



HAL
open science

Étude des fonctions biologiques et oncosuppressives du gène de prédisposition aux Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1 dans les tissus hormono-dépendants chez la souris

Christelle Seigne

► **To cite this version:**

Christelle Seigne. Étude des fonctions biologiques et oncosuppressives du gène de prédisposition aux Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1 dans les tissus hormono-dépendants chez la souris. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10247. tel-00877511

HAL Id: tel-00877511

<https://theses.hal.science/tel-00877511>

Submitted on 28 Oct 2013

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

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

THÈSE

Présentée devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON 1

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 8 décembre 2009 par

Christelle SEIGNE

Etude des fonctions biologiques et oncosuppressives du gène
de prédisposition aux Néoplasies Endocriniennes Multiples de
type 1 dans les tissus hormono-dépendants chez la souris

Directeur de thèse : Dr. Chang Xian ZHANG

Devant un jury composé de :

Pr. Jean-Yves SCOAZEC

Président du jury

Dr. Catherine TOMASETTO

Rapporteur

Pr. Jérôme BERTHERAT

Rapporteur

Dr. Ruth RIMOKH

Examineur

Pr. Günther WEBER

Examineur

Dr. Chang Xian ZHANG

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Chang, je te remercie particulièrement pour l'encadrement de qualité que tu m'as apporté durant toutes ces années, ainsi que pour la patience dont tu as fait preuve. Tu as toujours été présent, essayant de me remonter le moral dans les moments de doute (qui ont été nombreux, je l'avoue!). Je suis vraiment heureuse de t'avoir eu comme directeur de thèse, tu as toujours été très gentil. Peut-être même un peu trop... heureusement pour moi ! Tu ne m'as jamais reproché mes arrivées tardives le matin au labo, ni les bêtises que je faisais souvent dans les manip au début. Merci d'avoir été aussi compréhensif et d'avoir toujours été là quand j'avais besoin de toi.

Je remercie également **Marc Billaud**, pour m'avoir accueillie dans ton laboratoire et pour ton soutien lors de la MRT et de ma demande de financement pour la 4^{ème} année de thèse.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe MEN1, passés et présents, à qui je dois tellement... La thèse, c'est beaucoup de travail personnel, mais c'est avant tout un travail d'équipe, et je n'aurais pas pu mieux tomber. La bonne ambiance qui a régné entre nous tous tout au long de ma thèse a été un des moteurs qui me permettaient d'avancer, et qui faisait que j'étais heureuse de venir au labo chaque matin. Vous allez tous me manquer ! Un grand grand merci...

A **Jieli**, toi qui m'a accompagnée tout au long de cette thèse, avec ta gentillesse, ta bonne humeur et tes petites phrases pour me remonter le moral (Christine et moi, on n'oubliera jamais « Mei guan xi » !). Je pense que toutes ces années de travail m'auraient paru beaucoup plus difficiles si tu n'avais pas été ma voisine de paillasse et mon amie. Merci pour les repas que tu me préparais si gentiment, pour nos discussions, pour les voyages que nous avons fait ensemble (le Portugal, Venise) et pour ton soutien à chaque moment durant toutes ces années. Ça a été très dur quand tu es rentrée en Chine, tu me manques vraiment beaucoup, mais je compte bien te rendre visite à Shanghai dès que possible !

A **Christine**, notre chère technicienne irremplaçable, mais aussi une très bonne amie, avec qui on pouvait parler de tout (potins, science et surtout chiens !). Un grand merci pour ta gentillesse, et pour avoir été à mes côtés, m'avoir aidée et soutenue, aussi bien au niveau technique qu'amical. Merci aussi de nous avoir invitées, Jieli et moi, au Portugal dans ta

famille (à qui je fais de gros bisous !), c'étaient des chouettes vacances ! J'ai été très triste quand tu es partie du labo, mais heureusement, tu n'es pas allée bien loin ! Le CIRC a beaucoup de chance de t'avoir. Je t'ai proclamée « reine de l'immuno » et promis, si le métier d'attachée de recherche clinique ne me plaît plus, je viendrais te voir et on montera ensemble la plateforme « ChrisPath » !

A **Rémy**, pour avoir apporté un air nouveau dans l'équipe, avec ta gentillesse (je pense que « non » ne doit pas faire partie de ton vocabulaire !), ton dynamisme et ta motivation. Je suis très fière de t'avoir eu comme stagiaire et comme collègue, étant donné tes capacités plus que prometteuses dans le milieu de la recherche. Gardes cet enthousiasme qui te rend si attachant et surtout restes tel que tu es, ne changes rien ! Merci pour ton soutien et ton aide et bonne chance pour l'avenir.

A **Philippe**, jeune chercheur brillant avec lequel l'avenir de la recherche est assuré (ah mais non, pardon, tu es encore stagiaire INSERM, donc « bon début, mais doit faire ses preuves » ;-) oh c'est bon je te taquine !). Avec toi, on a découvert la « pink attitude » (non non, j'ai rien contre les hommes en rose !). Merci pour les discussions scientifiques (et celles moins scientifiques...), il faut dire qu'il n'y a pas plus bavard que toi ! Prends bien soin du « petit » quand je ne serais plus là. J'espère en tout cas que tu pourras un jour monter ton équipe, tu le mérites !

A **Maya**, la petite nouvelle qui a très vite été adoptée dans l'équipe, grâce à sa bonne humeur constante et à son petit grain de folie qu'on aime tant ! Maya contente ! Tu m'as fait beaucoup rire en couvant tes tubes. Bon courage et bonne chance.

A **Hélène**, pour avoir été aussi gentille et prévenante avec moi, et pour toutes les discussions passionnantes que nous avons eues.

A tous les autres : **Cécile**, mon médecin préféré, merci pour les restos que nous avons fait ensemble, pour m'avoir fait l'honneur et le plaisir d'être invitée à ton mariage ; **Nader**, qui m'a formée aux manips et qui mettait de l'ambiance dans le labo ; **Sandra**, tu m'as appris beaucoup de choses sur les souris et les manips, avec toute la gentillesse et la patience qui te caractérisent, et je t'en remercie ; et enfin merci à **Huguette**, pour son aide technique sur les immunohistochimies, et à **Alain Calender**.

Je tiens à remercier vivement mes collègues et amis de l'UMR 5201. Pendant toutes ces années de thèse, il y a certes eu des moments difficiles, mais aussi beaucoup de moments de bonheur et de fous rires, grâce à vous tous, que je n'oublierai jamais.

Un grand merci aux supers secrétaires **Annick** et **Sophie**, pour votre gentillesse et surtout vos compétences, qui m'ont beaucoup facilité la vie. Nos discussions détente/potins mondains/ragots labo de midi autour du café vont me manquer !

Merci à nos voisines de paillasse de l'équipe BRCA1 :

Monique et **Anne**, vous avez été des vraies secondes mères pour moi. Merci de votre gentillesse et de votre aide.

Amandine, merci pour ton amitié, nos discussions me manqueront. Bonne chance pour le mariage, et pour l'enseignement, tu vas y arriver !

Estelle et **Chloé**, on a bien rigolé ensemble, bonne chance aussi pour l'avenir. Merci aussi à **Marie-Eve**, pour ses explications et conseils en anapath et félicitations pour le bébé !

Un grand merci aussi à **Sylvie**, pour tous tes conseils et pour avoir accepté une collaboration sur les cancers du sein humains, et à **Nicole**, pour les discussions à toute heure de la journée (enfin bon, surtout potins en tout genre), toujours très instructives !

Tous mes remerciements également aux autres membres du labo :

Karine, merci pour les discussions au repas de midi à la cantine de Rockefeller et pour m'avoir suggéré de faire la formation ARC de Lyon1. Bonne chance avec les souris et j'espère que tu trouveras très vite un poste !

Florence, merci pour tes nombreuses questions scientifiques pendant mes séminaires (et en dehors aussi), pour ton dynamisme et ton franc-parler que j'ai toujours adoré !

Maïlys, ma normande préférée ! Je te souhaite bonne chance pour la thèse (tu vas les mater ces souris !) et pour ton avenir dans la recherche (ou ailleurs !).

Malek, ah Malek, que dire... Espèce d'obsédé !!! Je vais monter un groupe de soutien psychologique pour toutes les victimes de ton harcèlement sexuel au labo (elles sont nombreuses! Et ce ne sont pas toutes des filles...). Plus sérieusement, félicitations pour ton mariage et tous mes vœux de bonheur à toi et à Koliiane !

Anne-Laure, je n'ai jamais vu quelqu'un avec une telle joie de vivre et un tel entrain à la paillasse. J'en étais presque jalouse ! Je me suis vraiment demandé si tu n'étais pas sous

ecstasy 24h/24... Merci de ta bonne humeur communicative ! Bonne chance pour le post-doc (et la suite) et avec Nico aussi !

Nicolas, qu'est-ce que j'ai pu m'amuser à te faire enrager !! (Sarko facho ! Vive l'OL !). Mais tu ne te privais pas non plus, surtout avec Julien ! Y'a vraiment des fois où je vous aurais bien étranglés ! Alors qu'en grattant bien sous la couche de strass Guess et les chaînes en or, tu es un mec adorable (oui, bon alors profite bien, je ne le redirais pas !). Bonne chance dans la recherche et j'attends que tu m'envoies ton futur Nature ou Science!

Merci aux « verveux », avec qui nous avons partagé le labo à Rockefeller. **Laurent Mouchiroud** et **Laurent Molin**. Grâce à vous deux, j'ai pu parfaire ma culture générale en travaillant, surtout grâce aux updates biblio de Mouch Mouch, notre futur prix Nobel (eh, qui sait !).

Merci à **Patricia**, pour tes conseils techniques et ta gentillesse, ainsi qu'à **Virginie**, pour tes suggestions de restos et tes petites anecdotes sur le CIRC. C'était toujours un plaisir de bavarder avec vous.

Merci également à tous les autres pour leur sympathie : **Christelle** (félicitations pour le bébé et bonne chance à l'ENS), **Katy** (allez courage, c'est bientôt fini ! merci d'avoir joué le jeu pour la danse des canards et bonne chance pour la suite), **Alain** (merci pour les supers pâtisseries libanaises, quel réconfort après les manips qui marchent pas !), **Audrey** (tellement bavarde et tellement sympa ! Félicitations pour l'heureux événement), **Stéphane** (merci pour les blagues et les pitreries qui m'ont fait bien rire), **Aurélié** (merci de ta gentillesse, même si tu as parfois participé aux blagues que me faisaient Nico et Julien ! ;-), **Magali** (Une vraie tornade, mais tellement adorable ! et tu portes tellement bien le bec de canard !), **Ivan**, **Sadok**, **Toufic**, **les deux Serge**, **Daniel**, **Isabelle**, **Yann** et **Florent** (les deux inséparables, presque un petit couple, si la recherche est bouchée, vous pourrez faire du cinéma !), **François**, **Béatrice**. Bon courage aux M2, **Diane**, **Agnès** et **Nicolas**. Je vous souhaite un bel avenir dans la recherche (et bien sûr une petite MRT avant !).

Je n'oublie pas ceux qui ont quitté le labo pour d'autres horizons, **Florent**, **Olga**, **Julien**, **ALF**, **Clem**, qui ont tous contribué à l'ambiance du labo par leurs bêtises, blagues en tout genre et bonne humeur. Merci également à **Elodie**, qui m'a souvent tenu compagnie pendant les sacrifices de souris à Rockefeller au 4^e étage, et qui avait toujours des tas d'histoires à raconter pendant que je charcutais ces pauvres bêtes.

Tous mes remerciements à **Jérémy** aussi, pour tous les tampons que tu as fait pour moi.

J'adresse également mes remerciements à nos collaborateurs,

Aux pathologistes, **Wei-Ming Tong** et **Bernard Fontanière**, et tout particulièrement à **Lucien Frappart**, qui s'est beaucoup investi et qui me faisait rêver avec les récits de ses aventures aux quatre coins du monde avec l'OMS.

Au **Dr. Isabelle Treilleux** et ses techniciennes **Sophie Goddard-Léon** et **Amélie Colombe** qui ont réalisé et analysé les TMA, ainsi qu'au **Dr. Nick Hayward** et à **Magdalena Auret** pour avoir collecté et envoyé les glandes mammaires de leur modèle de souris.

Au personnel de l'animalerie ALECS SPF (**Jean-Michel, Caro, Martin, Aurélie**) et conventionnel (**Angèle, Chrystelle, Mickaël**) sans l'aide de qui je n'aurais pas pu réaliser ce projet souris. Vous avez bien chouchouté mes souris !

Au personnel de la plateforme Anipath, **Nicolas** et **Cécile**, pour la mise en bloc et les coupes des tissus, que je vous amenais toujours à la dernière minute !

Je remercie vivement le **Dr. Catherine Tomasetto** et le **Pr. Jérôme Bertherat**, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs à ma thèse, ainsi que le **Dr. Ruth Rimokh** (merci pour tes conseils tout au long de la thèse dans le cadre du comité de thèse), et les **Pr. Günther Weber** et **Jean-Yves Scoazec**, pour avoir accepté de juger mon travail.

Un grand grand merci enfin à toute ma famille. Je dédie cette thèse à mes parents, qui m'ont énormément soutenue pendant toutes ces années (et même avant !) et qui ont toujours cru en moi. Cette fois, c'est bien fini, je n'aurais plus à revenir au labo le week-end pour donner à manger à mes cellules ! Merci à mon frère et à ma sœur, qui savaient me changer les idées quand je venais le week-end. Merci à tous d'avoir été à mes côtés, je vous aime fort. Je remercie aussi mes oncles et tantes, cousins et cousines, qui ont tous essayé en vain de comprendre ce que je faisais : « alors, ça avance la recherche ? Quand est-ce que vous allez guérir le cancer ? Vous cherchez, vous cherchez, mais est-ce que vous trouvez de temps en temps ? ».

A mes grands-parents, aucun de vous n'aura vu où ces longues études m'ont menées, mais vous ne m'avez jamais quittée en pensée.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
INTRODUCTION.....	8
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	10
I. LE SYNDROME DES NÉOPLASIES ENDOCRINIENNES MULTIPLES DE TYPE 1 : DE LA MALADIE AU GÈNE DE PRÉDISPOSITION.	10
A. La maladie	10
A.1. Définition clinique et diagnostic	10
A.2. Incidence, pénétrance et morbidité.....	10
A.3. Atteintes cliniques (voir tableau 1)	11
A.3.a. Hyperparathyroïdie primaire (HPT)	11
A.3.b. Tumeurs entéro-pancréatiques	11
A.3.c. Adénomes antéhypophysaires	12
A.3.d. Atteintes endocrines associées	12
A.3.e. Atteintes non endocrines associées	12
A.3.f. Association des NEM1 avec les cancers du sein ?.....	13
B. Le gène de prédisposition aux Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1, <i>MEN1</i>	14
B.1. Généralités	14
B.2. Mutations du gène identifiées chez les patients atteints de NEM1	14
C. La protéine menin.....	15
C.1. Conservation entre les espèces	15
C.2. Structure de la protéine.....	16
D. Les partenaires et les fonctions connues de menin (Tableau 2 et figure 1).....	17
D.1. Menin est au cœur de la régulation transcriptionnelle	17
D.1.a. Menin peut agir en tant qu'activateur transcriptionnel.....	17
D.1.a.1. Membres de la famille HOX	18

D.1.a.2. Inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CDKI)	19
D.1.a.3. Gènes cibles des récepteurs nucléaires	20
D.1.b. Menin peut agir en tant que répresseur transcriptionnel	20
D.1.b.1. Menin inhibe la transcription du gène <i>hTERT</i>	20
D.1.b.2. Menin inhibe la synthèse de nombreuses hormones	21
D.2. Menin contrôle la prolifération cellulaire et l'apoptose	22
D.2.a. Observations générales dans les cellules endocrines et non endocrines	22
D.2.b. Interaction fonctionnelle avec JunD.....	22
D.2.c. Implication des inhibiteurs de CDK, <i>p27^{Kip1}</i> et <i>p18^{INK4c}</i>	23
D.2.d. Les voies TGF- β et BMP	24
D.2.e. Voie Wnt/beta-caténine	24
D.2.f. Menin et NF- κ B (Nuclear Factor - kappa B).....	25
D.2.g. Menin et ASK (Activator of S-phase kinase).....	25
D.2.h. Menin et apoptose	26
* Dans les cellules non endocrines.....	26
* Dans les cellules endocrines.....	27
* <i>In vivo</i>	27
D.3. Stabilité génomique et réparation de l'ADN.....	27
D.3.a. Instabilité chromosomique chez les patients NEM1	27
D.3.b. Les partenaires de menin impliqués dans la stabilité génomique et la réparation de l'ADN.....	28
* FANCD2 (Fanconi Anemia Complementation Group D2)	28
* RPA2	28
* NM23H1	28
D.3.c. Données connues au niveau cellulaire.....	29
D.4. Menin régule la différenciation de nombreux types cellulaires	29
D.4.a. Différenciation des organes endocrines.....	29
D.4.b. Différenciation des lignées ostéogéniques et myogéniques.....	30
D.4.c. Différenciation des lignées hématopoïétiques.....	31
* Au cours du développement embryonnaire.....	31
* A l'âge adulte	32
E. Renseignements tirés des modèles murins	33
E.1. Les modèles <i>Men1</i> knock-out classique	33
E.1.a. Souris nullizygotés.....	33

E.1.b. Souris hétérozygotes	34
E.2. Les modèles <i>Men1</i> knock-out conditionnel	34
E.2.a. Invalidation de <i>Men1</i> dans les cellules beta du pancréas endocrine	35
E.2.b. Invalidation de <i>Men1</i> dans les cellules des glandes parathyroïdes	35
E.2.c. Invalidation de <i>Men1</i> dans les cellules hypophysaires	35
E.2.d. Invalidation de <i>Men1</i> dans les organes non endocrines.....	36
- Foie	36
- Cellules hématopoïétiques	36
E.2.e. Menin et prolifération adaptative des cellules beta pancréatiques pendant la gestation	36
II. LES TISSUS HORMONO-DÉPENDANTS.....	37
A. Structure et physiologie de la prostate et des glandes mammaires	37
A.1. La prostate	37
A.2. Les glandes mammaires	38
B. Notions d'histopathologie des tissus hormono-dépendants chez la souris.....	39
B.1. Classification des lésions mammaires (Cardiff <i>et al.</i> , 2000).....	39
B.2. Classification des lésions prostatiques (Shappell <i>et al.</i> , 2004).....	40
C. Les modèles de tumorigénèse des tissus hormono-dépendants chez la souris	40
C.1. Les gènes <i>Brcal/2</i> et la prédisposition aux tumeurs mammaires.....	41
C.2. <i>p53</i> dans la tumorigénèse mammaire	42
C.3. La voie Wnt/beta-caténine/APC.....	43
- Dans les glandes mammaires	43
- Dans la prostate.....	44
C.4. PTEN, la voie PI3K/AKT et LKB1	44
- Dans les glandes mammaires	45
- Dans la prostate.....	45
C.5. La voie TGF-beta et Smad4	47
CHAPITRE 2 : RÉSULTATS	48
ARTICLE 1: Characterisation of the prostate cancer lesions developed in heterozygous <i>Men1</i> mutant mice	52

ARTICLE 2: High incidence of mammary intraepithelial neoplasia development in murine mammary glands with <i>Men1</i> ablation	77
CHAPITRE 3 : DISCUSSION.....	111
I. Menin et la tumorigenèse des tissus hormono-dépendants chez la souris.....	111
A. Complexité et apports des modèles murins d'invalidation de <i>Men1</i>	111
A. 1. Les carcinomes mammaires et prostatiques, un phénotype inattendu chez les souris hétérozygotes pour <i>Men1</i>	111
A. 2. Rôle de l'invalidation du gène <i>Men1</i> dans la prédisposition, certes faible, à la tumorigenèse des glandes mammaires et de la prostate.....	112
A. 3. Facteurs pouvant expliquer la faible prédisposition observée au développement de carcinomes	115
B. Quels sont les événements secondaires liés à l'inactivation de menin qui favorisent la tumorigenèse ?.....	116
B. 1. Implication éventuelle des récepteurs nucléaires	116
B. 2. Menin, beta-caténine et E-cadherine	117
B. 3. Un rôle pour les inhibiteurs de CDK p27 et p18 ?	117
II. <i>MEN1</i> est-il aussi un gène de prédisposition à la tumorigenèse de la prostate et des glandes mammaires chez l'Homme ?.....	119
A. Association des NEM1 avec les cancers des tissus hormono-dépendants ?	119
B. Problème de la rareté des mutations de <i>MEN1</i> par rapport à la fréquence des cancers du sein et de la prostate	120
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	122
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	126
ANNEXES	138

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH : Hormone corticotrope (Adrenocorticotrophic Hormone)
AP : Lobe antérieur de la prostate murine (Anterior Prostate)
AR : Récepteur aux androgènes (Androgen Receptor)
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BRCA1/2: Gènes de prédisposition au cancer du sein 1 et 2 (BReast CAncer 1/2)
CDK : Kinase dépendante des cyclines (Cyclin-Dependent Kinase)
CDKI : Inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor)
Cre : Causes recombination
DP : Lobe dorsal de la prostate murine (Dorsal Prostate)
ER : Récepteur aux œstrogènes (Estrogen Receptor)
ES : Cellules souches embryonnaires (Embryonic Stem cells)
FIHPT : Parathyroïdisme familial isolé (Familial Isolated Hyperparathyroidism)
FSH: Folliculostimuline (Follicle Stimulating Hormone)
GH : Hormone de croissance (Growth Hormone)
H3K4 : Lysine 4 de l'histone H3
HMT : Histone méthyl-transférase
HPT : Hyperparathyroïdie primaire
Kb: Kilobases
LH: Hormone lutéinisante (Luteinizing Hormone)
LOH: Perte d'hétérozygotie (Loss Of Heterozygoty)
LP : Lobe latéral de la prostate murine (Lateral Prostate)
MEF: Fibroblastes embryonnaires murins (Mouse Embryonic Fibroblasts)
MEN1 : Gène de prédisposition aux NEM1 (Multiple Endocrine Neoplasia type 1)
MIN: Néoplasie intraépithéliale mammaire (Mammary Intraepithelial Neoplasia)
MLL: Mixed Lineage Leukemia
MMTV: Mouse Mammary Tumor Virus
MSH: Hormone mélanotrope (Melanocyte Stimulating Hormone)
NEM1 : Syndrome des Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1
NES : Signal d'export nucléaire (Nuclear Export Signal)
NLS : Signal de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal)

PIN : Néoplasie intraépithéliale prostatique (Prostatic Intraepithelial Neoplasia)

PP : Polypeptide pancréatique (Pancreatic Polypeptide)

PR: Récepteur à la progestérone (Progesterone Receptor)

PRL: Prolactine

PTEN: Phosphatase and Tensin homologue

PTH: Hormone parathyroïdienne (Parathyroid Hormone)

Rip: Promoteur de l'insuline de rat (Rat Insulin Promoter)

RNAi: Interférence à l'ARN (RNA interference)

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

TSH: Hormone thyroïdienne (Thyroid Stimulating Hormone)

UTR : Régions non traduites des ARN messagers (Untranslated Regions)

VIP : Polypeptide vasointestinal (Vasointestinal Polypeptide)

VP : Lobe ventral de la prostate murine (Ventral Prostate)

WAP: Protéine du lait (Whey Acidic Protein)

Nomenclature

Les gènes humains sont en majuscules et en italique (Exemple : *MEN1*)

Les gènes murins sont en minuscules et en italique (Exemple : *Men1*)

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1 : Tumeurs associées au syndrome NEM1 et leur pénétrance.

Tableau 2 : Résumé des partenaires protéiques identifiés pour la protéine menin.

Tableau 3 : Résumé des phénotypes des principaux modèles murins de tumorigenèse mammaire.

Tableau 4 : Résumé des phénotypes des principaux modèles murins de tumorigenèse prostatique.

Figure 1 : Représentation schématique de la protéine menin.

Figure 2 : Représentation schématique de l'implication de menin dans la différenciation des ostéoblastes.

Figure 3 : Anatomie générale de la glande prostatique chez la souris.

Figure 4 : Stades de développement pré- et post-pubertaire des glandes mammaires chez la souris.

Figure 5 : Les composants de la voie de signalisation Wnt entraînent le développement de métaplasies squameuses et d'adénocarcinomes mammaires chez la souris.

Figure 6 : Génération d'un modèle murin où le gène *Men1* est invalidé spécifiquement dans les cellules épithéliales mammaires luminales.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cancer est actuellement un problème de santé publique majeur en France et dans le monde entier, avec plusieurs millions de nouveaux cas rapportés chaque année. Si la majorité des tumeurs diagnostiquées sont plutôt des formes sporadiques, un nombre croissant de syndromes tumoraux à prédisposition héréditaire (formes familiales) ont été identifiés ces dernières années. Cette prédisposition d'origine génétique serait responsable de 5 à 10 % de l'ensemble des cas de cancer.

Le gène suppresseur de tumeurs *MEN1* est impliqué dans un syndrome familial qui conduit les individus porteurs d'une mutation germinale à développer de multiples tumeurs affectant plusieurs organes endocrines. Ce syndrome, transmis selon un mode autosomique dominant avec une forte pénétrance, est appelé Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1 (NEM1). Malgré l'acquisition de nombreuses informations depuis l'identification du gène en 1997, sa fonction biologique dans les tissus endocrines ainsi que son rôle dans les processus de tumorigenèse liés aux NEM1 restent mal connus.

L'équipe « Biologie des NEM1 », dirigée par le Dr. C. X. Zhang, au sein du laboratoire Génétique Moléculaire, Signalisation et Cancer (CNRS UMR 5201), s'intéresse à la compréhension des conséquences physiopathologiques et moléculaires de l'inactivation du gène *MEN1*, par l'étude de modèles murins capables de mimer la pathologie humaine. L'équipe a ainsi entrepris la génération et la caractérisation de différents modèles murins d'inactivation du gène *Men1*, en utilisant aussi bien l'approche dite « classique » que celle dite « conditionnelle » (spécifique d'un type cellulaire donné).

Lors de mon arrivée dans l'équipe en 2004 en tant qu'étudiante en Master 2, la caractérisation de ces modèles avait déjà montré que **1)** le gène *Men1* est indispensable au développement embryonnaire chez la souris, son absence affectant la différenciation et le développement d'organes tels que le cœur, le foie, et le tube neural, **2)** les souris hétérozygotes pour *Men1* développent un spectre de tumeurs endocrines similaire à celui observé chez les patients atteints de NEM1, **3)** l'inactivation tissu-spécifique du gène dans les cellules beta du pancréas endocrine entraîne le développement précoce d'insulinomes avec une pénétrance complète.

De façon surprenante, l'équipe avait aussi observé chez les souris *Men1* hétérozygotes âgées le développement de cancers touchant les tissus hormono-dépendants, la glande mammaire chez les femelles et la prostate chez les mâles, avec une incidence faible mais non négligeable. J'ai ainsi été amenée à déterminer l'implication de l'inactivation du gène *Men1* dans le développement de ces lésions, et à comprendre le rôle biologique du gène dans ces tissus hormono-dépendants. Le but de mon travail de thèse a été de définir si le gène *Men1* pouvait être un gène de prédisposition, même mineur, au développement de cancers des glandes mammaires et de la prostate chez la souris, et éventuellement chez l'humain.

Ce mémoire fait la synthèse des travaux que j'ai réalisés pendant mon Master 2 et les quatre années de ma thèse. Le premier chapitre est une revue bibliographique divisée en deux parties. Je ferai tout d'abord un point sur l'état actuel des connaissances sur le syndrome NEM1, son gène de prédisposition *MEN1* et la protéine qu'il code, tout en exposant les connaissances acquises par l'étude des modèles animaux. Puis je présenterai les données concernant l'anatomie et la physiologie des tissus hormono-dépendants ayant fait l'objet de ma thèse, les glandes mammaires et la prostate. Je m'attacherai ensuite à faire l'état, de façon non exhaustive, des modèles animaux existants qui présentent des lésions pré-cancéreuses ou cancéreuses touchant ces deux tissus. Dans le second chapitre, je décrirai les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse, au travers de deux articles dont je suis le premier auteur. J'ai pu en effet montrer l'implication de l'inactivation du gène *Men1* chez la souris dans la prédisposition à des lésions pré-cancéreuses et/ou cancéreuses dans les glandes prostatiques chez les souris mâles et les glandes mammaires chez les souris femelles. Enfin, après avoir discuté ces résultats dans un troisième chapitre, je tirerai les conclusions de mes travaux et dégagerai les perspectives qu'ils ont ouvertes.

CHAPITRE 1:
REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE SYNDROME DES NÉOPLASIES ENDOCRINIENNES MULTIPLES DE TYPE 1 : DE LA MALADIE AU GÈNE DE PRÉDISPOSITION.

A. La maladie

A.1. Définition clinique et diagnostic

Les Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1 (NEM1), ou syndrome de Wermer (Online Mendelian Inheritance in Man 131100), sont une maladie héréditaire à transmission autosomique dominante, caractérisée par l'apparition de lésions hyperplasiques et/ou tumorales de glandes endocrines, principalement les glandes parathyroïdes, le pancréas endocrine et l'hypophyse antérieure (Brandi *et al.*, 2001).

Le diagnostic des NEM1 est fondé sur la présence chez un même patient d'au moins deux des trois atteintes cardinales liées aux NEM1 : adénomes parathyroïdiens, tumeurs endocrines entéro-pancréatiques et tumeurs hypophysaires. Dans le cas des formes sporadiques de NEM1, deux de ces atteintes doivent impérativement être retrouvées chez le même patient, alors que le diagnostic de forme familiale de NEM1 peut être posé si le patient ne présente qu'une seule atteinte, mais qu'un membre de sa famille apparenté au 1^{er} degré présente aussi une de ces atteintes cardinales.

A.2. Incidence, pénétrance et morbidité

Les NEM1 sont un syndrome rare touchant entre 1/50000 et 1/20000 personnes dans la population, aussi bien les hommes que les femmes (Bauters *et al.*, 2003). Néanmoins, cette incidence pourrait être sous-estimée étant donné la complexité des atteintes et la difficulté du diagnostic qui requiert la connaissance des antécédents familiaux. En effet, 75% des patients présentent initialement une seule atteinte cardinale, essentiellement parathyroïdienne ou neuroendocrine, lors de la première consultation clinique.

La pénétrance du syndrome est quasi complète puisqu'on estime que plus de 95% des porteurs d'une mutation du gène *MEN1* développeront des signes cliniques et/ou biologiques de la maladie avant 50 ans (Groupe d'Etude des Tumeurs Endocrines).

Les patients atteints de NEM1 ont une espérance de vie diminuée, dans la mesure où environ 15 à 20% meurent de causes directement liées à la maladie avant l'âge de 60 ans (Burgess *et al.*, 1998, Geerdink *et al.*, 2003). Les causes les plus fréquentes de mortalité sont représentées par les tumeurs pancréatiques devenant malignes, les gastrinomes à cause des ulcères qu'ils provoquent et qui peuvent se perforer, et les carcinoïdes pour leur potentiel hautement métastatique.

A.3. Atteintes cliniques (voir tableau 1)

A.3.a. Hyperparathyroïdie primaire (HPT)

Les tumeurs des glandes parathyroïdes sont l'atteinte principale des NEM1, affectant pratiquement 100% des patients avant l'âge de 50 ans, et le plus souvent la première manifestation clinique (Brandi *et al.*, 2001). Entre 1 et 15% des cas d'hyperparathyroïdies surviennent dans un contexte isolé de toute autre atteinte caractéristique des NEM1. On parle alors de variant FIHPT (Familial Isolated Hyperparathyroidism). Des mutations du gène *MEN1* ont été détectées dans environ 20% des FIHPT.

A.3.b. Tumeurs entéro-pancréatiques

Selon les études, on les retrouve chez 30 à 80% des patients NEM1 (Brandi *et al.*, 2001). La majorité de ces tumeurs produisent des taux excessifs d'hormones.

Les gastrinomes (sécrétant la gastrine) sont observés chez 40% des patients. La majorité d'entre eux donnent lieu au syndrome de Zollinger-Ellison, responsable d'ulcères gastriques. Ils ont en général un fort potentiel de malignité.

Les insulinomes (insuline sécrétée par les cellules beta des îlots pancréatiques) se développent chez environ 10% des patients atteints de NEM1 et sont responsables d'hypoglycémies d'aggravation progressive.

Les tumeurs produisant le glucagon (glucagonomes), le polypeptide vasointestinal (VIPomes) ou la somatostatine (somatostatines) se retrouvent beaucoup plus rarement, chez seulement 2% des patients, mais ont aussi un potentiel métastatique.

Une grande partie des tumeurs entéro-pancréatiques (20%) sont dites non fonctionnelles, dont celles sécrétant le polypeptide pancréatique (PPomes), car elles ne se traduisent par aucun signe clinique. Ces tumeurs non fonctionnelles sont pourtant graves à cause de leur forte capacité à devenir malignes.

Tableau 1 : Tumeurs associées au syndrome NEM1 et leur pénétrance estimée à l'âge de 40 ans (Brandi *et al.*, 2001).

Lésions développées	Pénétrance
Hyperparathyroïdies (Adénomes parathyroïdiens)	90 - 100%
Tumeurs entéro-pancréatiques	
Gastrinomes	40%
Insulinomes	10%
Non fonctionnelles, dont PPomes	20%
Autres (Glucagon, VIP, Somatostatine)	2%
Adénomes antéhypophysaires	
Prolactinomes (PRL)	20%
GH + PRL	5%
GH	5%
Non fonctionnels	5%
ACTH	2%
Tumeurs associées	
<i>Endocrines</i>	
Tumeurs corticosurréaliennes	25%
Tumeurs carcinoïdes neuroendocrines	
Gastriques	10%
Thymiques	2%
Bronchiques	2%
<i>Non endocrines</i>	
Angiofibromes faciaux	85%
Collagénomes faciaux	70%
Lipomes	30%
Léiomyomes	10%
Méningiomes	5%
Ependymomes	1%
Phéochromocytomes	<1%

A.3.c. Adénomes antéhypophysaires

Les tumeurs de l'hypophyse antérieure sont observées chez 10 à 60% des patients NEM1 (Brandi *et al.*, 2001). L'incidence semble plus élevée chez les femmes (50%) que chez les hommes (31%) (Verges *et al.*, 2002). Les manifestations cliniques dépendent surtout de la taille de la tumeur et de son produit de sécrétion, une tumeur de grande taille pouvant comprimer les voies optiques sous-jacentes (chiasma optique) et provoquer des troubles neurologiques, dont des défauts du champ visuel.

Les tumeurs les plus fréquentes sont celles sécrétant la prolactine (prolactinomes), observées chez 20% des patients (Brandi *et al.*, 2001). Les prolactinomes induisent des galactorrhées (écoulements de lait en dehors de l'allaitement), aménorrhées (absence anormale de règles) et une infertilité chez les femmes, ainsi que de l'hypogonadisme et une perturbation des fonctions sexuelles chez les hommes (Marini *et al.*, 2006).

Les autres types de tumeurs antéhypophysaires liées aux NEM1 sont surtout des tumeurs soit pluri-sécrétantes (à la fois PRL et GH, 5%), soit non sécrétantes (non fonctionnelles, 5%), soit sécrétant GH seule (5%) ou plus rarement ACTH (2%) (Brandi *et al.*, 2001).

A.3.d. Atteintes endocrines associées

Plus rarement, les trois atteintes cardinales décrites ci-dessus peuvent être associées à d'autres lésions endocrines, de type tumeurs corticosurrénales et tumeurs carcinoïdes neuroendocrines gastriques, bronchiques ou thymiques (Brandi *et al.*, 2001). Les tumeurs des corticosurrénales sont les plus fréquentes (25% des patients) et se développent assez tard en comparaison des autres tumeurs NEM1. Les tumeurs carcinoïdes sont présentes chez 14% des patients et ne sont symptomatiques que lorsqu'elles deviennent malignes.

A.3.e. Atteintes non endocrines associées

Outre les atteintes endocrines, des lésions touchant des organes non endocrines ont été rapportées chez les patients NEM1 dans la littérature.

Des atteintes cutanées, pour lesquelles une perte d'hétérozygotie (LOH, Loss of heterozygoty) du gène *MEN1* a été détectée, sont présentes chez une grande majorité des patients atteints de NEM1, sous la forme d'angiofibromes et de collagénomes faciaux (respectivement 85 et 70% des patients) et de lipomes sous-cutanés ou viscéraux (30%) (Brandi *et al.*, 2001).

Des tumeurs des muscles lisses de l'œsophage, l'utérus ou du rectum (léiomyomes, 10% des patients) et du système nerveux central (méningiomes, 3% ; épendymomes, 1%) sont aussi observées plus rarement chez les patients souffrant de NEM1 (Piecha *et al.*, 2008).

L'occurrence de phéochromocytomes (tumeurs de la médullosurrénale) a aussi été observée dans moins de 1% des patients.

A.3.f. Association des NEM1 avec les cancers du sein ?

Les cancers du sein n'ont jamais été rapportés comme faisant partie du spectre de tumeurs associées au syndrome NEM1. Cependant, une étude approfondie de différents cas cliniques et cohortes de patientes décrits dans la littérature, suivis pour la pathologie NEM1, pour de l'hyperparathyroïdie (HPT), ou pour des cancers du sein sporadiques, fait apparaître une association, certes faible mais probable, entre la perte du gène *MEN1* et l'occurrence de cancers du sein.

Deux cas de femmes atteintes de la pathologie NEM1 ont été rapportés dans la littérature comme ayant aussi développé un cancer du sein, où une perte d'hétérozygotie pour le gène *MEN1* a été détectée. En 2004, Honda *et al.* décrivaient une femme japonaise de 44 ans présentant un tableau clinique d'HPT associée à un adénome corticosurrénalien et à un carcinome mammaire squirrheux (Honda *et al.*, 2004). Une LOH au locus *MEN1* a été trouvée à la fois dans l'adénome parathyroïdien et le cancer du sein. L'analyse de mutation pour *MEN1* a détectée une mutation germinale A541T, considérée pour l'instant comme un polymorphisme non délétère puisqu'elle est retrouvée chez 24% de japonais non malades. Naito *et al.* ont aussi décrit une femme de 74 ans diagnostiquée pour un syndrome NEM1 après le développement d'une HPT et de tumeurs pancréatiques d'îlots, présentant un carcinome ductal mammaire invasif (Naito *et al.*, 2006). La recherche de mutations du gène *MEN1* n'a rien donné, mais une LOH pour le gène a cependant été observée dans les tumeurs des parathyroïdes et du pancréas, ainsi qu'une inactivation complète de l'expression de la protéine menin, y compris dans le cancer du sein.

Plusieurs études sur la mortalité des sujets atteints de NEM1 ont également décrit des cancers du sein chez un petit nombre d'entre eux (Doherty *et al.*, 1998, Dean *et al.*, 2000, Vierimaa *et al.*, 2007), dont une patiente ayant développé un carcinome mammaire ductal métastatique à l'âge de 34 ans, âge d'apparition plutôt caractéristique d'une prédisposition héréditaire que d'un cancer sporadique.

De plus, il existe un grand nombre de cancers du sein sporadiques, essentiellement du type carcinomes ductaux, dans lesquels une LOH a été détectée au locus 11q13, où le gène *MEN1* est localisé (Zhuang *et al.*, 1995, Chuaqui *et al.*, 1997, Costa *et al.*, 2001). Toutes ces études ont suggéré la présence à ce locus d'un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la transition des lésions mammaires pré-cancéreuses aux cancers du sein invasifs. Bien que Costa *et al.* n'aient trouvé aucune mutation dans l'exon 2 de *MEN1* (Costa *et al.*, 2001), il n'est pas exclu que des mutations soient présentes dans les autres régions du gène, ou bien que des réarrangements ou délétions plus larges soient mis en jeu.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré un lien entre l'hyperparathyroïdie et les cancers du sein. Ce lien est d'autant plus intéressant qu'il est connu que des mutations du gène *MEN1* seraient impliquées dans environ 2-3% des HPT sporadiques (paragraphe I.A.3.a). Une étude rétrospective, menée par le National Swedish Cancer Registry sur 7642 femmes ayant eu une parathyroïdectomie pour cause d'HPT, a pu montrer une augmentation de la fréquence des cancers du sein dans ce groupe (Nilsson *et al.*, 2007). Dans une autre étude (Fierabracci *et al.*, 2001), parmi 100 patientes traitées pour un cancer du sein, 7 ont été diagnostiquées pour une HPT (7%). Plus récemment, Pal *et al.* ont rapporté dans une revue une fratrie de 5 sœurs (Pal *et al.*, 2008), parmi lesquelles 4 présentaient avant la ménopause une hyperparathyroïdie de type FIHPT, associée à une tumeur hypophysaire pour une des 4, et à des carcinomes mammaires pour les 3 autres (2 carcinomes ductaux invasifs et un carcinome infiltrant). Aucune mutation délétère n'a été identifiée pour *BRCA1/2* et *MEN1* chez ces femmes.

B. Le gène de prédisposition aux Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1, *MEN1*

B.1. Généralités

Le gène *MEN1* a été identifié en 1997 par clonage positionnel (Chandrasekharappa *et al.*, 1997). Il est localisé sur le chromosome 11 en position q13, où il s'étend sur 9,8 kb et comporte 10 exons, le premier exon et la partie distale de l'exon 10 étant non codants.

Les observations de LOH réalisées dans les principales tumeurs développées chez les patients atteints de NEM1 familiales ou sporadiques (Lubensky *et al.*, 1996), ainsi que dans les tumeurs moins fréquemment associées aux NEM1 (Vageli *et al.*, 2006), suggèrent un rôle de suppresseur de tumeur pour *MEN1*.

B.2. Mutations du gène identifiées chez les patients atteints de NEM1

Plus de 500 mutations différentes du gène *MEN1* ont été identifiées à ce jour dans les cas de NEM1 familiales ou sporadiques (Lemos *et al.*, 2007). Près de 70% sont des mutations inactivatrices, par substitution d'un acide aminé (« non-sens », 23% des mutations) ou insertion/délétion décalant le cadre de lecture (environ 41% des mutations), qui font apparaître un codon stop prématuré et entraîne la synthèse d'une protéine tronquée. Les mutations touchent aussi les sites d'épissage de l'ARN messager (environ 9%), pouvant mener à la perte de certains exons. Les autres mutations sont de type « faux-sens » (20%), modifiant un acide aminé et conduisant pour la plupart à une instabilité de la protéine qui est rapidement ubiquitinylée et dégradée par le protéasome (Yaguchi *et al.*, 2004), ou des insertions/délétions ne modifiant pas le cadre de lecture (6%). Il est important de noter que les mutations sont dispersées sur toute la région codante du gène, sans « points chauds » identifiés, et que la position de la mutation ne permet pas de prédire le phénotype tumoral ou le degré de sévérité du syndrome (Wautot *et al.*, 2002).

Dans 10 à 20% des cas de NEM1 diagnostiqués, le séquençage du gène *MEN1* ne détecte aucune mutation (Brandi *et al.*, 2001), soit parce que ces mutations se trouvent dans des régions du gène qui ne sont pas analysées lors du séquençage (promoteur et régions UTR non traduites), soit parce que dans de rares cas (environ 1%), les patients NEM1 présentent une grande délétion partielle ou totale du gène qui n'est pas visible par les techniques de séquençage. Cependant, il n'est pas exclu que certains de ces patients présentent des syndromes ressemblant aux NEM1 (phénocopies), mais dont la cause est une mutation dans un autre gène situé au locus 11q13 ou sur un autre chromosome.

C. La protéine menin

Le gène *MEN1* code une protéine de 610 acides aminés, nommée menin, localisée majoritairement dans le noyau des cellules (Guru *et al.*, 1998, Kaji *et al.*, 1999, La *et al.*, 2006). La protéine menin est exprimée dans de nombreux tissus et types cellulaires, aussi bien endocrines que non endocrines, au cours du développement embryonnaire et de la vie adulte chez la souris (Stewart *et al.*, 1998) et l'Homme (Wautot *et al.*, 2000).

C.1. Conservation entre les espèces

Cette protéine est très conservée au cours de l'évolution, aussi bien chez les Vertébrés (souris, rat, poisson-zèbre, poulet, xénope, poisson fugu) que chez les Invertébrés (*Drosophila*

melanogaster, escargot, moustique, abeille), sauf chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le nématode *Caenorhabditis elegans* (Chandrasekharappa & Teh, 2001). Des alignements de séquences protéiques ont montré une homologie de séquence de 67% pour le poisson-zèbre et 97,2% pour le rat par rapport à la protéine humaine. Le gène murin *Men1*, situé sur le chromosome 19 dans une région synténique avec le locus humain 11q13, est très similaire au gène humain *MEN1* et code une protéine de 611 acides aminés présentant 97% d'homologie de séquence avec son orthologue humain (Guru *et al.*, 1999), faisant du modèle murin un bon modèle pour étudier la pathologie NEM1.

C.2. Structure de la protéine

Aucune homologie avec d'autres protéines connues n'a pu être mise en évidence pour menin. Plusieurs motifs protéiques ont pu cependant être identifiés (voir figure 1) :

- trois signaux de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localisation Signal) en position carboxy-terminale : deux principaux, NLS1 et NLS2 (acides aminés 479-497 et 588-608) (Guru *et al.*, 1998), et un NLS accessoire, NLSa (acides aminés 546-572) (La *et al.*, 2006), prenant le relais lorsque les deux autres ne sont pas fonctionnels. La quasi totalité des mutations tronquantes affectant menin prédisent la perte d'au moins un NLS, conduisant probablement à une instabilité de la protéine ou à une perte de fonction en empêchant son accès au noyau. Une étude a par ailleurs montré que la menin serait capable de se fixer directement sur l'ADN double brin *in vitro*, sans spécificité de séquence, par l'intermédiaire des charges positives des acides aminés composant les NLS dans la région carboxy-terminale de la protéine (La *et al.*, 2004).

- deux séquences d'export nucléaire (NES, Nuclear Export Signal) fonctionnelles, NES1 (acides aminés 33 à 41) et NES2 (acides aminés 258 à 267), qui permettent à la protéine de faire la navette entre noyau et cytoplasme (Cao *et al.*, 2009).

- un domaine SID (mSin3A-Interacting Domain) en position centrale (371-387), qui permet l'interaction de menin avec mSin3A, un corépresseur transcriptionnel recrutant les histones déacétylases HDACs (Kim *et al.*, 2003).

- un motif LXXLL (acides aminés 263 à 267), conservé au cours de l'évolution, et caractéristique des coactivateurs transcriptionnels connus pour se lier aux récepteurs nucléaires d'hormones (Dreijerink *et al.*, 2006).

- cinq sites prédits caractéristiques d'une activité guanosine triphosphatase (GTPase), nommés G1 à G5 (Yaguchi *et al.*, 2002).

Figure 1 : Représentation schématique de la protéine menin, montrant la position des différents motifs protéiques identifiés et la cartographie des sites d'interaction connus pour les différents partenaires de menin, indiqués par des barres.

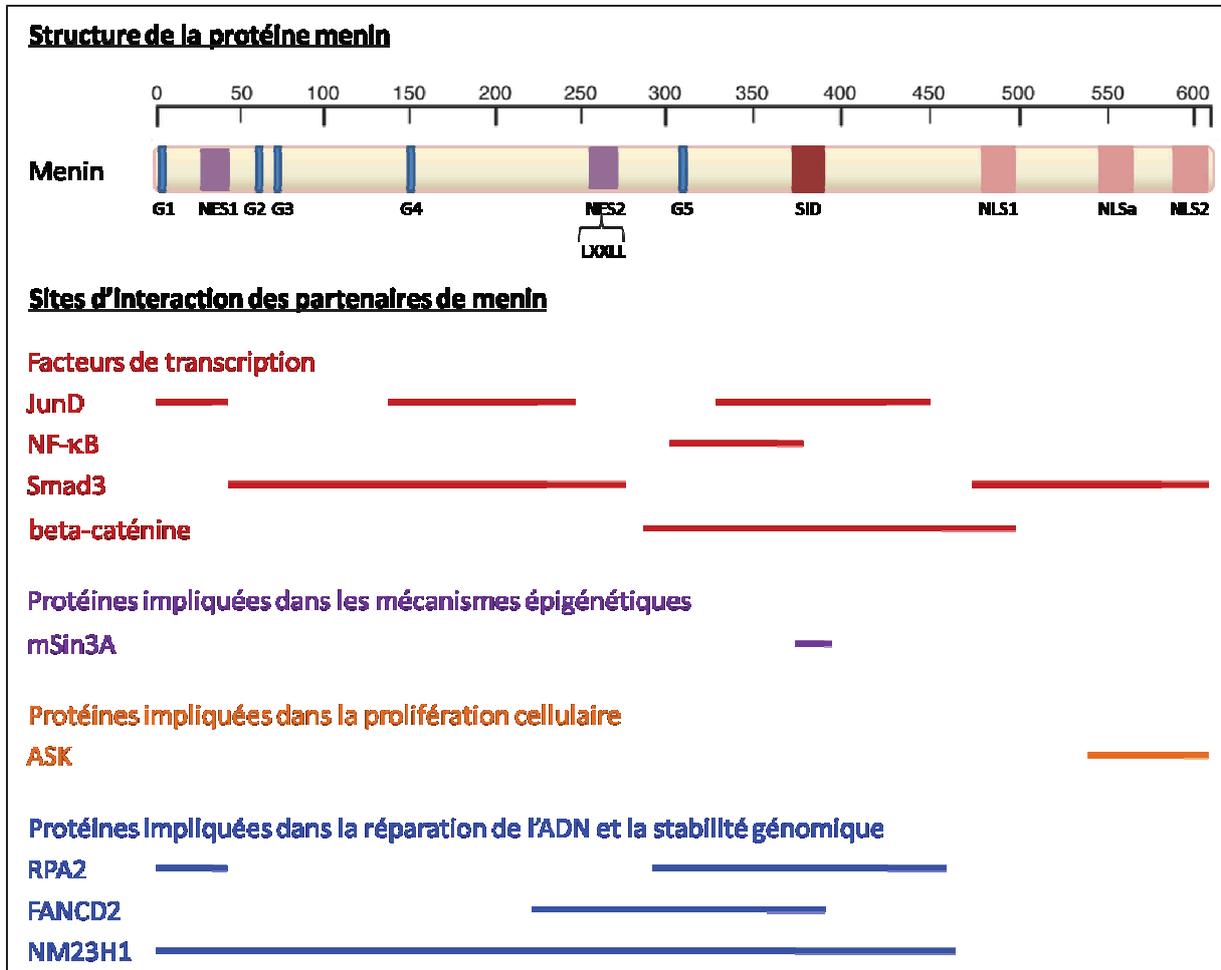


Tableau 2: Résumé des partenaires protéiques identifiés pour la protéine menin.

Protéine	Fonction	Méthodologies	Rôle fonctionnel de l'interaction	Références
Régulation de la transcription				
Complexe HMT MLL1/2	Complexe à activité histone méthyltransférase	Immunoprécipitation	Menin, au sein du complexe HMT contenant MLL1/2, permet la méthylation de H3K4 sur les promoteurs, activant ainsi l'expression des gènes <i>HOX</i> et des inhibiteurs de CDK <i>p27^{Kip1}</i> et <i>p18^{INK4c}</i>	Hughes <i>et al.</i> 2004 Yokoyama <i>et al.</i> 2004 Yokoyama <i>et al.</i> 2005 Milne <i>et al.</i> 2005
LEDGF	Protéine associée à la chromatine	Immunoprécipitation	Menin permettrait le recrutement du complexe HMT au niveau des promoteurs en interagissant avec LEDGF	Yokoyama & Cleary 2008
JunD	Facteur de transcription	Double-hybride en levure et mammifère, GST-pulldown, immunoprécipitation	Menin réprime la transactivation médiée par JunD	Agarwal <i>et al.</i> 1999 Gobl <i>et al.</i> 1999
NF-κB (p50, p52, p65)	Facteur de transcription	Immunoprécipitation, GST-pulldown	Menin réprime la transactivation médiée par NF-κB	Heppner <i>et al.</i> 2001
Smad3	Facteur de transcription	Immunoprécipitation	Menin permet l'interaction de Smad3 avec l'ADN, activant ainsi la transcription des gènes cibles de la voie TGF-β	Kaji <i>et al.</i> 2001
Smad1/5 Runx2	Facteurs de transcription	Immunoprécipitation	Menin est nécessaire à la transcription, médiée par Smad1/5, des gènes cibles de la voie des BMP, dont <i>Runx2</i> , co-facteur transcriptionnel des Smads	Sowa <i>et al.</i> 2003 Sowa <i>et al.</i> 2004b
ERα	Récepteur nucléaire/Facteur de transcription	Double-hybride en levure	Menin est un co-facteur transcriptionnel de ERα en permettant la triméthylation de H3K4 sur les promoteurs de certains gènes cibles des œstrogènes	Dreijerink <i>et al.</i> 2006
PPARγ	Récepteur nucléaire/Facteur de transcription	GST-pulldown	Menin est un co-facteur transcriptionnel de PPARγ en permettant la triméthylation de H3K4 sur les promoteurs de certains de ses gènes cibles	Dreijerink <i>et al.</i> 2009
Beta-caténine	Facteur de transcription	GST-pulldown, immunoprécipitation	- Menin est nécessaire à l'activation transcriptionnelle d'un gène cible de la voie Wnt/beta-caténine, le gène <i>Axin2</i> , par la triméthylation de H3K4 sur son promoteur - Menin régule la localisation sub-cellulaire de beta-caténine	Chen <i>et al.</i> 2008 Cao <i>et al.</i> 2009
IQGAP1	Chaperon moléculaire	Purification TAP (tandem-affinity purification)	Menin réduit l'interaction entre IQGAP1 et GTP-Rac1, et augmente l'interaction de IQGAP1 avec le complexe E-cadhérine/β-caténine, favorisant leur localisation à la membrane	Yan <i>et al.</i> 2009
mSin3A	Complexe à activité histone déacétylase	Immunoprécipitation	Menin réprime la transactivation de JunD en recrutant les HDAC1/2, par son association avec mSin3a	Kim <i>et al.</i> 2003
Prolifération cellulaire				
ASK	Prolifération cellulaire et réplication de l'ADN	Double-hybride en levure, immunoprécipitation	Menin supprime la prolifération cellulaire induite par ASK	Schnepp <i>et al.</i> 2004b
Réparation de l'ADN et stabilité génomique				
FANCD2	Réparation de l'ADN	Immunoprécipitation	Menin pourrait intervenir dans la réparation de l'ADN mettant en jeu FANCD2	Jin <i>et al.</i> 2003
RPA2	Réplication, recombinaison et réparation de l'ADN	Double-hybride en levure, GST-pulldown, colocalisation	Menin ne serait pas impliquée dans la réparation de l'ADN faisant intervenir RPA2	Sukhodolets <i>et al.</i> 2003
NM23H1	NDP kinase	Double-hybride en levure, GST-pulldown	L'interaction avec NM23H1 augmente l'activité GTP hydrolase atypique de menin	Ohkura <i>et al.</i> 2001

D. Les partenaires et les fonctions connues de menin (Tableau 2 et figure 1)

Actuellement, plus d'une vingtaine de partenaires de menin ont été identifiés par différentes techniques. Ils interviennent dans des processus très divers, comme la régulation de la transcription, le contrôle du cycle cellulaire, la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et le maintien de l'intégrité du génome. L'ensemble de ces données est récapitulé dans le tableau 2, et la figure 1 schématise les régions de la protéine menin impliquées dans certaines de ces interactions.

D.1. Menin est au cœur de la régulation transcriptionnelle

Des études à grande échelle d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) couplée à des puces oligonucléotidiques ont révélé que menin peut interagir avec des milliers de sites sur la chromatine, principalement au niveau des promoteurs géniques. Les sites occupés par menin sur la chromatine dans des cellules Hela, HepG2 (cellules d'hépatocarcinome humain) et dans des îlots pancréatiques coïncident fréquemment avec ceux de MLL1 et Rbbp5, membres d'un complexe à activité histone méthyl-transférase (HMT), et avec la méthylation sur la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) (Scacheri *et al.*, 2006). Cependant, cette co-localisation n'est pas systématique, suggérant que menin pourrait cibler d'autres promoteurs indépendamment du complexe HMT. De plus, une étude similaire récente a trouvé des centaines de sites d'interaction pour menin, la majorité étant situés dans les extrémités 3' des gènes et les introns (Agarwal *et al.*, 2007). Aucune spécificité de séquence pour la fixation de menin n'a été mise en évidence, suggérant que ces interactions de menin avec la chromatine seraient pour la plupart indirectes.

De nombreux travaux ont pu identifier plusieurs gènes cibles dont l'expression est régulée plus ou moins directement par menin.

D.1.a. Menin peut agir en tant qu'activateur transcriptionnel

L'immunoprécipitation de lysats de cellules Hela ou K562 (cellules érythroleucémiques) avec un anticorps anti-menin ou anti-MLL (Mixed Lineage Leukaemia), suivie d'une analyse en spectrométrie de masse, a permis de mettre en évidence une interaction entre menin et les membres d'un complexe à activité histone méthyl-transférase (HMT), pouvant activer la

transcription de certains gènes en méthylant H3K4 (Hughes *et al.*, 2004, Yokoyama *et al.*, 2004, Milne *et al.*, 2005). Récemment, il a été découvert que le recrutement du complexe HMT au niveau des promoteurs de certains gènes cibles de menin passerait par l'interaction entre menin et LEDGF (lens epithelium-derived growth factor), une protéine associée à la chromatine (Yokoyama & Cleary, 2008). Menin jouerait alors le rôle de protéine adaptatrice faisant le lien entre le complexe HMT et LEDGF.

Le proto-oncogène MLL, qui fait partie de ce complexe, est la cible de translocations chromosomiques dans de multiples pathologies mettant en jeu les lignages cellulaires hématopoïétiques, comme les leucémies aiguës myéloïdes et lymphoïdes. MLL peut être fusionné à plus de 40 protéines différentes, ces protéines fusions entraînant l'activation constitutive de MLL et la transformation des cellules. Il semblerait que menin soit capable de se lier non seulement à MLL, mais également à ses protéines de fusion oncogéniques, contrairement aux autres protéines du complexe HMT (Yokoyama *et al.*, 2004, Yokoyama *et al.*, 2005). Certaines mutations ponctuelles de menin, retrouvées chez les patients NEM1, empêchent cette interaction, suggérant l'importance de la perte de cette fonction dans les mécanismes de tumorigenèse associée à l'inactivation de *MEN1* (Hughes *et al.*, 2004).

D.1.a.1. Membres de la famille HOX

Les principales cibles transcriptionnelles de la protéine MLL, ainsi que de ses protéines de fusion oncogéniques, sont les gènes à homéodomaine *HOX*, qui sont d'importants régulateurs de la prolifération et de la différenciation cellulaire, notamment des cellules hématopoïétiques, ainsi que de la morphogenèse embryonnaire.

Le knock-down de l'expression de MLL ou de menin par interférence à l'ARN (RNAi), mais pas celui des autres composants du complexe HMT, conduit à une diminution significative de l'expression de *HoxA9* (Yokoyama *et al.*, 2004). De plus, Hugues *et al.* ont observé la diminution de l'expression d'autres gènes *Hox*, *HoxC6* et *HoxC8*, dans les embryons et les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) *Men1^{-/-}* par rapport aux embryons et MEF *Men1^{+/+}*, leur expression étant augmentée lorsque menin est réexprimée dans les MEF *Men1^{-/-}* (Hughes *et al.*, 2004). Plus récemment, il a été montré que la suppression de menin dans les cellules progénitrices de la moelle osseuse entraîne une réduction importante de l'expression de *HoxA9*, *HoxA7*, *HoxC6* et *HoxC8* (Chen *et al.*, 2006). Par ailleurs, menin semble capable de se fixer directement sur le promoteur et d'autres régions du gène *HoxC8*

(Hughes *et al.*, 2004), ainsi que sur les promoteurs de *HoxA7* et *HoxA10* (Yokoyama *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2006).

De façon surprenante, menin est également essentielle au maintien de l'expression de *HoxA9* dans les progéniteurs myéloïdes transformés par les protéines de fusion oncogéniques MLL-ENL, MLL-AF6 (Yokoyama *et al.*, 2005) et MLL-AF9 (Chen *et al.*, 2006), par sa capacité à recruter MLL et induire la méthylation de H3K4 sur le promoteur de *HoxA9*.

Menin apparaît donc comme un activateur transcriptionnel des gènes *Hox*, et pourrait exercer ce rôle en modifiant directement la structure de la chromatine au niveau de leurs promoteurs au sein du complexe HMT contenant MLL.

D.1.a.2. Inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CDKI)

Il existe deux familles d'inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CDK, Cyclin-Dependent Kinase). Les CDKI de la famille INK4 (Inhibitors of CDK4) comprennent p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d}, qui inhibent spécifiquement l'activité des CDK4 et 6, empêchant ainsi leur association avec Cycline D et bloquant le cycle cellulaire en phase G1. La famille Cip/Kip des CDKI comprend p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}, qui peuvent interagir à la fois avec les Cyclines A, D et E et les CDKs et bloquer leur activité (Sherr & Roberts, 1999).

Des études récentes ont montré que menin régule l'expression des CDKI p27^{Kip1/CDKN1B} et p18^{INK4c/CDKN2C}. En effet, le taux d'expression de p27^{Kip1} et p18^{INK4c} est diminué dans les cellules MEF *Men1*^{-/-} et *Mll*^{-/-} par rapport aux MEF *Men1*^{+/+} et *Mll*^{+/+} (Milne *et al.*, 2005) et dans les cellules beta des insulinomes développés chez les souris *Men1*^{+/-} où menin est inactivée (Karnik *et al.*, 2005). Cette réduction d'expression de p27^{Kip1} et p18^{INK4c} dans les MEF est accompagnée d'une augmentation de leur prolifération cellulaire, la réexpression de menin et de MLL dans les cellules déficientes rétablissant l'expression des CDKI et une prolifération cellulaire normale (Milne *et al.*, 2005). Deux études ont montré par immunoprécipitation de chromatine, en utilisant des cellules MIN6 ou des MEF, que menin est capable de se fixer *in vivo* sur les promoteurs des gènes p27^{Kip1} et p18^{INK4c} et de favoriser la méthylation sur H3K4 au niveau de ces promoteurs (Karnik *et al.*, 2005, Milne *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'utilisation de gènes rapporteurs luciférase sous le contrôle des promoteurs de p27^{Kip1} ou p18^{INK4c} a permis de montrer que la réexpression de menin dans les MEF *Men1*^{-/-} active la transcription de ces deux promoteurs (Milne *et al.*, 2005). Des mutations faux-sens de menin retrouvées chez les patients NEM1 empêchent la fixation de menin sur ces promoteurs (Karnik *et al.*, 2005, Milne *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces données indique le rôle de menin dans l'activation de la transcription des gènes *p27^{Kip1}* et *p18^{INK4c}*, grâce au mécanisme de méthylation de H3K4 par le complexe HMT contenant menin et MLL. Néanmoins, l'implication de cette régulation dans la tumorigenèse liée à l'inactivation de *Men1* est loin d'être évidente, dans la mesure où les souris double knock-out *p27^{-/-}:p18^{-/-}* développent un spectre tumoral proche de celui des patients NEM1, à l'exception des tumeurs du pancréas (Franklin *et al.*, 2000).

D.1.a.3. Gènes cibles des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires jouent un rôle important dans les processus endocrines chez l'homme. Dreijerink *et al.* ont identifié en 2006 une interaction entre menin et le récepteur aux œstrogènes (ER α), de manière dépendante du ligand, via le motif LXXLL qu'elle contient (Dreijerink *et al.*, 2006). Menin a ainsi été décrite comme un coactivateur transcriptionnel de ER α , mais aussi du récepteur à la vitamine D (VDR) (Dreijerink *et al.*, 2009a). Les auteurs ont pu observer que la surexpression de menin dans des cellules non endocrines COS et HEK293T entraîne une augmentation de la transactivation exercée par ER α et VDR sur des gènes rapporteurs après induction par le 17 β -œstradiol (E2) ou la vitamine D3 respectivement. Menin est en effet capable de recruter le complexe HMT contenant MLL1/2 au niveau des promoteurs des gènes cibles des oestrogènes et de la vitamine D, permettant la triméthylation de H3K4 et l'activation de la transcription.

Plus récemment, les mêmes auteurs ont montré l'interaction de menin avec un autre membre de la famille des récepteurs nucléaires, PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (Dreijerink *et al.*, 2009b). Menin intervient aussi comme coactivateur de la transcription des gènes cibles de PPAR γ , en recrutant le complexe HMT sur les promoteurs.

D.1.b. Menin peut agir en tant que répresseur transcriptionnel

D.1.b.1. Menin inhibe la transcription du gène *hTERT*

Chez l'Homme, l'activité de la télomérase étant absente dans la plupart des cellules somatiques, les télomères (extrémités des chromosomes) raccourcissent au fur et à mesure des divisions cellulaires, jusqu'à induire la mort de la cellule. La réactivation de la télomérase donne aux cellules la capacité de proliférer indéfiniment et participe donc aux mécanismes de tumorigenèse. De façon intéressante, il a été montré que menin régule négativement la transcription de la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (human Telomerase

Reverse Transcriptase, hTERT), dans certains types cellulaires uniquement, en se fixant sans spécificité de séquence sur son promoteur (Lin & Elledge, 2003, Hashimoto *et al.*, 2008). La réduction de l'expression de menin par RNAi de façon stable dans des fibroblastes humains primaires conduit à l'activation de la télomérase, associée à une augmentation de la taille des télomères. Ces cellules présentent des caractéristiques de cellules immortalisées dans la mesure où elles dépassent leur durée de vie normale de plus de 45 passages, sans signe de sénescence (Lin & Elledge, 2003, Hashimoto *et al.*, 2008). Ce mécanisme pourrait donc être une des voies d'action de menin en tant que suppresseur de tumeur. Par contre, l'inhibition de la transcription de *hTERT* dans certains types cellulaires, suite à la surexpression de menin, n'entraîne aucune diminution significative de l'activité de la télomérase (Hashimoto *et al.*, 2008).

D.1.b.2. Menin inhibe la synthèse de nombreuses hormones

Dans des cellules INS-1 (insulinomes de rat) et GH3 (lignée hypophysaire de rat), la surexpression de menin conduit à une diminution de l'activité des promoteurs de l'insuline (Sayo *et al.*, 2002) et de la prolactine (Namihira *et al.*, 2002) couplés à un gène rapporteur luciférase. De plus, le traitement de cellules hypophysaires de rat GH4C1 par l'activine (Lacerte *et al.*, 2004), ou de cultures primaires de tumeurs des parathyroïdes par le TGF- β (Sowa *et al.*, 2004b), induit respectivement l'inhibition de la synthèse de prolactine et d'hormone parathyroïdienne (PTH), ainsi que la diminution de la prolifération des cellules. Ces effets sont abolis par la réduction de l'expression de menin par RNAi. L'effet de l'activine sur la synthèse de PRL et la prolifération des cellules hypophysaires semble faire intervenir une action inhibitrice de menin, ainsi que les Smad2 et 3 de la voie TGF- β , sur l'expression d'un facteur de transcription spécifique de l'hypophyse, Pit-1, nécessaire à la génération et au maintien des lignées hypophysaires somatotropes, lactotropes et thyrotropes (Lacerte *et al.*, 2004).

Il semblerait aussi que menin puisse réguler négativement l'expression de l'hormone gastrine (Mensah-Osman *et al.*, 2008).

La protéine menin semble donc jouer un rôle synergique avec la voie TGF- β dans la répression de la synthèse de plusieurs hormones sécrétées par des tissus atteints dans la pathologie NEM1, et dans le contrôle de la prolifération de certains types cellulaires. Cependant, ces études ont pour la plupart été réalisées *in vitro* en utilisant des gènes

rapporteurs. La réalité et les mécanismes de ces régulations hormonales *in vivo* restent encore à éclaircir.

D.2. Menin contrôle la prolifération cellulaire et l'apoptose

De nombreux gènes suppresseurs de tumeurs exercent leur rôle soit par une inhibition de la prolifération cellulaire, soit par une activation des mécanismes d'apoptose.

D.2.a. Observations générales dans les cellules endocrines et non endocrines

Plusieurs équipes ont utilisé les MEF *Men1*^{-/-} immortalisés pour étudier le rôle du gène *Men1* dans la prolifération cellulaire. Il a été rapporté que les MEF *Men1*^{-/-} incorporent 2,5 fois plus de thymidine tritiée que les MEF *Men1*^{+/+} (Schnepf *et al.*, 2004a). La réexpression de menin dans ces cellules conduit à une diminution de la prolifération cellulaire de près de deux fois, ce qui n'est pas le cas avec des protéines menin mutées (Schnepf *et al.*, 2004a). Toutefois, il est important de signaler que l'équipe dont je fais partie n'a pas observé de différences significatives de prolifération entre les MEF primaires *Men1*^{-/-}, *Men1*^{+/-} et *Men1*^{+/+} issues de notre modèle de souris knock-out (Bertolino *et al.*, 2003a).

Après surexpression de menin dans les lignées d'insulinome de rat INS-1 ou de souris MIN6, deux études ont observé une diminution de la prolifération cellulaire (Sayo *et al.*, 2002, Karnik *et al.*, 2005). Cette diminution est due, selon les études, à une réduction de la synthèse d'ADN et une augmentation de l'apoptose (Sayo *et al.*, 2002), et/ou une accumulation des inhibiteurs de CDK (Karnik *et al.*, 2005). De même, la surexpression de menin dans les cellules pancréatiques endocrines BON1 (Stalberg *et al.*, 2004) ou les cellules hypophysaires GH3 (Namihira *et al.*, 2002) inhibe la prolifération cellulaire.

Divers travaux ont tenté d'expliquer les mécanismes de l'implication de menin dans ces processus.

D.2.b. Interaction fonctionnelle avec JunD

Le facteur de transcription JunD a été le premier partenaire identifié de menin en 1999, par une étude d'interaction en double-hybride chez la levure (Agarwal *et al.*, 1999, Gobl *et al.*, 1999). Trois domaines d'interaction avec JunD ont été mis en évidence sur la protéine menin (acides aminés 1-40, 139-242 et 323-428).

Menin est capable de réprimer l'activité transcriptionnelle de JunD dans un système *in vitro* de gène rapporteur (Agarwal *et al.*, 1999, Ikeo *et al.*, 2004). Des mutations faux-sens identifiées chez les patients NEM1 et localisées dans les domaines potentiels d'interaction entre menin et JunD entraînent une diminution plus ou moins importante de la capacité de menin à réprimer l'activité de JunD (Agarwal *et al.*, 1999). Il a été montré que la répression de l'activité transcriptionnelle de JunD par menin est dépendante d'une déacétylation des histones (Gobl *et al.*, 1999). Dans la continuité de ces observations, une interaction a été identifiée entre menin et mSin3a, un répresseur général de la transcription, qui permet le recrutement de HDAC1, entraînant une déacétylation des histones au niveau des promoteurs et la répression de leur activité transcriptionnelle (Kim *et al.*, 2003). Cette interaction a lieu via le domaine SID de menin et des mutations dans ce domaine empêchent l'interaction menin/mSin3A ainsi que la répression par menin de l'activité de JunD (Kim *et al.*, 2003).

De plus, il a été montré en 1999 que menin pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et de la tumorigénicité induite par l'oncogène Ras (Kim *et al.*, 1999). Une étude suggère que cet effet sur la suppression de la transformation induite par Ras passerait par l'inhibition de la voie de signalisation des MAPK, en partenariat avec JunD (Gallo *et al.*, 2002).

Cette interaction fonctionnelle peut cependant paraître paradoxale, puisque JunD, comme menin, a un effet inhibiteur sur la prolifération de certains types cellulaires. Néanmoins, il n'est pas impossible que la fonction même de JunD soit une conséquence de son interaction avec menin. En effet, Agarwal *et al.* ont montré que la surexpression de JunD dans des MEF *Men1*^{+/+} entraîne une diminution de la prolifération cellulaire, qui n'est pas retrouvée quand JunD est surexprimé dans des MEF *Men1*^{-/-} (Agarwal *et al.*, 2003). De même, ces auteurs ont montré que JunD, exprimé dans des MEF *JunD*^{-/-}, devient promoteur de la prolifération, au lieu d'inhibiteur, lorsqu'il porte des mutations l'empêchant d'interagir avec menin. Il semblerait donc que l'interaction de menin avec JunD soit nécessaire pour que JunD se comporte en inhibiteur de la prolifération. L'importance de cette interaction *in vivo* reste encore à élucider.

D.2.c. Implication des inhibiteurs de CDK, *p27*^{Kip1} et *p18*^{INK4c}

La *et al.* ont montré que l'expression de menin dans des MEF *Men1*^{-/-} immortalisés induit un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M (La *et al.*, 2004), alors que Schnepf *et al.* ont observé une accélération du passage de la phase G0/G1 à la phase S après l'invalidation de

Men1 dans des MEF *Men1*^{F/F} (Schnepf *et al.*, 2006). Cette accélération de l'entrée en phase S est accompagnée par une augmentation de l'activité de CDK2 et une diminution de l'expression de *p27^{Kip1}* et *p18^{INK4c}*. Par ailleurs, notre équipe a montré que la réexpression de *menin* dans une lignée tumorale de cellules de Leydig déficiente pour le gène *Men1* entraîne un blocage de la transition de la phase G0/G1 vers la phase S du cycle cellulaire, accompagnée d'une augmentation de l'apoptose et de l'expression de *p27^{Kip1}* et *p18^{INK4c}* (Hussein *et al.*, 2007).

D.2.d. Les voies TGF- β et BMP

Il a été montré que *menin* interagit avec certaines protéines Smads, notamment Smad3, effecteur de la voie du TGF- β (Kaji *et al.*, 2001). Les auteurs ont aussi montré que la réduction de l'expression de *menin* par RNAi entraîne un blocage de cette voie dans des cellules antéhypophysaires de rat (GH4C1 et GH3), en bloquant la liaison du complexe Smad3/Smad4 avec l'ADN. De même, *menin* peut s'associer avec le complexe Smad1/Smad5 impliqué dans la voie BMP-2 (Sowa *et al.*, 2003). L'inactivation de *menin* dans des cellules stromales de moelle osseuse ST2 bloque l'activité transcriptionnelle médiée par Smad1 et 5.

L'inhibition de la prolifération des cellules hypophysaires de rat GH4C1 et GH3 par le TGF- β et l'activine est fortement réduite en absence de *menin* (Kaji *et al.*, 2001, Lacerte *et al.*, 2004). De la même manière, le traitement par le TGF- β inhibe la prolifération en culture primaire des cellules parathyroïdiennes issues de patients atteints d'hyperparathyroïdie non liée aux NEM1, ce qui n'est pas le cas avec les cellules parathyroïdiennes de patients NEM1, qui sont déficientes en *menin*, ou des cellules parathyroïdiennes où l'expression de *menin* est inhibée par un antisens (Sowa *et al.*, 2004b). *Menin* semble donc indispensable à la régulation négative de la prolifération cellulaire exercée par le TGF- β dans les cellules parathyroïdiennes et hypophysaires.

D.2.e. Voie Wnt/beta-caténine

Chen *et al.* ont précédemment rapporté que l'interaction de la région carboxy-terminale de *menin* avec beta-caténine et ses co-facteurs TCF3 et 4 (T-Cell specific transcription Factor) est nécessaire à l'activation d'un gène cible de la voie Wnt/beta-caténine, le gène *Axin2*, dans des cellules TGP-61 d'îlots pancréatiques de souris, via la méthylation de H3K4 sur son promoteur (Chen *et al.*, 2008). Cette activation n'a pas lieu avec des mutants de *menin*. Néanmoins, deux études plus récentes décrivent plutôt un rôle inverse de *menin* sur la voie

Wnt/beta-caténine. En effet, Yan *et al.* ont pu mettre en évidence l'interaction de menin avec la protéine scaffold IQGAP1 (IQ motif containing GTPase activating protein 1) (Yan *et al.*, 2009). Les auteurs ont montré que menin est capable d'augmenter l'interaction entre IQGAP1 et les protéines d'adhésion cellulaire E-cadhérine et beta-caténine, renforçant ainsi les adhésions intercellulaires, notamment des cellules beta pancréatiques. L'inactivation spécifique de menin dans les cellules beta chez la souris conduit à une réduction de l'accumulation de E-cadhérine et beta-caténine aux jonctions intercellulaires. L'étude de Cao *et al.* démontre aussi une interaction de menin avec beta-caténine, l'expression de menin dans des MEF *Men1*^{-/-} entraînant une diminution de l'accumulation nucléaire de beta-caténine (Cao *et al.*, 2009). Les auteurs ont observé que menin était capable de réguler la localisation subcellulaire de beta-caténine par sa capacité à faire la navette entre noyau et cytoplasme. Ces deux études suggèrent donc que l'absence de menin, notamment dans les modèles murins où le gène *Men1* est spécifiquement invalidé dans les cellules beta, mènerait à une activation de la voie Wnt/beta-caténine.

D.2.f. Menin et NF-κB (Nuclear Factor - kappa B)

Des études de co-immunoprécipitation *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que les membres de la famille de régulateurs transcriptionnels NF-κB, p50 (NF-κB1), p52 (NF-κB2) et p65 (RelA), interagissent avec menin, cette dernière étant capable d'inhiber l'activation de la transcription des gènes cibles de NF-κB dans des cellules non endocrines (Heppner *et al.*, 2001). L'effet anti-prolifératif de menin pourrait passer par l'inhibition de l'activité de NF-κB.

En outre, l'inhibition de l'expression de menin par un anti-sens dans les cellules duodénales de rat IEC-17 entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire par accélération du passage de la phase G1 à la phase S, accompagnée d'une augmentation de l'expression des cyclines D1, D3 et de Cdk4, ainsi que l'apparition d'une tumorigénicité des cellules dans des rats immunodéprimés (Ratineau *et al.*, 2004). Le blocage de la voie NF-κB dans ces cellules contrebalance les effets de l'inhibition de menin sur la diminution de la prolifération et l'augmentation de l'expression de la cycline D1 (Theillaumas *et al.*, 2008).

D.2.g. Menin et ASK (Activator of S-phase kinase)

Une interaction a été mise en évidence dans les cellules HEK293 entre l'extrémité carboxy-terminale de menin et ASK, un acteur essentiel de la prolifération cellulaire, qui joue

un rôle dans la réplication de l'ADN (Schnepp *et al.*, 2004a). L'augmentation de l'expression de ASK dans des MEF *Men1^{-/-}* induit leur prolifération, cette induction étant abolie par la réexpression de menin dans ces cellules, mais pas par des mutants de menin incapables de se lier à ASK.

D.2.h. Menin et apoptose

* Dans les cellules non endocrines

La surexpression de menin dans les MEF immortalisés conduit à l'apoptose des cellules par induction des facteurs pro-apoptotiques Bak et Bax (Schnepp *et al.*, 2004b). Les auteurs ont également montré que les cellules double knock-out *Bax^{-/-}* et *Bak^{-/-}* sont incapables d'entrer en apoptose après surexpression de menin. Ces données indiquent la nécessité des protéines Bax et Bak pour l'effet pro-apoptotique de menin, suggérant l'implication de la voie mitochondriale dans ce mécanisme.

De plus, la réexpression de menin dans des MEF *Men1^{-/-}* a mis en évidence une augmentation significative du taux d'expression et de l'activité de la caspase 8, menin étant capable de se fixer sur la région 5'UTR du gène et d'augmenter l'acétylation des histones dans cette région, permettant l'activation de la transcription (Schnepp *et al.*, 2004b, La *et al.*, 2007).

Après un traitement au diépoxybutane (DEB), un agent pontant de l'ADN, des cellules CHO où menin est surexprimée présentent une diminution de la synthèse d'ADN (Ikeo *et al.*, 2000). Cet effet n'est pas visible en conditions normales de culture, ou après traitement aux UV. Par contre, les MEF *Men1^{-/-}* complétés par la menin, mais pas par les mutants de menin, sont plus sensibles à l'apoptose après traitement aux UV ou au TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) (Schnepp *et al.*, 2004b, La *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que menin pourrait stopper la progression du cycle cellulaire et agir en tant que protéine pro-apoptotique en cas de dommages à l'ADN.

Par ailleurs, Kottemann & Bale ont très récemment montré que l'absence de menin dans les MEF *Men1^{-/-}* abolit les points de contrôle à la transition G1/S et pendant la phase S, empêchant l'arrêt du cycle cellulaire normalement induit par des radiations ionisantes (Kottemann & Bale, 2009). Ce travail suggère aussi une régulation de l'expression de *p21* par le complexe MLL/menin de manière dépendante de dommages à l'ADN, dans la mesure où *p21* n'est pas augmenté après traitement aux radiations ionisantes dans les MEF *Men1^{-/-}*. Menin serait donc impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire en cas de dommages à

l'ADN, en agissant plutôt au niveau transcriptionnel pour bloquer le cycle cellulaire, par augmentation de l'expression de p21.

* Dans les cellules endocrines

Après irradiation aux rayons γ , les cellules INS-1 sont sensibilisées à l'apoptose lorsqu'elles surexpriment menin, via l'augmentation de l'activité de la caspase 3, de l'expression de p21 et de l'acétylation de p53 (Bazzi *et al.*, 2008). De plus, menin est retrouvée au sein des complexes contenant p53, suggérant une possible interaction, physique et/ou fonctionnelle, entre ces deux protéines dans le contrôle de l'apoptose. Les auteurs ont aussi montré que deux mutations faux-sens de menin retrouvées chez les patients NEM1, ainsi que le variant A541T considéré jusqu'alors comme un polymorphisme, perdent la capacité à induire l'apoptose, évoquant un possible mécanisme de tumorigenèse liée aux NEM1.

* *In vivo*

Contrairement aux observations faites *in vitro* dans les lignées cellulaires, notre équipe a montré que l'absence de menin dans des embryons *Men1* nullizygotes à E12,5 est associée à une augmentation de l'apoptose dans le foie et dans le pancréas endocrine, touchant particulièrement les cellules alpha sécrétant le glucagon (Bertolino *et al.*, 2003a, Fontaniere *et al.*, 2008). Les mécanismes moléculaires restent encore à éclaircir.

L'ensemble de ces données démontrent le rôle crucial de menin dans l'inhibition de la prolifération cellulaire. Les mécanismes sont controversés, mais ils seraient vraisemblablement multiples (apoptose, blocage du cycle cellulaire, ou une combinaison des deux) et dépendants du type cellulaire et des conditions de vie des cellules.

D.3. Stabilité génomique et réparation de l'ADN

D.3.a. Instabilité chromosomique chez les patients NEM1

Il a été rapporté que les lymphocytes périphériques et les fibroblastes issus de patients NEM1 et traités avec du diépoxybutane (agent pontant de l'ADN) montrent une augmentation de la fréquence des altérations chromosomiques spontanées (Tomassetti *et al.*, 1995). De plus, des délétions alléliques multiples ont été retrouvées dans les tumeurs pancréatiques des patients NEM1 (Hessman *et al.*, 1999).

D.3.b. Les partenaires de menin impliqués dans la stabilité génomique et la réparation de l'ADN

* FANCD2 (Fanconi Anemia Complementation Group D2)

Menin interagit avec la protéine FANCD2, et cette interaction est augmentée en réponse à une irradiation aux rayons gamma (Jin *et al.*, 2003). FANCD2 fait partie d'une voie de réparation des dommages à l'ADN, et plus particulièrement des liaisons covalentes entre les brins d'ADN, faisant intervenir la protéine BRCA1 (Breast Cancer 1). Par contre, une étude a récemment suggéré que menin et FANCD2 seraient impliquées dans des voies de réparation de l'ADN différentes, étant donné que la comparaison des spectres de mutations chez les drosophiles mutantes pour les orthologues de menin et FANCD2 n'a montré aucune similitude et qu'aucune interaction génétique entre ces deux gènes n'a pu être mise en évidence (Marek *et al.*, 2008). La signification fonctionnelle de l'interaction entre menin et FANCD2 chez les mammifères reste donc encore à élucider.

* RPA2

Par ailleurs, la sous-unité RPA2 de 32kDa du complexe hétérotrimérique RPA (Replication Protein A) est également un partenaire de menin (Sukhodolets *et al.*, 2003). RPA se lie à l'ADN simple brin (ADNsb) et joue un rôle essentiel dans les mécanismes de réplication de l'ADN, de recombinaison homologue et de réparation par excision de nucléotide. Les auteurs ont aussi montré que la liaison à RPA2 est inhibée par plusieurs mutations faux-sens de menin retrouvées chez les patients NEM1. Menin ne semble pas avoir d'effet sur la liaison de RPA à l'ADNsb *in vitro*, et les auteurs n'ont pas pu observer de co-localisation de menin avec RPA2 au sein des foyers de réplication ou de réparation de l'ADN.

* NM23H1

De plus, menin interagit aussi avec le possible suppresseur de tumeur NM23H1 (Non metastatic protein 23) (Ohkura *et al.*, 2001). NM23H1 est membre de la famille des NDP kinases (Nucleoside Diphosphate kinases) et est capable d'activer les protéines à activité d'hydrolyse du GTP (GTPase, Guanosine Triphosphate hydrolase). Il semblerait que menin possède une activité GTPase atypique, qui est amplifiée lorsqu'elle interagit avec NM23H1 (Yaguchi *et al.*, 2002). Cette interaction pourrait avoir un rôle dans la stabilité génomique, étant donné que NM23H1 est connu pour s'associer au centrosome et maintenir l'intégrité chromosomique.

Plusieurs partenaires de menin semblent donc jouer un rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN et le maintien de l'intégrité du génome. Cependant, le rôle fonctionnel de ces interactions reste encore à éclaircir.

D.3.c. Données connues au niveau cellulaire

Les MEF *Men1*^{-/-} traités au diépoxybutane ont une survie réduite, et les analyses cytogénétiques ont montré une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques (Jin *et al.*, 2003). De plus, dans les cellules HEK293, la localisation de menin est modifiée après irradiation aux rayons γ , l'association de menin avec la matrice nucléaire étant augmentée entre 3 et 6 fois. Très récemment, Farley *et al.* ont mis en évidence dans ces mêmes cellules HEK293 une augmentation de la localisation de menin au niveau de la chromatine, après des dommages à l'ADN causés par les UV (Farley *et al.*, 2006). La caféine, un inhibiteur de la voie de réparation ATR (Ataxia-Telangiectasia and Rad3 protein), bloque cette relocalisation au niveau de la chromatine. De plus, la surexpression de la protéine CHK1 activée, un effecteur de la voie ATR, mime l'effet des UV en induisant la relocalisation de menin sur la chromatine. Ces données suggèrent donc que la localisation de menin au niveau de la chromatine après irradiation aux UV dépend de l'activation de la voie ATR/CHK1.

L'implication de menin dans les voies de réparation de l'ADN et les mécanismes assurant la stabilité génomique n'est pas totalement établie. Les mécanismes ne sont pas encore élucidés, mais certains auteurs suggèrent que menin pourrait jouer un rôle dans les voies de réparation de l'ADN par excision de nucléotide (Busygina *et al.*, 2004).

D.4. Menin régule la différenciation de nombreux types cellulaires

D.4.a. Différenciation des organes endocrines

Notre équipe a voulu déterminer l'implication de menin dans le développement du pancréas endocrine en étudiant la participation de cellules souches embryonnaires (cellules ES) *Men1*^{-/-} dans la formation de cet organe chez des souris chimères. Les données obtenues indiquent une capacité moindre des cellules déficientes en menin à participer au développement du pancréas endocrine (Fontaniere *et al.*, 2008). En effet, plus de 80% des cellules du pancréas endocrine des souris chimères sont positives pour l'expression de menin, contrairement au pancréas exocrine ou à la peau dans lesquels on observe une participation équivalente (50%-50%) des cellules *Men1*^{-/-} et *Men1*^{+/+}. Ces résultats ont été confirmés par

des cultures de bourgeons pancréatiques d'embryons *Men1*^{-/-}, présentant une altération de la structure pancréatique ainsi qu'une diminution du nombre de cellules endocrines par rapport aux bourgeons pancréatiques issus d'embryons *Men1*^{+/+}. Ce travail indique le rôle essentiel de *menin* dans le développement normal des cellules endocrines du pancréas.

Dernièrement, il a été montré que *menin* serait nécessaire à la différenciation des adipocytes, par son interaction physique et fonctionnelle avec PPAR γ (Dreijerink *et al.*, 2009b). Les auteurs ont d'ailleurs avancé l'hypothèse que l'observation fréquente de lipomes chez les patients MEN1 pourrait être une conséquence de la perte de fonction de PPAR γ suite à l'inactivation de *menin*.

D.4.b. Différenciation des lignées ostéogéniques et myogéniques

Etant donné que les embryons nullizygotes pour *Men1* présentent parfois des défauts de développement du crâne et de la face (Crabtree *et al.*, 2001), Sowa *et al.* ont émis l'hypothèse selon laquelle *menin* pourrait jouer un rôle dans l'engagement des cellules souches mésenchymateuses vers le lignage ostéoblastique et dans la différenciation ostéoblastique (Sowa *et al.*, 2003, Sowa *et al.*, 2004a). Ils ont pu montrer que l'induction par BMP-2 de la différenciation ostéoblastique de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes C3H10T1/2 et ST2 augmente l'expression de *menin*, ainsi que son interaction avec Smad1, Smad5 et Runx2, qui est une cible commune des voies de signalisation TGF- β et BMP-2, mais aussi un cofacteur transcriptionnel des Smads (Massagué *et al.*, 2005). La réduction de l'expression de *menin* par un anti-sens bloque l'activité transcriptionnelle de Smad1/5 et Runx2 et empêche la différenciation ostéoblastique induite par Runx2 (Sowa *et al.*, 2004a).

L'expression de *menin* diminue après 21 jours de culture dans les cellules MC3T3-E1, modèle d'étude de la deuxième vague de différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures, soit pendant la période de minéralisation. L'inhibition de *menin* par antisens dans ces cellules conduit à une augmentation de l'expression de COL1, de l'OCN et de l'activité ALP, donc à la stimulation de la différenciation ostéoblastique et de la minéralisation (Sowa *et al.*, 2003). Les auteurs ont ainsi montré que *menin* interagit physiquement, mais pas fonctionnellement, avec les Smad1/5 et Runx2 dans les ostéoblastes différenciés, contrairement à ce qu'il se passe dans les cellules souches mésenchymateuses (Sowa *et al.*, 2004a). Par contre, dans ces mêmes cellules MC3T3-E1, *menin* interagit physiquement et fonctionnellement avec Smad3, cette interaction inhibant la voie de signalisation BMP-2/Runx2 et donc la maturation ostéoblastique. Une étude plus récente a montré que la

surexpression de JunD dans les cellules MC3T3-E1 induit l'augmentation de l'expression de COL1, OCN, Runx2, de l'activité ALP et de la minéralisation, tandis que la surexpression de menin inhibe cette augmentation de l'activité ALP (Naito *et al.*, 2005). Ces données suggèrent que menin pourrait bloquer la maturation des ostéoblastes en partie en inhibant la différenciation induite par JunD.

Récemment, une étude a montré que le niveau d'expression de menin dans les cellules souches mésenchymateuses serait un facteur clé de l'engagement des cellules vers les lignages ostéogéniques ou myogéniques (Aziz *et al.*, 2009). En effet, l'expression de menin est diminuée dans les cellules C3H10T1/2 au moment de l'induction de la différenciation musculaire, le maintien forcé de son expression inhibant cette différenciation. La diminution de l'expression de menin par RNAi accélère la différenciation myogénique, tandis qu'elle inhibe la différenciation ostéogénique induite par la voie BMP.

Il semble donc que le niveau d'expression de menin dans les cellules souches mésenchymateuses joue un rôle déterminant dans l'engagement vers la différenciation ostéogénique ou myogénique, en modulant la capacité des cellules de répondre aux stimulations par TGF- β et BMP. L'expression de menin est nécessaire à l'engagement des cellules souches mésenchymateuses dans la différenciation ostéoblastique jusqu'au stade pré-ostéoblaste, au sein de la voie faisant intervenir BMP-2, Smad1/5 et Runx2. L'absence de menin à ce stade engage les cellules vers le lignage musculaire. Menin inhiberait ensuite la différenciation plus tardive de ces pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures, via la voie TGF- β et Smad3. L'ensemble des données concernant l'implication de menin dans la différenciation ostéogénique et myogénique est schématisé dans la figure 2.

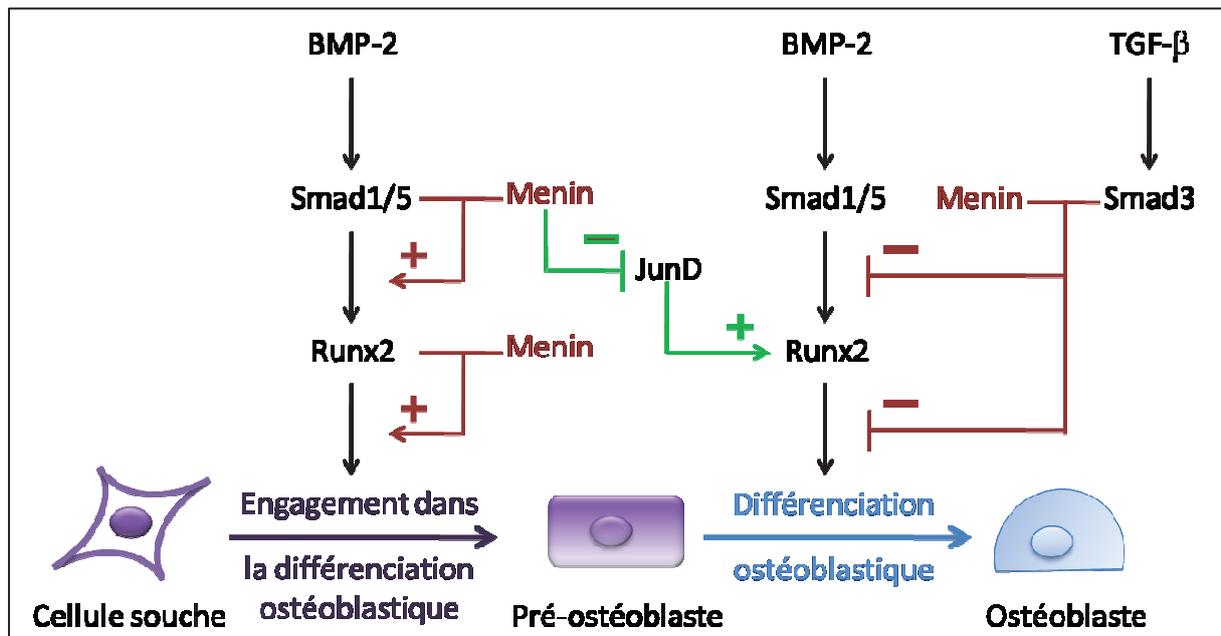
D.4.c. Différenciation des lignées hématopoïétiques

* Au cours du développement embryonnaire

Les embryons *Men1*^{-/-} ne sont pas viables et présentent des défauts d'organogenèse, notamment du foie (Bertolino *et al.*, 2003a). Des études de chimérisme réalisées dans notre équipe ont montré que, dans les embryons à E18.5, les cellules *Men1*^{-/-} sont incapables de participer au développement des organes hématopoïétiques fœtaux, le foie et le thymus. De plus, l'analyse de la formation de corps embryoïdes (EB) à partir de cellules souches embryonnaires (ES), technique permettant de récapituler *in vitro* certaines caractéristiques de l'embryogenèse précoce comme le processus d'hémoglobulinisation, a permis de montrer que

Figure 2 : Représentation schématique de l'implication de menin dans la différenciation des ostéoblastes.

Menin permet l'engagement initial des cellules souches vers les pré-ostéoblastes, de par son interaction avec Smad1/5 et Runx2. Au contraire, l'interaction de menin avec Smad3 inhibe la différenciation terminale des ostéoblastes, en régulant négativement la cascade BMP-2/Runx2. De plus, menin inhibe également les actions de JunD sur la différenciation tardive des ostéoblastes (d'après Hendy *et al.* 2005).



les cellules ES *Men1*^{-/-} forment des EB plus petits et moins nombreux, qui ne sont pas hémoglobulinisés par rapport aux cellules ES *Men1*^{+/+} (Bertolino *et al.*, 2003a). La réexpression de menin dans des cellules ES *Men1*^{-/-} restaure leur capacité à former des EB identiques aux contrôles. Ces données indiquent que menin est directement impliquée dans les processus de différenciation hématopoïétique dans le foie fœtal.

* A l'âge adulte

A travers l'étude d'un modèle de souris knock-out conditionnel inductible, où le gène *Men1* peut être invalidé à l'âge adulte dans tout l'organisme après traitement au tamoxifène, Chen *et al.* ont mis en évidence une diminution du nombre des cellules sanguines issues des trois lignages hématopoïétiques, indiquant un rôle de menin dans les progéniteurs hématopoïétiques communs (Chen *et al.*, 2006, Maillard *et al.*, 2009). Ce modèle murin est développé dans le paragraphe E.2.d. L'excision de *Men1* *in vivo* ou *in vitro* dans des cultures primaires de moelle osseuse conduit à une diminution de l'expression de *HoxA9*, *A7*, *C6* et *C8*, ainsi qu'à une réduction du nombre de colonies formées (Chen *et al.*, 2006). La réexpression de menin dans ces cellules de moelle osseuse restaure un phénotype normal. Menin semble donc impliquée dans la différenciation des lignages hématopoïétiques, de par son rôle dans la régulation des gènes *Hox*, dont *HoxA9* (voir D.1.a.1). Dans le compartiment hématopoïétique, l'absence de MLL est associée à une expansion réduite des progéniteurs et à une diminution de l'expression des gènes *Hox*. Par contre, des progéniteurs myéloïdes collectés à partir de moelle osseuse peuvent être transformés par des oncoprotéines de fusion MLL et surexpriment alors le gène *HoxA9*. De façon surprenante, une oncoprotéine MLL incapable de se lier à menin perd sa capacité transformante. En outre, l'inhibition de l'expression de menin dans des cellules myéloïdes transformées par MLL entraîne la perte du phénotype transformé et la réduction de l'expression de *HoxA9*, les cellules étant incapables de maintenir leur statut indifférencié (Chen *et al.*, 2006). Yokoyama *et al.* ont aussi montré que la menin semble nécessaire à la fois pour l'initiation et le maintien de la transformation par les oncoprotéines de fusion MLL (Yokoyama *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces données montre le rôle essentiel de menin dans l'hématopoïèse, et plus particulièrement dans les progéniteurs hématopoïétiques.

Menin semble avoir des rôles divers et variés, dont le plus clair est son rôle majeur dans la régulation de la transcription. De nombreux partenaires lui ont été attribués, les études

cellulaires les concernant ne permettant pas encore de comprendre le rôle de menin dans la tumorigenèse liée aux NEM1. Si la fonction de suppresseur de tumeur de menin est bien connue dans les tissus endocrines, la protéine semblerait avoir plutôt un rôle de type oncogénique dans les lignées myéloïdes, sa présence étant nécessaire à la transformation par les protéines de fusion MLL responsables de certaines leucémies. Menin pourrait donc avoir des fonctions différentes suivant le type cellulaire considéré.

E. Renseignements tirés des modèles murins

Plusieurs modèles murins ont été établis à ce jour afin d'étudier plus en détails les conséquences fonctionnelles de l'inactivation du gène *Men1*, et permettre de comprendre les mécanismes conduisant au développement tumoral dans la pathologie NEM1.

E.1. Les modèles *Men1* knock-out classique

Trois modèles de souris knock-out classique pour le gène *Men1* ont été générés à ce jour, par un groupe du NIH aux Etats-Unis en délétant les exons 3 à 8 (Crabtree *et al.*, 2001), par le groupe dont je fais partie par délétion de l'exon 3 (Bertolino *et al.*, 2003a, Bertolino *et al.*, 2003b), et récemment par un groupe australien en délétant l'exon 2 (Loffler *et al.*, 2007).

E.1.a. Souris nullizygotes

Les souris nullizygotes pour le gène *Men1* meurent au cours du développement embryonnaire à mi-gestation, entre 11.5 et 13.5 jours après la fécondation. Les embryons *Men1*^{-/-} sont de plus petite taille que les embryons sauvages et présentent fréquemment des hémorragies et des oedèmes, une fermeture anormale du tube neural (30% des embryons), ainsi que des défauts dans l'organogenèse du foie et du cœur (Bertolino *et al.*, 2003a), et 20% souffrent d'anomalies du développement crânial et/ou facial (Crabtree *et al.*, 2001). Ces données indiquent le rôle essentiel du gène *Men1* dans le développement embryonnaire, plus particulièrement dans la différenciation osseuse et hématopoïétique (voir D.4.b et D.4.c).

L'étude de ces souris nullizygotes a aussi permis à notre équipe de montrer que menin est essentielle à la survie et au développement des cellules endocrines pancréatiques très tôt dans le développement embryonnaire (Fontaniere *et al.*, 2008).

E.1.b. Souris hétérozygotes

Les souris hétérozygotes pour *Men1* développent un spectre tumoral proche de la pathologie humaine (Crabtree *et al.*, 2001, Bertolino *et al.*, 2003b, Loffler *et al.*, 2007) et sont de ce fait un bon modèle pour l'étude des mécanismes mis en place suite à l'inactivation du gène chez les patients NEM1. Un an après la naissance, les souris *Men1*^{+/-} développent des tumeurs endocrines multiples avec une très forte pénétrance, telles que des adénomes des glandes parathyroïdes et des îlots pancréatiques, ainsi que des tumeurs de l'hypophyse et des glandes corticosurrénales. Toutes ces tumeurs présentent une perte totale ou partielle du gène *Men1*. Les souris *Men1*^{+/-} générées par notre groupe et l'équipe australienne développent, en plus du spectre de tumeurs observé chez les patients NEM1, des tumeurs très agressives des cellules interstitielles de l'ovaire (cellules de la granulosa) et du testicule (cellules de Leydig) avec une forte incidence (Bertolino *et al.*, 2003b, Loffler *et al.*, 2007). Des carcinomes des glandes mammaires ont aussi été rapportés chez 3 souris hétérozygotes sur 36 ayant plus de 18 mois (Bertolino *et al.*, 2003b), ainsi qu'un carcinome prostatique (Crabtree *et al.*, 2001).

Notre équipe a d'ailleurs pu montrer que l'inactivation de *menin* observée dans les tumeurs de Leydig conduit à l'altération des voies de signalisation AMH/BMP et TGF- β , se traduisant par une diminution de l'expression du récepteur de type 2 de l'AMH (AMHR2) et des Smads 1, 5, 3 et 4, ainsi qu'à l'altération de l'expression des cibles de ces voies avec la diminution de *p18* et *p27*, et l'augmentation de *Cdk4* (Hussein *et al.*, 2008). Il faut noter que les souris *p18*^{-/-}: *p27*^{-/-} développent un spectre de tumeurs endocrines identique aux souris hétérozygotes pour *Men1* (Franklin *et al.*, 2000). Par ailleurs, deux études ont pu récemment montrer que l'inactivation homozygote de *p18*, mais pas celle de *p27*, chez les souris *Men1*^{+/-} entraîne une accélération du développement des tumeurs observées chez ces souris (Bai *et al.*, 2007, Pei *et al.*, 2007), et de la tumorigenèse pulmonaire (Pei *et al.*, 2007). Ces données suggèrent donc une collaboration entre *Men1* et *p18* dans la tumorigenèse des tissus endocrines.

E.2. Les modèles *Men1* knock-out conditionnel

Pour pallier à l'hétérogénéité des tumeurs développées par les souris *Men1*^{+/-} et afin d'étudier les conséquences directes de l'inactivation du gène *Men1* au sein d'un tissu et d'un type cellulaire particulier, des modèles de knock-out conditionnel ciblant spécifiquement les organes endocrines affectés dans la pathologie NEM1 ont été générés par plusieurs équipes.

Des souris porteuses de deux allèles dits « floxés » du gène *Men1* (*Men1^{F/F}*) ont ainsi été croisées avec des souris porteuses de transgènes exprimant l'enzyme Cre recombinase (Cre, Causes recombination) sous le contrôle de différents promoteurs.

E.2.a. Invalidation de *Men1* dans les cellules beta du pancréas endocrine

Les souris *Men1^{F/F}-RipCre⁺* expriment la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de l'insuline de rat (Rip, Rat insulin promoter). L'excision au niveau des sites *loxP* encadrant l'exon 3 (Bertolino *et al.*, 2003c), les exons 3 à 8 (Crabtree *et al.*, 2003) ou l'exon 2 (Biondi *et al.*, 2004) sur l'allèle *Men1* « floxé » a ainsi été réalisée dans les cellules beta des îlots pancréatiques. Les analyses histologiques ont mis en évidence des hyperplasies ou dysplasies de la majorité des îlots chez les souris *Men1^{F/F}-RipCre⁺* à 4 mois, 40% d'adénomes à 6 mois et une pénétrance complète d'insulinomes à 10 mois (Bertolino *et al.*, 2003c). Parallèlement, une perturbation de la sécrétion d'insuline est détectée à 6 mois, suivie d'une hypoglycémie à 10 mois. Des résultats similaires ont été obtenus plus tard par d'autres laboratoires (Crabtree *et al.*, 2003, Biondi *et al.*, 2004). Ces données constituent une preuve directe du rôle de suppresseur de tumeur du gène *Men1* dans les cellules beta des îlots pancréatiques.

E.2.b. Invalidation de *Men1* dans les cellules des glandes parathyroïdes

Dans le modèle de Libutti *et al.*, la Cre recombinase est exprimée sous le contrôle du promoteur de l'hormone parathyroïdienne humaine (PTH). Dès 7 mois, ces souris développent une hypercalcémie, ainsi qu'une hypertrophie des glandes parathyroïdes, avec une augmentation de la taille et du nombre des cellules (Libutti *et al.*, 2003). Ces souris présentent les signes d'une hyperparathyroïdie primaire, dont les données cliniques sont très similaires à celles observées chez les patients atteints d'HPT.

E.2.c. Invalidation de *Men1* dans les cellules hypophysaires

Les modèles de souris knock-out conditionnel de *Men1* dans les cellules beta pancréatiques établis par les équipes australiennes et américaines (Crabtree *et al.*, 2003, Biondi *et al.*, 2004) présentent en plus une fuite de l'expression du transgène *RipCre*, et donc une invalidation de *Men1*, dans la partie distale de l'hypophyse antérieure (*pars distalis*), entraînant le développement de tumeurs hypophysaires de type prolactinomes.

E.2.d. Invalidation de *Men1* dans les organes non endocrines

- Foie

Dans des souris *Men1^{F/F}* porteuses d'un transgène où la Cre recombinase est sous le contrôle du promoteur de l'albumine, l'inactivation homozygote du gène *Men1* dans les cellules du foie (hépatocytes), tissu non affecté par la pathologie NEM1, n'entraîne ni phénotype tumoral ni anomalie de développement de ce tissu (Scacheri *et al.*, 2004). Ce travail infirme une des hypothèses avancées pour expliquer la spécificité tissulaire des atteintes de la pathologie NEM1, hypothèse selon laquelle la perte d'hétérozygotie pour *MEN1* n'aurait lieu que dans les organes affectés par la pathologie. Or le travail de Scacheri *et al.* démontre clairement que la perte d'hétérozygotie n'entraîne le développement de tumeur que si le gène joue un rôle onco-suppressif critique dans ce tissu.

- Cellules hématopoïétiques

Des souris *Men1^{F/F}* ont été croisées avec d'autres souris porteuses d'un transgène CreERT2 sous le contrôle du promoteur ubiquitaire UBC9, exprimant la Cre recombinase de façon inducible après traitement au tamoxifène (Chen *et al.*, 2006, Maillard *et al.*, 2009). Une ingestion orale du tamoxifène chez les souris *Men1^{F/F}*-CreER pendant 12 semaines entraîne une inactivation du gène *Men1* dans tout l'organisme, mais les auteurs se sont focalisés sur le devenir des cellules sanguines. Ils ont ainsi démontré que l'inactivation de *Men1* conduit à une diminution du nombre de cellules des trois lignages hématopoïétiques (érythroïde, lymphoïde et myéloïde) alors que ceux-ci sont inchangés chez les souris *Men1^{+/+}*-CreER traitées au tamoxifène. Les auteurs ont établi que seul le lignage lymphoïde est sensible à l'absence de menin en conditions normales, alors que les cellules souches hématopoïétiques requièrent l'expression de menin uniquement en conditions de régénération hématopoïétique après un stress d'irradiation ou une transplantation de moëlle osseuse (Maillard *et al.*, 2009). Ces travaux indiquent le rôle important de *Men1* dans les cellules souches hématopoïétiques, pour le maintien du nombre normal de cellules sanguines chez les souris.

E.2.e. Menin et prolifération adaptative des cellules beta pancréatiques pendant la gestation

Chez les rongeurs, les cellules beta pancréatiques endocrines subissent une phase de prolifération adaptative intense au moment de la gestation, afin de s'adapter aux besoins métaboliques accrus de l'organisme, surtout en insuline, pendant cette période. Karnik *et al.*

ont pu observer chez des souris femelles C57BL/6 gestantes une augmentation de la prolifération des cellules beta pancréatiques pendant les 15 premiers jours de gestation, associée avec une diminution de l'expression de menin dans ces cellules, réapparaissant une semaine après la naissance des petits (Karnik *et al.*, 2007). La diminution de l'expression de p18 et p27 dans les îlots pancréatiques accompagne la réduction de l'expression de menin. En générant des souris transgéniques surexprimant menin dans les cellules beta, les auteurs ont pu montrer que la surexpression de menin empêche la prolifération adaptative des cellules beta lors de la gestation, ainsi que la diminution de p18 et p27, et conduit au développement d'un diabète gestationnel chez les souris à cause de l'insuffisance de la sécrétion d'insuline. Menin jouerait donc un rôle de régulateur physiologique de la prolifération adaptative des cellules beta du pancréas endocrine durant la gestation, sous l'effet de la prolactine et de la progestérone.

A ce jour, de nombreux modèles murins et lignées cellulaires dérivées, comme les MEF ou les cellules issues de tumeurs, ont été établis pour mieux comprendre le rôle biologique du gène Men1, ainsi que les conséquences de son inactivation dans la pathologie NEM1. Tous ces outils ont permis de donner la preuve génétique de l'implication du gène MEN1 dans cette pathologie humaine, mais aussi de lever le voile sur une partie des mécanismes moléculaires qui, suite à l'inactivation du gène, conduisent au développement tumoral.

II. LES TISSUS HORMONO-DÉPENDANTS

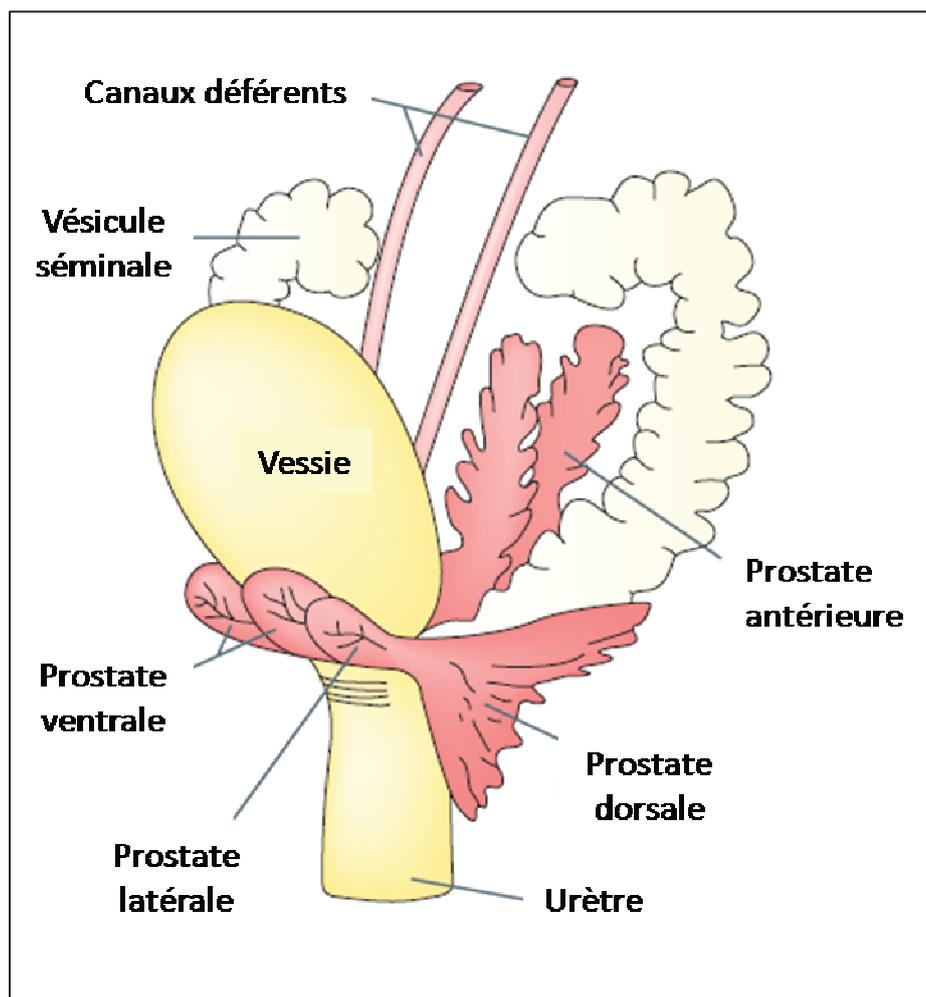
La glande prostatique et les glandes mammaires font partie des tissus hormono-dépendants, leur développement et leur physiologie dépendant entièrement de l'action des hormones sexuelles stéroïdiennes, comme les androgènes, les œstrogènes ou la progestérone, mais aussi, dans une moindre mesure, d'hormones protéiques telles que la prolactine.

A. Structure et physiologie de la prostate et des glandes mammaires

A.1. La prostate

La glande prostatique fait partie de l'appareil génital mâle. Chez la souris, elle se présente sous la forme d'une structure irrégulière multilobée, une partie entourant l'urètre à la base de

Figure 3 : Anatomie générale de la glande prostatique chez la souris (d'après Ahmad *et al.* 2008). La prostate entoure l'urètre, à la base de la vessie, et est divisée en quatre lobes distincts : prostate antérieure, dorsale, ventrale et latérale. Les canaux déférents, véhiculant les spermatozoïdes produits au niveau des testicules, reçoivent les sécrétions prostatiques venant des canaux collecteurs terminaux de la prostate, puis se terminent à la face postérieure de l'urètre.



la vessie (Shappell *et al.*, 2004). Elle est divisée en quatre lobes distincts reconnaissables histologiquement (Figure 3) :

- la prostate antérieure ou glande coagulatrice (AP, Anterior Prostate), qui est étroitement apposée le long de la courbure intérieure de la vésicule séminale. Son épithélium cuboïdal présente de nombreuses et longues invaginations (fort degré d'invagination), lui conférant un aspect papillaire et cribriforme.
- la prostate ventrale (VP, Ventral Prostate), dont l'épithélium plat forme de temps en temps des « touffes » ou des invaginations.
- la prostate dorsale (DP, Dorsal Prostate), dont les glandes sont délimitées par un épithélium simple à cellules cylindriques, occasionnellement légèrement stratifié et organisé en « touffes », avec un degré d'invagination modéré.
- la prostate latérale (LP, Lateral Prostate), qui possède un épithélium cuboïdal plus plat et ayant un degré d'invagination plus faible que la DP.

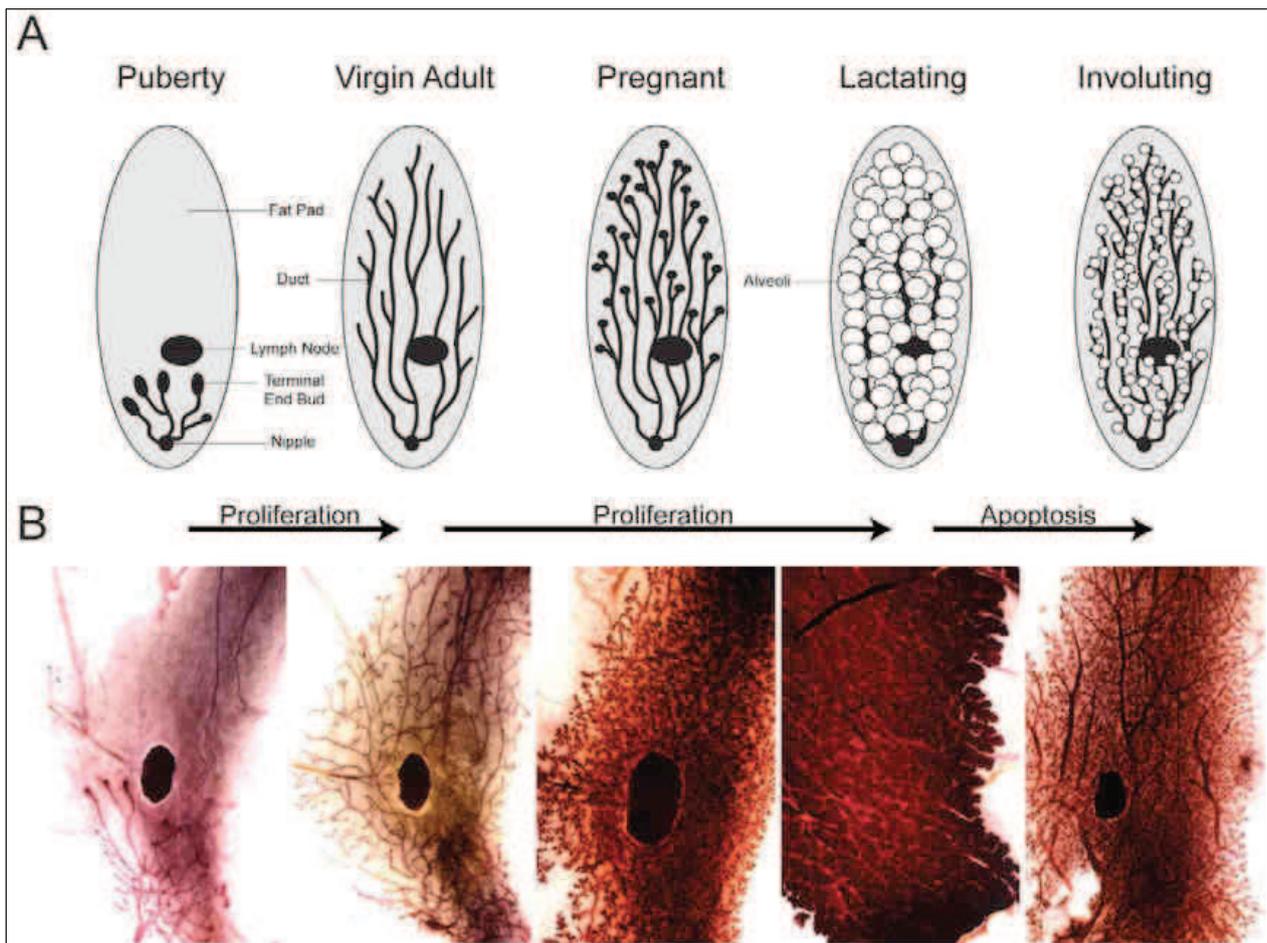
Le lobe dorsal et le lobe latéral sont souvent réunis sous le terme de prostate dorso-latérale (DLP, Dorso-Lateral Prostate).

La composition cellulaire est identique dans les quatre lobes. Les cellules luminales, bordant la lumière des glandes, sécrètent un matériel protéique et enzymatique qui entre dans la composition du sperme. Cette sécrétion se fait en réponse à une stimulation hormonale, essentiellement androgénique, et va participer à la survie et à la mobilité des spermatozoïdes. Les cellules basales forment une couche discontinue chez la souris, entourant chaque glande. La fonction de ces cellules dotées de capacités contractiles est d'assurer l'évacuation des sécrétions vers les canaux excréteurs qui s'ouvrent dans l'urètre. Les cellules neuroendocrines (<0.3% des cellules prostatiques) sécrètent la sérotonine, ainsi qu'une variété d'hormones peptidiques (Di Sant'Agnesse, 1998). Elles réguleraient l'activité et l'homéostasie des cellules basales et sécrétoires.

A.2. Les glandes mammaires

Les souris femelles possèdent cinq paires de glandes mammaires, trois dans la région cervico-thoracique et deux dans la région inguino-abdominale. Elles se composent toutes d'une masse de tissu adipeux servant de support à un réseau de glandes tubulo-alvéolaires. Les différents stades de développement pré- et post-pubertaire des glandes mammaires chez la souris sont présentés dans la figure 4 (Andrechek *et al.*, 2008). Avant la puberté (2 mois chez la souris), le tissu adipeux est le composant majeur des glandes, quelques canaux lactifères

Figure 4 : Stades de développement pré- et post-pubertaire des glandes mammaires chez la souris. (A) Schéma illustrant le développement des glandes mammaires chez la souris. Chaque stade est accompagné par (B) la photo d'une glande mammaire au stade correspondant colorée par la technique de whole-mount. Le développement des glandes mammaires est associé à une forte prolifération cellulaire à partir de la puberté et lors de la gestation. Le processus d'involution met en œuvre une apoptose massive des cellules sécrétrices des glandes (tiré de Andrechek *et al.*, 2008).



ayant peu de ramifications sont visibles. A la puberté, de nombreuses stimulations hormonales (œstrogènes et progestérone principalement) vont accroître la prolifération et la ramification des canaux pré-existants, accompagnées de la formation de quelques alvéoles sécrétantes (Cardiff *et al.*, 2000, Richert *et al.*, 2000). Le développement lobulo-alvéolaire complet n'est observé qu'en périodes de gestation et de lactation, essentiellement sous l'effet de l'hormone prolactine. Pendant la gestation (environ 20-21 jours chez la souris), les glandes vont subir une prolifération massive, donnant naissance à de nombreuses ramifications des canaux principaux et alvéoles. Les cellules épithéliales de ces alvéoles vont se différencier progressivement en cellules sécrétrices dès la fin de la gestation, puis sécréter les composants du lait pendant toute la lactation. Au sevrage des petits, l'arrêt du stimulus de succion va provoquer l'involution des glandes, un processus faisant intervenir une apoptose massive des cellules sécrétrices et permettant le retour des glandes à un état de repos.

L'épithélium mammaire comporte deux types de cellules. Les cellules épithéliales luminales, qui sont les cellules sécrétrices des composants du lait, sont en contact direct avec la lumière centrale des canaux et des alvéoles. Les cellules épithéliales basales sont situées entre la couche des cellules luminales et la membrane basale, et sont aussi appelées cellules myoépithéliales, car elles assurent l'évacuation du lait par leur activité contractile.

B. Notions d'histopathologie des tissus hormono-dépendants chez la souris

La classification des lésions pré-cancéreuses et cancéreuses diffère entre l'humain et la souris. Afin d'homogénéiser la classification des lésions mammaires et prostatiques observées chez les souris génétiquement modifiées, jusqu'alors éclectique et soumise à l'appréciation personnelle de chaque pathologiste, différents consensus ont été mis en place, définissant des critères et recommandations pour l'identification de chaque type de lésion (Cardiff *et al.*, 2000, Shappell *et al.*, 2004).

B.1. Classification des lésions mammaires (Cardiff *et al.*, 2000)

L'hyperplasie mammaire est définie comme une augmentation du nombre de cellules épithéliales, qui forment alors plus que les deux couches observées dans l'épithélium normal, la morphologie des cellules restant normale. Les hyperplasies sont fréquemment observées et sont considérées comme bénignes.

Les lésions mammaires considérées comme pré-cancéreuses sont appelées néoplasies intraépithéliales mammaires (mammary intraepithelial neoplasia ou MIN), sans distinction de leur origine plutôt ductale ou alvéolaire. Les carcinomes *in situ* sont aussi inclus dans cette appellation de MIN. Les MIN sont des lésions formées par la prolifération intra-luminale de cellules ayant une morphologie atypique, caractérisées par des atypies (anomalies) nucléaires et l'occurrence de mitoses.

Les carcinomes mammaires sont caractérisés principalement par un potentiel invasif, un plus grand nombre de mitoses et des atypies nucléaires plus prononcées. Ils sont en général identifiés selon leur degré de différenciation (bien/peu différenciés), selon leur apparence (cribriforme, solide, papillaire, ...) ou selon le type des cellules qui les composent. Ils peuvent notamment être glandulaires lorsqu'ils sont composés de glandes (adénocarcinomes), ou bien squameux lorsque la partie glandulaire est associée à des zones métaplasiques de différenciation squameuse produisant de la kératine (carcinomes adéno-squameux).

B.2. Classification des lésions prostatiques (Shappell *et al.*, 2004)

De la même façon que dans les glandes mammaires, l'hyperplasie de l'épithélium prostatique est une prolifération de cellules épithéliales sans atypies nucléaires et est considérée comme bénigne.

L'équivalent des MIN pour la prostate est appelé néoplasie intraépithéliale prostatique, ou mPIN (murine prostatic intraepithelial neoplasia), et se caractérise aussi par une prolifération de cellules présentant des atypies nucléaires et des mitoses.

Les carcinomes prostatiques sont également distingués par leur potentiel invasif et selon leur degré de différenciation ainsi que leur composition cellulaire (glandulaire pour les adénocarcinomes, squameuse, neuro-endocrine, ...).

C. Les modèles de tumorigénèse des tissus hormono-dépendants chez la souris

Une quantité impressionnante de modèles de souris génétiquement modifiées a été générée ces dix dernières années. Cependant, le nombre de modèles pour la tumorigénèse mammaire est beaucoup plus conséquent que pour celle des glandes prostatiques. Il m'est impossible de faire une liste exhaustive de tous les modèles existants dans ce manuscrit, j'ai donc choisi de ne mentionner que les gènes dont l'implication dans la tumorigénèse des tissus hormono-dépendants est la mieux documentée, ou qui pourraient avoir un lien avec un rôle

éventuel de *menin* dans ces tissus. Les phénotypes développés par les différents modèles murins sont résumés dans le tableau 3 pour les modèles de tumorigenèse mammaire et dans le tableau 4 pour les modèles prostatiques.

C.1. Les gènes *Brcal/2* et la prédisposition aux tumeurs mammaires

Les gènes suppresseurs de tumeurs *BRCA1* et *BRCA2* (breast cancer 1/2) ont été identifiés comme des gènes majeurs de prédisposition au cancer du sein chez la femme (Narod & Foulkes, 2004). Plusieurs modèles d'inactivation de ces gènes chez la souris développent des tumeurs mammaires. Les souris présentant deux allèles hypomorphiques de *Brcal* (*Brcal*^{Tr/Tr}), par insertion de 50 pb dans l'exon 11, développent une faible incidence de tumeurs mammaires (12 souris sur 76, avec 9 carcinomes invasifs et 3 carcinomes *in situ*) avec une latence assez longue (en moyenne 15 mois) (Ludwig *et al.*, 2001a). Des observations similaires ont été faites en délétant l'exon 11 spécifiquement dans les cellules mammaires en exprimant la Cre recombinase sous le contrôle des promoteurs *Wap* (whey acidic protein) ou *MMTV-LTR* (mouse mammary tumour virus-long terminal repeat), menant au développement de tumeurs mammaires, dont une majorité d'adénocarcinomes, dans 25% des souris mutantes suivies sur une période de deux ans (Brodie *et al.*, 2001). L'introduction chez ces souris d'un allèle muté du gène *p53* accélère le développement et augmente l'incidence des tumeurs mammaires (50% des souris à 8 mois, pratiquement 100% à 15 mois), la majorité des tumeurs présentant une perte de l'allèle sauvage de *p53*. Une autre étude similaire, délétant les exons de *Brcal* codant la région C-terminale de la protéine en utilisant le promoteur *BLG* (beta lactoglobuline), a aussi observé cette accélération de la tumorigenèse dans un contexte hétérozygote pour *p53* (McCarthy *et al.*, 2007), de même que lors de l'inactivation simultanée de *Brcal* et *p53* à l'aide du promoteur *K14* (kératine 14) (Liu *et al.*, 2007). Les tumeurs mammaires observées dans tous ces modèles murins, essentiellement des carcinomes, sont en majorité négatives pour l'expression du récepteur aux œstrogènes (ER), de types histologiques très variés, et présentent un profil moléculaire de type basal, avec l'expression de marqueurs des cellules basales de l'épithélium, reflétant ainsi les observations faites dans les cancers du seins humains liés à *BRCA1* (Brodie *et al.*, 2001, Ludwig *et al.*, 2001a, Liu *et al.*, 2007, McCarthy *et al.*, 2007). Cette diversité suggère que la perte de *Brcal* mènerait à des altérations génétiques aléatoires, expliquant les différents types histologiques développés.

Parmi les modèles d'inactivation conditionnelle de *Brcal2* dans les glandes mammaires, celui de Ludwig *et al.* possède la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur *Wap*

Tableau 3 : Résumé des phénotypes des principaux modèles murins de tumorigenèse mammaire. Pour certains modèles, les détails sur la nature (MIN ou carcinomes), l'incidence ou l'âge moyen d'apparition des lésions n'étant pas toujours clairement précisés, ils ont été extrapolés d'après les données présentées.

Transgène ou knock-out	Age moyen d'apparition des lésions	Incidence MIN	Incidence carcinomes	Références
<i>Brcal^{tr/tr}</i> (Tr: allèle hypomorphique)	15 mois	3/76 (3.9%)	9/76 (11.8%)	Ludwig <i>et al.</i> , 2001a
<i>MMTV-Cre;Brcal^{Co/Co}</i> <i>WAP-Cre;Brcal^{Co/Co}</i>	>24 mois	35/150 (25%), pas de détails sur les types de tumeurs		Brodie <i>et al.</i> , 2001
<i>MMTV-Cre;Brcal^{Co/Co};p53^{+/-}</i>	8 mois	50/56 (89%)		
<i>BLG-Cre;Brcal^{F22-24/F22-24};p53^{+/-}</i> <i>BLG-Cre;Brcal^{F22-24/F22-24};p53^{+/-}</i>	12-15 mois 1.5-10 mois	-	5/43 (12%) 25/39 (64%)	McCarthy <i>et al.</i> , 2007
<i>K14-Cre;Brcal^{F/F}</i> <i>K14-Cre;p53^{F/F}</i> <i>K14-Cre;Brcal^{F/F};p53^{F/F}</i>	- 9-10 mois 7 mois	-	0/11 (suivi sur plus de 2 ans) 20/32 (63%) 40/50 (80%)	Liu <i>et al.</i> , 2007
<i>WAP-Cre;Brcal^{flax/-}</i>	17 mois	-	20/26 (77%)	Ludwig <i>et al.</i> , 2001b
<i>MMTV-Cre;Brcal^{fl9-10/fl9-10}</i> <i>MMTV Cre;Brcal^{fl9-10/fl9-10};p53^{+/-}</i>	18 mois 10 mois	-	4/6 (67%) 14/15 (93%)	Cheung <i>et al.</i> , 2004
<i>K14-Cre;Brcal^{F11/F11};p53^{F2-10/F2-10}</i>	6 mois	-	77%	Jonkers <i>et al.</i> , 2001
<i>p53^{+/-}</i> ou <i>p53^{-/-}</i> (129/Sv ou C57BL/6x129/Sv)	?	-	<1%	Donahower <i>et al.</i> , 1995
<i>p53^{+/-}</i> (Balb/c) <i>p53^{-/-}</i> (Balb/c)	? 8-14 mois	- 45% (hyperplasies)	1/85 (1%) 55%	Kuperwasser <i>et al.</i> , 2000
Transplantation épithélium mammaire Balb/c p53 ^{-/-} dans hôte Balb/c p53 ^{+/+}	Nullipares: 11 mois Multipares: 10 mois	-	Nullipares: 16/26 (62%) Multipares: 19/28 (68%)	Jerry <i>et al.</i> , 2000
<i>MMTV-Cre;p53^{F/F}</i> <i>WAP-Cre;p53^{F/F}</i>	10-17 mois 15.5 mois	-	47-60% 92%	Lin <i>et al.</i> , 2004
<i>K14Cre;Trp53^{F/F}</i> <i>K14Cre;Cdh1^{F/F};Trp53^{F/F}</i>	11 mois 7 mois	-	17/25 (68%) 22/37 (59%), la moitié invasifs	Derksen <i>et al.</i> , 2006
<i>MMTV-ΔN89b-caténine</i>	4-7 mois	-	100%	Imbert <i>et al.</i> , 2001
<i>MMTV-ΔN90b-caténine</i>	11 mois	-	8 mois: 40%, 15 mois: 70%	Michaelson & Leder, 2001
<i>WAP-Cre;Catnb^{+/Δex3}</i> <i>MMTV-Cre;Catnb^{+/Δex3}</i>	-	Pas de tumeur (suivi sur 5 mois seulement), uniquement métaplasie squameuse et transdifférenciation dès 2 mois		Miyoshi <i>et al.</i> , 2002b
<i>MMTV-Wnt10b</i>	3.4 mois	-	50-100%	Lane & Leder, 1997
<i>MMTV-CK2</i>	23 mois	7/27 (26%): métaplasie squameuse (2-12 mois)	18/56 (30%)	Landesman-Bollag <i>et al.</i> , 2001
<i>MMTV-Int-2/Fgf-3</i>	10 mois	1/14 (7%) (hyperplasie)	13/14 (93%)	Lee <i>et al.</i> , 1995
<i>MMTV-CyclinD1</i>	18 mois	-	8/12 (67%)	Wang <i>et al.</i> , 1994
<i>dnGSK3β</i>	22 mois	-	62%	Farago <i>et al.</i> , 2005
<i>Apc^{+/-Δ572T}</i>	4-8 mois	-	85-100%	Gaspar <i>et al.</i> , 2009
<i>BLG-cre;Apc^{lox/lox}</i>	-	100% métaplasie squameuse, sans progression néoplasique		Gallagher <i>et al.</i> , 2002
<i>K14-cre;Apc^{QD/+}</i> <i>WAP-cre;Apc^{QD/+}</i> ou <i>QD/QD</i>	15 mois 18 mois	-	13/17 (76.5%) 10-16.7%	Kuraguchi <i>et al.</i> , 2009
<i>Pten^{+/-}</i>	10-11 mois	-	32/65 (49%)	Stambolic <i>et al.</i> , 2000
<i>MMTVCre-Pten^{flax/flax}</i>	9 mois	75%, sans distinction entre hyperplasies, MIN et carcinomes (probablement hyperplasies et MIN en majorité)		Li <i>et al.</i> , 2002
<i>MMTV-myrp110α</i>	24 mois	20-60% MIN dès 2 mois	Nullipares: 12% Multipares: 28%	Renner <i>et al.</i> , 2008
<i>BLG-Cre;Lkb1^{F/F}</i>	9-20 mois	-	8/42 (19%)	McCarthy <i>et al.</i> , 2009
<i>MMTVCre-Tgfbri^{flax/flax}</i>	3 mois	Hyperplasies (20-25%)		Forrester <i>et al.</i> , 2005
<i>MMTV-DNIIR</i>	27.5 mois	13/32 (40%)	5/32 (15%)	Gorska <i>et al.</i> , 2003
<i>MMTVCre-ou WapCre-Smad4^{Co/Co}</i>	11 mois	60% à 12 mois, 100% à 16 mois		Li <i>et al.</i> , 2003

endogène associée à un allèle floxed (exons 3-4) et un allèle nul (remplacement de l'exon 11 par une cassette *Neo*) de *Brca2* (Ludwig *et al.*, 2001b). Ces souris développent des carcinomes mammaires non métastatiques et des carcinomes adénosquameux, la majorité étant de type basal, après une période de latence longue (en moyenne 17 mois). Les souris *MMTV-Cre; Brca2^{F/F}* présentent aussi une longue période de latence (en moyenne 18 mois) pour le développement de carcinomes mammaires (Cheung *et al.*, 2004). A l'inverse, les souris *MMTV-Cre; Brca2^{F/F}; p53^{+/-}* (Cheung *et al.*, 2004) ou *K14-Cre; Brca2^{F11/F11}; p53^{F2-10/F2-10}* (Jonkers *et al.*, 2001) développent des tumeurs mammaires très rapidement, en moyenne vers 6 mois (Jonkers *et al.*, 2001) ou 10 mois (Cheung *et al.*, 2004), démontrant l'action synergique de la perte de fonction de *Brca2* et *p53* sur la tumorigenèse mammaire.

C.2. *p53* dans la tumorigenèse mammaire

L'invalidation homozygote ou hétérozygote du gène suppresseur de tumeurs *p53* chez les souris en fond génétique pur 129/Sv ou mixte C57BL/6 x 129/Sv donne une forte prévalence de lymphomes et sarcomes, mais pas (Jacks *et al.*, 1994) ou peu (moins de 1%) (Donehower *et al.*, 1995) de tumeurs mammaires. Seules les souris en fond génétique Balb/c développent des carcinomes mammaires (Kuperwasser *et al.*, 2000), moins nombreux chez les souris homozygotes pour l'allèle nul de *p53* (seulement 1%), essentiellement à cause de la mortalité précoce induite par les lymphomes et sarcomes, que chez les souris hétérozygotes (55% avec une latence comprise entre 8 et 14 mois). Les tumeurs détectées chez les hétérozygotes, en majorité des adénocarcinomes, présentent une forte aneuploïdie et une perte fréquente de l'allèle sauvage restant de *p53*. La transplantation des glandes mammaires Balb/c-*p53^{-/-}* dans des souris hôtes Balb/c-*p53^{+/+}* permet d'éviter la mort prématurée des souris, due aux lymphomes et sarcomes, et augmente le pourcentage de carcinomes mammaires développés (62%) (Jerry *et al.*, 2000). Les auteurs ont aussi observé que la stimulation hormonale induite par des gestations multiples n'a pratiquement pas d'effet sur la tumorigenèse dépendante de *p53* (68% de carcinomes) (Jerry *et al.*, 2000). L'invalidation spécifique de *p53* dans les cellules mammaires chez les souris *p53^{f/f}-MMTVCre* et *p53^{f/f}-WAPCre* entraîne des tumeurs mammaires avec une pénétrance quasi-totale, plus de la moitié étant métastatiques (Lin *et al.*, 2004). Les souris *p53^{f/f}-WAPCre* constituent d'ailleurs un excellent modèle pour les tumeurs mammaires humaines, en majorité positives pour ER, étant donné que 40% des tumeurs qu'elles développent expriment ER et le récepteur à la progestérone (PR), alors que les tumeurs observées chez les souris *p53^{f/f}-MMTVCre* sont toutes négatives pour ER (Lin *et al.*,

2004). De manière intéressante, l'inactivation simultanée de *p53* et du gène de la protéine d'adhésion E-cadhérine dans les souris *K14Cre ; Cdh1^{F/F} ; Trp53^{F/F}* transforme la majorité des carcinomes mammaires développés par les souris *K14Cre ; Trp53^{F/F}* en carcinomes invasifs, présentant des similarités surprenantes avec les carcinomes lobulaires invasifs humains (Derksen *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que la perte de fonction de *p53* est une étape-clé de la tumorigenèse mammaire liée aux gènes *Brca1/2* (voir paragraphe II.C.2).

L'ensemble de ces données démontre le rôle de l'inactivation de *p53* dans la tumorigenèse mammaire, bien que des événements génétiques additionnels semblent être nécessaires, étant donné les latences assez longues d'apparition des tumeurs mammaires.

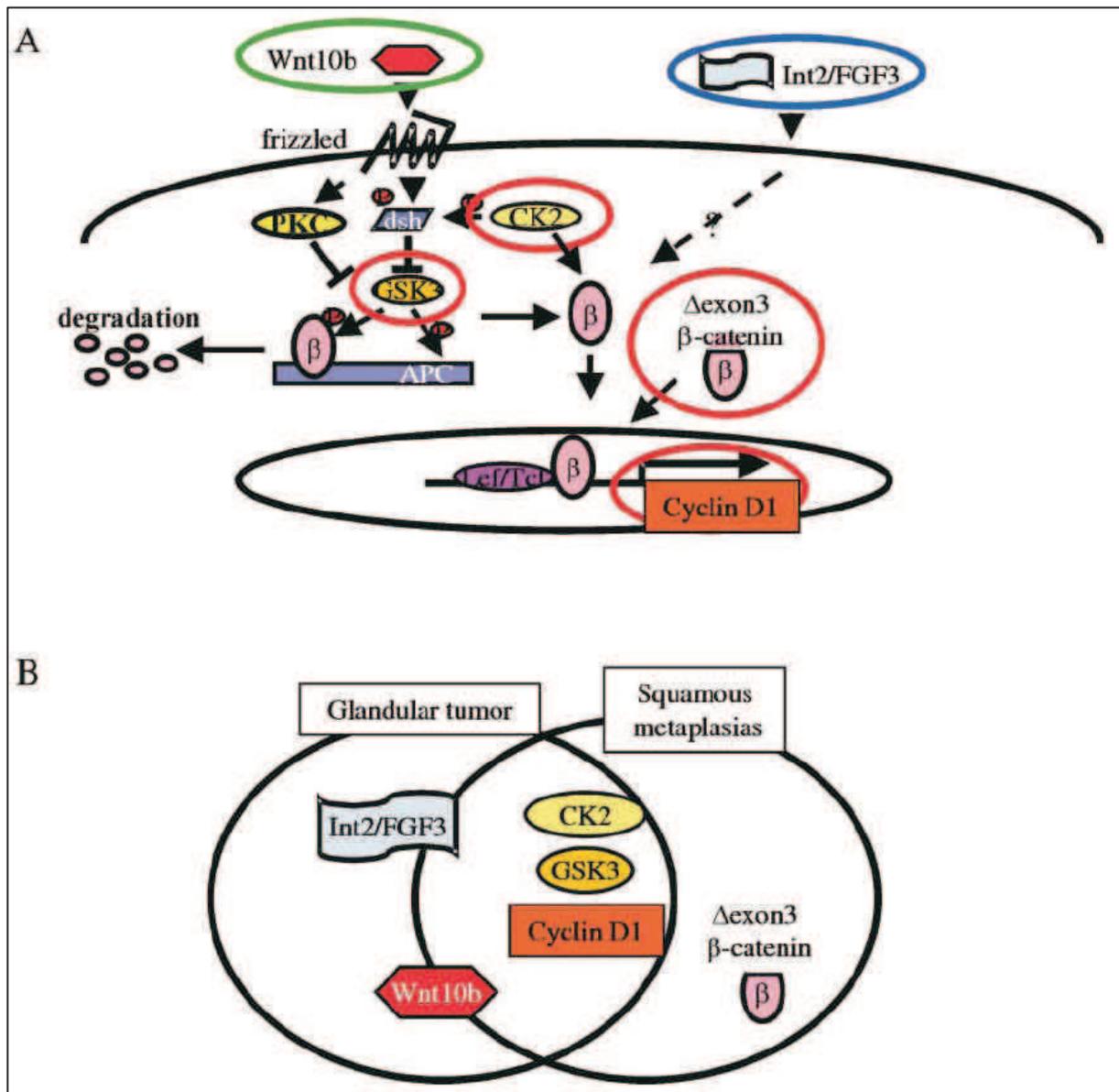
C.3. La voie Wnt/beta-caténine/APC

La voie Wnt/beta-caténine joue un rôle important durant le développement embryonnaire, notamment pour la spécification des axes du corps et des membres, mais aussi dans la tumorigenèse (Cadigan & Nusse, 1997). Le suppresseur de tumeur APC (adenomatous polyposis coli) est un des régulateurs négatifs majeurs de cette voie. Un schéma simplifié des différents constituants de cette voie est inclus dans la figure 5.

- Dans les glandes mammaires

Les souris exprimant une forme stabilisée constitutivement active de beta-caténine, $\Delta N89\beta$ -caténine (Imbert *et al.*, 2001) ou $\Delta N90\beta$ -caténine (Michaelson & Leder, 2001), sous le contrôle du promoteur *MMTV*, développent des adénocarcinomes mammaires avec une pénétrance complète dès l'âge de 4 mois (Imbert *et al.*, 2001) ou à partir de 8 mois dans seulement 40% des souris (Michaelson & Leder, 2001). Par contre, la stabilisation de la beta-caténine endogène par délétion de l'exon 3 du gène (Δ exon3 β -cat), sous le contrôle du promoteur *Wap* ou *MMTV*, donne uniquement de la métaplasie squameuse, résultant de la transdifférenciation des cellules mammaires en cellules épidermiques (Miyoshi *et al.*, 2002b). Miyoshi *et al.* ont pu établir que la transdifférenciation, et donc la métaplasie squameuse, était une caractéristique observée dans la totalité des modèles de souris transgéniques pour les différents composants de la voie Wnt (Miyoshi *et al.*, 2002a). La figure 5 résume les types de tumeurs développés dans les souris *MMTV-Wnt10b* (Lane & Leder, 1997), *MMTV-CK2* sur-exprimant la sous-unité catalytique de la protéine kinase CK2 (Landesman-Bollag *et al.*, 2001), *MMTV-Int-2/Fgf-3* générées par mutagenèse insertionnelle (Lee *et al.*, 1995), *MMTV- Δ exon3 β -cat* (Miyoshi *et al.*, 2002b), *MMTV-CyclinD1* (Wang *et al.*, 1994), et les souris exprimant un dominant négatif de GSK3 β (Farago *et al.*, 2005).

Figure 5 : Les composants de la voie de signalisation Wnt entraînent le développement de métaplasies squameuses et d'adénocarcinomes mammaires chez la souris. (A) Schéma de la voie de signalisation Wnt. Les molécules entourées sont celles qui induisent la formation de métaplasie squameuse. Les facteurs sécrétés Wnt (entouré en vert) et Int2/FGF3 (entouré en bleu) activent des voies différentes et induisent à la fois des tumeurs glandulaires et de la métaplasie. Les molécules intracellulaires GSK3b, CK2a, beta-caténine et cycline D1 sont entourées en rouge). (B) Distribution des tumeurs glandulaires et des métaplasies squameuses dans les différents modèles de souris transgéniques. Alors que la beta-caténine endogène stabilisée par l'excision de l'exon 3 conduit uniquement à de la métaplasie squameuse, INT2 et Wnt10b induisent préférentiellement le développement de tumeurs glandulaires. Les autres facteurs de la voie Wnt produisent des tumeurs de type mixte glandulaire/squameux, correspondant à la définition des carcinomes adénoquameux (tiré de Miyoshi *et al.*, 2002).



Un travail très récent a démontré que les tumeurs mammaires induites par la forme $\Delta N89\beta$ -caténine (Imbert *et al.*, 2001) ou par la surexpression de *Wnt1* (Tsukamoto *et al.*, 1988) n'étaient pas issues des mêmes cellules progénitrices mammaires (Teissedre *et al.*, 2009). En effet, les auteurs ont montré que Wnt induit la tumorigenèse mammaire à partir de précurseurs exprimant la kératine 14 (K14), et donne des tumeurs exprimant ER et à la fois les kératines 18 (marqueur des cellules luminales) et 14 (cellules basales). Au contraire, les cellules sensibles à la tumorigenèse induite par la forme activée $\Delta N89\beta$ -caténine sont plutôt des progéniteurs alvéolaires exprimant la kératine 18 (K18), menant à des tumeurs qui conservent un certain potentiel lactogénique, mais négatives pour l'expression de ER.

L'inactivation hétérozygote de *Apc* conduit les souris, à la fois mâles et femelles, à développer des carcinomes mammaires adénosquameux, présentant en majorité une activation de beta-caténine, avec une très forte pénétrance (surtout chez les femelles), et une variabilité observée suivant le fond génétique des souris (Gaspar *et al.*, 2009). Par contre, l'inactivation spécifique de *Apc* dans les cellules mammaires (*BLG-cre ;Apc^{lox/lox}*) ne conduit qu'au développement d'acanthomes (équivalents des carcinomes adénosquameux, mais sans caractère invasif), mais qui montrent aussi une forte activation de beta-caténine (Gallagher *et al.*, 2002). Kuraguchi *et al.* ont même démontré que l'inactivation hétérozygote de *Apc* entraîne des adénocarcinomes uniquement lorsque la Cre est sous le contrôle du promoteur *K14*, qui s'exprime dans les progéniteurs mammaires, mais pas avec *Wap-Cre*, qui ne cible que les cellules sécrétrices matures (Kuraguchi *et al.*, 2009), montrant l'importance de cette voie Wnt/APC/ beta-caténine dans les progéniteurs mammaires.

- Dans la prostate

De manière intéressante, les souris mâles où l'exon 3 du gène codant la beta-caténine est excisé à l'état hétérozygote sous le contrôle du transgène *MMTV-Cre*, montrent une stabilisation de beta-caténine dans l'épithélium prostatique, menant au développement d'hyperplasies dès 8 semaines ainsi qu'à une transdifférenciation extensive de l'épithélium prostatique en structures épidermoïdes vers l'âge de 12 semaines (Bierie *et al.*, 2003), ou de PIN de haut grade dès 10 semaines dans une autre étude (Gounari *et al.*, 2002).

Les modèles de souris transgéniques pour les différents composants de la voie Wnt/beta-caténine semblent indiquer la nécessité de l'intégrité de cette voie dans le maintien de la différenciation des cellules prostatiques et mammaires.

C.4. PTEN, la voie PI3K/AKT et LKB1

PTEN (phosphatase and tensin homologue), dont les mutations chez l'homme prédisposent à certaines tumeurs, y compris de la prostate et du sein, joue un rôle crucial de suppresseur de tumeurs dans la voie PI3K (phosphoinositide-3-kinase)/AKT, en inhibant la signalisation de cette voie (Baker, 2007). Un autre suppresseur de tumeur, *LKB1*, interagit physiquement et fonctionnellement avec *PTEN* et est aussi impliqué dans un syndrome de prédisposition tumorale (Mehenni *et al.*, 2005).

- Dans les glandes mammaires

Les souris femelles hétérozygotes pour *Pten* montrent une susceptibilité accrue aux tumeurs endométriales et aux tumeurs mammaires (Stambolic *et al.*, 2000). En effet, 61% des souris développent des tumeurs mammaires entre 30-49 semaines après la naissance, en majorité des adénocarcinomes ou des fibroadénomes. Cette incidence augmente à 83% à l'âge de 50-66 semaines, 6% des tumeurs étant métastatiques aux ganglions lymphatiques et aux poumons. Les mêmes types de tumeurs ont été observés dans un modèle d'inactivation conditionnelle de *Pten*, les souris *MMTVCre-Pten^{flox/flox}*, mais avec une latence d'apparition très réduite étant donné que les tumeurs apparaissent dès l'âge de deux mois (Li *et al.*, 2002).

Il a aussi été montré que l'activation de la voie PI3K dans les cellules mammaires donne le même genre de phénotype que lorsque *Pten* est invalidé. En effet, les souris exprimant un transgène codant une p110 α myristoylée spécifiquement dans les cellules mammaires (promoteur *MMTV*), présentent une activation constitutive de PI3K par le recrutement forcé à la membrane plasmique de sa sous-unité catalytique (p110 α) (Renner *et al.*, 2008). Chez ces souris, les auteurs ont observé le développement de carcinomes adénosquameux avec une incidence de 12% chez les femelles nullipares, allant jusqu'à 28% chez les femelles multipares, la majorité étant des lésions microscopiques.

Les souris *BLG-Cre;Lkb1^{F/F}* (BLG, beta-lactoglobuline) développent des tumeurs mammaires avec une latence de 46 à 85 semaines, principalement des carcinomes mammaires de type basal au niveau moléculaire, ressemblant à ceux observés chez les femmes ayant des mutations de *LKB1* (McCarthy *et al.*, 2009).

- Dans la prostate

Les souris mâles hétérozygotes pour *Pten* en fond génétique mixte C57BL6/129Sv développent des PIN avec une pénétrance variable suivant les études, allant de 25% (Stambolic *et al.*, 2000) à 50% (Di Cristofano *et al.*, 2001) des souris entre 9 et 15 mois, avec un cas de carcinome prostatique rapporté à 15 mois (1/16 souris) (Stambolic *et al.*, 2000). Il a aussi été montré que le fond génétique des souris pouvait influencer la latence et le spectre

Tableau 4 : Résumé des phénotypes des principaux modèles murins de tumorigenèse prostatique. Les détails sur la nature (PIN ou carcinomes), l'incidence ou l'âge moyen d'apparition des lésions ont été extrapolés, quand cela était possible, d'après les données présentées dans les articles lorsqu'elles n'étaient pas clairement mentionnées.

Transgène ou knock-out	Age moyen d'apparition des lésions	Incidence PIN	Incidence carcinomes	Références
<i>MMTV-Cre;Catnb^{+/lox3}</i>	2 mois	Hyperplasies dès 2 mois, métaplasie squameuse généralisée à 3 mois		Bierie <i>et al.</i> , 2003
<i>MMTV-Cre;Catnb^{+/lox3}</i>	2-5 mois	8/8 (100%): PIN de haut grade	-	Gounari <i>et al.</i> , 2002
<i>Pten^{-/-}</i> (C57BL6/129Sv)	9-15 mois	4/16 (25%)	1/16 (6%) à 15 mois	Stambolic <i>et al.</i> , 2000
<i>Pten^{-/-}</i> (C57BL6/129Sv)	9-16 mois	8/18 (50%)	-	Di Cristofano <i>et al.</i> , 2001
<i>Pten^{-/-}</i> (C57BL6)	-	7-9 mois: 10-55% selon les lobes 10-12 mois: 13-38% selon les lobes	7-9 mois: 20-64% selon les lobes 10-12 mois: 33-100% selon les lobes	Blando <i>et al.</i> , 2009
<i>Pb-CreA/Pten^{lox2/loxP}</i>	3 mois 2-7 mois	- 100% à 6 semaines	100% à 6 mois 100% à 7 mois	Trotman <i>et al.</i> , 2003 Wang <i>et al.</i> , 2003
<i>MMTVCre-Pten^{lox2/lox}</i>	4 mois	71-97% dès 2 semaines	40%	Backman <i>et al.</i> , 2004
<i>PSA-Cre-ER¹²/Pten^{lox2/lox}</i>	-	100% dans tous les lobes dès 2-3 mois	8-10 mois: 60%, 14-16 mois: 100%	Ratnacaram <i>et al.</i> , 2008
<i>Pb-myr-Akt1</i>	Non précisé	Incidence non précisée	-	Majumder <i>et al.</i> , 2003
<i>Pb-myr-Akt1;Cdkn1b^{-/-}</i> <i>Pb-myr-Akt1;Cdkn1b^{-/-}</i>	12 mois	-	38% 57%	Majumder <i>et al.</i> , 2008
<i>AhCre;Lkb1^{lox2/loxP}</i>	2 mois	56-83% selon les lobes	-	Pearson <i>et al.</i> , 2008

des lésions développées. En effet, les souris *Pten*^{+/-} générées en fond génétique pur C57BL6 présentent une incidence de carcinomes augmentée dans tous les lobes prostatiques par rapport au fond mixte, de 33% pour VP à 67% pour DLP et 100% dans AP pour les souris entre 10 et 12 mois (Blando *et al.*, 2009).

L'inactivation tissu-spécifique de *Pten* dans la prostate entraîne l'apparition de carcinomes invasifs à partir de 6 mois avec une pénétrance complète dans les souris *PbCre-Pten*^{flox/flox} (promoteur de la probasine, exprimé dans la prostate en présence d'androgènes) (Trotman *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2003). Quant aux souris *MMTVCre-Pten*^{flox/flox}, elles développent des PIN de haut grade et des carcinomes *in situ* dès l'âge de deux semaines, ainsi que des carcinomes invasifs dans 40% des souris entre 7 et 19 semaines (Backman *et al.*, 2004). Une relation directe entre l'inactivation de *Pten* et la progression vers des carcinomes prostatiques a été établie par un modèle de souris *PSA-Cre-ER*^{T2}/*Pten*^{flox/flox}, où *Pten* est invalidé dans les cellules prostatiques sous le contrôle du promoteur de la PSA (prostate-specific antigen) de manière inductible par le tamoxifène (Ratnacaram *et al.*, 2008). Ces souris présentent des hyperplasies 4 semaines après l'ablation de *Pten*, des PIN dans tous les lobes prostatiques dès 2-3 mois, et des carcinomes à 10 mois dans quelques souris.

Les modèles de souris combinant l'inactivation simultanée de plusieurs gènes ont permis de montrer la coopérativité entre *Pten* et d'autres gènes suppresseurs de tumeurs tels que *p18*, *p27* et *Nkx3.1*, par l'accélération du processus de tumorigenèse prostatique, se traduisant par une diminution de la latence d'apparition des carcinomes (Di Cristofano *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2002, Gao *et al.*, 2004, Bai *et al.*, 2006).

Par ailleurs, les souris présentant une activation d'AKT restreinte au lobe prostatique ventral (promoteur de la probasine) développent des PIN, d'histologie similaire à ceux observés chez les souris hétérozygotes pour *Pten* (Majumder *et al.*, 2003). Une élévation de l'expression de p27 a été détectée dans les PIN développés par ce modèle (Majumder *et al.*, 2008). De manière intéressante, l'inactivation de *p27* en combinaison avec l'activation d'AKT entraîne une progression des PIN vers des carcinomes invasifs, montrant le rôle de p27 en tant que frein à la progression tumorale (Majumder *et al.*, 2008).

Quant à *Lkb1*, l'inactivation spécifique des deux allèles *Lkb1*^{loxP/loxP} dans les quatre lobes prostatiques par l'utilisation d'une Cre sous le contrôle du promoteur *P450 CYP11A1* (nommée *AhCre*) entraîne le développement de PIN dès l'âge de 8 semaines, présentant une activation de beta-caténine/AKT, mais sans progression vers des adénocarcinomes, peut-être en raison du décès prématuré des souris entre 3 et 7 mois (Pearson *et al.*, 2008).

C.5. La voie TGF-beta et Smad4

Il est désormais admis que la voie de signalisation TGF- β exerce un rôle dual sur la tumorigenèse, plutôt inhibiteur dans les étapes précoces, mais facilitateur de la progression tumorale et de l'invasion dans les stades plus tardifs (Massagué, 2008).

Cependant, l'invalidation dans les cellules mammaires chez la souris du récepteur de type 2 du TGF- β (*MMTVCre-TgfbRII^{flox/flox}*) entraîne seulement l'apparition d'hyperplasies lobulo-alvéolaires, avec une augmentation de l'apoptose des cellules (Forrester *et al.*, 2005). Inversement, l'expression d'une forme dominant négatif de ce même récepteur (*MMTV-DNIIR*) induit le développement, dans 40% des femelles multipares uniquement, de MIN de haut grade/carcinomes mammaires *in situ* et de quelques adénocarcinomes et carcinomes adénosquameux avec une latence supérieure à deux ans (Gorska *et al.*, 2003).

De plus, l'invalidation de *Smad4* spécifiquement dans les glandes mammaires (souris *MMTVCre-* ou *WapCre-Smad4^{Co/Co}*) conduit à des tumeurs mammaires ayant une composante essentiellement squameuse et à des abcès mammaires, suite à la transdifférenciation des cellules épithéliales mammaires en cellules épidermoïdes (Li *et al.*, 2003).

De manière générale, il semblerait que les gènes prédisposant les souris à des lésions pré-cancéreuses dans la prostate (PIN) et les glandes mammaires (MIN), ou bien à des lésions plus avancées de type carcinomes, soient à peu près les mêmes dans les deux organes. Des facteurs comme PTEN, LKB1, AKT, la voie WNT/beta-caténine, jouent un rôle de suppresseurs de tumeurs aussi bien dans les cellules mammaires que dans les cellules prostatiques. Ces données suggèrent que les mécanismes menant à la tumorigenèse seraient similaires dans ces tissus hormono-dépendants, tout du moins chez la souris. Il est aussi important de souligner l'influence majeure du fond génétique des souris, mise en exergue par ces différentes études, sur la pénétrance, la vitesse de développement, et parfois même le type histologique des lésions développées à partir de la même modification génétique.

L'ensemble de ces travaux illustre aussi le fait que la coopération entre plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs soit souvent nécessaire pour mener à la tumorigenèse dans la glande mammaire et la prostate chez la souris, phénomène aussi observé dans les tumeurs humaines.

CHAPITRE 2: RÉSULTATS

CHAPITRE 2 : RÉSULTATS

J'ai été accueillie, pour mon Master 2 et pour la préparation de mon doctorat, dans l'équipe Biologie des Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1 (NEM1) dirigée par le Dr. C.X. Zhang, au sein du laboratoire Génétique Moléculaire, Signalisation et Cancer (UMR5201). Lors de mon arrivée au laboratoire, le groupe avait déjà généré des modèles murins d'inactivation du gène *Men1*, et montré que les souris hétérozygotes pour *Men1* récapitulent le spectre de tumeurs endocrines communément observé chez les patients NEM1 (Bertolino *et al.*, 2003b). De manière intéressante, des carcinomes mammaires et prostatiques avaient aussi été mis en évidence chez les souris âgées, avec une incidence faible, mais cependant non négligeable.

Pendant les quatre ans de ma thèse, je me suis donc plus particulièrement intéressée au rôle physiopathologique du gène *Men1* dans les tissus hormono-dépendants, la prostate et les glandes mammaires, par l'étude de modèles murins. Mes travaux de thèse ont permis d'obtenir les données suivantes :

- Caractérisation des carcinomes prostatiques développés chez les souris hétérozygotes pour *Men1*.

J'ai pu montrer que les souris mâles *Men1*^{+/-} développent des carcinomes de la prostate à partir de l'âge de 18 mois (6/47 souris, 12.8%), alors que les souris contrôle ne développent aucun carcinome. Dans ces carcinomes, une perte d'hétérozygotie partielle du gène *Men1*, ainsi qu'une inactivation complète de l'expression de menin ont pu être détectées. La nature cancéreuse de ces lésions a pu être confirmée par la désorganisation de la couche des cellules basales de l'épithélium prostatique, à l'aide du marqueur p63 spécifique de ces cellules. L'expression du récepteur aux androgènes (AR) est hétérogène dans les carcinomes, alors que l'expression de p27 est fortement diminuée, ce qui suggère une implication éventuelle de ces deux facteurs dans la tumorigenèse liée à l'inactivation de *Men1*. Ces résultats sont présentés dans l'article 1.

- L'inactivation spécifique du gène *Men1* dans les glandes mammaires conduit au développement de lésions pré-cancéreuses.

L'observation de carcinomes mammaires chez les souris femelles *Men1*^{+/-} à partir de l'âge de 18 mois, ainsi que diverses données de la littérature, notamment l'interaction physique et fonctionnelle identifiée entre menin et le récepteur aux œstrogènes ER α (Dreijerink *et al.*, 2006), nous ont amené à envisager un rôle de menin dans la tumorigenèse des glandes mammaires chez la souris.

Nous avons donc généré un modèle murin d'inactivation de *Men1* spécifiquement dans les cellules épithéliales mammaires sécrétrices (luminales) en croisant nos souris *Men1*^{F/F} avec des souris porteuses d'un transgène exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la protéine du lait *Wap*. La stratégie de génération de ces souris est schématisée dans la figure 6. J'ai pu vérifier que le transgène *WapCre* était bien spécifique de la couche luminale des cellules épithéliales mammaires, l'inactivation de l'expression de menin n'ayant pas lieu dans les cellules basales.

L'inactivation du gène *Men1* dans les cellules mammaires sécrétrices n'entraîne pas de perturbation structurale ou proliférative apparente des glandes mammaires durant leur développement post-natal, y compris pendant la gestation et la lactation, et n'a pas de conséquence sur la physiologie des glandes, les souris femelles mutantes étant capables d'allaiter normalement leurs portées.

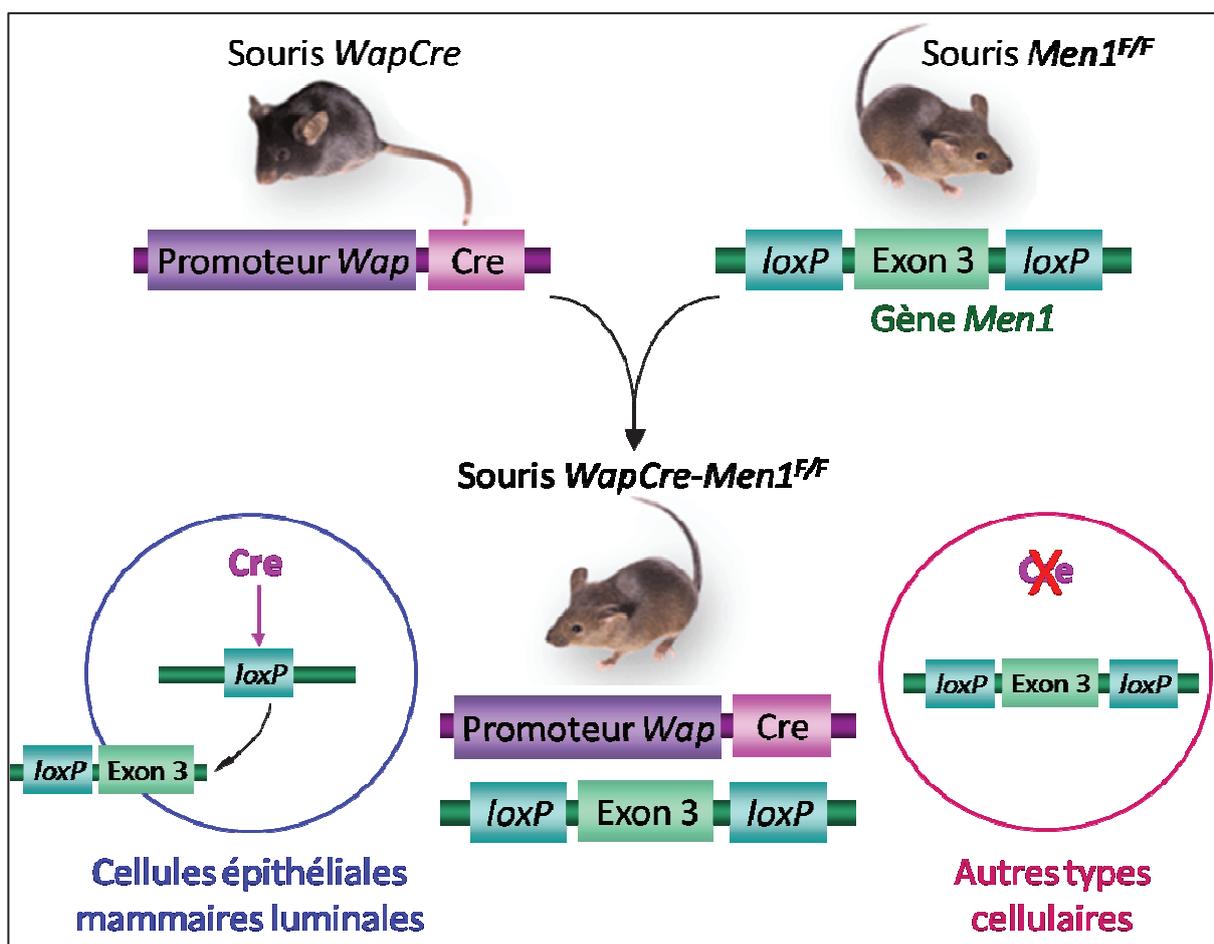
L'effet de l'inactivation de *Men1* sur la tumorigenèse des glandes mammaires a été étudié sur une cohorte de 120 femelles multipares (ayant subi trois gestations pour faire exprimer le transgène), dont 66 femelles mutantes *WapCre-Men1*^{F/F} et deux groupes de femelles contrôles de 28 souris *Men1*^{F/F} et 26 *WapCre-Men1*^{+/+}. J'ai pu observer que les souris mutantes présentent une augmentation de la fréquence de lésions pré-cancéreuses (MIN) dès l'âge de 9 mois (38.5% pour le groupe 9-12 mois), qui s'accroît avec l'âge (48.6% à 12-15 mois et 66.7% au-delà de 15 mois). Ces MIN expriment ER, bien qu'une diminution de l'intensité du marquage soit observée par rapport aux glandes mammaires des contrôles.

J'ai aussi pu mettre en évidence une fuite d'expression du transgène dans les cellules hypophysaires chez les souris mutantes, qui n'avait jamais été rapportée dans la littérature. Cette fuite entraîne une inactivation du gène dans les cellules lactotrophes hypophysaires, conduisant à l'apparition de prolactinomes, ayant comme conséquence une élévation des concentrations sériques de prolactine circulante. En revanche, j'ai pu établir, par diverses analyses, que l'augmentation de l'incidence de MIN chez les souris mutantes ne pouvait pas être expliquée par une influence de l'hyperprolactinémie sur les glandes mammaires. Par contre, la mortalité précoce engendrée par la survenue de ces prolactinomes chez nos souris

mutantes nous a empêchés d'évaluer l'effet de l'inactivation du gène *Men1* sur la tumorigenèse mammaire, notamment sur une possible conversion des MIN en carcinomes, à plus long terme.

Afin de comprendre les mécanismes de cette augmentation d'incidence des MIN, nous avons recherché quels événements secondaires à l'inactivation de *menin* pouvaient favoriser leur apparition. Nous avons ainsi pu observer que les MIN des souris mutantes présentaient une forte diminution de l'expression membranaire de *beta-caténine* et *E-cadhérine*, suggérant une implication de la perte d'adhésion cellulaire. L'ensemble de ces données est présenté dans le manuscrit de l'article 2.

Figure 6 : Génération d'un modèle murin où le gène *Men1* est invalidé spécifiquement dans les cellules épithéliales mammaires lumineales. Les souris *WapCre* porteuses d'un transgène exprimant l'enzyme Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la protéine du lait Wap (whey acidic protein) ont été croisées avec nos souris *Men1^{F/F}* où l'exon 3 du gène *Men1* est encadré de deux sites *loxP*. Le promoteur *Wap* ne s'exprimant normalement que dans les cellules mammaires sécrétrices (luminales), l'excision de l'exon du gène n'a lieu que dans ces cellules. Les descendants *WapCre-Men1^{F/F}* de ces croisements présentent donc une invalidation du gène *Men1* spécifiquement dans les cellules mammaires épithéliales lumineales, et pas dans les autres types cellulaires.



ARTICLE 1: Characterization of the
prostate cancer lesions developed in
heterozygous *Men1* mutant mice

Research article

Characterization of the prostate cancer lesions developed in heterozygous *Men1* mutant mice

Christelle Seigne¹, Sandra Fontanière^{1,2}, Christine Carreira^{1,2}, Jieli Lu¹, Wei-Ming Tong^{2,3}, Bernard Fontanière⁴, Zhao-Qi Wang^{2,5}, Chang Xian Zhang^{1*} and Lucien Frappart⁶

¹CNRS UMR5201, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Signalisation et Cancer, Centre Léon Bérard, Lyon F-69008, France

²International Agency for Research on Cancer, Lyon F-69008, France

³Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Medical Sciences, Beijing Union Medical College, Beijing-100005, China

⁴Département de Pathologie, Centre Léon Bérard, Lyon F-69008, France

⁵Leibniz Institute for Age Research - Fritz Lipmann Institute e.V., 07745 Jena, Germany

⁶Département de Pathologie, INSERM U590, Centre Léon Bérard, Hôpital Edouard Herriot, HCL, Lyon F-69008, France.

* Corresponding author

Abstract

Background: Mutations of the *MEN1* gene predispose to multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) syndrome. We and others have previously shown that *Men1* disruption in mice recapitulates MEN1 pathology. Intriguingly, rare cases of hormone-dependent lesions were also observed in the *Men1* mutant mice.

Methods: To better study the occurrence of prostate lesions, we followed a male mouse cohort of 47 *Men1*^{+/-} mice and 23 age-matched control littermates, starting at 18 months of age, and performed analyses of the prostate glands from the cohort.

Results: Interestingly, six *Men1*^{+/-} mice (12.8%) developed prostate cancer, two adenocarcinomas and four *in situ* carcinomas, while none of the control mice developed cancerous lesions. The expression of menin encoded by the *Men1* gene was found to be drastically reduced in all carcinomas, and partial LOH of the wild-type *Men1* allele was detected in three of the five analysed lesions. Using immunostaining for androgen receptor and p63, a basal epithelial cell marker, we demonstrated that the menin-negative prostate cancer cells did not display p63 expression, and that androgen receptor was expressed but more heterogeneous in these lesions. Furthermore, our data showed that the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1B (p27), an *Men1* target gene known to be inactivated during prostate cell tumorigenesis, was notably decreased in the prostate cancers that developed in the mutant mice.

Conclusion: Our work may suggest the possible involvement of *Men1* inactivation in the tumorigenesis of prostate gland.

Keywords: *Men1*, mutant mice, prostate cancer, androgen receptor, CDKN1B

Background

Mutations of the *MEN1* gene predispose patients to multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1), characterized by the occurrence of multiple endocrine tumours affecting mainly the parathyroid glands, the endocrine pancreas and the anterior pituitary [1]. Shortly after the identification of the *MEN1* gene, several nonendocrine tumours were also reported in MEN1 patients, such as lipoma and angioma [2, 3]. The *MEN1* gene encodes a primarily nuclear-localised protein named menin that has been shown to interact with a variety of other proteins [4]. In particular, its interaction with several transcriptional factors and co-factors suggests that menin may act as an adaptor protein involved in the regulation of gene expression. However, little is known about the *in vivo* physiological function of menin and the *in vivo* importance of the aforementioned protein-protein interactions, especially in the endocrine cells commonly affected in MEN1 disease.

By disrupting *Men1* in mice, we and others have previously shown that, while homozygous *Men1* mutant mice die embryonically, heterozygous *Men1* mutant mice largely recapitulate the major endocrine lesions seen in MEN1 pathology [5-8]. However, these mice develop several types of neoplastic lesions that are rarely seen in MEN1 patients, such as high frequency sex-cord stromal cell tumours [6, 8]. Intriguingly, we have found three cases of breast cancer in heterozygous *Men1* mice [6], and Crabtree *et al.* documented one case of prostate cancer developed in their heterozygous *Men1* mouse cohort [7]. Consistent to this finding, Dreijerink *et al.* has shown that menin interacts physically, in a ligand-dependent manner, with several nuclear receptors, such as oestrogen receptor (ER) [9] and peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) [10], and that menin acts as a coactivator of nuclear receptor mediated transcription. Altogether, these works elicit the question whether *Men1* inactivation could predispose to the development of hormone-dependent tumours. In order to elucidate the possible link between the development of prostate cancer and *Men1* disruption, we followed a cohort of aged male heterozygous *Men1* mutant mice. We noticed that several cases of prostate cancer were found in this group, while none was seen in control animals. Interestingly, the expression of menin was inactivated in these prostate cancers, and partial LOH (loss of heterozygosity) of the wild-type *Men1* allele was found. Gene expression analyses further revealed that the expression of CDKN1B (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, also called p27), a known menin target gene [11, 12], was markedly reduced in the analysed prostatic carcinomas.

Methods

Men1 mutant mice

Men1^{+/-} mice carrying an inactivated *Men1* allele were generated as described previously [5]. These mutant mice with mixed C57BL6/129-Sv genetic background give rise to multiple endocrine lesions mimicking the human MEN1 tumour spectra as previously described [6]. Littermate *Men1*^{+/-} and *Men1*^{+/+} male mice were used for our analyses, to limit the bias that could come from the mixed genetic background. All animal experiments were conducted in accordance with accepted standards of animal care and were approved by the International Agency for Research on Cancer's Animal Care and Use Committee.

Genotyping and LOH analysis

PCR genotyping analyses were performed to determine the presence of the wild-type and mutant *Men1* alleles as described previously [6]. For LOH analysis, menin-immunostained prostate sections were used to locate menin-negative lesions. Genomic DNA was then extracted from corresponding microdissected paraffin-embedded sections as described previously [6]. The wild-type (+) and mutant (-) *Men1* alleles were first amplified from 1 µg of genomic DNA by PCR, carried out as described for genotyping [6], using the following three primers: 2f0, 5-CTTACCTCTTCTCATGTCTG; 2r0, 5-CTCAGTACATTGCACGGAGA; tk1.1, 5-GCGTTGCGTGGGGTCAG. Southern blot was then performed by standard methods on these PCR products using a probe for each *Men1* allele, generated by amplification of genomic DNA from a *Men1* heterozygous mutant mouse with the PCR described above. Autoradiography films were scanned with the EC3 imaging system (UVP Bioimaging Systems) and the intensity of each band quantified with VisionworksLS software. The ratio between the intensities of the + and - *Men1* alleles (+/- ratio) was then calculated to evaluate the loss of the wild-type *Men1* allele.

Histopathological analyses

Prostate glands as well as adjacent tissues were collected from wild-type and heterozygous *Men1* mutant mice, fixed in 4% buffered formalin for at least 24 h at room temperature, and processed for paraffin-embedding, sectioning (3 µm) and haematoxylin and eosin staining. Histopathological examination of prostate samples was performed independently by three pathologists (B Fontanière, L Frappart and WM Tong), one being

specialist of mouse models (WM Tong), on a blinded basis according to the criteria recommended by the consensus report from the Bar Harbor meeting of the mouse models of human cancer consortium (MMHCC) prostate pathology committee [13]. The WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs (2004) has also been taken into account. More than 3 prostate sections were examined for each mouse and lobe origin was distinguished during the scoring process. The final diagnosis was then reached by a common decision.

Immunostaining analysis

Immunohistochemical (IHC) staining was performed on prostate serial sections as described previously [6], using antibodies against menin (BL342, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA, 1:6000), androgen receptor (C-19, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA, 1:4000) and CDKN1B (F-8, Santa Cruz Biotech, 1:2000). In all these analyses, the control without primary antibody was systematically included to rule out the non-specific staining due to secondary antibodies (data not shown). Double immunofluorescence staining (IF) was performed on paraffin-embedded prostate sections. Briefly, after endogenous peroxidase inactivation, antigen retrieval and antibody diluent treatment (DAKO, Capintaria, CA, USA), sections were incubated overnight with primary antibody against menin (BL342, 1:6000). After secondary antibody incubation (anti-rabbit, Vector Lab, 1:200), signal was amplified using ABC Vectastain elite kit (Vector Lab) and TSA Cyanine 3 kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA, 1/100). Slides were saturated once more in DAKO antibody diluent, then incubated overnight with primary antibodies against p63 (Ab-1, Oncogene Research products, San Diego, CA, USA, 1:2000) or CDKN1B (Santa Cruz Biotech, 1:2000), followed by incubation with secondary antibody (anti-mouse, Vector Lab, 1:200). The signals were revealed by ABC kit and TSA Cyanine 5 (PerkinElmer, 1/100). Slides were mounted in IF Vectashield DAPI-containing mounting medium (Vector Lab) and IF visualised with a confocal microscope LEICA TCS SP2.

Results

A proportion of aged heterozygous Men1 mutant mice develop prostate cancer

To determine whether *Men1* inactivation can lead to prostate cancer development in mice, we followed a cohort of 47 male mutant mice (*Men1*^{+/-}) and 23 wild-type (*Men1*^{+/+}) age-matched littermate mice during the period of 18 – 26 months of age, as we had not observed prostate cancer from the younger mice previously analysed [6].

Histopathologic analysis of the prostate glands from these mice was performed in accordance with the criteria defined by the MMHCC [13]. Our comparison between age-matched *Men1* wild-type and mutant mice revealed notable histological differences, with a marked increase in cancer incidence in *Men1*^{+/-} prostates (Table 1), and a significantly decreased proportion of mutant mice with normal prostate histology, with 30.4% of *Men1* wild-type prostates showing normal histology while only 6.4% of prostate glands from mutant mice were free of lesions (p=0.0266, Fisher's two-tailed exact test). Normal prostate presented as a single layer of secretory epithelial cells lined by a well-defined outer basal cell layer, with uniform small nuclei containing inconspicuous or small nucleoli. The epithelial hyperplasia diagnosed in this study appeared as increased numbers of epithelial cells, with or without atypia, associated with increased gland size. The intraluminal proliferation of markedly atypical epithelial cells, with tufted, cribriform or micropapillary growth pattern, was recognized histologically as mouse prostatic intraepithelial neoplasia (mPIN) (Figure 1B). Carcinomas were characterized by frequent mitotic figures, apoptotic debris and cytologic atypia such as amphophilic cytoplasm, increased nuclear-cytoplasmic ratio, hyperchromasia, prominent and multiple nucleoli, chromatin clumping and pleomorphism (Figure 1C, D, E).

Hyperplastic and mPIN lesions, mainly presenting in the lateral and anterior lobes of prostatic glands, were observed with a similar frequency between mutant and wild-type aged mice (Table 1, 43.5% in *Men1*^{+/+} versus 46.8% in *Men1*^{+/-} mice for hyperplasia and 26.1% in *Men1*^{+/+} versus 34% in *Men1*^{+/-} mice for mPIN), few of them being also found in dorsal and ventral lobes. However, it is noteworthy that the incidence of mPIN in mutant mice was underestimated, as four mPIN observed in mutant mice with *in situ* carcinomas were not counted, since only the most severe lesion was taken into account for each mouse. The real incidence of mPIN in *Men1*^{+/-} mice should thus be 42.5%. It is noted that the occurrence of

both hyperplasia and mPIN lesions has already been reported in some wild-type mice strains [14].

More importantly, our analysis revealed that, out of 47 heterozygous *Men1* mutant mice, six developed prostate cancers (12.8 %). No prostate carcinoma was ever found in age-matched *Men1*^{+/+} littermates (0/23). Among the prostate cancers observed in *Men1*^{+/-} mice, four were identified as *in situ* prostate carcinoma presenting as microscopic lesions (one in dorsal prostate, shown in figure 1C, two in lateral prostate, and one in anterior prostate), one papillary adenocarcinoma in anterior prostate (Figure 1D) and one differentiated invasive adenocarcinoma in lateral prostate (Figure 1E, F), both visible on gross examination. The invasion presented in epithelial areas lacking an intact basal cell layer, with cancerous cells invading the surrounding stroma (Figure 1F). Among the observed prostatic lesions, none displayed histopathological features typical of neuroendocrine differentiation (solid or sheet-like proliferation of closely spaced oval or spindle cells with scant cytoplasm and hyperchromatic nuclei, with areas of rosette formation) [13].

Taken together, our data revealed the development of prostate carcinomas in a small proportion of the aged heterozygous *Men1* mutant mice.

Menin expression is inactivated in cancerous lesions mainly through LOH

Normal menin expression was checked in the different prostatic lobes from *Men1* wild-type mice using either IHC for menin, or double IF with the antibodies against menin and p63, a basal epithelial cell marker. IHC analysis revealed that menin expression, mainly nuclear but also cytoplasmic, could be found in all prostatic lobes from *Men1* wild-type mice, in both luminal and basal prostatic epithelial cells (Figure 2A), but not in interstitial cells. Double IF staining of menin and p63 confirmed the result (Figure 3A-D). To know whether the occurrence of prostatic lesions found in heterozygous *Men1* mice was accompanied by the inactivation of the *Men1* gene, we examined menin expression by IHC in corresponding lesions. We found that menin expression was well detectable by IHC in all four tested mPIN lesions from WT mice (data not shown), but clearly reduced in two of four mPIN from mutant mice (Figure 2B, F). The data suggest that, although a large proportion of mPIN observed in mutant mice occurs independently of *Men1* inactivation, as those seen in wild-type mice, some of them may still be related to menin loss. In contrast to mPIN lesions, no menin expression was detectable in the six prostate cancers found in *Men1*^{+/-} mice (Figure 2C-E and G-I), suggesting that prostate cancer in these mice was likely caused by menin inactivation,

rather than the secondary effects of MEN1 pathology, such as gene expression and/or hormone disturbance in endocrine tissues. It is noticed that in two prostate cancers shown in figure 2 (panels D, H and E, I), a small number of cells remain positive for menin expression. We reasoned that these cells were in fact normal basal epithelial cells that remained in cancer lesions, which was confirmed by further analyses (see below).

To further study the related mechanisms leading to menin inactivation, we tested the presence of LOH in mPIN displaying reduced menin expression shown by IHC analysis and carcinoma lesions from *Men1*^{+/-} mice. To this end, the tested tissues were scraped from the corresponding paraffin-embedded slides, and genomic DNA was extracted from each lesion. Genotyping analysis demonstrated that partial LOH was indeed found in three of five analysed precancerous and cancerous lesions (Figure 2J). As a matter of fact, the quantification of amplified products corresponding to *Men1*⁺ and *Men1*⁻ alleles from the tail of a *Men1*^{+/-} mouse was used as a control, and achieved an identical intensity of both alleles, thus giving a +/- ratio which equals to one. The intensity of the wild-type allele (+), but not the mutant allele (-), was reduced in two mPIN (PIN1 and 2, both showing reduction of menin expression by IHC analysis) and an adenocarcinoma lesion (ADC) from *Men1*^{+/-} mice, as demonstrated by the lower +/- ratios for these lesions when compared with the control (Figure 2J). We assume that the residual wild-type allele, amplified from the tested lesions, comes mainly from remaining normal basal cells within the lesions, which were shown to retain menin expression. The result suggests that LOH of the remaining wild-type *Men1* allele may be one of the mechanisms leading to menin inactivation in prostate cancers developed in this model, although we cannot exclude that other mechanisms may also be involved.

The prostate cancers developed in heterozygous Men1 mutant mice do not express p63 and display heterogeneous AR expression

Although a loss of menin expression and a partial LOH were found in some mPIN from *Men1* mutant mice, we focused our analyses on the prostate cancers that developed in these mice, since mPIN occurred with rather similar frequency between wild-type and mutant mice. In order to further characterise the structure of the observed cancer lesions, p63 expression analysis, a basal epithelial cell marker, was carried out using double IF staining, since the diagnosis of cancerous lesions can often be based on the disruption of the basal cell layer [15]. The result showed that menin-negative cancerous cells were negatively stained with basal cell marker p63 (Figure 3E-H). We also noted that normal p63-positive basal cells were shown to

retain menin expression and scattered in the cancerous lesions, showing a disruption of the basal cell layer (Figure 3H, white arrowhead). The data confirmed therefore our histopathologic diagnosis, and also indicated that menin inactivation did not occur in basal cells, confirming what we had speculated from the results obtained by menin IHC.

Prostatic cells express androgen receptor (AR) and respond to the androgen pathway that regulates prostate growth, apoptosis and differentiation. Nearly 70% of clinical prostate cancer cases are AR positive. It is generally considered that AR expression in prostate cancer cells reflects not only the differentiation status of the cells, but also their sensitivity to anti-AR treatment. Thus, we checked AR expression by IHC in different prostate cancers found in our study. In the normal prostate from *Men1*^{+/+} mice, we observed strong AR nuclear staining in both luminal and basal epithelial cells, as well as in many stromal cells (Figure 3I, L), similar to what have previously been described in the literature [16-18]. We found that AR was clearly expressed in an *in situ* carcinoma (Figure 3J, M) and an adenocarcinoma (Figure 3K, N). In the meantime, we noticed that, compared with the normal control prostate (Figure 3I, L), AR expression was more heterogeneous in these lesions, with some cells showing reduced AR staining when compared with the control. By counting nuclei of prostate epithelial cells which displayed reduced intensity of AR staining relative to the average intensity observed in the majority of prostate epithelial cells in wild-type prostate, we indeed observed a significant increase in the number of cells with reduced AR expression in prostate carcinomas from *Men1* mutant mice compared to normal *Men1*^{+/+} prostate glands (Figure 3O).

Taken together, our data demonstrated the disruption of the basal cell layer in these lesions. They also suggest that menin inactivation may lead to the deregulation of AR expression.

The reduced expression of CDKN1B was evidenced in prostatic carcinomas

CDKN1B, an inhibitor of cyclin-dependent kinases, is known as a transcriptional target of menin protein [11, 12]. Its involvement in the tumorigenesis of prostate cells has also been well documented in different mouse models and in prostate cancer from patients [19, 20]. We thus analysed the expression of CDKN1B by IHC in serial sections of prostate carcinomas from *Men1*^{+/-} mice. A strong and mainly nuclear CDKN1B expression was found in virtually all luminal and basal prostatic cells from normal *Men1*^{+/+} prostate, except in some stromal cells (Figure 4A, D), consistent with previously reported studies [21, 22]. CDKN1B nuclear expression was clearly reduced in an *in situ* carcinoma (Figure 4B, E), and almost disappeared

in an adenocarcinoma (Figure 4C, F) found in *Men1*^{+/-} mice. Furthermore, when analysed by double IF staining of menin and CDKN1B, we found that the reduced expression of CDKN1B in prostate carcinomas correlated well with the loss of menin expression (Figure 4K-N), indicating that CDKN1B expression is indeed down-regulated in menin-negative prostatic cells.

Discussion

In the current study, we analysed a cohort of aged male *Men1*^{+/-} mice and found that the number of the mutant mice having normal prostate glands was significantly reduced, due to apparently the more frequent occurrence of prostate lesions in these mice. More interestingly, six mutant mice developed prostate cancer which was not observed in the age-matched wild-type littermates. It is noticed that the prostate lesions developed in heterozygous *Men1* mutant mice showed a slow cancer development procedure ranging from *in situ* carcinoma to invasive adenocarcinoma. The finding of prostate cancer development in aged male heterozygous *Men1* mice is reminiscent of the other non SV40-TAg GEM prostate cancer models, likely reflecting the relative late and slow features of prostate cancer development in men. Although one prostate cancer case has been previously documented in an independent heterozygous *Men1* mutant mouse cohort [7], to our knowledge, to date this is the first systematic study and characterization of prostate cancer related to the inactivation of the *Men1* gene.

Importantly, menin protein was undetectable in all the cancerous cells, and partial LOH was found in three out of five pre- and/or cancerous lesions from *Men1*^{+/-} mice. Menin loss in these mutant mice argues for a close relationship between *Men1* inactivation and the development of prostate cancer in these mice, i.e., an oncosuppressive role of the *Men1* gene in controlling the cell proliferation of prostate epithelial cells. However, we noticed that the occurrence of prostate cancer in these mice can only be seen in aged mice with a low frequency. This implies that *Men1* inactivation may confer a relatively minor predisposition to prostate cancer development compared with the endocrine tissues affected in MEN1 pathology, and that the participation of other factors may be needed for the fully development of the pathology. Interestingly, this is reminiscent of the mice carrying either one mutated *Pten* or *Nkx3.1* allele. Male heterozygous *Pten* mice develop only mPIN when older than 9 months [19], whereas *Nkx3.1* mutant mice show only hyperplastic or dysplastic prostatic

epithelium [23]. On the contrary, the double mutated *Pten*^{+/-}: *Nkx3.1*^{+/-} mice display high grade PIN/early carcinoma lesions at a high frequency [24, 25]. Taken together, our work suggests that the *Men1* gene could be among the rare known tumour suppressors whose disruption leads to the development of prostate cancer in mice, albeit at low incidence and slow progression rate.

Interestingly, our data suggest that menin expression could be crucial for keeping the normal level of AR expression in prostatic cells, as the latter is deregulated in prostate cancers found in *Men1* mutant mice. Generally considered as a co-regulator of transcription, menin has been reported to interact physically and functionally with some of the nuclear receptors, such as ER [9]. Although it is not known whether AR interacts physically with menin, we speculate that due to the wide range of common partners between menin and AR, there may be cross-talks between menin and AR pathways. The observation of deregulated AR expression in cancerous lesions found in *Men1* mutant mice suggests that menin inactivation and subsequent AR deregulation in these cells may lead to the disturbance of the AR pathway, which could in turn promote the progression to cancer. It is worth mentioning that the mutant mice enrolled in this study developed Leydig cell tumours with high frequency, which may raise question about whether the occurrence of these tumours plays a role in the tumorigenesis of prostate cells. However, the data from previously published mouse models of Leydig cell tumour did not offer any evidence supporting this hypothesis, as none reported prostate lesions [26-30]. Furthermore, it is generally believed that AR signalling seems to play a growth suppressing function in the initial stage of tumour development [31]. More importantly, another *Men1* mutant mouse model, developing Leydig cell tumours with a frequency similar to our model, was not reported to present prostate cancer [8]. Nevertheless, it will be interesting in the future to investigate the possible interplay between the development of Leydig cell tumours and the occurrence of prostate cancer.

It has been proposed that the growth inhibition function of AR signalling in the normal prostatic luminal cells is mediated by its induction of CDKN1B expression [31]. This indeed correlates with the downregulation of CDKN1B observed in prostate carcinomas developed in our *Men1* mutant mice. CDKN1B, which is closely related to the tumorigenesis of prostate cancers as described above, is known to be among the transcriptional targets of menin. The mouse models with *CDKN1B* disruption in combination with other genetic factors, such as *Pten* and *Nkx3.1*, lead to the appearance of a whole range of prostate cancer development, although *CDKN1B* inactivation alone displays no obvious neoplastic prostate lesions [19, 25].

The downregulation of CDKN1B found in prostate lesions in *Men1* mutant mice suggests the *in vivo* importance of CDKN1B inactivation in the tumorigenesis related to *Men1* inactivation, reminiscent of what has been observed in other mouse *Men1* tumour models [12, 32-34]. Furthermore, it would be interesting to clarify the possible relation between menin and other factors involved in CDKN1B regulation in the prostate, such as Pten and Nkx3.1, in the future.

Conclusion

Taken together, our data suggest the possible involvement of *Men1* inactivation in the tumorigenesis of prostatic cells in mice. The recent extensive genetic studies highlighted the difficulties in identifying genes involved in the tumorigenesis of prostate cells [35], indicating that prostate cancer could be a genetically complex disease with multiple predisposing factors affecting initiation, progression, and outcome of the disease. It would thus be interesting, in the future, to investigate the eventual oncosuppressive role of the *Men1* gene in prostatic cells in human. The current study also suggests that both altered AR and CDKN1B expression may be among the factors participating or facilitating the tumorigenesis of prostatic cells due to *Men1* inactivation.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

C. S. conducted most of the experiments, analyzed data and prepared figures; S. F. maintained the mouse colony and collected tissues; C. C. performed experiments, in particular histological analyses; J. L. provided experimental advice and assistance; W. M. T., B. F. and L. F. performed the histopathological analyses; Z. Q. W. supervised the experiments and helped preparing the manuscript; and C. X. Z. and L. F. conceived the study, supervised the overall project, analyzed data and wrote the manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer, France, the Ligue contre le Cancer du Rhône and de la Loire. During this study, CS was the recipient of fellowships from French government and of Association pour la Recherche contre le Cancer. SF was the recipient of fellowships from Ligue contre le Cancer de la Loire France. We thank Dominique Galendo and Marie-Pierre Cros for the maintenance of the mouse colonies, the colleagues at the “Groupe d’Etude Recherche, CNRS N°2906, France” for scientific discussion, as well as George Hinkal and Neela Guha for the correction of the manuscript.

References

1. Thakker RV: **Multiple endocrine neoplasia--syndromes of the twentieth century.** *J Clin Endocrinol Metab* 1998, **83**(8):2617-2620.
2. Boni R, Vortmeyer AO, Pack S, Park WS, Burg G, Hofbauer G, Darling T, Liotta L, Zhuang Z: **Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene detected in sporadic angiofibromas.** *J Invest Dermatol* 1998, **111**(3):539-540.
3. Hofmann M, Schilling T, Heilmann P, Haisken O, Wuster C, Brandi ML, Ziegler R, Nawroth PP: **[Multiple endocrine neoplasia associated with multiple lipomas].** *Med Klin (Munich)* 1998, **93**(9):546-549.
4. Yang Y, Hua X: **In search of tumor suppressing functions of menin.** *Mol Cell Endocrinol* 2007, **265-266**:34-41.
5. Bertolino P, Radovanovic I, Casse H, Aguzzi A, Wang ZQ, Zhang CX: **Genetic ablation of the tumor suppressor menin causes lethality at mid-gestation with defects in multiple organs.** *Mech Dev* 2003, **120**(5):549-560.
6. Bertolino P, Tong WM, Galendo D, Wang ZQ, Zhang CX: **Heterozygous Men1 mutant mice develop a range of endocrine tumors mimicking multiple endocrine neoplasia type 1.** *Mol Endocrinol* 2003, **17**(9):1880-1892.
7. Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, Garrett-Beal L, Emmert-Buck MR, Edgemon KA, Lorang D, Libutti SK, Chandrasekharappa SC, Marx SJ *et al*: **A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(3):1118-1123.
8. Loffler KA, Biondi CA, Gartside M, Waring P, Stark M, Serewko-Auret MM, Muller HK, Hayward NK, Kay GF: **Broad tumor spectrum in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 1.** *Int J Cancer* 2007, **120**(2):259-267.

9. Dreijerink KM, Mulder KW, Winkler GS, Hoppener JW, Lips CJ, Timmers HT: **Menin links estrogen receptor activation to histone H3K4 trimethylation.** *Cancer Res* 2006, **66**(9):4929-4935.
10. Dreijerink KMA, Varier RA, van Beekum O, Jeninga EH, Hoppener JWM, Lips CJM, Kummer JA, Kalkhoven E, Timmers HTM: **The Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1) tumor suppressor regulates PPAR{gamma}-dependent adipocyte differentiation.** *Mol Cell Biol* 2009:MCB.01001-01008.
11. Milne TA, Hughes CM, Lloyd R, Yang Z, Rozenblatt-Rosen O, Dou Y, Schnepf RW, Krankel C, Livolsi VA, Gibbs D *et al*: **Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(3):749-754.
12. Karnik SK, Hughes CM, Gu X, Rozenblatt-Rosen O, McLean GW, Xiong Y, Meyerson M, Kim SK: **Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(41):14659-14664.
13. Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R *et al*: **Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee.** *Cancer Res* 2004, **64**(6):2270-2305.
14. Liu Y, Mo JQ, Hu Q, Boivin G, Levin L, Lu S, Yang D, Dong Z: **Targeted Overexpression of Vav3 Oncogene in Prostatic Epithelium Induces Nonbacterial Prostatitis and Prostate Cancer.** *Cancer Res* 2008, **68**(15):6396-6406.
15. Weinstein MH, Signoretti S, Loda M: **Diagnostic Utility of Immunohistochemical Staining for p63, a Sensitive Marker of Prostatic Basal Cells.** *Mod Pathol* 2002, **15**(12):1302-1308.
16. Tsurusaki T, Aoki D, Kanetake H, Inoue S, Muramatsu M, Hishikawa Y, Koji T: **Zone-dependent expression of estrogen receptors alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**(3):1333-1340.
17. Svensson J, Kindblom J, Shao R, Moverare-Skrtic S, Lagerquist MK, Andersson N, Sjogren K, Venken K, Vanderschueren D, Jansson J-O *et al*: **Liver-derived IGF1 enhances the androgenic response in prostate.** *J Endocrinol* 2008, **199**(3):489-497.

18. Ishii K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Sugimura Y: **Role of stromal tenascin-C in mouse prostatic development and epithelial cell differentiation.** *Developmental Biology* 2008, **324**(2):310-319.
19. Di Cristofano A, De Acetis M, Koff A, Cordon-Cardo C, P Pandolfi P: **Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse.** *Nat Genet* 2001, **27**(2):222-224.
20. Macri E, Loda M: **Role of p27 in prostate carcinogenesis.** *Cancer Metastasis Rev* 1998, **17**(4):337-344.
21. Trotman LC, Niki M, Dotan ZA, Koutcher JA, Di Cristofano A, Xiao A, Khoo AS, Roy-Burman P, Greenberg NM, Van Dyke T *et al*: **Pten dose dictates cancer progression in the prostate.** *PLoS Biol* 2003, **1**(3):E59.
22. Zhong C, Saribekyan G, Liao C-P, Cohen MB, Roy-Burman P: **Cooperation between FGF8b Overexpression and PTEN Deficiency in Prostate Tumorigenesis.** *Cancer Res* 2006, **66**(4):2188-2194.
23. Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, Norton CR, Gridley T, Cardiff RD, Cunha GR *et al*: **Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer.** *Genes Dev* 1999, **13**(8):966-977.
24. Kim MJ, Cardiff RD, Desai N, Banach-Petrosky WA, Parsons R, Shen MM, Abate-Shen C: **Cooperativity of Nkx3.1 and Pten loss of function in a mouse model of prostate carcinogenesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(5):2884-2889.
25. Gao H, Ouyang X, Banach-Petrosky W, Borowsky AD, Lin Y, Kim M, Lee H, Shih WJ, Cardiff RD, Shen MM *et al*: **A critical role for p27kip1 gene dosage in a mouse model of prostate carcinogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(49):17204-17209.
26. Matzuk MM, Finegold MJ, Su J-GJ, Hsueh AJW, Bradley A: **[alpha]-Inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice.** *Nature* 1992, **360**(6402):313-319.
27. Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL: **Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development.** *Cell* 1994, **79**(3):415-425.
28. Matzuk MM, Finegold MJ, Mishina Y, Bradley A, Behringer RR: **Synergistic effects of inhibins and mullerian-inhibiting substance on testicular tumorigenesis.** *Mol Endocrinol* 1995, **9**(10):1337-1345.

29. Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL, Behringer RR: **Genetic analysis of the Mullerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation.** *Genes & Development* 1996, **10**(20):2577-2587.
30. Franklin DS, Godfrey VL, O'Brien DA, Deng C, Xiong Y: **Functional Collaboration between Different Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Suppresses Tumor Growth with Distinct Tissue Specificity.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(16):6147-6158.
31. Litvinov IV, De Marzo AM, Isaacs JT: **Is the Achilles' Heel for Prostate Cancer Therapy a Gain of Function in Androgen Receptor Signaling?** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**(7):2972-2982.
32. Hussein N, Lu J, Casse H, Fontaniere S, Morera AM, Guittot SM, Calender A, Di Clemente N, Zhang CX: **Deregulation of anti-Mullerian hormone/BMP and transforming growth factor-beta pathways in Leydig cell lesions developed in male heterozygous multiple endocrine neoplasia type 1 mutant mice.** *Endocr Relat Cancer* 2008, **15**(1):217-227.
33. Hussein N, Casse H, Fontaniere S, Morera AM, Asensio MJ, Bakeli S, Lu JL, Coste I, Di Clemente N, Bertolino P *et al*: **Reconstituted expression of menin in Men1-deficient mouse Leydig tumour cells induces cell cycle arrest and apoptosis.** *Eur J Cancer* 2007, **43**(2):402-414.
34. Fontaniere S, Casse H, Bertolino P, Zhang CX: **Analysis of p27(Kip1) expression in insulinomas developed in pancreatic beta-cell specific Men1 mutant mice.** *Fam Cancer* 2006, **5**(1):49-54.
35. Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N, Yu K, Chatterjee N, Welch R, Hutchinson A *et al*: **Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer.** *Nat Genet* 2008, **40**(3):310-315.

Figure legends

Figure 1

Precancerous and cancerous lesions are detected in aged male heterozygous *Men1* mutant mice. Haematoxylin and eosin staining of normal lateral prostate lobe from a 24-month-old *Men1*^{+/+} mouse (A) and precancerous or cancerous lesions observed in prostate glands from heterozygous *Men1* mutant mice (B-F). (B) mPIN found in anterior prostate, having signet ring variant: cytoplasmic vacuoles displacing the cell nuclei (21-month-old mouse). (C) *In situ* carcinoma in dorsal prostate (26-month-old mouse). (D) Adenocarcinoma in anterior prostate with branching and papillary infolding (23-month-old mouse). (E) Differentiated invasive adenocarcinoma in lateral prostate (*in situ* component) from a 23-month-old mouse. (F) Invasive component of the same lesion as (E) showing invasion to the prostatic connective tissue. Insets show a magnified view of a part of prostate glands. Scale bars 50 μ m.

Figure 2

Menin expression is inactivated in prostate cancers from *Men1*^{+/-} mice. Microscopic images of paraffin-embedded sections of prostate glands from *Men1*^{+/+} (A) and *Men1*^{+/-} mice (B-I) subjected to menin detection by IHC analysis using antibody against menin. Menin is widely expressed in the nuclei of prostate epithelial cells in lateral (LP), dorsal (DP), ventral (VP) and anterior (AP) prostate from a 21-month-old *Men1*^{+/+} mice (A), but is completely inactivated in two of four tested mPIN and in all six prostatic cancerous lesions developed in *Men1*^{+/-} mice. Four representative types of lesions are shown: an mPIN from a 21-month-old *Men1*^{+/-} mouse (B, F), an *in situ* prostate carcinoma from a 26-month-old mouse (C, G), a well-differentiated adenocarcinoma from a 23-month-old mouse (D, H) and a papillary adenocarcinoma from a 23-month-old mouse (E, I). Panels F-I are two-fold magnification of the upper panels (B-E). Insets show an amplified view of a part of prostate glands. Scale bars 50 μ m. (J) Representative result of two independent LOH analyses of prostatic lesions in *Men1*^{+/-} mice. Semi-quantitative amplification of *Men1* wild-type (+) and mutant (-) alleles with PCR, followed by Southern blot, was performed on DNA samples extracted from microdissected paraffin-embedded sections of *Men1*^{+/+} normal prostate (WT) and prostate lesions from *Men1*^{+/-} mice, including two mPIN (PIN1 and PIN2) and one adenocarcinoma (ADC). Tail DNA from wild-type (+/+) and heterozygous (+/-) *Men1* mice were used as

control. The intensity of both alleles (+ and -) was quantified and used to calculate the +/- ratio, which was compared with the +/- ratio obtained from the controls. Note that the wild-type *Men1* allele is partially lost in prostate lesions compared with the control.

Figure 3

Prostate cancers from *Men1*^{+/-} mice do not express p63 and display heterogeneous AR expression. (A-H) Representative images of double IF staining using antibodies against menin (red) and p63 (green) performed on paraffin-embedded sections of a normal prostate from a 24-month-old mouse *Men1*^{+/+} mouse (A-D) and an adenocarcinoma found in a *Men1*^{+/-} mouse of the same age (E-H). DAPI stains cell nuclei. Note that cancerous prostate cells (E-H) express neither menin nor p63, whereas normal p63-expressing basal cells scattered within the lesion remain menin-positive (shown by white arrowheads). Boxed areas are magnified in the insets. Scale bars 50 μ m. (I-N) IHC using antibody against AR was performed on paraffin-embedded sections of prostate tissues from *Men1*^{+/+} (I, L) and *Men1*^{+/-} (J, M and K, N) mice. Note that AR is expressed in all luminal and basal prostatic epithelial cells, and even in some stromal cells, in the normal lateral prostate from a 24-month-old *Men1*^{+/+} mice (I, L). AR expression is present but more heterogeneous in an *in situ* prostate carcinoma (J, M, 26-month-old mouse) and an adenocarcinoma (K, N, 23-month-old mouse) from *Men1*^{+/-} mice, when compared with the average staining intensity in the control. Panels L-N are two-fold magnification of the upper panels (I-K). Insets show an amplified view of a part of prostate glands. (O) Prostatic epithelial nuclei showing reduced intensity of AR expression, relative to the average AR staining intensity in normal prostate, were counted in six random microscopic fields in normal prostate glands from *Men1*^{+/+} mice (n=3) and carcinomas observed in *Men1*^{+/-} prostate glands (n=4), stained with AR antibody. The results are expressed as a percentage of total prostatic epithelial cells (based on 250 nuclei counts). Values are means \pm standard error of the mean. *** Significant difference from normal *Men1*^{+/+} prostate with a two-tailed Student's *t*-test ($P < 0.0001$).

Figure 4

Reduced CDKN1B expression in prostate cancers from *Men1*^{+/-} mice. (A-F) IHC was performed on paraffin-embedded sections of prostate tissues from *Men1*^{+/+} (A, D) and *Men1*^{+/-} (B, E and C, F) mice using antibody against CDKN1B. Note that, in the normal prostate from aged *Men1*^{+/+} mice (26-month-old), CDKN1B is expressed in all prostatic epithelial cells, but

not in all stromal cells (A, D). CDKN1B expression is reduced in an *in situ* carcinoma (B, E, 26-month-old mouse) and an adenocarcinoma (C, F, 23-month-old mouse) from *Men1*^{+/-} mice, when compared with the wild-type prostate. Panels D-F are two-fold magnification of the upper panels (A-C). Insets show an amplified view of a part of prostate glands. (G-N) Menin (red) and CDKN1B (green) expressions examined by double IF staining in prostate glands from a 21-month-old *Men1* wild-type mouse (G-J), and an adenocarcinoma from a 23-month-old *Men1*^{+/-} mouse (K-N). DAPI stains cell nuclei. Note that menin and CDKN1B expressions are co-localised in normal prostate epithelium, whereas both disappear in the cancerous lesions. Arrowheads show that basal cells remain both menin and CDKN1B positive in cancerous lesions. Boxed areas are magnified in the insets. Scale bars 50 μ m.

Table 1Morphologic alterations in the prostate glands of male heterozygous *Men1* mice.

Type of pathology	<i>Men1</i> ^{+/+}	<i>Men1</i> ^{+/-}
Normal prostate	7/23 (30.4%) ^a	3/47 (6.4%)*
Hyperplasia	10/23 (43.5%)	22/47 (46.8%)
mPIN	6/23 (26.1%)	16/47 (34%)
Carcinoma	0/23 (0%)	6/47 (12.8%)

Men1^{+/+} and *Men1*^{+/-} male mice were monitored for cancer development and examined by histology between 18 and 26 months. ^a Number of mice of each histological category over the total number of the mice examined. The percentage of mice in each histological category is shown in parentheses. For each mouse, only the most severe type of lesion was taken into account. For this reason, mPIN observed in four mice having carcinoma lesions were not counted in this table. * p=0.0266 (Fisher's exact test).

Fig. 1

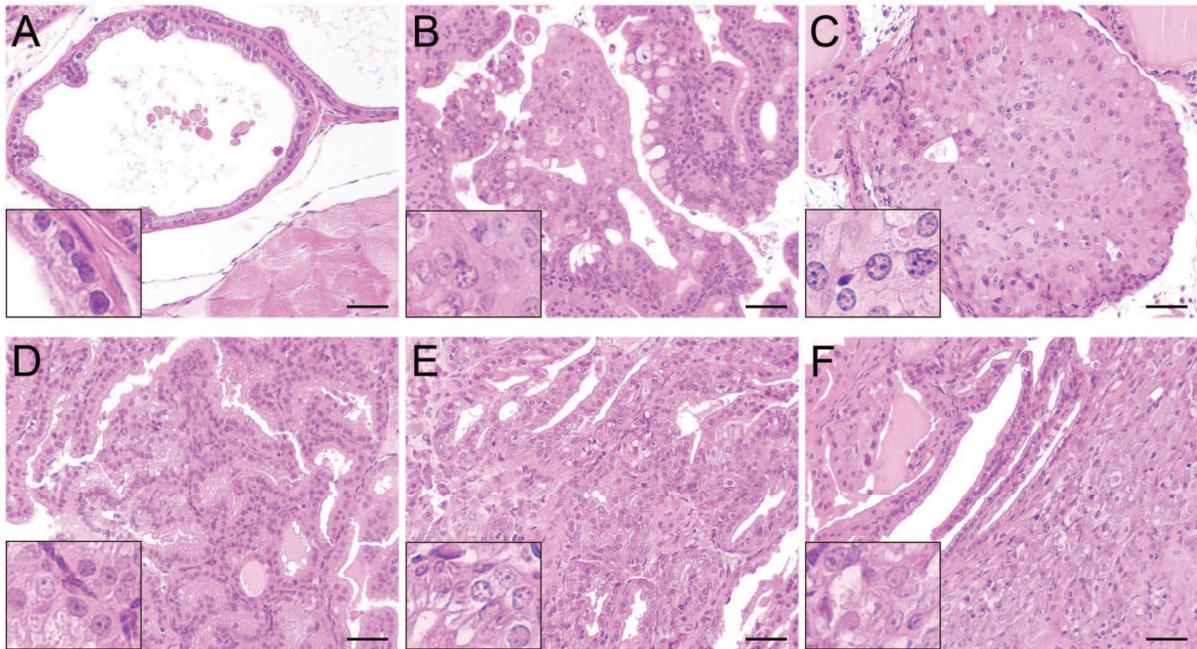


Fig. 2

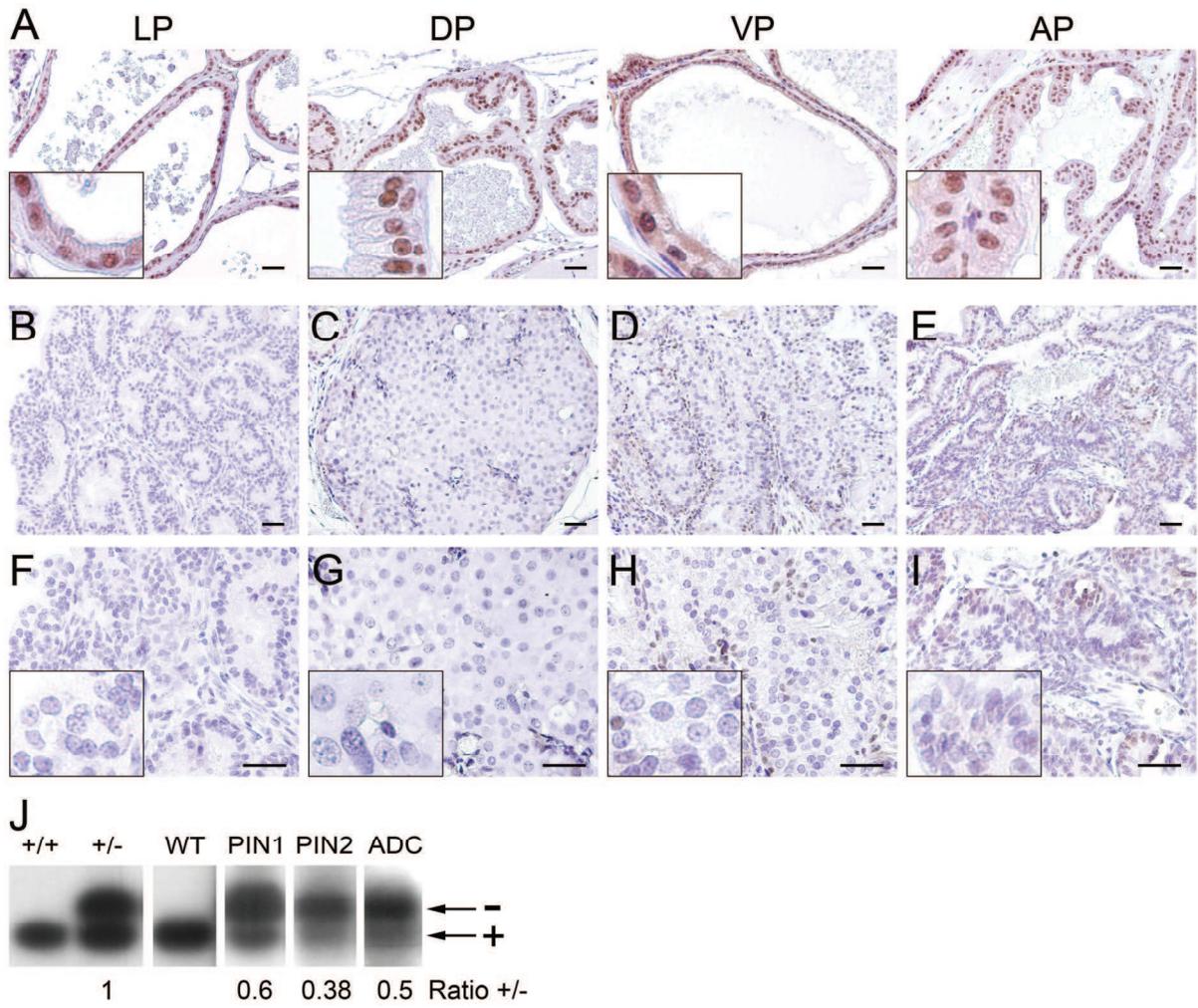


Fig. 3

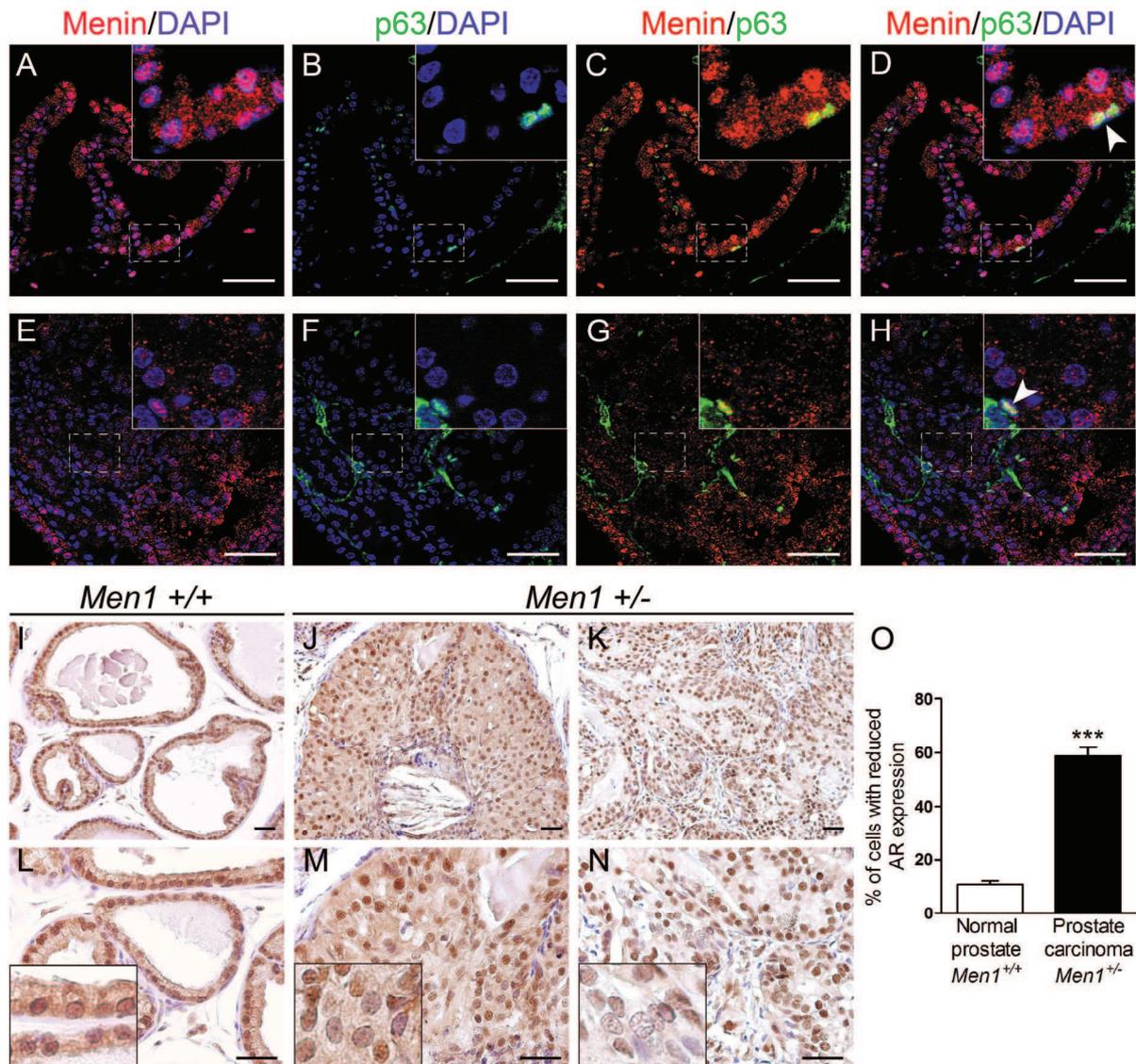
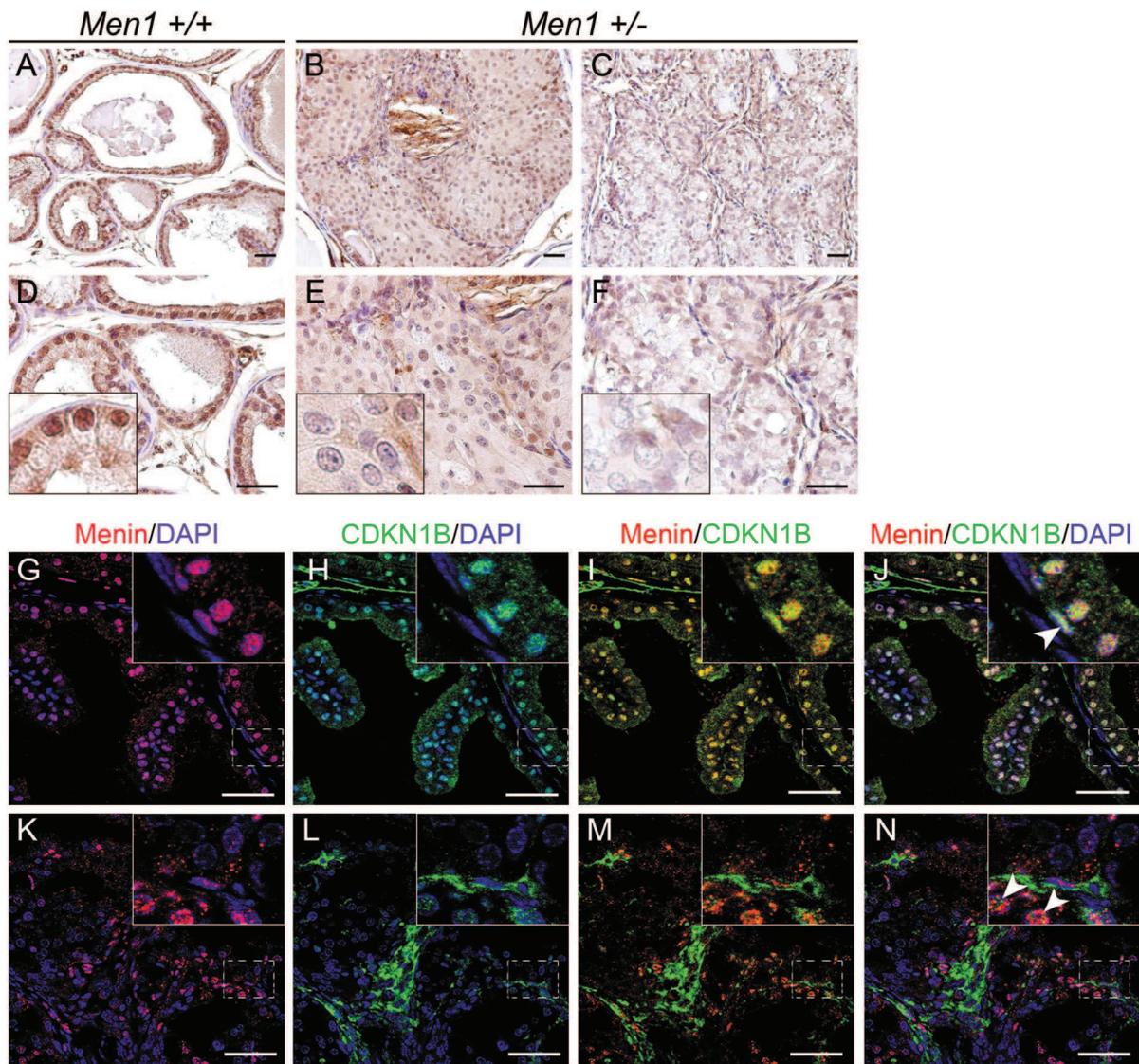


Fig. 4



ARTICLE 2: High incidence of mammary
intraepithelial neoplasia development in
murine mammary glands with *Men1*
ablation

High incidence of mammary intraepithelial neoplasia development in murine mammary glands with *Men1* ablation

Christelle Seigne^a, Magdalena Auret^b, Christine Carreira^a, Isabelle Treilleux^c, Sophie Goddard-Léon^c, Jieli Lu^a, Lucien Frappart^d and Chang Xian Zhang^{a*}

^a CNRS UMR5201, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Signalisation et Cancer, Centre Léon Bérard, Lyon F-69008, France; Université Claude Bernard Lyon, Lyon F-69008, France; Université Lyon 1, Domaine Rockefeller, Lyon F-69008, France.

^b Queensland Institute of Medical Research, Herston, QLD, Australia

^c Centre Léon Bérard, service d'anatomo-cytopathologie, Lyon, France

^d Département de Pathologie, INSERM U590, Centre Léon Bérard, Hôpital Edouard Herriot, HCL, Lyon F-69008, France.

*Correspondence

Chang Xian Zhang

Laboratoire Génétique Moléculaire, Signalisation et Cancer

CNRS UMR5201

Centre Léon Bérard,

28 rue Laënnec, 69008 Lyon, France.

Phone: (+33)-4-69 16 66 63 Fax: (+33)-4-69 16 66 60

E-mail: zhang@lyon.fnclcc.fr

ABSTRACT

Mutations of the *MEN1* tumor suppressor gene predispose to the development of multiple endocrine neoplasia syndrome (MEN1), characterized by multiple endocrine tumors, including prolactinomas. The recent findings of an interaction between menin, encoded by the gene, and estrogen receptor, and rare cases of mammary carcinomas observed in our heterozygous *Men1* mutant mice, led us to consider a putative tumor suppressor function of *Men1* in mammary cells. In the present study, we disrupted the *Men1* gene in luminal mammary epithelial cells in mice. Markedly, a significantly higher incidence of mammary intraepithelial neoplasia (MIN) developed in *Men1* mutant mice (51.5%), compared with that observed in *WapCre-Men1^{+/+}* and *Men1^{F/F}* control mice (respectively 0% and 7.1%). Due to the leakage of *WapCre* transgene expression, prolactinomas were observed in 83.3% of mutant mice, leading to premature death. However, several lines of evidence suggested that the increased incidence of MIN lesions was rather linked to *Men1* disruption than prolactinoma development: (a) No correlation was observed between an elevated serum prolactin concentration and the development of MIN; (b) Expression of phospho-STAT5 was not increased in mammary lesions; (c) In another *Men1* mouse model developing prolactinomas, but with intact mammary expression of menin, the incidence of MIN was shown to be twice as less as in our *Men1* mutant mice. Interestingly, we found a decrease in membrane-associated E-cadherin and beta-catenin expression, a menin partner, in MIN lesions. Taken together, the current work suggests a role of *Men1* inactivation in the development of mammary pre-cancerous lesions in mice.

Keywords: Men1, MIN, mammary neoplasia, adenosquamous carcinoma, prolactinoma, WapCre leakage

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common malignancy in women worldwide and remains the leading cause of cancer-related mortality (World Health Organization). A relatively small portion of diagnosed breast cancers (5-10%) arise in individuals who inherit mutations in breast cancer susceptibility genes, such as the *BRCA1* and *BRCA2* genes¹. Thus, a large subset of breast cancer cases remains poorly understood as to the underlying mechanisms responsible for their occurrence. This opens a broad field of investigations to identify new genes involved in breast cancer development. Mouse modeling of human breast cancer has developed rapidly over the past ten years and became a useful tool to identify new genes involved in tumor susceptibility, as existing models mimic many essential features of the variety of disease found in the human breast².

The *MEN1* gene is a tumor suppressor in a wide range of endocrine and non endocrine tissues. Mutations of the *MEN1* gene predispose patients to multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1), characterized by the occurrence of multiple endocrine tumors affecting mainly the parathyroid glands, endocrine pancreas and anterior pituitary³. Shortly after the identification of the *MEN1* gene, several non endocrine tumors were also reported in MEN1 patients, such as lipoma and angioma^{4, 5}. The *MEN1* gene encodes a primarily nuclear-localized protein named menin that has been shown to interact with a variety of other proteins⁶. In particular, its interaction with several transcriptional factors and co-factors suggests that menin may act as an adaptor protein involved in the regulation of gene expression. Recently, menin has been shown to physically interact with beta-catenin^{7, 8} and to be required for Wnt/beta-catenin signaling in islet tumor cells⁷. Menin also interacts with the MLL (mixed lineage leukemia) protein, in a chromatin-remodeling complex with histone methyltransferase (HMT) activity on H3K4⁹⁻¹¹. Interestingly, Dreijerink *et al.* reported a physical and functional interaction between menin and estrogen receptor alpha (ER α), the former acting as a coactivator of ER-mediated transcriptional activity through recruitment of HMT complex on ER α target genes¹². More recently, the same group identified an interaction between menin and another member of the nuclear receptor family, PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)¹³. They have shown that menin was required for the PPAR γ -mediated adipocyte differentiation, as well as the co-activation of PPAR γ target genes through recruitment of H3K4 methyltransferase activity. The existence of an eventual link between the *Men1* gene and hormone-dependent tissues was further suggested by the documentation by Crabtree *et al.* of

one prostate cancer case developed in their heterozygous *Men1* mouse cohort¹⁴ and three cases of mammary carcinomas observed in our previously analyzed cohort of female heterozygous *Men1* mutant mice, while none of the control developed such lesions¹⁵. Considering the major role of ER in the mammary gland physiology and the tumor suppressor function of menin in endocrine tissues, we found of particular interest to investigate menin's potential involvement in the mammary gland development, physiology and tumorigenesis.

In the present study, we have disrupted the *Men1* gene in luminal mammary epithelial cells in mice to study the potential effect of menin inactivation on mammary tissues. Our data showed that *Men1* ablation in mammary epithelium did not lead to obvious defects neither in mammary gland pre- and post-pubertal development nor in the gland physiology. On the contrary, a significantly higher proportion of mutant mice developed mammary intraepithelial neoplasia (MIN). Interestingly, we found a substantial decrease in membrane-associated beta-catenin and E-cadherin expression in the mammary lesions. Taken together, these results suggest a potential role of *Men1* disruption in the predisposition to mammary pre-cancerous lesions in mice.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic mice.

Mice carrying two floxed alleles of the *Men1* gene (*Men1*^{F/F}) were generated in mixed C57BL6-129/Sv genetic background as previously described¹⁶. To disrupt the *Men1* gene specifically in luminal cells of the mammary epithelium, *Men1*^{F/F} mice were crossed with *WapCre* transgenic mice, obtained from NCI Mouse Models of Human Cancers Consortium repository (B6.Cg-Tg(*WapCre*)11738Mam, strain number 01XA8)¹⁷, expressing Cre under the control of the whey acidic protein promoter. Mice were maintained on a 12-hour light/12-hour dark cycle with free access to water and standard mouse chow, and housed in pathogen-free facilities. All animal experiments were approved by the Regional Animal Experiments Committee of Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and were conducted in accordance with the ethical guidelines. Mammary samples from *Men1*^{loxP/loxP}/*Rip-Cre*⁺ female mice¹⁸ were harvested by M. Auret from Dr. Nick Hayward's team in Queensland Institute, and examined histologically by our pathologist.

Genotyping and recombination analysis.

PCR genotyping was performed from tail-extracted genomic DNA as described previously^{16, 17}. Cre-Lox excision in mammary glands and other organs was detected by the same PCR analysis on tissue-isolated genomic DNA¹⁶, using the following three primers: 3f1, 5'-GGATTCTGCCCCAGGC; 3r1, 5'-CACCTCCATCTTACGGTCG; 2f0, 5'-CTTACCTCTTCTCATGTCTG (the PCR strategy is schematized in figure 2A).

Histology and serum prolactin dosage.

Exclusively female mice were used in the experiments. Pregnancy samples were obtained on day 15 after vaginal plugs were identified. Lactating glands were obtained from mice on day 15 after litters' birth. Involuting mammary glands were collected from mice seven days after pups' weaning. For mammary gland lesions monitoring, each female mouse was mated with a male breeder for up to three rounds of pregnancies to induce pregnancy-dependent *WapCre* transgene expression, and kept until sacrifice at defined time points. Ill and distressed mice were euthanized by cervical dislocation following the institutional guidelines. Necropsies were done and organs were fixed in 4% neutral buffered formalin for at least 24h at room temperature. Fixed tissues were embedded in paraffin and sectioned at 3µm, routinely stained with H&E, and microscopically examined by a pathologist (L. Frappart) for histological analysis. Histopathological analyses were based on the criteria described by the Annapolis Pathology Panel². The classification of World Health Organization was also taken into account.

Blood was collected from control and mutant females by intracardiac puncture immediately after cervical dislocation, and serum was isolated. Circulating prolactin level was measured using Mouse/rat Prolactin ELISA kit (Calbiotech, Inc.) following the manufacturer's instructions.

Immunohistochemistry and 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation.

To assess cell proliferation, mice were injected i.p. with 0.05 mg 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma)/g of body weight 2h before sacrifice. BrdU incorporation was detected on sections by immunohistochemistry using a monoclonal antibody against BrdU (Sigma) following the manufacturer's recommendations. The percentage of BrdU-positive cells in mammary glands was determined by counting BrdU-positive epithelial cells over the

total number of epithelial cells in ten non overlapping fields per slide under a 40x objective lens (two slides per mouse and two mice per genotype).

Immunohistochemical (IHC) staining was performed on mammary gland sections as described previously¹⁵. Briefly, after endogenous peroxidase inactivation, antigen retrieval and antibody diluent treatment (DAKO, Carpinteria, CA, USA), sections were incubated overnight with primary antibodies. After incubation with the corresponding secondary antibody (Vector Lab, 1:200), signal was amplified using ABC Vectastain elite kit (Vector Lab) and revealed with DAB (Vector Lab). In all these analyses, the control without primary antibody was systematically included to rule out the non-specific staining due to secondary antibodies (data not shown). Primary antibodies used were: menin (BL342, rabbit polyclonal, Bethyl Laboratories, 1:2000), phospho-Stat5 Tyr694 (C11C5, rabbit monoclonal, Cell Signaling Technology Inc., 1:200), beta-catenin (#9652, rabbit polyclonal, Cell Signaling Technology Inc., 1:700), E-cadherin (#610181, mouse monoclonal, BD Transduction Laboratories, 1/1000), growth hormone (HGH, rabbit polyclonal, Novocastra, 1/100) and prolactin (C-17, goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1/100). Antigen retrieval step was skipped for GH and prolactin staining.

Statistical analyses

All analyses were performed using Prism4 software (GraphPad) and the statistical test used for each analysis is indicated in the legend of the corresponding figure.

RESULTS

Menin expression in adult mammary glands

To investigate the possible role of the *Men1* gene in mammary glands, we first analyzed menin expression by immunohistochemistry during the postnatal development of mammary glands in wild-type female mice (figure 1). We found that menin was expressed both in the luminal and basal (myoepithelial) cell layer of the mammary epithelium, showing predominantly nuclear staining, in five-week-old virgin mice and in mice during pregnancy (pregnancy day 15), lactation (lactation day 11), as well as during involution of the mammary glands (involution day 7). Note that menin expression was also detected in the nuclei of adipocytes, but not in the stromal cells surrounding the glands.

Mammary-specific disruption of the Men1 tumor suppressor gene

To disrupt the *Men1* gene in mammary epithelial cells, the mice carrying a floxed *Men1* allele (*Men1*^{F/F})¹⁶ were crossed with *WapCre* transgenic mice expressing Cre recombinase under the control of the whey acidic protein (*Wap*) promoter, known to be expressed specifically in luminal mammary epithelial cells during pregnancy and lactation¹⁷. To check the mammary specificity of *WapCre*-mediated *Men1* disruption, we performed PCR analysis with primers (shown as arrowheads in figure 2A) amplifying fragments of *Men1* wild-type (+), floxed (F) and deleted (Δ) alleles on genomic DNA extracted from a large panel of organs from *WapCre-Men1*^{+F} female mice, including mammary glands. Mammary glands were collected from three-month-old virgins and from parous female mice at lactation day 15 after first, second or third pregnancy (figure 2B). *WapCre*-mediated *Men1* disruption in different tissues was validated by the detection of the PCR fragment specific for the *Men1* Δ allele resulted from the excision of the *Men1* floxed exon 3. As expected, *Men1* disruption occurred in mammary glands from *WapCre-Men1*^{+F} mice, the efficiency increasing with pregnancy, as illustrated by the increased intensity of the Δ -specific PCR product. Among three virgin *WapCre-Men1*^{+F} mice analyzed, one presented a leakage of the *WapCre* transgene in mammary glands. As previously described¹⁷, the leakage of this transgene was also seen in the brain in all tested mice. Surprisingly, we also noted an activity of the *WapCre* transgene in pituitary glands in two out of three tested mice, which had never been reported before (Figure 2B). The excision of the *Men1* floxed allele was detected in none of other tested organs (data not shown), indicating that the leakage of *WapCre* transgene expression seems to be limited to the brain and pituitary gland.

The specificity and efficiency of *Men1* disruption in luminal mammary cells were further assessed in *WapCre-Men1*^{F/F} mice by menin detection with IHC. We observed that the inactivation of menin expression could be found in a subset of mammary luminal epithelial cells in some virgin mice (10-20%, data not shown), in approximately half of luminal cells during the first round of pregnancy and in nearly 90% of luminal cells after the third pregnancy (Figure 2C).

Normal mammary gland development in WapCre-Men1^{F/F} mice

We investigated if *Men1* inactivation had an impact on the physiology of the mammary glands. We thus analyzed the glands from *Men1*^{F/F} and *WapCre-Men1*^{F/F} virgin female littermates at 3 months of age, but also the same groups of mice at day 15 of pregnancy (P15)

and seven days after weaning (involution day 7, I7) for up to three pregnancies (G1, G2, G3) by microscopic analysis of sectioned tissue. Although menin inactivation occurred in a substantial proportion of the cells (see above) in the mutant mice, we did not notice any macroscopic or microscopic morphological differences between control and mutant mice either in virgin group, or mouse groups at P15 or I7 (figure 3A). Consistent with these observations, *WapCre-Men1^{F/F}* female mice were able to breastfeed their pups, all pups showing normal survival and growth (data not shown).

During post-pubertal and pregnancy-associated development, the mammary glands are subjected to massive proliferation². Thus, we examined whether *Men1* disruption resulted in modifications of epithelial proliferation by assessing the incorporation of BrdU in mammary glands from age-matched control and mutant littermate mice (figure 3B, C). Mammary glands from both genotypes proliferated massively during the first pregnancy (G1P15), with a similar increase of BrdU-positive cells, and regressed into a virgin-like state at involution (G1I7 and G3I7). We noted that the percentage of proliferating cells during the third pregnancy (G3P15) was not as high as during the first one, but was rather comparable with the proliferation rate observed in virgin mice. We did not see any significant difference in the number of BrdU-positive epithelial cells between *WapCre-Men1^{F/F}* and *Men1^{F/F}* female mice during the third pregnancy or the involution afterward.

Taken together, *WapCre-Men1^{F/F}* female mice did not show, albeit mammary luminal cell-specific menin inactivation in a substantial proportion of cells, any detectable consequence on morphological development, physiology or proliferation rate throughout mammary gland pre- and post-pubertal development.

Mammary intraepithelial neoplasia was detected with high frequency in WapCre-Men1^{F/F} mice

The effect of *Men1* inactivation in mammary gland tumorigenesis was studied in a cohort of 120 multiparous female mice. In order to induce *WapCre* transgene expression, 66 *WapCre-Men1^{F/F}* female mice, as well as 28 *Men1^{F/F}* and 26 *WapCre-Men1^{+/+}* female mice of two control groups, underwent three rounds of pregnancies. Females were then monitored over a 20-month period and necropsied at different age groups, respectively at 9-12, 12-15 and >15 months of age. As summarized in table 1, while the control *WapCre-Men1^{+/+}* mice developed no mammary lesions in all age groups, the control *Men1^{F/F}* mice showed a low but constant incidence of mammary intraepithelial neoplasia (MIN), with one in each of two older

age groups. On the contrary, from 9 months of age, a substantial number of *WapCre-Men1^{F/F}* mutant mice developed mammary neoplasia. MIN lesions were found in 38.5% of mutant mice in the age group 9-12 months. The incidence increased with age and reached 48.6% and 66.7% respectively in age groups 12-15 and >15 months, with 4.8- (p=0.0548, non significant) and 8-fold (p=0.0057, significant) increase compared with the corresponding age groups of the control *Men1^{F/F}* mice. Starting from 12 months of age, *WapCre-Men1^{F/F}* mutant mice succumbed massively because of pituitary tumor development (see below). Only two mutant mice survived beyond 18 months of age, and both developed MIN lesions. The overall incidence of MIN lesions in *WapCre-Men1^{F/F}* mutant mice was found to be significantly higher (51.5%) than that in *Men1^{F/F}* control mice (7.1%) by 7.2 fold (p<0.0001, significant). The histological examination also revealed the occurrence of adenosquamous carcinoma in one *Men1^{F/F}* (3.6%) and two *WapCre-Men1^{F/F}* mice (3%) without any statistical difference. A poorly differentiated infiltrating carcinoma was also detected in an *Men1^{F/F}* mouse (3.6%). The classification of mammary lesions observed in our mice was based on recommendations of the Annapolis Pathology Panel². Mammary intraepithelial neoplasia (MIN), which is known to be a potential precursor lesion to mammary cancer, displayed as focal or multifocal areas of intraluminal epithelial proliferation with significant nuclear atypia (large pleomorphic nuclei with hyperchromasia) and frequent mitosis, without any criteria of invasion² (figure 4A, top and middle panels). Noticeably, nearly 90% of MIN lesions found in both control and mutant mice were associated with squamous metaplasia. The tumor cells lining the cavities often underwent squamous differentiation (metaplasia) with keratinization. Adenosquamous carcinomas were defined as invasive lesions with areas of glandular tumor tissue intimately admixed with often widely dispersed solid nests of squamous differentiation (figure 4A, lower panel). Taken together, although mammary carcinomas appeared to be rare and non significant events in *Men1* mammary-specific mutant mice, the development of MIN lesions, a known precursor lesion to mammary cancer, frequently occurred in the mutant mice.

The absence of menin expression was shown by IHC staining in the majority of tested lesions, respectively in 10/13 MIN and in the two adenosquamous carcinomas developed in *WapCre-Men1^{F/F}* mice (figure 4A, right column). All three tested MIN lesions and the two carcinomas found in *Men1^{F/F}* mice were shown to express menin (data not shown). Overall, our data indicate that, whereas *Men1^{F/F}* female mice are prone to low-incidence spontaneous MIN and carcinoma lesions, *Men1* ablation in mammary epithelial cells seems to exacerbate significantly the development of pre-cancerous MIN lesions.

The expression status of estrogen receptor (ER α) in MIN lesions found in the mutant mice was determined by IHC analysis. Compared with what was seen in normal mammary glands, both its intensity and the number of ER α -positive cells were clearly reduced in all tested lesions (Figure 4B).

WapCre-Men1^{F/F} female mice develop prolactinomas consequently to the pituitary leakage of the WapCre transgene

WapCre-Men1^{F/F} mice were found to die significantly earlier, with a mean survival around 14 months, compared with more than 21 months for the other two genotypes (figure 5A, log-rank test, $p < 0.0001$). Necropsies identified the cause of death as highly haemorrhagic pituitary adenomas occupying a large proportion of the skull and developing in 83.3% of *WapCre-Men1^{F/F}* mice (table 2), consistent with the detected leakage of the *WapCre* transgene in pituitary gland. Pituitary tumor development started around 9 months of age in *WapCre-Men1^{F/F}* mice, reaching an incidence of 61.5% of mice between 9 and 12 months, 94.3% of mice at 12-15 months and 77.8% of mice older than 15 months (table 2). This apparent drop in pituitary tumor incidence after 15 months can be explained by the selection of mice who were able to survive up to more than 15 months, owing to the absence of pituitary lesions.

The pituitary tumors were shown to originate from *pars distalis* region of the anterior pituitary by histological examination (figure 5B). Immunohistochemical analysis of menin expression confirmed that the *Men1* gene was completely inactivated, indicating that these tumors developed consequently to menin inactivation. The expression of GH (growth hormone) was almost completely absent in these tumors, while the number of prolactin-secreting pituitary cells was largely increased, indicating prolactinoma lesions. The measure of circulating prolactin levels in sera from *WapCre-Men1^{+/+}*, *Men1^{F/F}* and *WapCre-Men1^{F/F}* mice indeed demonstrated a two-fold increase of serum prolactin concentration in *WapCre-Men1^{F/F}* mice compared with the control mice (figure 5C). Our results showed that menin inactivation caused by pituitary leakage of the *WapCre* transgene triggers prolactinoma development in *WapCre-Men1^{F/F}* mice, associated with hyperprolactinemia, and leads to the premature death of these mice.

The increased incidence of MIN in WapCre-Men1^{F/F} mice cannot be solely explained by the pituitary tumor development.

Prolactin is a well-known stimulating signal for rodent mammary epithelial cell proliferation¹⁹, whereas its importance in the development of human breast cancer remains controversial. A number of mouse models have described a potential oncogenic role of constitutively activated prolactin signaling in the mammary glands²⁰. To assess the potential effect of the increased serum prolactin level on the incidence of MIN observed in our mutant mice, we compared the mean levels of serum prolactin between *WapCre-Men1^{F/F}* mice without any detected mammary lesion (39.91 ng/ml \pm 9.045, n=18) and *WapCre-Men1^{F/F}* mice that developed mammary lesions (43.66 ng/ml \pm 6, n=14) (figure 5D). We did not observe a higher level of prolactin in mice with mammary lesions (p=0.7478, unpaired two-tailed t test), indicating the absence of a correlation between the occurrence of mammary lesions and hyperprolactinemia. Moreover, these two groups of mice showed a similar incidence of pituitary tumors, with 72.2% in *WapCre-Men1^{F/F}* mice without mammary lesions and 78.6% in *WapCre-Men1^{F/F}* mice with mammary lesions (not significantly different, p=1, Fisher's exact test).

The activation of prolactin signaling pathway is usually assessed by the phosphorylation of the transcription factor STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) on tyrosine residue²¹. We thus analyzed phospho-STAT5 expression by immunohistochemistry in MIN lesions developed in *WapCre-Men1^{F/F}* mice (figure 5E). When compared with the intensity of the staining in normal mammary glands from *Men1^{F/F}* mice, we did not detect any increased level of phospho-STAT5 expression or augmented number of positively stained cells in MIN presenting in *WapCre-Men1^{F/F}* mice, or in those observed in *Men1^{F/F}* control mice. Rather, its expression was diminished in neoplastic mammary cells (figure 5E).

To confirm that the increase in MIN lesions observed in our *WapCre-Men1^{F/F}* mice could not be simply considered as a consequence of the hyperprolactinemia detected in these mice, we analyzed mammary glands from another *Men1* mutant mice model developing prolactinomas¹⁸. In the *Men1^{loxP/loxP}/Rip-Cre⁺* mice generated in this work, the authors observed a pituitary leakage of the *Rip-Cre* transgene (rat insulin promoter), also leading to the development of prolactinomas. In this model, the expression of menin protein was intact in mammary glands. Histopathological examination of mammary glands was done in a group of 20 *Men1^{loxP/loxP}/Rip-Cre⁺* female mice aged from 9 to 16 months, and six *Men1^{loxP/loxP}* control mice (11-12 months), kindly provided by Dr Hayward. Among 20 *Men1^{loxP/loxP}/Rip-Cre⁺* female mice, we identified four mice with MIN lesions (20%, table 3), but no carcinoma was detected in these mice. The development of MIN in these mice was not statistically

significant when compared to control mice without any detected lesions ($p=0.5425$, Fisher's exact test). H&E staining for three of these four MIN lesions is presented in supplementary figure 1 (A-F). Hence, our *WapCre-Men1^{F/F}* female mice develop 2.5 times more MIN lesions than *Men1^{loxP/loxP}/Rip-Cre⁺* mice, the difference being statistically significant ($p=0.0107$, Fisher's exact test), while there was no significant difference between the incidence of MIN lesions found in *Men1^{loxP/loxP}/Rip-Cre⁺* and that in our *Men1^{F/F}* mice ($p=0.38$, Fisher's exact test).

Taken together, the above data suggest that the increased incidence of MIN lesions in *WapCre-Men1^{F/F}* mice is not likely to be solely caused by the prolactinoma development in these mice, thereby evoking a more direct role of *Men1* inactivation in the development of these lesions.

Altered membrane expression of both beta-catenin and E-cadherin was observed in MIN and carcinomas developed in WapCre-Men1^{F/F} mice.

The relative slow development with incomplete penetrance featured MIN lesions found in the mutant mice, which suggests that in addition to *Men1* disruption, further alterations are required for the formation of pre-cancerous lesions. The inactivation of cell-cell adhesion factors and the activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway had been described to promote mammary tumorigenesis, the latter being particularly related to the development of mammary squamous metaplasia^{22, 23}. Moreover, an altered expression of both E-cadherin and beta-catenin had been detected in our previous analysis in mouse *Men1* insulinoma and a physical and functional interaction between menin and beta-catenin was recently reported by several laboratories^{7, 8}. We checked therefore the eventual alteration of E-cadherin and beta-catenin in the observed MIN lesions. In contrast to the prominent membrane expression of both beta-catenin (figure 6A) and E-cadherin (figure 6G) analyzed by IHC seen in mammary glands from the normal control mice, the expression of both beta-catenin and E-cadherin was nearly disappeared from the membrane in mammary lesions from *WapCre-Men1^{F/F}* mice, with only residual cytoplasmic expression (figure 6D, E, F, H and I). In the lesions from the *Men1^{F/F}* control mice, the decreased membrane expression of both beta-catenin and E-cadherin was also observed, often accompanied by the nuclear activation of beta-catenin in peripheral cells (figure 6B, C). The data indicated an altered expression profile of beta-catenin and E-cadherin, particularly their decreased membrane expression, in MIN lesions developed in *WapCre-Men1^{F/F}* mutant mice.

DISCUSSION

By disrupting the *Men1* gene specifically in mammary luminal cells, the current study assessed the eventual role of *Men1* inactivation in mammary tumorigenesis. *Men1* ablation in mammary luminal cells did not seem to result in any obvious defects in the post-natal development of mammary glands. On the contrary, although the tumor phenotype found in this model is more complex than expected because of the leakage of the *WapCre* transgene, our data suggest that *Men1* inactivation in mouse mammary cells predisposes to the development of precancerous lesions. It would also be worthwhile to point out that the real MIN incidence in the mutant mice could have even been higher, had the mice not died massively around one year because of pituitary tumor development. The high incidence of MIN lesions observed in mutant mice provides therefore a strong indication of an important hitherto unknown role of the *Men1* gene in mammary cells.

The significance of the occurrence of MIN lesions may be challenged by the fact that a weak incidence of similar pre-cancerous lesions has been found in *Men1*^{F/F} control mice. The genetic background could be among the factors causing such a feeble predisposition to MIN lesions in this mouse strain. However, although it has already been observed that genetic background can predispose mice to low incidence of spontaneous mammary lesions^{24, 25}, especially in multiparous mice²⁶, the fact that litter-mate *WapCre-Men1*^{+/+} mice did not show the similar phenotype does not support this explanation. Rather, one may raise the question as to whether the floxed *Men1* allele, instead of the genetic background, could be the cause of such a low incidence. The floxed *Men1* allele has previously been proved not to be hypomorphic and functional, considering the normal development and function of related endocrine organs. However, we cannot exclude the possibility that some unknown disturbance of the floxed *Men1* allele could interfere with menin's function in mammary cells. More importantly, the procedure of the mammary lesion development seems to be different in *Men1*^{F/F} control mice than that seen in the *WapCre-Men1*^{F/F} mutant mice. In the former, the MIN lesion and carcinomas appeared lately, starting from 12 months of age, with a constant low incidence, while, in the latter, the lesions developed earlier (from 9 months) with a much higher incidence increasing with age. On the molecular level, even our analyses were rather limited because of the lack of available materials, the pattern of phosphorylated STAT5 and beta-catenin expression was substantially different in MIN lesions found in the mutant mice compared with those observed in *Men1*^{F/F} control mice. The data suggest that the MIN lesions found in these two models may be caused and maintained by different molecular mechanisms.

The possible interplay between the occurrence of mammary lesions and the pituitary tumor development in the mutant mice in the current study is another complex issue. We decided to disrupt the *Men1* gene in murine mammary glands using a Cre recombinase under the control of the *Wap* promoter, as other Cre-expressing transgenic mice, such as the MMTV-Cre (mouse mammary tumor virus-driven Cre expression), had been described to express Cre in a large panel of organs other than mammary glands²⁷. Although restricted to luminal mammary epithelial cells, the transgene was without reported leakage in other organs, except brain¹⁷. Unfortunately, we detected an unreported leakage of *WapCre* expression in the pituitary gland. As mice aged up, *menin* inactivation in anterior lactotroph pituitary cells led to the development of prolactinomas in a large portion of *WapCre-Men1^{F/F}* mice, resulting in precocious death starting from 9 months of age. The latter hampered greatly our detailed analyses on the effect of *menin* inactivation in mammary tissues in more aged mice, as the number of the age group 15-18 dropped to 18 and we could not have a sufficient number for constituting an age group above 18 months of age as initially planned. However, our data indicate that the prolactinoma development does not provide a direct explanation for the occurrence of MIN lesions in the mutant mice for the following reasons. Firstly, we found no correlation between the level of serum prolactin concentration and the development of MIN. Secondly, the expression of phosphorylated STAT5, widely considered as a marker of the activation of prolactin/JAK/STAT pathway²¹, was not increased, but rather diminished in MIN lesions occurred in the mutant mice. The data suggest that the prolactin/STAT pathway is not involved in the occurrence of MIN lesion in these mice. Finally, in another *Men1* mouse model developing prolactinomas, but with intact mammary expression of *menin*, the incidence of MIN was shown to be 2.5 times as less as the average incidence seen in our *Men1* mutant mice. Altogether, our data do not support the possibility that the prolactinoma development in the mutant mice could be the major cause of MIN development.

Mammary glands are not known as the tissues affected in the frame of MEN1 pathology. However, several previous observations have provided meaningful hints indicating that the *MEN1* gene may have possible functions in mammary tissues. An epidemiological study reported by Fierabracci *et al.* has revealed that 7% of patients with sporadic breast cancer were also diagnosed with parathyroidism²⁸. Since it is known that *MEN1* mutation can account for about 30% of sporadic parathyroid adenomas, one may speculate that a minor proportion of breast cancer patients could be related to *Men1* mutation. Consistent to this clinical observation, we have detected three cases of breast cancer found in aged heterozygous

Men1 mutant mice previously generated in our laboratory and one case of prostate cancer has been reported in another cohort of *Men1* heterozygous mice, suggesting that *Men1* inactivation may confer low predisposition to hormone-dependant cancer^{14, 15}. A recent biochemical study have established ER as a protein partner of menin, the latter acting synergistically with the former in regulating the activation of tested target genes induced by oestrogen¹². Finally, TGF-beta pathway, whose several effectors, such as Smad1, 3 and 5, are menin-interacting partners, is well known for its role both in initiation and progression of breast cancer development²⁹. Taking into account the above mentioned data, the high incidence of MIN development in *Men1* mammary-specific mutant mice is, after all, not an unexpected phenotype. Rather, the long latent period before MIN onset and the incomplete penetrance suggest that *Men1* inactivation itself may not be a strong breast cancer-inducing event. It may only provide a cancer-prone status which needs the participation of other factors to lead to the advancement of tumorigenesis procedure.

Cell-cell adhesion, which is mediated by cadherins and catenins, is part of the basic machinery involved in the organization of epithelial tissues. Multiple lines of evidence suggest that the deregulation of this cellular process plays a role in breast cancer initiation and progression³⁰. Interestingly, Derksen *et al.* have provided direct genetic evidence establishing E-cadherin as a tumor suppressor in mouse mammary tissues²². In parallel, other studies demonstrated that the activation of beta-catenin signaling by stabilization of beta-catenin in luminal epithelial cells results in the development of mammary tumors, including adenocarcinoma and squamous metaplasia^{23, 31-34}. Interestingly, in the current study, we found a clearly reduced membrane expression of beta-catenin and E-cadherin in MIN lesions from the mutant mice, which implies that disturbed cell-cell adhesion could be one of the relevant molecular events occurring in *Men1* inactivation-related MIN lesions. On the contrary, the activation of beta-catenin was not observed in the same lesions, but seen in MIN lesions found in *Men1*^{F/F} control mice. Our previous work has provided evidence showing that E-cadherin and beta-catenin membrane expression was reduced in mouse *Men1* insulinomas¹⁶. Several recent works have reported the interaction between menin and Wnt/beta-catenin pathway in different cells and endocrine tissues, highlighting the role of menin in regulating the activity of beta-catenin either as adhesion molecule or Wnt pathway activator^{7, 8, 35}. Our current data, in consistency with the previous observations, suggest that menin's role in regulating cell-cell adhesion may also be involved in the control of normal growth of mammary cells, although the underlying mechanism needs further investigation.

Taken together, by disrupting the *Men1* gene specifically in mammary gland cells, we have provided the compelling evidence showing that menin inactivation in mouse resulted in high incidence of pre-cancerous mammary lesions. The finding of this previously unknown role of menin may shed light onto the complex molecular mechanisms of mammary tumorigenesis. To this regard, mice with *Men1* inactivation specifically in mammary provide a tool to identify and study additional factors important for the initiation and progression of breast cancer.

Acknowledgments

We thank all the staff from the animal facility ALECS (IFR62/Université Lyon1) for the maintenance of the mouse colonies, the colleagues at the “Groupe d’Etude Recherche, CNRS N°2906, France” for scientific discussion, as well as Nick Hayward and Graham Kay from Queensland Institute for their input into this study. We are also grateful to the ANIPATH core facility (IFR62/Université Lyon1) for production of histologic sections.

Funding

This study is supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer, France, the Ligue contre le Cancer du Rhône and de la Loire. During this study, C. S. was the recipient of fellowships from French government and of Association pour la Recherche contre le Cancer. The authors report no conflict of interest that would prejudice its impartiality.

References

1. Olopade OI, Grushko TA, Nanda R, Huo D. Advances in Breast Cancer: Pathways to Personalized Medicine. *Clin Cancer Res* 2008;14:7988-99.
2. Cardiff RD, Anver MR, Gusterson BA, Hennighausen L, Jensen RA, Merino MJ, Rehm S, Russo J, Tavassoli FA, Wakefield LM, Ward JM, Green JE. The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene* 2000;19:968-88.
3. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia--syndromes of the twentieth century. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2617-20.
4. Hofmann M, Schilling T, Heilmann P, Haisken O, Wuster C, Brandi ML, Ziegler R, Nawroth PP. [Multiple endocrine neoplasia associated with multiple lipomas]. *Med Klin (Munich)* 1998;93:546-9.

5. Boni R, Vortmeyer AO, Pack S, Park WS, Burg G, Hofbauer G, Darling T, Liotta L, Zhuang Z. Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene detected in sporadic angiofibromas. *J Invest Dermatol* 1998;111:539-40.
6. Yang Y, Hua X. In search of tumor suppressing functions of menin. *Mol Cell Endocrinol* 2007;265-266:34-41.
7. Chen G, A J, Wang M, Farley S, Lee LY, Lee LC, Sawicki MP. Menin promotes the Wnt signaling pathway in pancreatic endocrine cells. *Mol Cancer Res* 2008;6:1894-907.
8. Cao Y, Liu R, Jiang X, Lu J, Jiang J, Zhang C, Li X, Ning G. Nuclear-cytoplasmic shuttling of menin regulates nuclear translocation of {beta}-catenin. *Mol. Cell. Biol.* 2009:MCB.00335-09.
9. Hughes CM, Rozenblatt-Rosen O, Milne TA, Copeland TD, Levine SS, Lee JC, Hayes DN, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Biondi CA, Kay GF, Hayward NK, et al. Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the hoxc8 locus. *Mol Cell* 2004;13:587-97.
10. Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J, Sanyal M, Aufiero DJ, Kitabayashi I, Herr W, Cleary ML. Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol* 2004;24:5639-49.
11. Milne TA, Hughes CM, Lloyd R, Yang Z, Rozenblatt-Rosen O, Dou Y, Schnepf RW, Krankel C, Livolsi VA, Gibbs D, Hua X, Roeder RG, et al. Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:749-54.
12. Dreijerink KM, Mulder KW, Winkler GS, Hoppener JW, Lips CJ, Timmers HT. Menin links estrogen receptor activation to histone H3K4 trimethylation. *Cancer Res* 2006;66:4929-35.
13. Dreijerink KMA, Varier RA, van Beekum O, Jenning EH, Hoppener JWM, Lips CJM, Kummer JA, Kalkhoven E, Timmers HTM. The Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1) tumor suppressor regulates PPAR{gamma}-dependent adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 2009:MCB.01001-08.
14. Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, Garrett-Beal L, Emmert-Buck MR, Edgemon KA, Lorang D, Libutti SK, Chandrasekharappa SC, Marx SJ, Spiegel AM, Collins FS. A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1118-23.

15. Bertolino P, Tong WM, Galendo D, Wang ZQ, Zhang CX. Heterozygous Men1 mutant mice develop a range of endocrine tumors mimicking multiple endocrine neoplasia type 1. *Mol Endocrinol* 2003;17:1880-92.
16. Bertolino P, Tong WM, Herrera PL, Casse H, Zhang CX, Wang ZQ. Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer Res* 2003;63:4836-41.
17. Wagner KU, Wall RJ, St-Onge L, Gruss P, Wynshaw-Boris A, Garrett L, Li M, Furth PA, Hennighausen L. Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Research* 1997;25:4323-30.
18. Biondi CA, Gartside MG, Waring P, Loffler KA, Stark MS, Magnuson MA, Kay GF, Hayward NK. Conditional inactivation of the MEN1 gene leads to pancreatic and pituitary tumorigenesis but does not affect normal development of these tissues. *Mol Cell Biol* 2004;24:3125-31.
19. Hennighausen L, Robinson GW, Wagner K-U, Liu X. Prolactin Signaling in Mammary Gland Development. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:7567-9.
20. Arendt LM, Schuler LA. Transgenic Models to Study Actions of Prolactin in Mammary Neoplasia. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2008;13:29-40.
21. Tan SH, Nevalainen MT. Signal transducer and activator of transcription 5A/B in prostate and breast cancers. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:367-90.
22. Derksen PWB, Liu X, Saridin F, van der Gulden H, Zevenhoven J, Evers B, van Beijnum JR, Griffioen AW, Vink J, Krimpenfort P, Peterse JL, Cardiff RD, et al. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell* 2006;10:437-49.
23. Miyoshi K, Rosner A, Nozawa M, Byrd C, Morgan F, Landesman-Bollag E, Xu X, Seldin DC, Schmidt EV, Taketo MM, Robinson GW, Cardiff RD, et al. Activation of different Wnt/beta-catenin signaling components in mammary epithelium induces transdifferentiation and the formation of pilar tumors. *Oncogene* 2002;21:5548-56.
24. Hosokawa Y, Papanikolaou A, Cardiff RD, Yoshimoto K, Bernstein M, Wang TC, Schmidt EV, Arnold A. In vivo analysis of mammary and non-mammary tumorigenesis in MMTV-cyclin D1 transgenic mice deficient in p53. *Transgenic Research* 2001;10:471-8.
25. van Rossum AG, van Bragt MP, Schuurin-Scholtes E, van der Ploeg JC, van Krieken JH, Kluin PM, Schuurin E. Transgenic mice with mammary gland targeted

expression of human cortactin do not develop (pre-malignant) breast tumors: studies in MMTV-cortactin and MMTV-cortactin/-cyclin D1 bitransgenic mice. *BMC Cancer* 2006;6.

26. Renner O, Blanco-Aparicio C, Grassow M, Cañamero M, Leal JFM, Carnero A. Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase by Membrane Localization of p110A Predisposes Mammary Glands to Neoplastic Transformation. *Cancer Res* 2008;68:9643-53.

27. Wagner K-U, Ward T, Davis B, Wiseman R, Hennighausen L. Spatial and temporal expression of the Cre gene under the control of the MMTV-LTR in different lines of transgenic mice. *Transgenic Research* 2001;10:545-53.

28. Fierabracci P, Pinchera A, Miccoli P, Conte PF, Vignali E, Zaccagnini M, Marcocci C, Giani C. Increased prevalence of primary hyperparathyroidism in treated breast cancer. *J Endocrinol Invest* 2001;24:315-20.

29. Serra R, Crowley MR. Mouse models of transforming growth factor b impact in breast development and cancer. *Endocrine Related Cancer* 2005;12:749-60.

30. Cowin P, Rowlands TM, Hatsell SJ. Cadherins and catenins in breast cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 2005;17:499-508.

31. Imbert A, Eelkema R, Jordan S, Feiner H, Cowin P. Δ^{N89} -Catenin Induces Precocious Development, Differentiation, and Neoplasia in Mammary Gland. *J. Cell Biol.* 2001;153:555-68.

32. Michaelson JS, Leder P. beta-catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland. *Oncogene* 2001;20:5093-9.

33. Miyoshi K, Shillingford JM, Le Provost F, Gounari F, Bronson R, von Boehmer H, Taketo MM, Cardiff RD, Hennighausen L, Khazaie K. Activation of β^2 -catenin signaling in differentiated mammary secretory cells induces transdifferentiation into epidermis and squamous metaplasias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:219-24.

34. Rowlands TM, Pechenkina IV, Hatsell SJ, Pestell RG, Cowin P. Dissecting the roles of β^2 -catenin and cyclin D1 during mammary development and neoplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:11400-5.

35. Yan J, Yang Y, Zhang H, King C, Kan HM, Cai Y, Yuan CX, Bloom GS, Hua X. Menin interacts with IQGAP1 to enhance intercellular adhesion of beta-cells. *Oncogene* 2009;28:973-82.

Figure legends

Figure 1: Menin is expressed in mammary epithelial cells during the different stages of mammary gland postnatal development. Immunohistochemical detection of menin expression was performed in five-week-old virgin, 15-day pregnant, 11-day lactating and 7-day involuting mammary glands from *Men1* wild-type female mice. A predominantly nuclear expression of menin was detected both in luminal and myoepithelial basal cells in the mammary epithelium, as well as in adipocytes, but not in surrounding stromal cells. The lower panel is a four-fold magnification of the upper one. Scale bars represent 50µm.

Figure 2: *Men1* conditional ablation in mouse mammary luminal cells. (A) Structure of the wild-type (+), floxed (F) and deleted (Δ) murine *Men1* alleles. Exons are indicated by a black box with numbers. Red arrows represent the *loxP* sequences. Blue arrowheads indicate the position of the primers used for PCR genotyping and recombination analyses (3f1, 3r1, 2f0). (B) *Men1* disruption occurs specifically in mammary glands, but a leakage of *WapCre* transgene expression is detected in pituitary glands and brain. PCR amplification of fragments of the wild-type (+, 215 bp), floxed (F, 280 bp) and deleted (Δ , 300 bp) *Men1* alleles was performed with genomic DNA extracted from a large panel of organs collected from *WapCre-Men1^{+F}* female mice. Mammary glands were obtained from three different virgin mice (MG V) and from 15-day lactating mice during first (#1 MG L15), second (#2 MG L15) or third (#3 MG L15) round of pregnancy. The *Men1* deleted (Δ) allele is detected in mammary glands as expected, but also in brain and pituitary gland. Genomic DNA extracted from the tail of *Men1^{+F}* (+/F) and *Men1^{+Δ}* (+/ Δ) mice was used as control. MG: mammary gland, Pit: pituitary gland, Ov: ovary, Br: brain, Kid: kidney, Pa: pancreas. (C) *Men1* is specifically disrupted in the mammary luminal epithelial cells of *WapCre-Men1^{F/F}* mice. Representative images of menin inactivation in mammary glands are shown, detected by IHC, in a 12-month-old *WapCre-Men1^{F/F}* female mouse. The panel on the right is a four-fold magnification of the left one, and shows that only basal cells remain positive for menin expression. Scale bar 100 µm.

Figure 3: Normal mammary gland development and proliferation in *WapCre-Men1^{F/F}* female mice. (A) Mammary glands were collected from control *Men1^{F/F}* and mutant *WapCre-Men1^{F/F}* age-matched female mice in three-month-old virgin mice, and during the first (G1) and third

(G3) round of pregnancy, 15 days after observation of the vaginal plug (P15) and seven days after pups' weaning (I7). Mammary gland architecture was observed after haematoxylin & eosin staining. Note that control and mutant mice present a similar mammary gland structure at all stages of postnatal development. Scale bar 200 μm . (B) Mammary epithelial cell proliferation was assessed by immunohistochemical detection of BrdU incorporation in the above-mentioned control *Men1^{F/F}* and mutant *WapCre-Men1^{F/F}* age-matched female mice. Representative images of BrdU staining are shown in mammary glands harvested from control *Men1^{F/F}* and mutant *WapCre-Men1^{F/F}* age-matched virgin female mice. Scale bar 50 μm . (C) The percentage of BrdU-positive epithelial cells was calculated as described in material and methods. Bars represent the mean percentage \pm S.E.M. for two mice of each genotype. The percentage of BrdU-positive epithelial cells was not found to be significantly different ($p=0.9866$, two-way ANOVA) between *Men1^{F/F}* and *WapCre-Men1^{F/F}* mice, neither in virgin mice (6.062 ± 0.699 versus 6.103 ± 0.809) nor during first and third rounds of pregnancy (G1P15: 10.44 ± 0.736 versus 11.075 ± 0.98 ; G3P15: 6.561 ± 0.666 versus 5.884 ± 0.528) or involution (G1I7: 1.206 ± 0.182 versus 1.437 ± 0.317 , G3I7: 1.656 ± 0.384 versus 1.395 ± 0.294).

Figure 4: *WapCre-Men1^{F/F}* female mice develop mammary neoplasia showing menin inactivation and reduced ER expression. (A) Representative histological sections (H&E staining, left and middle column) and immunohistochemical detection of menin expression (right column) for two mammary intraepithelial neoplasia (MIN) lesions and an adenosquamous carcinoma found in *WapCre-Men1^{F/F}* mice (18-, 14- and 13-month-old mice respectively). MIN lesions display intraluminal proliferation of cells with nuclear atypia (nuclear enlargement and chromatin clumping) and mitosis (black arrowheads). Adenosquamous carcinoma is characterized by association of glandular tumor tissue with clusters of squamous metaplasia and signs of invasion into the surrounding stroma. Red arrowhead indicates a tripolar atypical mitosis. The middle and right columns are a four-fold magnification of the first column. Insets show an amplified view of a part of menin-immunostained mammary lesions, illustrating the complete inactivation of menin expression in neoplastic cells, while basal myoepithelial cells remain menin-positive. Scale bar 50 μm . (B) Decreased ER expression in MIN lesions from *Men1* mutant mice. In normal mammary glands from multiparous *Men1^{F/F}* control mice, expression of ER was detected in approximately 20-30% of the epithelial cells by IHC. ER expression was found decreased in

lesions detected in *WapCre-MenI^{F/F}* mice (n=7). Representative images of two MIN from multiparous *WapCre-MenI^{F/F}* mice (respectively 14- and 17-month-old mice) are presented. Scale bar 50 μ m.

Figure 5: Pituitary leakage of the *WapCre* transgene leads to the development of prolactinomas in *WapCre-MenI^{F/F}* female mice, which does not allow to explain the increased incidence of MIN lesions. (A) Kaplan-Meier analysis determining the survival ratio of female *MenI^{F/F}* (blue line, n=34), *WapCre-MenI^{+/+}* (black line, n=27) and *WapCre-MenI^{F/F}* mice (red line, n=75) according to age. Ill and distressed mice that were killed, or died, prematurely were counted as a death event for this analysis, mice sacrificed at the pre-determined time points were considered as alive. *WapCre-MenI^{F/F}* mice were found to die significantly earlier due to pituitary tumors, with a mean survival around 14 months, compared with more than 21 months for the other two genotypes (log-rank test, $p < 0.0001$). (B) Pituitary adenomas developed in *WapCre-MenI^{F/F}* mice are prolactinomas. H&E staining and immunohistochemical detection of menin, growth hormone (GH) and prolactin expression were done in a normal pituitary gland from a control *MenI^{F/F}* mouse (upper panel, 19-month-old mouse) and a pituitary adenoma found in a 12-month-old *WapCre-MenI^{F/F}* mouse (lower panel). *p.d.*: *pars distalis*, *p.n.*: *pars nervosa*. Scale bar 50 μ m. (C) Dosage of serum prolactin levels in control and mutant mice. Mean serum prolactin concentration was significantly increased in *WapCre-MenI^{F/F}* mice (41.55 ng/ml \pm 5.653, n=32) compared with *MenI^{F/F}* (11.00 ng/ml \pm 4.008, n=10) and *WapCre-MenI^{+/+}* (17.84 ng/ml \pm 5.885, n=10). #: $p=0.0323$, *: $p=0.0056$ (unpaired two-tailed t test). (D) Elevated prolactin levels do not correlate with mammary lesion development in *WapCre-MenI^{F/F}* mice. Mean serum prolactin concentrations in *WapCre-MenI^{F/F}* mice over 9 months of age either without (w/o) mammary lesions (39.91 ng/ml \pm 9.045, n=18) or with mammary lesions (43.66 ng/ml \pm 6, n=14) were not significantly different ($p=0.7478$, unpaired two-tailed t test). (E) Immunohistochemical detection of phospho-STAT5. In normal mammary glands from multiparous *MenI^{F/F}* control mice, approximately 30-40% of the epithelial cells are strongly stained for phospho-STAT5. The intensity of its expression was decreased in MIN lesions and adenosquamous carcinomas developed in *WapCre-MenI^{F/F}* mice. Representative images of two MIN, respectively from 14- and 17-month-old multiparous *WapCre-MenI^{F/F}* mice, are presented. Scale bar 50 μ m.

Figure 6: Decreased membrane expression of beta-catenin and E-cadherin in MIN and adenocarcinomas developed in *WapCre-Men1^{F/F}* mice. (A-F) Immunohistochemical detection of beta-catenin expression. Beta-catenin staining was mainly membrane-localized and slightly cytoplasmic in normal mammary glands from control mice (A, 18-month-old *Men1^{F/F}* mouse) while nuclear beta-catenin staining could be detected in MIN lesions developed in *Men1^{F/F}* mice (B, 8-month-old mouse). In contrast, membrane and cytoplasmic beta-catenin expression were decreased in MIN lesions and adenocarcinomas developed in *WapCre-Men1^{F/F}* mice. Representative photographs show beta-catenin staining in three MIN lesions (C, D, E: respectively 18-month-old, 17-month-old and 12-month-old mouse) and an adenocarcinoma (F, 13-month-old mouse) from the mutant mice. (G-I) Immunohistochemical detection of E-cadherin expression. E-cadherin staining was localized to cell membrane in normal mammary glands from control mice (G, 12-month-old *Men1^{F/F}* mouse). Membrane expression of E-cadherin was decreased in MIN lesions (H, 12-month-old mouse) and adenocarcinomas (I, 13-month-old mouse) developed in *WapCre-Men1^{F/F}* mice. Insets show an amplified view of a part of mammary lesions. Scale bar 100µm.

Supplementary figure 1: Histological sections of mammary lesions found in *Men1^{loxP/loxP}/Rip-Cre⁺* mice presenting prolactinoma development. Three representative H&E staining of mammary intraepithelial neoplasia (MIN) lesions found in *Men1^{loxP/loxP}/Rip-Cre⁺* mice aged of 10 months (A, D), 16 months (B, E) and 11 months (C, F) are shown. Panels D-F are a two-fold magnification of panels A-C. Scale bar 50µm.

Fig. 1

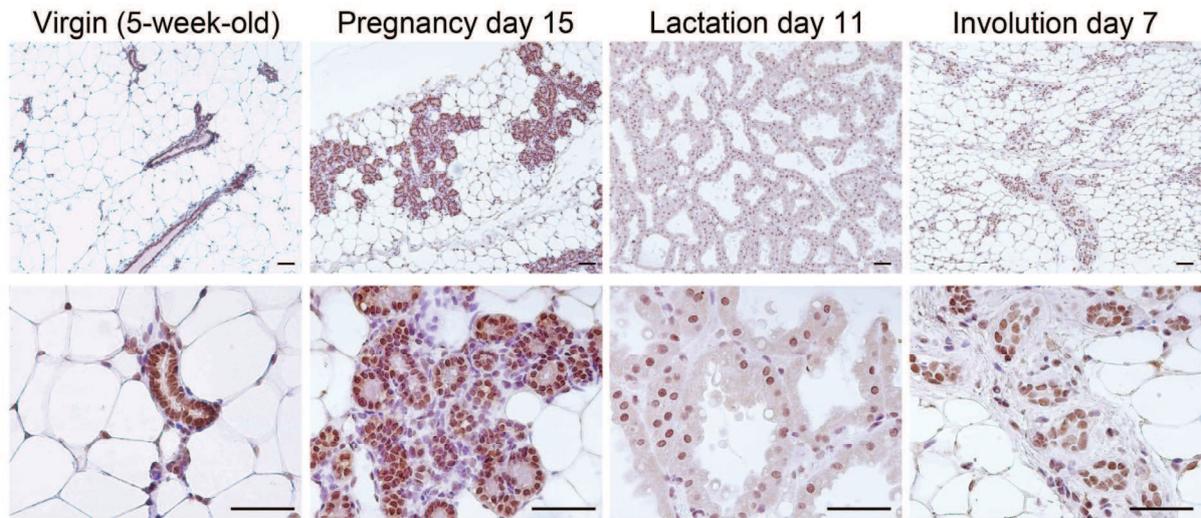


Fig. 2

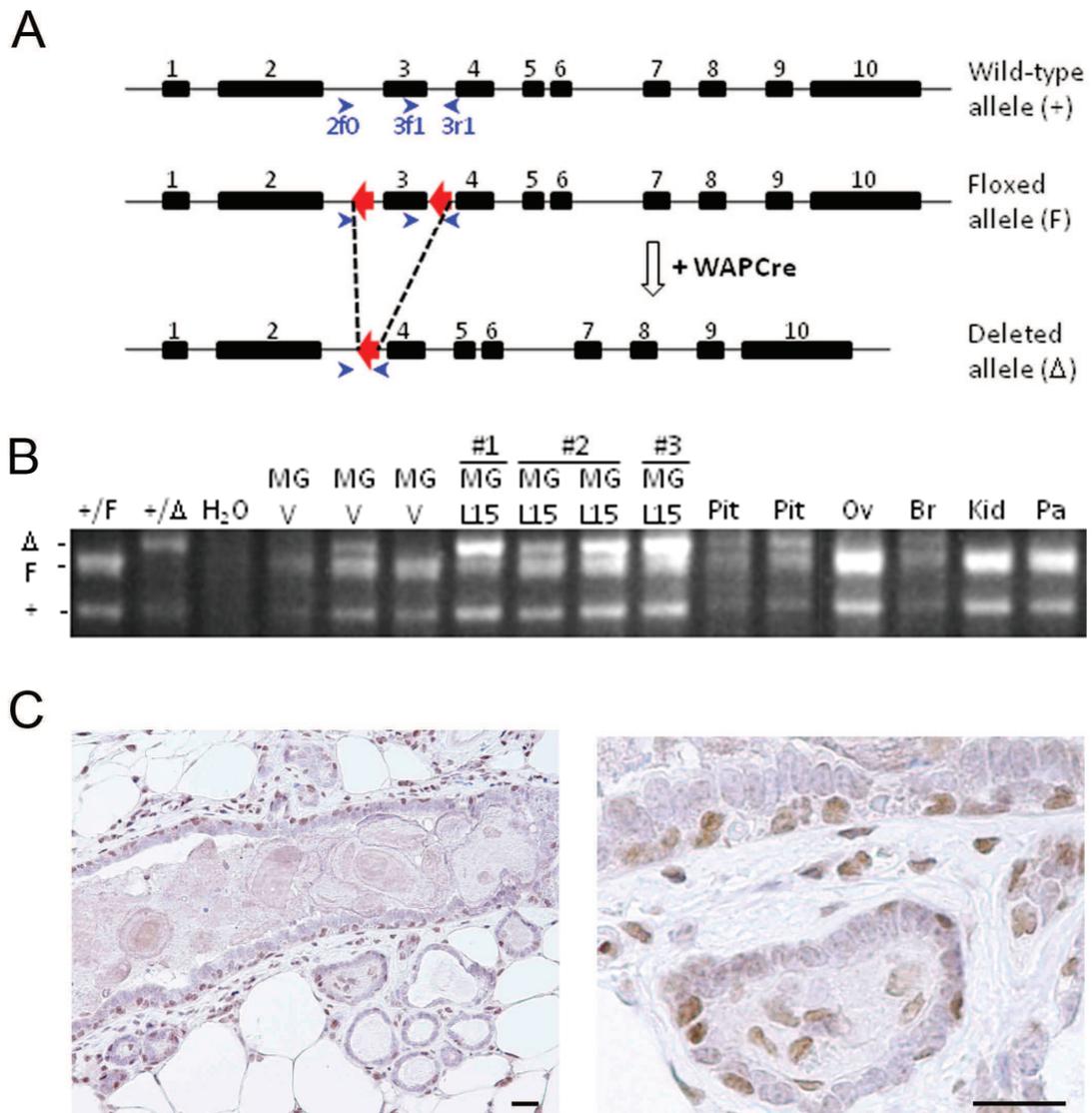


Fig. 3

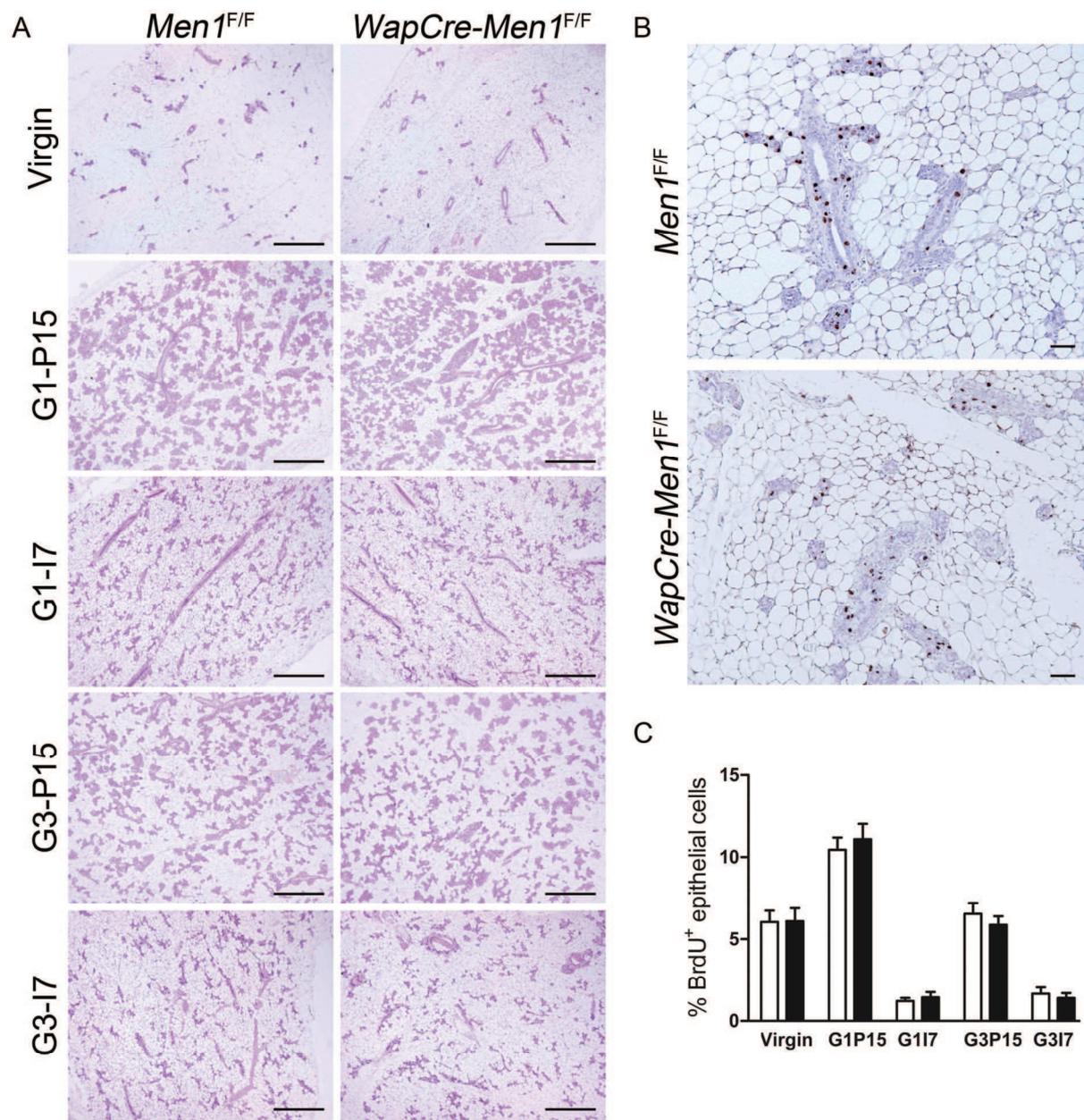


Fig. 4

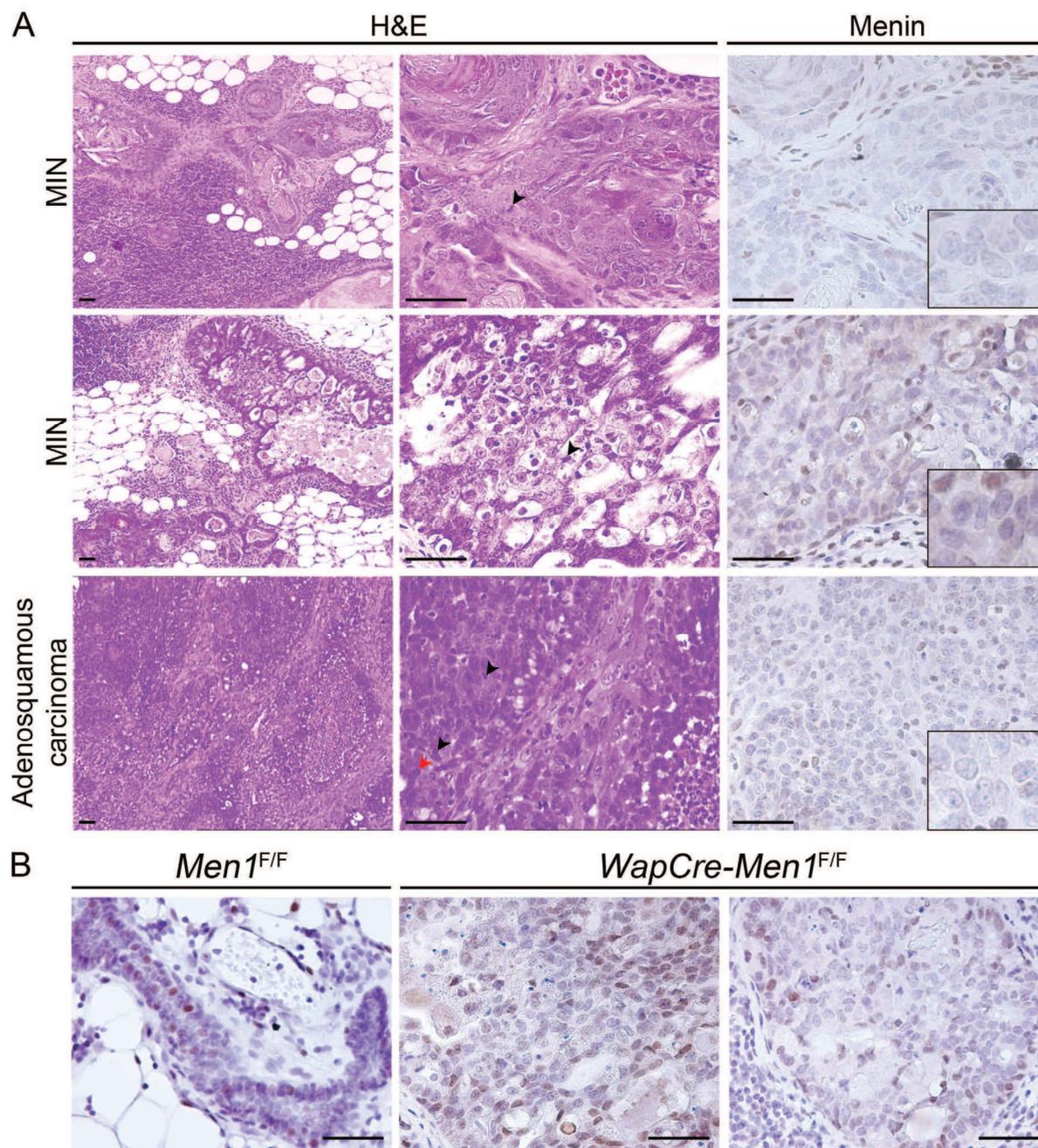


Fig. 5

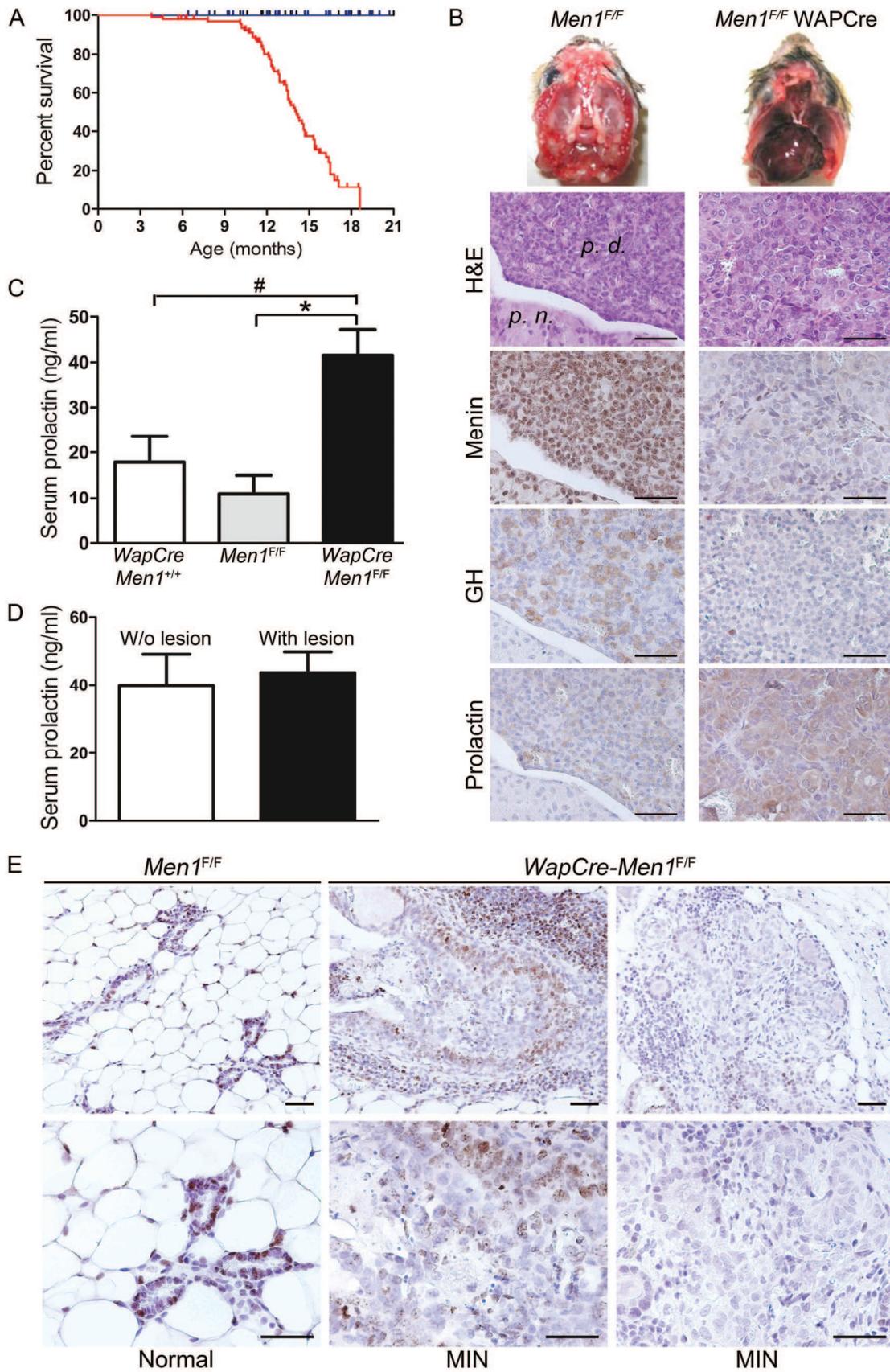
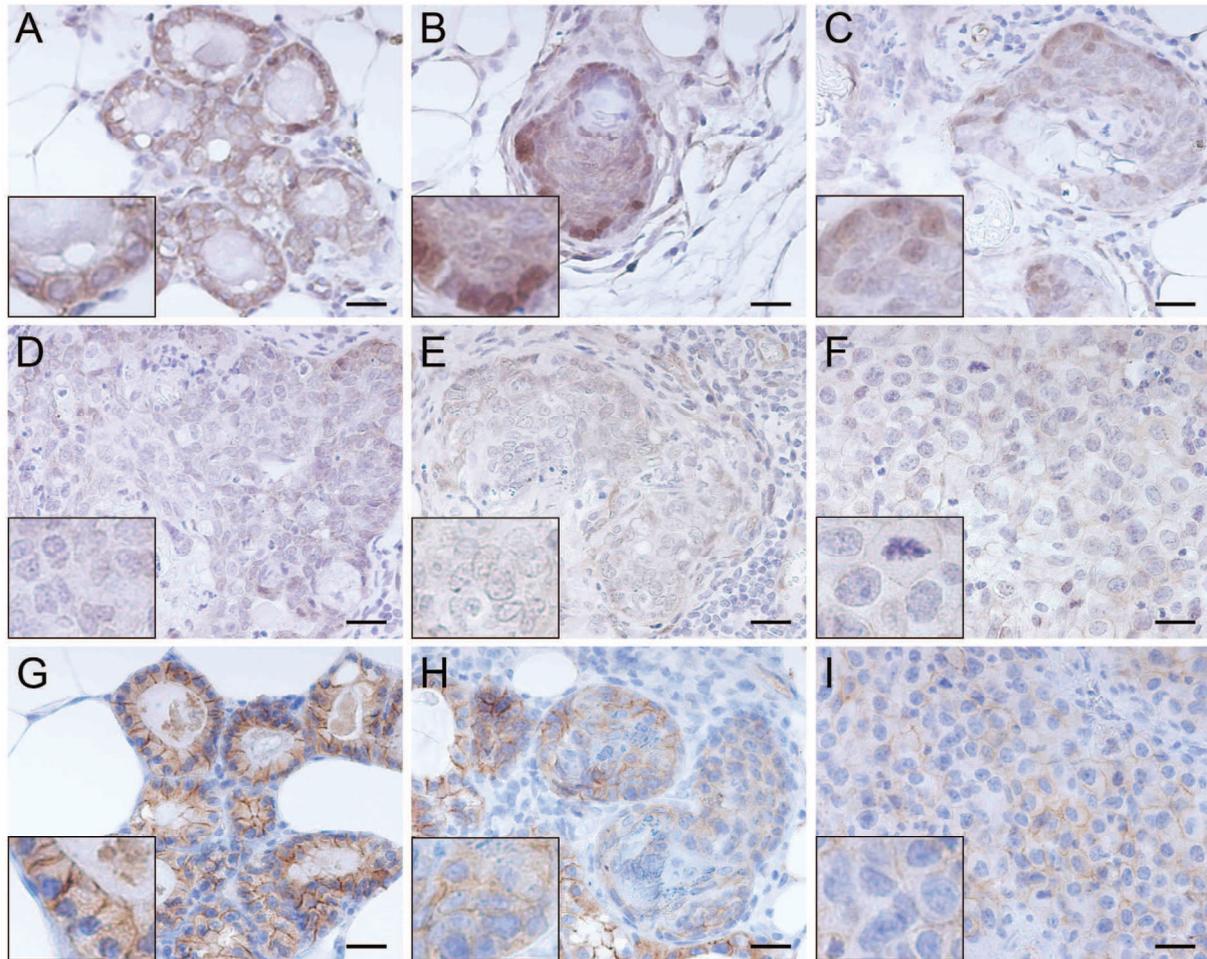


Fig. 6



Suppl. fig. 1

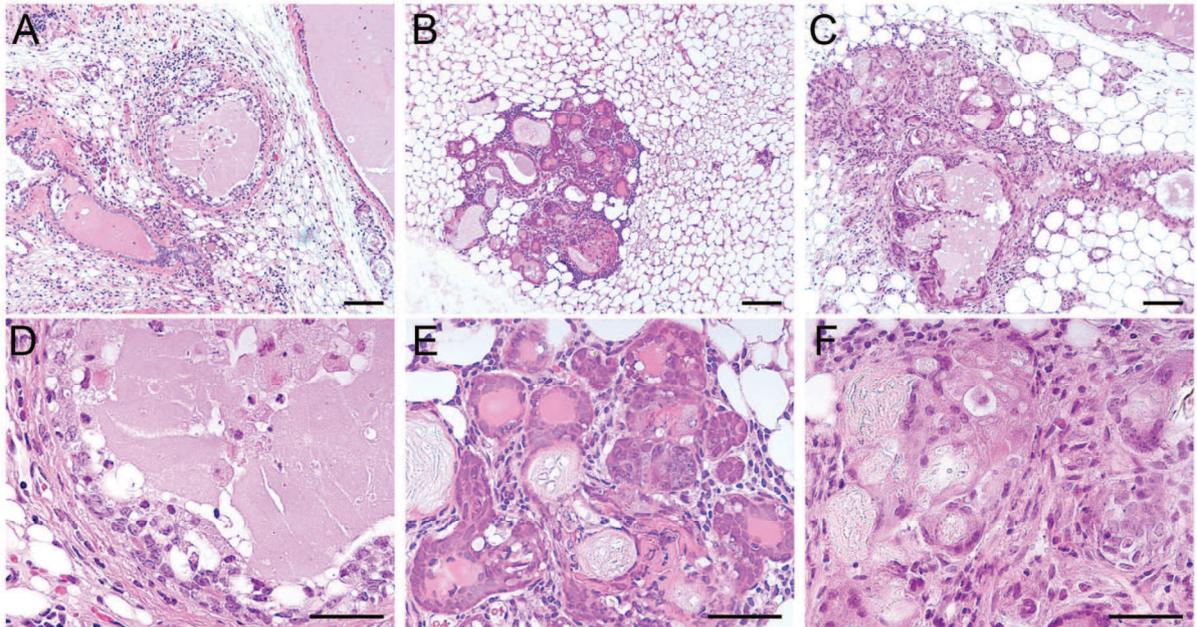


Table 1: Age-related incidence of mammary lesions in *WapCre-Men1^{F/F}* females.

Genotype	Histology	9-12 months	12-15 months	> 15 months	Overall incidence
<i>WapCre-</i> <i>Men1^{+/+}</i>	Normal	9/9 (100%)	8/8 (100%)	9/9 (100%)	26/26 (100%)
	MIN	0/9 (0%)	0/8 (0%)	0/9 (0%)	0/26 (0%)
	Adenosquamous carcinoma	0/9 (0%)	0/8 (0%)	0/9 (0%)	0/26 (0%)
<i>Men1^{F/F}</i>	Normal	6/6 (100%)	8/10 (80%)	10/12 (83.4%)	24/28 (85.7%)
	MIN	0/6 (0%)	1/10 (10%)	1/12 (8.3%)	2/28 (7.1%)
	Adenosquamous carcinoma	0/6 (0%)	1/10 (10%)	0/12 (0%)	1/28 (3.6%)
	Poorly differentiated carcinoma	0/6 (0%)	0/10 (0%)	1/12 (8.3%)	1/28 (3.6%)
<i>WapCre-</i> <i>Men1^{F/F}</i>	Normal	8/13 (61.5%)	16/35 (45.7%)	6/18 (33.3%)	30/66 (45.5%)
	MIN	5/13 (38.5%)	17/35 (48.6%) ¹	12/18 (66.7%) ²	34/66 (51.5%) ³
	Adenosquamous carcinoma	0/13 (0%)	2/35 (5.7%)	0/18 (0%)	2/66 (3%)

Mammary lesions were classified according to the recommendations of the Annapolis Pathology Panel². MIN: mammary intraepithelial neoplasia. The number of mice of each histological category over the total number of the mice examined is indicated, and the corresponding percentage is shown in parentheses. P values (Chi-square test *WapCre-Men1^{F/F}* versus *Men1^{F/F}*): ¹ 0.0548, ² 0.0057, ³ <0.0001.

Table 2: Age-related incidence of pituitary adenomas in *WapCre-Men1^{F/F}* females.

Genotype	Pituitary histology	9-12 months	12-15 months	> 15 months	Overall incidence
<i>WapCre-Men1^{+/+}</i>	Normal	0/9 (0%)	0/8 (0%)	0/9 (0%)	0/26 (0%)
<i>Men1^{F/F}</i>	Normal	0/6 (0%)	0/10 (0%)	0/12 (0%)	0/28 (0%)
<i>WapCre-Men1^{F/F}</i>	Normal	5/13 (38.5%)	2/35 (5.7%)	4/18 (22.2%)	11/66 (16.7%)
	Adenoma	8/13 (61.5%)	33/35 (94.3%)	14/18 (77.8%)	55/66 (83.3%)

The number of mice of each histological category over the total number of the mice examined is indicated, and the corresponding percentage is shown in parentheses.

Table 3: Incidence of mammary lesions in *Men1^{loxP/loxP}/Rip-Cre⁺* female mice developing prolactinomas.

Mammary histology	<i>Men1^{loxP/loxP}/Rip-Cre⁺</i>	<i>Men1^{loxP/loxP}</i>
Normal	16/20 (80%)	6/6 (100%)
MIN	4/20 (20%)	0/6 (0%)
Carcinoma	0/20 (0%)	0/6 (0%)

Mammary lesions were classified according to the recommendations of the Annapolis Pathology Panel². MIN: mammary intraepithelial neoplasia. The number of mice of each histological category over the total number of the mice examined is indicated, and the corresponding percentage is shown in parentheses. Analysed females were aged from 9 to 16 months.

CHAPITRE 3: DISCUSSION

CHAPITRE 3 : DISCUSSION

I. Menin et la tumorigenèse des tissus hormono-dépendants chez la souris

Mes travaux de thèse ont pu montrer l'implication de l'inactivation du gène *Men1* dans la tumorigenèse des glandes mammaires et de la prostate chez la souris. Son inactivation favoriserait notamment la transition des PIN en carcinomes prostatiques et le développement de lésions pré-cancéreuses au niveau des glandes mammaires.

A. Complexité et apports des modèles murins d'inactivation de *Men1***A. 1. Les carcinomes mammaires et prostatiques, un phénotype inattendu chez les souris hétérozygotes pour *Men1***

Afin d'étudier les conséquences physiopathologiques de l'inactivation du gène *Men1*, l'équipe où j'ai réalisé ma thèse avait établi des modèles d'inactivation du gène chez la souris. Les souris hétérozygotes pour *Men1* développent, avec une très forte pénétrance, des tumeurs dans plusieurs organes endocrines environ un an après leur naissance, le spectre tissulaire des tumeurs étant très similaire à celui observé chez les patients NEM1. L'analyse de ces souris a également permis de mettre en évidence une fréquence élevée de tumeurs affectant les cellules interstitielles des gonades : les cellules de Leydig dans les testicules (88%) et les cellules de la corde stromale dans les ovaires (50%) (Bertolino *et al.*, 2003b), toutes deux impliquées dans la sécrétion d'hormones stéroïdiennes. Chez les souris âgées (entre 19 et 26 mois), trois cas de cancers mammaires avaient aussi été détectés chez les femelles (Bertolino *et al.*, 2003b), ainsi que 12.8% de carcinomes prostatiques chez les mâles (voir article 1).

Ces observations chez les souris, ainsi que l'association éventuelle entre le syndrome NEM1 et les cancers du sein chez la femme, suggérée par les données de la littérature, nous ont incité à générer un modèle murin d'inactivation tissu-spécifique de *Men1* dans les glandes mammaires. Les analyses effectuées chez ces souris semblent indiquer une relation entre l'inactivation de menin et l'augmentation de l'incidence de lésions pré-cancéreuses mammaires (MIN), étant donné que plus de la moitié des souris mutantes développent des MIN.

A. 2. Rôle de l'inactivation du gène *Men1* dans la prédisposition, certes faible, à la tumorigenèse des glandes mammaires et de la prostate

- Inactivation du gène Men1 et de l'expression de menin détectée dans les lésions

J'ai pu mettre en évidence une perte d'hétérozygotie (LOH) partielle du gène *Men1* dans les carcinomes prostatiques des souris *Men1^{+/-}*, associée à une inactivation complète de l'expression de menin en immunohistochimie, renforçant l'existence d'un lien entre l'inactivation de menin et le développement de ces lésions. Cette LOH partielle peut-être expliquée de deux manières différentes :

→ une contamination des échantillons par des cellules normales au moment du grattage. En effet, il est fort possible que des cellules normales exprimant menin, et ayant donc un allèle sauvage intact du gène, aient été prélevées en même temps que les carcinomes au moment du grattage des lames de paraffine. Le manque de précision de cette technique de grattage ne permet en effet pas de dissocier les cellules cancéreuses des cellules normales dispersées au sein des lésions (fibroblastes, cellules vasculaires, cellules basales de l'épithélium prostatique pour lesquelles nous avons montré qu'elles exprimaient menin et étaient éparpillées au sein des lésions). Cette hypothèse est favorisée.

→ l'inactivation de l'allèle normal du gène par un autre mécanisme que la LOH. Nous ne pouvons en effet pas exclure que l'inactivation du second allèle du gène *Men1* ne se fasse pas uniquement par un mécanisme de LOH, lié à une instabilité chromosomique, mais puisse aussi se faire par méthylation du promoteur du gène ou par d'autres mécanismes entraînant l'extinction de l'expression de l'allèle sauvage.

Je n'ai malheureusement pas pu tester la présence de LOH dans les carcinomes mammaires des souris hétérozygotes par manque de matériel, mais j'ai pu détecter une absence d'expression de menin en immunohistochimie (non montré dans l'article 2).

Quoi qu'il en soit, la majorité des MIN observées chez les souris *WapCre-Men1^{F/F}* présentent une inactivation de l'expression de menin en immunohistochimie.

- Une prédisposition faible

Les lésions développées à la fois chez les souris hétérozygotes pour le gène *Men1* et dans le modèle d'inactivation spécifique du gène dans les glandes mammaires présentent des caractéristiques assez similaires. En effet, les carcinomes prostatiques et mammaires observés dans le modèle hétérozygote montrent une latence d'apparition assez longue, étant donné que seules les souris de plus de 18 mois sont affectées par ce genre de lésions. Le faible pourcentage de carcinomes détectés dans la prostate et les glandes mammaires de ces souris suggère aussi un processus de tumorigenèse lent. Chez les souris hétérozygotes, l'inactivation

du second allèle du gène *Men1* peut être un événement tardif et nécessiter du temps. Il est aussi possible qu'à la suite de l'inactivation de *menin* des événements secondaires additionnels soient nécessaires pour mener au développement des lésions pré-cancéreuses puis de carcinomes. Ce point est discuté plus longuement dans le paragraphe I. B. De même, les lésions MIN chez les souris *WapCre-Men1^{F/F}*, observées à partir de l'âge de 9 mois, présentent un délai d'apparition assez long, sans progression détectable vers des carcinomes dans ce modèle.

- Influence des perturbations hormonales ?

Il est bien sûr envisageable que les carcinomes mammaires et prostatiques observés chez les souris hétérozygotes se soient développés en réponse aux perturbations hormonales, et surtout stéroïdiennes, induites par les tumeurs des cellules de Leydig et de l'ovaire. Cependant, il est important de noter qu'un cas de carcinome prostatique a été décrit dans un autre modèle de souris *Men1* hétérozygotes, sans qu'aucune tumeur des cellules de Leydig n'aie été rapportée (Crabtree *et al.*, 2001). Par ailleurs, le modèle australien de souris *Men1* hétérozygotes développe des tumeurs interstitielles des gonades avec une incidence similaire à celle observée dans notre modèle, mais aucune lésion n'a été décrite dans les glandes mammaires ou la prostate (Loffler *et al.*, 2007). De plus, d'autres modèles de souris ne décrivent aucune apparition de carcinomes de la prostate ou mammaires, aussi bien chez les souris où la voie de l'AMH (hormone anti-müllérienne) est invalidée, menant à des hyperplasies des cellules de Leydig (Behringer *et al.*, 1994, Mishina *et al.*, 1996) que chez les souris *p18^{-/-} ; p27^{-/-}* (Franklin *et al.*, 2000), ou invalidées à la fois pour l'inhibine-alpha, un ligand de la famille TGF- β , et l'AMH (Matzuk *et al.*, 1995) développant des tumeurs des cellules interstitielles des ovaires et testicules. Il semble donc peu vraisemblable que les carcinomes prostatiques et mammaires observés chez nos souris soient une conséquence de ces tumeurs des cellules interstitielles des gonades.

Le modèle murin d'invalidation du gène *Men1* spécifique des glandes mammaires que nous avons généré s'est avéré développer aussi des prolactinomes dus à une fuite du transgène *WapCre* dans l'hypophyse. L'hyperprolactinémie engendrée par ces tumeurs hypophysaires aurait pu avoir une influence sur le développement de lésions dans les glandes mammaires. Différentes analyses ont été réalisées dans notre modèle, ainsi que dans un autre modèle murin d'invalidation de *Men1* dans le pancréas, développant aussi des prolactinomes à cause d'une fuite du transgène, afin d'évaluer l'influence de l'élévation sérique de la concentration en prolactine sur l'augmentation de la fréquence des MIN. Ces analyses ont montré qu'il

n'était pas possible d'expliquer l'augmentation du développement de MIN simplement par l'occurrence des prolactinomes.

- *Influence du fond génétique ?*

Il n'est pas exclu que les carcinomes observés chez les souris hétérozygotes soient des lésions apparaissant de manière spontanée. En effet, certaines souches de souris, notamment Balb/c et FVB, sont connues pour leur prédisposition au développement de tumeurs spontanées (Cardiff *et al.*, 2000). Cependant, si tel était le cas, nous observerions aussi des carcinomes dans les souris contrôles *Men1*^{+/+} issues des mêmes portées, or il n'en est rien. De plus, les souris en fond génétique C57BL/6 ou 129Sv ne font pas partie de celles décrites comme étant susceptibles aux lésions spontanées. Le développement des lésions mammaires et prostatiques observé dans nos modèles de souris semble donc être associé à l'inactivation du gène *Men1*.

- *Allèle floxé de Men1 hypomorphique ?*

Nous avons observé que les souris *Men1*^{F/F} présentaient un très faible pourcentage de MIN et de carcinomes, ces carcinomes étant retrouvés dans des proportions similaires chez les souris *WapCre-Men1*^{F/F}. Ces lésions spontanées peuvent être attribuées soit à une influence du fond génétique, soit à la possibilité que l'allèle « floxé » de *Men1* (flanqué par les sites *loxP*) soit hypomorphique. Bien que l'épithélium mammaire des souris *Men1*^{F/F} ne montre aucune diminution de l'intensité de l'expression de menin en immunohistochimie, il n'est pas exclu que la présence des sites *loxP* affecte l'épissage du transcrit *Men1*. Cette altération de l'épissage pourrait entraîner soit une modification de la séquence de la protéine produite, par traduction d'un intron mal excisé, pouvant par exemple altérer l'interaction de menin avec certains de ses partenaires, soit une déstabilisation du transcrit menant à une diminution de l'expression de menin, qui ne serait pas détectable par immunohistochimie. Le caractère hypomorphique de l'allèle floxé de *Men1* n'a jamais été décrit dans d'autres modèles, notamment d'inactivation de *Men1* dans les cellules pancréatiques (Bertolino *et al.*, 2003c). Néanmoins, il est possible que les cellules mammaires soient plus sensibles à cet allèle floxé que d'autres tissus comme le pancréas. Le fait que nous ayons détecté une faible incidence de MIN dans les glandes mammaires des souris *RipCre-Men1*^{F/F} générées par un groupe australien (Biondi *et al.*, 2004), où l'expression de menin est intacte dans les cellules mammaires, semble aussi indiquer un allèle floxé hypomorphique au niveau des cellules mammaires.

A. 3. Facteurs pouvant expliquer la faible prédisposition observée au développement de carcinomes

- *Mortalité précoce des souris WapCre-Men1^{F/F}*

L'apparition de prolactinomes chez les souris mutantes a considérablement compliqué l'étude de l'effet de l'inactivation tissu-spécifique de *Men1* sur la tumorigenèse des glandes mammaires. En effet, ces tumeurs ont engendré une mortalité précoce des souris dès l'âge de 9 mois par compression des tissus cérébraux, la totalité des souris ne survivant pas au-delà de 18 mois. Dans ces conditions, nous n'avons pas pu évaluer le potentiel des MIN détectées dans un peu plus de 50% des souris mutantes à évoluer en carcinomes à plus long terme.

- *Fond génétique peu favorable*

On peut aussi se poser la question de l'influence du fond génétique des souris utilisées sur la pénétrance des lésions. Le fond mixte C57BL/6 x 129/Sv n'est pas le plus couramment utilisé dans les études de prédisposition à la tumorigenèse mammaire et prostatique, qui utilisent plutôt des souris en fond FVB et Balb/c, présentant une susceptibilité accrue aux tumeurs en général. Il est probable que le fond mixte que nous avons utilisé ne soit favorable ni au développement de lésions, ni à la conversion des MIN/PIN en carcinomes en l'absence de *menin*. Plusieurs études ont ainsi montré qu'une même modification génétique, par exemple l'inactivation de *p53* (Jacks *et al.*, 1994, Donehower *et al.*, 1995, Kuperwasser *et al.*, 2000), d'un allèle d'*Apc* (Gaspar *et al.*, 2009) ou de *Pten* (Stambolic *et al.*, 2000, Di Cristofano *et al.*, 2001, Blando *et al.*, 2009), pouvait n'avoir aucun effet ou ne donner que des lésions pré-cancéreuses dans un fond génétique donné, et donner des carcinomes dans un autre fond génétique, plus susceptible.

- *Nécessité d'événements additionnels*

Finalement, le fait que nous n'observions qu'une faible incidence de carcinomes dans nos modèles de souris suite à l'inactivation du gène *Men1* ne signifie aucunement que le gène *Men1* ne joue pas un rôle de suppresseur de tumeurs dans les tissus hormono-dépendants. D'après nos résultats, il semblerait que l'inactivation du gène *Men1* soit impliquée dans l'augmentation de la fréquence de lésions pré-cancéreuses mammaires, et éventuellement dans la transition des PIN vers des carcinomes prostatiques. La fréquence des carcinomes prostatiques et mammaires pourrait peut-être augmenter si l'inactivation du gène *Men1* était associée avec un autre événement génétique. Effectivement, des gènes comme *PTEN*, dont les mutations chez l'homme sont connues pour prédisposer au cancer de la prostate, ne donnent que des hyperplasies ou PIN sans donner de carcinomes dans les modèles murins (Stambolic

et al., 2000, Di Cristofano *et al.*, 2001). Ce n'est qu'en combinant l'inactivation hétérozygote de *Pten* avec l'inactivation d'autres suppresseurs de tumeurs (*p27*, *Nkx3.1*) que des carcinomes prostatiques apparaissent (Di Cristofano *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2002, Gao *et al.*, 2004, Bai *et al.*, 2006).

- *Choix du transgène Cre utilisé*

De plus, l'utilisation du transgène *WapCre* dans notre modèle d'inactivation spécifique du gène *Men1* dans les glandes mammaires limite l'étude du rôle du gène au compartiment luminal de l'épithélium mammaire. Le croisement de nos souris *Men1^{F/F}* avec, par exemple, des souris *MMTV-Cre*, ou *K14-Cre* nous aurait permis de cibler plus de types cellulaires mammaires.

B. Quels sont les événements secondaires liés à l'inactivation de menin qui favorisent la tumorigenèse ?

B. 1. Implication éventuelle des récepteurs nucléaires

La caractéristique essentielle des tissus hormono-dépendants est leur sensibilité extrême aux hormones sexuelles androgéniques ou œstrogéniques. Le fait même que j'ai pu observer au cours de ma thèse une prédisposition des souris ayant un ou deux allèles invalidés du gène *Men1* au développement de lésions pré-cancéreuses des glandes mammaires et de carcinomes prostatiques n'est pas anodin, étant donné l'interaction connue de menin avec plusieurs récepteurs nucléaires d'hormones, dont ER α (Dreijerink *et al.*, 2006) et PPAR γ (Dreijerink *et al.*, 2009b), pour lesquels elle joue le rôle de coactivateur transcriptionnel.

Il a précédemment été montré que menin est nécessaire à l'inhibition de la prolifération induite par la voie TGF- β dans des lignées hypophysaires, notamment via son interaction avec Smad3 (Kaji *et al.*, 2001). De manière intéressante, plusieurs travaux ont démontré des interférences mutuelles entre les voies de signalisation des récepteurs aux œstrogènes (ER) ou aux androgènes (AR) et la voie TGF- β . Ainsi, il a été montré que ER inhibe l'activité transcriptionnelle de Smad3 dans les cellules mammaires MCF-7 (Cherlet & Murphy, 2007), ainsi que la migration de ces cellules induite par le TGF- β (Malek *et al.*, 2006), et qu'inversement, Smad4 est un co-répresseur de l'activité transcriptionnelle de ER (Wu *et al.*, 2003). De plus, le TGF- β restreint la prolifération des cellules mammaires exprimant ER (Ewan *et al.*, 2005). De la même manière, le complexe Smad3/Smad4 interagit avec AR et semblerait aussi être un répresseur de la signalisation AR (Hayes *et al.*, 2001, Kang *et al.*,

2002). Inversement, AR réprime la signalisation TGF- β dans les cellules prostatiques LNCaP en interagissant avec Smad3 (Chipuk *et al.*, 2002). Menin se trouve donc à la croisée de ces deux voies, de par son interaction avec Smad3 et pourrait de ce fait participer à une sorte d'équilibre entre les voies de signalisation des récepteurs nucléaires et la voie TGF- β .

B. 2. Menin, beta-caténine et E-cadherine

Nous avons observé une diminution de l'expression membranaire de beta-caténine et E-cadhérine dans les MIN développées chez nos souris *WapCre-Men1^{F/F}* (voir article 2). Cette observation est d'autant plus intéressante que le même phénomène a pu être observé par notre équipe dans les insulinomes développés suite à l'inactivation du gène *Men1* dans les cellules beta du pancréas (Bertolino *et al.*, 2003c). De plus, d'autres travaux plus récents ont montré l'interaction entre menin et beta-caténine (Chen *et al.*, 2008, Cao *et al.*, 2009), et que l'interaction de menin avec une autre protéine d'adhésion cellulaire, IQGAP1, renforce la localisation des complexes beta-caténine/IQGAP1 à la membrane plasmique et augmente l'adhésion inter-cellulaire des cellules beta (Yan *et al.*, 2009).

La diminution de l'expression membranaire de beta-caténine et E-cadhérine observée dans les MIN chez nos souris pourrait donc être une conséquence de l'inactivation de menin, et participerait éventuellement au développement de ces lésions pré-cancéreuses, peut-être en fragilisant les contacts inter-cellulaires.

Il est intéressant de noter que, chez la souris, la double inactivation de p53 et E-cadherine conduit au développement de carcinomes lobulaires métastatiques, alors que l'inactivation seule de E-cadhérine n'a aucun effet, ni sur la structure, ni sur la tumorigenèse des glandes mammaires (Derksen *et al.*, 2006). Les auteurs ont notamment démontré un rôle de l'inactivation de E-cadhérine dans les étapes précoces de la tumorigenèse. (Bertolino *et al.*, 2003c). Ces données suggèrent que, dans notre modèle d'inactivation du gène *Men1* dans les glandes mammaires, l'inactivation de menin pourrait être responsable de la diminution membranaire de E-cadherin/beta-caténine, favorisant l'initiation du processus de tumorigenèse. Ces altérations entraîneraient éventuellement une fréquence accrue de lésions pré-cancéreuses (MIN), mais ne seraient pas suffisantes pour déclencher la conversion des MIN en lésions cancéreuses.

B. 3. Un rôle pour les inhibiteurs de CDK p27 et p18 ?

Les inhibiteurs de CDK p27 et p18 sont connus comme étant des gènes cibles de menin. Leur expression est notamment régulée positivement par la méthylation de H3K4 au niveau

de leur promoteur, sous l'action du complexe HMT dont fait partie menin (Karnik *et al.*, 2005, Milne *et al.*, 2005).

J'ai pu détecter une forte diminution de l'expression de p27 dans les carcinomes prostatiques développés chez nos souris hétérozygotes pour *Men1*. Etant donné l'accélération de la tumorigenèse prostatique observée chez les souris présentant une invalidation, homozygote ou hétérozygote, de *p27* en association avec l'invalidation hétérozygote de *Pten* (Di Cristofano *et al.*, 2001, Gao *et al.*, 2004) ou l'activation d'AKT (Majumder *et al.*, 2008), cette diminution d'expression de p27 dans nos lésions pourrait jouer un rôle dans la tumorigenèse. Cependant, notre équipe a pu montrer que la diminution de l'expression de p27, bien qu'observée dans une majorité des insulinoïdes liés à l'invalidation de *Men1* chez la souris, n'est pas toujours systématique et est plutôt un événement tardif dans la tumorigenèse (Fontaniere *et al.*, 2006a). D'ailleurs, l'invalidation seule de p27 n'induit pas de lésions prostatiques (Di Cristofano *et al.*, 2001, Gao *et al.*, 2004, Majumder *et al.*, 2008). On peut donc imaginer que la perte de p27 pourrait plutôt intervenir dans la transition des PIN en carcinomes, étant donné que nous avons observé autant de PIN chez les contrôles *Men1*^{+/+} que chez les mutants *Men1*^{+/-}, avec un développement de carcinomes prostatiques uniquement chez les mutants. Majumder *et al.* ont par ailleurs démontré que p27 serait impliqué dans un point de contrôle régulant la prolifération des cellules prostatiques, et que sa perte favoriserait une conversion des PIN, développés sous l'effet de l'activation d'AKT, en carcinomes (Majumder *et al.*, 2008).

Un autre candidat pourrait être p18, étant donné qu'il a été montré récemment que les souris *Men1*^{+/-} ; *p18*^{-/-} présentent une augmentation de la fréquence et une accélération du développement des tumeurs endocrines observées chez les souris hétérozygotes pour *Men1* (Bai *et al.*, 2007). Il semblerait donc que *p18* collabore avec *Men1* pour empêcher la tumorigenèse des tissus endocrines. De manière intéressante, le même groupe a aussi montré que l'invalidation de *p18* dans un contexte hétérozygote pour *Pten* accélère la tumorigenèse prostatique (Bai *et al.*, 2006). Enfin, une étude publiée cette année a montré que l'invalidation de *p18* prédispose les souris au développement de tumeurs mammaires (Pei *et al.*, 2009). Alors que les souris *p18*^{-/-} en fond génétique C57BL/6 ne présentent que des hyperplasies mammaires et des ectasies canalaire (dilatation des canaux mammaires) (Latres *et al.*, 2000), le passage en fond Balb/c entraîne l'apparition de carcinomes mammaires ductaux *in situ* (Pei *et al.*, 2009).

Le modèle de Pei *et al.* présente des similarités avec notre modèle d'invalidation de *Men1* dans les cellules mammaires. La latence moyenne d'apparition des tumeurs mammaires est de

15.4 mois dans les souris *p18^{-/-}* contre 14.6 mois dans notre modèle (donnée non incluse dans l'article 2). L'incidence des tumeurs mammaires dans leur modèle est de 23% dans les souris entre 5 et 12 mois (38.5% dans notre modèle, groupe 9-12 mois), puis atteint 88% dans le groupe 12-24 mois (54.7% dans notre modèle, en regroupant les groupes 12-15 et >15 mois). La plus faible incidence dans le groupe le plus âgé pour notre modèle peut être expliquée par la mortalité due aux prolactinomes chez nos souris mutantes, ne leur permettant pas de survivre au-delà de 18 mois. Enfin, les tumeurs mammaires observées dans leur modèle sont en fait en majorité des carcinomes *in situ*, qui sont en principe classés parmi les MIN dans le consensus d'Annapolis que nous avons suivi. Les auteurs n'ont réellement observé que deux carcinomes invasifs sur 18 souris (11%), l'âge des souris n'étant pas précisé. Les auteurs ont aussi observé que la plupart de ces tumeurs étaient positives pour l'expression de ER, avec un pourcentage de cellules marquées par ER très variable, allant de 2-5% à 20% des cellules des lésions, ce qui ressemble assez à ce que nous avons aussi observé concernant le marquage ER dans les MIN de notre modèle.

A cause de difficultés techniques pour faire marcher notre anticorps anti-p18 en immunohistochimie sur les glandes mammaires, je n'ai malheureusement pas pu regarder si l'expression de p18 était diminuée dans les MIN développées par nos souris. Le développement de ces MIN pourrait en effet passer, soit entièrement, soit partiellement, par la diminution de l'expression de p18 consécutive à l'inactivation de *Men1*.

II. *MEN1* est-il aussi un gène de prédisposition à la tumorigenèse de la prostate et des glandes mammaires chez l'Homme ?

A. Association des NEM1 avec les cancers des tissus hormono-dépendants ?

Comme décrit dans l'introduction (paragraphe I.A.3.f.), certaines études dans la littérature peuvent suggérer une association entre la pathologie NEM1 et les cancers du sein.

Mes recherches dans la littérature m'ont permis de découvrir deux cas de femmes atteintes de NEM1 ayant aussi développé un cancer du sein, les deux cancers du sein montrant une inactivation de menin, visible soit par une LOH détectée au locus *MEN1* (Honda *et al.*, 2004), soit par l'absence d'expression de menin en immunohistochimie dans le cancer du sein (Naito *et al.*, 2006). J'ai pu également trouver quelques études de suivi de cohortes de patients NEM1, décrivant des cancers du sein chez certains d'entre eux (Doherty *et al.*, 1998, Dean *et al.*, 2000, Vierimaa *et al.*, 2007). Ces observations amènent une question, à savoir si la survenue des cancers du sein dans ce contexte résulte ou non de l'inactivation du gène.

Cependant, les études de cas cliniques ou les études rétrospectives publiées sur les patients NEM1 sont rares, et pour la majorité d'entre elles, les données cliniques concernant les antécédents de lésions autres que celles associées aux NEM1 ne sont pas toujours complètes. Il est donc difficile de savoir quelle est la fréquence exacte des cancers du sein, ou de la prostate, chez les patients NEM1, et encore moins le statut du gène *MEN1* dans ces lésions.

De toute façon, il est clair que l'incidence des cancers du sein et de la prostate qui pourraient être liés à l'inactivation du gène *Men1* est faible. Cependant, les cancers survenant chez des patients NEM1 avant 50 ans seraient susceptibles d'avoir des causes génétiques. Il serait donc intéressant que les cancers survenant dans ce contexte fassent l'objet d'une analyse du statut du gène *MEN1*.

B. Problème de la rareté des mutations de *MEN1* par rapport à la fréquence des cancers du sein et de la prostate

Bien que les données obtenues pendant ma thèse suggèrent une éventuelle implication du gène *Men1* dans la tumorigenèse mammaire et prostatique chez la souris, on peut s'interroger sur la signification de nos observations chez l'homme. Il n'est pas exclu que ce rôle du gène *Men1* soit propre à l'espèce murine. Cependant, l'absence de corrélation établie entre les mutations du gène *MEN1* et les cancers du sein et de la prostate peut aussi résulter de la rareté de ces mutations. En effet, la fréquence des cancers du sein et de la prostate dans la population générale étant très élevée comparée à celle de la maladie NEM1, on comprend très bien que les médecins et pathologistes diagnostiquant les cas de NEM1 ne prêtent pas d'intérêt particulier à des cancers du sein ou de la prostate présents chez ces patients, et soient plutôt enclins à considérer leur association chez un même patient comme une association fortuite. Dans l'idéal, il faudrait pouvoir sensibiliser les médecins faisant du conseil génétique à la surveillance d'une possible prédisposition des patients NEM1 à ces types de cancers.

Il est aussi important de souligner que, dans les cancers humains, la prédisposition au cancer serait la plupart du temps multigénique. Pour les cancers du sein, il a par exemple été estimé qu'environ la moitié des cancers héréditaires seraient dus à une prédisposition polygénique, impliquant plusieurs gènes, chacun conférant un risque faible ou modéré (Olopade *et al.*, 2008). Il est possible que le gène *MEN1* fasse partie de ces gènes de prédisposition à pénétrance faible ou modérée, mais qui en combinaison avec d'autres gènes, mène à une susceptibilité accrue aux cancers des tissus hormono-dépendants.

Les mutations du gène *MEN1* pourraient aussi être impliquées dans les cancers plutôt sporadiques. Dans ce cas, un criblage des banques de cancers du sein et de la prostate pourrait

être utile, bien que laborieux, étant donné la prédisposition vraisemblablement faible conférée par *MENI*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux effectués par le groupe du Dr. C. X. Zhang et dans d'autres laboratoires ont pu établir des preuves génétiques démontrant le rôle du gène *MEN1* dans la suppression des tumeurs endocrines observées chez les patients NEM1, en utilisant des modèles murins, notamment les souris hétérozygotes pour le gène *Men1*, qui développent un spectre de tumeurs similaire aux patients. Les fonctions biologiques et onco-suppressives précises de menin restent cependant à clarifier. L'analyse de ce modèle de souris hétérozygotes avait permis de mettre en évidence un type de lésions inattendues, des carcinomes des tissus hormono-dépendants, à savoir la prostate chez les mâles et les glandes mammaires chez les femelles. Les objectifs de mes travaux de thèse ont été de déterminer si l'inactivation du gène *Men1* était impliquée dans le développement de ces cancers et, par conséquent, si le gène *Men1* pouvait constituer un gène de prédisposition à ce type de lésions.

Tout d'abord, dans une première partie de mon travail, j'ai pu montrer que les carcinomes prostatiques observés chez les souris hétérozygotes pour *Men1* présentaient une inactivation quasi totale de l'expression de la protéine menin, accompagnée d'une perte d'hétérozygotie partielle pour le gène *Men1*. Ces données suggèrent donc un lien entre l'inactivation de menin et le développement de lésions cancéreuses, notamment dans la transition des lésions pré-cancéreuses (PIN) en carcinomes. Afin de mieux préciser ce rôle, il serait intéressant de générer un modèle d'inactivation du gène *Men1* spécifiquement dans les cellules épithéliales prostatiques, en croisant nos souris *Men1*^{F/F} avec des souris porteuses d'un transgène *Cre* sous le contrôle de promoteurs spécifiques de la prostate, comme *PSA* ou *Probasin*. Par ailleurs, j'ai pu mettre en évidence une expression hétérogène de AR dans ces lésions, ainsi que la diminution de l'expression de p27, indiquant un rôle éventuel de ces altérations dans la progression vers les carcinomes. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans ce processus et liés à l'inactivation de menin n'ont pas pu être approfondis. Il serait notamment intéressant de déterminer l'existence potentielle d'une interaction, physique et/ou fonctionnelle entre menin et AR. Etant donné l'interaction déjà identifiée entre menin et ER α , ainsi que menin et PPAR γ , deux autres récepteurs nucléaires, on peut penser que menin pourrait aussi avoir un lien avec AR dans les cellules prostatiques. Des analyses dans des lignées de cellules prostatiques en culture, comme les LNCaP, pourraient être envisagées, tout d'abord pour

étudier l'interaction entre menin et AR, par GST-pulldown avec les constructions GST-menin, éventuellement tronquées à différents niveaux de la protéine, qui sont déjà disponibles dans l'équipe, ou bien par immunoprécipitation endogène. L'inhibition de l'expression de menin dans ces cellules par ARN interférence pourrait nous apporter des éléments de réponse quant au rôle de menin dans les cellules prostatiques, au niveau de la prolifération, de l'apoptose et des conséquences de son inactivation *in vitro*, qui pourrait expliquer le développement de carcinomes chez les souris. La piste de la collaboration entre la perte de menin et celle de p27, cette dernière étant éventuellement une conséquence de la première, serait aussi intéressante à approfondir. Cela pourrait être fait par un croisement des souris hétérozygotes pour *Men1* avec les souris ayant un ou deux allèles invalidés de *p27*, ou bien de *p18*, afin de voir si la tumorigenèse prostatique est accélérée, comme dans les souris hétérozygotes pour *Pten*. Il est bien sûr nécessaire de vérifier que la tumorigenèse dans nos souris ne passe pas par l'altération de facteurs connus pour leur prédisposition aux cancers de la prostate (*Pten*, beta-caténine, ...), ce que je n'ai pas pu faire faute de matériel suffisant.

Une deuxième partie de mon travail s'est intéressée au rôle de l'inactivation de menin dans les carcinomes mammaires observés chez ces mêmes souris. Différentes données de la littérature nous ont poussés à générer un modèle de souris où le gène *Men1* est invalidé spécifiquement dans les cellules mammaires. La caractérisation de ce modèle m'a permis de montrer que l'invalidation du gène pourrait prédisposer les souris au développement de lésions pré-cancéreuses mammaires (MIN) exprimant ER. Néanmoins, l'analyse de ce phénotype a été considérablement compliquée par l'apparition de prolactinomes, suite à la fuite d'expression du transgène *WapCre* dans l'hypophyse, conduisant à la mort prématurée des souris avant l'âge de 18 mois, ne nous permettant pas d'évaluer la progression potentielle de ces MIN en carcinomes avec le temps. Après avoir écarté, par diverses analyses, une influence éventuelle de l'hyperprolactinémie engendrée chez ces souris sur l'augmentation de l'incidence des MIN, nous avons pu tout de même montrer le rôle de l'inactivation de menin dans la prédisposition à ces lésions pré-cancéreuses. De plus, les données que j'ai pu obtenir suggèrent la participation dans ce processus de la dérégulation de l'expression membranaire de beta-caténine et E-cadhérine, susceptible d'être liée à la perte de menin.

Afin de confirmer l'implication de menin dans la prédisposition aux lésions MIN, il serait judicieux de générer un autre modèle de souris, en croisant nos souris *Men1^{F/F}* avec des souris porteuses d'un transgène Cre sous le contrôle d'un autre promoteur que *Wap*, pour éviter le développement de prolactinomes interférant avec nos analyses. Parmi les promoteurs pouvant

être utilisés, un bon candidat serait le promoteur NRL (neu-related lipocalin), étant donné qu'il s'exprime dans les cellules mammaires, mais n'est pas régulé par les hormones (œstrogènes et prolactine), à l'inverse de *Wap*. Il serait aussi nécessaire d'étudier de manière plus approfondie les mécanismes moléculaires conduisant au développement de MIN, suite à l'inactivation du gène *Men1*. L'analyse de l'expression de *Brcal/2*, *Pten*, *Smad4*, *p18*, ... présenterait notamment un intérêt particulier. En raison de la mauvaise qualité en immunohistochimie des anticorps dirigés contre ces facteurs qui étaient à notre disposition, je n'ai pas pu évaluer leur expression dans les MIN développées dans notre modèle. Ces analyses pourraient être faites soit en utilisant des anticorps provenant d'autres fournisseurs, soit en réalisant des analyses en western blot sur les cellules épithéliales purifiées à partir des glandes mammaires de ces souris. Ce genre d'analyses en western blot ne permettrait cependant pas une très grande sensibilité, étant donné que la majorité des lésions observées sont plutôt focales et de taille limitée. L'analyse en immunomarquage reste donc le meilleur moyen de visualiser les altérations d'expression se produisant dans les MIN. Les modèles cellulaires pourraient aussi constituer un bon outil pour des analyses plus poussées. L'inhibition par interférence à l'ARN de l'expression de *menin* dans des lignées de cellules mammaires de type plutôt différencié, comme MCF-7 ou MCF10A, pourrait apporter des indices concernant le rôle de *menin* dans les cellules mammaires. L'analyse de la prolifération, de l'apoptose, mais aussi de l'état de différenciation des cellules permettrait de préciser les processus cellulaires altérés après inhibition de *menin*.

Dans l'hypothèse où les données que j'ai obtenues pendant ma thèse sur une prédisposition éventuellement conférée par l'inactivation du gène *Men1* dans la tumorigenèse prostatique et mammaire chez la souris, seraient confirmées par d'autres analyses, il serait intéressant de voir si cela peut être élargi à l'homme. Un criblage de banques de cancers du sein et de la prostate humains par immunohistochimie révélant *menin* pourrait être utile pour évaluer cette hypothèse, bien que difficile à réaliser à grande échelle. Nous avons déjà initié une analyse de TMA (tissue microarray) permettant de tester l'expression de *menin* en immunohistochimie sur une collection d'une centaine de cancers du sein humain diagnostiqués entre 1998 et 1999 au Centre Léon Bérard. Les résultats des marquages sont actuellement en cours d'analyse.

En conclusion, mes travaux ont apporté une nouvelle perspective concernant les fonctions déjà connues de *menin* dans les tissus endocrines, en ouvrant la voie vers un éventuel rôle

jusqu'alors insoupçonné de *Men1* en tant que suppresseur de tumeurs dans les tissus hormono-dépendants, tout du moins chez la souris. Il reste encore à établir la signification de ces données chez l'humain. Si l'implication du gène dans la survenue de cancers du sein et de la prostate, même dans le cadre d'une prédisposition faible, pouvait être confirmée, cette découverte aboutirait à terme à la fois à une meilleure prise en charge des patients NEM1, avec un renforcement du suivi de ces patients pour la surveillance de ces cancers, et à l'identification d'un nouveau rôle suppresseur de tumeur du gène *MEN1* dans les cancers sporadiques du sein et de la prostate.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agarwal, S. K., Guru, S. C., Heppner, C. et al. 1999. Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell*, **96**, 143-152.
- Agarwal, S. K., Impey, S., Mcweeney, S. et al. 2007. Distribution of menin-occupied regions in chromatin specifies a broad role of menin in transcriptional regulation. *Neoplasia*, **9**, 101-107.
- Agarwal, S. K., Novotny, E. A., Crabtree, J. S. et al. 2003. Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 10770-10775.
- Andrechek, E. R., Mori, S., Rempel, R. E., Chang, J. T. & Nevins, J. R. 2008. Patterns of cell signaling pathway activation that characterize mammary development. *Development*, **135**, 2403-2413.
- Arendt, L. M. & Schuler, L. A. 2008. Transgenic Models to Study Actions of Prolactin in Mammary Neoplasia. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **13**, 29-40.
- Aziz, A., Miyake, T., Engleka, K. A., Epstein, J. A. & Mcdermott, J. C. 2009. Menin expression modulates mesenchymal cell commitment to the myogenic and osteogenic lineages. *Developmental Biology*, **332**, 116-130.
- Backman, S. A., Ghazarian, D., So, K. et al. 2004. Early onset of neoplasia in the prostate and skin of mice with tissue-specific deletion of Pten. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1725-1730.
- Bai, F., Pei, X. H., Nishikawa, T., Smith, M. D. & Xiong, Y. 2007. p18Ink4c, but not p27Kip1, collaborates with Men1 to suppress neuroendocrine organ tumors. *Mol Cell Biol*, **27**, 1495-1504.
- Bai, F., Pei, X. H., Pandolfi, P. P. & Xiong, Y. 2006. p18 Ink4c and Pten constrain a positive regulatory loop between cell growth and cell cycle control. *Mol Cell Biol*, **26**, 4564-4576.
- Baker, S. J. 2007. PTEN Enters the Nuclear Age. *Cell*, **128**, 25-28.
- Bauters, C., Leclerc, L., Wémeau, J. L., Proye, C., Pigny, P. & Porchet, N. 2003. Multiple endocrine neoplasias. Recent advances in clinical and genetic diagnosis. *Rev Med Interne*, **24**, 721-729.
- Bazzi, W., Renon, M., Vercherat, C. et al. 2008. MEN1 Missense Mutations Impair Sensitization to Apoptosis Induced by Wild-Type Menin in Endocrine Pancreatic Tumor Cells. *Gastroenterology*.
- Behringer, R. R., Finegold, M. J. & Cate, R. L. 1994. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell*, **79**, 415-425.
- Bertolino, P., Radovanovic, I., Casse, H., Aguzzi, A., Wang, Z. Q. & Zhang, C. X. 2003a. Genetic ablation of the tumor suppressor menin causes lethality at mid-gestation with defects in multiple organs. *Mech Dev*, **120**, 549-560.
- Bertolino, P., Tong, W. M., Galendo, D., Wang, Z. Q. & Zhang, C. X. 2003b. Heterozygous Men1 mutant mice develop a range of endocrine tumors mimicking multiple endocrine neoplasia type 1. *Mol Endocrinol*, **17**, 1880-1892.
- Bertolino, P., Tong, W. M., Herrera, P. L., Casse, H., Zhang, C. X. & Wang, Z. Q. 2003c. Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer Res*, **63**, 4836-4841.

- Bhatia-Gaur, R., Donjacour, A. A., Sciavolino, P. J. et al. 1999. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev.*, **13**, 966-977.
- Bierie, B., Nozawa, M., Renou, J. P. et al. 2003. Activation of beta-catenin in prostate epithelium induces hyperplasias and squamous transdifferentiation. *Oncogene*, **22**, 3875-3887.
- Biondi, C. A., Gartside, M. G., Waring, P. et al. 2004. Conditional inactivation of the MEN1 gene leads to pancreatic and pituitary tumorigenesis but does not affect normal development of these tissues. *Mol Cell Biol*, **24**, 3125-3131.
- Blando, J., Portis, M., Benavides, F. et al. 2009. PTEN Deficiency Is Fully Penetrant for Prostate Adenocarcinoma in C57BL/6 Mice via mTOR-Dependent Growth. *Am J Pathol*, **174**, 1869-1879.
- Boni, R., Vortmeyer, A. O., Pack, S. et al. 1998. Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene detected in sporadic angiofibromas. *J Invest Dermatol*, **111**, 539-540.
- Brandi, M. L., Gagel, R. F., Angeli, A. et al. 2001. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 5658-5671.
- Brodie, S. G., Xu, X., Qiao, W., Li, W. M., Cao, L. & Deng, C. X. 2001. Multiple genetic changes are associated with mammary tumorigenesis in Brca1 conditional knockout mice. *Oncogene*, **20**, 7514-7523.
- Burgess, J. R., Greenaway, T. M. & Shepherd, J. J. 1998. Expression of the MEN-1 gene in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type 1. *J Intern Med*, **243**, 465-470.
- Busygina, V., Suphapeetiporn, K., Marek, L. R., Stowers, R. S., Xu, T. & Bale, A. E. 2004. Hypermutability in a Drosophila model for multiple endocrine neoplasia type 1. *Hum Mol Genet*, **13**, 2399-2408.
- Cadigan, K. M. & Nusse, R. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & Development*, **11**, 3286-3305.
- Cao, Y., Liu, R., Jiang, X. et al. 2009. Nuclear-cytoplasmic shuttling of menin regulates nuclear translocation of {beta}-catenin. *Mol. Cell. Biol.*, MCB.00335-00309.
- Cardiff, R. D., Anver, M. R., Gusterson, B. A. et al. 2000. The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene*, **19**, 968-988.
- Chandrasekharappa, S. C., Guru, S. C., Manickam, P. et al. 1997. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science*, **276**, 404-407.
- Chandrasekharappa, S. C. & Teh, B. T. 2001. Clinical and molecular aspects of multiple endocrine neoplasia type 1. *Front Horm Res.*, **28**, 50-80.
- Chen, G., A, J., Wang, M. et al. 2008. Menin promotes the Wnt signaling pathway in pancreatic endocrine cells. *Mol Cancer Res*, **6**, 1894-1907.
- Chen, Y. X., Yan, J., Keeshan, K. et al. 2006. The tumor suppressor menin regulates hematopoiesis and myeloid transformation by influencing Hox gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1018-1023.
- Cherlet, T. & Murphy, L. 2007. Estrogen receptors inhibit Smad3 transcriptional activity through Ap-1 transcription factors. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **306**, 33-42.
- Cheung, A. M. Y., Elia, A., Tsao, M.-S. et al. 2004. Brca2 Deficiency Does Not Impair Mammary Epithelium Development but Promotes Mammary Adenocarcinoma Formation in p53+/- Mutant Mice. *Cancer Res*, **64**, 1959-1965.
- Chipuk, J. E., Cornelius, S. C., Pultz, N. J. et al. 2002. The Androgen Receptor Represses Transforming Growth Factor- β Signaling through Interaction with Smad3. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 1240-1248.
- Chuaqui, R. F., Zhuang, Z., Emmert-Buck, M. R., Liotta, L. A. & Merino, M. J. 1997. Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 11q13 in atypical ductal hyperplasia and in situ carcinoma of the breast. *Am J Pathol.*, **150**, 297-303.

- Costa, S. C., Nascimento, L. S., Ferreira, F. J., Mattos, P. S., Camara-Lopes, L. H. & Ward, L. S. 2001. Lack of mutations of exon 2 of the MEN1 gene in endocrine and nonendocrine sporadic tumors. *Braz J Med Biol Res*, **34**, 861-865.
- Cowin, P., Rowlands, T. M. & Hatsell, S. J. 2005. Cadherins and catenins in breast cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, **17**, 499-508.
- Crabtree, J. S., Scacheri, P. C., Ward, J. M. et al. 2001. A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1118-1123.
- Crabtree, J. S., Scacheri, P. C., Ward, J. M. et al. 2003. Of mice and MEN1: Insulinomas in a conditional mouse knockout. *Mol Cell Biol*, **23**, 6075-6085.
- Damber, J.-E. & Aus, G. 2008. Prostate cancer. *The Lancet*, **371**, 1710-1721.
- Dean, P. G., Van Heerden, J. A., Farley, D. R. et al. 2000. Are patients with multiple endocrine neoplasia type I prone to premature death? *World J Surg*, **24**, 1437-1441.
- Derksen, P. W. B., Liu, X., Saridin, F. et al. 2006. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell*, **10**, 437-449.
- Di Cristofano, A., De Acetis, M., Koff, A., Cordon-Cardo, C. & P Pandolfi, P. 2001. Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat Genet*, **27**, 222-224.
- Di Sant'agnese, P. A. 1998. Neuroendocrine cells of the prostate and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: a review of morphologic aspects. *Urology*, **51**, 121-124.
- Doherty, G. M., Olson, J. A., Frisella, M. M., Lairmore, T. C., Wells, S. A., Jr. & Norton, J. A. 1998. Lethality of multiple endocrine neoplasia type I. *World J Surg*, **22**, 581-586; discussion 586-587.
- Donehower, L. A., Harvey, M., Vogel, H. et al. 1995. Effects of genetic background on tumorigenesis in p53-deficient mice. *Mol Carcinog*, **14**, 16-22.
- Dreijerink, K. M., Mulder, K. W., Winkler, G. S., Hoppener, J. W., Lips, C. J. & Timmers, H. T. 2006. Menin links estrogen receptor activation to histone H3K4 trimethylation. *Cancer Res*, **66**, 4929-4935.
- Dreijerink, K. M., Varier, R. A., Van Nuland, R. et al. 2009a. Regulation of vitamin D receptor function in MEN1-related parathyroid adenomas. *Mol Cell Endocrinol*.
- Dreijerink, K. M. A., Varier, R. A., Van Beekum, O. et al. 2009b. The Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1) tumor suppressor regulates PPAR γ -dependent adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, MCB.01001-01008.
- Ewan, K. B. R., Oketch-Rabah, H. A., Ravani, S. A., Shyamala, G., Moses, H. L. & Barcellos-Hoff, M. H. 2005. Proliferation of Estrogen Receptor- α -Positive Mammary Epithelial Cells Is Restrained by Transforming Growth Factor- β 1 in Adult Mice. *Am J Pathol*, **167**, 409-417.
- Farago, M., Dominguez, I., Landesman-Bollag, E. et al. 2005. Kinase-Inactive Glycogen Synthase Kinase 3 β Promotes Wnt Signaling and Mammary Tumorigenesis. *Cancer Res*, **65**, 5792-5801.
- Farley, S. M., Chen, G., Guo, S. et al. 2006. Menin localizes to chromatin through an ATR-CHK1 mediated pathway after UV-induced DNA damage. *J Surg Res*, **133**, 29-37.
- Fierabracci, P., Pinchera, A., Miccoli, P. et al. 2001. Increased prevalence of primary hyperparathyroidism in treated breast cancer. *J Endocrinol Invest*, **24**, 315-320.
- Fontaniere, S., Casse, H., Bertolino, P. & Zhang, C. X. 2006. Analysis of p27(Kip1) expression in insulinomas developed in pancreatic beta-cell specific Men1 mutant mice. *Fam Cancer*, **5**, 49-54.

- Fontaniere, S., Duvillie, B., Scharfmann, R., Carreira, C., Wang, Z. Q. & Zhang, C. X. 2008. Tumour suppressor menin is essential for development of the pancreatic endocrine cells. *J Endocrinol*, **199**, 287-298.
- Forrester, E., Chytil, A., Bierie, B. et al. 2005. Effect of Conditional Knockout of the Type II TGF- β Receptor Gene in Mammary Epithelia on Mammary Gland Development and Polyomavirus Middle T Antigen Induced Tumor Formation and Metastasis. *Cancer Res*, **65**, 2296-2302.
- Franklin, D. S., Godfrey, V. L., O'Brien, D. A., Deng, C. & Xiong, Y. 2000. Functional Collaboration between Different Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Suppresses Tumor Growth with Distinct Tissue Specificity. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 6147-6158.
- Gallagher, R. C., Hay, T., Meniel, V. et al. 2002. Inactivation of Apc perturbs mammary development, but only directly results in acanthoma in the context of Tcf-1 deficiency. *Oncogene*, **21**, 6446-6457.
- Gallo, A., Cuzzo, C., Esposito, I. et al. 2002. Menin uncouples Elk-1, JunD and c-Jun phosphorylation from MAP kinase activation. *Oncogene*, **21**, 6434-6445.
- Gao, H., Ouyang, X., Banach-Petrosky, W. et al. 2004. A critical role for p27kip1 gene dosage in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17204-17209.
- Gaspar, C., Franken, P., Molenaar, L. et al. 2009. A targeted constitutive mutation in the APC tumor suppressor gene underlies mammary but not intestinal tumorigenesis. *PLoS Genet*, **5**.
- Geerdink, E. A., Van Der Luijt, R. B. & Lips, C. J. 2003. Do patients with multiple endocrine neoplasia syndrome type 1 benefit from periodical screening? *Eur J Endocrinol*, **149**, 577-582.
- Gobl, A. E., Berg, M., Lopez-Egido, J. R., Oberg, K., Skogseid, B. & Westin, G. 1999. Menin represses JunD-activated transcription by a histone deacetylase-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*, **1447**, 51-56.
- Gorska, A. E., Jensen, R. A., Shyr, Y., Aakre, M. E., Bhowmick, N. A. & Moses, H. L. 2003. Transgenic mice expressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor-beta receptor exhibit impaired mammary development and enhanced mammary tumor formation. *Am J Pathol*, **163**, 1539-1549.
- Gounari, F., Signoretti, S., Bronson, R. T. et al. 2002. Stabilization of beta-catenin induces lesions reminiscent of prostatic intraepithelial neoplasia, but terminal squamous transdifferentiation of other secretory epithelia. *Oncogene*, **21**, 4099-4107.
- Guru, S. C., Crabtree, J. S., Brown, K. D. et al. 1999. Isolation, genomic organization, and expression analysis of Men1, the murine homolog of the MEN1 gene. *Mamm Genome*, **10**, 592-596.
- Guru, S. C., Goldsmith, P. K., Burns, A. L. et al. 1998. Menin, the product of the MEN1 gene, is a nuclear protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1630-1634.
- Hashimoto, M., Kyo, S., Hua, X. et al. 2008. Role of menin in the regulation of telomerase activity in normal and cancer cells. *Int J Oncol*, **33**, 333-340.
- Hayes, S. A., Zarnegar, M., Sharma, M. et al. 2001. SMAD3 Represses Androgen Receptor-mediated Transcription. *Cancer Res*, **61**, 2112-2118.
- Hennighausen, L., Robinson, G. W., Wagner, K.-U. & Liu, X. 1997. Prolactin Signaling in Mammary Gland Development. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 7567-7569.
- Heppner, C., Bilimoria, K. Y., Agarwal, S. K. et al. 2001. The tumor suppressor protein menin interacts with NF-kappaB proteins and inhibits NF-kappaB-mediated transactivation. *Oncogene*, **20**, 4917-4925.

- Hessman, O., Lindberg, D., Einarsson, A. et al. 1999. Genetic alterations on 3p, 11q13, and 18q in nonfamilial and MEN 1-associated pancreatic endocrine tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, **26**, 258-264.
- Hofmann, M., Schilling, T., Heilmann, P. et al. 1998. [Multiple endocrine neoplasia associated with multiple lipomas]. *Med Klin (Munich)*, **93**, 546-549.
- Honda, M., Tsukada, T., Horiuchi, T. et al. 2004. Primary hyperparathyroidism associated with aldosterone-producing adrenocortical adenoma and breast cancer: relation to MEN1 gene. *Intern Med*, **43**, 310-314.
- Hosokawa, Y., Papanikolaou, A., Cardiff, R. D. et al. 2001. In vivo analysis of mammary and non-mammary tumorigenesis in MMTV-cyclin D1 transgenic mice deficient in p53. *Transgenic Research*, **10**, 471-478.
- Hughes, C. M., Rozenblatt-Rosen, O., Milne, T. A. et al. 2004. Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the hoxc8 locus. *Mol Cell*, **13**, 587-597.
- Hussein, N., Casse, H., Fontaniere, S. et al. 2007. Reconstituted expression of menin in Men1-deficient mouse Leydig tumour cells induces cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Cancer*, **43**, 402-414.
- Hussein, N., Lu, J., Casse, H. et al. 2008. Deregulation of anti-Mullerian hormone/BMP and transforming growth factor-beta pathways in Leydig cell lesions developed in male heterozygous multiple endocrine neoplasia type 1 mutant mice. *Endocr Relat Cancer*, **15**, 217-227.
- Ikeo, Y., Sakurai, A., Suzuki, R. et al. 2000. Proliferation-associated expression of the MEN1 gene as revealed by in situ hybridization: possible role of the menin as a negative regulator of cell proliferation under DNA damage. *Lab Invest*, **80**, 797-804.
- Ikeo, Y., Yumita, W., Sakurai, A. & Hashizume, K. 2004. JunD-menin interaction regulates c-Jun-mediated AP-1 transactivation. *Endocr J*, **51**, 333-342.
- Imbert, A., Eelkema, R., Jordan, S., Feiner, H. & Cowin, P. 2001. Δ N89 β -Catenin Induces Precocious Development, Differentiation, and Neoplasia in Mammary Gland. *J. Cell Biol.*, **153**, 555-568.
- Ishii, K., Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T. & Sugimura, Y. 2008. Role of stromal tenascin-C in mouse prostatic development and epithelial cell differentiation. *Developmental Biology*, **324**, 310-319.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O. et al. 1994. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current Biology*, **4**, 1-7.
- Jerry, D. J., Kittrell, F. S., Kuperwasser, C. et al. 2000. A mammary-specific model demonstrates the role of the p53 tumor suppressor gene in tumor development. *Oncogene*, **19**, 1052-1058.
- Jin, S., Mao, H., Schnepf, R. W. et al. 2003. Menin associates with FANCD2, a protein involved in repair of DNA damage. *Cancer Res*, **63**, 4204-4210.
- Jonkers, J., Meuwissen, R., Van Der Gulden, H., Peterse, H., Van Der Valk, M. & Berns, A. 2001. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet*, **29**, 418-425.
- Kaji, H., Canaff, L., Goltzman, D. & Hendy, G. N. 1999. Cell cycle regulation of menin expression. *Cancer Res*, **59**, 5097-5101.
- Kaji, H., Canaff, L., Lebrun, J. J., Goltzman, D. & Hendy, G. N. 2001. Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming growth factor type beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3837-3842.
- Kang, H.-Y., Huang, K.-E., Chang, S. Y., Ma, W.-L., Lin, W.-J. & Chang, C. 2002. Differential Modulation of Androgen Receptor-mediated Transactivation by Smad3 and Tumor Suppressor Smad4. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 43749-43756.

- Karnik, S. K., Chen, H., Mclean, G. W. et al. 2007. Menin controls growth of pancreatic beta-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. *Science*, **318**, 806-809.
- Karnik, S. K., Hughes, C. M., Gu, X. et al. 2005. Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 14659-14664.
- Kim, H., Lee, J. E., Cho, E. J., Liu, J. O. & Youn, H. D. 2003. Menin, a tumor suppressor, represses JunD-mediated transcriptional activity by association with an mSin3A-histone deacetylase complex. *Cancer Res*, **63**, 6135-6139.
- Kim, M. J., Cardiff, R. D., Desai, N. et al. 2002. Cooperativity of Nkx3.1 and Pten loss of function in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 2884-2889.
- Kim, Y. S., Burns, A. L., Goldsmith, P. K. et al. 1999. Stable overexpression of MEN1 suppresses tumorigenicity of RAS. *Oncogene*, **18**, 5936-5942.
- Kottemann, M. C. & Bale, A. E. 2009. Characterization of DNA damage-dependent cell cycle checkpoints in a menin-deficient model. *DNA Repair*, **8**, 944-952.
- Kuperwasser, C., Hurlbut, G. D., Kittrell, F. S. et al. 2000. Development of Spontaneous Mammary Tumors in BALB/c p53 Heterozygous Mice : A Model for Li-Fraumeni Syndrome. *Am J Pathol*, **157**, 2151-2159.
- Kuraguchi, M., Ohene-Baah, N. Y., Sonkin, D., Bronson, R. T. & Kucherlapati, R. 2009. Genetic mechanisms in Apc-mediated mammary tumorigenesis. *PLoS Genet*, **5**.
- La, P., Desmond, A., Hou, Z., Silva, A. C., Schnepf, R. W. & Hua, X. 2006. Tumor suppressor menin: the essential role of nuclear localization signal domains in coordinating gene expression. *Oncogene*, **25**, 3537-3546.
- La, P., Silva, A. C., Hou, Z. et al. 2004. Direct binding of DNA by tumor suppressor menin. *J Biol Chem*, **279**, 49045-49054.
- La, P., Yang, Y., Karnik, S. K. et al. 2007. Menin-mediated caspase 8 expression in suppressing multiple endocrine neoplasia type 1. *J Biol Chem*, **282**, 31332-31340.
- Lacerte, A., Lee, E. H., Reynaud, R. et al. 2004. Activin inhibits pituitary prolactin expression and cell growth through Smads, Pit-1 and menin. *Mol Endocrinol*, **18**, 1558-1569.
- Landesman-Bollag, E., Romieu-Mourez, R., Song, D. H., Sonenshein, G. E., Cardiff, R. D. & Seldin, D. C. 2001. Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. *Oncogene*, **20**, 3247-3257.
- Lane, T. F. & Leder, P. 1997. Wnt-10b directs hypermorphic development and transformation in mammary glands of male and female mice. *Oncogene*, **15**, 2133-2144.
- Latres, E., Malumbres, M., Sotillo, R. et al. 2000. Limited overlapping roles of P15INK4b and P18INK4c cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J*, **19**, 3496-3506.
- Lee, F. S., Lane, T. F., Kuo, A., Shackleford, G. M. & Leder, P. 1995. Insertional mutagenesis identifies a member of the Wnt gene family as a candidate oncogene in the mammary epithelium of int-2/Fgf-3 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2268-2272.
- Lemos, M. C., Harding, B., Shalet, S. M. & Thakker, R. V. 2007. A novel MEN1 intronic mutation associated with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **66**, 709-713.
- Li, G., Robinson, G. W., Lesche, R. et al. 2002. Conditional loss of PTEN leads to precocious development and neoplasia in the mammary gland. *Development*, **129**, 4159-4170.
- Li, W., Qiao, W., Chen, L. et al. 2003. Squamous cell carcinoma and mammary abscess formation through squamous metaplasia in Smad4/Dpc4 conditional knockout mice. *Development*, **130**, 6143-6153.

- Libutti, S. K., Crabtree, J. S., Lorang, D. et al. 2003. Parathyroid gland-specific deletion of the mouse *Men1* gene results in parathyroid neoplasia and hypercalcemic hyperparathyroidism. *Cancer Res*, **63**, 8022-8028.
- Lin, S.-C. J., Lee, K.-F., Nikitin, A. Y. et al. 2004. Somatic Mutation of p53 Leads to Estrogen Receptor α -Positive and -Negative Mouse Mammary Tumors with High Frequency of Metastasis. *Cancer Res*, **64**, 3525-3532.
- Lin, S. Y. & Elledge, S. J. 2003. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell*, **113**, 881-889.
- Litvinov, I. V., De Marzo, A. M. & Isaacs, J. T. 2003. Is the Achilles' Heel for Prostate Cancer Therapy a Gain of Function in Androgen Receptor Signaling? *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 2972-2982.
- Liu, X., Holstege, H., Van Der Gulden, H. et al. 2007. Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 12111-12116.
- Liu, Y., Mo, J. Q., Hu, Q. et al. 2008. Targeted Overexpression of Vav3 Oncogene in Prostatic Epithelium Induces Nonbacterial Prostatitis and Prostate Cancer. *Cancer Res*, **68**, 6396-6406.
- Loffler, K. A., Biondi, C. A., Gartside, M. et al. 2007. Broad tumor spectrum in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 1. *Int J Cancer*, **120**, 259-267.
- Lubensky, I. A., Debelenko, L. V., Zhuang, Z. et al. 1996. Allelic deletions on chromosome 11q13 in multiple tumors from individual MEN1 patients. *Cancer Res*, **56**, 5272-5278.
- Ludwig, T., Fisher, P., Ganesan, S. & Efstratiadis, A. 2001a. Tumorigenesis in mice carrying a truncating *Brcal* mutation. *Genes & Development*, **15**, 1188-1193.
- Ludwig, T., Fisher, P., Murty, V. & Efstratiadis, A. 2001b. Development of mammary adenocarcinomas by tissue-specific knockout of *Brca2* in mice. *Oncogene*, **20**, 3937-3948.
- Macri, E. & Loda, M. 1998. Role of p27 in prostate carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, **17**, 337-344.
- Maillard, I., Chen, Y.-X., Friedman, A. et al. 2009. Menin regulates the function of hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors. *Blood*, **113**, 1661-1669.
- Majumder, P. K., Grisanzio, C., O'connell, F. et al. 2008. A Prostatic Intraepithelial Neoplasia-Dependent p27Kip1 Checkpoint Induces Senescence and Inhibits Cell Proliferation and Cancer Progression. *Cancer Cell*, **14**, 146-155.
- Majumder, P. K., Yeh, J. J., George, D. J. et al. 2003. Prostate intraepithelial neoplasia induced by prostate restricted Akt activation: The MPAKT model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 7841-7846.
- Malek, D., Gust, R. & Kleuser, B. 2006. 17- β -estradiol inhibits transforming-growth-factor- β -induced MCF-7 cell migration by Smad3-repression. *European Journal of Pharmacology*, **534**, 39-47.
- Marek, L. R., Kottmann, M. C., Glazer, P. M. & Bale, A. E. 2008. MEN1 and FANCD2 mediate distinct mechanisms of DNA crosslink repair. *DNA Repair (Amst)*, **7**, 476-486.
- Marini, F., Falchetti, A., Del Monte, F. et al. 2006. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Orphanet J Rare Dis*, **1**, 38.
- Massagué, J. 2008. TGF β in Cancer. **134**, 215-230.
- Massagué, J., Seoane, J. & Wotton, D. 2005. Smad transcription factors. *Genes & Development*, **19**, 2783-2810.
- Matzuk, M. M., Finegold, M. J., Mishina, Y., Bradley, A. & Behringer, R. R. 1995. Synergistic effects of inhibins and mullerian-inhibiting substance on testicular tumorigenesis. *Mol Endocrinol*, **9**, 1337-1345.

- Mccarthy, A., Lord, C. J., Savage, K. et al. 2009. Conditional deletion of the *Lkb1* gene in the mouse mammary gland induces tumour formation. *The Journal of Pathology*, **9999**, n/a.
- Mccarthy, A., Savage, K., Gabriel, A., Naceur, C., Reis-Filho, J. S. & Ashworth, A. 2007. A mouse model of basal-like breast carcinoma with metaplastic elements. *The Journal of Pathology*, **211**, 389-398.
- Mehenni, H., Lin-Marq, N., Buchet-Poyau, K. et al. 2005. LKB1 interacts with and phosphorylates PTEN: a functional link between two proteins involved in cancer predisposing syndromes. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 2209-2219.
- Mensah-Osman, E., Zavros, Y. & Merchant, J. L. 2008. Somatostatin stimulates menin gene expression by inhibiting protein kinase A. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **295**, G843-854.
- Michaelson, J. S. & Leder, P. 2001. beta-catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland. *Oncogene*, **20**, 5093-5099.
- Milne, T. A., Hughes, C. M., Lloyd, R. et al. 2005. Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 749-754.
- Mishina, Y., Rey, R., Finegold, M. J. et al. 1996. Genetic analysis of the Mullerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes & Development*, **10**, 2577-2587.
- Miyoshi, K., Rosner, A., Nozawa, M. et al. 2002a. Activation of different Wnt/beta-catenin signaling components in mammary epithelium induces transdifferentiation and the formation of pilar tumors. *Oncogene*, **21**, 5548-5556.
- Miyoshi, K., Shillingford, J. M., Le Provost, F. et al. 2002b. Activation of β^2 -catenin signaling in differentiated mammary secretory cells induces transdifferentiation into epidermis and squamous metaplasias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 219-224.
- Naito, J., Kaji, H., Sowa, H., Hendy, G. N., Sugimoto, T. & Chihara, K. 2005. Menin suppresses osteoblast differentiation by antagonizing the AP-1 factor, JunD. *J Biol Chem*, **280**, 4785-4791.
- Naito, J., Kaji, H., Sowa, H. et al. 2006. Expression and functional analysis of menin in a multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) patient with somatic loss of heterozygosity in chromosome 11q13 and unidentified germline mutation of the MEN1 gene. *Endocrine*, **29**, 485-490.
- Namihira, H., Sato, M., Murao, K. et al. 2002. The multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin, inhibits the human prolactin promoter activity. *J Mol Endocrinol*, **29**, 297-304.
- Narod, S. A. & Foulkes, W. D. 2004. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer*, **4**, 665-676.
- Nilsson, I.-L., Zedenius, J., Yin, L. & Ekbom, A. 2007. The association between primary hyperparathyroidism and malignancy: nationwide cohort analysis on cancer incidence after parathyroidectomy. *Endocr Relat Cancer*, **14**, 135-140.
- Ohkura, N., Kishi, M., Tsukada, T. & Yamaguchi, K. 2001. Menin, a gene product responsible for multiple endocrine neoplasia type 1, interacts with the putative tumor metastasis suppressor nm23. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 1206-1210.
- Olopade, O. I., Grushko, T. A., Nanda, R. & Huo, D. 2008. Advances in Breast Cancer: Pathways to Personalized Medicine. *Clin Cancer Res*, **14**, 7988-7999.
- Pal, S. K., Blazer, K., Weitzel, J. & Somlo, G. 2008. An association between invasive breast cancer and familial idiopathic hyperparathyroidism: a case series and review of the literature. *Breast Cancer Res Treat*.

- Pearson, H. B., Mccarthy, A., Collins, C. M., Ashworth, A. & Clarke, A. R. 2008. Lkb1 deficiency causes prostate neoplasia in the mouse. *Cancer Res*, **68**, 2223-2232.
- Pei, X.-H., Bai, F., Smith, M. D. et al. 2009. CDK Inhibitor p18INK4c Is a Downstream Target of GATA3 and Restrains Mammary Luminal Progenitor Cell Proliferation and Tumorigenesis. *Cancer Cell*, **15**, 389-401.
- Pei, X. H., Bai, F., Smith, M. D. & Xiong, Y. 2007. p18Ink4c collaborates with Men1 to constrain lung stem cell expansion and suppress non-small-cell lung cancers. *Cancer Res*, **67**, 3162-3170.
- Piecha, G., Chudek, J. & Wiecek, A. 2008. Multiple Endocrine Neoplasia type 1. *Eur J Intern Med*, **19**, 99-103.
- Ratineau, C., Bernard, C., Poncet, G. et al. 2004. Reduction of menin expression enhances cell proliferation and is tumorigenic in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*, **279**, 24477-24484.
- Ratnacaram, C. K., Teletin, M., Jiang, M., Meng, X., Chambon, P. & Metzger, D. 2008. Temporally controlled ablation of PTEN in adult mouse prostate epithelium generates a model of invasive prostatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 2521-2526.
- Renner, O., Blanco-Aparicio, C., Grassow, M., Cañamero, M., Leal, J. F. M. & Carnero, A. 2008. Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase by Membrane Localization of p110A Predisposes Mammary Glands to Neoplastic Transformation. *Cancer Res*, **68**, 9643-9653.
- Richert, M. M., Schwertfeger, K. L., Ryder, J. W. & Anderson, S. M. 2000. An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **5**, 227-241.
- Rowlands, T. M., Pechenkina, I. V., Hatsell, S. J., Pestell, R. G. & Cowin, P. 2003. Dissecting the roles of β^2 -catenin and cyclin D1 during mammary development and neoplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 11400-11405.
- Sayo, Y., Murao, K., Imachi, H. et al. 2002. The multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin, inhibits insulin production in rat insulinoma cells. *Endocrinology*, **143**, 2437-2440.
- Scacheri, P. C., Crabtree, J. S., Kennedy, A. L. et al. 2004. Homozygous loss of menin is well tolerated in liver, a tissue not affected in MEN1. *Mamm Genome*, **15**, 872-877.
- Scacheri, P. C., Davis, S., Odom, D. T. et al. 2006. Genome-wide analysis of menin binding provides insights into MEN1 tumorigenesis. *PLoS Genet*, **2**, e51.
- Schnepf, R. W., Chen, Y. X., Wang, H. et al. 2006. Mutation of tumor suppressor gene Men1 acutely enhances proliferation of pancreatic islet cells. *Cancer Res*, **66**, 5707-5715.
- Schnepf, R. W., Hou, Z., Wang, H. et al. 2004a. Functional interaction between tumor suppressor menin and activator of S-phase kinase. *Cancer Res*, **64**, 6791-6796.
- Schnepf, R. W., Mao, H., Sykes, S. M. et al. 2004b. Menin induces apoptosis in murine embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, **279**, 10685-10691.
- Serra, R. & Crowley, M. R. 2005. Mouse models of transforming growth factor b impact in breast development and cancer. *Endocrine Related Cancer*, **12**, 749-760.
- Shappell, S. B., Thomas, G. V., Roberts, R. L. et al. 2004. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res*, **64**, 2270-2305.
- Sherr, C. J. & Roberts, J. M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, **13**, 1501-1512.

- Sowa, H., Kaji, H., Canaff, L. et al. 2003. Inactivation of menin, the product of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene, inhibits the commitment of multipotential mesenchymal stem cells into the osteoblast lineage. *J Biol Chem*, **278**, 21058-21069.
- Sowa, H., Kaji, H., Hendy, G. N. et al. 2004a. Menin Is Required for Bone Morphogenetic Protein 2- and Transforming Growth Factor {beta}-regulated Osteoblastic Differentiation through Interaction with Smads and Runx2. *J. Biol. Chem.*, **279**, 40267-40275.
- Sowa, H., Kaji, H., Kitazawa, R. et al. 2004b. Menin inactivation leads to loss of transforming growth factor beta inhibition of parathyroid cell proliferation and parathyroid hormone secretion. *Cancer Res*, **64**, 2222-2228.
- Stalberg, P., Grimfjard, P., Santesson, M. et al. 2004. Transfection of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene to a human endocrine pancreatic tumor cell line inhibits cell growth and affects expression of JunD, delta-like protein 1/preadipocyte factor-1, proliferating cell nuclear antigen, and QM/Jif-1. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 2326-2337.
- Stambolic, V., Tsao, M.-S., Macpherson, D., Suzuki, A., Chapman, W. B. & Mak, T. W. 2000. High Incidence of Breast and Endometrial Neoplasia Resembling Human Cowden Syndrome in pten+/- Mice. *Cancer Res*, **60**, 3605-3611.
- Stewart, C., Parente, F., Piehl, F. et al. 1998. Characterization of the mouse Men1 gene and its expression during development. *Oncogene*, **17**, 2485-2493.
- Sukhodolets, K. E., Hickman, A. B., Agarwal, S. K. et al. 2003. The 32-kilodalton subunit of replication protein A interacts with menin, the product of the MEN1 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biol*, **23**, 493-509.
- Svensson, J., Kindblom, J., Shao, R. et al. 2008. Liver-derived IGF1 enhances the androgenic response in prostate. *J Endocrinol*, **199**, 489-497.
- Tan, S. H. & Nevalainen, M. T. 2008. Signal transducer and activator of transcription 5A/B in prostate and breast cancers. *Endocr Relat Cancer*, **15**, 367-390.
- Teissedre, B., Pinderhughes, A., Incassati, A., Hatsell, S. J., Hiremath, M. & Cowin, P. 2009. MMTV-Wnt1 and -DeltaN89beta-catenin induce canonical signaling in distinct progenitors and differentially activate Hedgehog signaling within mammary tumors. *PLoS ONE*, **4**.
- Thakker, R. V. 1998. Multiple endocrine neoplasia--syndromes of the twentieth century. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 2617-2620.
- Theillaumas, A., Blanc, M., Couderc, C. et al. 2008. Relation between menin expression and NF-kappaB activity in an intestinal cell line. *Mol Cell Endocrinol*, **291**, 109-115.
- Thomas, G., Jacobs, K. B., Yeager, M. et al. 2008. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet*, **40**, 310-315.
- Tomassetti, P., Cometa, G., Del Vecchio, E. et al. 1995. Chromosomal instability in multiple endocrine neoplasia type 1. Cytogenetic evaluation with DEB test. *Cancer Genet Cytogenet*, **79**, 123-126.
- Trotman, L. C., Niki, M., Dotan, Z. A. et al. 2003. Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biol*, **1**, E59.
- Tsukamoto, A. S., Grosschedl, R., Guzman, R. C., Parslow, T. & Varmus, H. E. 1988. Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell*, **55**, 619-625.
- Tsurusaki, T., Aoki, D., Kanetake, H. et al. 2003. Zone-dependent expression of estrogen receptors alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 1333-1340.
- Vageli, D., Daniil, Z., Dahabreh, J. et al. 2006. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at the MEN1 locus in lung carcinoid tumors: a novel approach using

- real-time PCR with melting curve analysis in histopathologic material. *Oncol Rep*, **15**, 557-564.
- Van Rossum, A. G., Van Bragt, M. P., Schuurung-Scholtes, E. et al. 2006. Transgenic mice with mammary gland targeted expression of human cortactin do not develop (pre-malignant) breast tumors: studies in MMTV-cortactin and MMTV-cortactin/-cyclin D1 bitransgenic mice. *BMC Cancer*, **6**.
- Verges, B., Boureille, F., Goudet, P. et al. 2002. Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 457-465.
- Vierimaa, O., Ebeling, T. M., Kytola, S. et al. 2007. Multiple endocrine neoplasia type 1 in Northern Finland; clinical features and genotype phenotype correlation. *Eur J Endocrinol*, **157**, 285-294.
- Wagner, K.-U., Ward, T., Davis, B., Wiseman, R. & Hennighausen, L. 2001. Spatial and temporal expression of the Cre gene under the control of the MMTV-LTR in different lines of transgenic mice. *Transgenic Research*, **10**, 545-553.
- Wagner, K. U., Wall, R. J., St-Onge, L. et al. 1997. Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4323-4330.
- Wang, S., Gao, J., Lei, Q. et al. 2003. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell*, **4**, 209-221.
- Wang, T. C., Cardiff, R. D., Zukerberg, L., Lees, E., Arnold, A. & Schmidt, E. V. 1994. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature*, **369**, 669-671.
- Wautot, V., Khodaei, S., Frappart, L. et al. 2000. Expression analysis of endogenous menin, the product of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene, in cell lines and human tissues. *Int J Cancer*, **85**, 877-881.
- Wautot, V., Vercherat, C., Lespinasse, J. et al. 2002. Germline mutation profile of MEN1 in multiple endocrine neoplasia type 1: search for correlation between phenotype and the functional domains of the MEN1 protein. *Hum Mutat*, **20**, 35-47.
- Weinstein, M. H., Signoretti, S. & Loda, M. 2002. Diagnostic Utility of Immunohistochemical Staining for p63, a Sensitive Marker of Prostatic Basal Cells. *Mod Pathol*, **15**, 1302-1308.
- Wu, L., Wu, Y., Gathings, B. et al. 2003. Smad4 as a Transcription Corepressor for Estrogen Receptor β . *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 15192-15200.
- Yaguchi, H., Ohkura, N., Takahashi, M., Nagamura, Y., Kitabayashi, I. & Tsukada, T. 2004. Menin missense mutants associated with multiple endocrine neoplasia type 1 are rapidly degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol*, **24**, 6569-6580.
- Yaguchi, H., Ohkura, N., Tsukada, T. & Yamaguchi, K. 2002. Menin, the multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, exhibits GTP-hydrolyzing activity in the presence of the tumor metastasis suppressor nm23. *J Biol Chem*, **277**, 38197-38204.
- Yan, J., Yang, Y., Zhang, H. et al. 2009. Menin interacts with IQGAP1 to enhance intercellular adhesion of beta-cells. *Oncogene*, **28**, 973-982.
- Yang, Y. & Hua, X. 2007. In search of tumor suppressing functions of menin. *Mol Cell Endocrinol*, **265-266**, 34-41.
- Yokoyama, A. & Cleary, M. L. 2008. Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. *Cancer Cell*, **14**, 36-46.
- Yokoyama, A., Somerville, T. C., Smith, K. S., Rozenblatt-Rosen, O., Meyerson, M. & Cleary, M. L. 2005. The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell*, **123**, 207-218.

- Yokoyama, A., Wang, Z., Wysocka, J. et al. 2004. Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol*, **24**, 5639-5649.
- Zhong, C., Saribekyan, G., Liao, C.-P., Cohen, M. B. & Roy-Burman, P. 2006. Cooperation between FGF8b Overexpression and PTEN Deficiency in Prostate Tumorigenesis. *Cancer Res*, **66**, 2188-2194.
- Zhuang, Z., Merino, M. J., Chuaqui, R., Liotta, L. A. & Emmert-Buck, M. R. 1995. Identical Allelic Loss on Chromosome 11q13 in Microdissected in Situ and Invasive Human Breast Cancer. *Cancer Res*, **55**, 467-471.

ANNEXES

ANNEXES

ARTICLE 3: Alpha-cell-specific *Men1* ablation triggers the transdifferentiation of glucagon-expressing cells and subsequent insulinoma development

Jieli Lu, Pedro L Herrera, Christine Carreira, Christelle Seigne, Alain Calender, Philippe Bertolino and

Chang xian Zhang

Publication en révision majeure à *Gastroenterology*

RÉSUMÉ en français : Les mutations du gène *MEN1* prédisposent au syndrome des Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1 (NEM1), caractérisé par des tumeurs endocrines multiples. Les souris hétérozygotes pour *Men1* développent des tumeurs similaires, ainsi que des cancers de la prostate et des glandes mammaires, avec une incidence faible. J'ai pu montrer que l'expression de la protéine menin, codée par ce gène, est totalement inactivée dans les carcinomes prostatiques développés chez ces souris et est associée à une dérégulation de l'expression du récepteur aux androgènes et une inactivation de l'inhibiteur des CDK p27, un gène cible connu de menin. Des souris *WapCre-Men1^{F/F}*, où le gène *Men1* est invalidé dans les cellules mammaires, développent des néoplasies intra-épithéliales mammaires (MIN) avec une forte incidence à partir de 9 mois. Une fuite d'expression du transgène *WapCre* dans l'hypophyse entraîne en plus le développement de prolactinomes chez ces souris, les conduisant à une mort prématurée. Par diverses analyses, j'ai pu déterminer que l'augmentation de l'incidence de ces lésions ne pouvait pas être seulement expliquée par l'influence des prolactinomes. De manière intéressante, j'ai pu mettre en évidence une nette diminution du marquage membranaire de beta-caténine, un partenaire connu de menin, ainsi que de E-cadhérine dans les lésions MIN, suggérant une altération de la cohésion cellulaire en absence de menin. L'ensemble des données obtenues pendant ma thèse indiquent un rôle potentiel de l'invalidation du gène *Men1* dans le développement de carcinomes prostatiques et de néoplasies mammaires chez la souris.

TITRE en anglais: Study of the biological and oncosuppressive role of the gene predisposing to multiple endocrine neoplasia type 1 in hormone-dependent tissues in mice.

RÉSUMÉ en anglais: Mutations of the *MEN1* gene predispose to multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) syndrome, characterized by the occurrence of multiple endocrine tumours. Heterozygous *Men1* mutant mice not only recapitulate MEN1 pathology, but also display prostatic and mammary carcinomas with a low incidence. I showed that the expression of menin, coded by the *Men1* gene, was completely inactivated in the prostatic carcinomas developed in these mice. Deregulated expression of androgen receptor and the inactivation of p27 CDK inhibitor, a menin target gene, were also found in these lesions. In addition, my data demonstrated that mammary-specific disruption of the *Men1* gene in mice led to high incidence of mammary intraepithelial neoplasia (MIN) from 9 months of age in the mutant mice. An unexpected leakage activity of the *WapCre* transgene in pituitary resulted in the development of prolactinomas and premature death in the mutant mice. Several analyses provided evidence showing that the increased incidence of MIN lesions could not be simply explained by the influence of prolactinomas. Interestingly, we observed a strong reduction of beta-catenin, a known menin partner, and E-cadherin membrane expression in these lesions, suggesting an alteration of cellular adhesion in the absence of menin. On the whole, these data indicate a potential implication of *Men1* disruption in the development of prostate carcinomas and mammary intraepithelial neoplasia in mice.

DISCIPLINE: Biologie Moléculaire et Cellulaire

MOTS-CLÉS: MEN1, prostate, glandes mammaires, modèles murins, cancer, prolactinomes, gène suppresseur de tumeurs, néoplasie

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE: Laboratoire Génétique Moléculaire, Signalisation et Cancer – CNRS UMR 5201, Centre Léon Bérard, Cheney D, 28 rue Laënnec 69008 Lyon, FRANCE