAVAUX PERSONNELS.....	58
I. Régulation de l'expression de LRH-1 au cours du développement pancréatique.....	58
I.1 Résultats : publication 1 : «Pancreatic-Duodenal Homeobox 1 Regulates Expression of Liver Receptor Homolog 1 during Pancreas Development », <i>Molecular and Cellular Biology</i> , Oct.2003, Vol. 23 , No.19, p. 6713-6724.....	58
I.2 Conclusion et Perspectives.....	71
II. Rôle de E2F1 dans la prolifération du pancréas et le diabète.....	73
II.1 Resultats : publication 2 : « Impaired pancreatic growth, β -cell mass and function in E2F1 <i>-/-</i> mice », <i>Journal of Clinical Investigations</i> , in press (2003).....	73
II.2 Conclusion et Perspectives.....	103
DISCUSSION GENERALE.....	104
BIBLIOGRAPHIE.....	107
SUMMARY.....	125

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyriboNucléique	ERK2	Extracellular signal regulated kinase
AF-1	Activation function-1	FGF	Fibroblast Growth factor
AF-2	Activation function-2	FTZ	Fushi tarazu gene
AFP	α -fetoprotein	FTZ-F1	Fushi tarazu factor 1
AMPc	Adénine monophosphate cyclique	FXR	Farnesol X receptor
AR	Androgen Receptor	GIP	Gastric inhibitory peptide
ARN	Acide ribonucléique	GLP-1	Glucagon like peptide-1
ASBT	Apical Sodium dependent Bile acid Transporter	Glut-	Glucose transporter
bHLH	Basic helix-loop-helix	GR	Récepteur des glucocorticoïdes
BMP	Bone morphogenic protein	Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
CBP	CREB binding protein	GSK3	Glycogen synthase 3
C/EBP	CCAAT enhancer binding protein	HAT	Histone acetyl transferase
CEL	Cholesterol ester lipase	HDAC	Histone desacetylase
CETP	Cholesteryl ester transfer protein	HGF	Hepatic Growth factor
ChIP	Chromatin immunoprecipitation	HNF-	Hepatocyte nuclear factor
COX-2	Cyclo-oxygénase-2	HRE	Hormone response element
CTE	Carboxy-terminal extension	IFN γ	Interféron gamma
DAX-1	Dosage sensitive sex reversal-Adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome	IGF-	Insulin growyeh factor
DBD	DNA binding domain	IL-	Interleukine
DP	Differentiation regulated transcription factor protein	IPF-1	Insulin promoting factor-1
EGF	Epidermal Growth factor	IR	Insulin receptor
ER	Estrogen receptor	IRR	Insulin receptor related
		IRS	Insulin receptor substrate
		ISL1	Islet 1
		KIR6.2	inward rectifying potassium channel
		LBD	Ligand binding domain
		LRH-1	Liver receptor homolog-1
		LXR	Liver X receptor

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	PXR	Pregnane X receptor
MMP-	Métalloprotéase de la matrice	RA	Retinoic acid
MR	Mineralocorticoid receptor	RAR	Retinoic acid receptor
MRP-3	Multi drug resistance protein-3	RXR	Retinoid X receptor
PDGF	Platelet derived growth factor	SH-2	Src homology-2
PDX1	Pancreatic duodenal homeobox 1	SHP	Short heterodimer partner
PI(3)K	Phosphatidylinositol 3 kinase	Shc	Src homologous and collagen protein
PKA	Protein kinase A	SR-BI	Scavenger récepteur type B class I
PKB	Protein kinase B	SRC-1	Stéroïd récepto co-activateur 1
PKC	Protein kinase C	SUR1	Sulfonylurea receptor1
PP	Pancreatic polypeptide	TGF β	Transforming growth factor β
PP2A	Protéine phosphatase 2A	TNF α	Facteur nécrosant les tumeurs alpha
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor	VCAM	Vascular cell adhesion molécule
PR	Progesteron receptor	VEGF	Vascular endothelial Growth factor
Ptf1a	Pancreas transcription factor1a		
PTB	Phosphotyrosine binding		
PTPase	Phosphotyrosine phosphatase		

INTRODUCTION

I. La superfamille des récepteurs nucléaires

I.1 Généralités

Les récepteurs nucléaires représentent une des plus large famille de facteurs de transcription, comprenant 48 membres identifiés dans le génome humain ¹. L'activité transcriptionnelle de la plupart des récepteurs nucléaires est contrôlée par la fixation de petites molécules lipophiliques, comme des hormones ou des métabolites incluant par exemple les acides gras, les oxysterols ou des xénobiotiques. De nombreux récepteurs nucléaires ont été clonés avant l'identification de leur ligand, et furent appelés récepteurs nucléaires orphelins. L'identification de leur ligand, naturel ou synthétique, a permis « d'adopter » certains récepteurs orphelins ². La découverte de l'importance de ces récepteurs dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme a entraîné une recherche intensive de nouveaux ligands pouvant être utilisés dans le traitement préventif ou thérapeutique de maladies métaboliques comme le diabète, l'athérosclérose ou l'obésité (pour revue, voir ³).

Le concept que de petites molécules lipophiliques pouvaient réguler le fonctionnement cellulaire par interaction avec des protéines intracellulaires, appelées récepteurs, fut proposé il y a plus de 30 ans ⁴. La preuve formelle de ce concept est apparue avec le clonage moléculaire et l'étude fonctionnelle des récepteurs aux hormones stéroïdiennes au milieu des années 1980 ⁵⁻⁷. L'isolation et la caractérisation de récepteurs activés par des ligands non-stéroïdiens, comme la vitamine A ^{8,9} ou l'hormone thyroïde ^{10,11}, suggéraient que les récepteurs nucléaires pouvaient réguler l'expression de gènes en réponse à une grande variété de ligands lipophiles ¹². Suite à ces travaux, un grand nombre de récepteurs pour des hormones nucléaires ont été identifiés, ainsi que des récepteurs orphelins, sans ligand connu. Dans le même temps, les premiers récepteurs nucléaires ont été identifiés chez l'insecte ^{13,14}. L'identification chez la drosophile du récepteur à l'ecdysone ¹⁵ comme membre de la superfamille des récepteurs nucléaires suggère la nature universelle de ces protéines et montre que ces récepteurs se sont

développés antérieurement à la divergence entre vertébrés et invertébrés. Une autre avancée importante a été réalisée avec la découverte « rétinoid X receptor » (RXR) et de son ligand, l'acide 9-cis rétinoïque, identifiant le partenaire obligatoire à l'hétérodimérisation de certains récepteurs nucléaires ¹⁶.

Les membres de cette superfamille ont été initialement classifiés en quatre groupes, selon la nature de leur ligand et leur mode de fixation à l'ADN ^{17,18} (figure 1). La classe I regroupe les récepteurs aux hormones stéroïdes se fixant à l'ADN sous forme d'homodimères. Cette classe comprend le récepteur à l'androgène (AR), aux glucocorticoïdes (GR), aux œstrogènes (ER), aux minéralocorticoïdes (MR) et à la progestérone (PR). La classe II correspond aux récepteurs nucléaires s'hétérodimérisant avec le RXR, et se fixant sur des répétitions directes de séquences d'ADN. La classe III regroupe les récepteurs nucléaires orphelins ou activés par des ligands non-stéroïdiens se fixant à l'ADN sous forme d'homodimère. Enfin, la classe IV comprend les récepteurs nucléaires orphelins monomériques. Cependant, au cours de ces dernières années, le nombre de séquences codant des récepteurs nucléaires a dépassé les 300, rendant difficile la classification. Une nouvelle nomenclature, basée sur l'évolution de deux domaines conservés chez les récepteurs nucléaires, a été proposée en 1999 (¹⁹ et <http://www.ens-lyon.fr/LBMC>).

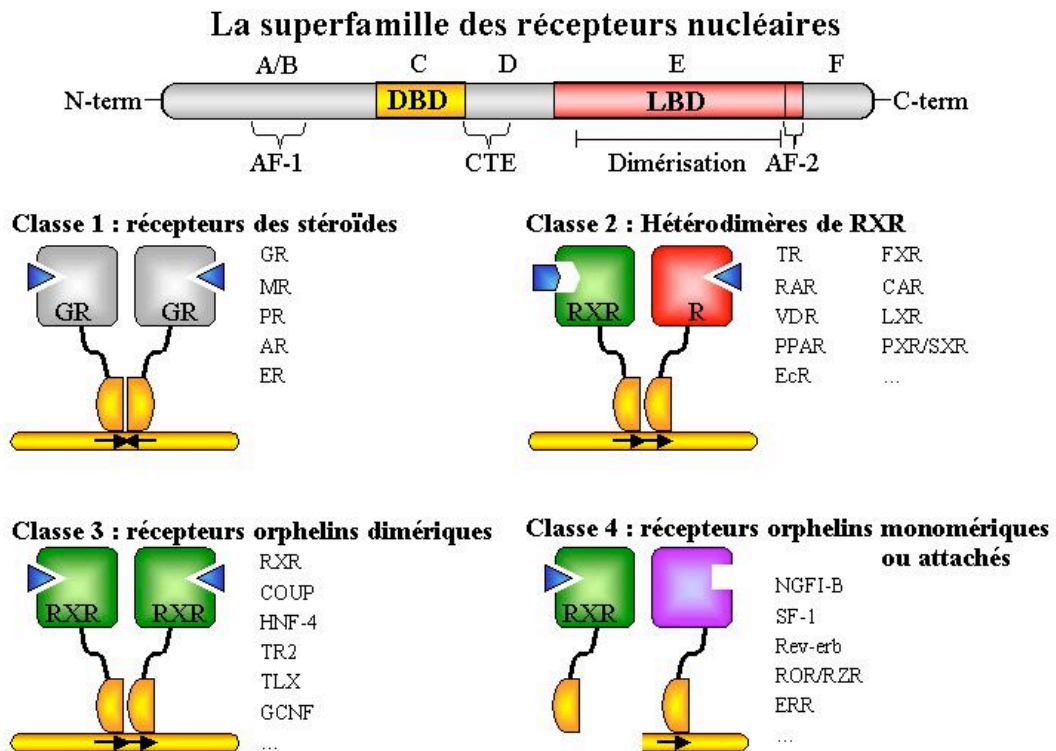


Figure 1. Organisation structurale et fonctionnement des récepteurs nucléaires. Les récepteurs nucléaires ont une structure constituée de six domaines (A-F) ayant des fonctions différentes. Tous les récepteurs nucléaires sont constitués d'une partie centrale, le domaine de liaison à l'ADN (DBD : région C) très conservé, caractérisé par deux structures en doigts de zinc. La moitié C-terminale du récepteur contient un domaine de liaison au ligand (LBD : région E) contenant l'AF-2 intervenant dans la transactivation. Entre ces deux domaines se trouve un domaine charnière (région D) de taille variable. Du côté N-Terminale la région (A/B) variable contient l'AF-1 qui intervient dans la transactivation indépendante du ligand. La région C-Terminale variable (F) est présente dans la plupart des récepteurs nucléaires, mais sa fonction est encore très mal connue. (D'après Olefsky JM *et al* 20).

I.2 Structure des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires ont une structure modulaire caractérisée par la présence de 5 domaines ayant chacun une fonction spécifique (figure 1). Le domaine amino-terminal contient une région A/B peu conservée possédant une fonction d'activation de la transcription indépendante de la fixation du ligand (AF-1). Le domaine central de liaison à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain, region C) est très conservé et contient deux structures en doigt de zinc établissant des contacts avec des séquences nucléotidiques spécifiques appelées éléments de réponse. La région D est une région charnière, ayant un rôle conformationnel. La région

carboxy-terminale (LBD : Ligand Binding Domain, région E et parfois F) est nécessaire à la liaison du ligand et à l'éventuelle dimérisation du récepteur. Chez la majorité des récepteurs nucléaires, cette région contient un second domaine très conservé d'activation transcriptionnelle dépendante du ligand (AF-2).

I.2.1 Le domaine A/B

La région A/B amino-terminale démontre une forte variabilité en séquence primaire ainsi qu'en longueur. En effet, les unités transcriptionnelles codant les récepteurs nucléaires utilisent l'épissage alternatif, différents promoteurs, ainsi que des sites d'initiation de la traduction distincts, générant différents domaines A/B, conduisant à l'expression de plusieurs isoformes pour un même gène. Cette région contient une fonction d'activation de la transcription appelée AF-1. L'étude des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone a clairement démontré que cette région A/B possède des activités transcriptionnelles dépendante du promoteur et du type cellulaire²¹⁻²³, suggérant que la région amino-terminale de ces récepteurs peut interagir avec des corégulateurs spécifiques d'un type cellulaire. Bien que peu d'homologie peptidique existe au sein des membres de la superfamille, les domaines A/B ont démontré des propriétés similaires pour différents récepteurs nucléaires. Par exemple, les séquences peptidiques de cette région peuvent servir de substrat pour des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation par les « Mitogen-Activated Protein Kinase » (MAPK)²⁴.

I.2.2 Le domaine C de liaison à l'ADN (DBD)

Les récepteurs nucléaires se fixent à l'ADN sous forme de monomères, d'hétérodimères ou d'homodimères sur des séquences d'ADN cibles appelées « Hormone Response Element (HRE) » (pour revue, voir²⁵). Ce site de fixation contient un ou une répétition directe (DR_n), inversée (IR_n) ou « everted » (ER_n) de demi-sites hexanucléotidiques consensus séparés par un nombre variable de nucléotides (entre 0 et 7).

Les récepteurs aux stéroïdes reconnaissent la séquence consensus AGAACA, alors que le récepteur aux œstrogènes et les autres récepteurs nucléaires se fixent sur des séquences de type AGGTCA. Pour les sites HRE monomériques, le demi-site est flanqué en 5' d'une séquence riche en A/T. La séquence du demi-site peut différer considérablement du consensus, et il est souvent rare de trouver des HRE naturels contenant deux demi-sites parfaitement conservés. Cependant, pour les HRE dimériques, un seul demi-site conservé est suffisant pour conférer une haute affinité de liaison à l'homo- ou à l'hétérodimère.

Le domaine C est la région la plus conservée dans la superfamille des récepteurs nucléaires. Elle est constituée de deux motifs en doigt de zinc codés par 60-70 acides aminés, et d'une extension carboxy-terminale (CTE) d'approximativement 25 amino-acides. Des expériences de mutagenèse dirigée sur cette région C ont permis d'identifier deux sous-domaines impliqués pour le premier dans la reconnaissance directe des demi-sites et localisé dans le premier doigt de zinc (boîte P) ²⁶, et pour le second dans le processus de dimérisation et présent dans le deuxième doigt de zinc (boîte D et DR) ^{27,28}. Le CTE joue le rôle d'interface permettant les interactions protéine-ADN et protéine-protéine.

I.2.3 Le domaine D

Le domaine D est une région charnière constituée d'acides aminés faisant le lien entre le domaine C et le domaine de liaison du ligand (domaine E/F). Cette région, très flexible, contribue à la spécificité et la polarité de la fixation du récepteur à l'ADN ²⁵. Ce domaine, qui change de conformation après fixation du ligand, a été impliqué dans la fixation de corépresseurs ^{29,30} ainsi que dans les mouvements noyau-cytoplasme ³¹.

I.2.4 Le domaine de liaison du ligand (LBD, domaine E ou EF)

Le LBD est un domaine multifonctionnel permettant la fixation du ligand, la dimérisation, l'interaction avec les protéines de choc thermique et corégulateurs, la localisation nucléaire et la transactivation. Des expérimentations de cristallographie aux

rayons X suggèrent que les LBDs des différents récepteurs nucléaires possèdent des structures similaires. Ils sont constitués de 11 à 13 hélices α organisées en trois couches antiparallèle, plaçant le site de liaison du ligand à l'intérieur du LBD ³²⁻³⁸. L'activation dépendante du ligand nécessite la présence d'un motif hautement conservé LXXLL (L pour leucine et X pour tout autre acide aminé), appelé AF-2, et localisée à l'extrémité carboxy-terminale du LBD. La transactivation ligand-dépendante requiert le recrutement de coactivateurs, un processus dans lequel le domaine AF-2 joue un rôle primordial ³⁹.

La région F, absente chez certains récepteurs nucléaires, a une fonction peu connue. Il semble que la région F du récepteur aux œstrogènes jouerait un rôle dans la spécificité du ligand et influencerait l'activation transcriptionnelle ⁴⁰.

I.3 Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires

Le modèle d'action d'un récepteur nucléaire est généralement représenté par un récepteur cytoplasmique inactif, en complexe avec des protéines de choc thermique, qui, une fois activé par la fixation de son ligand, se retrouve transloqué dans le noyau afin d'activer la transcription de ses gènes cibles. Bien que ce modèle soit vrai pour les récepteurs aux hormones stéroïdes ⁴¹, la plupart des récepteurs nucléaires sont constitutivement nucléaires et souvent liés à l'ADN en absence de leur ligand. Il est également reconnu qu'en l'absence de ligand, les récepteurs nucléaires agissent comme de forts répresseurs de la transcription ^{29,42-46}. Afin de moduler la transcription de leur gène cibles, les récepteurs nucléaires interagissent avec des protéines corégulatrices (figure 2). Ils ont été montrés associés à de nombreux composants de la machinerie transcriptionnelle, à des corépresseurs et à des coactivateurs (pour revue, voir ^{47,48}). Les corépresseurs fonctionnent en recrutant des protéines ayant une activité histone désacétylase (HDAC), fonction permettant de maintenir la chromatine dans un état de répression de la transcription ⁴⁹. Après fixation du ligand, le récepteur change de conformation, le complexe répresseur se dissocie du récepteur, lui permettant d'interagir avec le ou les coactivateurs. Certains coactivateurs possèdent une activité histone acétylase (HAT), menant à la dérpression de la structure chromatinienne. D'autres coactivateurs possèdent une

activité ATPase, comme BRG1 ou hBrm, permettant le remodelage local de la chromatine^{50,51}. Basé sur ces résultats, un modèle de régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires a été établi : 1) en l'absence de récepteur, la chromatine démontre une activité basale d'acétylation des histones et de transcription ; 2) la chromatine compactée est dans un état de répression dû à une forte désacétylation des histones, et aucune transcription en présence d'un récepteur nucléaire sans ligand n'est possible ; 3) la chromatine décompactée devient active avec de hauts niveaux d'acétylation des histones menant à une transcription en présence du récepteur activé par la fixation de son ligand⁵². Cependant, l'ouverture de la chromatine n'est pas suffisante pour l'activation transcriptionnelle, indiquant que des interactions supplémentaires entre récepteurs nucléaires et machinerie transcriptionnelle sont requises pour réguler l'expression génique⁵³.

Enfin, les récepteurs nucléaires peuvent également réguler la transcription de gènes via des interactions directes avec d'autres facteurs de transcription, un processus qui ne dépend pas de la fixation sur l'ADN du récepteur nucléaire (pour revue, voir^{54,55}).

Nos connaissances sur la régulation de l'expression génique par les récepteurs nucléaires se sont étendues depuis ces dernières années, principalement grâce à l'observation que non seulement l'interaction du récepteur avec l'ADN est importante dans la réponse transcriptionnelle, mais aussi que les coactivateurs et corépresseurs sont fondamentaux dans la transmission des signaux hormonaux à la machinerie transcriptionnelle. De plus, la détermination des structures cristallographiques du LBD des récepteurs nucléaires ont permis d'identifier les mécanismes par lesquels ces récepteurs modifient l'état transcriptionnel de la cellule. Il est de plus en plus évident que les récepteurs nucléaires ont un impact majeur sur la croissance, la différenciation, le métabolisme, la reproduction et la morphogénèse. Compte tenu de l'importance des récepteurs nucléaires en physiologie humaine, leur rôle dans le développement de certaines maladies et leur importance en tant que cible thérapeutique, une compréhension détaillée de leur fonction aura un impact non seulement en biologie humaine mais également dans le développement de nouveaux médicaments pour le traitement de pathologies comme le cancer, le diabète, l'athérosclérose ou encore l'obésité.

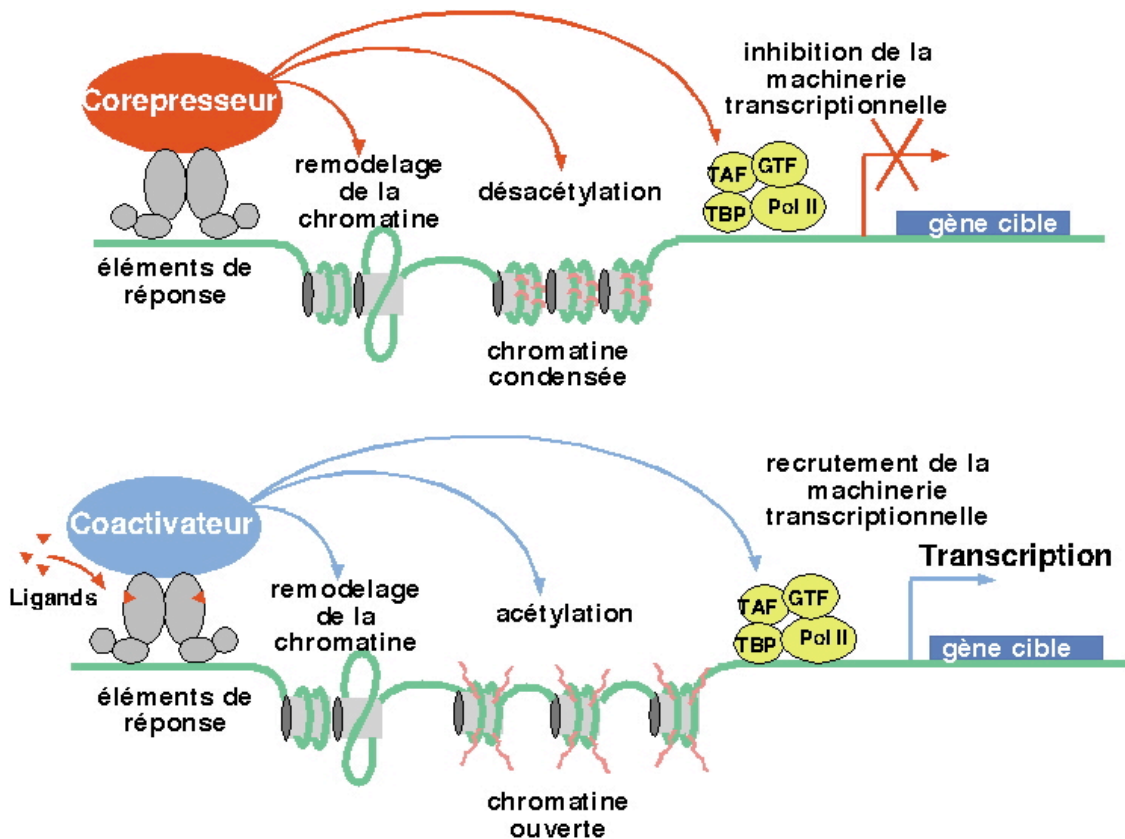


Figure 2 : Corépresseurs, coactivateurs et récepteurs nucléaires. En absence de ligand, les récepteurs nucléaires sont associés à des complexes de corépresseurs, recrutent des protéines ayant une activité histone désacétylase. La désacétylation des histones entraîne un compaction de la chromatine, conduisant à une répression transcriptionnelle. La fixation du ligand entraîne une libération des corépresseurs, un recrutement de coactivateurs et une décompaction de la chromatine, permettant l'activation de la transcription.

II. Le Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1)

Drosophila fushi tarazu factor 1 (FTZ-F1, NR5A3) est un récepteur nucléaire orphelin qui régule la transcription du gène fushi tarazu (*ftz*) très tôt au cours du développement^{18,19,56-58}. L'homologue de FTZ-F1 le mieux caractérisé est le « steroidogenic factor 1 » (SF-1, NR5A1), un récepteur nucléaire orphelin exprimé dans les organes stéroïdogéniques ainsi que dans des régions particulières de l'hypothalamus, dans les cellules pituitaires gonadotropiques, où il régule l'expression de gènes cruciaux dans les processus développementaux et physiologiques (pour une revue, voir⁵⁹). Le liver receptor homolog-1 (LRH-1, NR5A2) est un récepteur nucléaire orphelin caractérisé comme un paralogue de SF-1. Il a été d'abord cloné chez la souris (GenBank accession number M81385). Des orthologues de LRH-1 ont été ensuite découverts dans plusieurs espèces, chez le xenope

(FTZ-F1-related receptor xFF1)⁶⁰, le poulet (orphan receptor 2.0)⁶¹, le rat (fetoprotein transcription factor)⁶², le poisson zèbre (FTZ-F1 related receptor zFF1)⁶³, la grenouille (*Rana rugosa* FTZ-F1)⁶⁴. Les orthologues humains ont été reportés sous différents noms : le « pancreas homolog receptor 1 » (PHR-1),⁶⁵; le « human fetoprotein transcription factor » (hFTF)⁶²; le « human B1-binding factor » (hB1F)⁶⁶; le « CYP7a promoter binding factor » (CPF)⁶⁷. Les membres de la sous-famille FTZ-F1 possèdent une séquence caractéristique de 30 acides aminés, dénommée la boîte FTZ-F1. Cette boîte, localisée dans la région carboxy-terminale adjacente au domaine C, est très conservée entre les différentes espèces. Les membres de cette sous-famille se fixent à l'ADN sous forme de monomère sur des séquences consensus de type 5'-PyCAAGGPyCPu-3' (où Py est C ou T, Pu est A ou G)⁵⁶. Quand on compare cette séquence à la séquence du demi-site classique AGGTCA, on remarque qu'elle possède trois bases additionnelles en 5'. La boîte FTZ-F1 joue un rôle fondamental dans la liaison du récepteur nucléaire à l'ADN, puisqu'elle permet la reconnaissance de ces trois bases, et confère une forte spécificité d'interaction entre ADN et protéine.

Le gène de LRH-1 humain est localisé sur le chromosome 1, position q31.3-32.1⁶², entre les microsatellites D1S2622 et D1S306 (Annicotte JS & Auwerx J, communications personnelles). Ce gène s'étend sur plus de 140 kilobases et contient 9 exons. Comme pour la plupart des récepteurs nucléaires, le gène codant LRH-1 est susceptible de subir un épissage alternatif pour générer au moins deux isoformes exerçant des fonctions régulatrices distinctes⁶⁶.

II.1 Expression tissulaire et cellulaire

LRH-1 est exprimé très tôt au cours du développement embryonnaire de souris, au jour embryonnaire 7 (e7)^{68,69}. A ce stade, son expression est localisée dans l'endoderme, l'ectoderme neural ainsi que dans certains tissus extra-embryonnaire comme l'endoderme pariétal attaché à la membrane de Reichert, l'endoderme du « yolk sac », l'amnion et le chorion. LRH-1 est ensuite retrouvé dans des tissus d'origine endodermique, comme le foie, le pancréas endocrine et exocrine, l'intestin, la glande salivaire^{68,69}. LRH-1 est également

exprimé dans les arcs branchiaux, la moelle épinière, ainsi que dans certaines régions du cerveau embryonnaire, comme l'hypothalamus et le thalamus (Annicotte JS & Auwerx J, communications personnelles). Une expression a également été détectée dans le cordon ombilical, le palais, ainsi que dans la langue. Ce n'est qu'à un stade plus tardif du développement (e17) que LRH-1 adopte son profil d'expression adulte, avec une expression qui s'éteint dans le pancréas endocrine, et reste confiné dans l'intestin aux cryptes de Lieberkhun^{68,69}. Chez l'adulte, LRH-1 est fortement exprimé dans le pancréas exocrine, le foie, l'intestin^{69,70}. Ce récepteur nucléaire est également exprimé dans l'ovaire^{71,72}, ainsi que dans les préadipocytes⁷³.

II.2 Ligand, modulation de son activité transcriptionnelle et régulation de son expression

A l'heure actuelle, aucun ligand n'a été trouvé pour LRH-1. Ce récepteur nucléaire est considéré comme constitutivement actif. Cependant, des analyses structurales semblent révéler la présence d'une large poche hydrophobe dans son domaine E capable d'accueillir une petite molécule lipophile comme ligand⁷⁴.

Bien qu'aucun ligand connu ne puisse à l'heure actuelle moduler l'activité de LRH-1, des modifications post-traductionnelles semblent jouer un rôle dans la régulation de son activité. En effet, il semble que la région charnière D de LRH-1 possède deux sites de phosphorylation cibles de la protéine kinase activée par les mitogènes Erk2 (MAPK Erk2) (résultats non publiés). LRH-1 pourrait donc être activé en réponse à la fixation de facteurs de croissance, comme le « Fibroblast Growth Factor » (FGF), le « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF), le « Heparin Binding EGF-Like Growth Factor » (HBEGF) ou l'« Epidermal Growth Factor » (EGF) afin de répercuter ces signaux extracellulaires en modifiant l'expression de ses gènes cibles. Étant donnée l'importance de ces facteurs de croissance dans les mécanismes de prolifération/différenciation cellulaire, il est tentant d'envisager un rôle pour LRH-1 dans ces processus.

D'autre part, les récepteurs nucléaires orphelins « Short Heterodimer Partner » (SHP), gène cible de LRH-1, et « Dosage sensitive sex reversal-Adrenal hypoplasia congenital critical

region on the X chromosome », gene 1 (DAX-1) interagissent avec ce dernier et agissent en corépresseur en inhibant l'activité transcriptionnelle de LRH-1⁷⁵⁻⁷⁸. Ces deux récepteurs nucléaires sont atypiques puisqu'ils ne possèdent pas, contrairement aux autres membres de la superfamille, de domaine de liaison à l'ADN. D'autres corégulateurs modifient l'activité de ce récepteur nucléaire, comme AIB1, GRIP1, CBP/P300, SMRT1 et SRC1⁷⁴. De plus, Liu *et al.* ont également montré que Prox1 est un corépresseur de Ff1a et Ff1b, orthologues chez le poisson zèbre de LRH-1 et SF-1, respectivement⁷⁹.

Concernant la régulation transcriptionnelle de ce récepteur nucléaire, le promoteur de souris de LRH-1 est activé *in vitro* par les facteurs de transcription GATA-1, 2, 5 et 6, HNF-4 α , Nkx 2.5, et probablement par les protéines de type « basic Helix Loop Helix » (bHLH)⁸⁰. LRH-1 est également capable de réguler sa propre expression⁸⁰. En ce qui concerne le promoteur humain, les facteurs de transcription HNF-1, HNF-3 β et PDX-1 régulent son expression^{68,81}.

II.3 Fonctions

II.3.1 Rôles au cours du développement embryonnaire

Le profil d'expression de LRH-1 et des autres membres de la sous-famille FTZ-F1 indique que ces récepteurs nucléaires pourraient être requis dans les processus de développement embryonnaire. L'étude du *drosophila* FTZ-F1 β , orthologue de LRH-1, a révélé un rôle prépondérant dans l'activation du gène de segmentation *fushi tarazu*, codant une protéine à « homeobox » et jouant un rôle crucial dans les mécanismes de développement chez la drosophile⁵⁶⁻⁵⁸. De plus, des études chez la souris d'inactivation génique de SF-1, paralogue de LRH-1, ont démontré que ce récepteur nucléaire était impliqué dans le développement d'organes à fonction endocrine, comme les gonades, les glandes surrénales, le noyau ventro-médian hypothalamique (VMH nucleus), mais aussi les cellules gonadotropes de l'hypophyse (pour une revue, voir⁵⁹). Il se pourrait donc que LRH-1, à l'image des autres membres de la famille, joue un rôle dans le développement des organes où il est exprimé (cf.

chapitre II.1). Les souris dont le gène LRH-1 a été inactivé par introduction d'une cassette néomycine dans l'exon 6 (codant le domaine D) meurent *in utero* à e7, suggérant que LRH-1 pourrait être impliqué dans les mécanismes de gastrulation (Annicotte JS *et al.*, manuscrit en préparation). En outre, des études *in vitro* sur le promoteur de LRH-1 (cf. chapitre II.2) ainsi que sur les gènes cibles de ce récepteur nucléaire ont souligné que LRH-1 pourrait être un intermédiaire clé entre les signaux initiaux d'organogénèse hépatique et l'activation en cascade de facteurs de transcription amplifiant ce processus. En effet, il a été démontré que LRH-1 est un activateur de HNF-3 β , HNF-4 α et HNF-1 α ⁸⁰. De plus, l'orthologue de LRH-1 chez le rat régule *in vitro* l'expression de l' α -fetoprotéine (AFP) ⁸². L'activation de l'AFP est un des premiers événements apparaissant lors de la différenciation de l'endoderme en foie ⁸³. Il est, par conséquent, probable que des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans le développement hépatique puissent également jouer un rôle dans ce processus.

Cependant, le rôle de LRH-1 au cours du développement pancréatique, intestinal ou nerveux reste à l'heure actuelle peu connu. La fonction de LRH-1 au cours du développement embryonnaire sera vraisemblablement élucidée avec l'obtention de souris chimériques et/ou invalidées de manière tissu- et/ou temps-spécifique pour ce récepteur nucléaire, grâce à l'utilisation du système *Cre/loxP*.

II.3.2 LRH-1 et le métabolisme du cholestérol

II.3.2.1 La synthèse d'acides biliaires

Alors que des études suggèrent un rôle pour LRH-1 dans le développement hépatique, d'autres groupes ont démontré que ce récepteur nucléaire joue également un rôle physiologique important chez l'adulte, plus particulièrement dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol (figure 3) ^{76,77}. Cette régulation s'opère en concert avec d'autres récepteurs nucléaires, comme le « Liver X Receptor » (LXR), le « Farnesol X Receptor » (FXR), le « Pregnane X Receptor » (PXR) et le SHP (pour revue, voir ³). LRH-1 est impliqué dans de

nucléaire orphelin requis pour l'expression de CYP7A1 et CYP8B1. Les particules véhiculant le cholestérol, comme les LDL et VLDL, sont endocytées par l'hépatocyte via le récepteur aux LDL. Une quantité croissante de cholestérol mène à la suppression de la biosynthèse de novo du cholestérol et à la régulation négative du récepteur LDL, processus médiés par SREBP. LXR et LRH-1 transforment l'excès de cholestérol en acides biliaires, en activant la transcription de CYP7A1 et CYP8B1. BSEP exporte ensuite ces acides biliaires pour qu'ils soient sécrétés dans le lumen.

II.3.2.2 Le métabolisme des hormones stéroïdiennes

Des équipes de recherche ont récemment déterminé que LRH-1 était impliqué dans différentes voies biologiques liées à la synthèse des hormones stéroïdiennes et à la reproduction. Chez la souris, LRH-1 est fortement exprimé dans l'ovaire au niveau des cellules folliculaires granulosas à différents stades (follicule préantral, et de De Graaf), et du corps jaune ⁷². SF-1 est également exprimé dans l'ovaire, mais dans des structures différentes de celles qui expriment LRH-1, suggérant des rôles complémentaires pour chacun de ces deux récepteurs nucléaires dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes et dans la fertilité. Sirianni *et al.* ont également détecté une forte expression de LRH-1 dans l'ovaire humain ⁸⁹. Dans cette étude, ils ont aussi démontré la présence de ce récepteur nucléaire dans le testicule, ainsi que la régulation transcriptionnelle par LRH-1 de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, comme le StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein), le CYP11A1, le CYP11B1, le CYP17 et enfin le HSD17B4. Une autre équipe a également démontré la présence de LRH-1 dans les glandes surrénales humaines, et a confirmé que le CYP11B1 est un gène cible de LRH-1 ⁹⁰. Il est intéressant de noter que le profil d'expression de LRH-1 dans les organes stéroïdogéniques diffère selon l'espèce. En effet, LRH-1 est exprimé chez l'homme dans l'ovaire, le testicule et la glande surrénale, alors que chez la souris, sa présence n'est détectée que dans l'ovaire. Aucune expression n'a été retrouvée dans le testicule et dans la surrénale de souris ⁷².

Il a également été montré que LRH-1 est exprimé spécifiquement dans les préadipocytes où il régule l'activité transcriptionnelle du gène CYP19 ⁷³. Ce gène, également appelé aromatase, permet la synthèse des œstrogènes et joue donc un rôle prépondérant dans la reproduction.

II.3.3 LRH-1 et cancer

Quelques observations nous permettent d'entrevoir un rôle potentiel de LRH-1 dans le développement de certains cancers. D'abord, le premier gène cible de LRH-1 est l'AFP⁸². Cette protéine est l'une des plus importantes lors du développement des mammifères. Elle est synthétisée principalement par le foie fœtal et le yolk sac, elle représente la forme fœtale de l'albumine et est impliquée dans le transport vers les cellules prolifératrices de l'embryon des acides gras et autres éléments nutritifs. Chez l'adulte, l'expression de l'AFP est éteinte, mais on observe dans certaines transformations néoplasiques une réactivation de l'AFP. L'AFP est souvent détectée dans le sérum de patients atteints de carcinome hépatocellulaire (CHC) et de tumeurs malignes au niveau du tractus gastro-intestinal, et elle a été proposée comme marqueur spécifique et précoce de ce type de cancer⁹¹.

Ensuite, le virus de l'hépatite B (VHB) est une des principales causes du développement de maladies hépatiques et de CHC primaire. Le promoteur régulant la transcription de la capsidie du VHB est le sujet de nombreuses recherches puisqu'il est responsable du tropisme hépatique. De nombreuses données indiquent clairement que l'hépatotropisme du VHB nécessite la présence de nombreux facteurs de transcription spécifiques du foie, permettant une répllication efficace du génome du VHB. Li *et al.* ont découvert que LRH-1 se fixe et active l'« enhancer » II du VHB, un des éléments essentiels à la régulation transcriptionnelle du virus⁶⁶. Plus tardivement, Gilbert *et al.* ont identifié LRH-1 comme l'un des constituants régulant l'activité du promoteur codant la capsidie du VHB, via deux éléments de réponse⁹². Ils ont également observé qu'un autre récepteur nucléaire fortement exprimé dans le foie, HNF-4 α (NR2A1), est un partenaire très efficace pour LRH-1 dans la régulation de ce promoteur⁹². Ces deux récepteurs nucléaires peuvent donc être fortement impliqués dans l'hépatotropisme du VHB.

Finalement, un rôle pour LRH-1 dans le développement du cancer du sein a été proposé⁷³. Cette équipe a montré que LRH-1 est exprimé dans les cellules stromales des glandes mammaires. Ces cellules, caractérisées comme des préadipocytes, expriment également l'aromatase (CYP 19), responsable de la synthèse d'œstrogènes. Dans le tissu adipeux mammaire normal, l'expression et l'activité de l'aromatase est peu élevée, alors que chez les

patients atteints d'un cancer du sein, les niveaux d'aromatase et d'œstrogènes sont augmentés⁹³⁻⁹⁶. Clyne *et al.* ont montré que LRH-1 peut avoir un rôle prépondérant dans la synthèse d'œstrogènes en contrôlant l'expression de l'aromatase, suggérant que ce récepteur nucléaire pourrait être impliqué dans certains cancers comme celui du sein⁷³.

III. Le facteur de transcription E2F1

III.1 Généralités

Le facteur de transcription E2F1 a été originellement isolé comme le médiateur cellulaire capable de se fixer au promoteur E2 de l'adénovirus E1A^{97,98}. La famille des facteurs de transcription E2F comprend six membres (E2F1-6), structurellement proches, et fonctionnant sous forme d'hétérodimères avec les membres de la famille « Differentiation regulated transcription factor Protein » (DP-1 et DP-2). Les premières études ont impliqué l'hétérodimère E2F/DP dans l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (pour une revue, voir⁹⁹). Cependant, il est à présent évident que ce rôle ne constitue qu'une facette de l'activité de E2F. En effet, les données obtenues ces dernières années démontrent que les protéines E2F sont des transactivateurs ou répresseurs de la transcription. Il est maintenant évident que les E2Fs ont des fonctions importantes dans la régulation autant de la prolifération cellulaire que dans les processus anti-prolifératif, comme l'apoptose ou la sénescence.

III.2 Structure protéique et modulation de son activité

Les protéines E2F et DP contiennent un domaine hautement conservé de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine de dimérisation^{99,100} (figure 4). La partie carboxy-terminale de E2F1, -2, -3, -4 et -5 contient un domaine de transactivation, absent chez E2F6 et DP. Bien que E2F et DP active la transcription de manière synergique, la sous-unité DP semble activer la transcription indirectement en augmentant l'activité de la sous-unité E2F¹⁰¹. Les membres

de la famille sont classés en trois groupes, les activateurs (E2F1, -2, -3) et les répresseurs (E2F4 et -5) de la transcription. E2F6, dernier membre cloné de la famille, continue à être perçu comme indépendant de ces deux classes, et joue un rôle de répresseur de la transcription dépendante de E2F⁹⁹.

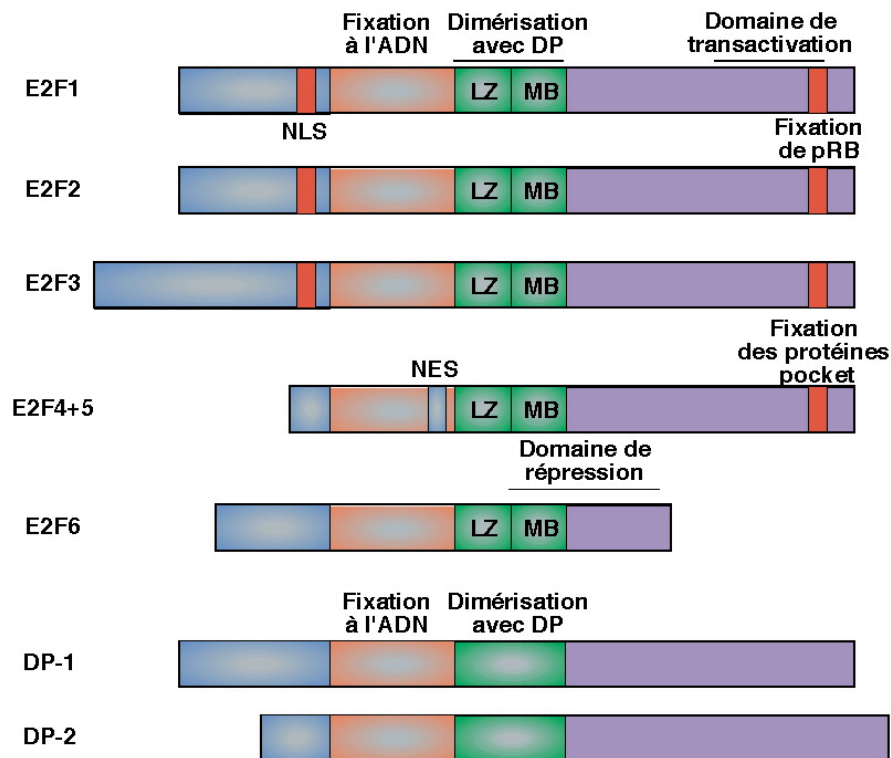


Figure 4 : Organisation structurale des protéines E2F et DP. Les protéines E2F et DP ont un domaine de liaison à l'ADN et de dimérisation très conservé. Les séquences nécessaires à l'activation transcriptionnelle et à la fixation des protéines « pocket » sont uniquement présentes chez E2F1, 2, 3, 4 et 5. E2F1, 2 et 3 ont un signal de localisation nucléaire (NLS), absent chez E2F4 et 5 qui ont un signal d'exportation nucléaire (NES). E2F6 diverge considérablement des autres E2Fs, n'ayant que très peu d'homologie en dehors des domaines de dimérisation et de fixation à l'ADN. LZ, Leucine zipper ; MB, motif « marked box ».

L'activité transcriptionnelle de E2F est régulée par des mécanismes d'interaction protéique. En effet, une interaction physique de E2F avec les protéines « pocket », comme la protéine Retinoblastoma (pRB), la protéine p107 ou p130, inhibe l'activité transcriptionnelle de E2F. Cette interaction non seulement bloque la transactivation induite par E2F, mais également réprime la transcription par recrutement sur le complexe pRB/E2F/DP de protéines HDAC, du complexe de remodelage de la chromatine hSWI/SNF et des protéines du groupe polycomb¹⁰². E2F1, -2 et -3 interagissent exclusivement avec pRB, E2F4 et -5 avec p107,

p130 et parfois pRB, alors qu'E2F6 n'interagit avec aucune des protéines « pocket », n'ayant pas de domaine de liaison de pRB (figure 4). La formation du complexe protéine « pocket »/E2F est régulée au cours du cycle cellulaire par des modifications post-traductionnelles (figure 5). Au cours du cycle cellulaire, certaines cyclines, exprimées en phase G1, vont activer leurs kinases associées, les « cyclin dependent kinase » (cdk) (figure 5A). Celles-ci vont phosphoryler les protéines « pockets », libérant le complexe E2F-DP et permettant la transcription des gènes cibles de E2F (figure 5B). L'activité transcriptionnelle de E2F est donc modulée de manière temporelle en fonction du cycle cellulaire. En effet, pRB, p107 et p130 s'associent à E2F à différentes phases du cycle cellulaire. Bien que le profil d'association dépende du contexte cellulaire, le complexe p130/E2F est retrouvé en premier dans les cellules quiescentes ou différenciées, le complexe p107/E2F est prévalent lors de la phase S, mais peut être retrouvé en phase G1. Le complexe pRB/E2F est observé dans les cellules quiescentes ou différenciées, mais est le plus souvent retrouvé dans les cellules progressant de la phase G1 vers la phase S (figure 5B, pour revue, voir ¹⁰³). Afin de sortir de la phase S, les cellules ont besoin d'inactiver E2F. Cette étape d'inactivation est indépendante de la régulation de pRB et implique trois processus. Le premier correspond à la phosphorylation de DP et E2F1-3, inhibant la fixation à l'ADN de ce complexe. Le second est provoqué par la dégradation de E2F par ubiquitination. Enfin, le troisième mécanisme potentiel est suggéré par l'observation que E2F6 est un répresseur de la transcription E2F dépendante ¹⁰⁴. La découverte que E2F6 a moins d'affinité pour l'ADN que les autres E2Fs permet d'envisager que E2F6 pourrait se fixer aux promoteurs cibles de E2F et réprimer leur transcription.

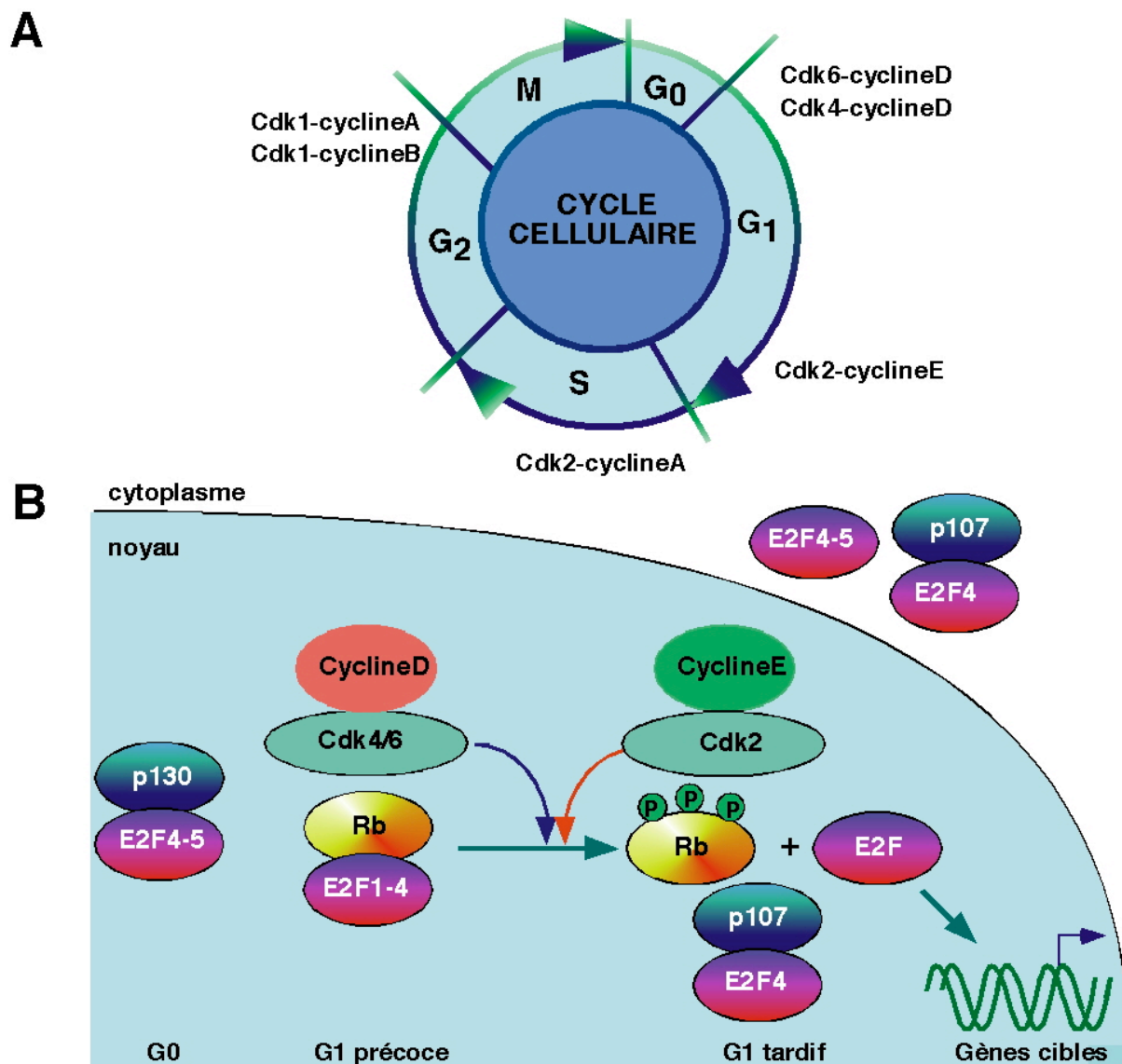


Figure 5 : Cycle cellulaire et régulation des complexes E2F. A- Les différents complexes cyclines-cdk sont exprimés spécifiquement à différentes étapes du cycle cellulaire. B- Ce schéma représente l'association et la localisation subcellulaire des complexes E2F-protéine « pocket ». Chaque complexe contient la protéine DP, non indiqué afin de simplifier le schéma. Cdk : cyclin dépendant kinase ; pRB : retinoblastoma protein.

III.3 Régulation transcriptionnelle par E2Fs

Les membres de la famille E2F ont d'abord été reconnus pour leur rôle important dans la progression du cycle cellulaire. D'autres gènes cibles de E2F ont été par la suite découverts, notamment grâce à l'utilisation de puces à ADN^{105,106} et de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP,^{107,108}). Ces gènes cibles sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires dépendant ou non du cycle cellulaire, comme la mitose, la

ségrégation chromosomique, la réparation de l'ADN, la condensation de la chromatine, l'apoptose, la différenciation et le développement (figure 6) ^{109,110}.

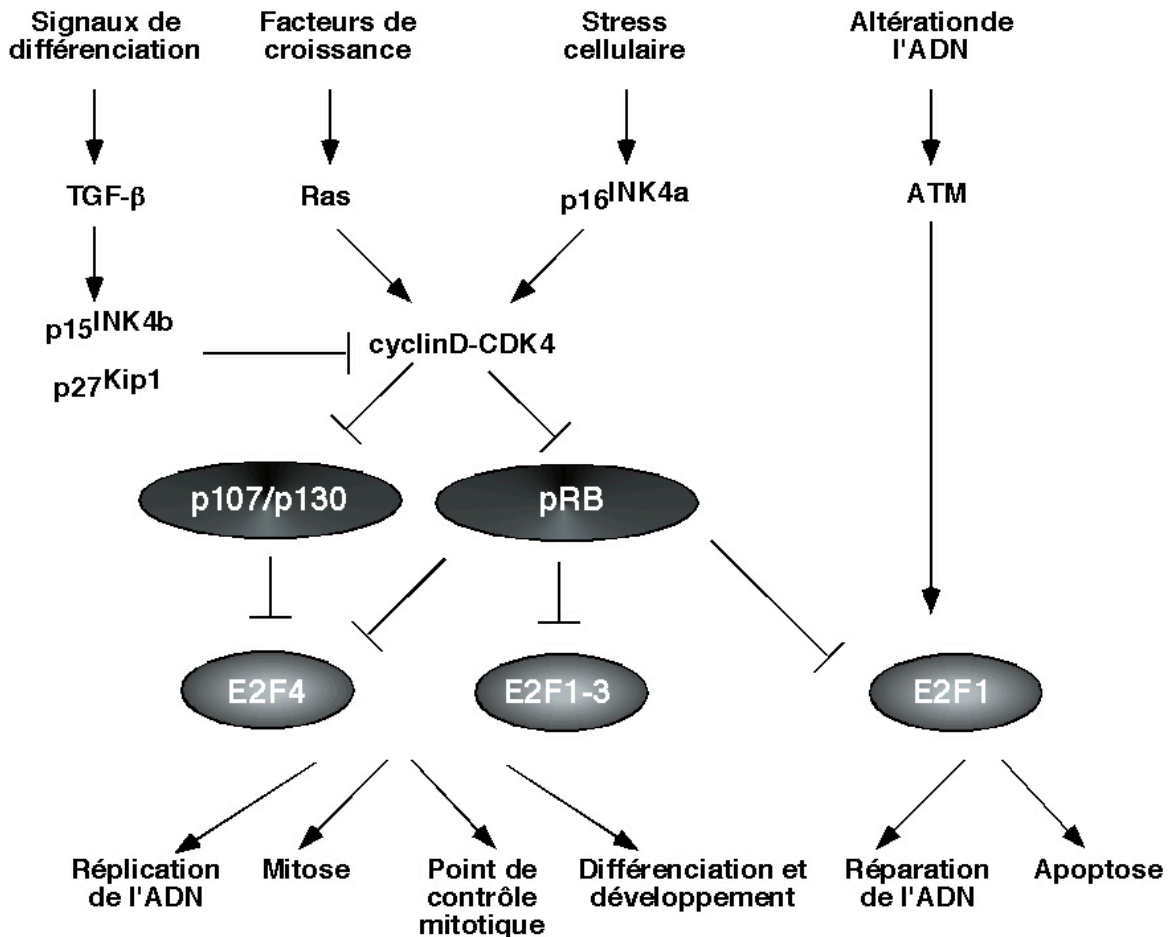


Figure 6 : Voie de signalisation des complexes E2F-protéine « pocket ». Le complexe E2F/RB agit en aval de molécules de signalisation déclenchant l'arrêt du cycle cellulaire. La sénescence cellulaire et la voie du TGF- β induisent les inhibiteurs du cycle cellulaire, comme p15, p16 et p27, inactivant le complexe cyclineD-cdk4. La voie des MAPK induit, quant à elle, l'expression de la cycline D, menant à l'activation transcriptionnelle de E2F. Les altérations de l'ADN induisent deux types de réponse selon le contexte cellulaire et l'importance des altérations : un arrêt du cycle cellulaire nécessitant pRB, ou une réponse proapoptotique médiée par ATM et E2F1. Les gènes cibles des E2Fs ont des fonctions variées et sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, comme la réplication de l'ADN, la mitose, les points de contrôle mitotique, la différenciation, le développement, la réparation de l'ADN et l'apoptose. ATM : ataxia-telangiectasia protein.

III.4 Les E2Fs activateurs

E2F1, -2 et -3 peuvent contribuer à la répression des gènes cibles de E2F en recrutant pRB. Cependant, des études de surexpression ainsi que des modèles animaux mutants indiquent que ces trois E2Fs jouent un rôle clé dans l'activation de gènes essentiels à la

prolifération cellulaire et à l'apoptose. Nous appellerons donc ce sous-groupe « E2Fs activateurs ». Une sur-expression de chacun de ces trois E2Fs est suffisante pour induire l'entrée des cellules en phase S¹¹¹⁻¹¹³, et donc dans la prolifération. Ces E2Fs déclenchent également l'apoptose (pour revue, voir¹¹⁴). Une question primordiale est de savoir si les différents E2Fs ont des fonctions spécifiques ou communes. La création de souris déficientes pour certains E2Fs a permis d'élucider en partie leurs fonctions. Les souris E2F1 et E2F3 mutantes montrent un phénotype complètement différent du point de vue développement embryonnaire. En effet, les souris E2F3^{-/-} meurent *in utero*¹¹⁵ alors que les souris E2F1^{-/-} sont viables et fertiles, mais présentes de nombreuses anomalies, comme un excès de lymphocyte T, une atrophie testiculaire et le développement de nombreuses tumeurs^{116,117}. Zhu *et al.* ont reporté que E2F1 et E2F2 coopèrent dans la régulation de la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques, et également dans la suppression des tumeurs¹¹⁸. De même, la majorité des défauts du développement embryonnaire des souris mutantes E2F1 et E2F3 sont augmentés lorsque les deux mutations sont combinées¹¹⁹. Il semble donc que E2F1, -2 et -3, à l'image de leur rôle chevauchant dans le contrôle du cycle cellulaire, aient des fonctions cruciales et chevauchantes lors du développement embryonnaire. Cependant, Cloud *et al.* ont identifié une différence importante entre E2F1 et E2F3. En effet, E2F1, et non E2F3, est un suppresseur de tumeur¹²⁰.

III.5 Les E2Fs répresseurs

La seconde sous-classe regroupe E2F4 et E2F5. Ces deux E2Fs activent faiblement la transcription lorsqu'ils sont surexprimés, et ne sont pas capables d'induire l'entrée de cellule quiescentes dans le cycle cellulaire. Cette différence entre activateurs et répresseurs est due à leur localisation subcellulaire. E2F1, -2 et -3 sont constitutivement nucléaires, alors que E2F4 et -5 sont principalement cytoplasmiques. En revanche, E2F4 et -5 sont impliqués dans l'induction de la sortie du cycle cellulaire et la différenciation terminale. Des études de sur-expression de E2F4 ont démontré qu'il était suffisant pour déclencher la différenciation terminale de précurseurs neuronaux¹²¹. De plus, les troubles du développement rencontrés

dans les souris déficientes en E2F4 et -5 semblent résulter d'un défaut de différenciation tissulaire de plusieurs lignées cellulaires ¹²²⁻¹²⁵.

III.6 Rôles physiologiques des E2Fs

Etant donné que la plupart des études portent sur la fonction des E2Fs dans les mécanismes de prolifération/apoptose, les rôles physiologiques des E2Fs restent à l'heure actuelle peu étudiés. Il a été montré que E2F1 et E2F4 sont directement impliqués dans l'adipogénèse à différents niveaux. L'adipogénèse est un processus cellulaire réunissant des phases de prolifération et différenciation. Après prolifération, la croissance des preadipocytes confluents est arrêtée suite à une inhibition par contact. Ces derniers prolifèrent suite à une induction hormonale (expansion clonale), stoppent leur prolifération à nouveau, puis sortent du cycle cellulaire et entrent dans une phase de différenciation terminale. E2F1 et -3 régulent l'expression de PPAR γ , récepteur nucléaire impliqué dans la formation du tissu adipeux, lors de l'expansion clonale ¹²⁶. Cette régulation *in vitro* est confirmée par l'étude des souris invalidées pour le gène E2F1 (E2F1^{-/-}). En effet, ces souris E2F1^{-/-} ont une masse grasseuse moins importante, signe d'un défaut du développement du tissu adipeux ¹²⁶. Dans cette même étude, il a été montré que E2F4 joue également un rôle au cours de l'adipogénèse. Il semble que E2F4 bloque l'adipogénèse par inhibition de l'expression de PPAR γ , permettant la différenciation terminale ¹²⁶. Cette inhibition semble être indépendante de la régulation du cycle cellulaire par E2F4 ¹²⁷. L'implication de E2F1 au cours de l'adipogénèse et de la granulopoïèse a également été étudiée ¹²⁸. Il a été montré que le « CCAAT/enhancer binding proteins » (C/EBP), facteur de transcription impliqué dans la croissance et la différenciation de nombreux tissus et types cellulaires, et PPAR γ interagissent avec E2F et répriment l'activité transcriptionnelle de E2F, permettant aux cellules de sortir du cycle cellulaire et d'entamer la phase de différenciation terminale ^{128,129}. Il semble donc évident que les E2Fs jouent un rôle métabolique important de par leur contrôle de l'adipogénèse, et donc du métabolisme lipidique.

III.7 E2F1 : gène suppresseur de tumeur ou oncogène ?

Contrairement à pRB, des mutations du gène E2F1 n'ont jamais été détectées dans des tumeurs humaines. Paradoxalement, les souris dont le gène E2F1 est inactivé (E2F1^{-/-}) développent des tumeurs^{116,117}. L'apparition de tumeurs dans ces souris E2F1^{-/-} était initialement surprenante, E2F1 étant considéré comme un oncogène ayant la propriété de provoquer la prolifération cellulaire¹³⁰. Les souris E2F1^{-/-} présentent une atrophie testiculaire, des anomalies histologiques au niveau de tissus à fonction exocrine, comme la glande salivaire ou le pancréas, développent des sarcomes au niveau du tractus reproductif, des adénocarcinomes pulmonaires et des lymphomes^{116,117}. Il semble donc que E2F1 ait des propriétés de gène suppresseur de tumeur. De plus, E2F1 induit l'apoptose. En effet, les souris E2F1^{-/-} montrent des défauts de l'apoptose et le taux élevé d'apoptose observé dans les souris RB^{-/-} est supprimé suite à la déficience ajoutée de E2F1. Cependant, il est difficile de classer catégoriquement E2F1 comme un suppresseur de tumeur, étant donné que des souris transgéniques surexprimant E2F1 développent également des tumeurs¹³⁰⁻¹³³. Un exemple frappant du rôle complexe de E2F1 dans la prolifération cellulaire est donné par l'étude des souris Rb^{+/-};E2F1^{-/-}. Le développement de tumeurs de la glande pituitaire dans ces souris est retardé par rapport au souris Rb^{+/-}. Ce résultat est la démonstration que l'ablation du gène E2F1 peut également réduire la formation de tumeur¹³⁴, et confirme que E2F1 peut avoir des fonctions opposées selon le contexte cellulaire.

IV. Le pancréas

IV.1 Généralités

Le pancréas est un organe essentiel à la digestion et à l'homéostasie du glucose. Un dysfonctionnement du pancréas résulte en de nombreuses pathologies comme le diabète, la pancréatite et le cancer. De nombreuses avancées ont été effectuées dans l'étude du développement du pancréas, identifiant de nombreux facteurs de transcription et des voies de

signalisation primordiales pour la différenciation des différents types cellulaires pancréatiques. Le pancréas possède une fonction exocrine, impliquée dans la libération d'enzymes au niveau du tube digestif, et une fonction endocrine, permettant la synthèse d'hormones libérées dans le sang et régulant l'utilisation du glucose par les tissus. Le pancréas exocrine est constitué par les cellules acineuses qui produisent des enzymes de digestion (amylase, elastase, protease, nuclease, etc...) et les cellules ductales qui transportent ces enzymes vers l'intestin. L'unité fonctionnelle du pancréas endocrine est représentée par les îlots de Langerhans, disséminés dans le pancréas exocrine, et constituée de 4 types cellulaires, les cellules α , β , δ et PP. Les cellules β productrices d'insuline représentent la majorité de la population des cellules endocrines, et constituent le noyau de l'îlot, alors que les cellules α , δ et PP sécrètent le glucagon, la somatostatine et le polypeptide pancréatique, respectivement, et sont localisées à la périphérie de l'îlot.

IV.2 Le développement du pancréas

Les cellules endocrines, exocrines et ductales dérivent de l'épithélium endodermique suite à une série d'interactions avec les tissus adjacents. Initialement, une région de l'endoderme précoce se spécifie pour générer un tissu compétent afin de former le pancréas. Ensuite, des interactions inductives entre l'endoderme compétent et les tissus voisins induisent la différenciation pancréatique. Enfin, la région pancréatique est réajustée relativement aux régions des organes voisins. Le pancréas se forme après bourgeonnement dorsalement et ventralement de l'épithélium du tube digestif, entre l'estomac et le duodénum. Avant et pendant la phase de bourgeonnement, l'ébauche pancréatique exprime la protéine à homéodomaine « Pancreatic-Duodenal Homeobox1/Insulin Promoter Factor1 » (PDX1/IPF1). Tous les types cellulaires pancréatiques dérivent des cellules progénitrices exprimant PDX1^{135,136}. Une inactivation génique de PDX1 chez la souris, tout comme une mutation homozygote dans le gène humain de PDX1, provoque une agénèse pancréatique¹³⁷⁻¹³⁹. Cependant, le pancréas des souris nulles pour PDX1 arrête son développement après le

bourgeoisement ^{138,140}, suggérant que d'autres facteurs contribuent au développement pancréatique (pour revue, voir ^{141,142}) (figure 7).

IV.2.1 Régionalisation antéro-postérieure de l'endoderme

Le positionnement et la croissance des bourgeons pancréatiques sont dictés non seulement par des interactions inductives des tissus voisins, mais également par la capacité de l'endoderme compétent à répondre à ces signaux. La spécification pancréatique dépend donc de l'organisation antéro-postérieure de l'endoderme. Au moment de la gastrulation, l'endoderme reçoit des signaux via le FGF4 du mésoderm adjacent séparant l'endoderme en une région antérieure et postérieure ¹⁴³ (figure 7). Chez l'embryon du poisson zèbre, d'autres signaux peuvent également intervenir dans la spécification antéro-postérieure de l'endoderme. En effet, des inhibiteurs de la signalisation de l'acide rétinoïque ¹⁴⁴ ou de la « Bone Morphogenetic Protein » (BMP) ¹⁴⁵ empêchent la formation du domaine pancréatique. Il est intéressant de noter que l'acide rétinoïque active les récepteurs nucléaires RXR et RAR, démontrant l'implication potentielle des récepteurs nucléaires au cours du développement pancréatique.

IV.2.2 Signaux extra-cellulaires, facteurs intra-cellulaires et formation des bourgeons pancréatiques

Une fois compétent, l'endoderme va bourgeonner dans deux régions différentes du tube digestif, l'une dorsale et l'autre ventrale. Après rotation du tube digestif, ces deux bourgeons vont fusionner pour former l'organe mature ¹⁴⁶. Durant la formation du pancréas, les bourgeons pancréatiques dorsaux et ventraux ne sont pas soumis aux mêmes signaux extra-cellulaires (figure 7 et 10 ; pour revue, voir ¹⁴⁷) et cellulaires.

IV.2.2.1 Les signaux extra-cellulaires

Deux signaux permissifs (car ils sont nécessaires à la formation du pancréas mais insuffisants pour induire son développement dans des domaines antérieurs ou postérieurs du duodénum) sont importants pour l'induction du bourgeonnement dorsal du pancréas. L'un provient de la notochorde, l'autre de l'aorte dorsale (figure 7). La signalisation par la notochorde est nécessaire à l'initiation de la différenciation pancréatique du **bourgeon dorsal**^{148,149}, induisant l'expression de gènes du pancréas endocrine et exocrine, et réprimant l'expression de la protéine sécrétée *Sonic Hedgehog* (*Shh*) (figure 7 et 10). Le membre de la famille « Transforming Growth Factor- β » (TGF- β), l'activine- β B, ainsi que le FGF2 miment l'action de la notochorde et seraient responsables de l'inhibition de *Shh*¹⁵⁰. L'inhibition de l'expression de *Shh* dans le bourgeon pancréatique semble donc essentielle à la formation du pancréas. En effet, une souris transgénique exprimant *Shh* sous contrôle du promoteur PDX1 démontre un défaut de la différenciation endocrine et exocrine¹⁵¹. De plus, les souris invalidées pour *Shh* présentent des anomalies de développement de certains organes, alors que le pancréas n'est pas affecté¹⁵². Cependant, deux études ont montré que *Shh* était requis pour la différenciation des cellules pancréatiques endocrines chez le poisson zèbre, suggérant des différences importantes entre espèces^{153,154}. A e9, la notochorde s'éloigne ensuite de l'endoderme, poussée dorsalement par l'aorte. L'aorte, mais aussi d'autres vaisseaux sanguins, ont la capacité de stimuler la différenciation des cellules endocrines dans l'endoderme pancréatique¹⁵⁵. Chez un embryon de xénope dépourvu d'aorte, les marqueurs pancréatiques, comme l'insuline et le glucagon, sont absents. Des explants d'endoderme prépancréatique mis en culture avec de l'aorte disséquée initient la différenciation pancréatique, alors que l'endoderme incubé avec du tissu d'origine non endothéliale ne se différencie pas¹⁵⁵. Par conséquent, les cellules endothéliales apportent non seulement les éléments nutritifs nécessaires au développement, mais également des signaux induisant la différenciation du pancréas. De plus, chez une souris transgénique surexprimant le VEGF sous le contrôle du promoteur PDX1, des cellules exprimant de façon ectopique l'insuline apparaissent au niveau de l'estomac, organe connu pour exprimer également PDX1¹⁵⁵.

Bien que le profil de différenciation soit similaire à celui du bourgeon dorsal, le **bourgeon ventral** n'est pas en contact avec la notochorde, ni avec l'aorte. Le mésoderme

latéral est la source de signaux spécifiant à l'endoderme la formation du domaine pancréatique ventral (figure 7 et 10 ; ¹⁵⁶). Ces signaux sont dits instructifs, car ils sont capables d'induire les gènes pancréatiques, comme PDX1, dans d'autres domaines de l'endoderme. De plus, des amas de cellules productrices d'insuline, ressemblant à des îlots, apparaissent lorsque l'endoderme est mis en culture avec du mésoderme latéral. Cependant, les mécanismes moléculaires ne sont pas encore déterminés, mais il semblerait que les protéines activins et BMPs puissent jouer un rôle dans l'induction des bourgeons dorsal et ventral.

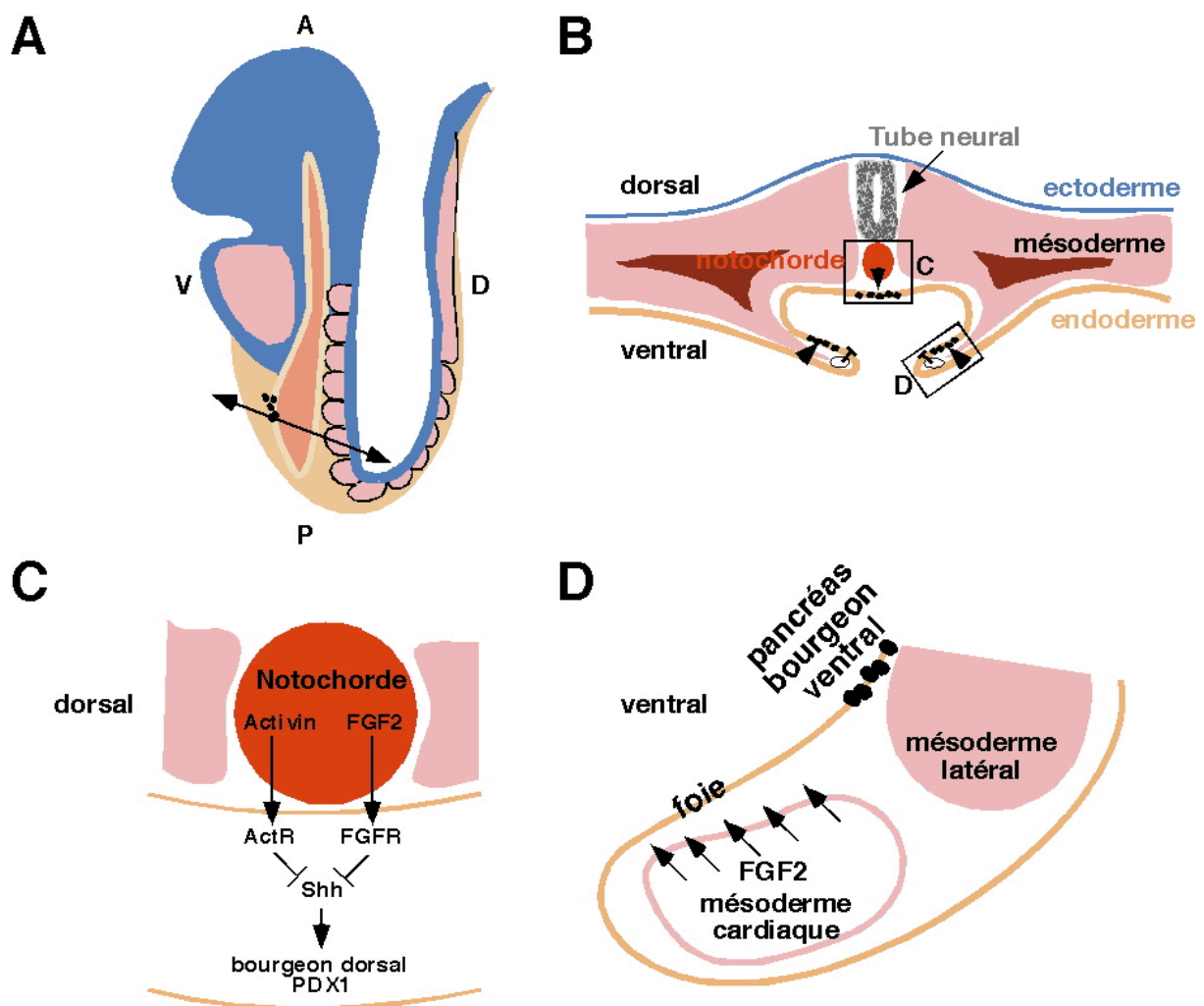


Figure 7 : Signaux extra-cellulaires induisant le développement du pancréas. A- Représentation d'un embryon de souris à e8,5. Les territoires présomptifs du pancréas sont représentés par des points noirs. B- Une section transversale au niveau de la flèche en A montre l'influence des tissus mésodermiques adjacents dans le développement pancréatique. C- La notochorde envoie des signaux permissifs à l'endoderme du futur bourgeon dorsal. Ceux-ci inhibent l'expression de Sonic Hedehog (Shh), conduisant à la différenciation pancréatique. Les aortes, latérales à la notochorde à ce stade, fusionneront de façon médiane et prendront ensuite le relais. D- Les

bourgeons ventraux reçoivent l'influence instructive du mésoderme latéral, alors que le mésoderme cardiaque induit le développement hépatique au détriment de celui du pancréas. L'ectoderme est coloré en bleu, le mésoderme en rose et l'endoderme en jaune.

IV.2.2.2 Les facteurs intra-cellulaires

Bien qu'ils forment le même tissu mature, le programme de différenciation développé dans les deux bourgeons est différent. L'induction de l'expression de gènes pancréatiques apparaît d'abord au niveau ventral à e8,5 chez la souris, et 12 à 16 heures plus tard au niveau dorsal ¹⁵⁷. De plus, les signaux extra-cellulaires diffèrent ventralement et dorsalement, comme vu précédemment. Enfin, des études d'inactivation génique chez la souris nous ont apporté de nombreuses informations, étant donné que l'inactivation de certains gènes démontrent un phénotype dorsal ou ventral.

La protéine à homéobox Hb9 (codée par le gène *hlox9*) est exprimé au niveau de l'endoderme pancréatique peu de temps après la formation des bourgeons, et son expression est limitée aux îlots plus tardivement ^{158,159}. Bien qu'il soit exprimé dans le bourgeon dorsal et ventral, seul ce dernier se forme dans les souris mutantes. Cependant, Hb9 étant également exprimé dans le notochorde, connue pour promouvoir le développement du pancréas dorsal, le rôle de Hb9 pourrait être indirectement lié à son expression dans les bourgeons pancréatiques ¹⁴⁸. La différenciation endocrine est, quant à elle, faiblement touchée au niveau ventral chez ces souris mutantes, malgré le rôle de Hb9 dans la maturation des cellules β . En effet, les îlots sont plus petits par rapport aux souris sauvages, mais les quatre types cellulaires endocrines sont présents ^{158,159}.

Une étude récente a déterminé le rôle précoce du facteur de transcription de type bHLH « Pancreas Transcription Factor1a » (Ptf1a) au cours du développement pancréatique. Elle a démontré que cette protéine, initialement décrite comme acteur important de la différenciation exocrine ¹⁶⁰, possède un rôle précoce et fondamental dans les premières phases du développement pancréatique ¹⁶¹. Chez les souris déficientes pour Ptf1a, le bourgeon dorsal se forme normalement, alors que le bourgeon ventral ne se forme pas. De plus, les cellules progénitrices nulles pour Ptf1a se différencient en cellules intestinales ¹⁶¹. L'expression de

Ptf1a peut, par conséquent, orienter la différenciation vers la formation de cellules pancréatiques ou intestinales.

IV.2.3 Prolifération de l'ébauche pancréatique : rôle des interactions mésenchyme-épithélium

Après le bourgeonnement, l'ébauche pancréatique (dorsale et ventrale) commence à croître et se ramifier, tout en fusionnant en un seul organe. L'épithélium en prolifération est entouré de cellules mésenchymales et des expériences de culture en explant ont souligné l'importance du mésenchyme pour la croissance et la différenciation (exocrine)^{149,162}. A l'heure actuelle, au moins quatre facteurs du mésenchyme sont connus pour être nécessaires à la croissance de l'ébauche pancréatique.

Le premier facteur est « Islet1 » (Isl1), facteur de transcription de la famille des protéines à homéodomaine LIM. En effet, les souris mutantes pour Isl1 n'ont pas de mésenchyme, et l'expression de PDX1 dans l'épithélium dorsal adjacent est réduite¹⁶³. *In vitro*, le bourgeon dorsal mutant ne se différencie pas en cellules exocrines, alors qu'il y parvient lorsqu'il est co-cultivé avec du mésenchyme sauvage. Cela démontre l'importance de l'expression de Isl1, et plus généralement du mésenchyme, au cours du développement pancréatique. Un phénotype identique est observé chez les souris mutantes pour la N-cadherine, qui est aussi exprimée dans le mésenchyme dorsal pancréatique et requis pour son développement¹⁶⁴.

Le second facteur est Pbx1. Pbx1 est un facteur de transcription à homéodomaine membre de la famille TALE (« Three-amino acid loop extension »)^{165,166}. Un phénotype similaire à celui de Isl1, mais moins sévère, est observé chez des embryons de souris invalidées pour le gène Pbx1. Comme pour les souris Isl1^{-/-}, les embryons Pbx1^{-/-} présentent une hypoplasie sévère du pancréas dorsal (due à une désorganisation du mésenchyme), associé à un défaut de la différenciation exocrine et endocrine¹⁶⁷. De nouveau, l'épithélium dorsal des souris Pbx1^{-/-} mis en culture avec du mésenchyme pancréatique dorsal de souris sauvage retrouve une différenciation exocrine, reflétant l'importance de l'expression de Pbx1 dans le mésenchyme. Etant donné que PDX1 et Pbx1 forment un complexe se fixant sur l'ADN de leurs gènes

cibles ¹⁶⁸⁻¹⁷¹, le rôle de Pbx1 au cours du développement pancréatique pourrait être directement lié à son association avec PDX1. Afin de déterminer l'implication de cet hétérodimère lors du développement du pancréas, Dutta *et al.* ont créé une souris transgénique exprimant, sous contrôle du promoteur PDX1, une forme mutée de PDX1 ¹⁷². Cette mutation empêche la dimérisation avec Pbx1 et révèle le rôle direct de cet hétérodimère. Croisée dans un fond génétique nul pour PDX1, ce transgène ne parvient que partiellement à rétablir la croissance pancréatique. Ce résultat, ainsi que l'observation que le pancréas ventral des souris Pbx1 est modérément hypoplasique ¹⁶⁷, suggèrent que PDX1 induit la prolifération épithéliale en partie par interaction avec Pbx1, impliquant ce facteur de transcription dans la prolifération pancréatique.

Un autre facteur mésenchymal intervenant dans la croissance épithéliale est le FGF-10. Les souris mutantes pour FGF-10 ont une hypoplasie du pancréas ventral et dorsal, dû à une diminution de la prolifération épithéliale ¹⁷³. A l'inverse, une souris transgénique surexprimant le FGF-10 démontre une hyperplasie pancréatique liée à une forte prolifération des cellules épithéliales, et une inhibition de la différenciation du pancréas endocrine ¹⁷⁴. Ces données confirment l'importance de la signalisation par le FGF au cours du développement pancréatique.

D'autres signaux du mésenchyme regroupent les membres de la famille de l'EGF. En effet, les souris invalidées pour le récepteur à l'EGF ont une diminution modérée de la croissance pancréatique ¹⁷⁵ mais l'EGF induit la prolifération des cellules épithéliales *in vitro* ¹⁷⁶.

L'hypoplasie observée chez ces différents mutants est accompagnée d'une diminution de l'expression de PDX1, exception faite des souris Pbx1^{-/-}. Comme vu précédemment, le pancréas des souris invalidées pour PDX1 arrête sa croissance/prolifération après le bourgeonnement, suggérant un rôle fondamental de PDX1 lors de la prolifération épithéliale ^{137,138}. Cependant, PDX-1 n'est pas exprimé dans le mésenchyme bordant les bourgeons pancréatiques ^{140,167}, suggérant un rôle direct de PDX1 dans la prolifération des cellules épithéliales. De plus, le mésenchyme pancréatiques des souris PDX1^{-/-} ne présente pas de défaut de développement ¹⁴⁰. Afin de mieux définir le rôle de ce facteur de transcription au cours de la prolifération pancréatique, Holland *et al.* ont remplacé la séquence codante de

PDX1 par celle de la protéine transactivatrice inhibée par la tetracycline (tTA), créant une souris nulle pour PDX1¹⁷⁷. Ils ont ensuite croisé cette souris avec une souris transgénique exprimant PDX1 sous le contrôle de l'élément de réponse à tTA. Dans cette souris à la fois mutante et transgénique pour PDX1, l'expression de PDX1 peut donc être contrôlée au cours du développement par injection de tetracycline. Sans tetracycline, la protéine tTA va activer la transcription de PDX1, restaurant l'expression de PDX1 dans la souris nulle. En inhibant l'expression de PDX1 après la formation du bourgeon par injection de tetracycline, Holland *et al.* ont constaté que la fonction de PDX1 est requise de manière continue au cours du développement pancréatique pour la prolifération de l'épithélium.

IV.2.4 Différenciation des cellules endocrines et exocrines

La différenciation des différents types cellulaires commence avant même la formation des bourgeons. Pendant cette phase précoce (de e9,5 à e12,5), la majorité des cellules endocrines formées sont les cellules α . Ensuite, pendant la transition dite secondaire, les cellules endocrines se différencient de manière exponentielle, avec une majorité de cellules β ¹⁷⁸. Les cellules endocrines vont ensuite migrer de l'épithélium et s'agréger pour former les îlots. Des études cinétiques ont démontré que les cellules endocrines se différenciaient tout au long du développement embryonnaire¹⁷⁹. Les premiers signes de différenciation exocrine apparaissent au cours de la transition secondaire à e10 avec l'expression du facteur de transcription Ptf1a¹⁸⁰. Concernant la différenciation des cellules ductales, très peu d'informations sont disponibles (figure 8). Comme décrit précédemment, toutes les cellules pancréatiques adultes dérivent des cellules progénitrices exprimant PDX1. Pendant la prolifération des bourgeons pancréatiques, PDX1 est exprimé de manière uniforme, puis son expression se limite aux cellules β et plus faiblement dans les précurseurs indifférenciés^{181,182}. De plus, l'inactivation de PDX1 après la formation du bourgeon pancréatique, en utilisant le système tTA¹⁷⁷, empêche la différenciation des îlots et acini. Cela suggère que le rôle général de PDX1 au cours du développement pourrait refléter également un rôle dans les cellules progénitrices ou souches.

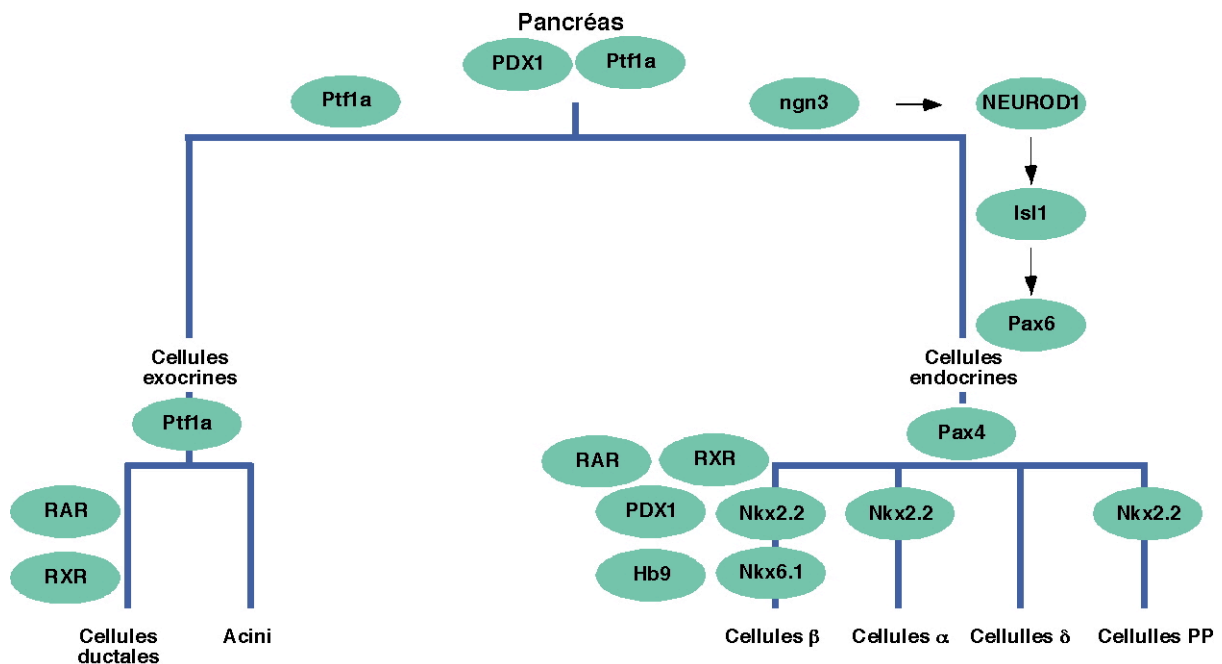


Figure 8 : Différenciation des cellules endocrines et exocrines. Les cellules précurseurs exprimant PDX1 et Ptf1a donneront naissance aux cellules exocrines et endocrines. Par la suite, certains gènes sont nécessaires à la différenciation exocrine (Ptf1a) ou endocrine (ngn3). Ngn3 induit l'expression de NEUROD1, Isl1 puis Pax6. D'autres facteurs de transcription sont spécifiquement requis pour un type cellulaire, comme Nkx6.1, Nkx2.2.

IV.2.4.1 Différenciation des cellules endocrines

IV.2.4.1.1 Initiation de la différenciation endocrine

Excepté PDX1, un régulateur-clé du développement endocrine est la protéine de type bHLH Neurogenin3 (ngn3), exprimée exclusivement dans les précurseurs des cellules endocrines, et régulée négativement lors de la différenciation^{135,183}. Le fait que son expression soit absolument nécessaire pour le développement des îlots¹⁸⁴ suggère que ngn3 induise, chez les cellules progénitrices exprimant PDX1, le choix cellulaire vers la formation de cellules endocrines. De plus, une expression ectopique de ngn3 est suffisante pour induire la différenciation endocrine dans l'ensemble de l'épithélium du tube digestif¹⁸⁵. Ngn3 est normalement exprimé dans quelques cellules dispersées de l'épithélium, et sa surexpression dans l'ébauche pancréatique, en utilisant le promoteur de PDX1, provoque la formation d'un pancréas constitué exclusivement de cellules endocrines^{151,183}.

Ngn3 fait partie de la famille des facteurs ngn, également exprimés dans le système nerveux central (SNC) et possédant une fonction pro-neural¹⁸⁶. Dans le SNC en développement, l'expression de ces gènes est contrôlée par inhibition latérale, menant à la formation, à partir de cellules initialement équivalentes, de cellules progénitrices neuronales exprimant la ngn, entourées de cellules non-neuronales. Le contrôle latéral est régulé par la voie de signalisation Notch-Delta. Lorsque cette voie est abrogée, la différenciation neuronale a lieu dans une région non limitée¹⁸⁷. Ce paradigme peut également être appliqué au pancréas (figure 9). Les souris déficientes pour la protéine Delta1, ligand se fixant au récepteur Notch, pour la protéine RBPJk, partenaire se fixant à l'ADN suite à l'activation de la voie Notch, ou encore pour la protéine Hes1, gène cible de Notch, démontrent un phénotype proche de celui correspondant à une surexpression de ngn3 (induction de la différenciation précoce des cellules endocrines)^{182,188}. Ces expérimentations identifient ngn3 comme une cible négative de Notch, tout comme le démontre l'analyse du promoteur de ngn3¹⁸⁹.

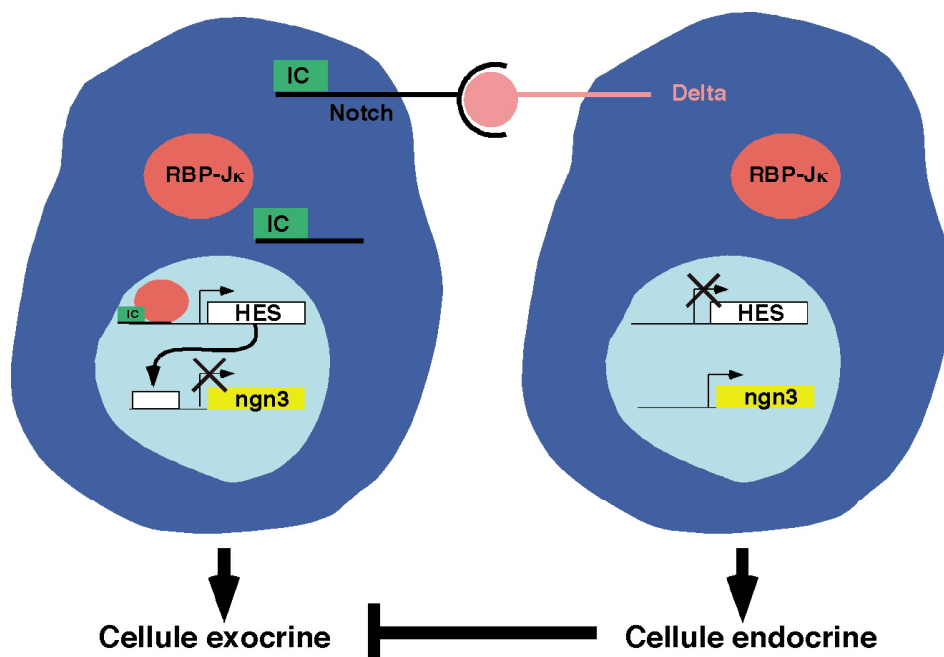


Figure 9 : Voie de signalisation par Notch-Delta. La voie Notch implique une signalisation entre cellules via des récepteurs membranaires codés par le gène Notch et des ligands membranaires, codés par le gène Delta. L'activation suite à l'interaction ligand-récepteur résulte en un clivage du récepteur, libérant la partie intracellulaire (IC) active. IC interagit avec le facteur de transcription RBP-Jk, activant la transcription du gène HES. Ce gène code un facteur de transcription bHLH, répresseurs des gènes ngn et donc de la différenciation endocrine. En revanche, la cellule exprimant le ligand Delta exprimera ngn3, et se différenciera en cellule endocrine.

Ngn3 est également régulé positivement par HNF6, exprimé dans le tube digestif en développement. Les souris mutantes pour HNF6 n'ont pas ou peu de cellules exprimant ngn3, et accumulent à la place des cellules épithéliales non différenciées¹⁹⁰. Cependant, l'inhibition de la différenciation endocrine n'est que temporaire chez ces souris HNF6^{-/-}, puisque les îlots commencent à se former après la naissance.

D'autres facteurs de transcription jouent des rôles fondamentaux lors de la différenciation des cellules endocrines. En absence du facteur de transcription à homéodomaine Pax6, connu pour être en aval de Isl1¹⁹¹ et exprimé initialement dans tous les types de cellules endocrines, le développement des lignées endocrines est affecté^{192,193}. Un phénotype semblable apparaît après inactivation du facteur de transcription de type bHLH NEUROD/BETA1¹⁹⁴. La protéine Pax4, d'un autre côté, est nécessaire à la formation de cellules β et δ mature (Sosa-Pineda *nature* 1997 399). Il est intéressant de noter que, dans les doubles mutants Pax4^{-/-}; Pax6^{-/-}, aucune cellule endocrine n'est présente¹⁹³. Deux membres de la famille Nkx (Nkx2.2 et Nkx6.1) sont impliqués dans la différenciation des cellules β , et bien que non requis pour la spécification des cellules β , ils sont nécessaires à leur différenciation terminale^{195,196} (figure 8).

IV.2.4.1.2 Formation des îlots de Langerhans

Les cellules endocrines se forment dans la partie distale des bourgeons épithéliaux ramifiés du pancréas et quittent l'épithélium à e16,5. Elles migrent dans le mésenchyme et s'agrègent pour former les îlots de Langerhans. Des expériences de chimères d'agrégation chez la souris ont montré que les îlots sont d'origine polyclonale¹⁹⁷. Leur architecture, conservée, semble être importante pour l'homéostasie du glucose¹⁴⁷. Les cellules productrices d'insuline sont au centre des îlots, alors que les cellules à glucagon, somatostatine et PP, sont à la périphérie.

La formation des îlots est dépendante des molécules d'adhérence et de la capacité des cellules à digérer la matrice extracellulaire. Cette dernière propriété est conférée par les métalloprotéases, dont au moins deux sont exprimées dans le pancréas, MMP-2 et -9¹⁴⁷. De

plus, leur inhibition perturbe la formation des îlots. Les MMP sont induites par l'EGF et peut-être par les membres de TGF β ^{147,198}. Les îlots de souris dont la voie de signalisation de l'EGF est invalidée restent à proximité des canaux ¹⁷⁵. Les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$, deux protéines transmembranaires qui permettent l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire, facilitent aussi la migration des cellules endocrines ¹⁹⁹. Les interactions entre cellules endocrines jouent aussi un rôle dans l'organisation des îlots. Ces interactions sont contrôlées par deux grandes familles de protéines : les cadhérines qui relayent les interactions dépendantes du calcium, et les « cell adhesion molecules » (CAM), qui en est indépendante. Les cadhérines E-, N- et R- sont exprimées dans les îlots et une forme dominante négative de la E-cadhérine empêche l'agrégation des cellules endocrines ¹⁴⁷. En l'absence de N-CAM, les cellules α perdent leur localisation périphérique et se mélangent aux cellules β ^{147,164}. Les mécanismes intracellulaires qui coordonnent l'expression des molécules d'adhérence et, par conséquent, la migration, sont méconnus. L'expression ectopique de *ngn3* dans l'intestin grêle promeut le bourgeonnement pancréatique dans le mésoderme et l'agrégation en îlots de cellules endocrines. Il est donc possible que la différenciation endocrine et la formation des îlots soient liées ¹⁸⁵.

IV.2.4.2 Différenciation des cellules exocrines

La proportion entre cellules endocrines et exocrines est réglée par des protéines sécrétées. L'inhibition de la voie du TGF β a pour conséquence une prolifération des cellules exocrines. Par exemple, la follistatine, inhibiteur du TGF β sécrété par le mésenchyme pancréatique, augmente le nombre de cellules exocrines aux dépens des cellules endocrines ²⁰⁰.

Le facteur de transcription *Ptf1a* joue également un rôle important lors de la différenciation exocrine. *Ptf1a* a été isolé comme un régulateur transcriptionnel de l'expression de gènes exprimés dans les acini, et son expression a été décrite comme spécifique du pancréas exocrine ¹⁶⁰. En adéquation avec un rôle de *Ptf1a* dans l'activation de gène exocrine, le pancréas dorsal des souris mutantes pour *Ptf1a* n'a pas de cellules acineuses ¹⁸⁰.

Horb et Slack ont traité l'ébauche pancréatique par l'aphidicolin, inhibiteur de la synthèse d'ADN²⁰¹. Cette manipulation bloque complètement la différenciation exocrine et stimule la différenciation endocrine. Dans d'autres cas, les bourgeons précoces mis en culture avec le mésenchyme entourant la région pancréatique subissent la différenciation exocrine^{200,202}. Des études *in vitro* ont également impliqué l'EGF et le FGF comme signaux du mésenchyme qui promeuvent la prolifération et la différenciation exocrine^{176,203}. De ce travail a émergé un modèle dans lequel les cellules exprimant PDX1 seraient des cellules souches bipotentielles : en présence de mitogène ou de l'activité de Notch, les cellules prolifèrent et sont disponibles par la suite pour une différenciation soit endocrine ou soit exocrine ; si les cellules échappent à ces signaux, elles expriment *ngn3* et subissent la différenciation endocrine.

En résumé, le développement du pancréas est régulé de manière spatio-temporelle par de nombreux facteurs extra- et intra-cellulaires (figure 10). Ces facteurs sont absolument requis pour l'élaboration d'un organe fonctionnel ayant de fonctions métaboliques primordiales.

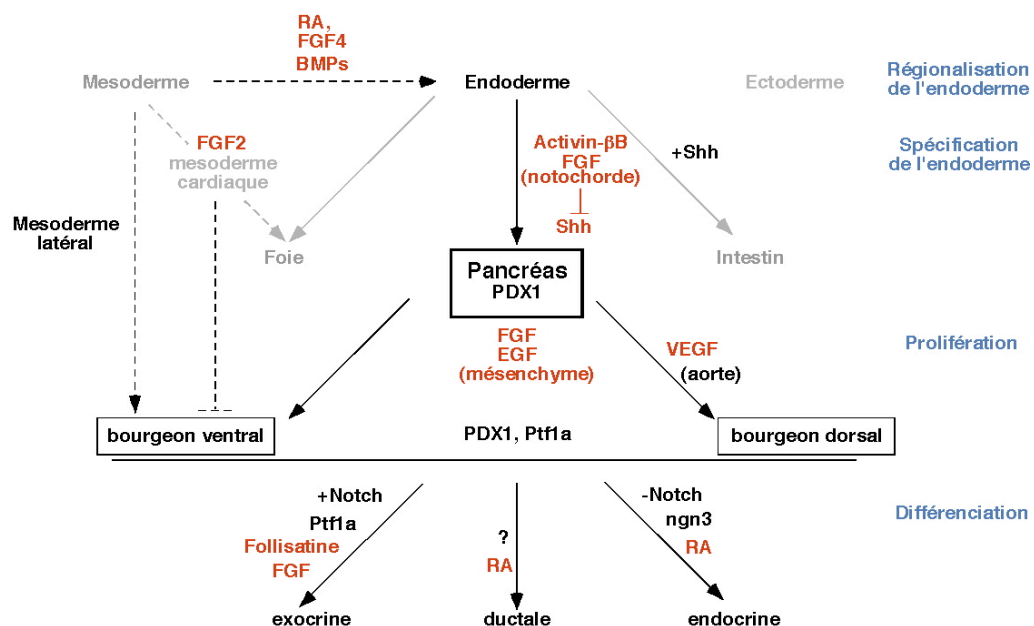


Figure 10 : Les étapes du développement du pancréas. Une région endodermique du tube digestif, soumise à des signaux mésodermiques, comme les « Bone Morphogenic Protein » (BMPs), le FGF4, l'acide rétinolique (RA), donnera naissance aux bourgeons pancréatiques. Cette région n'exprime pas la protéine Sonic Hedgehog, dont l'expression est réprimée par le FGF ou les membres de la famille du TGFβ. Les cellules épithéliales des bourgeons pancréatiques, exprimant PDX1, prolifèrent sous l'influence de nombreux facteurs de croissance sécrétés par le mésenchyme pancréatique, comme le FGF et l'EGF. Ces cellules exprimeront également Ptf1a, nécessaire à la différenciation exocrine et endocrine. Par la suite, les cellules épithéliales se différencient en cellules endocrines, exocrines et ductales. Pour ces dernières, les mécanismes de différenciation restent

inconnus, mais il semblerait que l'acide rétinoïque soit impliqué. En revanche, l'inhibition latérale de la voie de signalisation Notch permettra l'expression du facteur de transcription *ngn3*, entraînant une différenciation endocrine. La follistatin, inhibiteur de la voie du TGF β , ainsi que le FGF favorisent la différenciation exocrine. Les signaux extra-cellulaires sont indiqués en rouge.

IV.3 Rôles du pancréas

IV.3.1 La fonction exocrine

Le pancréas exocrine a pour fonction de synthétiser le suc pancréatique, liquide alcalin riche en proenzymes et enzymes. Les proenzymes et enzymes pancréatiques sont sécrétées par les acinus. Elles hydrolysent les trois types d'aliments dans la lumière du duodénum, appelé processus de digestion intraluminaire. Les lipases, enzymes nécessaires à la digestion des graisses et synthétisées uniquement dans le pancréas, et l'amylase sont libérées sous leur forme active. En revanche, les enzymes protéolytiques sont sécrétées sous leur forme inactive (afin d'empêcher l'autodigestion des tissus), le trypsinogène et le chymotrypsinogène. Sous l'action de l'entérokinase, enzyme sécrétée par le plateau strié des entérocytes, le trypsinogène et le chymotrypsinogène sont respectivement transformés en trypsine et chymotrypsine, formes actives des enzymes. Le pancréas synthétise également des ribonucléases et désoxyribonucléases.

L'eau et les bicarbonates sont sécrétés par les canaux pancréatiques. La sécrétion du suc pancréatique est sous contrôle nerveux (ortho et parasympathique) et hormonal. Les fibres cholinergiques du système parasympathique (pneumogastrique) provoquent la sécrétion d'un suc riche en enzymes (présence de terminaisons nerveuses au contact des acinus). De petits ganglions nerveux sont d'ailleurs détectés au sein du parenchyme pancréatique. Les fibres orthosympathiques proviennent, quant à eux, des ganglions coéiliaques. Le rôle hormonal est joué par des cellules endocrines situées dans les muqueuses pylorique et duodénale : l'arrivée du bol alimentaire dans l'estomac provoque la sécrétion de gastrine par les cellules endocrines de la muqueuse pylorique, puis le chyme gastrique libéré par le pylore déclenche la sécrétion de cholécystokinine (CCK, appelée aussi pancréozymine) par les cellules endocrines du

duodénum. La gastrine et la cholécystokinine provoquent enfin l'extrusion des grains de zymogène par les acinus (proenzymes et enzymes). D'autre part, l'acidité du chyme gastrique induit la sécrétion de la sécrétine duodénale, provoquant la libération d'eau et de bicarbonates par les canaux pancréatiques, ayant pour effet de neutraliser l'acidité du chyme et de permettre ainsi l'action des enzymes pancréatiques.

IV.3.2 La fonction endocrine

IV3.2.1 Généralités

Les îlots de Langerhans sont très nombreux (1 à 2 millions) mais ne représentent que 1/100^{ème} de la masse pancréatique. Ils sont situés au sein du parenchyme exocrine, sans séparation nette avec ce dernier (non encapsulés). Les îlots sont parcourus par de nombreux capillaires sanguins (réseau insulaire) et richement innervés. Les cellules β à insuline sont les plus nombreuses (70% environ des cellules endocrines). L'insuline est une hormone hypoglycémiante, stimulant la captation de glucose par les hépatocytes (qui le stockent sous forme de glycogène, processus appelé glycogénogenèse) mais aussi par les cellules musculaires striées et par les adipocytes. La régulation de la sécrétion des cellules à insuline est triple : métabolique (par la glycémie, figure 11), nerveuse (par les fibres ortho et parasymphatiques) et hormonale (gastrine, sécrétine, CCK, glucagon like peptide 1 (GLP-1), somatostatine, glucocorticoïdes...).

Les cellules α (20% environ des cellules insulaires) sont plus volumineuses et souvent situées en périphérie des îlots. Elles sécrètent le glucagon, hormone hyperglycémiante (augmentation du taux de glucose sanguin) en agissant essentiellement sur les hépatocytes (gluconéogénèse et glycogénolyse). Comme les cellules β , les cellules α sont sous un triple contrôle métabolique, nerveux et hormonal.

Les cellules à somatostatine (5 à 10%) sont les cellules δ . Ce sont de petites cellules dispersées entre les cellules à glucagon, elles exercent sur ces dernières une action inhibitrice selon un mode paracrine.

Par ailleurs, il existe des cellules endocrines insérées dans les constituants du parenchyme exocrine (acinus et canaux pancréatiques), par exemple les cellules à gastrine, à sérotonine, à PP (polypeptide pancréatique). Tout comme les cellules endocrines gastro-intestinales, ces cellules appartiennent au système endocrinien diffus.

IV3.2.2 L'insuline

IV3.2.2.1 La sécrétion d'insuline

La glycémie est étroitement régulée par plusieurs systèmes hormonaux permettant de maintenir une valeur stable, fluctuant autour de 1g/l (5mM). Si plusieurs hormones, dites de contre-régulation, agissent de manière complémentaire pour augmenter la concentration sanguine de glucose (glucagon, adrénaline, cortisol, hormone de croissance), l'insuline, sécrétée lors d'une élévation de la glycémie, est la seule hormone hypoglycémiante.

Physiologiquement, le glucose est le seul stimulus provoquant la sécrétion d'insuline. Cette sécrétion est rapidement et étroitement régulée en fonction de l'hyperglycémie. Cependant, de nombreux autres facteurs métaboliques viennent moduler la réponse sécrétoire, soit en l'amplifiant, comme les hormones (glucagon, « gastric inhibitory polypeptide » (GIP), GLP-1, CCK), les nutriments (fructose, certains acides aminés et acides gras, corps cétoniques et certains neuromédiateurs (acétylcholine), soit en la diminuant comme les catécholamines, la galanine et la somatostatine.

La sécrétion d'insuline résulte d'une cascade de réactions engendrées par le métabolisme intra-cellulaire du glucose (figure 11). Le glucose pénètre dans la cellule grâce au transporteur Glut-2. La première étape du catabolisme implique l'enzyme glucokinase, entraînant la glycolyse et la production d'ATP. La glucokinase est une enzyme clé car elle constitue l'étape limitante de la glycolyse dans les cellules β . Une diminution de son activité, suite à des mutations de son gène, est à l'origine d'une forme de diabète, le MODY2. L'augmentation du rapport ATP/ADP provoque la fermeture des canaux potassiques sensible à l'ATP (K^+ ATP), complexe hétéromultimérique constitué de quatre sous-unités « récepteur des

sulfonylurées » (SUR-1) entourant quatre sous-unités « inward rectifying potassium channel » (Kir6.2). La fermeture de ces canaux entraîne une accumulation intracellulaire de K^+ , entraînant une dépolarisation membranaire, ouvrant les canaux calciques voltage-dépendants. Le Ca^{2+} entre alors massivement dans la cellule. L'augmentation de Ca^{2+} dans la mitochondrie induit la sécrétion de l'insuline. Une autre voie régulant la sécrétion d'insuline, encore hypothétique, est actuellement étudiée. L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire activerait le cycle de Krebs, menant à une élévation du glutamate mitochondrial. Celui-ci passerait dans le cytoplasme et induirait la libération, par exocytose, de l'insuline. Le glutamate pénétrerait dans les vésicules contenant l'insuline, modifierait leur potentiel membranaire par acidification intravésiculaire et augmenterait l'ATP cytosolique. Ce phénomène permettrait alors l'appariement des protéines membranaires vSNARE (vésiculaire) et tSNARE (cytoplasmique), permettant la fusion des membranes vésiculaires et plasmiques et la libération du contenu vésiculaire.

D'autres voies intracellulaires, activatrices ou modulatrices (inositol phosphates, diacylglycerol, AMP cyclique), régulent également de manière plus ou moins importantes, l'insulinosécrétion.

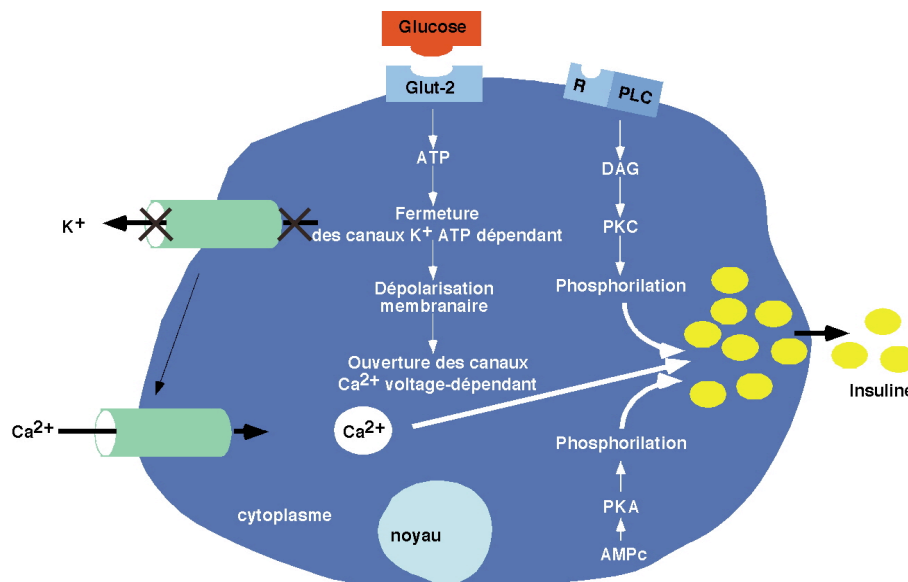


Figure 11 : Sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. Le glucose pénètre dans la cellule grâce au transporteur Glut-2. La première étape du catabolisme implique l'enzyme glucokinase, entraînant la glycolyse et la production d'ATP. L'augmentation du rapport ATP/ADP provoque la fermeture des canaux potassiques sensible à l'ATP (K^+ ATP). La fermeture de ces canaux entraîne une accumulation intracellulaire de K^+ , entraînant une dépolarisation membranaire, ouvrant les canaux calciques voltage-dépendants. Le Ca^{2+} entre

alors massivement dans la cellule, induisant la libération, par exocytose, de l'insuline. D'autres voies intracellulaires, activatrices ou modulatrices (diacylglycerol, AMP cyclique), régulent également de manière plus ou moins importantes, l'insulinosécrétion. AMPc : AMP cyclique ; DAG : diacylglycerol ; Glut-2 : glucose transporter 2 ; PKA : protéine kinase A ; PKC : protéine kinase C ; PLC : phospholipase C ; R : récepteur.

IV3.2.2.2 Les voies de signalisation de l'insuline

L'insuline joue un rôle majeur dans la mise en réserve des substrats glucidiques et lipidiques (figure 12). Ses effets résultent de sa liaison à un récepteur membranaire spécifique exprimé en priorité sur ses trois tissus cibles, le foie, le muscle et le tissu adipeux.

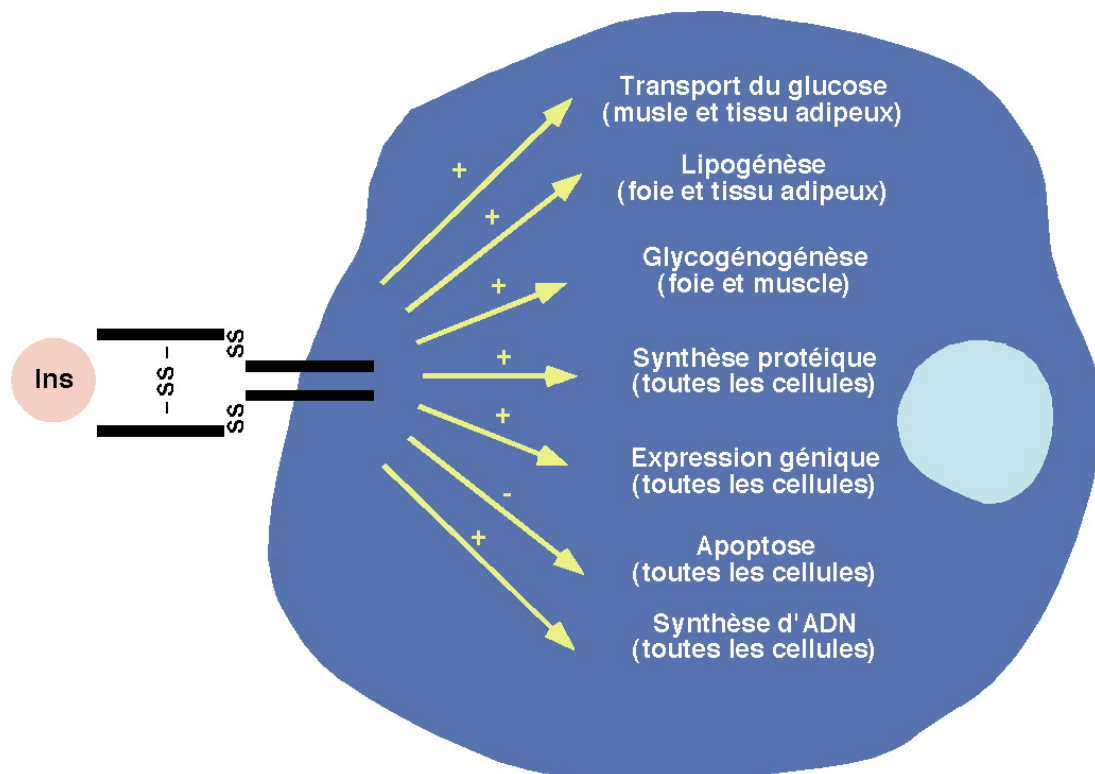


Figure 12 : Effets pléiotropiques de l'insuline. En se fixant sur son récepteur spécifique, l'insuline exerce ses effets dans de nombreux tissus, ses trois principaux tissus cibles étant le foie, le tissu adipeux et le muscle.

IV.3.2.2.2.1 Le récepteur à l'insuline

Le récepteur de l'insuline (IR) appartient à la famille des récepteurs de facteur de croissance possédant une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire (figure 13). Cette famille inclut également le récepteur de l'IGF-1 (« Insulin-like Growth Factor-1 ») et de

l'IRR (« Insulin Receptor-Related ») ²⁰⁴. Ces récepteurs sont formés de deux chaînes α extracellulaires reliées par des ponts disulfure à deux chaînes β transmembranaires, fonctionnant comme une enzyme allostérique dans laquelle la sous-unité α inhibe l'activité tyrosine kinase de la sous-unité β . La fixation de l'insuline sur la sous-unité α mène à la dérégulation de l'activité kinase de la sous-unité β et un changement conformationnel augmentant l'activité kinase ²⁰⁴. Les récepteurs de l'insuline, de l'IGF-1 et de l'IRR peuvent former des hybrides fonctionnels, et une mutation inhibitrice chez l'un de ces récepteurs peut donc inhiber l'activité des autres ²⁰⁵.

IV.3.2.2.2 La transmission du signal insulinique

La transmission du signal insulinique dans la cellule met en jeu des modules protéiques de reconnaissance présents sur les protéines de substrats et capables de les positionner à proximité du récepteur activé. Au moins 9 substrats intracellulaires communs aux récepteurs de l'insuline et de l'IGF-1 ont été identifiés. La première famille, qui compte quatre membres, est celle des IRS (« Insulin Receptor Substrate ») ²⁰⁶. D'autres substrats incluent Gab-1, p60dok, Cbl, APS et des isoformes de Shc ²⁰⁷. Les tyrosines phosphorylées de ces substrats servent de point d'ancrage pour d'autres protéines contenant un motif SH2 (« Src-Homology-2 »). De nombreuses protéines à domaine SH2 sont des molécules adaptatrices, comme la sous-unité régulatrice p85 de la Phosphatidyl-Inositol (3) kinase (PI(3)K) et Grb2, ou CrkII, qui activent des petites protéines G par fixation sur des facteurs d'échange de nucléotide. D'autres protéines SH2, comme la phosphotyrosine phosphatase SHP2 et la tyrosine kinase cytoplasmique Fyn, sont elles-mêmes des enzymes. La fixation du substrat à ces protéines SH2 permet la régulation de leur activité, ou dans certains cas leur localisation sub-cellulaire.

L'une des principales voies de signalisation insulinique est celle de la PI(3)K (figure 13). L'effet de l'insuline sur le transport du glucose, qui représente sans doute l'un des effets les mieux étudiés de l'hormone, montre la complexité de la signalisation insulinique. L'insuline est capable d'induire la translocation, d'un compartiment intracellulaire vers la membrane

plasmique, de vésicules contenant les transporteurs Glut-4, présentes dans les cellules musculaires et les adipocytes (pour revue, voir ²⁰⁸⁻²¹⁰).

Il existe également une autre voie de signalisation par l'insuline, la voie MAP kinase, qui est commune à de nombreux facteurs de croissance et permet d'activer l'expression génique et la prolifération (figure 13). Les voies PI(3)K/PKB et MAP kinase sont interconnectées entre elles et participent à l'activation l'une de l'autre.

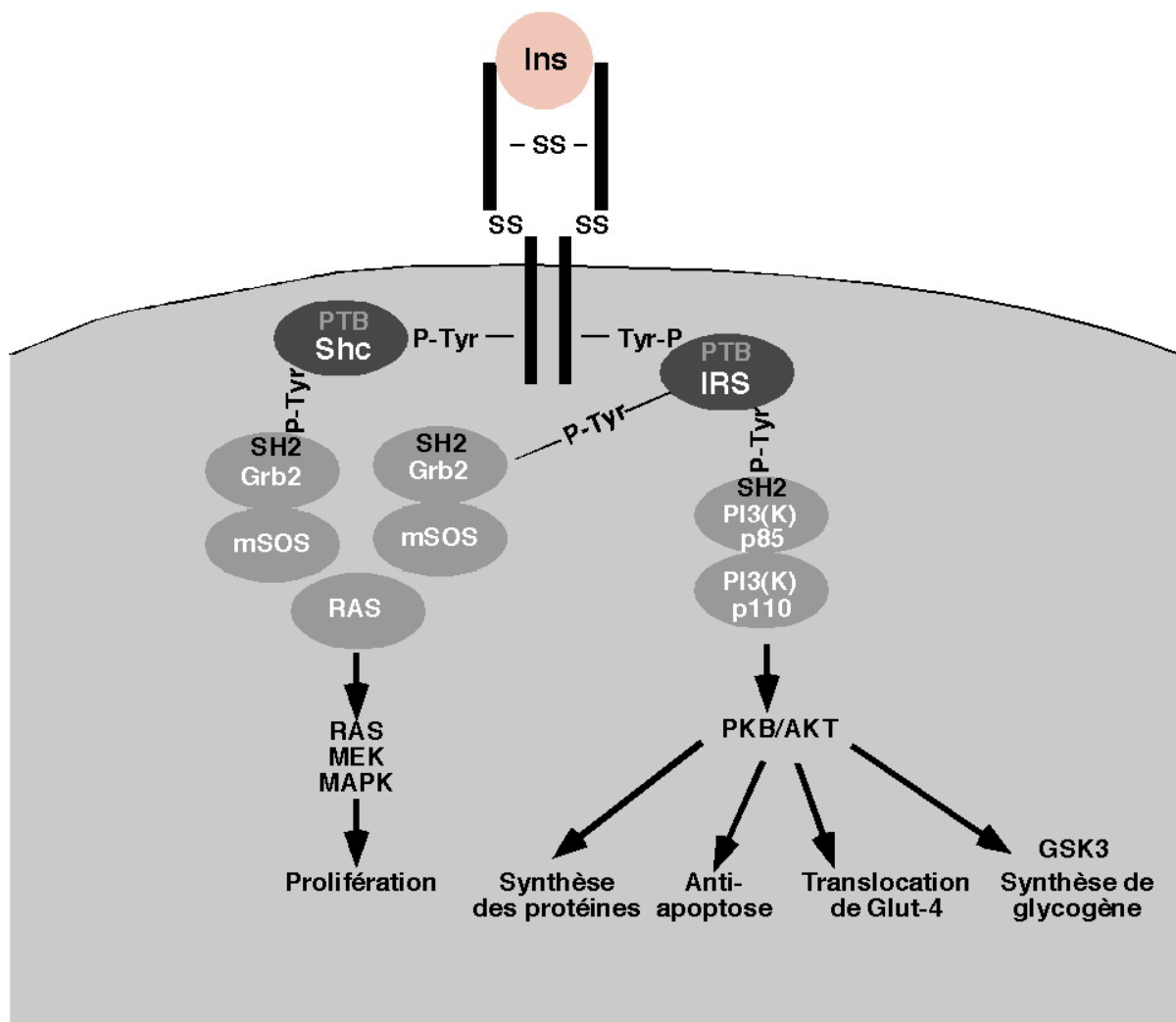


Figure 13 : Représentation schématique des principales voies de signalisation du récepteur à l'insuline. En se fixant sur son récepteur spécifique, l'insuline exerce ses effets dans de nombreux tissus, ses trois principaux tissus cibles étant le foie, le tissu adipeux et le muscle. IRS : insulin receptor substrate ; PTB : phosphotyrosine binding ; SH2 : src homology 2 ; PI(3)K : phosphatidyl inositol 3 kinase ; Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2 ; PKB/Akt : protein kinase B ; GSK3 : glycogen synthase 3 ; Shc : src homologous and collagen protein.

IV.3.2.2.2.3 Contrôle négatif de la signalisation insulinique

La fin du signal insulinique implique la dégradation de l'hormone après internalisation du complexe hormone-récepteur dans les endosomes. La majorité des récepteurs est recyclée au niveau de la membrane. Dans les conditions physiologiques, les récepteurs nouvellement synthétisés permettent de restaurer un nombre normal de récepteurs sur la cellule. En revanche, en présence d'hyperinsulisme persistant, les cycles d'internalisation/recyclage peuvent aboutir à une diminution du nombre de récepteurs à la surface, processus de régulation négative participant de façon secondaire à l'installation de la résistance à l'insuline. La déphosphorylation des résidus tyrosine du récepteur et des protéines IRS requiert des protéines tyrosine phosphatases (PTPase), comme la PTP1B cytoplasmique, ou la LAR (« Leukocyte common Antigen Related molecule ») membranaire. Les souris invalidées pour PTP1B démontrent une augmentation de la phosphorylation des tyrosines de l'IR et des IRS dans le muscle, menant à une augmentation de la sensibilité à l'insuline ²¹¹. De plus, une augmentation de l'activité PTPase dans les muscles de patients diabétiques a été observée et participerait à l'insulinorésistance dans ce tissu. Ces résultats impliquent PTP1B comme une cible thérapeutique potentielle dans le traitement du diabète.

IV.4 Maladies liées au dysfonctionnement pancréatique

IV.4.1 Le diabète

Le diabète sucré est l'une des maladies les plus répandues à travers le monde (le diabète de type 2 atteint 6% de la population aux Etats-Unis, en Europe et dans les pays à culture occidentale), pouvant entraîner des complications principalement cardio-vasculaires. Le diabète sucré n'est pas une maladie homogène. Il s'agit en fait d'un ensemble hétérogène de désordres métaboliques qui, néanmoins, ont comme caractéristique commune de permettre l'installation d'une hyperglycémie chronique. La cellule β et son produit de sécrétion, l'insuline, joue un rôle central dans la physiopathologie des diabètes. La classification étiologique proposée par l'OMS comporte actuellement quatre groupes : les diabètes de type

1, de type 2, gestationnel et un ensemble de diabète d'étiologie diverse, rangés sous la classification « autres types spécifiques de diabètes » (tableau 1).

Tableau 1 : Classification des différents diabètes sucrés.

I. Diabète de type 1	
A. Auto-immun	
B. Idiopathique	
II. Diabète de type 2	
III. Autres types de diabète	
A. Dysfonctionnement des cellules β d'origine génétique	E. Diabètes induits par les médicaments
1. Mutation du gène HNF-4 α (MODY1)	1. Pentamidine
2. Mutation du gène de la glucokinase (MODY2)	2. Acide nicotinique
3. Mutation du gène HNF-1 α (MODY3)	3. Glucocorticoïdes
4. Mutation du gène PDX1 (MODY4)	4. Hormones thyroïdiennes
5. Mutation du gène HNF-1 β (MODY5)	5. Diazoxide
6. Mutation du gène NEUDOD1 (MODY6)	6. Agoniste β -adrénergiques
7. Mutation de l'ADN mitochondrial	7. Thiazidiques
8. Autres	8. Phénytoïne
B. Déficit d'activité de l'insuline d'origine génétique	9. Interféron
1. Insulinorésistance de type A	10. Autres
2. Lepréchaunisme	F. Diabètes d'origine infectieuse
3. Syndrome de Rabson-Medenhall	1. Rubéole congénitale
4. Diabète lipo-atrophique	2. Infection à CMV
5. Autres	3. Autres
C. Maladies exocrines du pancréas	G. Formes rares d'origine auto-immune
1. Pancréatite	1. Syndrome de l'homme raide
2. Pancréatectomie/traumatisme	2. anticorps anti-récepteur de l'insuline
3. Cancer	3. Autres
4. Mucoviscidose	H. Autres syndromes d'origine génétique parfois associés au diabète
5. Hémochromatose	1. Trisomie 21
6. Fibrose et calculs pancréatiques	2. Syndrome de Klinefelter
7. Autres	3. Syndrome de Turner
D. Endocrinopathies	4. Syndrome de Wolfram
1. Acromégalie	5. Ataxie de Friedreich
2. Syndrome de Cushing	6. Chorée de Huntington
3. Glucagonome	7. Syndrome de Lawrence-Moon_Biedl
4. Phéochromocytome	8. Dystrophie myotonique
5. Hyperthyroïdie	9. Porphyrie
6. Somatostatine	10. Syndrome de Prader-Willi
7. Hyperaldostéronémie	
8. Autres	
IV. Diabète gestationnel	

Le diabète de type 1 représente 15% de l'ensemble des diabètes, le diabète de type 2 80%, les autres formes étant plus rares (MODY, 5%) ou exceptionnelles (diabètes avec forte insulinorésistance).

Le diabète de type 1, ou insulinodépendant, résulte d'un déficit primaire en insuline, dû à la destruction auto-immune des cellules β .

Au cours du diabète de type 2 (ou diabète non insulinodépendant), les muscles squelettiques, le foie et le tissu adipeux blanc sont devenus résistants à l'action de l'insuline. Par ailleurs, l'adaptation compensatrice des cellules β visant à produire plus d'insuline dans la circulation

(l'hyperinsulinisme ayant pour fonction de compenser l'insulinorésistance) n'est plus suffisante pour assurer la normoglycémie, ce qui se traduit par un épuisement fonctionnel des cellules β ²¹². Le diabète de type 2 n'est lui-même pas une maladie homogène, les diverses variantes de diabète de type 2 correspondant à un éventail de combinaisons, en proportion variables, des deux traits phénotypiques majeurs, l'insulinorésistance et le déficit de la production d'insuline. Cependant, certaines de ces variantes, simples et monogéniques, touchent la capacité des cellules β de sécréter l'insuline, ce sont les MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young).

Indépendamment des mutations touchant les gènes précités qui appartiennent au génome nucléaire, des mutations du génome mitochondrial, rares elles aussi, sont sources d'anomalies de fonctionnement des mitochondries et peuvent entraîner l'apparition d'un diabète ²¹³.

IV.4.2 Le cancer du pancréas

Les néoplasies pancréatiques regroupent plusieurs sous-types, incluant l'adénocarcinome ductal (80 à 90% des cancers) et le carcinome des cellules acineuses, mais également le plus rare néoplasme solide pseudopapillaire, le pancréatoblastome, le cystadénome séreux, le cystadénocarcinome mucineux, le néoplasme intra-ductal papillaire mucineux et des carcinomes indifférenciés. Le cancer du pancréas affecte approximativement 30000 personnes par an aux Etats-Unis, faisant de ce cancer la cinquième cause de mortalité par cancer aux Etats-Unis ²¹⁴. Sa fréquence a augmenté en Europe et en Amérique du Nord durant ces dernières décennies et, à l'inverse de certains carcinomes comme celui des poumons, de l'estomac et de l'œsophage, son incidence est encore en augmentation avec un taux annuel de 8-10 pour 100 000 personnes ²¹⁵. Le carcinome pancréatique représente une préoccupation de santé publique majeure du fait de son agressivité. En effet, il est la cause de plus de 6 000 décès par an en France ²¹⁶. Le cancer du pancréas exocrine évolue habituellement d'une manière asymptomatique jusqu'à un stade très avancé. Pour cette raison, il est rarement guérissable. Le plus fort taux de guérison a lieu si la tumeur reste localisée au pancréas. Malheureusement, ce stade de la maladie ne représente que moins de 20% des cas et

résulte en 20% de taux de survie au bout de cinq ans pour les patients dont la tumeur a été complètement éliminé, mais seulement 4% pour l'ensemble des patients. Des avancées dans la compréhension des altérations génétiques de l'adénocarcinome ont contribué à mieux comprendre les différents processus impliqués dans le développement de ce cancer. Le cancer pancréatique provient de l'accumulation d'altérations génétiques hétérogènes, allant de l'anomalie chromosomique à la mutation ponctuelle. L'analyse des changements génétiques au niveau du chromosome a permis l'identification de nombreuses pertes et gains chromosomiques. De plus, les analyses de mutations génétiques ont révélé des altérations dans les gènes suppresseurs de tumeurs et des gènes de maintenance du génome, importants pour la progression du cancer pancréatique. D'autres mécanismes ont également été récemment décrits, comme la méthylation des îlots CpG, le raccourcissement des télomères, la réactivation télomérique et les instabilités des microsatellites (pour revue, voir ^{217,218}).

IV.4.3 La pancréatite

La pancréatite correspond à une inflammation du pancréas. Elle peut être chronique ou aiguë. Dans le cas de la pancréatite aiguë, il s'agit de l'autodigestion du pancréas, utilisant ses propres enzymes pour sa destruction. Le mécanisme par lequel les enzymes pancréatiques s'attaquent à leur parenchyme d'origine est inconnu. Cependant, on peut retenir le schéma suivant: normalement, les enzymes pancréatiques sont sécrétées sous forme de proenzymes inactifs puis sont activées par des hydrolases intestinales. Au cours d'une pancréatite aiguë, les enzymes sont activées prématurément, dans le canal de Wirsung, et entraînent une inflammation du parenchyme, qui peut aller du simple oedème (pancréatite mineure) à la nécrose hémorragique (pancréatite grave, de mauvais pronostic). Cette activation précoce serait due à deux éléments: d'une part, un reflux du contenu duodéal vers le canal de Wirsung, et d'autre part une hyperpression dans ce même Wirsung. Ce mécanisme dit "canalaire" est retrouvé dans les deux plus grandes causes de pancréatites aiguës: la migration des calculs biliaires via l'ampoule de Vater, et dans une intoxication éthylique

aigüe, qui induit une hypertonie du sphincter d'Oddi et une augmentation des contractions duodénales (favorisant ainsi le reflux).

Il existe un second schéma, qui fait intervenir la séquence ischémie-nécrose: entrent dans ce cadre physio-pathologique les pancréatites aigües post-opératoires et traumatiques. Ils existent de nombreuses autres causes à la pancréatite aigüe, mais dont les mécanismes restent inconnus. Une fois guérie, la régression des lésions est complète.

Contrairement à la pancréatite aigüe, la pancréatite chronique est caractérisée par des altérations morphologiques et fonctionnelles irréversibles, dues à la formation d'une fibrose. L'apparition de la pathologie et la progression de la pancréatite chronique sont déterminées par la détermination du profil des cytokines inflammatoires persistant dans le tissu pancréatique : TNF- α , IL-6, IL-8, PDGF, TGF- β . Il est intéressant de noter que le même profil de chimiokines est retrouvé dans le cancer pancréatique ²¹⁹. Il semble évident que la pancréatite chronique a un effet stimulateur sur le développement du cancer pancréatique. La pancréatite chronique peut être considérée comme un environnement favorable et attractif pour la croissance tumorale, facilitant l'instabilité génomique et stimulant l'angiogénèse. Les cellules inflammatoires, les chimiokines et cytokines, régulent la croissance, la migration et la différenciation de tous les types cellulaires dans le microenvironnement tumoral, incluant les cellules néoplasiques, fibroblastes, et cellules endothéliales.

BUT DU TRAVAIL

I. Etudier la régulation de l'expression de LRH-1 au cours du développement pancréatique chez la souris

Chez l'adulte, LRH-1 est fortement exprimé dans le pancréas exocrine et plus faiblement dans le foie et l'intestin, et joue un rôle crucial dans le métabolisme du cholestérol. De plus, LRH-1 semble posséder des fonctions importantes dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans le développement hépatique et pancréatique. Cependant, la contribution et la fonction de LRH-1 dans le pancréas restent inconnues. Le but de ce travail était donc d'étudier la régulation transcriptionnelle de LRH-1 au cours du développement pancréatique, en utilisant des expérimentations *in vitro* (EMSA, ChIP *in vitro* et *in vivo*, lignée rétrovirale, RNAi) ainsi que des modèles animaux (PDX-1 *-/-*).

II. Etudier le rôle de E2F1 dans la prolifération du pancréas et le diabète

E2F1 est principalement connu pour son rôle dans les mécanismes de prolifération cellulaire et d'apoptose. Les fonctions physiologiques restent donc peu connues. Des études d'inactivation génique de E2F1 ont démontré que ce facteur de transcription jouait un rôle primordiale dans le développement du tissu adipeux. En effet, les souris E2F1 *-/-* ont peu de tissu adipeux, dû à un défaut du processus d'adipogénèse. Etant donné le lien direct entre les métabolismes du glucose et des acides gras, nous avons voulu évaluer si E2F1 pouvait être impliqué dans l'homéostasie glucidique, en étudiant différents paramètres liés à ce métabolisme, comme la sécrétion d'insuline et l'insulinorésistance chez les souris E2F1^{+/+} et *-/-*.

TRAVAUX PERSONNELS

I. Régulation de l'expression de LRH-1 au cours du développement pancréatique

I.1 Résultats : publication 1 : «Pancreatic-Duodenal Homeobox 1 Regulates Expression of Liver Receptor Homolog 1 during Pancreas Development », *Molecular and Cellular Biology*, Oct.2003, Vol. **23**, No.19, p. 6713-6724

[signalé bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Pancreatic-Duodenal Homeobox 1 Regulates Expression of Liver Receptor Homolog 1 during Pancreas Development

Jean-Sébastien Annicotte, Elisabeth Fayard, Galvin H. Swift, Lars Selander, Helena Edlund, Toshiya Tanaka, Tatsuhiko Kodama, Kristina Schoonjans, and Johan Auwerx

Molecular and Cellular Biology, Oct. 2003, Vol. 23, n°19, pages 6713–6724

Pages 6713–6724 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://dx.doi.org/10.1128/MCB.23.19.6713-6724.2003>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP:
peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

I.2 Conclusion et Perspectives

Nous avons mis en évidence, dans cette étude, que l'expression de LRH-1 était contrôlée par le facteur de transcription PDX1 au cours du développement pancréatique jusqu'à e16,5-17. Bien que PDX1 soit également coexprimé avec LRH-1 dans le tube digestif, nous n'avons pas observé de régulation dans ce tissu. Il semble donc que cette régulation soit spécifique du pancréas, et ne s'exerce que pendant un temps donné (entre e8,5 et e16,5), lorsque les deux protéines sont coexprimées au niveau cellulaire. En effet, à partir de e17,5, LRH-1 est exprimé dans le pancréas exocrine, alors que PDX1 est confiné principalement dans les cellules β . Malgré ces résultats, le rôle exact de LRH-1 dans le développement pancréatique reste à définir, car les souris invalidées pour LRH-1 meurent *in utero*, rendant impossible son étude au cours du développement pancréatique. Afin d'étudier le rôle de LRH-1 dans le développement et la fonction du pancréas, nous avons donc généré des souris contenant les exons 3 et 4 de LRH-1 flanqués de sites *LoxP* (figure 14). Ces souris floxées sont actuellement croisées avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur PDX1. Cette stratégie nous permettra d'inactiver l'expression de LRH-1 dans les premiers stades du développement pancréatique, et d'étudier l'implication de ce récepteur nucléaire dans la formation du pancréas. En parallèle, les cellules souches embryonnaires contenant les deux allèles de LRH-1 floxés sont en cours de génération. Ces cellules seront ensuite transfectées avec la Cre recombinase, afin d'obtenir des cellules ES LRH-1 $-/-$. Ces cellules ES LRH-1 $-/-$ permettront de générer des souris chimériques, afin de déterminer la contribution de LRH-1 dans le développement de différents organes, notamment le pancréas. Afin de déterminer le rôle de LRH-1 au cours de la différenciation endocrine, ces cellules ES seront également soumises au protocole de différenciation *in vitro* permettant d'obtenir des cellules productrices d'insuline

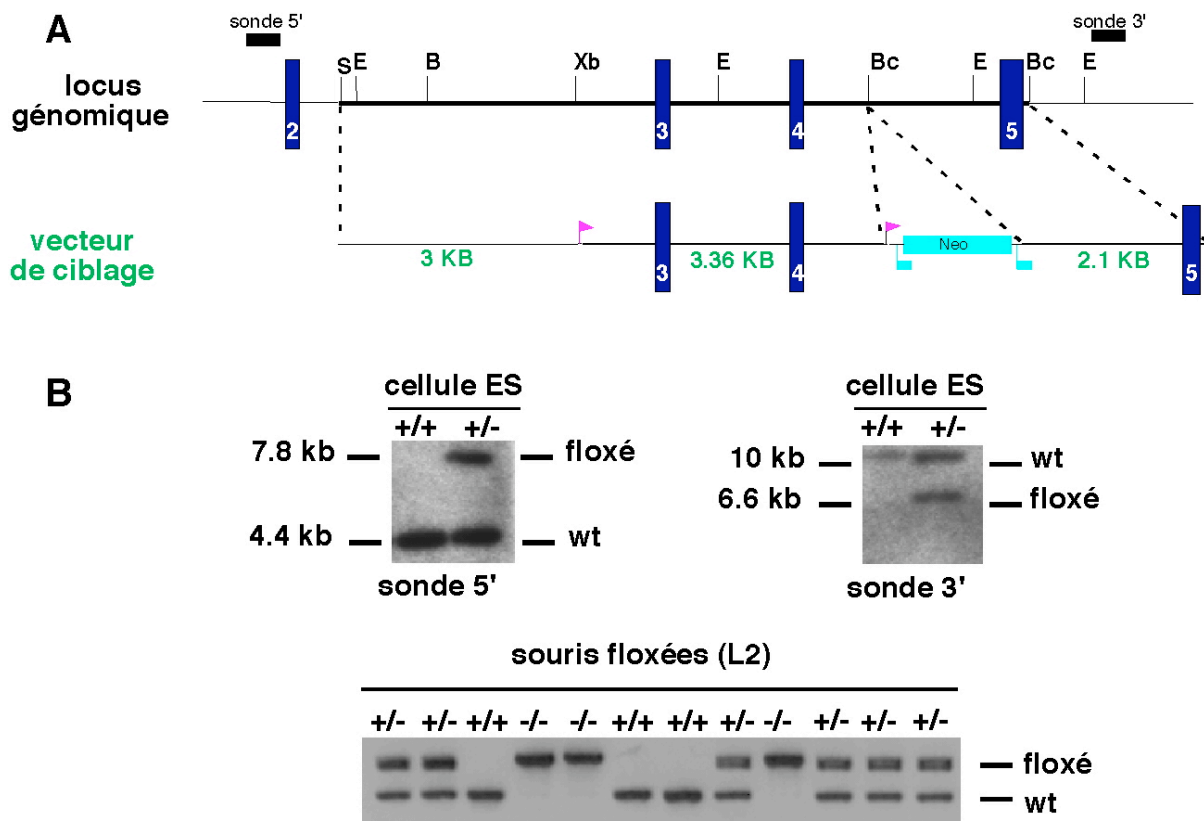


Figure 14 : Génération des souris dont le gène LRH-1 est floxé. A- Schéma représentant le vecteur de ciblage servant à introduire les sites *LoxP* au niveau de la région entourant les exons 3 et 4 du locus LRH-1. B- Schéma représentant l'intégration de la construction par recombinaison homologue dans les cellules ES. wt, allèle sauvage. Floxé, allèle ayant intégré les sites *LoxP*. Les cellules ES ayant intégrées les sites *LoxP* ont ensuite été injectées dans des blastocystes et ont donné naissance à des souris chimériques. Les souris chimériques transmettant la modification dans leur lignée germinale ont ensuite été utilisées pour générer des souris hétérozygotes puis homozygotes. L2 : 2 sites *LoxP*

II. Rôle de E2F1 dans la prolifération du pancréas et le diabète

II.1 Resultats : publication 2 : « Impaired pancreatic growth, β -cell mass and function in E2F1 -/- mice », *Journal of Clinical Investigations*, in press (2003)

Impaired pancreatic growth, β -cell mass and function in E2F1 -/- mice

Lluís Fajas^{1,*,\ddagger}, Jean-Sébastien Annicotte^{1*}, Stéphanie Miard¹, David Sarruf^{\ddagger}, Mitsuhiro Watanabe¹, and Johan Auwerx^{1,2,\dagger}

¹ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS / INSERM / ULP, F-67404 Illkirch, France

² Institut Clinique de la Souris, Génopole Strasbourg, F-67404 Illkirch, France

Running title: E2F1 and glucose homeostasis

Key words: E2F1, insulin, pancreas, adipocyte

Manuscript statistics: 48581 characters (including spaces)

* These authors contributed equally to this work.

\ddagger Present address: Equipe Avenir Inserm U540. 60 rue de Navacelles. F-34090 Montpellier, France.

\dagger To whom correspondence should be addressed at the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Parc d'Innovation, 1 rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch, France; E-mail: auwerx@igbmc.u-strasbg.fr

Summary

We evaluated the effects of E2F1 on glucose homeostasis using E2F1^{-/-} mice. E2F1^{-/-} mice show an overall reduction in pancreatic size, as the result of impaired postnatal pancreatic growth. These animals furthermore have dysfunctional β -cells, linked to impaired PDX-1 activity. Because of the disproportionate small pancreas and dysfunctional islets, E2F1^{-/-} mice secrete insufficient amounts of insulin in response to a glucose load, resulting in glucose intolerance. Despite this glucose intolerance, E2F1^{-/-} mice do not develop overt diabetes mellitus because they are insulin hypersensitive, secondary to a diminished adipose tissue mass and altered adipocytokine levels, which compensates for the defect in insulin secretion. These data demonstrate that factors controlling cell proliferation, such as E2F1, determine pancreatic growth and function, subsequently affecting metabolic homeostasis.

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2D) is a prevalent disorder of glucose homeostasis resulting from an imbalance between insulin secretion by pancreatic β -cells and the sensitivity of peripheral tissues to insulin (1). Insulin secretion can be affected by signaling and transcription factors that are necessary for the proper differentiation and growth of the various pancreatic cell types (2). Characterization of human mutations and studies in knock-out mice identified several transcription factors playing important roles in endocrine pancreas development, such as the insulin promoter factor 1 (IPF1 also known as PDX-1) (3), Nkx2.2 or Pax4 (4, 5), neurogenin 3 (6), or NeuroD (7). The importance of transcription factors in the development of the pancreas was further underscored by the analysis of mutations in patients with a monogenic type of diabetes known as maturity-onset diabetes of the young (MODY), that is characterized by early age of onset, autosomal dominant inheritance, and impaired insulin secretion. To date five MODY genes have been identified, four of which are transcription factors. These include hepatocyte nuclear factor (HNF) 1A (8), HNF4A (9), and HNF1B (10) that are responsible for MODY1, 3, and 5 respectively, IPF1/PDX1 that underlies MODY4 (11), and NeuroD, whose absence causes MODY6 (12). The remaining gene that causes MODY2 corresponds to the enzyme glucokinase (13). Furthermore, several

signaling factors, such as fibroblast (14) or epidermal growth factors (15) together with their respective receptors, sonic and indian hedgehog (16), as well as the notch signaling pathways (17) have also been linked to pancreatic growth and morphogenesis.

Beside insulin secretion, insulin resistance, characterized by an impaired glucose uptake in response to insulin by peripheral tissues, is the other important determinant for the development of T2D. Several proteins have been implicated in the development of insulin resistance including the insulin receptor (18-20), the glucose transporter Glut4 (21), the insulin receptor substrate (IRS) 1(22, 23) and IRS2 (24), insulin growth factor 1 (25), protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) (26), the p85a subunit of the phosphoinositide 3-kinase (27), protein kinase C (28), and the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) (29, 30).

E2F transcription factors are the effectors of the pathway that controls the G1/S transition of the cell cycle. E2F DNA binding sites were found to be critical in the promoters of genes involved in cell cycle progression, apoptosis, and DNA synthesis (for review see (31-33)). When bound to DNA, they exist either as free E2F/DP heterodimers, or associated in larger complexes containing members of the retinoblastoma family (pRB, p107, p130) and members of the cyclin/cdk protein families. RB associates with all E2Fs except for E2F5 and E2F6, whereas p130 associates specifically with E2F4 and E2F5, and p107 complexes exclusively with E2F4 (34). E2F complexes can act as repressors (large complexes) or as activators (free heterodimers) of their target genes. Depending on the promoter context, association of E2F with the pRB family members will either result in inhibition of E2F/DP transactivation, or active repression through recruitment of histone deacetylases by the RB family members (35-37). The role of the individual E2F family members has been established based on both over-expression studies and the analysis of E2F-deficient mice and cells (reviewed in (38, 39)). These studies show that E2F1-3 play a key role in the activation of E2F-responsive genes and therefore the induction of cellular proliferation. In contrast, E2F4 and E2F5 appear to be primarily involved in the repression of target genes and are particularly relevant for the transition between cell proliferation to differentiation (40-42).

We recently described that E2F1 favors adipocyte differentiation and fat formation

(43). Since adipose tissue plays an important role in glucose homeostasis, we now evaluated the role of E2F1 in this process. E2F1^{-/-} mice have impaired insulin secretion in response to a glucose challenge due to a defect in pancreatic growth and islet dysfunction. E2F1^{-/-} mice are, however, protected against the development of diabetes, because they are also insulin hypersensitive, as a consequence of reduced adipose tissue mass.

Results and Discussion

Adipocyte differentiation is impaired in E2F1^{-/-} mice and we reported that this results in a reduced fat pad mass (43). DEXA scan analysis performed in this study confirmed the reduction in total body fat mass in E2F1^{-/-} compared to E2F1^{+/+} mice (Fig. 1A). Consistent with the decreased body fat mass, the E2F1^{-/-} mice had lower serum leptin and free fatty acid levels (Fig. 1A). Except in the case of lipodystrophic syndromes, body fat mass appears to be directly correlated with the development of insulin resistance. This prompted us to investigate whether the decreased fat mass in E2F1^{-/-} mice could have an impact on glucose homeostasis. Both, fasting glucose and insulin levels were statistically lower in E2F1^{-/-} compared to E2F1^{+/+} mice (0.6- and 0.2-fold respectively; Fig. 1B). This effect was independent of the age of the animals and suggested increased insulin sensitivity. Consistent with this, glucose decreased by 60% in E2F1^{-/-} mice after insulin injection, whereas it decreased only by 20% in E2F1^{+/+} mice, indicating that the absence of E2F1 improved insulin sensitivity (Fig. 1C). Furthermore, coherent with a better response to insulin, radioactively labeled glucose was more efficiently taken up by size-matched primary adipocytes from E2F1^{-/-} than from E2F1^{+/+} mice after 10 min of insulin challenge (Fig. 1D), whereas no differences in glucose uptake were observed between cultured primary myocytes from E2F1^{-/-} and E2F1^{+/+} mice (Fig. 1E). This suggested that the increased insulin sensitivity of E2F1^{-/-} mice was not due to a defect in the muscle but rather the result of the decreased adipose tissue mass in these animals.

We then analyzed the causes of the improved insulin sensitivity by performing quantitative RT-PCR analysis of a number of genes involved in metabolic control. The expression of the mRNAs encoding insulin receptor substrate 1 (IRS1), IRS2, and

phosphatidylinositol-3-kinase 3 (PI3K), which are proteins involved in insulin signaling were increased 2.5-, 1.7-, and 2-fold respectively, in the white adipose tissue (WAT) of E2F1^{-/-} compared to E2F1^{+/+} mice, (Fig. 2A). Furthermore, adiponectin (Anec.) mRNA expression was increased 2.2-fold, whereas leptin mRNA levels were decreased 0.2-fold in the WAT of E2F1^{-/-} mice (Fig. 2A). No differences in WAT mRNA expression for protein kinase B (PKB), glucose transporter 4 (GLUT4), or resistin (Resist.) were observed between the genotypes (Fig. 2A). We also measured the expression of a number of genes in other insulin sensitive tissues, such as muscle and liver. No differences in the expression of genes involved in the insulin signaling pathway in the muscle were observed (Fig. 2B). Genes controlling gluconeogenesis in the liver, such as PEPCK and glucose 6 phosphatase were also not different between the two genotypes (data not shown).

The disproportionate decrease in fasting insulin relative to glucose levels (Fig. 1B) incited us to explore insulin secretion from pancreatic β -cells upon a glucose challenge, during an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT). In contrast to expectations, intraperitoneally injected glucose was cleared at least as well in E2F1^{+/+}, compared to E2F1^{-/-} mice (Fig. 3A). This observation seemed inconsistent with the decreased fasting glucose levels in E2F1^{-/-} animals. Since glucose uptake was increased in isolated E2F1^{-/-} adipocytes (Fig. 1D), and the response of the E2F1^{-/-} mice to insulin was improved compared to E2F1^{+/+} mice (Fig. 1C), the results of the glucose tolerance test pointed to an additional defect in insulin secretion in the E2F1^{-/-} mice. In line with this, fasting insulin levels were significantly lower and the insulin levels remained almost flat upon glucose injection in E2F1^{-/-} mice, which contrasted to the robust increase in insulin release in E2F1^{+/+} mice (Fig. 3A). We also performed a meal tolerance test, consisting in feeding mice *ad libitum* after an overnight fast, to evaluate glucose disposal. Reminiscent to the results of the IPGTT, insulin levels were 5-fold higher in E2F1^{+/+} compared to E2F1^{-/-} mice, whereas glucose levels were similar (Fig. 3B). In combination, these data indicated that there might be an additional defect in insulin production/secretion in these E2F1^{-/-} mice. A defect in insulin secretion either results from a reduction in size or number of islets, or a defect in insulin production by the β -cells in response to glucose. Although the body weight of E2F1^{-/-} mice

was reduced compared to E2F1^{+/+} mice (E2F1^{+/+}: 20.8±1.7 g; E2F1^{-/-}: 18.6±1.2 g), morphometric analysis of the pancreas of E2F1^{-/-} mice showed a disproportionate reduction in overall pancreatic size with a significant decrease in the ratio of pancreatic to total body weight (Fig.3C and D). The ratio of organ to body weight was, however, similar in other tissues such as heart or kidney (Fig. 3D).

A detailed histological analysis of pancreatic sections of E2F1^{-/-} mice showed no differences in the number of islets reported to pancreatic weight, suggesting that development of the endocrine pancreas was not affected in E2F1^{-/-} mice (Fig.4A and B; islet/pancreas ratio). However, the absolute number of islets was significantly reduced in E2F1^{-/-} mice when expressed relative to total body weight (Fig.4B; islet number). Similarly, the total area of pancreatic islets was not different between E2F1^{+/+} and E2F1^{-/-} mice if islet area was corrected by pancreatic surface, but decreased when related to their total body weight (Fig.4C).

The reduction of pancreatic size and islet number and surface could in part account for the decreased insulin secretion observed in these animals. This could be the consequence of either reduction in cell size or number of cells that compose the islets. Histological analysis of pancreatic sections indicated that the relative size of pancreatic cells was not affected by E2F1 deficiency, although other abnormalities, such as enlarged nuclei were observed in the exocrine pancreas of E2F1^{-/-} mice (44-45)(Fig. 4D). Pancreatic cell number is dictated by the proliferative rate of all pancreatic structures, including acini, islets and in particular ducts, which constitute the main proliferative compartment of the pancreas (46-48). β -cell growth could result from neogenesis or differentiation from ductal precursor cells (48, 49). Over-expression studies in cells and the analysis of E2F-deficient mice show that E2F1 plays a key role in the activation of genes involved in cell cycle progression and cellular proliferation (reviewed in (38, 39)). Consistent with a role of E2F1 in regulating pancreas cell proliferation, E2F1 was highly expressed in the pancreatic ducts of E2F1^{+/+} mice (Fig.4E), but was absent in the ducts of E2F1^{-/-} mice (data not shown). A lower, but significant, level of E2F1 expression was also observed in β -cells, suggesting an additional and direct role of E2F1 in regulating β -cell function (Fig.4E).

To further prove that E2F1 regulates pancreas cell proliferation, the *in vivo* cell proliferation index was analyzed by BrdU incorporation in the pancreas of mice. The proliferation index was $6\pm 0.8\%$ in E2F1^{+/+} mice, whereas only $2\pm 0.1\%$ of E2F1^{-/-} pancreatic cells proliferated (Fig. 5A). Furthermore, the number of cells positive for phosphorylated histone H3, which is an additional marker of mitosis, was significantly decreased in the pancreas of E2F1^{-/-} mice (Fig. 5B and C). Consistent with the observed decreased proliferation in pancreatic islets of E2F1^{-/-} mice, mRNA expression of the E2F target gene cyclin E was decreased in isolated islets of these mice (Fig. 5D), whereas no changes in mRNA levels of cyclin D1 and thymidine kinase were detected. Decreased proliferation could also correlate with increased apoptosis as was shown for thymocytes of E2F1^{-/-} mice (50). However, no change in apoptosis rate was observed in pancreatic sections as measured by TUNEL assay (Fig. 5E). These results indicate that reduced growth of E2F1^{-/-} pancreas is the result of impaired proliferation of pancreatic cells.

Our results point to E2F1 as an important regulator of postnatal pancreatic growth. In contrast to early pancreas development which is relatively well understood, little is known about postnatal pancreatic growth, which also participates in optimizing pancreatic insulin secretion and production. Proliferation studies have shown measurable levels of cell division in all pancreatic compartments including acini, islets, and ducts (46-48) indicating that cell proliferation could account, at least in part, for the postnatal growth of the pancreas. Strikingly, inactivation of cyclin-dependent kinase 4, which is an upstream regulator of E2F1 function, also entails a defect in insulin secretion due to impaired proliferation of pancreatic β -cells (51). In contrast to E2F1, which might stimulate β -cell neogenesis from proliferating ductal cell precursors, the forkhead transcription factor foxo-1 is a negative effector of this pathway inhibiting the proliferation of these β -cell precursors (52). Consequently, haploinsufficiency of foxo-1 restores β -cell proliferation in *Irs2*^{-/-} mice, which have impaired β -cell proliferation (52), leading us to suggest that E2F1 could be a negative modulator of foxo-1 signaling. In support of this hypothesis is the fact that E2F1 favors adipogenesis (43), a process that is inhibited by a constitutively active form of foxo-1 (53).

An alternate possibility to explain the inadequate insulin response to glucose in E2F1^{-/-} mice, would be a specific defect in insulin-secreting β -cells. Whereas 4 weeks after birth no differences were observed between the size, morphology or distribution of exocrine and endocrine tissues of E2F1^{-/-} and E2F1^{+/+} mice (Fig. 4C), the ratio glucagon/insulin producing cells was clearly elevated in E2F1^{-/-} islets of 16 week old mice, as assessed by immunofluorescence analysis (Fig.5F). This was perfectly correlated with the serum glucagon/insulin ratio (Fig. 5G). The lack of differences in β -cell area in young animals indicates that E2F1 does not participate in pancreas development, but rather participates in post-natal growth. Consistent with this, we observed that E2F1 was highly expressed in embryonic pancreas at 16.5 days post coitum (dpc), a stage when the pancreas is already developed, but not in the developing pancreas at 12.5 dpc, when PDX-1, a key player in pancreas development, was already expressed (Fig.5H). The lack of expression of E2F1 during the critical early phases of pancreas development demonstrates that it has no role in early pancreas development.

The fact that the ratio of glucagon/insulin producing cells as well as the serum glucagon/insulin ratio was increased in E2F1^{-/-} mice suggested a specific defect in pancreatic β -cell mass and/or function. PDX1/IPF1 is a transcription factor that plays an important role, not only during pancreas development, but also in adult β -cell function. We therefore evaluated the expression of PDX1 in pancreatic sections of E2F1^{-/-} or E2F1^{+/+} mice by immunofluorescence analysis. Whereas 75% of insulin producing cells were also positive for PDX1 in E2F1^{+/+} mice, only 30% of β -cells were positive for PDX1 in E2F1^{-/-} mice (Fig. 6A and B). Interestingly, a significant number of E2F1^{-/-} cells expressed PDX1 in the cytoplasm, whereas PDX1 was exclusively localized in the nucleus in E2F1^{+/+} cells (Fig.6C). Furthermore, PDX1 mRNA expression was significantly decreased in isolated islets from E2F1^{-/-} compared to E2F1^{+/+} mice (Fig. 6D). No further changes in the expression of other transcription factors involved in pancreas development or function, such as HNF1 was observed (Fig 6D). The mRNA expression analysis also confirmed the increased glucagon to insulin ratio observed previously on the protein level (Fig. 5F and G). Altogether, these results are reminiscent to those observed in islets of *Irs2*^{-/-} mice which showed both,

decreased expression, and cytoplasmic localization of PDX1 (52), and suggest that E2F1 could directly regulate the expression of PDX1. The modified expression of PDX1 and its altered cellular localization in the E2F1^{-/-} mice clearly contributes to their β -cell dysfunction.

To provide further arguments to support that the E2F1^{-/-} islets were dysfunctional, we analyzed glucose- and arginine-induced insulin secretion in isolated islets of E2F1^{-/-} and +/+ mice. Insulin secretion in response to either glucose or arginine challenge was significantly reduced in the islets of E2F1^{-/-} mice when compared to E2F1^{+/+} islets (Fig.6E). The response of E2F1^{-/-} islets was, however, still rather robust, suggesting that this β -cell dysfunction was not sufficient to fully explain the hypoinsulinemia and the glucose intolerance and further underscored the relevance of the decreased pancreatic mass to explain the phenotype.

The fact that E2F1^{-/-} mice did not develop diabetes over time, even after high fat diet (Fig. 1B), suggests that the increased insulin sensitivity is not just a compensatory mechanism to maintain glucose homeostasis. E2F1 rather seems to have two independent effects on glucose metabolism. First, E2F1 participates in the control of insulin secretion / production. E2F1 favors postnatal pancreatic growth by controlling the proliferation rate of pancreatic cells (Fig. 4), and it directly controls β -cell function through its regulatory role on genes such as PDX1 (Fig. 6). This effect of E2F1 on β -cell function is fully in line with an independent study, that was published while this paper was being reviewed and which characterized E2F1/E2F2 double mutant mice (45). In contrast to the E2F1^{-/-} mice, these E2F1/E2F2 double mutant mice, developed a more severe exocrine pancreatic atrophy that impacted on pancreatic β -cell maintenance and function. Second, E2F1 negatively regulates insulin action, likely through regulation of the expression of genes implicated in this process. Interestingly, similar to E2F1^{-/-} mice, S6K1-deficient mice are glucose intolerant and show low insulin levels due to a selective reduction of β -cell size (54). These S6K1^{-/-} mice do not develop diabetes, indicating that they are insulin hypersensitive (54), and suggesting an eventual cross-talk between S6K1 and E2F1 signaling pathways. Another putative E2F1 target in this context is the PTP1B gene, which dephosphorylates the insulin receptor, and thus attenuates insulin signaling. Mice lacking PTP1B are, like the E2F1^{-/-} mice (43), insulin sensitized and protected against diet-induced obesity (26). We speculate that in the case of the E2F1/E2F2

double mutant mice, the disappearance of this negative effect of E2F1 on insulin action may be insufficient to compensate for the more severe pancreatic failure, ultimately causing these mice to become diabetic (45). It is at present also unclear whether E2F2 also regulates the expression of the same set of genes implicated in insulin sensitivity, that are regulated by E2F1.

The compensatory mechanism through which E2F1^{-/-} mice maintain their glucose homeostasis likely involves its role on adipose tissue development rather than a direct effect of E2F1 in insulin sensitive target tissues such as muscle or liver. Supporting this hypothesis is the fact that, in contrast to what is observed in isolated adipocytes, isolated myocytes from E2F1^{-/-} mice are not more sensitive to insulin than E2F1^{+/+} cells. We have previously shown that E2F1 favors adipogenesis through the induction of PPAR γ , the master controller of adipocyte differentiation (43). Total absence of adipose tissue, such as seen in lipotrophic subjects (55) and animals (56-58) results in insulin resistance. Excess adipose tissue in obesity is also a risk factor for insulin resistance since high levels of free fatty acids, which are the consequence of “spill over” from adipose tissue, are linked to the induction of insulin resistance (59). Furthermore, besides fatty acids, adipose tissue secretes several proteins (also called adipocytokines) that affect insulin signaling in other tissues, including TNF α (60), resistin (61) and adiponectin (62-64). We hypothesize that the normal glucose tolerance and insulin sensitivity in E2F1^{-/-} mice is most likely the result of the improved profile of adipose tissue-derived signaling molecules, as reflected by the increase in adiponectin and the reduction in FFA levels. The reduced fat mass in the E2F1^{-/-} mice could therefore, through altered levels of these signaling factors (fatty acids and adipocytokines), contribute to the increased overall insulin sensitivity, a phenomenon reminiscent to that previously observed in mice heterozygous for mutations in the PPAR γ gene (29, 30).

In summary, we have shown that the transcription factor E2F1 regulates pancreatic growth and islets mass and function. E2F1 achieves these effects through controlling cell proliferation and directly regulating islet function. The ensuing impaired insulin secretion does, however, not result in the development of diabetes since E2F1^{-/-} mice are more sensitive to insulin, secondary to a reduced fat mass.

Material and methods

Materials: All chemicals, except if stated, were purchased from Sigma (St-Louis, MO).

RNA isolation and quantitative real time PCR: RNA isolation and reverse transcription has been previously described. Quantitative PCR was carried out by Real Time PCR using a LightCycler and the DNA double strand specific SYBR Green I dye for detection (Roche, Basel, Switzerland). Reverse transcription of total RNA was performed at 42°C using the Superscript II reverse transcriptase (Stratagene, La Jolla, CA) and random hexanucleotides primers, followed by a 15 min inactivation at 70°C. cDNAs were then purified using Qiagen Purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). Results were then normalized to GAPDH levels. The primer pairs used in this study are available upon request.

Histological and immunofluorescence analysis: Sections of pancreas were fixed in either Bouin's solution or in 4% formaldehyde. They were then stained with haematoxylin and eosin, or treated with 1.5N HCl before incubation with specific antibodies directed against insulin (Santa Cruz Biotechnology, CA), glucagon (a kind gift of G. Thomas), phospho-histone H3 (Upstate Biotech, Lake Placid, NY), PDX-1(65), or BrdU (Dako A/S, Glostrup, Denmark). Preparations were then incubated with an anti-mouse IgG and FITC-conjugated anti-rabbit IgG. For in vivo cell proliferation assays two week-old mice were intraperitoneally injected with BrdU (50 mg / Kg body weight). After 18 hours, mice were sacrificed and pancreas was excised and fixed as described. Pancreatic sections were immunostained with an anti-BrdU antibody. BrdU positive cells were counted.

Embryos from stages between 7 dpc to 16.5 dpc were directly embedded in cryomatrix (Shandon, Pittsburgh, PA). *In situ* hybridizations were performed on 10 µm cryosections using ³⁵S-antisense RNA probes as described previously (66). Mouse mE2F1 cDNA was subcloned into the *EcoRI* site of pBS-SK+, linearized by *NotI* and antisense mE2F1 RNA was synthesized using T7 RNA polymerase (Promega Life Science, Madison, WI). Mouse PDX-1 cDNA was subcloned from pSP64-xβPDX-1 (67) into *HindIII/XbaI* sites of pBS-SK+, linearized by *HindIII* and antisense mPDX-1 RNA was synthesized using T3 RNA

polymerase (Promega). Negative controls were performed in parallel using sense RNA probes for mE2F1 and mPDX-1 (data not shown).

Animal experiments: The generation of E2F1^{+/+} and ^{-/-} mice has been described (44). These mice were purchased from Jackson laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and were on a pure C57BL/6J background. Only age-matched (10-16 weeks old) mice were used, unless otherwise stated. Animals were maintained in a temperature-controlled (23°C) facility with a 12-hrs light/dark cycle according to EU guidelines for use of laboratory animals. Mice had *ad libitum* access to water and regular rodent chow (DO4, UAR, France). Intraperitoneal glucose tolerance tests (IPGTT), insulin sensitivity test, and glucose, free fatty acids and insulin measurements were performed as described (Picard et al., 2002). Body fat mass was evaluated in anesthetized mice by dual energy X-ray absorptiometry (PIXIMUS™, GE Medical Systems, Buc, France).

Glucose uptake: Primary adipocytes and primary myocytes were prepared according to Rodbell (68) and Rando (69) respectively. Cells were incubated with 100 mM of radiolabeled ¹⁴C-3-O-methylglucose for 10 min. in the presence of 1 μM insulin. After that period, the cells were washed three times with PBS, lysed in NaOH 0.1M, and radioactivity was measured.

Pancreatic islet studies: Islets isolation and insulin secretion studies were described previously (70). Briefly, small pieces of pancreas were digested by collagenase (3 mg/mL) and isolated in oxygenated Krebs-Ringer buffer. Approximately four islets per condition were hand-picked and exposed to 15mM glucose or 20mM arginine. Insulin released in the medium was measured 30 min later. Data were corrected as a ratio per DNA content.

Statistical analysis: Data are presented as means ± S.E.M. Group means were compared by factorial analysis of variance (ANOVA). Upon significant interactions, differences between individual group means were analyzed by Fisher's protected least squares difference (PLSD) test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Acknowledgements

P. Chambon, M.F. Champy and various members of the Auwerx and Fajas labs are

acknowledged for support and discussion. We thank G. H. Swift for the PDX-1 cDNA. This work was supported by grants of CNRS, INSERM, CHU de Strasbourg, ARC, FRM, the European community RTD program (QLG1-CT-1999-00674 and GLRT-2001-00930), and NIH (1P01 DK 59820-01).

References

1. Taylor, S.I. 1999. Deconstructing type 2 diabetes. *Cell* 97:9-12.
2. Edlund, H. 2002. Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 3:524-532.
3. Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., and Edlund, H. 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371:606-609.
4. Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, D.J., Meneses, J.J., Pedersen, R.A., Rubenstein, J.L., and German, M.S. 1998. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* 125:2213-2221.
5. Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G., and Gruss, P. 1997. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386:399-402.
6. Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., and Guillemot, F. 2000. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1607-1611.
7. Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F.J., Leiter, A.B., and Tsai, M.J. 1997. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11:2323-2334.
8. Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P.J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R.D., Lathrop, G.M., Boriraj, V.V., et al. 1996. Mutations in the hepatocyte

- nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384:455-458.
9. Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P.J., Menzel, S., Cox, N.J., Fajans, S.S., Signorini, S., Stoffel, M., and Bell, G.I. 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384:458-460.
 10. Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., Furuta, H., Hinokio, Y., Cockburn, B.N., Lindner, T., Yamagata, K., Ogata, M., Tomonaga, O., et al. 1997. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 17:384-385.
 11. Stoffers, D.A., Ferrer, J., Clarke, W.L., and Habener, J.F. 1997. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17:138-139.
 12. Malecki, M.T., Jhala, U.S., Antonellis, A., Fields, L., Doria, A., Orban, T., Saad, M., Warram, J.H., Montminy, M., and Krolewski, A.S. 1999. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 23:323-328.
 13. Bell, G.I., Pilkis, S.J., Weber, I.T., and Polonsky, K.S. 1996. Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus. *Annu Rev Physiol* 58:171-186.
 14. Miralles, F., Czernichow, P., Ozaki, K., Itoh, N., and Scharfmann, R. 1999. Signaling through fibroblast growth factor receptor 2b plays a key role in the development of the exocrine pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6267-6272.
 15. Miettinen, P.J., Huotari, M., Koivisto, T., Ustinov, J., Palgi, J., Rasilainen, S., Lehtonen, E., Keski-Oja, J., and Otonkoski, T. 2000. Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Development* 127:2617-2627.
 16. Kim, S.K., and Melton, D.A. 1998. Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13036-13041.

17. Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D.J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U., and Edlund, H. 1999. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400:877-881.
18. Bluher, M., Michael, M.D., Peroni, O.D., Ueki, K., Carter, N., Kahn, B.B., and Kahn, C.R. 2002. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 3:25-38.
19. Bruning, J.C., Michael, M.D., Winnay, J.N., Hayashi, T., Horsch, D., Accili, D., Goodyear, L.J., and Kahn, C.R. 1998. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2:559-569.
20. Lauro, D., Kido, Y., Castle, A.L., Zarnowski, M.J., Hayashi, H., Ebina, Y., and Accili, D. 1998. Impaired glucose tolerance in mice with a targeted impairment of insulin action in muscle and adipose tissue. *Nat Genet* 20:294-298.
21. Stenbit, A.E., Tsao, T.S., Li, J., Burcelin, R., Geenen, D.L., Factor, S.M., Houseknecht, K., Katz, E.B., and Charron, M.J. 1997. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med* 3:1096-1101.
22. Araki, E., Lipes, M., Patti, M.-E., Bruning, J.C., Haag, B.I., Johnson, R.S., and Kahn, C.R. 1994. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-I gene. *Nature* 372:186-190.
23. Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., et al. 1994. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate I. *Nature* 372:182-186.
24. Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towery, H., Burks, D.J., Ren, J.M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G.I., et al. 1998. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391:900-904.
25. Withers, D.J., Burks, D.J., Towery, H.H., Altamuro, S.L., Flint, C.L., and White, M.F. 1999. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 23:32-40.

26. Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., et al. 1999. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283:1544-1548.
27. Terauchi, Y., Tsuji, Y., Satoh, S., Minoura, H., Murakami, K., Okuno, A., Inukai, K., Asano, T., Kaburagi, Y., Ueki, K., et al. 1999. Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat Genet* 21:230-235.
28. Itani, S.I., Zhou, Q., Pories, W.J., MacDonald, K.G., and Dohm, G.L. 2000. Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. *Diabetes* 49:1353-1358.
29. Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., et al. 1999. PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell* 4:597-609.
30. Miles, P.D., Barak, Y., He, W., Evans, R.M., and Olefsky, J.M. 2000. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest* 105:287-292.
31. Nevins, J.R. 1992. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258:424-429.
32. Helin, K. 1998. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 8:28-35.
33. Sardet, C., Le Cam, L., Fabbrizio, E., and Vidal, M. 1997. E2Fs and the retinoblastoma protein family. *Progress in gene expression* 2:1-62.
34. Sardet, C., Vidal, M., Cobrinik, D., Geng, Y., Onufryk, C., Chen, A., and Weinberg, R.A. 1995. E2F-4 and E2F-5, two members of the E2F family, are expressed in the early phases of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2403-2407.
35. Cao, L., Faha, B., Dembski, M., Tsai, L.H., Harlow, E., and Dyson, N. 1992. Independent binding of the retinoblastoma protein and p107 to the transcription factor E2F. *Nature* 355:176-179.

36. Dyson, N., Dembski, M., Fattaey, A., Ngwu, C., Ewen, M., and Helin, K. 1993. Analysis of p107-associated proteins: p107 associates with a form of E2F that differs from pRB-associated E2F-1. *J Virol* 67:7641-7647.
37. Krek, W., Livingston, D.M., and Shirodkar, S. 1993. Binding to DNA and the retinoblastoma gene product promoted by complex formation of different E2F family members. *Science* 262:1557-1560.
38. Dyson, N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12:2245-2262.
39. Trimarchi, J.M., and Lees, J.A. 2002. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:11-20.
40. Gaubatz, S., Lindeman, G.J., Ishida, S., Jakoi, L., Nevins, J.R., Livingston, D.M., and Rempel, R.E. 2000. E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol Cell* 6:729-735.
41. Humbert, P.O., Rogers, C., Ganiatsas, S., Landsberg, R.L., Trimarchi, J.M., Dandapani, S., Brugnara, C., Erdman, S., Schrenzel, M., Bronson, R.T., et al. 2000. E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Mol Cell* 6:281-291.
42. Rempel, R.E., Saenz-Robles, M.T., Storms, R., Morham, S., Ishida, S., Engel, A., Jakoi, L., Melhem, M.F., Pipas, J.M., Smith, C., et al. 2000. Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. *Mol Cell* 6:293-306.
43. Fajas, L., Landsberg, R.L., Huss-Garcia, Y., Sardet, C., Lees, J.A., and Auwerx, J. 2002. E2Fs regulate adipogenesis. *Developmental Cell* 3:39-49.
44. Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E., and Dyson, N.J. 1996. Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* 85:537-548.
45. Li, F., Zhu, J., Tessem, J., Beilke, J., Varella-Garcia, M., Jensen, J., Hogan, C., and DeGregory, J. 2003. The development of diabetes in E2F1/E2F2 mutant mice reveals important roles for bone marrow derived cells in preventing islet cell loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12935-12940.

46. Elsasser, H.P., Biederbick, A., and Kern, H.F. 1994. Growth of rat pancreatic acinar cells quantitated with a monoclonal antibody against the proliferating cell nuclear antigen. *Cell Tissue Res* 276:603-609.
47. Muller, R., Laucke, R., Trimper, B., and Cossel, L. 1990. Pancreatic cell proliferation in normal rats studied by in vivo autoradiography with 3H-thymidine. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 59:133-136.
48. Githens, S. 1988. The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation, and culture. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 7:486-506.
49. Bonner-Weir, S., Baxter, L.A., Schuppin, G.T., and Smith, F.E. 1993. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42:1715-1720.
50. Garcia, I., Murga, M., Vicario, A., Field, S.J., and Zubiaga, A.M. 2000. A role for E2F1 in the induction of apoptosis during thymic negative selection. *Cell Growth Differ* 11:91-98.
51. Rane, S.G., Dubus, P., Mettus, R.V., Galbreath, E.J., Boden, G., Reddy, E.P., and Barbacid, M. 1999. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet* 22:44-52.
52. Kitamura, T., Nakae, J., Kitamura, Y., Kido, Y., Biggs, W.H., 3rd, Wright, C.V., White, M.F., Arden, K.C., and Accili, D. 2002. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest* 110:1839-1847.
53. Nakae, J., Kitamura, T., Kitamura, Y., Biggs, W.H., 3rd, Arden, K.C., and Accili, D. 2003. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* 4:119-129.
54. Pende, M., Kozma, S.C., Jaquet, M., Oorschot, V., Burcelin, R., Le Marchand-Brustel, Y., Klumperman, J., Thorens, B., and Thomas, G. 2000. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature* 408:994-997.

55. Moller, D.E., and Flier, J.S. 1991. Insulin resistance-mechanisms, syndromes, and implications. *New England Journal of Medicine* 325:938-948.
56. Shimomura, I., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Ikemoto, S., Bashmakov, Y., J.L., G., and Brown, M.S. 1998. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: a model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes & Development* 12:3182-3194.
57. Moitra, J., Mason, M.M., Olive, M., Krylov, D., Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., Feigenbaum, L., Lee, E., Aoyama, T., Eckhaus, M., et al. 1998. Life without fat: a transgenic mouse. *Genes & Development* 12:3168-3181.
58. Koutnikova, H., Cock, T., Watanabe, M., Houten, S., Champy, M., Dierich, A., and Auwerx, J. 2003. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR γ hypomorphic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14457-14462.
59. Randle, P.J. 1998. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* 14:263-283.
60. Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. 1993. Adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91.
61. Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312.
62. Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., et al. 2002. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277:25863-25866.
63. Fruebis, J., Tsao, T.S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R., Yen, F.T., Bihain, B.E., and Lodish, H.F. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2005-2010.

64. Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., et al. 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8:731-737.
65. Annicotte, J., Fayard, E., Swift, G.H., Selander, L., Edlund, H., Tanaka, T., Kodama, T., Schoonjans, K., and Auwerx, J. 2003. Pancreatic-duodenal homeobox 1 regulates expression of liver receptor homolog 1 during pancreas development. *Mol Cell Biol* 23:6713-6724.
66. Dolle, P., and Duboule, D. 1989. Two gene members of the murine HOX-5 complex show regional and cell- type specific expression in developing limbs and gonads. *Embo J* 8:1507-1515.
67. Liu, Y., MacDonald, R.J., and Swift, G.H. 2001. DNA binding and transcriptional activation by a PDX1.PBX1b.MEIS2b trimer and cooperation with a pancreas-specific basic helix-loop-helix complex. *J Biol Chem* 276:17985-17993.
68. Rodbell, M., and Krishna, G. 1974. Preparation of isolated fat cells and fat cell "ghosts"; methods for assaying adenylate cyclase activity and levels of cyclic AMP. *Methods Enzymol* 31(Pt:103-114).
69. Rando, T., and Blau, H. 1994. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol* 125:1275-1287.
70. Picard, F., Wanatabe, M., Schoonjans, K., Lydon, J., O'Malley, B.W., and Auwerx, J. 2002. Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to beta -cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15644-15648.

Figure legends

Figure 1. Insulin sensitivity in E2F1^{-/-} mice.

A. Body fat mass, evaluated by DEXA scanning, and free fatty acid, and leptin levels in the serum of E2F1^{+/+} and ^{-/-} mice (6 animals per group). Results are the average of 3 independent experiments. In all following figures, statistically significant differences (ANOVA $p < 0.005$) are indicated by asterisks.

B. Fasting plasma glucose and insulin in either 12 week- or 50 week-old E2F1^{+/+} and ^{-/-} mice. Results are the mean \pm standard deviation of 12 mice analyzed per group. The same number of mice were analyzed in subsequent experiments.

C. Glucose clearance after intraperitoneal injection of insulin (0.75 IU/Kg) as a measure of insulin sensitivity in E2F1^{-/-} and ^{+/+} mice. Glucose values are reported to the initial glucose levels.

D-E. In vitro ¹⁴C 3-O-methylglucose uptake 10 minutes after insulin addition to isolated adipocytes (E) or myocytes (F) from the same amount of tissue of E2F1^{+/+} and ^{-/-} mice. Results are normalized by the content of DNA.

Figure 2. Gene expression analysis in different tissues of E2F1^{-/-} or ^{+/+} mice.

Quantification of the expression by real time RT-PCR of relevant genes for the insulin sensitivity pathway in white adipose tissue (A; WAT), and muscle (B). Results were normalized by the expression of the 18S ribosomal subunit RNA, and expressed as fold-changes relative to expression levels in E2F1^{+/+} mice.

Figure 3. Glucose tolerance and macroscopic analysis of the pancreas of E2F1^{-/-} or ^{+/+} mice.

A. Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) measuring the levels of glucose and insulin at different times after intraperitoneal injection of glucose in E2F1^{+/+} or E2F1^{-/-} mice.

B. Glucose and insulin levels upon a meal tolerance test. E2F1^{-/-} or ^{+/+} mice were fed ad libitum after an overnight fast. Ninety minutes after beginning the meal, plasma insulin and glucose levels were measured.

C. Morphology of the entire pancreas from E2F1^{+/+} or ^{-/-} mice demonstrates the decreased size of the E2F1^{-/-} pancreas

D. Relative weight of three representative tissues of E2F1^{-/-} or ^{+/+} mice. Weights are reported to total body weight. Statistically significant differences are indicated.

Figure 4. Pancreatic size and β -cell area.

A. Hematoxylin-eosin staining of pancreatic sections of E2F1^{-/-} or ^{+/+} 2 week-old mice. Pancreatic islets are indicated by arrowheads.

B. Pancreatic islet number in E2F1^{-/-} and ^{+/+} 2 week-old mice. Summed islet numbers obtained from examining every fifth section of 20 μ m thickness from a whole pancreas (left scale). The numbers were reported to pancreas weight to determine the islet pancreas ratio (right scale).

C. Endocrine islet area calculated as arbitrary units from micrographs of pancreatic sections of E2F1^{+/+} or ^{-/-} 2 week-old mice using the Canvas 7 software (Daneba). The right scale represents the relative islet area reported to pancreas weight.

D. H&E staining of pancreatic sections of E2F1^{-/-} and ^{+/+} mice. Quantification of the relative cell size of exocrine pancreatic cells of 2 week-old E2F1^{-/-} and ^{+/+} mice.

E. Immunofluorescence analysis of pancreatic sections showing expression of E2F1 in ducts and β -cells (green), which are also positive for insulin (red). Nuclei are stained with the Hoechst reagent.

Figure 5. *in vivo* proliferation and apoptosis rates and expression of E2F1 in pancreas development.

A. Representative micrograph showing BrdU immunostaining of pancreatic sections of E2F1^{-/-} and ^{+/+} 2 week-old mice. The pancreas of five mice of each genotype was analyzed 18 hours after intraperitoneal injection of BrdU. The percentage of BrdU positive cells is

indicated. Results are the mean of the summed numbers from 10 sections of each pancreas from 5 mice per genotype.

B-C. Phospho-histone H3 immunofluorescent labelling in pancreatic sections of either E2F1^{+/+} or ^{-/-} mice. Nuclei are visualized by Hoechst staining. At least 500 cells were counted, and the number of phospho-histone H3 positive cells was reported to total number of cells (B).

D. Quantification of the expression by real time RT-PCR of relevant E2F-target genes in isolated islets. Results were normalized by the expression of the 18S ribosomal subunit RNA.

E. DNA fragmentation (green) measured by TUNEL assay in pancreatic sections (10 sections per pancreas of 6 mice) of E2F1^{-/-} and ^{+/+} 16 week-old mice. The percentage of apoptotic cells is indicated at the right of the panel.

F. Insulin (red; β -cells) and glucagon (green; α -cells) immunostaining of pancreatic islets of Langerhans in E2F1^{-/-} and ^{+/+} 16 week-old mice.

G. Quantification of the glucagon/insulin ratio in the serum of E2F1^{-/-} and ^{+/+} male 16 week-old mice.

H. In situ hybridization of E2F1 or PDX-1 in sections of 12.5 or 16.5 dpc embryos. Location of liver (liv), stomach, skin, lung, pancreas (panc), intestine (int), and dorsal root ganglion (rg) in the embryo is indicated.

Figure 6. PDX1 expression and insulin secretion of islets of E2F1^{-/-} and ^{+/+} mice.

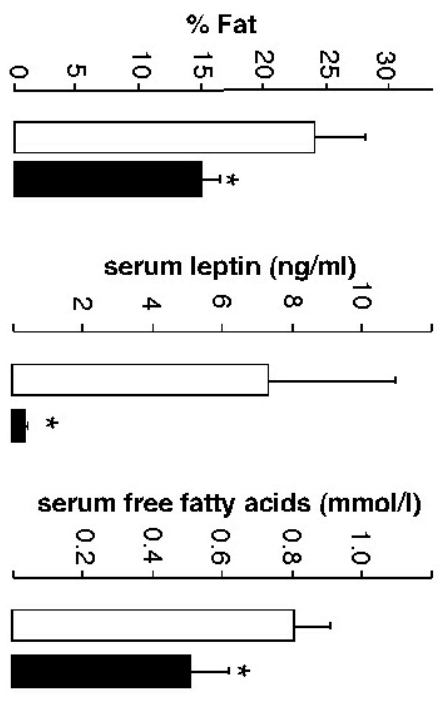
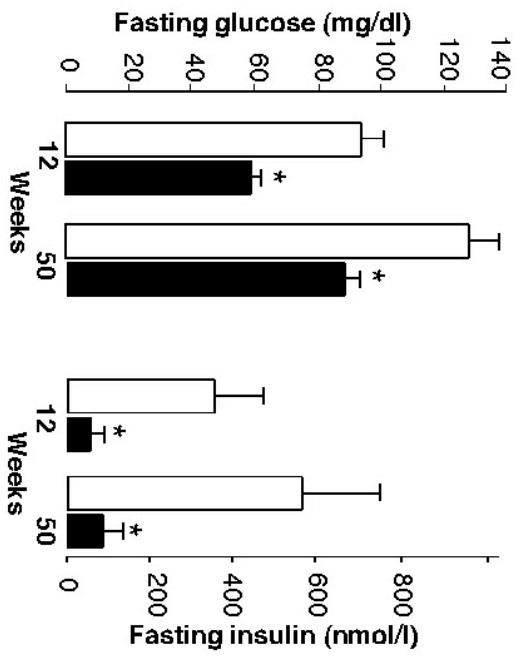
A. Immunofluorescence analysis of PDX1 expression (green) in insulin producing cells (red) of pancreatic sections of E2F1^{+/+} or ^{-/-} 16 week-old mice.

B. Quantification (500 cells) of insulin producing cells, which were also expressing PDX1. Results are reported to total number of insulin producing cells.

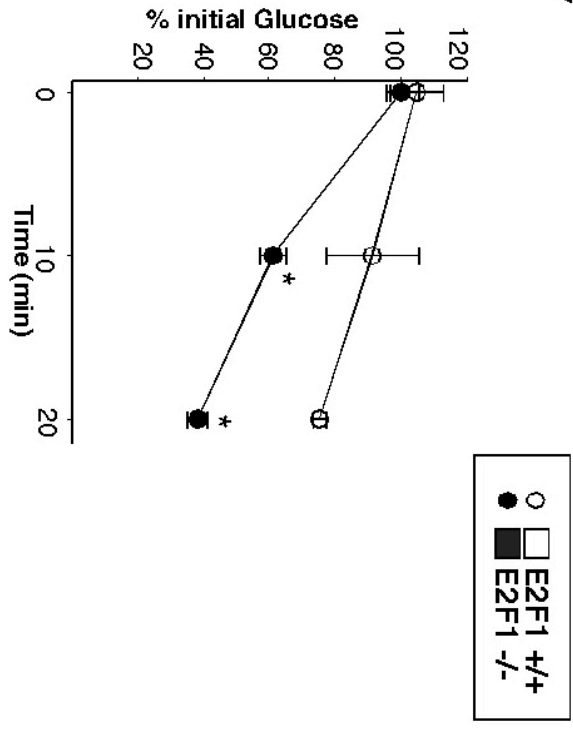
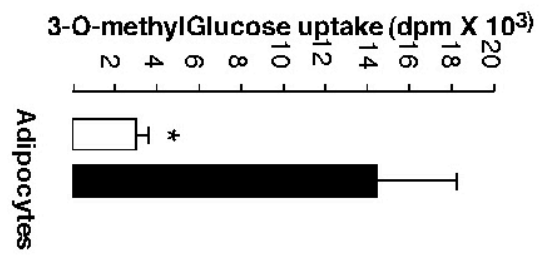
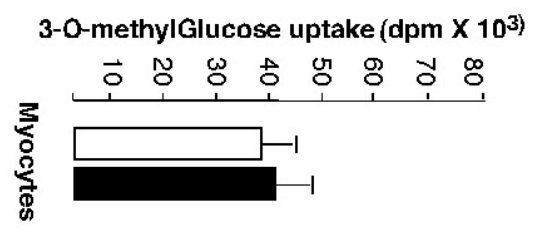
C. Cellular localization of PDX1 expression (green) in pancreatic β -cells. Hoechst staining of nuclei is in blue.

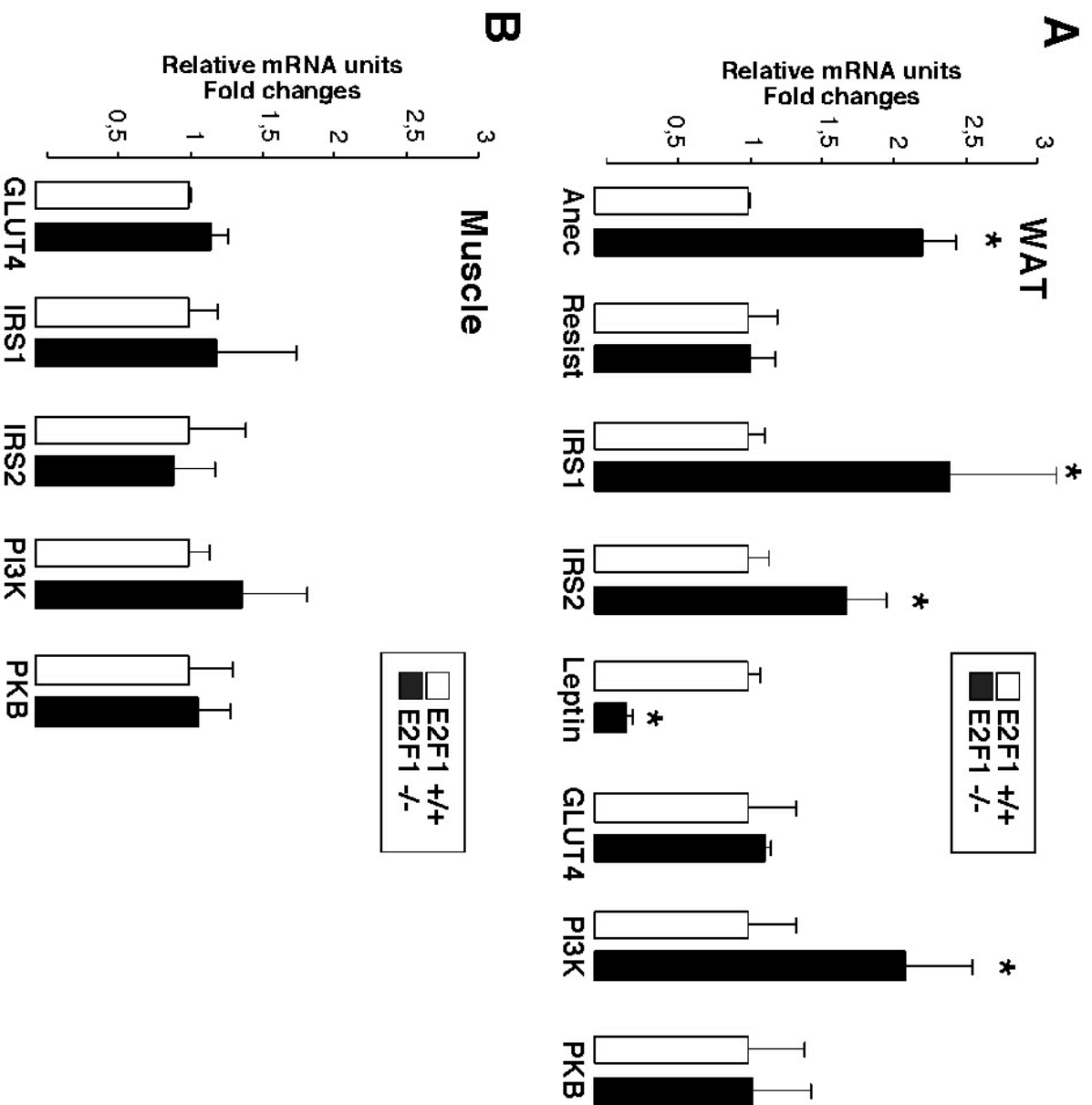
D. Quantification of the expression by real time RT-PCR of relevant genes for pancreatic islets development or function. Results were normalized by the expression of the 18S ribosomal subunit RNA.

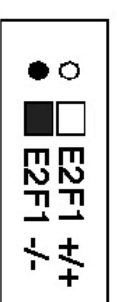
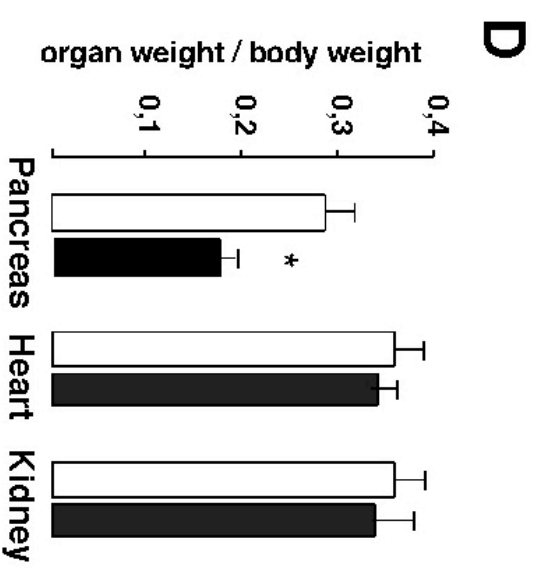
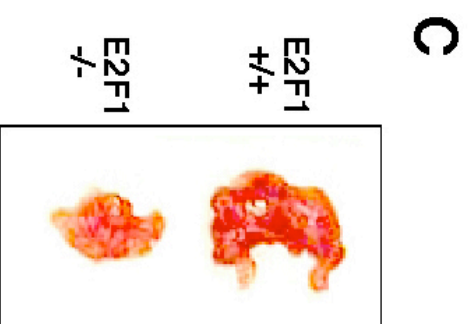
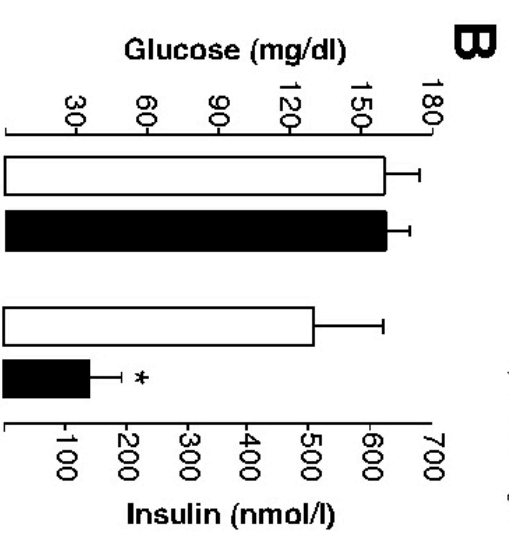
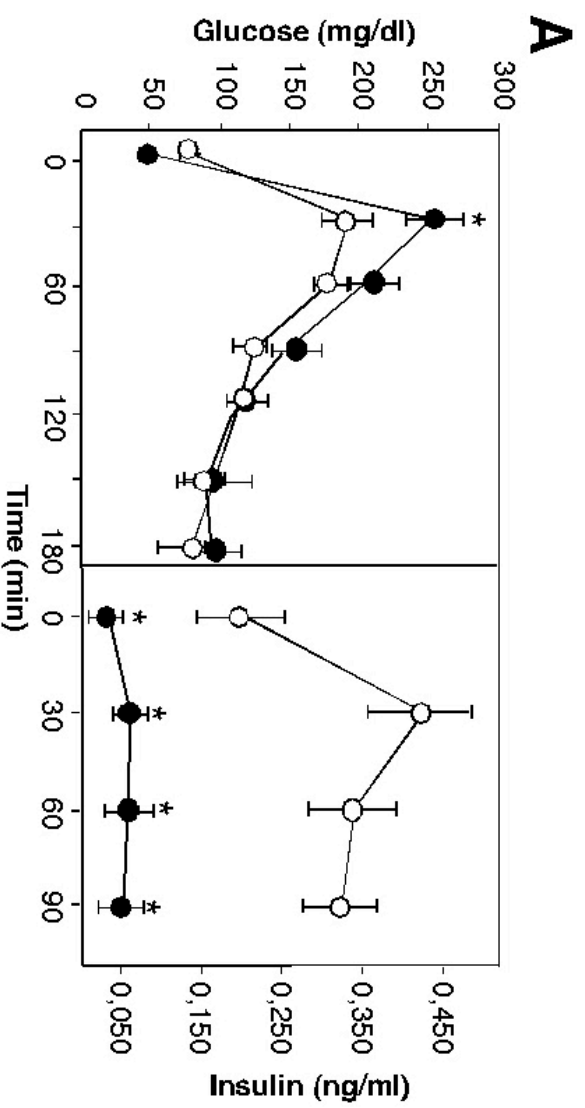
E. Insulin secretion of isolated islets of E2F1^{+/+} or ^{-/-} mice, in the absence or in the presence of 15mM glucose, or 20mM arginine. Islets were isolated from 16 week old male mice. Results are reported to total DNA content.

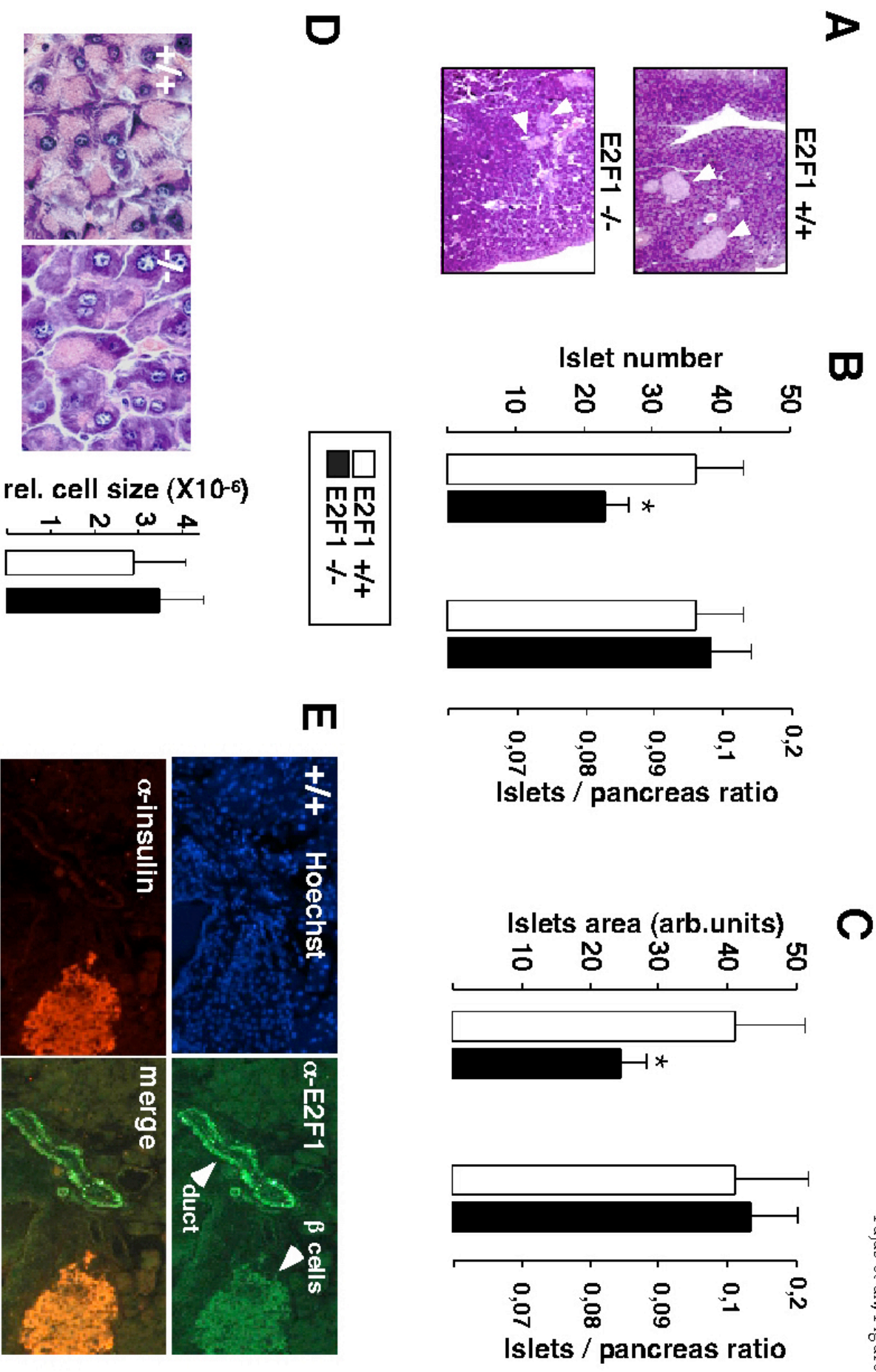
A**B**

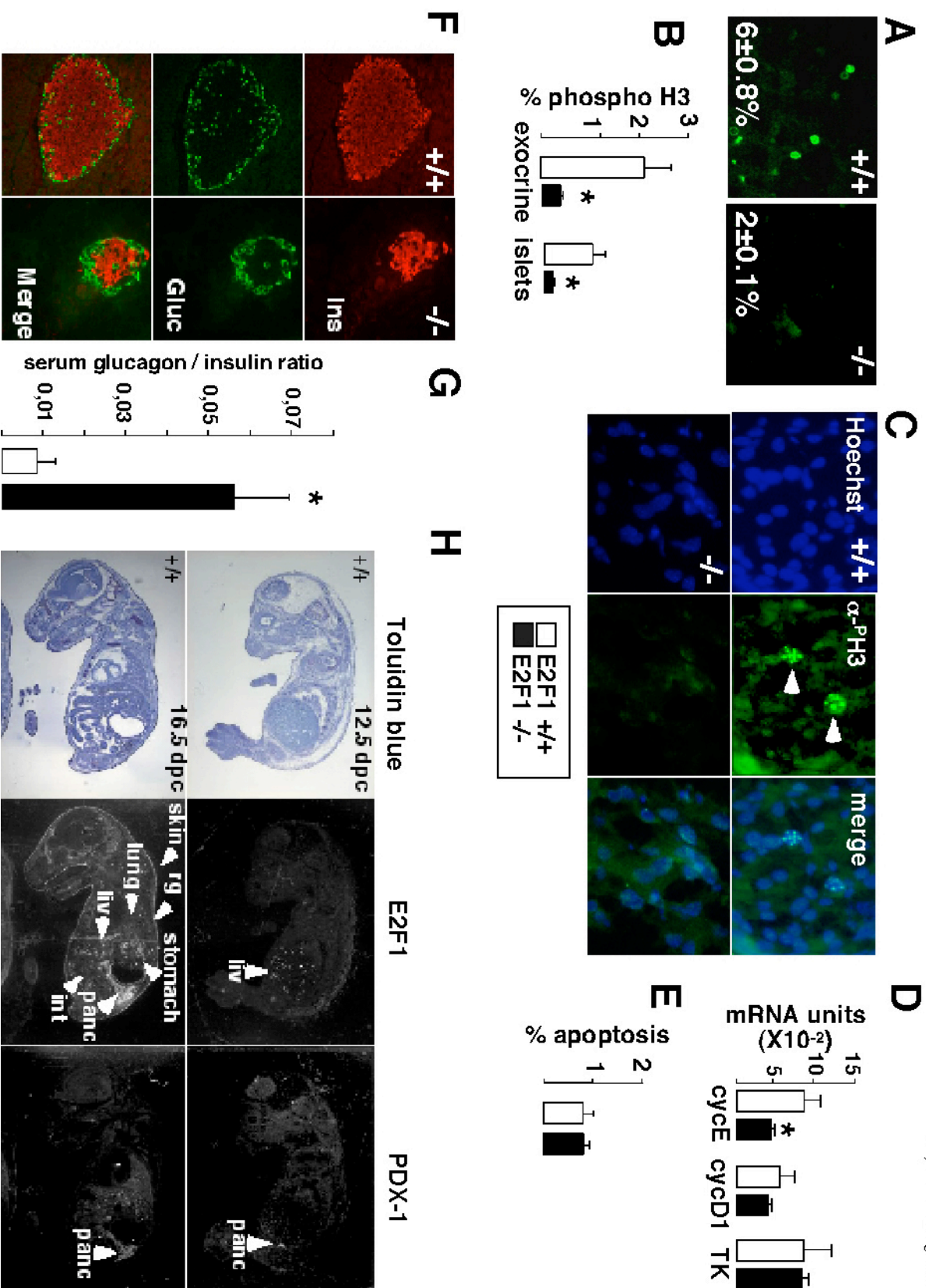
Fajjas et al., Figure 1

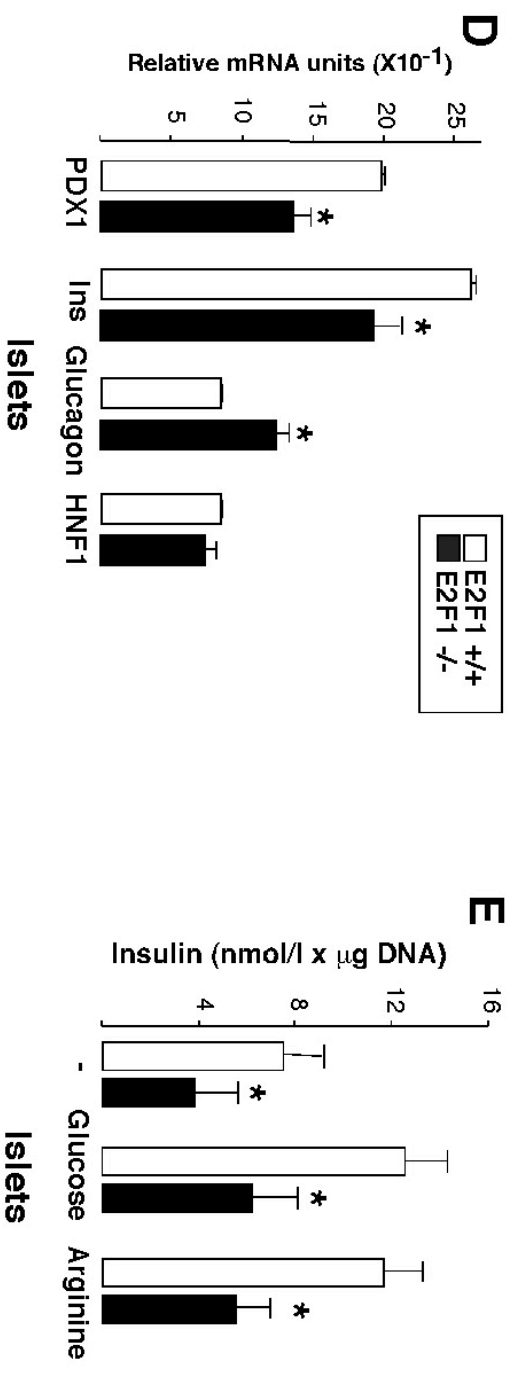
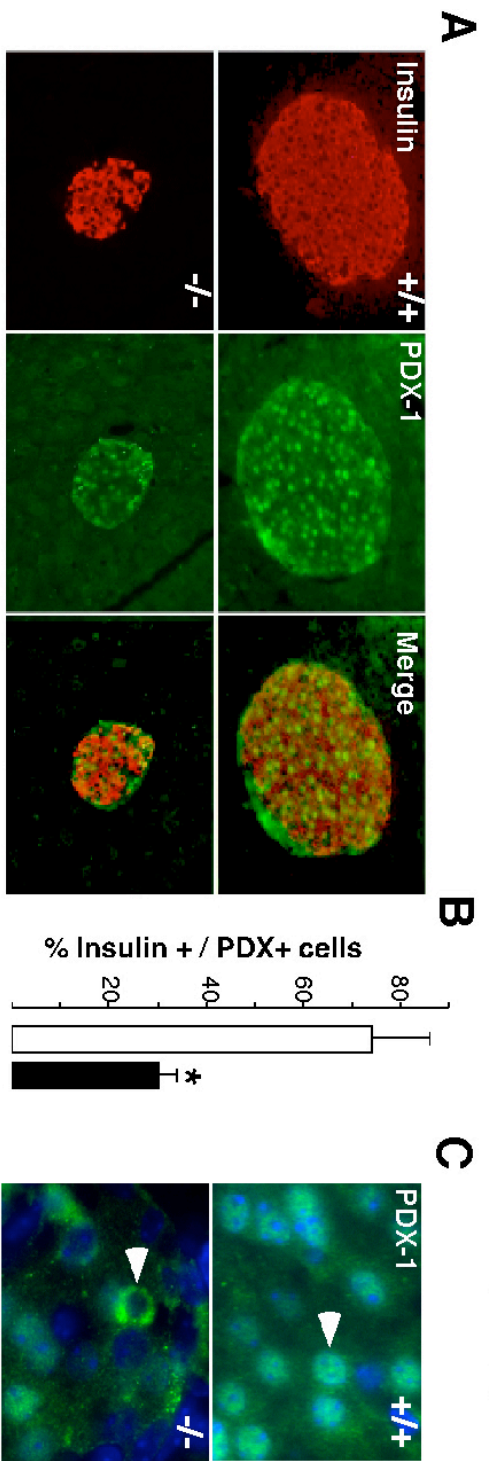
C**D****E**











II.2 Conclusions et Perspectives

Nous avons mis en évidence, dans cette étude, que le facteur de transcription E2F1 joue un rôle dans l'homéostasie du glucose en contrôlant la prolifération des cellules pancréatiques. Les souris E2F1^{-/-} ont un pancréas de petite taille, dû à un défaut de croissance post-natal. En effet, E2F1 n'est exprimé dans le pancréas qu'à partir de e16,5, confirmant qu'il a un rôle limité au cours du développement pancréatique. En revanche, les marqueurs de prolifération et mitotique sont largement diminués dans le pancréas des souris invalidées, confirmant l'importance de E2F1 dans le maintien de la croissance pancréatique post-natale. De plus, ces animaux présentent un dysfonctionnement des îlots de Langerhans, dû à un défaut de l'activité de PDX-1. Les souris E2F1^{-/-} sécrètent des quantités insuffisantes d'insuline en réponse à une injection de glucose, les rendant intolérantes au glucose. Cependant, ces souris ne développent pas de diabète, car elles ont une meilleure sensibilité à l'insuline due à une diminution de la masse de tissu adipeux blancs et de la sécrétion d'adipocytokines. Ces résultats démontrent que des facteurs contrôlant la prolifération cellulaire peuvent avoir d'importantes fonctions physiologiques, comme la régulation de l'homéostasie du glucose.

DISCUSSION GENERALE

Nous avons mis en évidence que le récepteur nucléaire LRH-1 était régulé par le facteur de transcription PDX1 au cours du développement pancréatique. Des embryons invalidés pour PDX1 (PDX1^{-/-}) ont également été étudiés afin de déterminer si l'expression de LRH-1 dans ces embryons était altérée. Nous avons observé une nette diminution de son expression au niveau de l'ébauche pancréatique ventrale, confirmant nos données *in vitro*. Cependant, nous avons également remarqué une diminution de l'expression de ce récepteur nucléaire dans le foie, organe n'exprimant pas PDX1. Il se pourrait donc que l'absence de PDX1 chez l'embryon affecte l'expression d'autres gènes exprimés dans cette région de l'endoderme ventral et impliqués dans le développement hépatique, comme LRH-1. Bien que ces résultats restent préliminaires, ils soulèvent la possibilité que PDX1 pourrait avoir un rôle plus général et plus précoce au niveau endodermique. Deutsch *et al.* ont montré qu'il existait des cellules localisées au niveau de l'endoderme ventral (les cellules progénitrices bipotentielles) ayant la capacité de donner naissance au pancréas ou au foie, selon les signaux envoyés par le mésoderme cardiaque ²²⁰. Dans cette étude, ils ont observé une faible expression de PDX1 dans de l'endoderme isolé du tube digestif proche du mésoderme cardiaque, qui normalement ne l'exprime pas. Cette région, sous l'effet du FGF et de BMP4, donnera naissance au bourgeon hépatique ^{220,221}. Bien qu'ils expliquent cela par un problème de contamination lors du prélèvement, il se pourrait que PDX1 soit effectivement présent dans ces cellules progénitrices bipotentielles. Dans ce cas, on pourrait imaginer que l'inactivation génique de PDX1 diminuerait l'expression de ces gènes cibles dans le pancréas, mais également dans le foie.

Ptfla est un facteur de transcription exprimé chez l'adulte dans le pancréas exocrine et est nécessaire à son développement ¹⁸⁰. Il est intéressant de noter que LRH-1 est exprimé au cours du développement pancréatique dans tous les types cellulaires, alors que chez l'adulte, son expression est localisée uniquement dans le pancréas exocrine⁶⁹. Cela suggère que LRH-1 pourrait être un facteur impliqué dans le développement du pancréas, comme l'est Ptfla ¹⁸⁰. En effet, Kawaguchi *et al.* ont également montré plus récemment que ce facteur de

transcription avait également un rôle précoce au cours du développement pancréatique, permettant d'orienter l'endoderme non différencié vers la formation de cellules pancréatiques ou intestinales¹⁶¹. Cela ouvre la perspective que LRH-1, tout comme Ptf1a, pourrait jouer un rôle au cours du développement pancréatique. De plus, l'étude de la régulation de l'expression de LRH-1 par Ptf1a, ou à l'inverse de Ptf1a par LRH-1, pourrait être intéressante. Enfin, l'étude de l'inactivation génique de LRH-1 pourrait également nous apporter des informations importantes quant aux rôles de LRH-1 au cours du développement embryonnaire, et plus particulièrement pancréatique. Cependant, les souris LRH-1^{-/-} meurent *in utero* à e7 (Annicotte *et al.*, manuscript en préparation), empêchant toute étude liée au développement des organes. L'utilisation des souris floxées et chimériques nous permettra dans le futur de répondre à ces questions.

Nous avons également mis en évidence l'importance du facteur de transcription E2F1 lors du processus de croissance pancréatique. Suite à un défaut prolifératif, le pancréas des souris E2F1^{-/-} adulte est hypoplasique, dû à un problème de croissance post-natale. De plus, ces souris montrent un dysfonctionnement des îlots de Langerhans et une diminution des cellules β , une diminution de l'expression de PDX-1, l'ensemble menant à une diminution de la sécrétion d'insuline. Cependant, ces souris ne développent pas de diabète, car elles possèdent moins de tissu adipeux blanc, entraînant une diminution de la sécrétion d'adipocytokines, connues pour interférer avec la signalisation insulinique. De plus, le tissu adipeux de ces souris E2F1^{-/-} est plus sensible à l'action de l'insuline, empêchant le développement d'un diabète de type 2. Ces données démontrent que prolifération du pancréas et fonctions métaboliques sont intimement liées. Ainsi, un facteur contrôlant directement le cycle cellulaire peut être impliqué dans le métabolisme glucidique. Plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Premièrement, l'étude de lignées cellulaires pancréatiques surexprimant E2F1 pourrait ouvrir de nouvelles voies de recherche pour la thérapie cellulaire du diabète. En effet, la création d'une cellule ES (ou tout autre modèle cellulaire pluripotent) surexprimant E2F1, puis soumis à un protocole de différenciation en cellule β , pourrait constituer un bon modèle dans le traitement du diabète. Deuxièmement, nous avons observé une forte diminution de l'expression de la cycline E dans les îlots des souris E2F1^{-/-}. La

cycline E, gène cible de E2F1 connu pour être impliqué dans les mécanismes de prolifération cellulaire, est fortement exprimée dans les cellules β , alors que ces cellules ont peu de capacités prolifératives. Cela suggère que la cycline E, à l'image de E2F1, pourrait avoir des fonctions similaires à E2F1 dans le métabolisme glucidique. Troisièmement, étant donné le rôle bivalent de E2F1 dans la promotion et la suppression du cancer, il serait intéressant de déterminer si E2F1 pourrait être impliqué dans certains cancers, comme celui du pancréas.

Différenciation et prolifération sont extrêmement imbriquées. En effet, un tissu ne pourra se différencier que si les cellules qui le forment passent par une phase de prolifération intense. Une étude en cours dans notre laboratoire montre que LRH-1 est un facteur pro-prolifératif. Ces données révèlent que LRH-1 régule directement ou en coopération avec la β -caténine l'expression de la cycline E et D, respectivement. Cet effet est particulièrement intéressant puisqu'il donne à LRH-1 le pouvoir d'induire la formation de tumeurs chez des souris « nude » immunodéprimées. Ainsi, tout comme pour E2F1, l'étude du rôle de LRH-1 dans le développement du cancer du pancréas pourrait être instructif, au même titre que son étude lors de la régénération du pancréas après pancréatectomie. Un rôle double pourrait être attribué à ce récepteur nucléaire, d'abord au cours du développement embryonnaire, ensuite lors de la prolifération cellulaire, voire la cancérogénèse. Si cette hypothèse se révèle exacte, LRH-1 pourrait, à l'image de E2F1, avoir un rôle précoce au cours de la différenciation et tardif lors de la prolifération. Nous avons d'ailleurs observé une régulation de l'expression de E2F1 par LRH-1, suggérant que ces deux facteurs sont liés dans certains processus cellulaires.

En conclusion, de nombreuses informations devraient nous parvenir avec l'étude des souris LRH-1 chimériques et délétées spécifiquement dans le pancréas. L'implication de LRH-1 dans les processus de développement et de différenciation pancréatiques, mais aussi de son rôle chez l'adulte, devraient ouvrir de nouvelles voies de recherche dans le traitement de maladies liées au dysfonctionnement du pancréas.

BIBLIOGRAPHIE

1. Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V. How many nuclear receptors are there in the human genome? *Trends in Genetics* 2001;17:554-556.
2. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 2001;294(5548):1866-70.
3. Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol* 2003;65:261-311.
4. Jensen EV, Desombre ER, Hurst DJ, Kawashima T, Jungblut PW. Estrogen-receptor interactions in target tissues. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1967;56(3):547-69.
5. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 1985;318(6047):635-41.
6. Miesfeld R, Rusconi S, Godowski PJ, Maler BA, Okret S, Wikstrom AC, Gustafsson JA, Yamamoto KR. Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. *Cell* 1986;46(3):389-99.
7. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986;320(6058):134-9.
8. Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 1987;330(6149):624-9.
9. Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 1987;330(6147):444-50.
10. Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H, Vennstrom B. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 1986;324(6098):635-40.
11. Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 1986;324(6098):641-6.
12. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240(4854):889-95.
13. Nauber U, Pankratz MJ, Kienlin A, Seifert E, Klemm U, Jackle H. Abdominal segmentation of the *Drosophila* embryo requires a hormone receptor-like protein encoded by the gap gene knirps. *Nature* 1988;336(6198):489-92.

14. Oro AE, Ong ES, Margolis JS, Posakony JW, McKeown M, Evans RM. The *Drosophila* gene *knirps*-related is a member of the steroid-receptor gene superfamily. *Nature* 1988;336(6198):493-6.
15. Koelle MR, Talbot WS, Segraves WA, Bender MT, Cherbas P, Hogness DS. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 1991;67(1):59-77.
16. Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990;345:224-229.
17. Kastner P, Mark M, Chambon P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life ? *Cell* 1995;83:859-869.
18. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark E, Chambon P and others. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83:835-839.
19. Committee NRN. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999;97(2):161-3.
20. Olefsky JM. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 2001;276:36863-36864.
21. Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* 1988;333:185-188.
22. Berry M, Metzger D, Chambon P. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *Embo J* 1990;9(9):2811-8.
23. Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993;7(10):1244-55.
24. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H and others. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995;270(5241):1491-4.
25. Glass CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 1994;15(3):391-407.
26. Umesono K, Evans RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 1989;57(7):1139-46.
27. Perlmann T, Rangarajan PN, Umesono K, Evans RM. Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes & Development* 1993;7:1411-1422.

28. Zechel C, Shen XQ, Chambon P, Gronemeyer H. Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *Embo J* 1994;13(6):1414-24.
29. Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK and others. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 1995;377(6548):397-404.
30. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 1995;377:454-457.
31. Guiochon-Mantel A, Lescop P, Christin-Maitre S, Loosfelt H, Perrot-Applanat M, Milgrom E. Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *Embo J* 1991;10(12):3851-9.
32. Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature* 1995;375:377-382.
33. Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 1995;378(6558):690-7.
34. Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* 1995;378(6558):681-9.
35. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997;389(6652):753-8.
36. Williams SP, Sigler PB. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 1998;393(6683):392-6.
37. Uppenberg J, Svensson C, Jaki M, Bertilsson G, Jendeberg L, Berkenstam A. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPAR γ . *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:31108-31112.
38. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 1998;395(6698):137-43.
39. Feng W, Ribeiro RC, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, Baxter JD, Kushner PJ, West BL. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 1998;280(5370):1747-9.

40. Weatherman RV, Scanlan TS. Unique protein determinants of the subtype-selective ligand responses of the estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) at AP-1 sites. *J Biol Chem* 2001;276(6):3827-32.
41. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 1997;18(3):306-60.
42. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors [see comments]. *Nature* 1995;377(6548):454-7.
43. Damm K, Thompson CC, Evans RM. Protein encoded by v-erbA functions as a thyroid-hormone receptor antagonist. *Nature* 1989;339(6226):593-7.
44. Sap J, Munoz A, Schmitt J, Stunnenberg H, Vennstrom B. Repression of transcription mediated at a thyroid hormone response element by the v-erb-A oncogene product. *Nature* 1989;340(6230):242-4.
45. Graupner G, Wills KN, Tzukerman M, Zhang XK, Pfahl M. Dual regulatory role for thyroid-hormone receptors allows control of retinoic-acid receptor activity. *Nature* 1989;340(6235):653-6.
46. Baniahmad A, Kohne AC, Renkawitz R. A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. *Embo J* 1992;11(3):1015-23.
47. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999;20(3):321-44.
48. Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. Nuclear receptor coactivators. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(2):222-32.
49. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 2000;14(2):121-41.
50. Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 2002;108(4):475-87.
51. Vignali M, Hassan AH, Neely KE, Workman JL. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 2000;20(6):1899-910.
52. Wolffe AP. Transcriptional control. Sinful repression. *Nature* 1997;387(6628):16-7.
53. Wong J, Shi YB, Wolffe AP. Determinants of chromatin disruption and transcriptional regulation instigated by the thyroid hormone receptor: hormone-regulated chromatin disruption is not sufficient for transcriptional activation. *Embo J* 1997;16(11):3158-71.
54. Pfahl M. Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev* 1993;14(5):651-8.
55. Karin M. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* 1998;93(4):487-90.

56. Ueda H, Sonoda S, Brown JL, Scott MP, Wu C. A sequence-specific DNA-binding protein that activates fushi tarazu segmentation gene expression. *Genes & Development* 1990;4:624-635.
57. Lavorgna G, Ueda H, Clos J, Wu C. FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. *Science* 1991;252:848-851.
58. Lavorgna G, Karim FD, Thummel CS, Wu C. Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(7):3004-8.
59. Parker KL. The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. *Mol Cell Endocrinol* 1998;140(1-2):59-63.
60. Ellinger-Ziegelbauer H, Hihi AK, Laudet V, Keller H, Wahli W, Dreyer C. Ftz-F1-related orphan receptors in *Xenopus laevis*: transcriptional regulators differentially expressed during early embryogenesis. *Molecular Cellular Biology* 1994;14:2786-2797.
61. Kudo T, Sutou S. Molecular cloning of chicken FTZ-F1-related orphan receptors. *Gene* 1997;2197:261-268.
62. Galarneau L, Drouin R, Bèlanger L. Assignment of the fetoprotein transcription factor gene (FTF) to human chromosome band 1q32.11 by in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* 1998;82:269-270.
63. Liu D, Le Drean Y, Ekker M, Xiong F, Hew CL. Teleost FTZ-F1 homolog and its splicing variant determine the expression of the salmon gonadotropin IIbeta subunit gene. *Mol Endocrinol* 1997;11(7):877-90.
64. Nakajima T, Takase M, Miura I, Nakamura M. Two isoforms of FTZ-F1 messenger RNA: molecular cloning and their expression in the frog testis. *Gene* 2000;248(1-2):203-12.
65. Becker-André M, André E, DeLamararter JF. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993;194:1371-1379.
66. Li M, Xie Y-H, Kong Y-Y, Wu X, Zhu L, Wang Y. Cloning and characterization of a novel human hepatocyte transcription factor, hB1F, which binds and activates enhancer II of hepatitis B virus. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:29022-29031.
67. Nitta M, Ku S, Brown C, Okamoto AY, Shan B. CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1999;96:6660-6665.

68. Annicotte JS, Fayard E, Swift GH, Selander L, Edlund H, Tanaka T, Kodama T, Schoonjans K, Auwerx J. Pancreatic-duodenal homeobox 1 regulates expression of liver receptor homolog 1 during pancreas development. *Mol Cell Biol* 2003;23(19):6713-24.
69. Rausa FM, Galarneau L, Bélanger L, Costa RH. The nuclear receptor fetoprotein transcription factor is coexpressed with its target gene HNF-3 β in the developing murine liver, intestine and pancreas. *Mechanisms of Development* 1999;89:185-188.
70. Lu TT, Repa JJ, Mangelsdorf DJ. Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J Biol Chem* 2001;276(41):37735-8.
71. Takase M, Nakajima T, Nakamura M. FTZ-F1 α is expressed in the developing gonad of frogs. *Biochim Biophys Acta* 2000;1494(1-2):195-200.
72. Schoonjans K, Annicotte JS, Huby T, Botrugno OA, Fayard E, Ueda Y, Chapman J, Auwerx J. Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I. *EMBO Rep* 2002;3(12):1181-1187.
73. Clyne CD, Speed CJ, Zhou J, Simpson ER. Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes. *J Biol Chem* 2002;277(23):20591-7.
74. Sablin EP, Krylova IN, Fletterick RJ, Ingraham HA. Structural basis for ligand-independent activation of the orphan nuclear receptor LRH-1. *Mol Cell* 2003;11(6):1575-85.
75. Lee YK, Parker KL, Choi HS, Moore DD. Activation of the promoter of the orphan receptor SHP by orphan receptors that bind DNA as monomers. *J Biol Chem* 1999;274(30):20869-73.
76. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Molecular Cell* 2000;6:507 - 515.
77. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME and others. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 2000;6(3):517-26.
78. Lee YK, Moore DD. Dual mechanisms for repression of the monomeric orphan receptor liver receptor homologous protein-1 by the orphan small heterodimer partner. *J Biol Chem* 2002;277(4):2463-7.

79. Liu YW, Gao W, Teh HL, Tan JH, Chan WK. Prox1 is a novel coregulator of Ff1b and is involved in the embryonic development of the zebra fish interrenal primordium. *Mol Cell Biol* 2003;23(20):7243-55.
80. Pare JF, Roy S, Galarneau L, Belanger L. The mouse fetoprotein transcription factor (ftf) gene promoter is regulated by three gata elements with tandem e box and nkx motifs, and ftf in turn activates the hnf3beta, hnf4alpha, and hnf1alpha gene promoters. *J Biol Chem* 2001;276(16):13136-44.
81. Zhang CK, Lin W, Cai YN, Xu PL, Dong H, Li M, Kong YY, Fu G, Xie YH, Huang GM and others. Characterization of the genomic structure and tissue-specific promoter of the human nuclear receptor NR5A2 (hB1F) gene. *Gene* 2001;273(2):239-49.
82. Galarneau L, Paré J-F, Allard D, Hamel D, Lévesque L, Tugwood JD, Green S, Bélanger L. The α_1 -fetoprotein locus is activated by a nuclear receptor of the drosophila Ftz-F1 family. *Molecular Cellular Biology* 1996;16:3853-3865.
83. Gualdi R, Bossard P, Zheng M, Hamada Y, Coleman JR, Zaret KS. Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev* 1996;10(13):1670-82.
84. del Castillo-Olivares A, Gil G. Alpha 1-fetoprotein transcription factor is required for the expression of sterol 12alpha -hydroxylase, the specific enzyme for cholic acid synthesis. Potential role in the bile acid-mediated regulation of gene transcription. *J Biol Chem* 2000;275(23):17793-9.
85. Inokuchi A, Hinoshita E, Iwamoto Y, Kohno K, Kuwano M, Uchiumi T. Enhanced expression of the human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes. A transcriptional control of a plausible bile acid transporter. *J Biol Chem* 2001;276(50):46822-9.
86. Chen F, Ma L, Dawson PA, Sinal CJ, Sehayek E, Gonzalez FJ, Breslow J, Ananthanarayanan M, Shneider BL. Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid dependent negative feedback regulation of the apical sodium- dependent bile acid transporter. *J Biol Chem* 2002;26:26.
87. Fayard E, Schoonjans K, Annicotte JS, Auwerx J. Liver receptor homolog 1 controls the expression of carboxyl ester lipase. *J Biol Chem* 2003;278(37):35725-31.
88. Luo Y, Liang CP, Tall AR. The orphan nuclear receptor LRH-1 potentiates the sterol-mediated induction of the human CETP gene by liver X receptor. *J Biol Chem* 2001;276(27):24767-73.
89. Sirianni R, Seely JB, Attia G, Stocco DM, Carr BR, Pezzi V, Rainey WE. Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates

- transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. *J Endocrinol* 2002;174(3):R13-7.
90. Wang ZN, Bassett M, Rainey WE. Liver receptor homologue-1 is expressed in the adrenal and can regulate transcription of 11 beta-hydroxylase. *J Mol Endocrinol* 2001;27(2):255-8.
 91. Seregni E, Botti C, Bombardieri E. Biochemical characteristics and clinical applications of alpha-fetoprotein isoforms. *Anticancer Res* 1995;15(4):1491-9.
 92. Gilbert S, Galarneau L, Lamontagne A, Roy S, Belanger L. The hepatitis B virus core promoter is strongly activated by the liver nuclear receptor fetoprotein transcription factor or by ectopically expressed steroidogenic factor 1. *J Virol* 2000;74(11):5032-9.
 93. Bulun SE, Price TM, Aitken J, Mahendroo MS, Simpson ER. A link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P450 transcripts using competitive polymerase chain reaction after reverse transcription. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77(6):1622-8.
 94. Harada N. Aberrant expression of aromatase in breast cancer tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;61(3-6):175-84.
 95. Thorsen T, Tangen M, Stoa KF. Concentration of endogenous oestradiol as related to oestradiol receptor sites in breast tumor cytosol. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1982;18(4):333-7.
 96. van Landeghem AA, Poortman J, Nabuurs M, Thijssen JH. Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res* 1985;45(6):2900-6.
 97. Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* 1986;45(2):219-28.
 98. Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR. Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(8):2180-4.
 99. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998;12(15):2245-62.
 100. Helin K. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8(1):28-35.
 101. Helin K, Wu CL, Fattaey AR, Lees JA, Dynlacht BD, Ngwu C, Harlow E. Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev* 1993;7(10):1850-61.
 102. Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 2000;14(19):2393-409.

103. Sardet C, Le Cam L, Fabbrizio E, Vidal M. E2Fs and the retinoblastoma protein family. *Progress in gene expression* 1997;2:1-62.
104. Trimarchi JM, Fairchild B, Verona R, Moberg K, Andon N, Lees JA. E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(6):2850-5.
105. Ishida S, Huang E, Zuzan H, Spang R, Leone G, West M, Nevins JR. Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* 2001;21(14):4684-99.
106. Muller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E, Prosperini E, Vigo E, Oliner JD, Helin K. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 2001;15(3):267-85.
107. Weinmann AS, Yan PS, Oberley MJ, Huang TH, Farnham PJ. Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev* 2002;16(2):235-44.
108. Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA, Dynlacht BD. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* 2002;16(2):245-56.
109. Dimova DK, Stevaux O, Frolov MV, Dyson NJ. Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the *Drosophila* E2F/RB pathway. *Genes Dev* 2003;17(18):2308-20.
110. Stevaux O, Dyson NJ. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14(6):684-91.
111. Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 1993;365(6444):349-52.
112. Lukas J, Petersen BO, Holm K, Bartek J, Helin K. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol* 1996;16(3):1047-57.
113. Qin XQ, Livingston DM, Kaelin WG, Jr., Adams PD. Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(23):10918-22.
114. Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(1):11-20.
115. Humbert PO, Verona R, Trimarchi JM, Rogers C, Dandapani S, Lees JA. E2f3 is critical for normal cellular proliferation. *Genes Dev* 2000;14(6):690-703.

116. Field SJ, Tsai FY, Kuo F, Zubiaga AM, Kaelin WG, Jr., Livingston DM, Orkin SH, Greenberg ME. E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 1996;85(4):549-61.
117. 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.
118. Zhu JW, Field SJ, Gore L, Thompson M, Yang H, Fujiwara Y, Cardiff RD, Greenberg M, Orkin SH, DeGregori J. E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2001;21(24):8547-64.
119. Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, Nuckolls F, Giangrande P, Wright FA, Field SJ and others. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* 2001;414(6862):457-62.
120. Cloud JE, Rogers C, Reza TL, Ziebold U, Stone JR, Picard MH, Caron AM, Bronson RT, Lees JA. Mutant mouse models reveal the relative roles of E2F1 and E2F3 in vivo. *Mol Cell Biol* 2002;22(8):2663-72.
121. Persengiev SP, Kondova, II, Kilpatrick DL. E2F4 actively promotes the initiation and maintenance of nerve growth factor-induced cell differentiation. *Mol Cell Biol* 1999;19(9):6048-56.
122. Cobrinik D, Lee MH, Hannon G, Mulligan G, Bronson RT, Dyson N, Harlow E, Beach D, Weinberg RA, Jacks T. Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev* 1996;10(13):1633-44.
123. Humbert PO, Rogers C, Ganiatsas S, Landsberg RL, Trimarchi JM, Dandapani S, Brugnara C, Erdman S, Schrenzel M, Bronson RT and others. E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Mol Cell* 2000;6(2):281-91.
124. Lindeman GJ, Dagnino L, Gaubatz S, Xu Y, Bronson RT, Warren HB, Livingston DM. A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting. *Genes Dev* 1998;12(8):1092-8.
125. Rempel RE, Saenz-Robles MT, Storms R, Morham S, Ishida S, Engel A, Jakoi L, Melhem MF, Pipas JM, Smith C and others. Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. *Mol Cell* 2000;6(2):293-306.
126. Fajas L, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J. E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell* 2002;3(1):39-49.
127. Landsberg RL, Sero JE, Danielian PS, Yuan TL, Lee EY, Lees JA. The role of E2F4 in adipogenesis is independent of its cell cycle regulatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(5):2456-61.

128. Porse BT, Pedersen TA, Xu X, Lindberg B, Wewer UM, Friis-Hansen L, Nerlov C. E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. *Cell* 2001;107(2):247-58.
129. Altioek S, Xu M, Spiegelman BM. PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev* 1997;11(15):1987-98.
130. Johnson DG, Cress WD, Jakoi L, Nevins JR. Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(26):12823-7.
131. Guy CT, Zhou W, Kaufman S, Robinson MO. E2F-1 blocks terminal differentiation and causes proliferation in transgenic megakaryocytes. *Mol Cell Biol* 1996;16(2):685-93.
132. Pierce AM, Fisher SM, Conti CJ, Johnson DG. Deregulated expression of E2F1 induces hyperplasia and cooperates with ras in skin tumor development. *Oncogene* 1998;16(10):1267-76.
133. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(15):8858-63.
134. Yamasaki L, Bronson R, Williams BO, Dyson NJ, Harlow E, Jacks T. Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice. *Nat Genet* 1998;18(4):360-4.
135. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 2002;129(10):2447-57.
136. Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo J* 1993;12(11):4251-9.
137. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994;371(6498):606-9.
138. Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 1996;122(3):983-95.
139. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* 1997;15(1):106-10.

140. 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.
141. Kumar M, Melton D. Pancreas specification: a budding question. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13(4):401-7.
142. Scharfmann R. Control of early development of the pancreas in rodents and humans: implications of signals from the mesenchyme. *Diabetologia* 2000;43(9):1083-92.
143. Wells JM, Melton DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 2000;127(8):1563-72.
144. Stafford D, Prince VE. Retinoic acid signaling is required for a critical early step in zebrafish pancreatic development. *Curr Biol* 2002;12(14):1215-20.
145. Tiso N, Filippi A, Pauls S, Bortolussi M, Argenton F. BMP signalling regulates anteroposterior endoderm patterning in zebrafish. *Mech Dev* 2002;118(1-2):29-37.
146. Slack JM. Developmental biology of the pancreas. *Development* 1995;121(6):1569-80.
147. Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* 2001;15(2):111-27.
148. Kim SK, Hebrok M, Melton DA. Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. *Development* 1997;124(21):4243-52.
149. Wessells NK, Cohen JH. Early pancreas organogenesis : morphogenesis, tissue interactions and mass effects. *Dev Biol* 1967;15:237-270.
150. Hebrok M, Kim SK, Melton DA. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* 1998;12(11):1705-13.
151. Apelqvist A, Ahlgren U, Edlund H. Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol* 1997;7(10):801-4.
152. Hebrok M, Kim SK, St Jacques B, McMahon AP, Melton DA. Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development* 2000;127(22):4905-13.
153. diIorio PJ, Moss JB, Sbrogna JL, Karlstrom RO, Moss LG. Sonic hedgehog is required early in pancreatic islet development. *Dev Biol* 2002;244(1):75-84.
154. Roy S, Qiao T, Wolff C, Ingham PW. Hedgehog signaling pathway is essential for pancreas specification in the zebrafish embryo. *Curr Biol* 2001;11(17):1358-63.
155. Lammert E, Cleaver O, Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 2001;294(5542):564-7.
156. Kumar M, Jordan N, Melton D, Grapin-Botton A. Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. *Dev Biol* 2003;259(1):109-22.

157. Jonsson J, Ahlgren U, Edlund T, Edlund H. IPF1, a homeodomain protein with a dual function in pancreas development. *Int J Dev Biol* 1995;39(5):789-98.
158. Harrison KA, Thaler J, Pfaff SL, Gu H, Kehrl JH. Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice. *Nat Genet* 1999;23(1):71-5.
159. Li H, Arber S, Jessell TM, Edlund H. Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat Genet* 1999;23(1):67-70.
160. Krapp A, Knofler M, Frutiger S, Hughes GJ, Hagenbuchle O, Wellauer PK. The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *Embo J* 1996;15(16):4317-29.
161. Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 2002;32(1):128-34.
162. Gosolow N, Grobstein C. Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis. *Dev Biol* 1962;4:242-255.
163. Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 1997;385(6613):257-60.
164. Esni F, Johansson BR, Radice GL, Semb H. Dorsal pancreas agenesis in N-cadherin-deficient mice. *Dev Biol* 2001;238(1):202-12.
165. Kamps MP, Murre C, Sun XH, Baltimore D. A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* 1990;60(4):547-55.
166. Nourse J, Mellentin JD, Galili N, Wilkinson J, Stanbridge E, Smith SD, Cleary ML. Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* 1990;60(4):535-45.
167. Kim SK, Selleri L, Lee JS, Zhang AY, Gu X, Jacobs Y, Cleary ML. Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in Ipfl1-deficient mice promotes diabetes mellitus. *Nat Genet* 2002;30(4):430-5.
168. Asahara H, Dutta S, Kao HY, Evans RM, Montminy M. Pbx-Hox heterodimers recruit coactivator-corepressor complexes in an isoform-specific manner. *Mol Cell Biol* 1999;19(12):8219-25.
169. Liu Y, MacDonald RJ, Swift GH. DNA binding and transcriptional activation by a PDX1.PBX1b.MEIS2b trimer and cooperation with a pancreas-specific basic helix-loop-helix complex. *J Biol Chem* 2001;276(21):17985-93.

170. Peers B, Sharma S, Johnson T, Kamps M, Montminy M. The pancreatic islet factor STF-1 binds cooperatively with Pbx to a regulatory element in the somatostatin promoter: importance of the FPWMK motif and of the homeodomain. *Mol Cell Biol* 1995;15(12):7091-7.
171. Swift GH, Liu Y, Rose SD, Bischof LJ, Steelman S, Buchberg AM, Wright CV, MacDonald RJ. An endocrine-exocrine switch in the activity of the pancreatic homeodomain protein PDX1 through formation of a trimeric complex with PBX1b and MRG1 (MEIS2). *Mol Cell Biol* 1998;18(9):5109-20.
172. Dutta S, Gannon M, Peers B, Wright C, Bonner-Weir S, Montminy M. PDX:PBX complexes are required for normal proliferation of pancreatic cells during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(3):1065-70.
173. Bhushan A, Itoh N, Kato S, Thiery JP, Czernichow P, Bellusci S, Scharfmann R. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development* 2001;128(24):5109-17.
174. Hart A, Papadopoulou S, Edlund H. Fgf10 maintains notch activation, stimulates proliferation, and blocks differentiation of pancreatic epithelial cells. *Dev Dyn* 2003;228(2):185-93.
175. Miettinen PJ, Huotari M, Koivisto T, Ustinov J, Palgi J, Rasilainen S, Lehtonen E, Keski-Oja J, Otonkoski T. Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Development* 2000;127(12):2617-27.
176. Cras-Meneur C, Elghazi L, Czernichow P, Scharfmann R. Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro: a balance between proliferation and differentiation. *Diabetes* 2001;50(7):1571-9.
177. Holland AM, Hale MA, Kagami H, Hammer RE, MacDonald RJ. Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(19):12236-41.
178. Herrera PL, Huarte J, Sanvito F, Meda P, Orci L, Vassalli JD. Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene. *Development* 1991;113(4):1257-65.
179. Kaung HL. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn* 1994;200(2):163-75.
180. Krapp A, Knofler M, Ledermann B, Burki K, Berney C, Zoerkler N, Hagenbuchle O, Wellauer PK. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the

- exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* 1998;12(23):3752-63.
181. Guz Y, Montminy MR, Stein R, Leonard J, Gamer LW, Wright CV, Teitelman G. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 1995;121(1):11-8.
 182. Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EE, Lindsell C, Weinmaster G, Madsen OD, Serup P. Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 2000;49(2):163-76.
 183. Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 2000;127(16):3533-42.
 184. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(4):1607-11.
 185. Grapin-Botton A, Majithia AR, Melton DA. Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes Dev* 2001;15(4):444-54.
 186. Lee JE. Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 1997;7(1):13-20.
 187. Lewis J. Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* 1998;9(6):583-9.
 188. Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe de Angelis M, Lendahl U, Edlund H. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 1999;400(6747):877-81.
 189. Lee JC, Smith SB, Watada H, Lin J, Scheel D, Wang J, Mirmira RG, German MS. Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* 2001;50(5):928-36.
 190. Jacquemin P, Durviaux SM, Jensen J, Godfraind C, Gradwohl G, Guillemot F, Madsen OD, Carmeliet P, Dewerchin M, Collen D and others. Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene ngn3. *Mol Cell Biol* 2000;20(12):4445-54.
 191. Edlund H. Transcribing pancreas. *Diabetes* 1998;47(12):1817-23.

192. Sander M, Neubuser 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 Dev* 1997;11(13):1662-73.
193. St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 1997;387(6631):406-9.
194. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 1997;11(18):2323-34.
195. Sander M, Sussel L, Connors J, Scheel D, Kalamaras J, Dela Cruz F, Schwitzgebel V, Hayes-Jordan A, German M. Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 2000;127(24):5533-40.
196. Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL, German MS. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* 1998;125(12):2213-21.
197. Deltour L, Leduque P, Paldi A, Ripoche MA, Dubois P, Jami J. Polyclonal origin of pancreatic islets in aggregation mouse chimaeras. *Development* 1991;112(4):1115-21.
198. Miralles F, Battelino T, Czernichow P, Scharfmann R. TGF-beta plays a key role in morphogenesis of the pancreatic islets of Langerhans by controlling the activity of the matrix metalloproteinase MMP-2. *J Cell Biol* 1998;143(3):827-36.
199. Cirulli V, Beattie GM, Klier G, Ellisman M, Ricordi C, Quaranta V, Frasier F, Ishii JK, Hayek A, Salomon DR. Expression and function of alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrins in the developing pancreas: roles in the adhesion and migration of putative endocrine progenitor cells. *J Cell Biol* 2000;150(6):1445-60.
200. Miralles F, Czernichow P, Scharfmann R. Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development* 1998;125(6):1017-24.
201. Horb LD, Slack JM. Role of cell division in branching morphogenesis and differentiation of the embryonic pancreas. *Int J Dev Biol* 2000;44(7):791-6.
202. Gittes GK, Galante PE, Hanahan D, Rutter WJ, Debase HT. Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* 1996;122(2):439-47.

203. Miralles F, Czernichow P, Ozaki K, Itoh N, Scharfmann R. Signaling through fibroblast growth factor receptor 2b plays a key role in the development of the exocrine pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(11):6267-72.
204. Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1998;9(2-4):89-109.
205. Butler AA, LeRoith D. Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 2001;142(5):1685-8.
206. White MF. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 1998;182(1-2):3-11.
207. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106(2):165-9.
208. Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(4):267-77.
209. Kido Y, Nakae J, Accili D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(3):972-9.
210. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;414(6865):799-806.
211. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC and others. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999;283(5407):1544-8.
212. Kahn SE. Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(9):4047-58.
213. Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* 2001;414(6865):807-12.
214. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001;51(1):15-36.
215. Eskelinen MJ, Haglund UH. Prognosis of human pancreatic adenocarcinoma: review of clinical and histopathological variables and possible uses of new molecular methods. *Eur J Surg* 1999;165(4):292-306.
216. Caudry M, Bonnel C. [Adenocarcinoma of the exocrine pancreas: management and therapeutic hopes]. *Rev Med Interne* 1999;20(9):810-5.
217. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2002;2(12):897-909.

218. Hansel DE, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003;4:237-56.
219. Farrow B, Evers BM. Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol* 2002;10(4):153-69.
220. Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J, Zaret KS. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 2001;128(6):871-81.
221. Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 2001;15(15):1998-2009.

SUMMARY

The Pancreatic-Duodenal Homeobox-1 (PDX-1) regulates the expression of the Liver Receptor Homolog 1 (LRH-1) during pancreas development

Abstract

The liver receptor homolog 1 (LRH-1) and the pancreatic-duodenal homeobox-1 (PDX-1) are coexpressed in the pancreas during mouse embryonic development. Analysis of the regulatory region of the human LRH-1 gene demonstrates the presence of three functional binding sites for PDX-1. Electromobility shift assays and chromatin immunoprecipitation analysis show that PDX-1 binds to the LRH-1 promoter, both in cultured cells *in vitro* and during pancreatic development *in vivo*. Retroviral expression of PDX-1 in pancreatic cells induces the transcription of LRH-1, whereas reduced PDX-1 levels by RNA interference attenuate its expression. Consistent with a direct regulation of LRH-1 expression by PDX-1, PDX-1^{-/-} mice expressed lower amounts of LRH-1 mRNA in the embryonic pancreas. Taken together, our data indicate that PDX-1 controls LRH-1 expression and identify LRH-1 as a novel downstream target in the PDX-1 regulatory cascade governing pancreatic development, differentiation and function.

Keywords: ChIP, Differentiation, Gene expression, Insulin, IPF-1, LRH-1, Nuclear receptor, PDX-1, Transcription

Impaired pancreatic growth, β -cell mass and function in E2F1 ^{-/-} mice

Abstract

We evaluated the effects of E2F1 on glucose homeostasis using E2F1^{-/-} mice. E2F1^{-/-} mice show an overall reduction in pancreatic size, as the result of impaired postnatal pancreatic growth. These animals furthermore have dysfunctional β -cells, linked to impaired PDX-1 activity. Because of the disproportionate small pancreas and dysfunctional islets, E2F1^{-/-} mice secrete insufficient amounts of insulin in response to a glucose load, resulting in glucose intolerance. Despite this glucose intolerance, E2F1^{-/-} mice do not develop overt diabetes mellitus because they are insulin hypersensitive, secondary to a diminished adipose tissue mass and altered adipocytokine levels, which compensates for the defect in insulin secretion. These data demonstrate that factors controlling cell proliferation, such as E2F1, determine pancreatic growth and function, subsequently affecting metabolic homeostasis.

Key words: E2F1, insulin, pancreas, adipocyte

Résumé

Le LRH-1 (Liver Receptor Homolog-1) est un récepteur nucléaire orphelin de la sous-famille Ftz-F1. Chez l'adulte, cette protéine est fortement exprimée dans le pancréas exocrine et plus faiblement dans le foie et l'intestin, et joue un rôle crucial dans le métabolisme du cholestérol. De plus, LRH-1 semble posséder des fonctions importantes dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans le développement hépatique et pancréatique. Cependant, la contribution et la fonction de LRH-1 dans le pancréas reste inconnue. Le but de ce travail était donc d'étudier la régulation transcriptionnelle de LRH-1 au cours du développement pancréatique.

Notre étude a démontré que LRH-1 était régulé par la protéine PDX-1/IPF-1, un facteur de transcription de la classe des homeobox essentiel au développement du pancréas. En effet, une inactivation de PDX-1 chez la souris, ainsi qu'une mutation inactivant PDX-1 chez l'homme, empêchent la formation du pancréas. De plus, une mutation hétérozygote du gène PDX-1 chez l'homme conduit au développement du diabète. Nous avons démontré chez la souris que PDX-1 régule l'expression de LRH-1 au cours du développement embryonnaire, jusqu'au jour embryonnaire 16,5-17. Par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine, nous avons montré une fixation directe de PDX-1 sur le promoteur de LRH-1, *in vitro* dans des cellules co-exprimant LRH-1 et PDX-1, mais également *in vivo* chez l'embryon. De plus, nous avons observé une diminution de l'expression de LRH-1 dans des souris inactivées pour PDX-1, confirmant ce mécanisme transcriptionnel. Ces résultats mettent en évidence un rôle potentiel de LRH-1 dans le développement embryonnaire, mais également dans le fonctionnement du pancréas adulte. Cette étude devrait donc ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques dans le traitement du diabète. Des études d'inactivation de LRH-1 spécifiquement dans le pancréas sont actuellement entreprises afin d'élucider le rôle de ce récepteur nucléaire dans le développement pancréatique.

Nous avons également évalué les effets du facteur de transcription E2F1 sur l'homéostasie du glucose. E2F1 est une protéine impliquée dans les mécanismes de prolifération cellulaire en contrôlant la transition G1/S lors du cycle cellulaire. Notre étude a démontré que des souris invalidées pour le gène E2F1 (E2F1^{-/-}) démontrent une réduction de la taille du pancréas, due à un déficit de croissance post-natal du pancréas et à un dysfonctionnement des cellules β . En effet, nous avons remarqué une diminution des index de prolifération au niveau pancréatique chez les souris E2F1^{-/-}, alors que l'index apoptotique n'est pas modifié. De plus, la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (*in vivo*, après injection intra-péritonéal de glucose ou *in vitro* sur îlots isolés) est diminuée dans les souris E2F1^{-/-}, suggérant un défaut dans la voie de signalisation par le glucose au niveau des cellules β . Nous avons observé que le facteur de transcription PDX-1 était plus faiblement exprimé chez les souris invalidées, et que sa localisation cellulaire était très souvent cytoplasmique au lieu d'être nucléaire. PDX-1 étant impliqué dans la régulation de l'expression de l'insuline, cela pourrait expliquer en partie la diminution de la sécrétion d'insuline. En dépit de leur intolérance pour le glucose, les souris E2F1^{-/-} ne développent pas de diabète, grâce à une hypersensibilité à l'insuline. Ces résultats démontrent que des facteurs contrôlant la prolifération cellulaire ont un rôle déterminant quant à la croissance du pancréas, et peuvent en conséquence affecter les processus métaboliques.