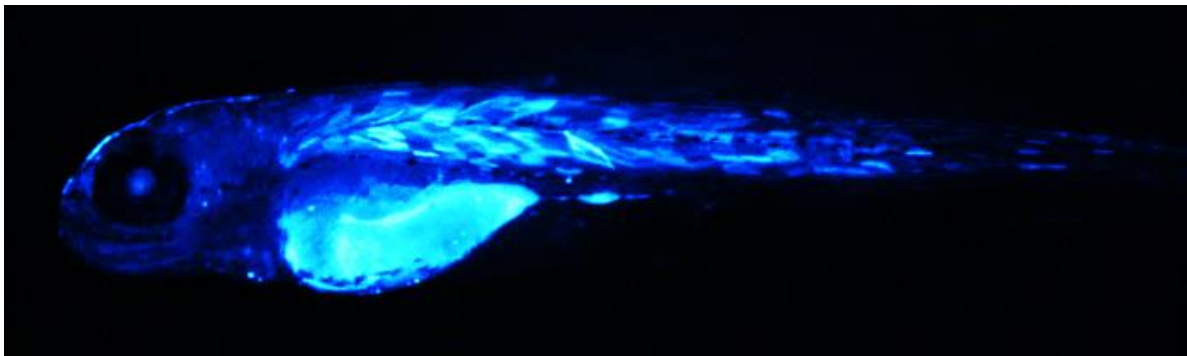


Grappe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée (GIGA)
Département des Sciences de la Vie

Laboratory of zebrafish Development and Disease Models (ZDDM)

**Identification et caractérisation des progéniteurs pancréatiques
et des précurseurs endocrines durant l'embryogenèse chez le
poisson-zèbre**



Ghaye Aurélie

Promoteur : Dr Marianne Voz

Thèse présentée en vue de l'obtention du
grade de Docteur en Sciences

Septembre 2015



Remerciements ...

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur Joseph A. Martial de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour les remarques constructives qu'ils ont fait sur mon projet de thèse. J'adresse mes remerciements aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie tout particulièrement Marianne pour sa présence, pour ses conseils avisés tout au long de ce travail et pour son enthousiasme. Outre son savoir et son expérience, elle m'a poussée à arriver à mon but et pas uniquement au laboratoire. Lors d'une randonnée en Écosse, alors que j'étais à bout de souffle, elle m'a encouragée et porté mon sac jusqu'au sommet.... Dans mes recherches, elle m'aura aidée à porter ce sac pendant cinq ans. Je garde aussi d'excellents souvenirs des moments que nous avons partagés en dehors du laboratoire, lors de nos sorties et de nos voyages, où la découverte ne se limitait pas au Zebrafish. Marianne et Bernard forment un couple qui se complète dans la vie comme au labo et je leur suis reconnaissante de m'avoir prise sous leur aile, de m'avoir aidée et soutenue. Je dois reconnaître que sans l'infatigable persévérance et optimisme de Marianne, je n'en serais pas là aujourd'hui.

Je remercie aussi Isabelle pour sa précieuse aide et ses conseils toujours très pertinents. Elle constitue un inépuisable puit de sciences dans le domaine régénération pancréatique et les canaux... et son éternel optimisme me manquera.

A l'exception de ses goûts musicaux, j'ai beaucoup apprécié travailler avec David B. Je le remercie pour son aide précieuse. Je lui souhaite une bonne continuation dans ses travaux. Ma lignée transgénique a encore un bel avenir grâce à lui.

Virginie, ma voisine de paillasse, fut et restera pour moi une personne extraordinaire. Je ne sais comment la remercier pour tout ce qu'elle m'a apporté au cours de ces cinq années au laboratoire. Je lui suis infiniment reconnaissante d'avoir été là dans les bons comme dans les moins bons moments, tant au niveau professionnel que personnel. Ces cinq années en sa compagnie m'auront apportée non seulement une collègue compétente, disponible et enthousiaste, mais surtout une amie. Merci de m'avoir soutenue et remontée le moral maintes et maintes fois.

Merci à Justine pour tous les excellents moments que nous avons partagés, pour son enthousiasme et son optimisme. Je lui souhaite de réussir une merveilleuse carrière aux États-Unis et je lui souhaite également beaucoup de bonheur dans sa vie matrimoniale.

Un grand merci aussi à David S pour ses nombreux conseils informatiques. Les longues journées d'isolement entre les murs sombres et lugubres de la salle d'injection étaient biens plus surmontables en sa compagnie. Toutes nos discussions resteront de très beaux souvenirs. Je lui souhaite de trouver la motivation nécessaire pour terminer sa thèse car il le mérite.

Merci également à Sarah, Benoît, Nathalie, Thomas, Audrey, Joachim, Lydie, Yobhana, Julia, Arnaud, Marc, Marie, Tefa... et tous ceux que je n'aurais pas cités mais que je n'oublie pour autant, pour leur aide et surtout leur bonne humeur.

Mes remerciements vont aussi à ma famille et à mes amis qui, avec cette question récurrente, bien qu'angoissante en période fréquente de doutes (quand est-ce que tu défends ta thèse ?) m'ont permis de ne

jamais dévier de mon objectif final. Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents qui ont toujours cru en moi et qui m'ont soutenue. Merci de m'avoir supporté dans les moments difficiles où le doute me poussait à l'abandon. Je vous dois beaucoup.

Mes derniers remerciements vont à Sébastien qui a tout fait pour m'aider, qui m'a soutenue et surtout supportée dans tout ce que j'ai entrepris. Son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme dans la vie en général m'a encouragée.

Encore un grand merci à tous pour m'avoir conduit à ce jour mémorable.

Je dédie cette thèse à mon grand-père.

Table des matières

Liste des abréviations.....	5
Introduction.....	9
1. Le pancréas.....	11
1.1. Anatomie du pancréas.....	11
1.2.1. Pancréas Exocrine :.....	11
1.2.2. Pancréas Endocrine.....	13
1.2.2.1. Fonction du pancréas endocrine.....	14
2. Le diabète.....	15
2.1. Traitements :.....	17
2.2. Thérapies envisagées :.....	19
3. Zebrafish ou poisson zèbre (Danio rerio).....	23
3.1. Généralités et avantages du zebrafish :.....	23
3.2. Anatomie du pancréas chez le poisson-zèbre :.....	24
3.3. Formation du pancréas chez le poisson zèbre	25
3.3.1. Mise en place de l'endoderme	26
3.3.2. Comparaison de la formation des bourgeons pancréatiques chez le poisson-zèbre et la souris.....	29
4. Différenciation des cellules pancréatiques chez le poisson-zèbre	33
4.1. Différenciation des cellules endocrines du bourgeon pancréatique dorsal	35
4.1.1. Voie de Signalisation Notch.....	37
4.1.1.1. Généralités :.....	37
4.1.1.2. Inhibition latérale.....	39
4.1.1.3. Rôle de la voie de signalisation Notch dans la différenciation endocrine.....	41
4.1.2. Les acteurs précoces de la différenciation endocrine :.....	45
4.1.2.1. La famille des gènes ARP/ASCL :.....	45
4.1.2.1.1. Généralités.....	45
4.1.2.1.2. Neurogénine 3 : facteur clé dans la différenciation endocrine chez la souris.....	47

4.1.2.1.3.	Ascl1b et Neurod1 : deux facteurs clés de la différenciation des cellules endocrines chez le poisson-zèbre	49
4.1.2.2.	Sox4b	53
4.1.2.3.	Les facteurs de la famille des NKX6.....	54
4.1.2.3.1.	Généralités :.....	55
4.1.2.3.2.	Profil d'expression de Nkx6.1 et Nkx6.2 dans le bourgeon pancréatique dorsal	59
4.1.2.3.3.	Fonction de nkx6.1 et nkx6.2 dans la différenciation endocrine.....	61
4.1.2.4.	Pdx1 :.....	63
4.2.	Différenciation des cellules exocrines et endocrine du bourgeon pancréatique ventral	65
4.2.1.	Différenciation des cellules acinaires et canaux du bourgeon pancréatique ventral	67
4.2.1.1.	Nkx6.1 et Ptf1a :.....	67
4.2.1.2.	Sox9b :.....	70
4.2.2.	Différenciation des cellules endocrines du bourgeon pancréatique ventral :	71
4.2.2.1.	Voie de signalisation Notch :	71
4.2.2.2.	Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules endocrines du bourgeon ventral.....	74
5.	Le but de la thèse	77
 Résultats.....		79
1.	Destin des cellules pancréatiques <i>nkx6.1+</i>	81
1.1.	Lignée transgénique Tg(<i>nkx6.1:eGFP</i>)	82
1.1.1.	Construction du transgène <i>nkx6.1:eGFP</i>	83
1.1.1.1.	1 ^{er} stratégie :.....	83
1.1.1.2.	2 ^{ième} stratégie :.....	85
1.1.2.	Injection du transgène <i>nkx6.1:eGFP</i>	88
1.1.3.	Nouvelle construction Tol2-BAC(<i>nkx6.1:eGFP</i>)	89
1.1.4.	Injection de la nouvelle construction <i>nkx6.1:eGFP</i> dans des embryons de poissons zèbre et analyse de leurs descendances.....	91
1.2.	Lignée transgénique Tg(<i>nkx6.1:creER^{T2}</i>).....	95
1.2.1.	Construction du transgène <i>nkx6.1:creER^{T2}</i>	95
1.2.2.	Injection du transgène <i>nkx6.1:creER^{T2}</i>	96
1.3.	Expérience de destin des cellules pancréatiques <i>nk6.1+</i>	97
1.4.	Capacité proliférative des cellules pancréatiques <i>nk6.1+</i>	102

2. Destin des cellules pancréatiques <i>ascl1b+</i>	105
2.1. Lignée transgénique Tg(<i>ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2}</i>)	105
2.2.1. Construction du transgène <i>ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2}</i>	105
2.2.2. Injection de la construction BAC(<i>ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2}</i>) dans des embryons de poissons zèbre et analyse de leurs descendance	107
2.3. Expérience de destin cellulaire des cellules pancréatiques <i>ascl1b+</i>	109
3. Comparaison du profil d'expression de <i>Nkx6.1</i> avec celui d'<i>Ascl1b</i>	114
4. Effet de la voie de signalisation Notch sur l'expression d'<i>ascl1b</i> et de <i>nkx6.1</i>	120
4.1. Inactivation de la voie de signalisation Notch : Perte de fonction	120
4.2. Activation de la voie de signalisation Notch : Gain de fonction	122
5. Comparaison des cellules <i>nkx6.1+</i> avec les NRCs (Notch responsive cells)	124
 Conclusions, Discussions et Perspectives	127
1. Conclusions et discussions.....	129
2. Perspectives.....	137
 Annexes	141
 Bibliographie	161

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
Aa	Acide aminé
AR	Acide Rétinoïque
ARP	Atonal Related Protein
ASCL	Achaete-Scute Complex Like
ATO	Atonal
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
Cellule β	Cellule (bêta) produisant l'insuline
Cellule α	Cellule produisant le glucagon
Cellule δ	Cellule produisant la somatostatine
Cellule PP	Cellule produisant le polypeptide pancréatique
Cellule ϵ	Cellule produisant la ghréline
D	Dorsal
DAPT	N-[N-(3,5-difluorophénacétyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester
DIG	Digoxigénine
DSL	Delta Lag Serrate
DMSO	DiMéthylSulfOxide
DNP	2, 4-dinitrophénol
dNTP	désoxyriboNucléotides TriPhosphate
Dpf	« day(s) post fertilization » : jour(s) après fécondation
E	jour Embryonnaire
EA	Endoderme Antérieur
EDU	5'-Ethylnyl-2'-deoxyuridine
Eh1	Engrailed homology 1

EHD	Extrahepatic Duct (canal extrahépatique)
EP	Endoderme Postérieur
EPD	Extra-pancreatic Duct (canal extra-pancréatique)
FGF	Fibroblast Growth Factor
G	Gramme
GDP	Guanosine DiPhosphate
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosine TriPhosphate
HD	Domaine d'hétérodimérisation
Hb9	Homeobox9
HES	Hairy and Enhancer of Split
HPD	Hepato-Pancreatic Ducts (Canaux hépato-pancréatiques)
Hpf	« hour(s) post fertilization » : heure(s) après fécondation
HS	« Heat-shock »
HTH	Hélice-tour-hélice
IHC	ImmunoHistoChimie
IHD	Intrahepatic Duct (canal intrahépatique)
IPD	Intra-pancreatic Duct (canal intra-pancréatique)
Isl1	Islet1
Kb	Kilo(s) bases
LB	milieu de culture Luria-Bertani
M	molaire (mole/litre)
Mib	Mind Bomb
n	Nombre de spécimens analysés
Ngn3	Neurogenin 3
NICD	Notch IntraCellular Domain
Nkx6.1	Nk6 homeobox 1
Nkx6.2	Nk6 homeobox 2
NRCs	Notch Responsive Cells
PFA	Paraformaldéhyde
PTU	1-Phényl-2-ThioUrée
PCR	Polymerase Chain Reaction
S	Somites

Tg	Transgénique
V	Ventral
VB	Vésicule biliaire
WISH	Whole-mount in situ hybridization
WT	Wild Type

The page features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each with a lighter blue outer ring and a darker blue inner circle. These circles are arranged in a diagonal line from the top right towards the bottom right. Two thin, light blue lines intersect at the top left and extend diagonally across the page, framing the circles and the text.

Introduction

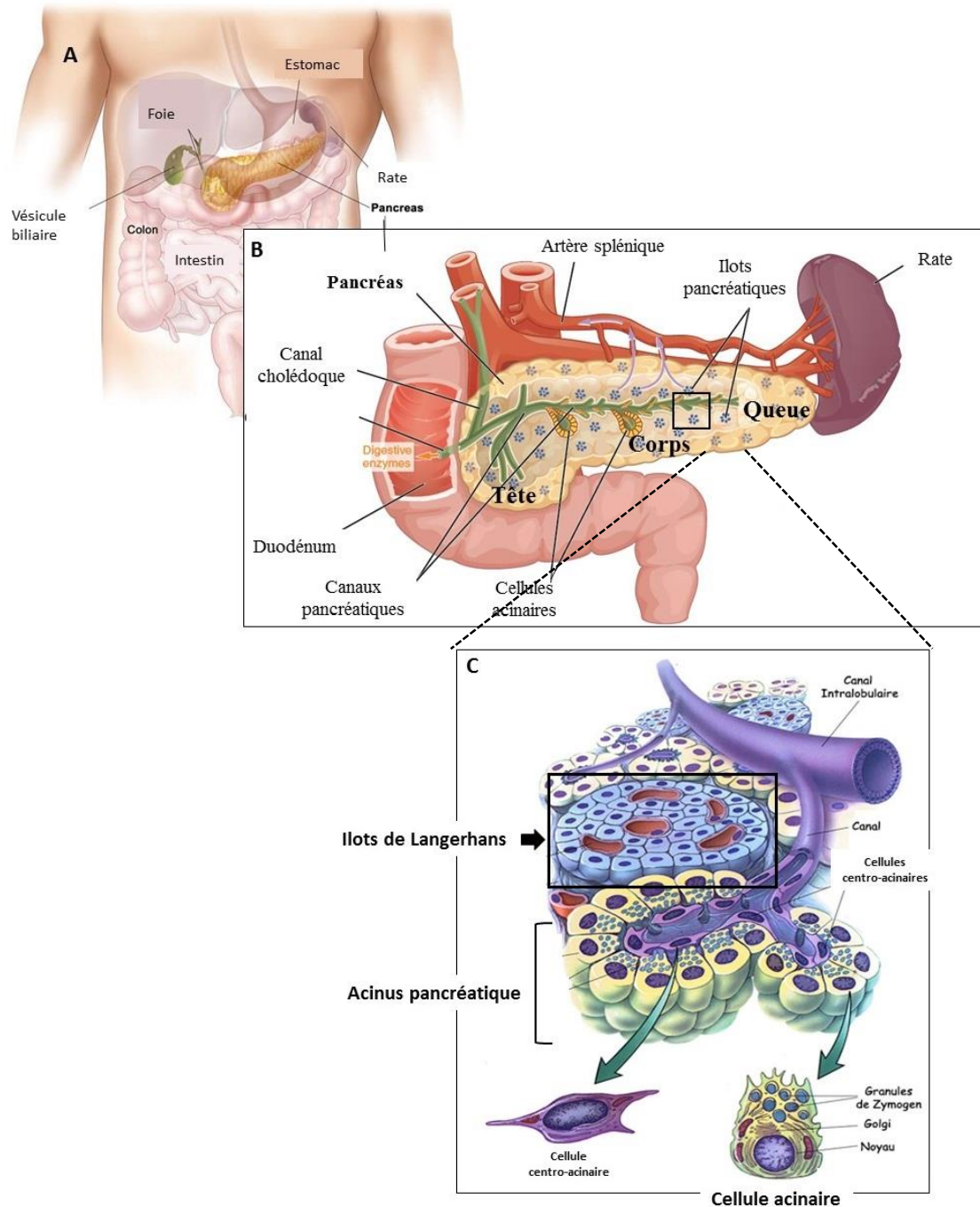


Figure 1 : Localisation et organisation du pancréas. (A) Le pancréas (en jaune) est situé à l'arrière de l'estomac entre la rate et le duodénum. Figure adaptée du site : <http://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR636528-750.jpg>. (B) Vue globale du pancréas adulte. Il est divisé en trois parties : la tête, le corps et la queue. Les îlots pancréatiques appelés îlots de Langerhans sont dispersés dans le tissu exocrine. Figure adaptée du site : http://philschatz.com/anatomy-book/resources/1820_The_Pancreas.jpg (C) Illustration d'une section de pancréas représentant un îlot de Langerhans et un acinus. Les petits canaux drainant les acini transportent les sécrétions pancréatiques vers des canaux de diamètre de plus en plus grand. Les cellules centro-acinaires se trouvent à l'interface entre les canaux et les acini. Figure adaptée du site : http://hepatoweb.com/Pancreas_fonction.php

1. Le pancréas

1.1. Anatomie du pancréas

Le pancréas est un organe glandulaire associé au tube digestif. Il est localisé dans l'abdomen, derrière l'estomac. Le pancréas s'étend postérieurement du duodénum, auquel il est étroitement lié, jusqu'à la rate (**Figure 1A**). Il peut être subdivisé en trois parties: la tête, le corps et la queue (**Figure 1B**).

1.2. Histologie du pancréas

Le pancréas est composé de deux parties : le pancréas exocrine (qui sécrète les enzymes digestives) et le pancréas endocrine (qui produit les hormones pancréatiques).

1.2.1. Pancréas Exocrine :

Le compartiment exocrine constitue la plus grande partie de la glande pancréatique. Il est composé d'une part des cellules acinaires pancréatiques regroupées en acini et d'autre part de canaux pancréatiques (**Figure 1B**). Les acini, étroitement serrés les uns contre les autres (comme les raisins d'une grappe), produisent des enzymes digestives (ex : protéases, amylases, lipases et nucléases) qui sont acheminées dans le duodénum via un système canalaire très ramifié. Cependant, afin d'empêcher l'autodigestion du pancréas, certaines enzymes pancréatiques sont produites sous une forme inactive et ne seront activées que dans la lumière intestinale. Chaque acinus (**Figure 1C**) est constitué d'un amas de cellules sécrétoires de forme pyramidale (cellules acinaires). Le pôle basal de ces cellules comprend un noyau qui est entouré d'un cytoplasme riche en réticulum endoplasmique rugueux (site de production des enzymes digestives). Leur pôle apical contient des granules de zymogènes (lieu de stockage des enzymes digestives) qui seront libérées par exocytose dans la lumière de l'acinus (**Figure 1C**). A la jonction entre les acini et les canaux se trouvent les cellules terminales des canaux pancréatiques, les cellules centro-acinaires [24]. Les sécrétions des acini sont exportées dans de petits canaux appelés canaux intercalaires.

Ces derniers se drainent ensuite dans des canaux intralobulaires (**Figure 1C**), qui se drainent à leur tour dans des canaux interlobulaires. En plus de transporter les enzymes digestives des acini au duodénum, les cellules des canaux, sécrètent de l'eau et des électrolytes, qui contribuent avec la sécrétion enzymatique des acini, à former le suc pancréatique [25]. Ce dernier est finalement collecté par le canal principal ou canal de Wirsung qui se jette dans le duodénum.

1.2.2. Pancréas Endocrine

Le compartiment endocrine ne représente que 1 à 2% de la masse pancréatique. Il est constitué d'amas de cellules, les îlots de Langerhans, disséminés dans le tissu exocrine (**Figure 1B**). Ces derniers, richement vascularisés, constituent l'unité fonctionnelle du tissu endocrine. On y retrouve 5 types cellulaires distincts dont la proportion au sein de l'îlot varie selon les espèces [11, 26] (**Figure 2A**). Ces 5 types cellulaires sont chacun responsables de la sécrétion d'une hormone pancréatique particulière : les cellules β qui sont les plus nombreuses, produisent l'insuline, les cellules α produisent le glucagon, les cellules δ et les cellules PP synthétisent respectivement la somatostatine et le polypeptide pancréatique. Les cellules ϵ , produisant la ghréline, constituent le cinquième type.

Selon les espèces, l'organisation des cellules endocrines au sein de l'îlot diffère [11, 26, 27]. Ainsi chez les rongeurs, les cellules β sont plutôt regroupées au centre de l'îlot et sont entourées par les autres types cellulaires α , δ et PP (**Figure 2C**). En comparaison, chez l'Homme, l'architecture de l'îlot correspond plus à un enchevêtrement des différents types cellulaires (**Figure 2B**).

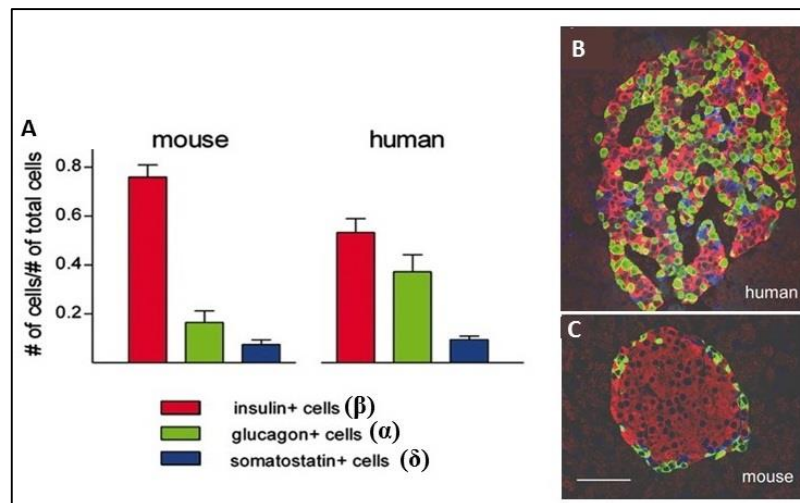


Figure 2 : Comparaison de la proportion et de l'organisation des cellules endocrines au sein d'un îlot chez l'humain et chez la souris. (A) La proportion des cellules exprimant l'insuline, le glucagon ou la somatostatine au sein de l'îlot est différente entre la souris et l'homme. L'îlot pancréatique d'une souris contient plus de cellules produisant l'insuline que l'homme. Par contre, un îlot pancréatique humain comprend plus de cellules sécrétant le glucagon que chez la souris. (B-C) L'organisation des cellules endocrines au sein d'un îlot varie aussi entre la souris (C) et l'humain (B). D'après [11].

1.2.2.1. Fonction du pancréas endocrine

Le principal rôle du pancréas endocrine est la régulation de la glycémie à travers la production des hormones insuline et glucagon (**Figure 3**). L'insuline, produite par les cellules β , est une hormone hypoglycémiante. Son rôle est d'abaisser le taux de sucre dans le sang en favorisant l'entrée du glucose dans les cellules musculaires, adipeuses et hépatiques. Dans les cellules hépatiques et musculaires, le glucose est stocké sous forme de glycogène. Dans les cellules adipeuses, il est stocké sous forme de triglycérides. L'insuline inhibe aussi la dégradation du glycogène en glucose et la synthèse du glucose à partir des lipides ou des protéines. A l'inverse, le glucagon est une hormone hyperglycémiante sécrétée par les cellules α . Son rôle est de maintenir un niveau suffisant de glucose dans le sang. La sécrétion de glucagon stimule donc la production du glucose.

La somatostatine, synthétisée par les cellules δ , inhibe les sécrétions de glucagon et d'insuline [28, 29]. Le polypeptide pancréatique, produite par les cellules PP, inhibe les sécrétions exocrines du pancréas [30]. La ghréline est notamment connue pour stimuler l'appétit [31].

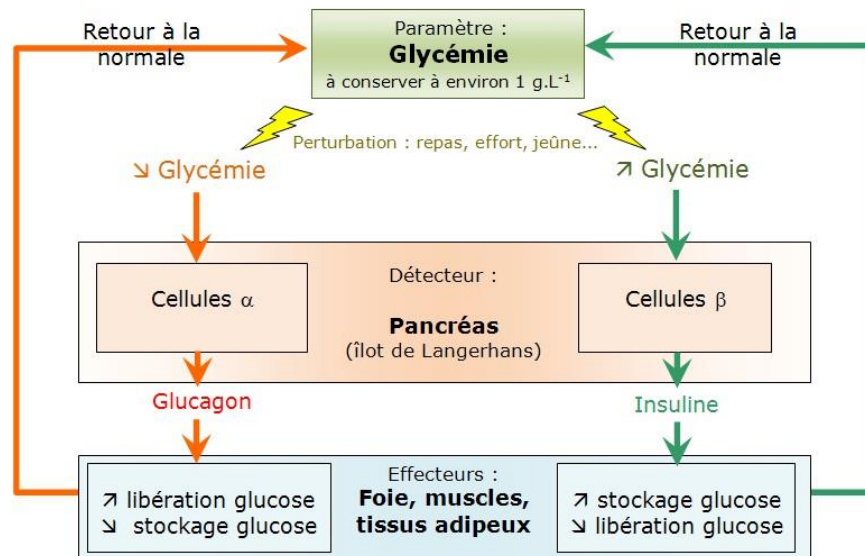


Figure 3 : Régulation de la glycémie. Dans le cas d'une hyperglycémie (excès de glucose dans le sang), les cellules β produisent de l'insuline. Celle-ci induit le stockage du glucose sous forme de glycogène dans les hépatocytes et les cellules musculaires et sous forme de triglycérides dans les adipocytes, ce qui conduit à une diminution du glucose sanguin. Dans le cas d'une hypoglycémie, c'est l'hormone glucagon qui est sécrétée par les cellules α . Elle stimule la production de glucose. D'après <http://www.svt-biologie-premiere.bacdefrancais.net/regulation-glycemie.jpg>

2. Le diabète

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par un dysfonctionnement de la régulation de la glycémie qui conduit à une élévation du taux de glucose dans le sang (hyperglycémie). De façon alarmante, cette maladie affecte 387 millions de personnes dans le monde et touche de plus en plus de personnes chaque année. En 2035, on estime à 592 millions le nombre de personnes atteintes. Jusqu'à présent, cette maladie peut être contrôlée mais ne peut pas être guérie. Une glycémie en permanence élevée peut mener à long terme à des problèmes de santé graves touchant par exemple le système cardiovasculaire, les yeux, les reins et les nerfs. En 2014, 4.9 millions de personnes sont décédées des conséquences de cette maladie. Toutes les 7 secondes, une personne meurt du diabète (www.idf.org).

Parmi les différents types de diabète, on trouve :

Le diabète de type 1 qui représente environ 10 % de tous les cas de diabète. La maladie peut toucher des personnes de tout âge mais elle apparaît le plus souvent chez les enfants ou les jeunes adultes d'où son appellation ancienne de « diabète juvénile » [32]. Il s'agit d'une maladie auto-immune dans laquelle notre système immunitaire attaque progressivement les cellules bêta du pancréas ce qui entraîne une réduction puis une disparition de la production d'insuline. Les symptômes cliniques apparaissent quand 60-80% des cellules bêta sont détruites [33]. Cependant, les causes de cette attaque auto-immune ne sont pas clairement établies. L'apparition du diabète peut être attribuée à une infection virale, à une prédisposition génétique et à des facteurs environnementaux [32]. A long terme, le diabète de type 1, s'il n'est pas contrôlé et suivi, peut mener à de graves problèmes de santé : maladies cardio-vasculaires, d'insuffisance rénale, perte de sensibilité aux doigts et aux pieds, problèmes oculaires pouvant aller jusqu'à la cécité,...

Le diabète de type 2 qui représente 90% des cas de diabètes. Il peut être diagnostiqué à tout âge. Cependant, cette maladie peut passer inaperçue pendant de nombreuses années. Au début de la maladie, la production d'insuline par les cellules bêta du pancréas est normale. Cependant, les organes périphériques n'y répondent plus correctement. Les cellules cibles, qui doivent stocker le glucose sanguin pour abaisser le taux de sucre dans le sang, deviennent insensibles à l'insuline

produite (d'où son appellation de diabète insulino-résistant). Par conséquent, le glucose ne pouvant entrer dans les cellules, les cellules bêta se mettent à produire davantage d'insuline pour forcer la prise de glucose par les cellules cibles. Au fur et à mesure de l'avancée de la maladie, les cellules bêta s'épuisent, c'est-à-dire que leur production d'insuline diminue jusqu'à disparaître, ce qui à terme peut faire évoluer la maladie vers un diabète de type 1 [34]. L'apparition du diabète peut être attribuée à une prédisposition génétique et à des facteurs environnementaux. Cependant, les facteurs environnementaux (obésité, mauvaise alimentation et manque d'exercices) semblent être la cause majeure de la maladie. A cause de notre mode de vie de plus en plus sédentaire et d'une mauvaise alimentation, le nombre de personnes atteintes par le diabète de type 2 ne cessent donc d'augmenter d'année en année.

Le diabète gestationnel (ou diabète de grossesse) se développe, comme son nom l'indique, pendant la grossesse, généralement durant le deuxième trimestre. Cependant, dans certains cas, il s'agit d'un diabète préexistant jusqu'alors non diagnostiqué. Chez la majorité des femmes, il disparaît le plus souvent après l'accouchement. Cependant, les femmes ayant des antécédents de diabète gestationnel sont exposées à un risque accru de développer un diabète de type 2 dans les années qui suivent [35-37].

2.1. Traitements :

Actuellement, aucun traitement ne permet de guérir définitivement le diabète de type 1. C'est une maladie chronique qui évolue avec le temps et un traitement à vie est nécessaire. Les personnes atteintes par ce type de diabète ont besoin d'injections régulières d'insuline afin de maintenir leur glycémie sous contrôle. Dans le cas d'un diabète de type 2, le premier traitement recommandé, c'est une perte de poids (si cela est nécessaire) et une modification de son mode de vie. Ainsi, les personnes atteintes de ce type de diabète parviennent en général à contrôler leur maladie en adoptant une meilleure alimentation et en pratiquant de manière régulière une activité physique. Si ces mesures ne suffisent pas, une approche médicamenteuse peut être envisagée. Et si le pancréas n'est plus à même de sécréter une quantité suffisante d'insuline, et ce malgré les médicaments antidiabétiques, ces personnes auront alors recours à une insulinothérapie pour contrôler leur glycémie. Que ce soit dans le cas d'un diabète de type 1 ou d'un diabète de type 2, les traitements sont contraignants et coûteux. La sécrétion d'insuline en réponse au glucose est un processus physiologique complexe qui ne peut être parfaitement mimé par de l'insuline exogène. Les contraintes qu'il impose et les périodes d'hypo- et d'hyperglycémie subsistantes peuvent entraîner des complications secondaires.

A l'heure actuelle, l'approche thérapeutique qui permet le rétablissement d'un métabolisme insulinique physiologique, c'est la transplantation de cellules bêta productrices d'insuline. Cette dernière est réalisée par transplantation d'un pancréas entier ou d'îlots de Langerhans. La transplantation de pancréas entier est efficace mais très lourde pour le patient. Les candidats à cette intervention sont souvent des patients qui ont un diabète sévère et chez qui les risques de complications de la maladie sont plus importants que les risques liés à la transplantation (risques opératoires et post-opératoires) et ceux encourus par la prise d'un traitement immunosuppresseur à long terme [38]. Souvent lorsque que d'importantes complications rénales surviennent, le patient peut bénéficier d'une double transplantation pancréas-rein [38]. La transplantation d'îlots de Langerhans humains est aujourd'hui considérée comme une alternative prometteuse à la greffe du pancréas entier surtout après la publication d'un nouveau protocole, appelé protocole d'Edmonton [39-41]. Les clés de la réussite de ce protocole sont l'utilisation d'immunosuppresseurs appropriés, une meilleure sélection des receveurs et l'obtention d'îlots de meilleure qualité. De plus, la greffe d'îlots est une technique beaucoup moins lourde pour le patient et comporte elle-même peu de

risques [42]. En effet, sa réalisation ne nécessite qu'une anesthésie locale au cours de laquelle les îlots de Langerhans sont injectés par un cathéter via la veine porte dans le foie où ils s'y implantent. Ainsi, les cellules des îlots pancréatiques du donneur produisent de l'insuline, ce qui aide le receveur de la greffe à retrouver le contrôle de son niveau de glycémie et d'éliminer ou de réduire considérablement le besoin d'injections d'insuline. Malheureusement, la transplantation de pancréas ou d'îlots de Langerhans est associée à différents problèmes tels que le manque de donneurs d'organes (il faut deux ou trois pancréas pour une seule transplantation dans le cas des îlots), un traitement immunosuppresseur. De plus, ce traitement reste transitoire car il est incapable d'offrir un traitement à long terme.

2.2. Thérapies envisagées :

Une restauration de cellules β représenterait un traitement d'avenir. Les défis à l'heure actuelle sont de développer des stratégies qui permettraient de remplacer les cellules β détruites par le système immunitaire. Deux initiatives majeures tentent de corriger ce déficit, l'une consiste à générer *in vitro* des cellules β fonctionnelles (à partir de cellules souches) qui seraient ensuite transplantées chez les patients diabétiques [43, 44], l'autre à stimuler *in vivo* la régénération des cellules β . Cette dernière approche est particulièrement intéressante puisqu'elle permettrait notamment d'éviter les problèmes engendrés par les allogreffes, ainsi que les manipulations de cellules souches *in vitro*. Dans ce contexte, il est fondamental de connaître l'origine et les mécanismes de néogenèse des cellules β afin, *in fine*, de pouvoir les exploiter en thérapie humaine. Différentes observations ont permis de considérer les canaux pancréatiques comme une source prometteuse de remplacement des cellules β chez l'homme adulte. En effet, plusieurs études montrent l'apparition de cellules exprimant l'insuline dans et à proximité des canaux pancréatiques humains [45-50]. Ces données sont également appuyées par la mise en évidence directe *-in vitro* et sous conditions particulières de culture - de la capacité des cellules canalaire à se différencier en cellules endocrines [51, 52]. Ce qui amène la question suivante : les cellules β pourraient-elles être régénérées à partir des canaux pancréatiques adultes ?

Cependant étudier la régénération des cellules β reste difficile chez les mammifères. En effet, la capacité des cellules β à régénérer est très limitée [53]. De plus, en fonction notamment de la technique utilisée pour détruire les cellules β afin d'étudier les mécanismes de régénération et de la quantité de cellules β restantes (perte totale ou partielle), le processus de régénération des cellules β peut se dérouler de 3 façons différentes [16] (**Figure 4**):

- par réplication des cellules bêta restantes [54, 55]
- par transdifférenciation d'autres types cellulaires pancréatiques (α ou γ) en cellules β [56, 57]
- par différenciation de progéniteurs pancréatiques localisés dans les canaux pancréatiques [58, 59]

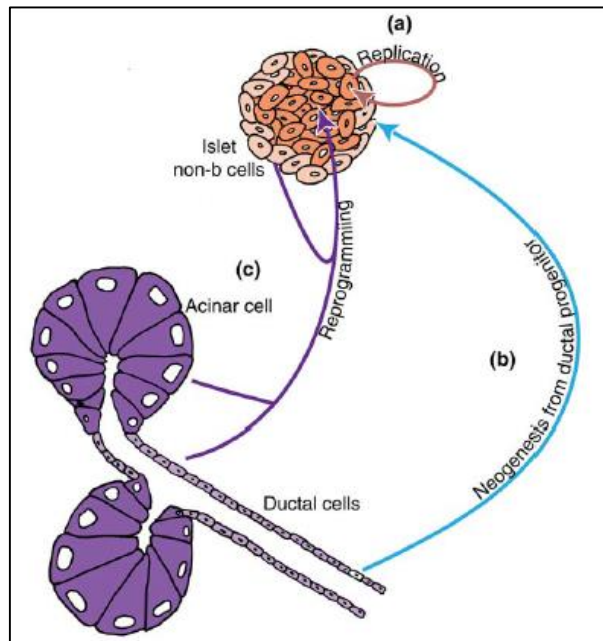


Figure 4 : La régénération des cellules β peut se dérouler de 3 façons différentes. (A) par répllication des cellules β persistantes, (B) par différenciation de progéniteurs localisés au niveau des canaux (C) par transdifférenciation d'autres types pancréatiques matures en cellules endocrines. D'après [16].

Tous ces résultats rendent difficiles l'extrapolation des données expérimentales et compliquent donc l'étude du phénomène de régénération chez les mammifères.

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un modèle intéressant pour comprendre les mécanismes de régénération puisqu'il possède le remarquable pouvoir de régénérer certains tissus [60]. C'est notamment le cas des cellules β . Cette étude est notamment facilitée chez le poisson-zèbre par l'existence d'une lignée transgénique qui permet une destruction temporelle et ciblée des cellules β [60, 61].

En utilisant ce modèle, Pisharath a montré chez la larve qu'une destruction ciblée des cellules β n'affecte pas les cellules voisines et que leur régénération est rapide [61]. Dans son étude, ils montrent également que les cellules β nouvellement formées ne proviennent pas de cellules acinaires. Il n'a toutefois pas identifié l'origine des cellules régénérées. Les travaux réalisés au laboratoire ont, cependant, montré une implication des canaux pancréatiques dans le processus de régénération [62]. De plus, les cellules β sont aussi capables de régénérer chez l'adulte [63]. En effet, deux semaines après l'ablation ciblée des cellules β , les poissons adultes récupèrent une glycémie normale et une analyse histologique montre la présence de nouvelles cellules β dans les îlots pancréatiques. De plus, une augmentation de la prolifération des cellules au niveau des canaux pancréatiques a également été observée [63].

L'origine canalaire de cellules β restaurées chez le poisson-zèbre ne pourra toutefois être confirmée que par des expériences de destin cellulaire. Ensuite, il faudra comprendre le rôle des canaux pancréatiques et les mécanismes responsables de la régénération des cellules β chez le poisson zèbre en identifiant les facteurs de transcription et voies de signalisation impliqués dans ce processus. Avec ses travaux, les chercheurs espèrent ensuite trouver le moyen de stimuler cette régénération chez les mammifères.



Figure 5 : Le poisson-zèbre (ou zebrafish) mesure 4 à 5 cm de long. Des bandes bleues acier longitudinales ornent le corps du poisson-zèbre sur toute sa longueur. La distinction mâle-femelle se fait morphologiquement : la femelle a un abdomen plus arrondi rempli d'œufs.

D'après http://news.stanford.edu/news/2007/october17/gifs/zebrafish_600.jpg

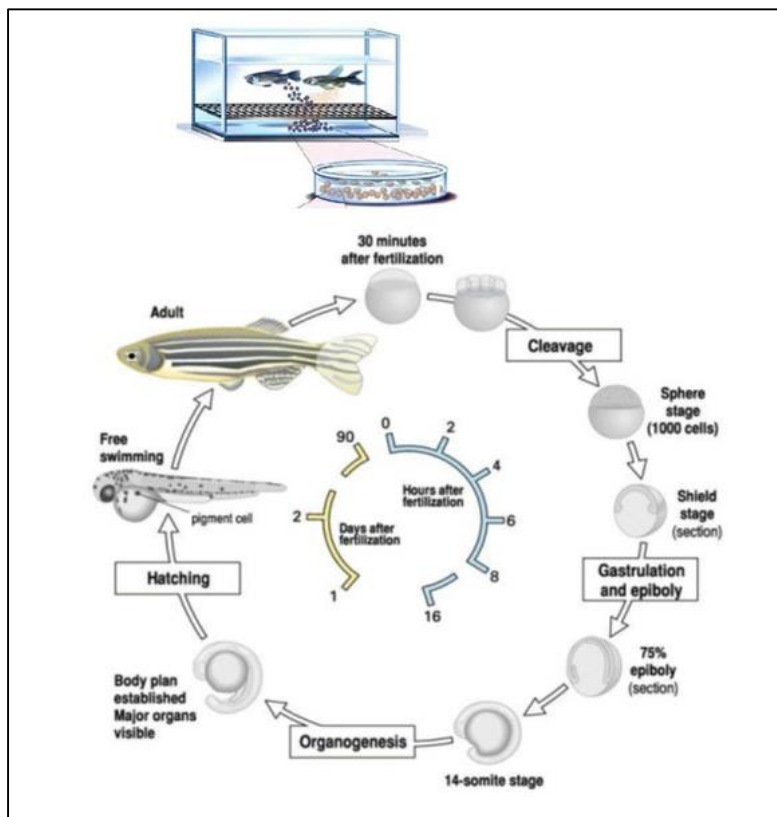


Figure 6 : Développement du poisson-zèbre. D'après « biologie de développement » de Lewis Wolpert au édition Dunod.

3. Zebrafish ou poisson zèbre (*Danio rerio*)

3.1. Généralités et avantages du zebrafish :

Le zebrafish ou poisson-zèbre (*Danio rerio*) est un petit poisson d'eau douce, originaire d'Inde et appartenant à l'ordre des Cypriniformes. Il présente des teintes vives, métalliques et brillantes (**Figure 5**). Le mâle est élancé alors que la femelle est beaucoup plus arrondie (**Figure 5**). Le poisson-zèbre, de par ses nombreux avantages, font de lui un excellent organisme modèle de plus en plus utilisé ces dernières années pour l'étude du développement chez les vertébrés: une petite taille (4-5 cm à l'âge adulte), un élevage aisé et peu coûteux et un temps de génération court (**Figure 6**). En effet, tous les organes sont mis en place après 3 jours. Ensuite, la croissance et la maturation de ces organes se poursuivent aux stades larvaires et la maturité sexuelle du poisson-zèbre est atteinte vers 3 mois. Les femelles sont aussi très fertiles ; elles peuvent pondre jusqu'à 500 œufs tous les 10 jours. L'organogenèse chez ce poisson peut être facilement étudiée puisque le développement embryonnaire est externe (ce qui évite de sacrifier la mère) et les embryons sont transparents. Nous pouvons ainsi facilement observer son développement *in vivo*. La petite taille des embryons permet aussi de réaliser et d'analyser des hybridations *in situ* et des immunohistochimies sur des spécimens entiers sans la nécessité de dissection.

Le traitement par des composés chimiques (tels des inhibiteurs pharmacologiques) dans le milieu d'élevage permet un criblage à grande échelle. Les micromanipulations, telles l'injection d'un morpholino (qui bloque l'épissage ou la traduction d'un ARNm cible (=knock-down)), d'ARNm, de transgènes, de protéines sont facilement réalisables sur des embryons ou larves de poisson-zèbre, ce qui augmente la variété d'approches fonctionnelles. De nombreuses lignées mutantes et transgéniques sont également disponibles. De plus, son génome est pour ainsi dire presque séquencé et environ 70% des gènes humains ont un gène correspondant chez le poisson-zèbre [64] .

3.2. Anatomie du pancréas chez le poisson-zèbre :

Le pancréas du poisson-zèbre se compose aussi d'une partie endocrine et d'une partie exocrine. Le compartiment exocrine est composé de cellules acinaires et d'un réseau de canaux associés (**Figure 7A**). Le compartiment endocrine est formé d'un îlot de Langerhans principal situé dans la tête du pancréas (**Figure 7A**) et de petits îlots secondaires qui sont localisés le long des canaux dans la queue du pancréas. Dans l'îlot de Langerhans, les cellules productrices d'insuline sont localisées au centre, comme chez la souris, et sont entourées par les cellules α productrices de glucagon (**Figure 7C,D**), les cellules δ productrices de somatostatine (**Figure 7B,D**) et enfin par les cellules ϵ qui synthétisent la ghréline.

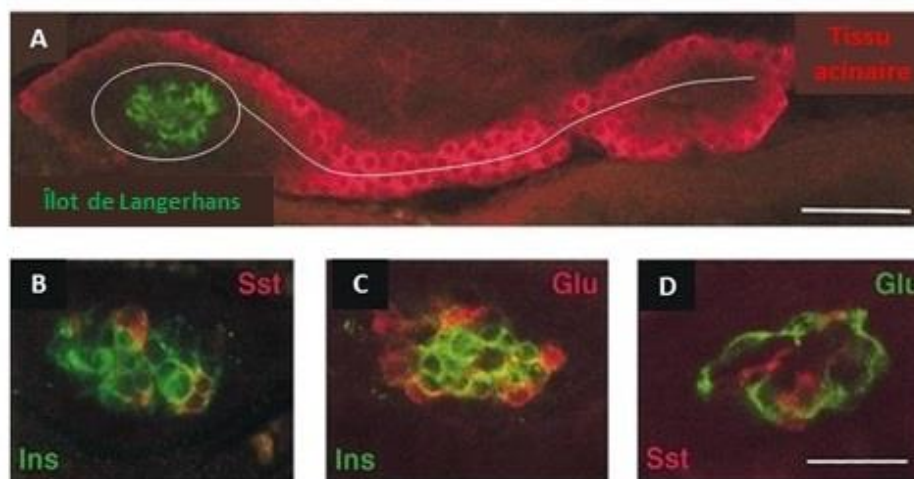


Figure 7 : Pancréas du poisson-zèbre. (A) Les canaux pancréatiques (ligne blanche) et le tissu acinaire (en rouge) entourent l'îlot de Langerhans (en vert) et s'étendent postérieurement dans la queue du pancréas. (B-D) Dans l'îlot, les cellules productrices d'insuline sont localisées au centre (B-C) et les cellules exprimant le glucagon et la somatostatine se trouvent à la périphérie. D'après [6]

3.3. Formation du pancréas chez le poisson zèbre

Lors de la gastrulation, les cellules s'organisent en trois feuillets de cellules : l'ectoderme d'où se développera l'épiderme et le système nerveux (**Figure 8B**), le mésoderme d'où se formera notamment la notochorde, les somites et le sang (**Figure 8B**) et l'endoderme qui donnera naissance au système digestif et à ses glandes annexes (**Figure 8B**) [65]. Une fois que la zone pancréatique sera définie au sein de l'endoderme, deux bourgeons émergeront (le bourgeon dorsal et le bourgeon ventral) et fusionneront pour former le pancréas au sein duquel la différenciation cellulaire se poursuivra.

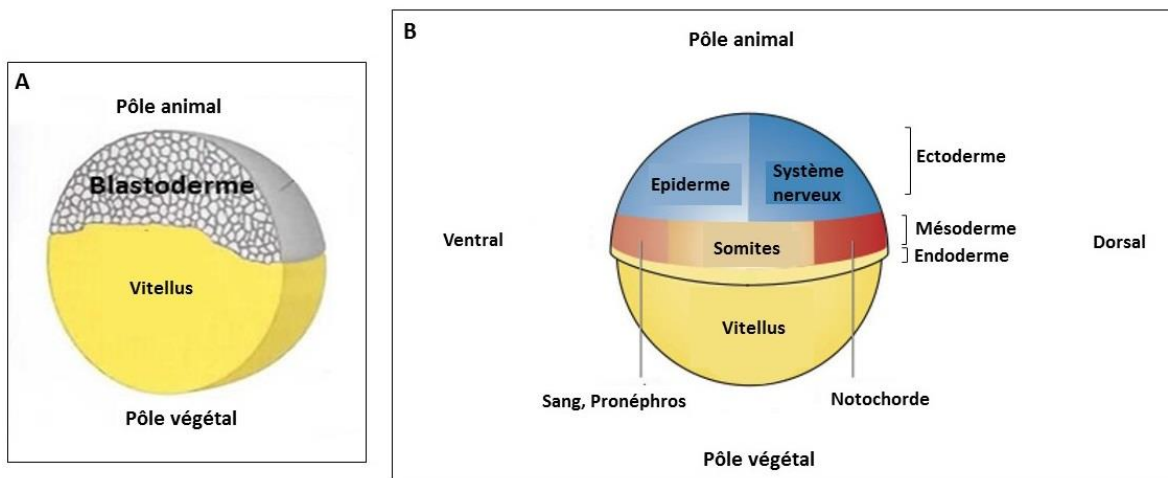


Figure 8 : (A) A la fin de la première étape de segmentation, l'embryon est formé d'un blastoderme situé au sommet du vitellus. Les trois feuillets embryonnaires se développent à partir du blastoderme. (B) Carte des territoires présomptifs du poisson-zèbre chez une jeune gastrula. Les cellules du bord du blastoderme donneront par la suite de l'endoderme, alors que le mésoderme sera issu de cellules un plus proches du pôle animal. L'ectoderme proviendra, quand à lui, des cellules les plus proches du pôle animal. L'endoderme donnera le tube digestif et ses glandes annexes (dont le pancréas). Le mésoderme évoluera notamment en somites, en sang, en pronéphros et en notochorde. L'ectoderme donnera naissance à l'épiderme et au système nerveux. D'après « biologie de développement » de Lewis Wolpert aux éditions Dunod.

3.3.1. Mise en place de l'endoderme

Après la fécondation, l'œuf commence sa segmentation. Les cellules qui se divisent, portent le nom de blastomères. Au fur et à mesure des divisions, on obtient des blastomères de plus en plus petits. A la fin de première étape de segmentation, l'embryon est formé d'un amas de blastomères (=blastoderme) situé au sommet du vitellus (**Figure 8A**). Les cellules localisées au pôle animal donneront naissance au futur ectoderme alors que les cellules localisées dans la région marginale donneront naissance au mésoderme et à l'endoderme (**Figure 8**).

A la fin de la période blastula, les blastomères migrent vers le pôle végétal jusqu'à recouvrir la totalité du vitellus par un phénomène qui porte le nom d'épibolie. La gastrulation commence lorsque les blastomères recouvrent 50% du vitellus. A partir de ce stade-là, des mouvements cellulaires (mouvements d'involution, de convergence et d'extension) conduisent à la mise en place des feuilletts embryonnaires : l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme [65-67].

A la fin de la gastrulation, l'endoderme est alors constitué d'une couche de cellules séparées en deux par une « ligne médiane », c.-à-d. une ligne imaginaire qui marque l'axe antéro-postérieur séparant le côté droit du côté gauche de l'embryon. L'endoderme antérieur donnera naissance au pharynx et à l'œsophage. L'endoderme postérieur donnera naissance, quant à lui, à l'intestin (bulbe intestinal, intestin moyen et intestin postérieur), au foie et au pancréas (**Figure 9**) [7, 8].

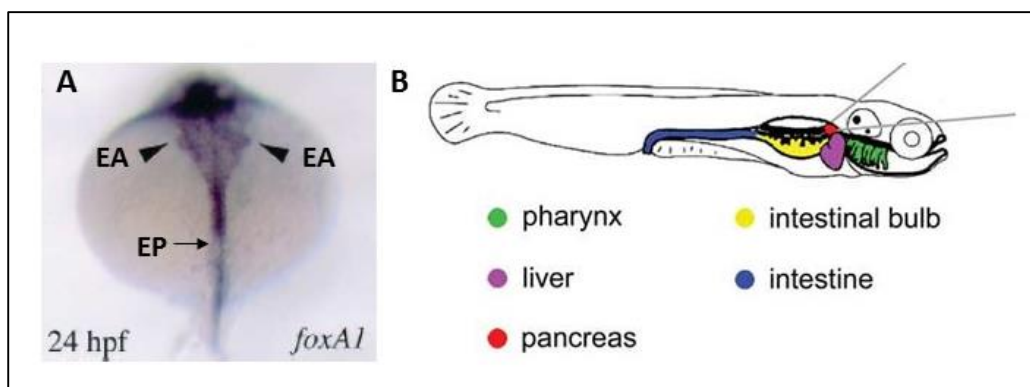


Figure 9 : (A) L'endoderme, visualisé par l'expression de *foxA1*, formera le tube digestif et ses glandes annexes. (B) L'endoderme antérieur donnera naissance au pharynx et à l'œsophage. L'endoderme postérieur donnera l'intestin, le foie et le pancréas. EA : endoderme antérieur ; EP ; endoderme postérieur. D'après [7, 8].

D'un point de vue moléculaire, la mise en place du feuillet endodermique et mésodermique au sein de la zone marginale du blastoderme nécessite l'intervention des facteurs nodaux [8, 68].

Plusieurs morphogènes contribuent aussi à la régionalisation antéro-postérieure de l'endoderme. Par exemple, la spécification du domaine pancréatique requiert la voie de signalisation de l'acide rétinoïque (AR) dès la fin de la gastrulation (entre 9 et 13hpf) [69]. Ainsi, quand la voie de signalisation de l'AR est altérée pharmacologiquement ou génétiquement, le pancréas ne se développe pas [69]. Inversement, si on traite les embryons avec de l'AR exogène, on étend le domaine pancréatique dans l'endoderme antérieur où des cellules pancréatiques ectopiques apparaissent [69]. Des études de transplantation ont montré que le signal de l'AR requis pour le développement du pancréas dans l'endoderme, est produit par le mésoderme paraxial antérieur [70]. De plus, la limite antérieure et la limite postérieure du domaine pancréatique sont déterminées respectivement par l'expression de l'enzyme Cyp26a1 dans l'endoderme (qui dégrade l'acide rétinoïque) [71] et du facteur de transcription cdx4 (qui bloque le signal de l'acide rétinoïque) [72]. Ils contrôlent donc la taille et la position du pancréas au sein de l'endoderme. En conclusion, le signal de l'acide rétinoïque produit dans le mésoderme participe à la régionalisation de l'endoderme et à la spécification du domaine pancréatique à la fin de la gastrulation.

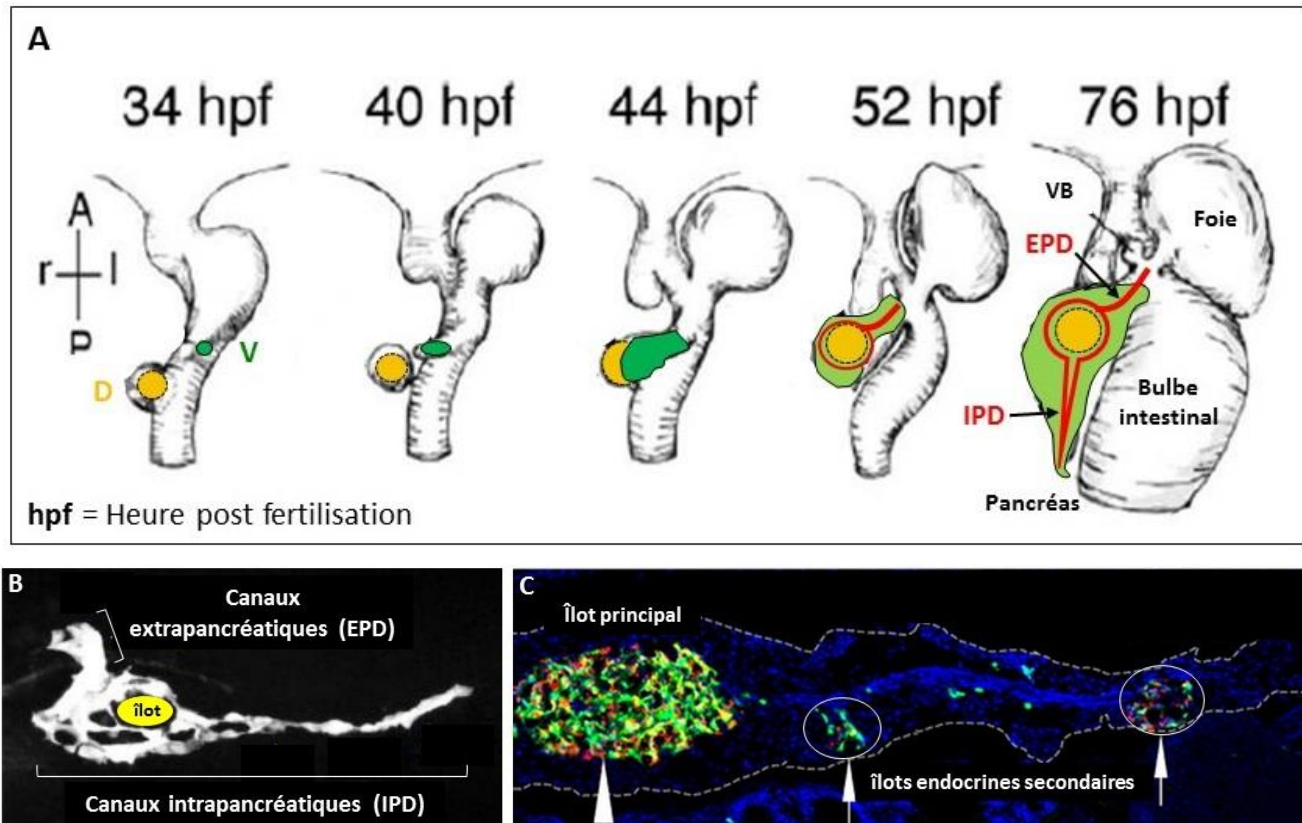


Figure 10 : Formation du pancréas chez le poisson-zèbre (A) Le pancréas se développe à partir de deux bourgeons endodermiques. Le bourgeon pancréatique dorsal est visible à 34 hpf (orange). Il donne naissance aux premières cellules endocrines qui se regroupent pour former l'îlot principal (orange). Le bourgeon ventral (vert foncé) est visible à 40hpf et donne naissance aux cellules acinaires (vert clair), aux canaux pancréatiques (rouge) et à des cellules endocrines tardives. Les deux bourgeons fusionnent à 52 hpf pour former une structure unique. D'après [17].

(B) Les canaux pancréatiques sont constitués des canaux intrapancréatiques et extrapancréatiques. Les canaux intrapancréatiques entourent l'îlot principal (jaune) et s'étendent postérieurement dans la queue du pancréas. D'après [23].

(C) Les cellules endocrines, qui émergent au niveau des canaux intrapancréatiques, se regroupent pour former de petits îlots secondaires (flèches blanches entourées par un cercle blanc) disséminés dans la queue du pancréas. La tête de flèche blanche montre l'îlot principal. Les canaux pancréatiques sont délimités par la ligne blanche en pointillé. D'après [19]. VB : vésicule biliaire ; D : dorsal ; V :ventral ; IPD : intrapancreatic duct ; EPD : extrapancreatic duct.

3.3.2. Comparaison de la formation des bourgeons pancréatiques chez le poisson-zèbre et la souris

Le pancréas du **poisson zèbre** se développe à partir de deux bourgeons endodermiques, un dorsal et un ventral [17]. Le premier bourgeon, dorsal et postérieur, émerge de l'endoderme aux environs de 24hpf (**Figure 10A, orange**). Il donne naissance aux premières cellules endocrines qui se regroupent pour former l'îlot principal appelé îlot de Langerhans [6]. Les premières cellules endocrines qui apparaissent sont les cellules bêta productrices d'insuline (15hpf). Ensuite apparaissent les cellules productrices de somatostatine (17hpf), puis les cellules produisant la ghréline (18hpf) et finalement les cellules exprimant le glucagon (21hpf). Le deuxième bourgeon, ventral et plus antérieur, est visible à 40hpf (**Figure 10A, vert foncé**). Les cellules de ce bourgeon migrent pour envelopper l'îlot principal et s'étendent après postérieurement pour former la queue du pancréas (**Figure 10A**). Le bourgeon ventral donne naissance aux cellules acinaires (**Figure 10A, vert clair**), aux cellules canalaire (**Figure 10A, rouge**) (qui vont former les canaux intrapancréatiques (IPD) et extrapancréatiques (EPD) (**Figure 10B**)) et à des cellules endocrines tardives qui émergent au niveau de l'épithélium canalaire [17, 20, 73]. Ces cellules endocrines sont générées soit au niveau des canaux extrapancréatiques [74-76] et contribuent à l'expansion de l'îlot principal, soit au niveau des canaux intrapancréatiques [19, 20, 77]. Les cellules endocrines issues des canaux intrapancréatiques se regroupent pour former de petits îlots secondaires disséminés dans la queue du pancréas (**Figure 10C**).

Chez la souris, le pancréas se développe aussi à partir de deux bourgeons pancréatiques. Cependant, contrairement au poisson-zèbre, les deux bourgeons pancréatiques donnent naissance à la fois au tissu endocrine et au tissu exocrine (cellules acinaires et canalaire). Le territoire pancréatique est déjà déterminé à 8 jours de développement embryonnaire (stade E8) (**Figure 11A**). La morphogenèse pancréatique commence avec une évagination dorsale de l'épithélium du tube digestif primitif (qui forme un bourgeon dorsal), qui apparaît au 9^{ème} jour de la vie fœtale embryonnaire suivie d'une seconde évagination qui apparaît ventralement (qui forme un bourgeon ventral) (**Figure 11B**).

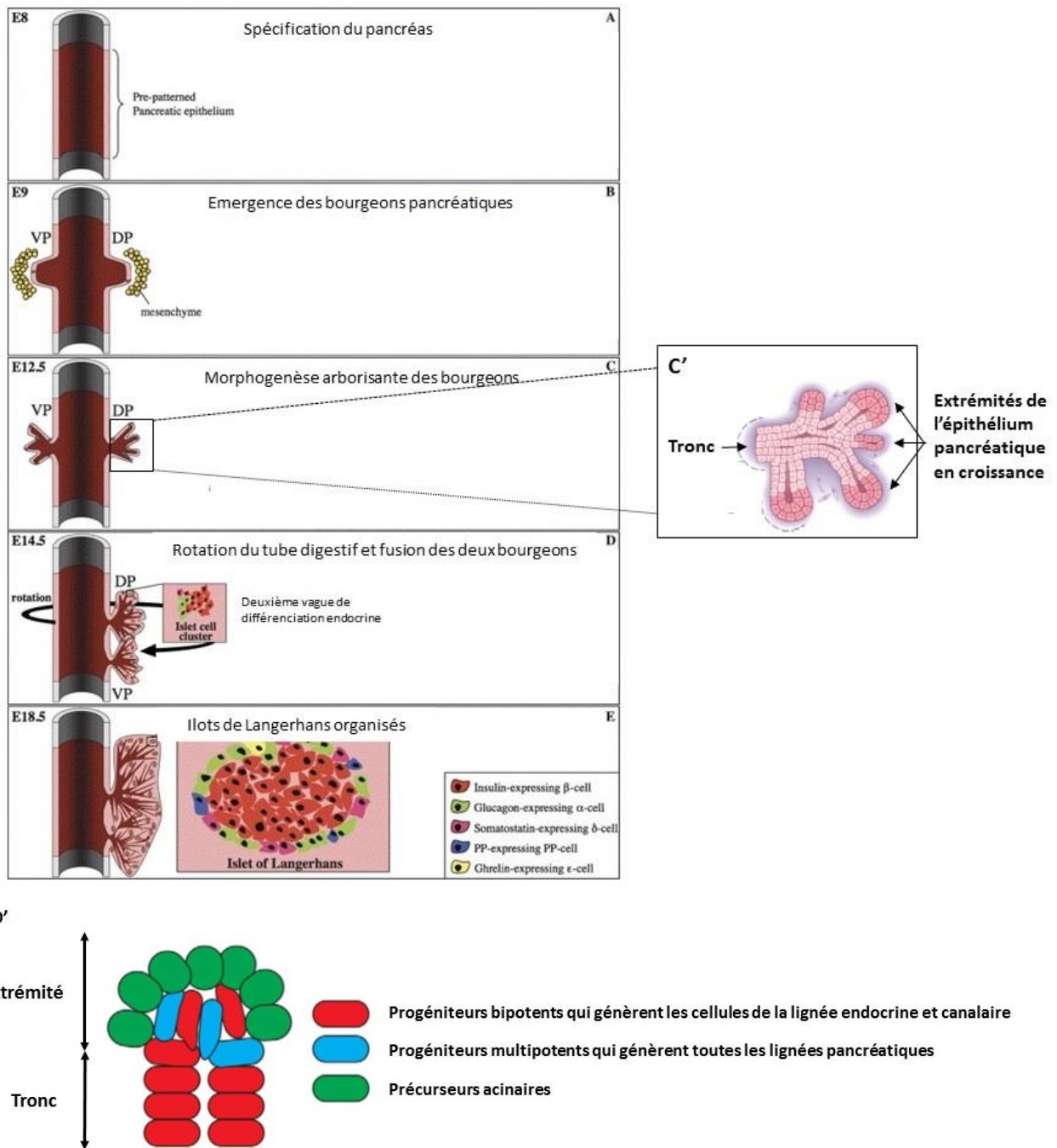


Figure 11 : (A-E) : Développement du pancréas chez la souris. D'après [15]. (C') Représentation schématique de l'épithélium pancréatique en croissance. Les progéniteurs multipotents, localisés aux extrémités des structures branchées de l'épithélium pancréatique en croissance (rose plus foncé), donnent naissance à toutes les lignées pancréatiques. Les progéniteurs bipotents, localisés dans le tronc (rose clair), génèrent les cellules acinaires et canalaire à E12.5. D'après [21].

(D') Représentation schématique d'une structure branchée de l'épithélium pancréatique à E14.5. Les progéniteurs multipotents se localiseraient (en bleu) à l'interface entre les cellules du tronc (en rouge) et les cellules de l'extrémité de l'épithélium pancréatique (en vert). D'après [22]. VP : Bourgeon pancréatique ventral. DP : Bourgeon pancréatique dorsal

L'équipe de Zhou a montré, par une expérience de traçage de lignée, que l'épithélium pancréatique des deux bourgeons contient, à ce moment-là, une population de progéniteurs multipotents qui peut donner naissance à toutes les cellules pancréatiques (les cellules endocrines, acinaires et canalaire) [5].

Au fur et à mesure que le développement embryonnaire se poursuit, l'épithélium pancréatique va proliférer, envahir le mésenchyme avoisinant et subir un remaniement morphologique qui va lui donner un aspect arborisant (**Figure 11C**). L'extrémité de l'épithélium pancréatique en croissance va alors contenir des progéniteurs multipotents qui donneront naissance à toutes les lignées pancréatiques et la région du tronc va abriter, par contre, des progéniteurs bipotents qui ne donneront plus naissance qu'aux cellules endocrines et canalaire (**Figure 11C'**) [5, 22, 78]. Vers E14.5, l'intestin subit une rotation et les deux bourgeons pancréatiques fusionnent pour former un organe interconnecté (**Figure 11D**) [15]. L'équipe de Zhou a également montré par une expérience de traçage de lignée, qu'à partir de E14, les cellules situées à l'extrémité de l'épithélium pancréatique perdent leur multi-potentialité et deviennent des précurseurs qui ne donneront plus naissance qu'à la lignée acinaire [5]. Par contre, les cellules situées à l'interface entre le domaine du tronc et l'extrémité de l'épithélium pancréatique resteraient multipotentes jusqu'à la naissance et donneraient toutes les lignées pancréatiques [22] (**Figure 11D'**).

Durant la morphogenèse du pancréas murin, les cellules endocrines apparaissent aussi lors de deux vagues de différenciation successives. La première s'étend de E9.5 à E12.5 et la deuxième de E13.5 à E16.5. La plupart des cellules endocrines issues de la première vague de différenciation chez la souris ne semble pas, contribuer aux îlots endocrines adultes [79]. Vers E18.0, les cellules endocrines commencent à s'organiser en îlots de Langerhans (**Figure 11E**) [15].

D'un point de vue moléculaire, la spécification des deux bourgeons et la différenciation des cellules pancréatiques nécessitent l'intervention de nombreux facteurs de transcription et voies de signalisation communs chez la souris et le poisson-zèbre. Cependant, nous aborderons uniquement dans la partie suivante seulement ceux qui sont directement impliqués dans notre étude.

4. Différenciation des cellules pancréatiques chez le poisson-zèbre

Au début du développement pancréatique (à 6-8S), les cellules endodermiques forment des rangées de cellules (appelées M, L1, L2) (**Figure 12D**). En marquant individuellement à la fluorescéine des cellules endodermiques appartenant à ces rangées (**Figure 12A,B,C**), l'équipe de Stainier a montré qu'elles adoptent un destin cellulaire différent en fonction de leur localisation médio-latérale [12, 13] (**Figure 12**). En effet, les cellules les plus médianes, localisées de part et d'autre de la ligne médiane (les rangs M) ne donneront naissance qu'à des cellules endocrines (**Figure 12A,D**). Les cellules, adjacentes et légèrement plus latérales (les rangs L1) donneront naissance à des cellules exocrines, à quelques cellules endocrines et à des cellules intestinales (**Figure 12B,D**). Les cellules les plus latérales (les rangs L2), se différencieront en cellules exocrines, intestinales ou hépatiques (**Figure 12C,D**).

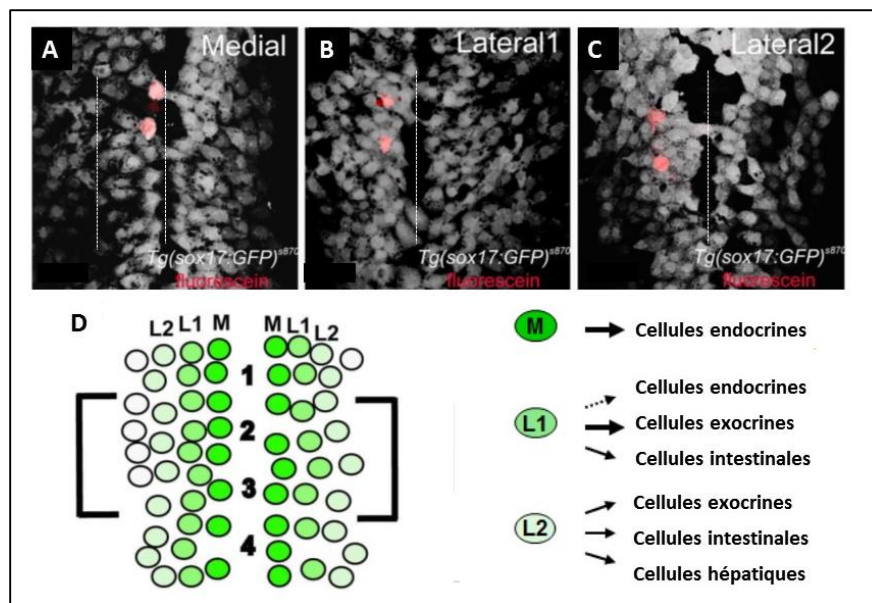


Figure 12 : Destin des cellules endodermiques situées sur les rangées M, L1 et L2 à 6-8S (A-B-C) Visualisation de l'endoderme grâce à la lignée transgénique Tg(sox17 :GFP). A 6-8S, deux cellules endodermiques dans la rangée M (B), L1(C) et L2(D) ont été marquées à la fluorescéine pour déterminer leur destin. (D) Représentation schématique des trois rangées de cellules (M,L1 et L2) observées dans l'endoderme au stade 6-8S. En fonction de leur localisation médio-latérale dans l'endoderme, les cellules donnent naissance à des cellules endocrines, à des cellules exocrines, à des cellules intestinales ou hépatiques. La « ligne médiane » est représentée en pointillé. D'après [12, 13].

4.1. Différenciation des cellules endocrines du bourgeon pancréatique dorsal

La différenciation des précurseurs endocrines vers un état différencié est contrôlée par la voie de signalisation Notch (cf 4.1.1) et nécessite une cascade régulatrice impliquant de nombreux facteurs de transcription. Beaucoup de ces facteurs identifiés chez la souris, sont également impliqués dans la différenciation des cellules pancréatiques chez le poisson-zèbre. Les premières cellules différenciées (les cellules productrices d'insuline) apparaissent déjà dès 15hpf (12S). La cascade de différenciation endocrine est donc déjà initiée très tôt durant le développement embryonnaire. A ce jour, *Ascl1b* est le premier marqueur pancréatique à être exprimé chez le poisson-zèbre [1]. Son expression dans l'endoderme pancréatique débute dès 10 hpf (stade bud) (**Figure 13**). L'expression des facteurs *Neurod1*, *Sox4b*, *Nkx6.1*, *Nkx6.2*, *Pdx1* [1, 3, 6, 80] apparaît un peu plus tard dans l'endoderme pancréatique (entre 11 et 14hpf) (**Figure 13**). L'analyse de l'expression de *Pdx1* a permis notamment de mieux comprendre le mouvement des précurseurs endocrines contribuant à la formation de l'îlot endocrine (Cf :4.1.2.3). Ces facteurs sont les acteurs les plus précoces connus jusqu'à présent dans la cascade de différenciation endocrine (Cf :4.1.2). Parmi ceux-ci, seuls les facteurs *Ascl1b* et *Nkx6.1*, qui sont des facteurs clefs de notre travail, seront développés plus en détail (Cf :4.1.2.1 et 4.1.2.2). Apparaissent ensuite dans cette cascade de différenciation les facteurs de transcription (*Isl1*, *Pax6b*,...) (**Figure 13**) impliqués dans la spécification et/ou la maturation d'un ou plusieurs types endocrines (c-à-d les cellules exprimant l'insuline, le glucagon, la somatostatine ou la ghréline). Cependant, ces derniers facteurs ne seront pas abordés dans cette introduction.

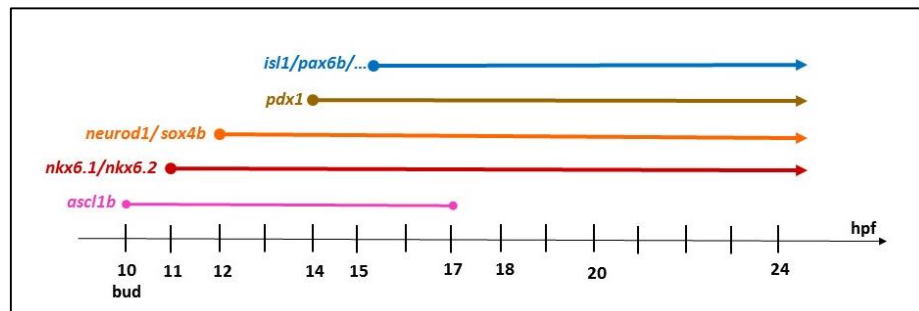


Figure 13 : Représentation schématique de l'expression d'*ascl1b*, de *nkx6.1*, de *nkx6.2*, de *neurod1*, de *sox4b*, de *pdx1*, d'*isl1* et de *pax6b* dans la cascade de différenciation des cellules endocrines du bourgeon dorsal. L'expression d'*ascl1b* s'éteint vers 17hpf alors que l'expression des autres facteurs continue au-delà de 24hpf.

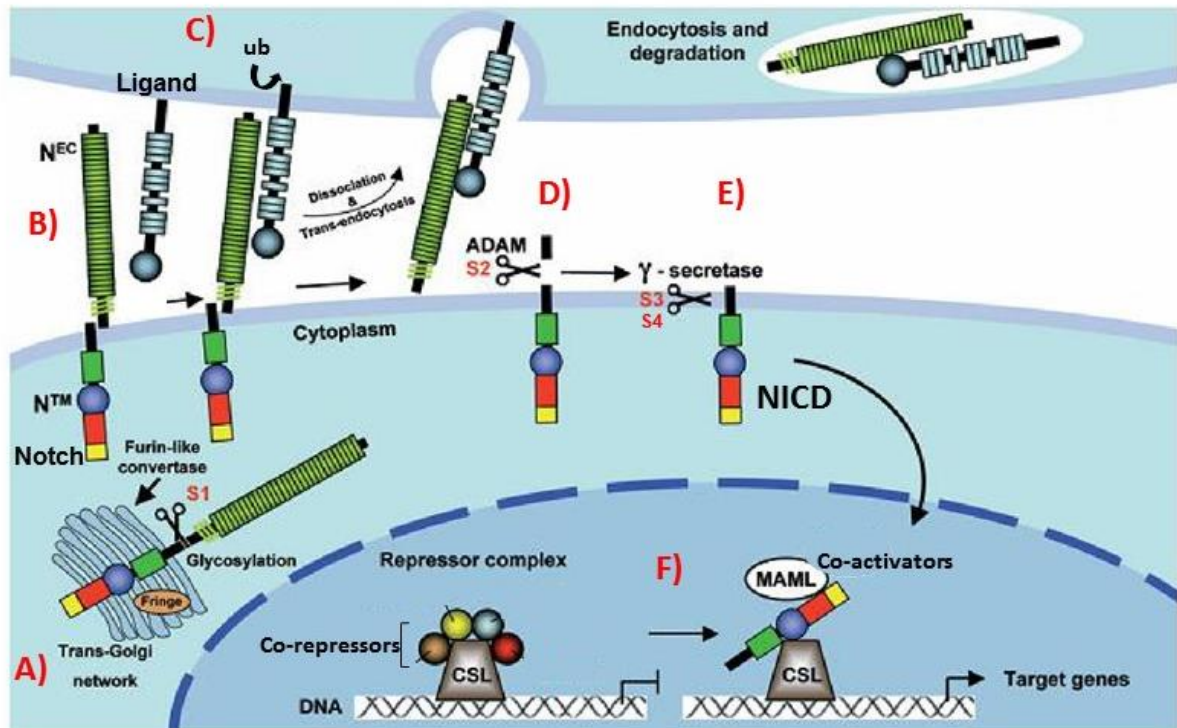


Figure 14 : Représentation schématique de la voie de signalisation Notch. Figure adaptée de <http://projetmaster.besson-net.info/images/notch.png>

4.1.1. Voie de Signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est une voie de signalisation juxtacrine conservée chez tous les métazoaires. Elle nécessite l'interaction entre deux protéines transmembranaires exposées à la surface de deux cellules voisines: le récepteur Notch et son ligand Delta (ou Jagged). La signalisation par le récepteur Notch est impliquée dès le développement embryonnaire dans un très grand nombre de processus comme la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire.

4.1.1.1. Généralités :

Les ligands de Notch appartiennent à la famille des protéines DSL (Delta Lag Serrate). Chez l'humain et chez la souris, il y a 3 ligands Delta (1,2 et 3) et 2 ligands Jagged (1 et 2). Chez le poisson-zèbre, il y a 4 ligands Delta (A,B,C et D) et 3 jagged (1a, 1b et 2) [81-83].

Le récepteur Notch est à la fois un récepteur transmembranaire et un régulateur transcriptionnel, son activation permettant d'activer l'expression de ses gènes cibles. Chez les mammifères, il existe 4 récepteurs Notch. Le zebrafish en compte 4 également [84, 85].

Après sa synthèse, la protéine Notch est clivée au niveau du domaine d'hétérodimérisation (HD) par une convertase furin-like dans l'appareil de golgi. Ce clivage, qui s'effectue durant la maturation du récepteur, convertit Notch en un hétérodimère composé de deux domaines : un domaine extracellulaire (N^{EC}) et un domaine qui comprend d'une part la partie transmembranaire et d'autre part la partie intracellulaire de la protéine Notch (N^{TM}) (**Figure 14A**). Ces deux domaines sont maintenus ensemble par des interactions non-covalentes au niveau du domaine d'hétérodimérisation. Une fois mature et amené à la membrane cellulaire, le récepteur Notch peut être reconnu par son ligand présent à la surface d'une cellule voisine (**Figure 14B**). Le domaine extracellulaire de Notch contient des répétitions de séquences appelées EGF (Epidermal Growth Factor). Ces séquences permettent la reconnaissance de Notch avec son ligand.

Après l'interaction (**Figure 14C**), le domaine intracellulaire du ligand est ubiquitiné par une ubiquitine ligase (Mib chez le poisson- zèbre). Le ligand, toujours en interaction avec le domaine extracellulaire du récepteur Notch est alors endocyté dans la cellule voisine (**Figure 14C**).

Dans l'autre cellule, la partie intracellulaire de Notch subit une série de clivages protéolytiques qui activent le récepteur. Le premier clivage en S2 (dans le domaine d'hétérodimérisation) est réalisé par une métalloprotéase de la famille ADAM (**Figure 14D**). Ce clivage génère une forme tronquée de Notch, toujours ancrée à la membrane. Cette dernière est ensuite clivée par la γ -sécrétase aux sites S3 et S4 (**Figure 14E**), ce qui libère la partie intracellulaire de Notch (NICD) dans le cytoplasme et le peptide N β dans l'espace intercellulaire. Le domaine intracellulaire de Notch migre ensuite vers le noyau grâce à son domaine de localisation nucléaire. Au niveau nucléaire, NICD s'associe, par l'intermédiaire de son domaine RAM, à la protéine de liaison à l'ADN appelée CSL (CBF1 ou RBP-jk chez les mammifères, Suppressor of hairless (Su(H)) chez la drosophile et Lag1 chez *C. elegans*) [86]. En l'absence de NICD, CSL s'associe à des co-répresseurs (CoR) et des déacétylases d'histone (*HDACs*) et réprime la transcription des gènes cibles. En revanche, son interaction avec NICD induit un changement allostérique de CSL qui facilite le déplacement des répresseurs transcriptionnels. Le co-activateur transcriptionnel Mastermind (MAM : Mastermind-like protein) reconnaît alors le complexe NICD/CSL et recrute d'autres co-activateurs transcriptionnels (Co-A) pour activer la transcription des gènes cibles (**Figure 14F**) [87-89]. Dans le pancréas, il active la transcription des membres de la famille des « Hairy enhancers of split (Hes/Her) » qui vont ensuite inhiber l'expression des gènes de type ARP/ASCL. Par après, NICD sera dégradé (grâce à son domaine PEST) et en l'absence de nouvelles molécules NICD, la transcription sera réprimée.

4.1.1.2. Inhibition latérale

La voie de signalisation Notch peut intervenir selon un mécanisme d'inhibition latérale. Ce dernier permet, à partir d'une population cellulaire initialement homogène, de produire deux populations différentes. En effet, au départ, un pool de progéniteurs exprime de manière équivalente, le récepteur Notch et son ligand Delta (ou Jagged). Ce processus maintient l'état indifférencié des cellules progénitrices. A un moment donné, une cellule au hasard commence à exprimer plus de ligands ce qui aura comme conséquence une inhibition de la production de ligands chez ces voisines. Comme les cellules voisines n'expriment plus de ligands, la cellule initiale échappe à cette inhibition réciproque et synthétise toujours plus de ligands, ce qui accentue sa différence moléculaire avec ses voisines. Elle entre en différenciation cellulaire. Quand une cellule progénitrice s'engage dans un destin déterminé, elle empêche donc les cellules voisines d'acquies le même destin (**Figure 15**).

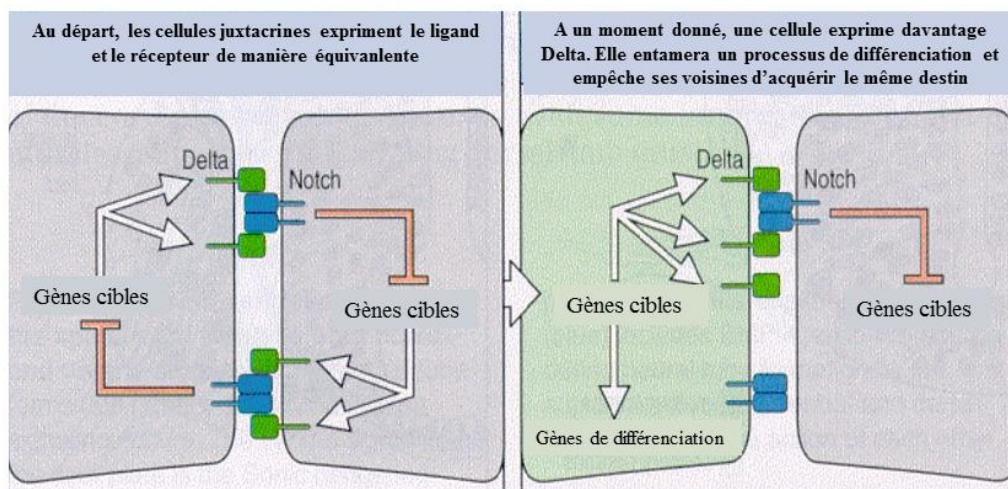


Figure 15 : Représentation schématique de l'inhibition latérale contrôlée par la voie de signalisation Notch. Si une cellule à un moment donné se met à exprimer plus de delta que ses voisines, elle les empêche de développer à leur tour une inhibition réciproque. La cellule entre donc en différenciation cellulaire. Figure adaptée de Biologie du développement de Lewis Wolpert aux éditions Dunod.

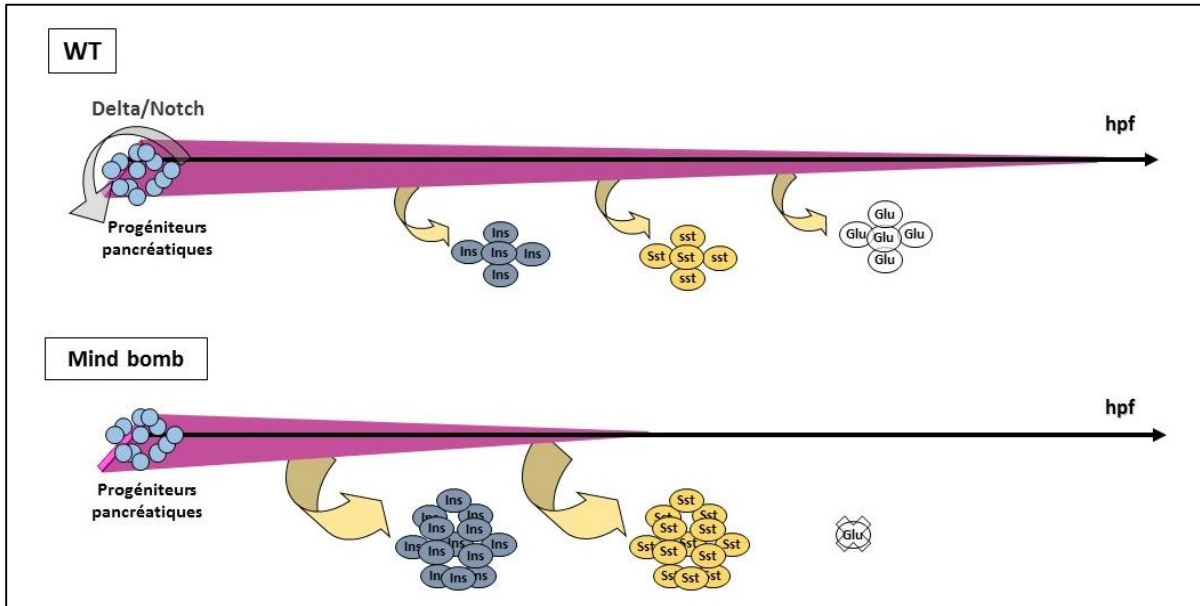


Figure 16: Chez le poisson-zèbre, la différenciation endocrine s'effectue à partir d'un pool de progéniteurs maintenu dans un état indifférencié par la voie de signalisation Notch. Les premières cellules à se différencier à partir de ce pool sont les cellules productrices d'insuline (gris), puis apparaissent les cellules exprimant la somatostatine (en jaune). Les cellules exprimant le glucagon sont les dernières à apparaître (blanc). Dans le mutant *Mind Bomb* dans lequel la voie de signalisation Notch est inactivée dès le début du développement pancréatique, les progéniteurs se différencient de manière excessive en cellules productrices d'insuline et de somatostatine, les premiers types cellulaires à pouvoir se différencier. Suite à cette différenciation excessive, le *pool* de progéniteurs s'épuise, ce qui empêche les types cellulaires qui apparaissent plus tardivement (cellules exprimant le glucagon) de se différencier. L'inactivation de la voie de signalisation Notch induit donc une augmentation des cellules exprimant l'insuline et la somatostatine et une perte des cellules produisant le glucagon.

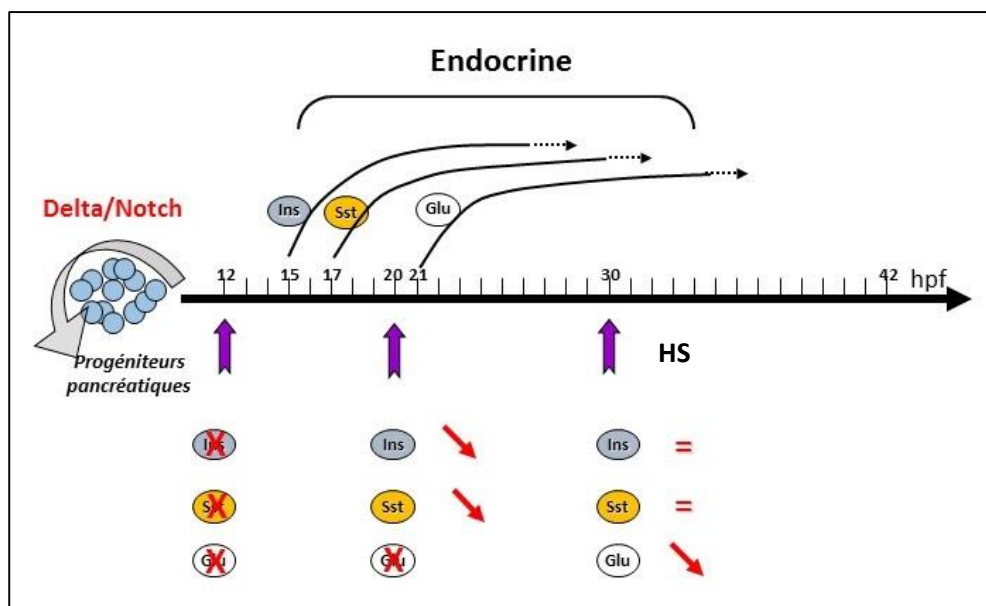


Figure 17: Représentation schématique de l'impact de la surexpression de Notch sur la différenciation des cellules endocrines. Les chocs thermiques (HS) ont été réalisés à 12hpf, 20hpf et 30 hpf (flèches mauves).

4.1.1.3. Rôle de la voie de signalisation Notch dans la différenciation endocrine

Des expériences de perte et de gain de fonction ont permis de mieux comprendre l'implication de la voie de signalisation Notch dans la différenciation des cellules endocrines du bourgeon dorsal.

- Expérience de perte de fonction de la voie de signalisation Notch

Le mutant *mind bomb (mib)* a été utilisé pour déterminer le rôle de la voie de signalisation Notch dans le développement précoce du pancréas chez le poisson-zèbre. Le gène *mib* code pour une ubiquitine ligase qui ubiquitine le domaine intracellulaire du ligand Delta (ou Jagged) (**Figure 14C**), qui est en interaction avec le fragment extracellulaire de Notch, ce qui entraîne leur endocytose. Cette étape facilite dans la cellule voisine les clivages du récepteur Notch restant (**Figure 14C-D**). Dans le mutant, la présence d'un codon stop prématuré ne permet pas la génération d'une protéine Mib fonctionnelle, ce qui empêche l'endocytose de Delta (ou de Jagged) et donc l'activation de la voie de signalisation Notch dans la cellule voisine [90].

Dans ce mutant, on observe d'une part une augmentation des cellules productrices d'insuline et de somatostatine (qui sont les 2 premiers types cellulaires à se différencier chez le poisson-zèbre) et d'autre part une diminution des cellules exprimant le glucagon. Si on inactive le ligand Delta, exprimé au début du développement pancréatique, un phénotype similaire est observé [81]. Une inactivation de la voie de signalisation Notch dans les progéniteurs pancréatiques induit donc une différenciation excessive des progéniteurs qui vont se différencier en cellules exprimant l'insuline et la somatostatine, qui sont les premières cellules endocrines à se différencier (**Figure 16**). Cette différenciation excessive conduit rapidement à un appauvrissement du pool de progéniteurs pancréatiques. Il n'y a donc plus assez de progéniteurs pour permettre la différenciation des cellules endocrines apparaissant plus tardivement (à savoir les cellules productrices de glucagon). Ce qui explique la très forte diminution des cellules exprimant le glucagon observée dans le mutant (**Figure 16**).

La voie de signalisation Notch contrôle donc la différenciation des cellules endocrines du bourgeon pancréatique dorsal.

- Expérience de surexpression de la voie de signalisation Notch

Pour étudier l'impact d'une surexpression de Notch sur la différenciation des cellules endocrines, deux lignées transgéniques peuvent être utilisées : une lignée transgénique (*Tg(hsp70:Gal4)*) exprimant le gène Gal4 sous le contrôle d'un promoteur inductible et une lignée transgénique (*Tg(UAS:NICD)*) où l'expression du domaine intracellulaire de Notch (NICD) est dépendante de l'expression de Gal4 [91]. La voie de signalisation Notch est alors surexprimée dans le double transgénique par un choc thermique.

Lorsqu'on réalise un choc thermique au moment où la différenciation endocrine ne fait que commencer (12hpf), on observe une augmentation des progéniteurs pancréatiques et une absence de cellules endocrines matures (insuline, somatostatine et glucagon) à 24hpf [81]. En surexprimant la voie de signalisation Notch à 12hpf, les progéniteurs pancréatiques ne se différencient donc pas en cellules endocrines. Ces résultats montrent que la voie de signalisation contrôle la différenciation endocrine en maintenant un pool de progéniteurs dans un état indifférencié. Maintenant, si la surexpression de NICD est induite à 20hpf, on observe à 30hpf une réduction des cellules productrices d'insuline et de somatostatine et une absence des cellules exprimant le glucagon. La réduction du nombre de cellules exprimant l'insuline et la somatostatine n'est pas complète parce qu'au moment où le choc thermique a été réalisé, elles avaient déjà commencé leur différenciation. Par contre, à ce stade-là, la différenciation des cellules produisant le glucagon n'a pas encore débuté (**Figure 17**). Un choc thermique réalisé plus tard, vers 30hpf, entraîne juste une diminution des cellules produisant le glucagon. Comme pour les deux autres expériences, c'est l'ordre d'apparition des différents types pancréatiques qui expliquent le phénotype observé. Et donc à 30hpf, les cellules exprimant l'insuline et la somatostatine sont déjà différenciées. Seule la différenciation des cellules productrices de glucagon, qui est en cours, est affectée (**Figure 17**). L'ensemble de ces résultats montre que la voie de signalisation Notch inhibe la différenciation cellulaire en cours et ultérieure afin de maintenir un pool de progéniteurs dans un état indifférencié [81].

En conclusion, la différenciation des cellules endocrines s'effectue de façon séquentielle. Les cellules productrices d'insuline apparaissent les premières, puis viennent les cellules produisant la somatostatine, celles produisant la ghréline et enfin les cellules productrices de glucagon. Cette différenciation successive est régulée par la voie de signalisation Delta/Notch qui maintient un pool de progéniteurs dans un état indifférencié. Elle empêche donc une différenciation endocrine excessive des progéniteurs en un seul type cellulaire (ex : cellules exprimant l'insuline) afin de permettre la différenciation des autres types endocrines (cellules exprimant la somatostatine, la ghréline et le glucagon) qui apparaissent plus tard. Si la voie de signalisation Notch est inactivée dès le début du développement pancréatique, les progéniteurs se différencient de manière excessive en cellules productrices d'insuline et de somatostatine au détriment des autres types. Par contre, si la voie Notch est surexprimée, les cellules sont maintenues dans un état indifférencié. De façon intéressante, les cellules qui entrent en différenciation endocrine au départ ne sont pas regroupées mais plutôt dispersées dans l'endoderme pancréatique (selon une distribution « salt and pepper ») de part et d'autre de la ligne médiane. On ne trouve pas deux cellules en cours de différenciation directement l'une à côté de l'autre. Elles sont séparées (**Figure 18B**) par des progéniteurs (**Figure 18C, flèches blanches**). Leur distribution « salt and pepper » dans l'endoderme pancréatique suggèrent que l'implication de la voie de signalisation Notch s'effectue à travers un mécanisme d'inhibition.

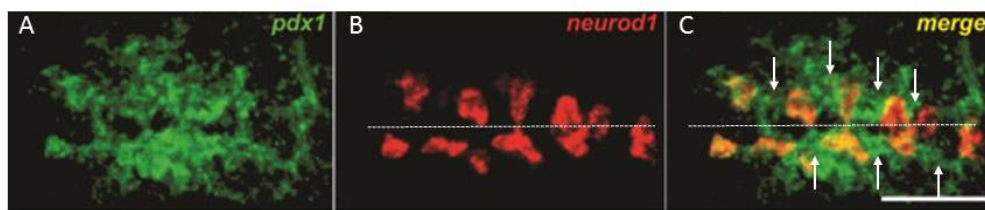


Figure 18 : Répartition « salt and pepper » des cellules qui entrent en différenciation endocrine. Les cellules en différenciation endocrine (rouge) sont marquées par l'expression de *neurod1* (15hpf). Comme sur base du modèle de l'inhibition latérale, on n'observe pas deux cellules en cours de différenciation adjacentes. Ces cellules sont séparées par des progéniteurs (vert, flèches blanches) marqués par l'expression de *pdx1*. La ligne en pointillé représente la ligne médiane. D'après [1]

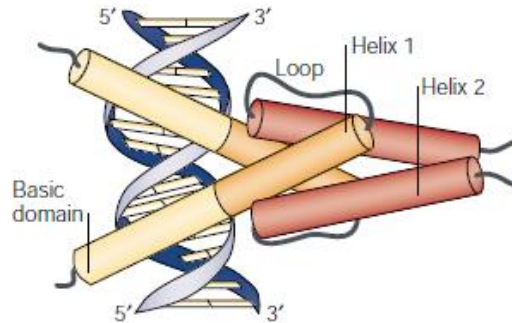


Figure 19 : Représentation schématique d'un dimère de facteurs bHLH en interaction avec l'ADN. Le facteur de transcription de type bHLH est constitué d'un domaine de type hélice-boucle-hélice (HLH) et d'un domaine basique (jaune). Le domaine HLH est formé de deux hélices alpha (l'hélice 1 est représentée en orange et l'hélice 2 en rouge) reliées entre elles par une boucle. Le domaine basique interagit avec l'ADN au niveau du grand sillon. D'après [18]

NGN Group:	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Biparous/TAP	RRMKANDRERNR
XNGN1 (a&b)	RRLKANNRERNR
MNGN1/MATH4c/MNeuroD3	RRVKANDRERNR
MNGN2/MATH4a	RRLKANNRERNR
MNGN3/MATH4b	RRKKANDRERNR
NeuroD Group:	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
DATH23	RRIEANARERTR
ZNdr1a	RRMEANARERNR
ZNdr2	RRQKANARERTR
XNeuroD	RRMKANARERNR
XATH3	RRVKANARERTR
MATH2/NEX1	RRQEANARERNR
MATH3/NeuroM	RRVKANARERSR
MNeuroD1/BETA2	RRMKANARERNR
MNeuroD2/NDRF/KW8	RRQKANARERNR
ATO Group:	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
LIN-32	RRSAANERERRR
ATO	RRLAANARERRR
AMOS	RRLAANARERRR
CATO	RRQAANARERKR
XATH1	RRLAANARERRR
XATH5	RRLAANARERRR
MATH1	RRLAANARERRR
MATH5	RRLAANARERRR
Ascl	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
mmAscl1	RR--NERERNR
mmAscl2	RR--NERERNR
hsAscl1	RR--NERERNR
hsAscl2	RR--NERERNR
drAscl1a	RR--NERERNR
drAscl1b	RR--NERERNR

Figure 20 : Comparaison du domaine basique des membres de la famille des ARP et des Ascl. En rouge: a.a. communs à tous les bHLH de type ARP/ASCL. En bleu: a.a. communs à tous les ARP. En vert: a.a. caractéristiques de chaque sous-famille d'ARP ou des Ascl. En noir: résidus variables. En mauve: substitutions dans la famille des Neurod suggérant la possibilité d'un sous-groupe. Il y a un espace de trois aa entre les aa2 et aa6 dans la famille des Ascl. D'après [10]

4.1.2. Les acteurs précoces de la différenciation endocrine :

Quand les progéniteurs échappent à la répression exercée par Notch, l'inhibition de l'expression des facteurs de transcription de type ARP/ASCL est levée et les cellules pancréatiques entrent en différenciation endocrine. C'est l'action combinée de toute une série de facteurs de transcription qui vont permettre la différenciation des précurseurs endocrines en cellules endocrines matures.

4.1.2.1. La famille des gènes ARP/ASCL :

4.1.2.1.1. Généralités

Les facteurs de transcription de type ARP/ASCL sont classés en deux grandes familles : la famille « Achaete scute-like » (ASCL) et la famille des « Atonal Related Proteins » (ARP) [10]. Les membres de la famille ARP sont ensuite subdivisés en trois sous-familles : les Neurogénines, les NeuroD et les Atonal [10, 18]. Ils codent tous pour des facteurs de transcription de type bHLH (basic helix-loop-helix) qui contiennent un domaine hélice-boucle-hélice (**Figure 19**) responsable de la dimérisation de la protéine et un domaine basique qui est responsable de la liaison à l'ADN (**Figure 19**). Le domaine basique des facteurs de la famille des ARP contient 12 acides aminés (aa) et celui de la famille des ASCL en contient 9 (numérotés de 1 à 12 sur la **Figure 20**). 7 aa sont communs à tous les bHLH de type ARP/ASCL. Ces acides aminés-là non variables entrent en contact avec l'ADN (**Figure 20: aa rouges**) [10, 18, 92]. Ils se lient à une séquence consensus, CANNTG, dite E-Box [10, 18]. Les autres acides aminés du domaine basique varient, quant à eux, d'une famille à l'autre et d'une sous-famille à l'autre. Parmi les 5 aa variables, on trouve un aa qui est spécifique à tous les ARP (**Figure 20 aa5, bleu**), trois aa qui déterminent l'appartenance des facteurs ARP à l'une des 3 sous-familles (les Neurogénines, les NeuroD et les Atonal) (**Figure 20: aa4, aa7 et aa11 verts**) et 2 aa qui sont spécifiques à tous les ASCL (**Figure 20 : aa7 et aa11 verts**). Les facteurs de la famille ASCL sont facilement distinguables de la famille des ARP car ils contiennent un espace de trois aa entre les aa2 et aa6 (**Figure 20 : aa3, aa4 et aa5**) [10]. Ce sont ces aa variables qui contribueraient à la spécificité fonctionnelle de ces facteurs en interagissant avec des cofacteurs spécifiques [10, 18, 92, 93].

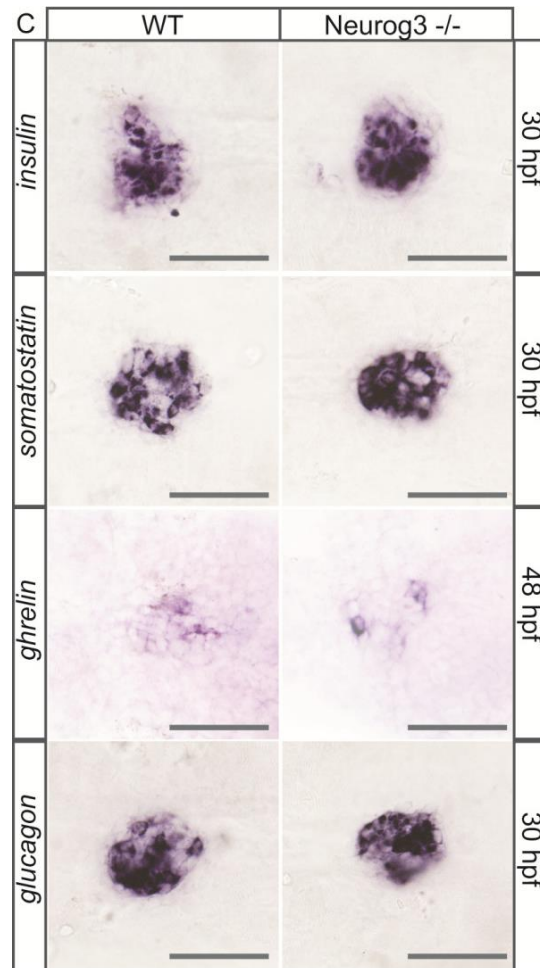


Figure 21 : L'inactivation de *ngn3* n'a pas d'effet sur la différenciation des cellules endocrines chez le poisson-zèbre. D'après [1]

Afin d'identifier toutes les facteurs ARP/ASCL impliqués dans la différenciation des cellules endocrines chez le poisson-zèbre, Flasse et al. a étudié leur profil d'expression et leur rôle dans le développement pancréatique [1]. Le premier facteur sur lequel elle s'est attardée est le facteur de transcription Ngn3 qui appartient à la famille des ARP et à la sous famille des Neurogénines car chez la souris, ce facteur est absolument requis pour la différenciation des cellules endocrines.

4.1.2.1.2. Neurogénine 3 : facteur clé dans la différenciation endocrine chez la souris

Chez la souris, NGN3, dont l'activation dépend de la voie de signalisation Delta/ Notch, contrôle l'expression de nombreux gènes qui sont impliqués dans la différenciation endocrine (ex : *NeuroD*, *Isl1*, *Pax6*, *Rfx6*, etc) [94-98]. En utilisant une méthode de traçage de lignée basée sur le système de recombinaison Cre-ERTM-LoxP, l'équipe de Melton a montré que les cellules qui expriment Ngn3 représentent une population de précurseurs endocrines qui donne naissance à toutes les cellules endocrines matures (α , β , δ , et PP) de l'îlot pancréatique [99]. Cependant, une fois que le précurseur est différencié en cellule endocrine mature, l'expression de *Ngn3* s'éteint [94, 100, 101]. D'un point de vue fonctionnel, l'inactivation du gène *Ngn3* entraîne une agénésie du pancréas endocrine et les souris meurent quelques jours après la naissance des suites d'une hyperglycémie sévère [94]. Inversement, une surexpression de *Ngn3* sous le contrôle du promoteur du gène *Pdx-1* entraîne une augmentation de la différenciation des premières cellules endocrines qui apparaissent [102] [100].

L. Flasse a donc voulu déterminer si la fonction de Ngn3 dans la différenciation des endocrines chez la souris est conservée chez le poisson-zèbre. Cependant, de manière surprenante, elle a montré que Ngn3 n'était pas exprimé dans le pancréas et n'était pas impliqué dans la différenciation des cellules endocrines (**Figure 20**) [1]. Il a fallu donc identifier le facteur de transcription qui joue le rôle de NGN3 chez le poisson-zèbre. Les travaux de Lydie Flasse se sont alors portés sur un autre facteur de type ARP/ASCL, à savoir *Ascl1b*. Ce dernier appartient à la famille des ASCL (Achaete-Scute Complex like).

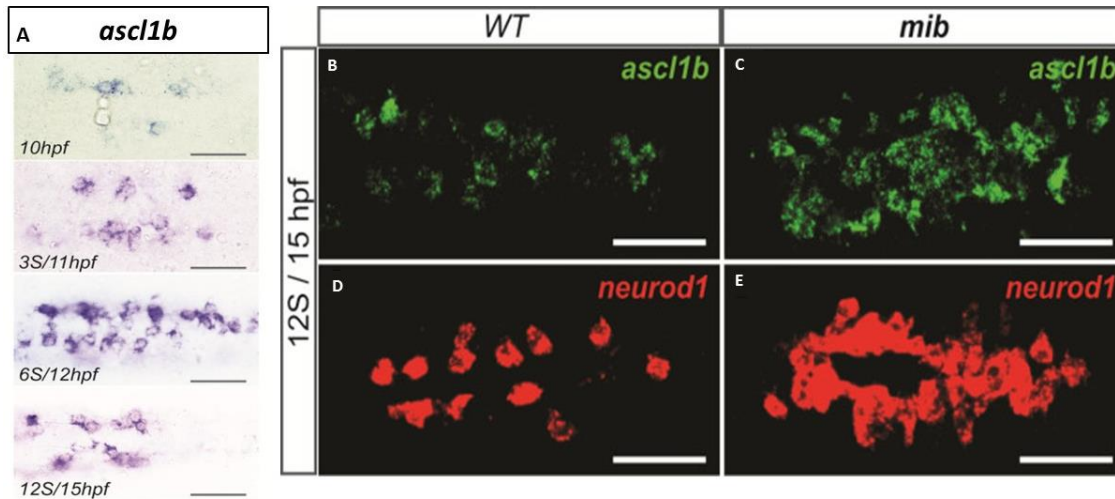


Figure 22 : (A) : Profil d'expression d'*ascl1b* dans le bourgeon pancréatique dorsal. (B-E) : L'expression d'*ascl1b* (B-C) et de *neurod1* (D-E) dans le bourgeon pancréatique dorsal est augmentée dans les mutants *mib*. D'après

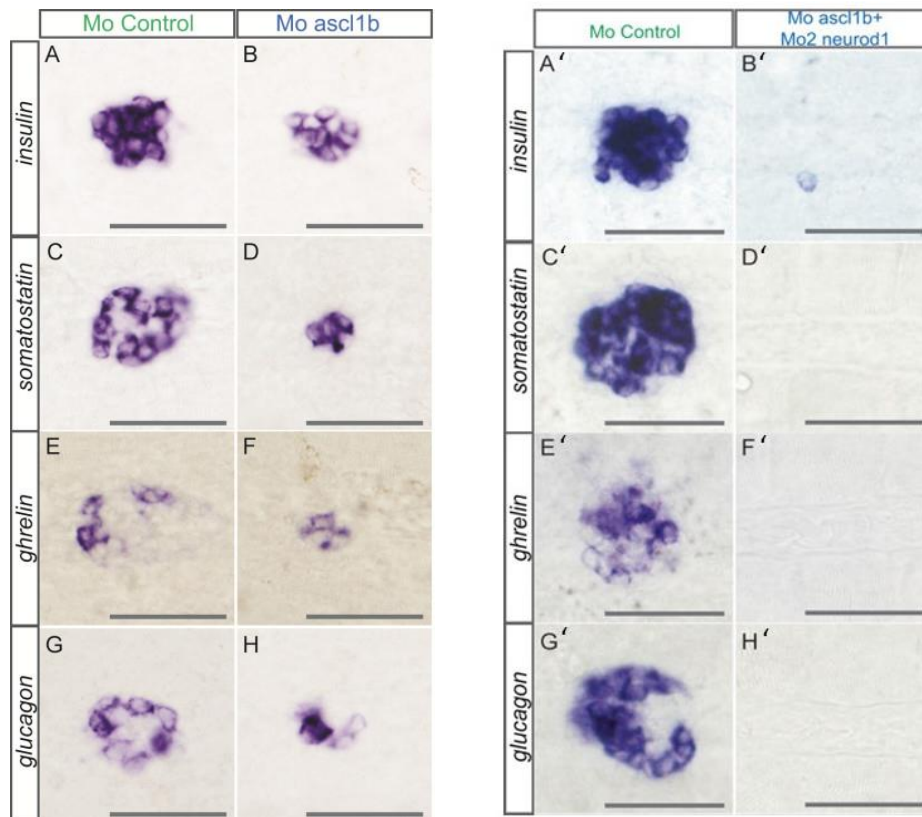


Figure 23 : (A,C,E,G) Embryons contrôles à 30hpf. (B,D,F,H) Le knock-down d'*ascl1b* mène à une réduction de tous les types endocrines (cellules exprimant l'insuline (B), le glucagon (H), la somatostatine (D) et la ghréline (F)) à 30hpf. (A',C',E',G') Embryons contrôles à 30hpf. (B',D',F',H') Le knock-down combiné d'*ascl1b* et de *neurod1* conduit à une perte de toutes les cellules endocrines à 30hpf. D'après [1].

4.1.2.1.3. *Ascl1b* et *Neurod1* : deux facteurs clés de la différenciation des cellules endocrines chez le poisson-zèbre

- *Ascl1b* :

Chez le poisson-zèbre, l'expression d'*ascl1b* commence dès le stade bud (10hpf) dans une double rangée de cellules localisées de part et d'autre de la ligne médiane. Son expression pancréatique atteint un maximum à 12hpf puis diminue progressivement jusqu'à disparaître vers 17hpf [1] (**Figure 22A**). *Ascl1b*, dont l'expression dans l'endoderme débute à 10hpf, semble être actuellement le premier marqueur pancréatique à être exprimé chez le poisson-zèbre (c.à.d 1 heures avant l'expression des premiers marqueurs pancréatiques connus jusqu'à ce jour) (**Figure 13**). Une analyse plus détaillée de son profil d'expression a montré qu'il n'était jamais exprimé dans les cellules endocrines matures. *ascl1b* est donc exprimé très précocement et transitoirement dans les cellules de la lignée endocrine du bourgeon pancréatique dorsal mais son expression se limite aux précurseurs de cette lignée car il n'est pas exprimé dans les cellules endocrines matures, comme *Ngn3* chez la souris.

La voie de signalisation Notch réprime l'expression d'*ascl1b* dans le bourgeon pancréatique dorsal. En effet, dans le mutant *mind bomb*, on observe une forte augmentation de l'expression d'*ascl1b* [1] (**Figure 22C**).

D'un point de vue fonctionnel, le knock-down de ce facteur affecte la différenciation de tous les types endocrines. Ainsi, dans le morphant *ascl1b*, on observe une diminution des cellules α , β , δ et ϵ (**Figure 22 B, D, F, H**). Le facteur *Ascl1b* ne semble donc pas jouer chez le poisson-zèbre le rôle de NGN3 puisque son inactivation n'entraîne pas une perte complète des cellules endocrines. Il faut savoir qu'à cause d'une duplication ancestrale de son génome, le poisson zèbre possède deux gènes *ascl1* : *ascl1b* mais aussi *ascl1a*. L'expression pancréatique d'*ascl1a* est, par contre, beaucoup plus faible qu'*ascl1b*. Elle débute dès 12hpf et s'éteint aux alentours de 24hpf et son inactivation n'a pas d'effet sur la formation du pancréas endocrine. Cependant, *Ascl1b* et *Ascl1a* n'auraient-ils pas une fonction redondante dans le pancréas ? Lydie Flasse a montré qu'une inactivation simultanée des deux facteurs n'accentue pas la réduction des cellules endocrines [1], ce qui indique qu'*Ascl1a* seul ne compense pas l'effet d'*Ascl1b*. *Ascl1a* et *Ascl1b* ne sont toutefois

pas les seuls facteurs de transcription de type ARP/ASCL qui pourraient jouer un rôle dans la différenciation des cellules endocrines chez le poisson-zèbre. En effet, les travaux de Lydie Flasse ont montré que si *ascl1b* est inactivé en même temps que *neurod1*, un autre facteur de type ARP/ASCL, on obtient un phénotype semblable à celui du mutant *Ngn3* chez la souris, à savoir une perte complète de toutes les cellules endocrines matures (**Figure 23 B', D', F', H'**).

- **Neurod1**

Le facteur Neurod1, appartient à la famille des ARP (Atonal Related Protein). L'expression de *neurod1* dans le bourgeon pancréatique dorsal chez le poisson-zèbre avait déjà été reportée [74, 80, 81, 95, 103] mais c'est dans notre laboratoire que son profil d'expression ainsi que l'étude de sa fonction ont été analysés plus en détail. L'expression pancréatique de *neurod1* commence 2 heures plus tard qu'*ascl1b* (**Figure 13**). Cependant, contrairement à *ascl1b*, l'expression de *neurod1* persiste dans toutes les cellules endocrines matures [1]. Neurod1 marque donc toutes les cellules de la lignée endocrine (précurseurs et cellules endocrines matures) du bourgeon pancréatique dorsal.

L'expression de *neurod1* est aussi contrôlée par la voie de signalisation Notch. En effet, une inactivation de la voie Notch dans le bourgeon dorsal induit une forte augmentation de son expression, comme *ascl1b* (**Figure 22E**) [1].

Bien que *neurod1* soit exprimé dans toutes les cellules endocrines pancréatiques, son knock-down n'affecte qu'une sous-population de ces cellules. En effet, les morphants *neurod1* montrent une perte complète des cellules exprimant le glucagon et la ghréline et une forte réduction des cellules produisant la somatostatine. Par contre, le nombre de cellules exprimant l'insuline n'est pas affecté par l'inactivation de *neurod1*.

- **Rôle d'Ascl1b et de Neurod1 dans les premières étapes de la différenciation endocrine**

En analysant le rôle d'Ascl1b très tôt dans la différenciation des cellules endocrines, Flasse a constaté qu'inactivation de l'expression d'*ascl1b* (knock-down) conduit à un retard d'expression de *sox4b* (cf 4.1 et 4.1.2.1.4) dans les précurseurs endocrines. Elle a montré qu'en l'absence d'*ascl1b*, c'est Neurod1 qui initie l'expression de *sox4b* mais seulement quand il commence à être exprimé (soit deux heures plus tard que *ascl1b*) (**Figure 24 C**). Comme les précurseurs endocrines Sox4b+ sont moins nombreux, on observe une diminution générale de tous les types endocrines (**Figure 24C**) [1].

Dans le morphant *neurod1*, l'expression de *sox4b* est correctement initiée dans les précurseurs endocrines mais s'éteint vers 18hpf. Ces résultats montrent que Neurod1 n'agit pas sur l'initiation de l'expression de *sox4b* dans les précurseurs endocrines mais plutôt sur la maintenance de son expression. En l'absence de *neurod1*, Ascl1b induit et maintient *sox4b* dans les précurseurs endocrines. Cependant, comme l'expression d'*ascl1b* s'éteint vers 17hpf et que Neurod1 n'est pas présent pour prendre le relais, l'expression de *sox4b* n'est plus maintenue (**Figure 24B**). Au moment elle s'éteint, la majorité des cellules exprimant l'insuline et une minorité des cellules produisant la somatostatine sont déjà différenciées. Seule la différenciation des cellules endocrines apparaissant après 17hpf, est bloquée, ce qui explique qu'on observe une perte des cellules productrices de glucagon et de ghréline et une réduction du nombre de cellules exprimant la somatostatine (**Figure 24B**) [1].

Le knock-down combiné de *neurod1* et d'*ascl1b* mène, par contre, à une perte de l'expression de *sox4b* et d'autres facteurs impliqués dans la différenciation endocrine tels qu'Isl-1, Pax6b, HB9. La différenciation endocrine est donc bloquée et les cellules endocrines matures sont absentes (**Figure 23 B',D',F',H'**) [1].

En Conclusion, chez le poisson-zèbre, Ascl1b et Neurod1 agissent de manière complémentaire dans les précurseurs endocrines pour induire leur différenciation. Il est requis dès le début de la formation du bourgeon pancréatique dorsal pour initier la différenciation de la lignée

endocrine. Neurod1 poursuit le programme de différenciation endocrine initié par le facteur Ascl1b [1].

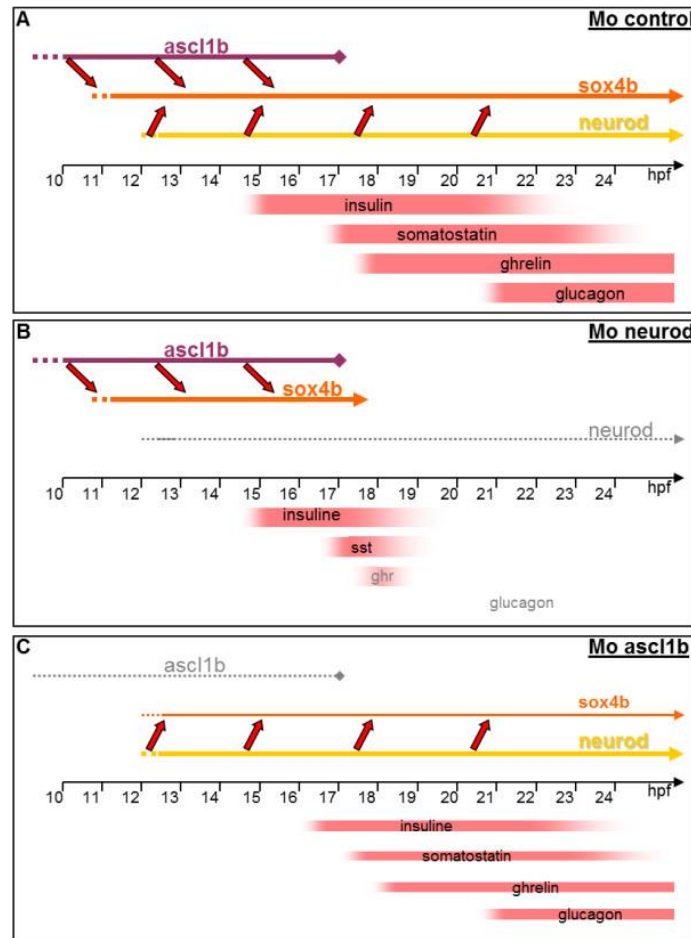


Figure 24 : Modèle décrivant le rôle d'Ascl1b et de Neurod1 dans la différenciation pancréatique endocrine. (A) : Dans les embryons WT, Ascl1b initie l'expression de *sox4b* dans les précurseurs endocrines à 11hpf. L'expression de *neurod1* démarre à 12hpf. Ce facteur maintient l'expression de *sox4b* dans les précurseurs. La différenciation des différents types endocrines peut avoir lieu. (B) Dans les morphants *neurod1*, Ascl1b initie l'expression de *sox4b* dans les précurseurs endocrines à 11hpf et maintient l'expression de *sox4b* jusqu'à 17hpf. Ensuite, l'expression d'*ascl1b* s'éteint et l'expression de *sox4b* n'est plus maintenue. La différenciation des cellules endocrines apparaissant après 17hpf est bloquée. (C) Dans les morphants *ascl1b*, l'expression de *sox4b* n'est pas initiée à 11hpf. Neurod1 initie l'expression de *sox4b* à 12hpf dans un nombre réduit de précurseurs. D'après [1].

4.1.2.2. Sox4b

Sox4b appartient à la famille des *SRY-like HMG*-box (SOX). L'expression de ce facteur débute dans l'endoderme pancréatique vers 11hpf [80]. Sox4b est exprimé dans les précurseurs de la lignée endocrine [1, 80, 95]. Dans les cellules endocrines matures, il n'est par contre pas ou presque pas exprimé (selon le type cellulaire) [80]. D'un point de vue fonctionnel, bien que Sox4b soit exprimé dans tous les précurseurs endocrines, il n'agit que sur la différenciation des cellules produisant le glucagon. En effet, le « Knock-down » de *sox4b* induit juste une diminution drastique des cellules exprimant le glucagon, le nombre de cellules produisant l'insuline et la somatostatine n'étant pas modifié [80].

4.1.2.3. Les facteurs de la famille des NKX6.

Deux autres facteurs de transcription sont aussi exprimés dans l'endoderme pancréatique (**Figure 25**) dès le stade 4S, soit 1h après le début de l'expression d'*ascl1b* et 1h avant le début de l'expression de *neurod1* (**Figure 13**). Il s'agit des facteurs de transcription Nkx6.1 et Nkx6.2. Ces deux facteurs ont des profils d'expression qui sont au départ très similaires (**Figure 25**). Puis, au cours de la formation du bourgeon pancréatique dorsal, le domaine d'expression de *nkx6.2* se sépare progressivement du domaine d'expression de *nkx6.1*. A 18 somites, ils ne sont plus exprimés dans les mêmes cellules, *nkx6.1* étant exprimé dans un domaine plus ventral que celui de *nkx6.2*. Cette ségrégation n'est pas ici la conséquence d'une répression mutuelle entre Nkx6.1 et Nkx6.2 puisque l'inactivation de l'un des deux gènes *nkx6* n'affecte pas l'expression de l'autre gène [3].

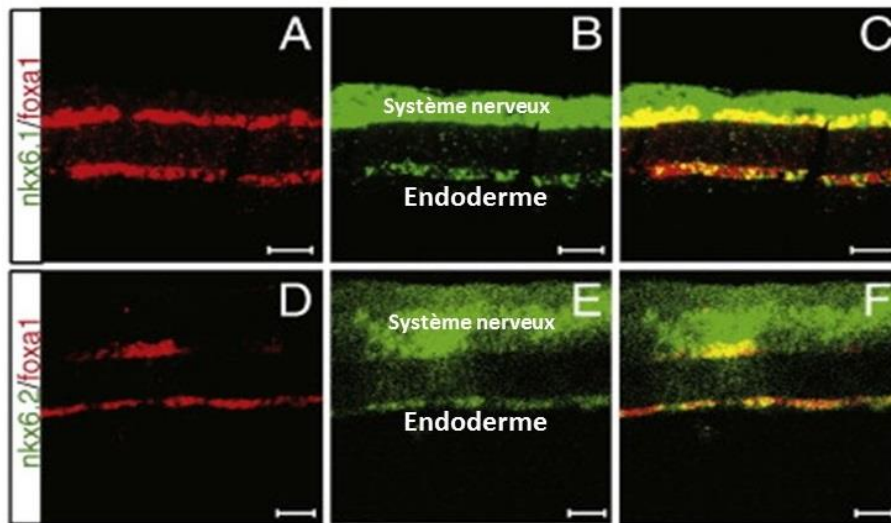


Figure 25 : Profil d'expression de *nkx6.1* et de *nkx6.2* dans l'endoderme à 12hpf. *nkx6.1* (A-C) et *nkx6.2* (D-F) sont tous les deux exprimés dans l'endoderme. L'endoderme est visualisé ici par l'expression de *foxa1*. D'après [1, 3].

4.1.2.3.1. Généralités :

La famille des gènes Nkx6 contient 3 gènes qui codent respectivement pour les facteurs de transcription Nkx6.1, Nkx6.2 et Nkx6.3. Ces trois facteurs sont caractérisés par la présence de trois domaines spécifiques (**Figure 26**) :

- Un homéodomaine (**Figure 26**) d'environ 60 aa qui est composé de 3 hélices alpha reliées entre elles par de courtes boucles (**Figure 27**). Les deux dernières hélices (n°2 et n°3) forment une conformation hélice-tour-hélice (HTH : helix-turn-helix). Les deux premières hélices (n°1 et n°2) sont orientées de façon antiparallèle alors que la troisième hélice se place de façon perpendiculaire par rapport aux deux autres (**Figure 27**). La troisième hélice est l'hélice de reconnaissance qui interagit avec le grand sillon de l'ADN. La première hélice possède en plus un bras N-terminal qui entre en contact avec le petit sillon adjacent de l'ADN [104-106] (**Figure 27**).

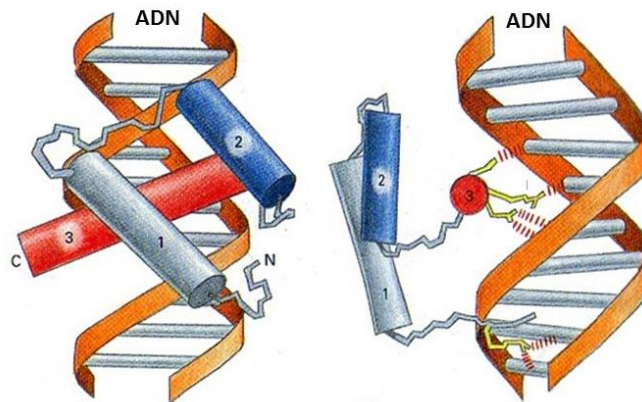


Figure 27 : Représentation schématique de deux vues différentes montrant un homéodomaine interagissant avec l'ADN. Les hélices alpha sont représentées par des cylindres. Elles sont reliées entre elles par de courtes boucles. D'après : <https://classconnection.s3.amazonaws.com/295/flashcards/3044295/png/capture-13E86DE4DBD5010E488.png>

- Un domaine BID (« DNA binding interference ») d'environ 20 aa (**Figure 26**) localisé dans le domaine C-terminal. Ce domaine module l'activité de liaison à l'ADN des facteurs Nkx6 en diminuant l'affinité intrinsèque de leur homéodomaine pour l'ADN. En effet, une mutation dans ce domaine augmente l'affinité de liaison à l'ADN. Mirmira et al. pensent

que pour que les facteurs Nkx6 puissent agir, le domaine BID interagierait avec d'autres protéines, ce qui éliminerait son activité répressive [107].

- Un domaine TN (ou NK décapeptide) d'environ 10 aa présent dans leur domaine NH2-terminal (**Figure 26**). Ce domaine présente des similarités de séquences avec le domaine eh1 (engrailed homology-1) de la protéine répresseur Engrailed (En) [108]. Le domaine NK est nécessaire pour la fonction répresseur des facteurs Nkx6. Cette activité semble s'effectuer par le recrutement des membres de la famille des co-répresseurs Groucho (Gro/TLE) qui interagissent avec le domaine NK [107, 108].

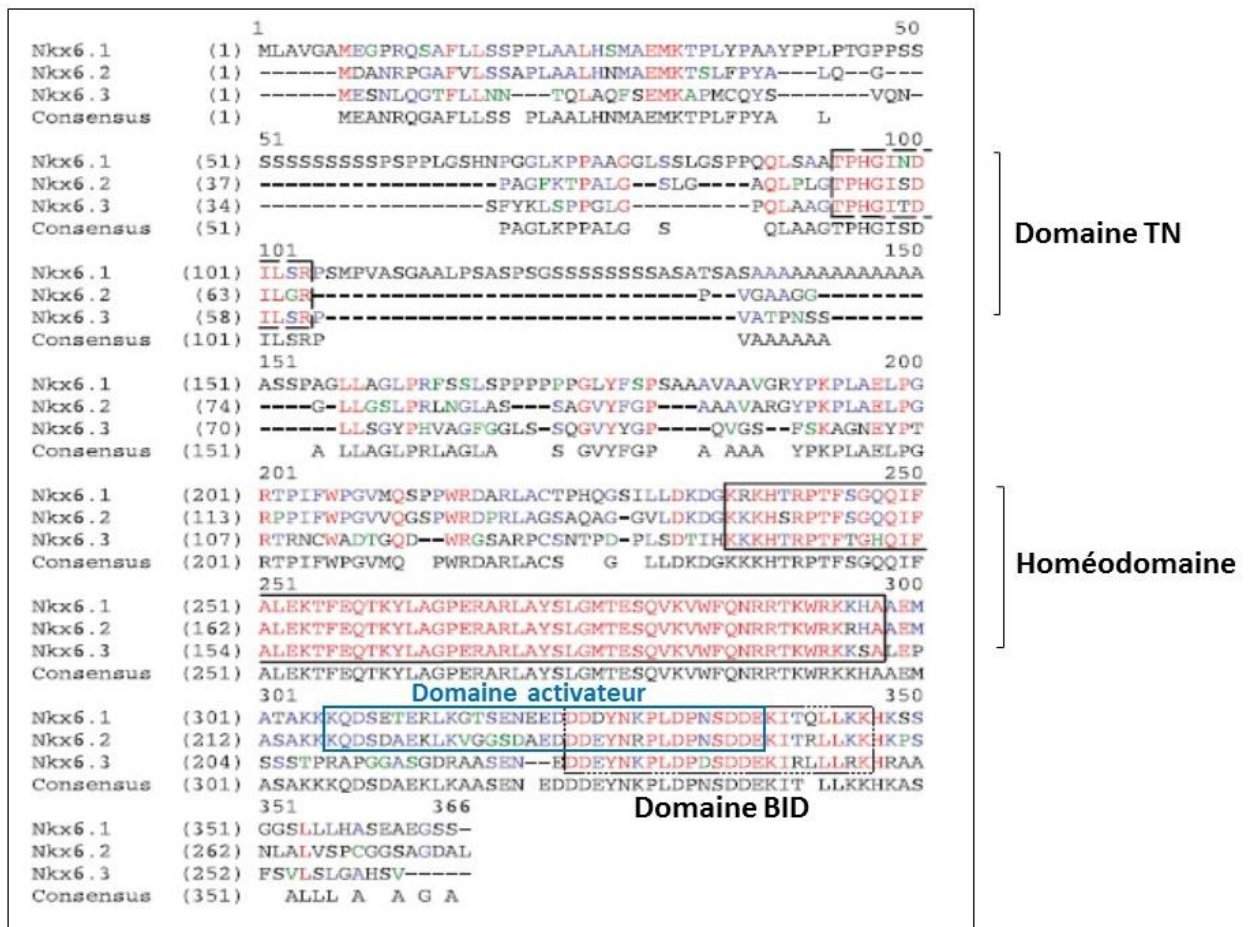


Figure 26: Alignement des séquences de Nkx6.1, Nkx6.2 et Nkx6.3. Le domaine NK, l'homéodomaine, le domaine BID (en noir) et le domaine activateur (en bleu) sont encadrés. Le domaine activateur se superpose partiellement au domaine BID. D'après [4].

En plus de son activité répresseur, Nkx6.1 contient aussi un domaine activateur localisé entre l'aa306 et aa338 dans le domaine C-terminal. Le domaine activateur se superpose partiellement au domaine BID (aa324 à aa346) et requiert pour une activité maximale une partie de l'homéodomaine. Par exemple, il est capable d'activer sa propre expression [14] (**Figure 26**).

Une analyse microarrays réalisée sur des îlots endocrines de rats supporte le rôle d'activateur et de répresseur de Nkx6.1. Dans cette étude, ils ont montré qu'une surexpression de *Nkx6.1* conduit, à une réduction de l'expression de 187 gènes et à une augmentation de l'expression de 156 gènes [109].

Sur base des différents résultats, Iype et al. ont élaboré un modèle (**Figure 28**) où la séquence d'ADN des gènes cibles reconnue par Nkx6.1 déterminerait si ce facteur a un rôle répresseur ou un rôle activateur : Ainsi, quand la séquence d'ADN reconnue par Nkx6.1 contient TAAT ou ATTA, il se lie à l'ADN et cause la répression de la transcription des gènes cibles grâce à son domaine N-terminal [107, 108]. Si la séquence d'ADN (ATTT) reconnue par le facteur est à proximité d'une région riche en G/C (comme c'est le cas pour le gène Nkx6.1), Nkx6.1 cause l'activation de la transcription des gènes cibles grâce via son domaine C-terminal [14]. De par leur forte homologie, il est fort probable que Nkx6.2 agisse comme Nkx6.1. Par exemple, chez la souris, NKX6.1 et NKX6.2 peuvent avoir une activité biologique similaire. Ainsi, les deux facteurs peuvent induire la formation des motoneurones : une expression ectopique de *Nkx6.1* ou *Nkx6.2* dans le tube neural induit la formation des motoneurones, alors que seul le facteur NKX6.1 est normalement requis pour le développement des motoneurones [110].

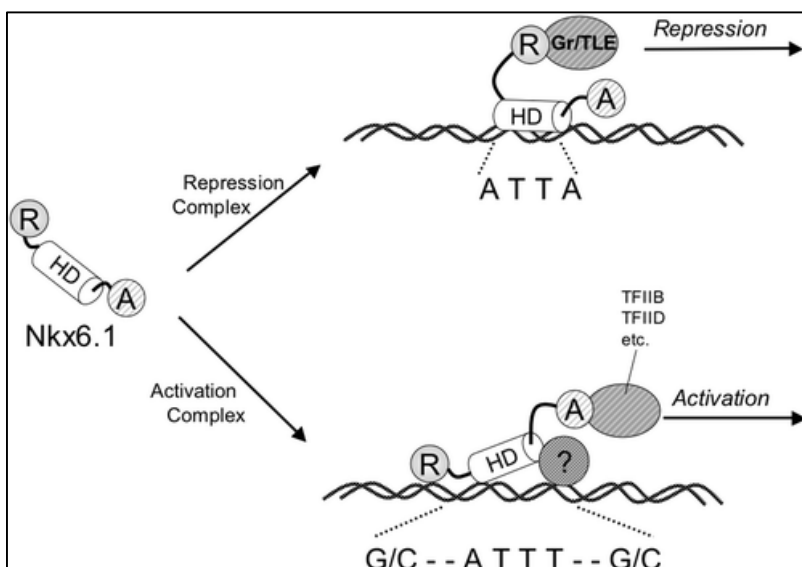


Figure 28: Modèle décrivant le mode d'action de Nkx6.1. Nkx6.1, représenté schématiquement, contient un domaine répressif TN (R) localisé dans sa partie NH2-terminal, un homéodomaine (HD) et un domaine activateur (A) qui localisé dans la région COOH-terminal. Si Nkx6.1 reconnaît la séquence d'ADN « ATTA », il interagit avec le corépresseur Gro/TLE via son domaine répressif et cause la répression des gènes cibles. Si Nkx6.1 reconnaît une séquence d'ADN (ATTT) qui se situe à proximité d'une séquence riche en GC, il interagit avec des composants de la machinerie transcriptionnelle basale via son domaine activateur et induit l'activation des gènes cibles. La liaison à l'ADN peut être facilitée par l'interaction avec d'autres facteurs de transcription. D'après [14].

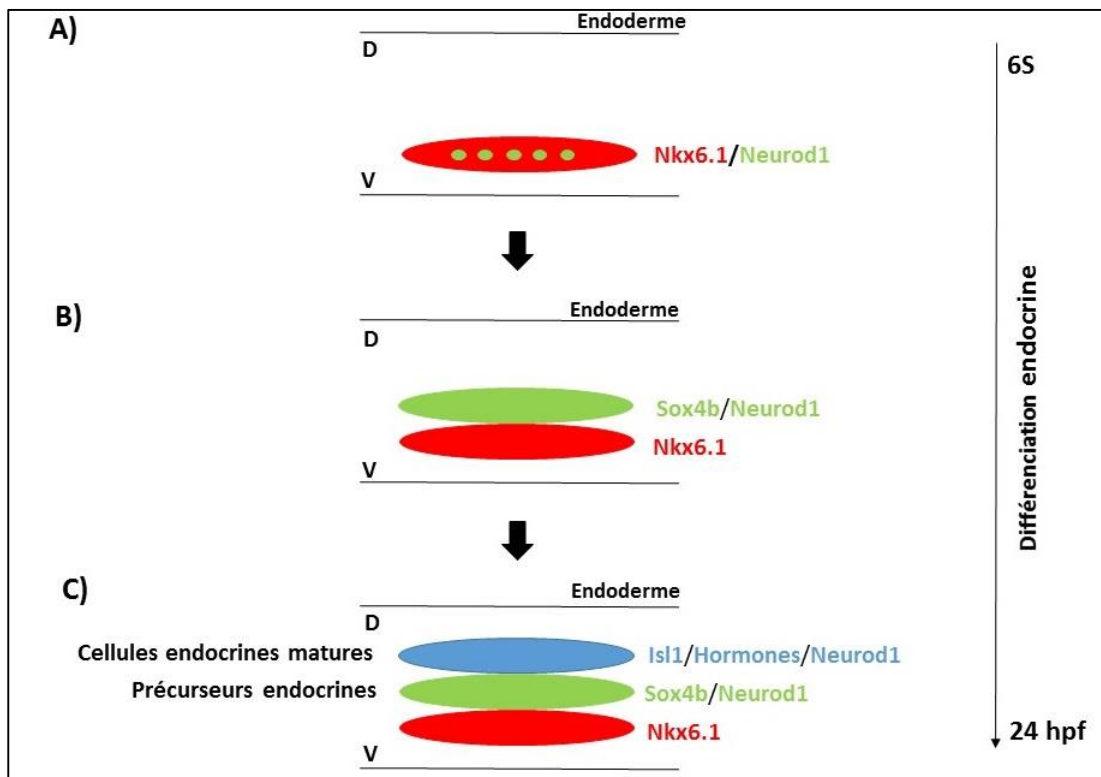


Figure 29: Représentation schématique d'une vue latérale de l'endoderme pancréatique à 12hpf (6S) (A), 15hpf (12S)(B) et 24hpf (C). (A) *Nkx6.1* colocalise avec *Neurod1* à 6S. (B) *Nkx6.1* est exprimé à la base des cellules exprimant *Neurod1* et *Sox4b*. (C) Les cellules exprimant *Nkx6.1* sont localisées plus ventralement que les cellules endocrines matures et les précurseurs endocrines à 24hpf. D, Dorsal ; V, ventral [3].

4.1.2.3.2. Profil d'expression de Nkx6.1 et Nkx6.2 dans le bourgeon pancréatique dorsal

- **Nkx6.1**

nkx6.1 est exprimé dès le début de la formation du bourgeon pancréatique dorsal dans les premières cellules de la lignée endocrine. En effet, à 12hpf (6 somites), *nkx6.1* colocalise avec *neurod1* (**Figure 29A**). Cependant, très rapidement, les deux domaines d'expression se séparent et les cellules qui expriment *neurod1* et qui entrent en différenciation endocrine, migrent vers la partie dorsale de l'endoderme (**Figure 29B**). A 24 hpf, *nkx6.1* est localisé à la base de *neurod1* qui à ce stade marque les précurseurs endocrines et les cellules endocrines matures (**Figure 29C**). De façon intéressante, une organisation en multicouches [3, 95] dont le niveau de différenciation varie en fonction de la localisation dorso-ventrale des cellules pancréatiques est observée à 24hpf. Ainsi, les cellules endocrines différenciées marquées par *isl1* ou encore par les hormones pancréatiques sont localisées dans la partie dorsale de l'endoderme tandis que les précurseurs endocrines marqués par *sox4b* sont dans la partie ventrale de l'endoderme pancréatique. *nkx6.1* est, quant à lui, localisé encore plus ventralement que les précurseurs endocrines (**Figure 29C**). Cette organisation en multicouches amène l'hypothèse d'un processus de migration dans l'endoderme où les cellules pancréatiques migreraient dorsalement tout en se différenciant au cours de la formation de l'îlot endocrine.

- **Nkx6.2**

Contrairement à *nkx6.1*, *nkx6.2* reste exprimé dans une sous-population de cellules de la lignée endocrine au cours de la somitogenèse. A 24hpf, le transcrit de *nkx6.2* est toujours détectable dans l'îlot endocrine en formation mais son expression se retreint aux cellules endocrines productrices d'insuline.

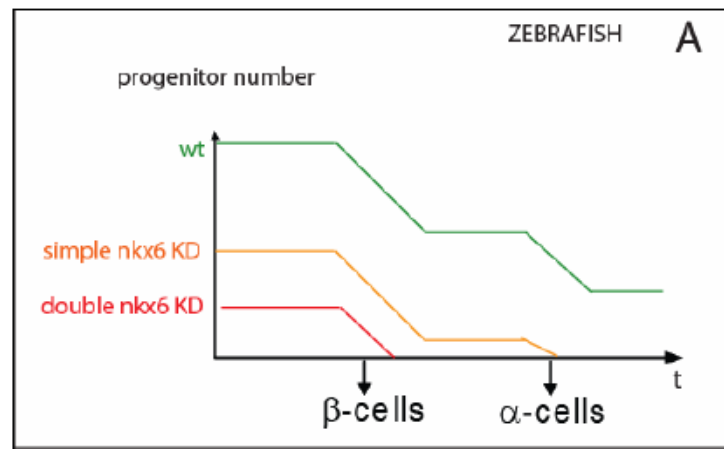


Figure 30 : Modèle décrivant le rôle de Nkx6.1 et Nkx6.2 dans la différenciation endocrine. Dans les embryons WT, le pool de progéniteurs est complet, permettant la différenciation de toutes les cellules endocrines. Quand l'expression de l'un des deux gènes est affectée (en orange), le nombre de progéniteurs diminue et la différenciation des premières cellules endocrines (les cellules bêta) épuise le pool de progéniteurs déjà diminué. Il n'y a donc pas assez de progéniteurs pour permettre la différenciation des dernières cellules endocrines (les cellules exprimant le glucagon). L'inactivation des deux gènes (en rouge) conduit à une réduction encore plus sévère des progéniteurs et il n'y a donc pas assez de progéniteurs pour permettre la différenciation des premières cellules endocrines. D'après [3].

4.1.2.3.3. Fonction de nkx6.1 et nkx6.2 dans la différenciation endocrine

D'un point de vue fonctionnel, une inactivation de l'un des deux facteurs (Nkx6.1 ou Nkx6.2) mène à une très forte réduction des cellules exprimant le glucagon. Une perte de fonction des deux gènes conduit toujours à une perte des cellules exprimant le glucagon et mais aussi à une diminution des cellules exprimant l'insuline [3].

En analysant le rôle des facteurs Nkx6 dans les premières étapes de la différenciation des cellules endocrine, Binot a constaté que l'inactivation de l'un des deux facteurs ou des deux facteurs mène à une réduction du pool de progéniteurs pancréatiques [3] et l'importance de cette diminution varie avec le niveau total des facteurs nkx6 dans les progéniteurs pancréatiques. Elle est en effet plus importante quand les deux facteurs sont inactivés. Dans le bourgeon dorsal, en agissant sur l'établissement ou la maintenance du pool de progéniteurs, Nkx6.1 et Nkx6.2 contrôlent indirectement la différenciation des cellules exprimant l'insuline et le glucagon. [3].

Sur base des résultats obtenus, un modèle a été élaboré (**Figure 30**). Ainsi, quand un des deux facteurs est inactivé, le pool de progéniteurs est réduit. Il s'épuise donc plus vite et il n'y a plus assez de progéniteurs pour permettre la différenciation des cellules exprimant le glucagon (qui sont les dernières cellules endocrines à apparaître). (**Figure 30 ligne ; orange**). Dans le double knock-down Nkx6.1/Nkx6.2., le pool de progéniteurs est encore plus réduit et s'épuise donc encore plus rapidement. Dans ce cas-là, il n'y a même plus assez de progéniteurs pour permettre la différenciation de toutes les cellules exprimant l'insuline (qui sont les premières cellules endocrines à apparaître) (**Figure 30 ; ligne rouge**). Cependant, ce modèle soulève l'existence d'un pool de progéniteurs spécifiques pour les cellules produisant l'insuline et le glucagon puisqu'on n'observe pas de réduction des cellules exprimant la somatostatine [3].

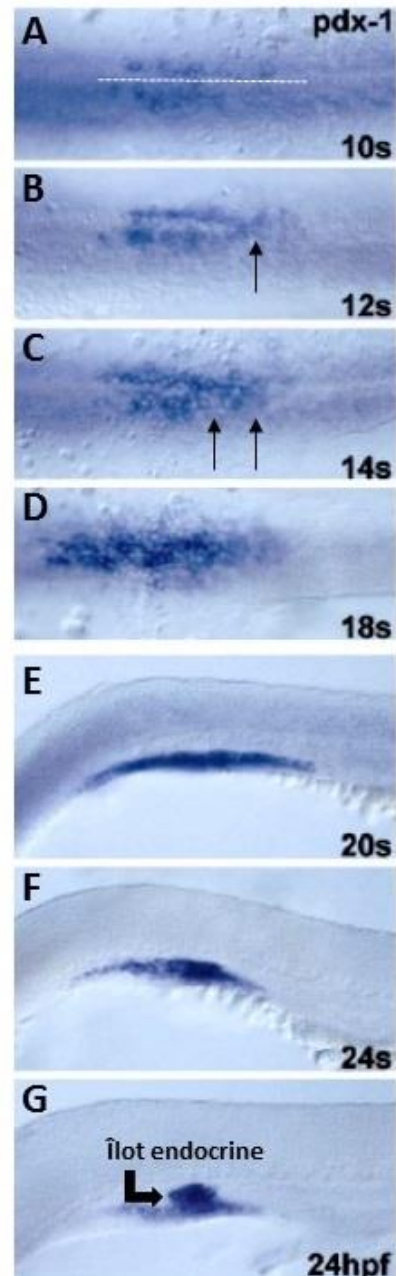


Figure 31 : Profil d'expression de Pdx1 par ISH. (A-G) Expression de Pdx1 dans le bourgeon pancréatique dorsal. La ligne médiane est représentée en pointillé. Les deux domaines d'expression de Pdx1 vont fusionner postérieurement au niveau de la ligne médiane (B-C, flèches noires). D'après [6].

4.1.2.4. Pdx1

Pdx-1 code pour un facteur de transcription à homéodomaine. Son expression débute dans l'endoderme à 14hpf (10S) et marque deux domaines de cellules séparés par la ligne médiane (**Figure 31A**). A 12S, dans le bourgeon pancréatique dorsal, les deux domaines d'expression de *pdx1* commencent à converger vers la ligne médiane. Cette fusion est d'abord initiée postérieurement (**Figure 31B-C, flèches**). Et à 18S (18hpf), Pdx1 ne marque plus qu'un seul domaine d'expression au niveau de la ligne médiane (**Figure 31D**). Ensuite, une partie des cellules exprimant *pdx1* migre dorsalement pour venir former l'îlot principal (=îlot de Langerhans) à 24hpf (**Figure 31E-G**). Les cellules endocrines matures (qui expriment les hormones pancréatiques) sont localisées dans la partie dorsale du domaine d'expression de *pdx1* (**Figure 31G**) [6]. Après 24hpf, *pdx1* reste exprimé dans le bourgeon pancréatique dorsal.

C'est l'analyse de l'expression de *pdx1* qui a permis de mieux comprendre le déplacement des précurseurs endocrines qui contribuent à la mise en place de l'îlot de Langerhans.

D'un point de vue fonctionnel, Pdx1 joue un rôle important dans la formation du pancréas. En effet, une inactivation de ce facteur par l'injection de morpholinos oligonucléotides entraîne une réduction de toutes les cellules endocrines du bourgeon pancréatique dorsal [74, 111, 112].

4.2. Différenciation des cellules exocrines et endocrines du bourgeon pancréatique ventral

Morphologiquement, le bourgeon pancréatique ventral, qui apparaît plus antérieur au bourgeon dorsal, est visible à 40hpf (**Figure 32A**). Ce bourgeon donne naissance aux cellules exocrines (cellules acinaires et cellules canalaire) et à des cellules endocrines qui émergent au niveau des canaux pancréatiques. Les deux bourgeons pancréatiques fusionnent à 52hpf (**Figure 32B**) pour former le pancréas constitué par l'îlot de Langerhans et entouré par le tissu exocrine.

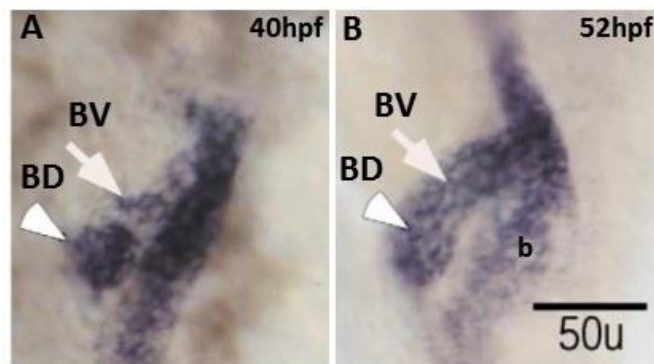


Figure 32: Visualisation du bourgeon pancréatique dorsal (BD, tête de flèche) et ventral (BV, flèches) par l'expression de Pdx1. (A) Le bourgeon pancréatique ventral, visible à 40hpf, se situe antérieurement au bourgeon dorsal (B) Les deux bourgeons fusionnent à 52hpf. b, le bulbe intestinal (b) D'après [17].

D'un point de vue moléculaire, c'est aussi une action combinée de nombreux facteurs de transcription qui coordonnent le programme de différenciation des cellules exocrines et endocrines du bourgeon pancréatique ventral.

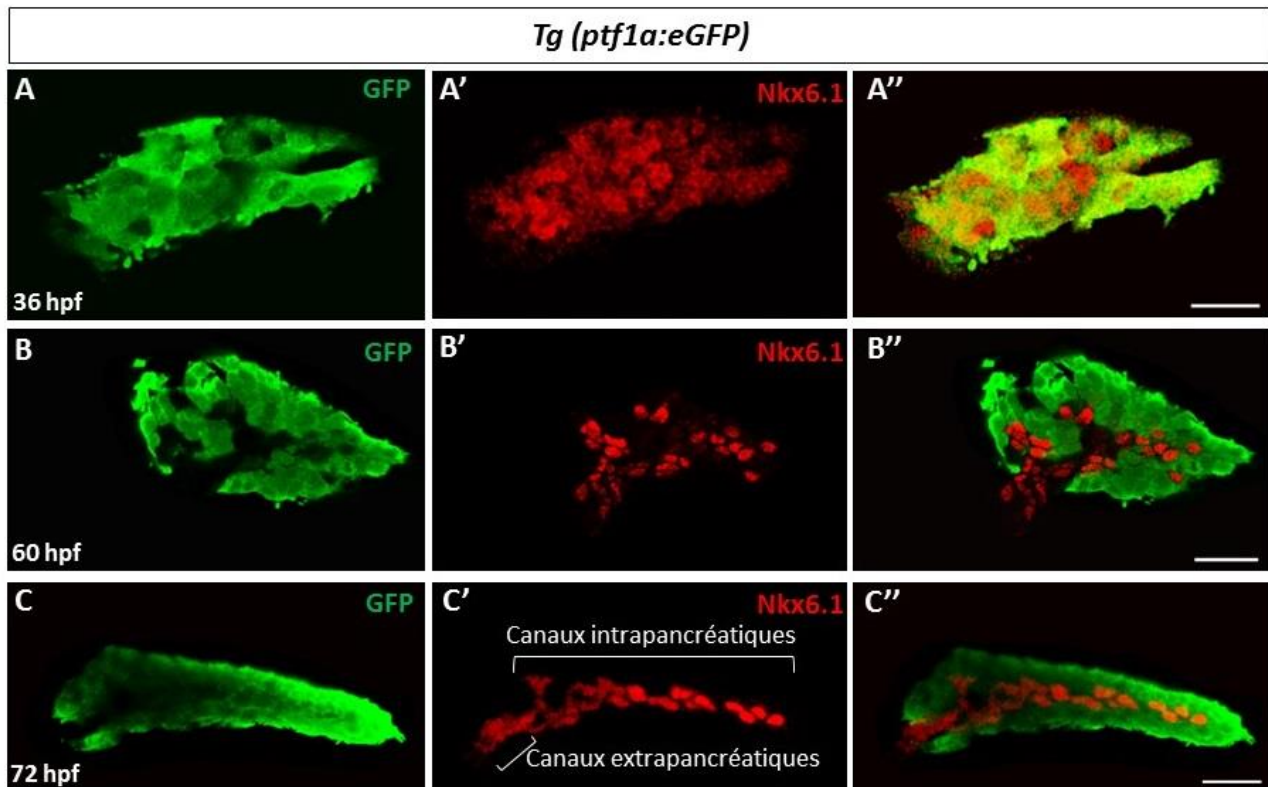


Figure 33: Profil d'expression de Nkx6.1 dans le bourgeon pancréatique ventral. (A) A 36hpf, Nkx6.1 est exprimé dans les cellules du bourgeon ventral marquées par l'expression de Ptf1a. (B) A 60hpf, Ptf1a et Nkx6.1 ne colocalisent plus. Ptf1a marquent les cellules de la lignée acinaire et Nkx6.1 les cellules de la lignée canalaire. (C) A 72hpf, Nkx6.1 est exprimé dans les canaux intra-pancréatiques et extra-pancréatiques (données personnelles).

4.2.1. Différenciation des cellules acinaires et canalaire du bourgeon pancréatique ventral

Les premiers facteurs de transcription détectables dès le début de la formation du bourgeon pancréatique ventral sont notamment *Ptf1a*, *Nkx6.1* et *Sox9b*.

4.2.1.1. *Nkx6.1* et *Ptf1a* :

Nkx6.1 et *Ptf1a* sont exprimés dès le début de la formation du bourgeon pancréatique ventral à 32hpf. Cette colocalisation persiste pendant quelques heures (**Figure 33A**) ([113] ; données personnelles). Les cellules du bourgeon ventral se séparent ensuite en deux populations de cellules : les cellules de la lignée acinaire marquées par *Ptf1a* et les cellules de la lignée canalaire marquées par *Nkx6.1*. (**Figure 33B**) ([113], données personnelles). A 72hpf, *Nkx6.1*, entouré par le tissu acinaire marqué par *Ptf1a*, reste exprimé dans les canaux intrapancréatiques et extrapancréatiques ([62, 114], données personnelles) (**Figure 33C**).

Chez le poisson-zèbre, nous ne savons pas par quels mécanismes les cellules du bourgeon pancréatique ventral se séparent en deux populations de cellules : les cellules de la lignée canalaire marquées par *Nkx6.1* et les cellules de la lignée acinaire marquées par *Ptf1a*. Chez la souris, on a une séparation identique. Des expériences de perte et de gain de fonction ont montré que ce sont des interactions antagonistes entre les facteurs de transcription *NKX6* et *PTF1A* qui séparent les progéniteurs pancréatiques multipotents en deux populations de cellules : les progéniteurs des cellules endocrines et canalaire (*Nkx6.1+/Ptf1a-/Sox9+*) localisés dans la région du tronc et les progéniteurs des cellules acinaires (*Nkx6.1-/Ptf1a+/Sox9-*) localisés aux extrémités des structures branchées de l'épithélium pancréatique en croissance (**Figure 34A-B**) [5, 9, 22].

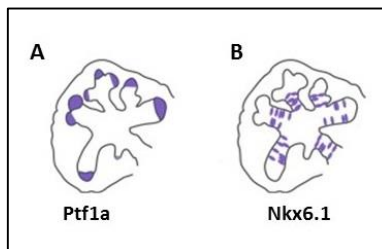


Figure 34 : Représentation schématique du domaine d'expression de *Ptf1a* et de *Nkx6.1* dans l'épithélium pancréatique en croissance à E14.5. *Ptf1a* est restreint à l'extrémité de l'épithélium pancréatique en croissance (A) et *Nkx6.1*, au domaine du tronc (B) après séparation. D'après [5].

En effet, une inactivation de *Nkx6.1* ou de *Nkx6.1* et *Nkx6.2* mène donc à une expression ectopique de *Ptf1a* dans la région du tronc. Inversement, une surexpression du gène *Nkx6.1* ou *Nkx6.2* sous le contrôle du promoteur du gène *Pdx-1* réprime l'expression de *Ptf1a* et empêche la différenciation acinaire. Cette surexpression n'induit cependant pas une différenciation endocrine accélérée. De la même façon, une expression ectopique de *Ptf1a* dans l'épithélium pancréatique *Pdx1+* bloque l'expression des gènes du tronc (*Nkx6.1*, *Sox9* ou *Ngn3*) et empêche la différenciation endocrine mais par contre n'induit pas une différenciation acinaire prématurée [9].

Ces résultats suggèrent que la fonction première des facteurs NKX6 et PTF1A chez la souris serait d'abord de déterminer le destin cellulaire en dirigeant les progéniteurs multipotents vers un destin acinaire (extrémité de l'épithélium pancréatique en croissance) ou endocrine/canalaire (tronc) et non d'initier la différenciation des cellules pancréatiques [9].

Comme montré précédemment, les facteurs NKX6 peuvent fonctionner comme des répresseurs transcriptionnels (Cf : 4.1.2.2.1.) [14, 107, 108]. L'équipe de Sander a montré que la répression de la transcription du gène *Ptf1a* peut directement être régulée par le facteur de transcription NKX6.1. Ils ont, en effet, identifié dans un enhancer de 2.3kb (situé en amont du site d'initiation de la transcription de *Ptf1a*) 8 sites de liaison pour le facteur de transcription NKX6.1 (**Figure 35**). Les expériences d'immunoprécipitation de chromatine (CHIP) et de co-transfection ont montré d'une part que c'est sur le site de liaison E5 de l'enhancer de *Ptf1a* que NKX6.1 se lie et d'autre part qu'il peut, en effet, réprimer la transcription du gène PTF1A. NKX6.2 peut aussi réprimer *Ptf1a* mais moins fortement que NKX6.1 [9]. Par contre, PTF1A est plutôt connu comme étant un activateur transcriptionnel, et il semble donc moins probable que PTF1A réprime directement la transcription du gène *Nkx6.1* [2, 115, 116].

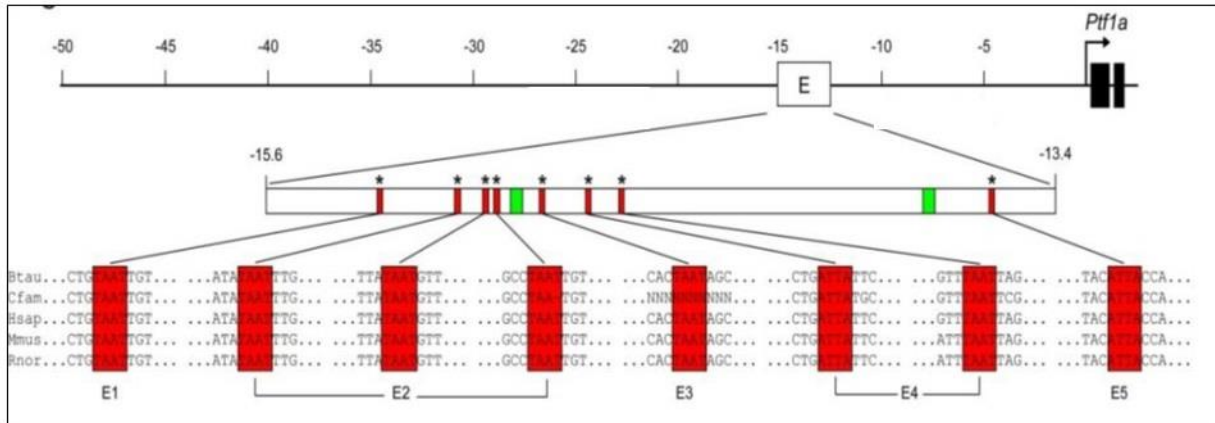


Figure 35 : Représentation schématique d'une région de 50kb située directement en amont du gène *Ptf1a*. L'enhancer contient deux sites de liaison pour *Ptf1a* (boite verte) [1, 2] et 8 sites potentiels de liaison pour le facteur de transcription NKX6.1 (boites rouges). D'après [9].

Il a également été montré que chez la souris la voie de signalisation Notch contrôle la répression mutuelle entre PTF1A et NKX6.1 dans les progéniteurs multipotents en régulant l'expression de *Nkx6.1*. Ainsi, une surexpression de la voie Notch favorise l'expression de *Nkx6.1* et exclut l'expression de *Ptf1a* dans les progéniteurs pancréatiques [9]. Inversement, l'inactivation de cette voie entraîne une perte de l'expression de *Nkx6.1* dans le tronc [117]. L'équipe de Jensen a montré par des expériences d'immunoprécipitations (Chip-seq) que la voie de signalisation Notch (via RBJ-jK) peut activer directement l'expression de *Nkx6.1* à E12.5 et E15.5 mais plus à E17.5. Le contrôle de l'expression de *Nkx6.1* par la voie de signalisation Notch semble donc limité dans le temps [117].

Chez le poisson-zèbre, d'un point de vue fonctionnel, une inactivation de *Ptf1a* par l'injection de morpholinos oligonucléotides entraîne une perte complète des cellules acinaires [118]. L'effet sur les cellules canaliculaires n'a cependant pas été montré. Récemment, Dong et al. ont aussi découvert que le niveau de *Ptf1a* semble avoir une influence sur le destin des cellules du bourgeon ventral. Les cellules avec un haut niveau de *Ptf1a* adoptent un destin exocrine alors que celles qui ont un faible niveau de *Ptf1a* opteront pour un destin endocrine [114]. Le rôle de *Nkx6.1* dans le bourgeon pancréatique ventral n'est par contre pas encore connu.

4.2.1.2. Sox9b :

Sox9b est exprimé dans le bourgeon pancréatique ventral et le bourgeon hépatique [62] (32hpf). Le profil d'expression de Sox9b dans la région pancréatique est vraiment très similaire à celui de Nkx6.1. En effet, comme Nkx6.1, Sox9b est exprimé dans les cellules du bourgeon ventral à 32hpf. A 48hpf, il est exprimé dans les progéniteurs des canaux pancréatiques et hépatiques. A la fin de l'embryogenèse (72hpf), l'expression Sox9b persiste dans la lignée canalaire où il marque tous les canaux pancréatiques (intra et extrapancréatiques), comme Nkx6.1, et tous les canaux hépatiques (intra et extrahépatiques) [62]. Chez la larve, la maintenance de l'expression de *sox9b* dans les canaux extrapancréatiques et intrapancréatiques requiert respectivement la voie de signalisation FGF et la voie de signalisation Notch [62], deux voies connues pour empêcher une différenciation endocrine excessive dans les canaux pancréatiques [19, 76].

D'un point de vue fonctionnel, le mutant *sox9b*^{-/-} présente un pancréas de taille et de morphologie normal. Son inactivation n'affecte pas la spécification du pancréas, la différenciation des cellules acinaires et la formation de l'îlot endocrine principal provenant du bourgeon pancréatique dorsal mais perturbe la formation des canaux hépatiques et pancréatiques. En effet, *sox9b* est requis pour la morphogénèse et la différenciation correcte des canaux hépatopancréatiques [62, 119]. Manfroid montrent également que les canaux pancréatiques marqués par *sox9b* sont nécessaires pour la formation des îlots endocrines secondaires et pour la régénération des cellules bêta après leur ablation ciblée [62].

4.2.2. Différenciation des cellules endocrines du bourgeon pancréatique ventral :

4.2.2.1. Voie de signalisation Notch :

Comme dans le bourgeon pancréatique dorsal, la voie de signalisation Notch contrôle la différenciation des cellules endocrines du bourgeon ventral qui émergent au niveau canaux pancréatiques [19, 20].

Pour faciliter l'étude de la voie de signalisation Notch dans la différenciation endocrine, l'équipe de Parsons a généré des lignées transgéniques *Tg(Tp1bglob:eGFP)* et *Tg(Tp1bglob:hmgb1-mCherry)* qui expriment la GFP ou la mCherry (particulièrement stable pour faire du traçage) sous la dépendance d'une séquence de régulation (Tp1) contenant plusieurs sites de liaison pour RBP-jk [19]. Ainsi, lorsque le fragment intracellulaire du récepteur Notch (NICD), lié à son cofacteur RBP-jk, se fixe sur les sites présents dans la séquence Tp1, la GFP (ou la mcherry) est exprimée. Les cellules dans lesquelles la voie de signalisation Notch est activée peuvent donc être suivies par l'expression de la GFP ou de mCherry. Ces cellules sont appelées les NRCs (Notch Responsive Cells).

Les travaux menés par Parsons *et al.* ont montré que l'inhibition de la voie de signalisation Notch, par un traitement au DAPT de 3dpf à 5dpf, conduit à une perte simultanée des NRCs (Notch Responsive Cells) et à une augmentation des cellules endocrines qui se regroupent pour former de petits îlots secondaires dans la queue du pancréas (**Figure 36**). Ces résultats suggèrent que les cellules des canaux pancréatiques répondant à la voie Notch (NRCs) représentent donc une population de cellules capables de donner naissance à des cellules endocrines [19].

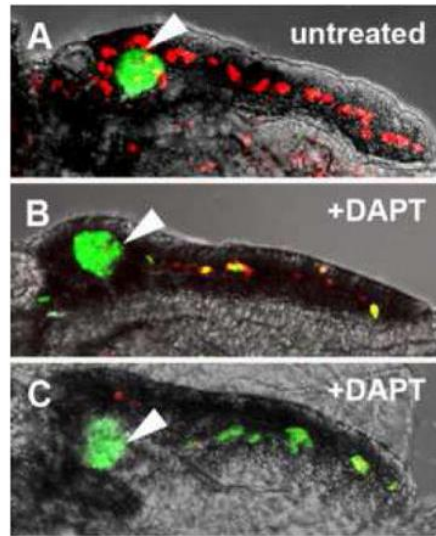


Figure 36: (A) Larve non traitée. Les NRCs entourent l'îlot principal (vert, flèche) et s'étendent postérieurement dans la queue du pancréas (rouge). (B-C) L'inactivation de la voie de signalisation Notch, par un traitement au DAPT de 3 à 5 jours, cause une perte concomitante des NRCs (en rouge) et une augmentation des cellules endocrines qui se regroupent pour former des îlots secondaires dans la queue du pancréas. D'après [19].

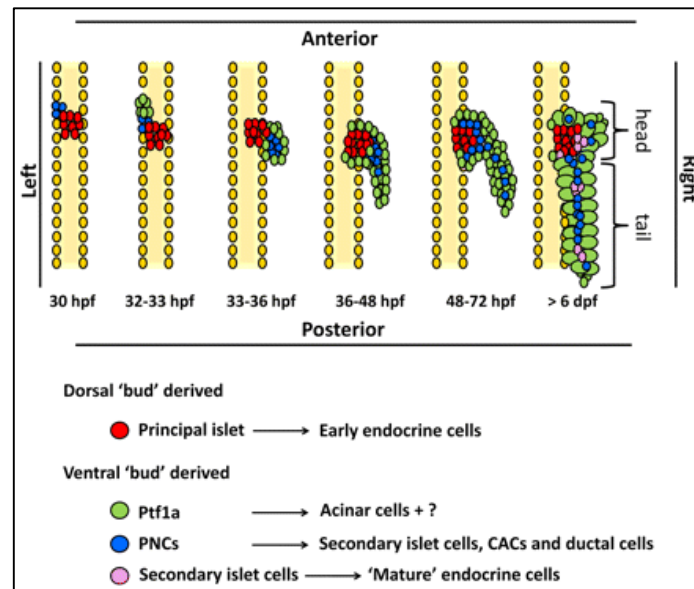


Figure 37 : Représentation schématique du pancréas exocrine en développement. Le bourgeon pancréatique ventral est composé de deux populations de cellules : une population de cellules exprimant *ptf1a* et une population de NRCs. Au cours du développement, les cellules Ptf1a+ migrent pour envelopper les NRCs. Les deux populations de cellules s'étendent après postérieurement pour former la queue du pancréas. Les cellules Ptf1a+ vont donner naissance aux cellules de la lignée acinaire et les NRCs vont donner naissance à des cellules canaliculaires et à des cellules endocrines qui vont se regrouper pour former des îlots secondaires dans la queue du pancréas. D'après [20].

Par des expériences de traçage de lignées en utilisant le système Cre/LoxP, l'équipe de Wang a démontré que les NRCs représentent une population de progéniteurs qui peut se différencier en plusieurs lignées incluant les cellules endocrines du bourgeon pancréatique dorsal et ventral, les cellules canalaire et les cellules centro-acinaires. Par contre, les NRCS ne donnent pas naissance aux cellules acinaires. En observant le début de la formation du bourgeon pancréatique ventral dans une double lignée transgénique Tg(*ptfla* :*eGFP* ; *Tp1bglob*:*hmgbl-mCherry*), ils ont constaté que *Ptf1a* et les NRCs ne colocalisent pas. D'après leurs résultats, le bourgeon pancréatique ventral serait alors composé de deux populations de cellules : une population de cellules exprimant *ptfla* et une population de NRCs (**Figure 37**) [20], ce qui expliquerait que les NRCs ne donnent pas naissance aux cellules acinaires. Cependant, ce modèle n'a pas été validé par nos résultats.

Ninov et al. ont également montré que les NRCs dans les canaux pancréatiques présentent des niveaux différents de Notch. Un haut niveau de Notch maintient les progéniteurs en quiescence alors qu'un faible niveau favorise leur prolifération. Une inhibition de la voie de signalisation Notch entraîne une prolifération des NRCs et puis leur différenciation en cellules endocrines [77].

4.2.2.2. Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules endocrines du bourgeon ventral

La différenciation des cellules endocrines du bourgeon ventral nécessite aussi une cascade régulatrice impliquant de nombreux facteurs de transcription. Cependant, contrairement au bourgeon dorsal, elle n'a été encore que très peu étudiée. Travailler sur la différenciation des cellules endocrines dans le bourgeon ventral est un peu plus compliqué que dans le bourgeon dorsal car elle n'est pas facilement détectable chez l'embryon et chez la larve [19]. Il faut la stimuler en bloquant la voie de signalisation Notch par un traitement au DAPT ou au LY411575 (inhibiteur de la γ -sécrétase). Par exemple, l'inactivation de Notch nous permet de détecter l'expression d'*ascl1b* et de *neurod1* dans la queue du pancréas (**Figure 38**) [1, 62, 74].

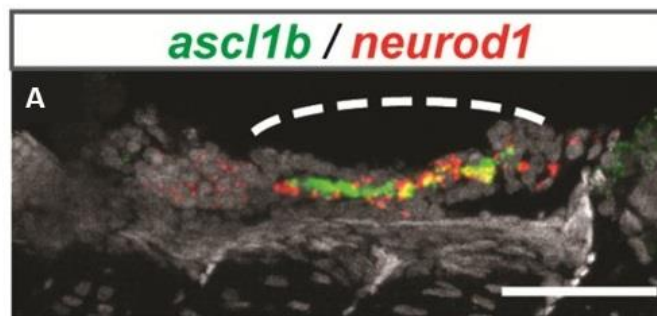


Figure 38 : La voie de signalisation réprime l'expression d'*ascl1b* et de *neurod1* dans le bourgeon pancréatique ventral. (A) Forte expression d'*ascl1b* et de *neurod1* dans les canaux intra-pancréatiques du bourgeon ventral après inhibition de la voie de signalisation Notch. La queue du pancréas est montrée par la ligne en pointillée [1].

5. Le but de la thèse

Les études sur le développement, la fonction et la régénération du pancréas sont non seulement intéressantes d'un point de vue fondamental mais également d'un point de vue thérapeutique étant donné qu'elles sont à la base de l'élaboration de traitements par thérapie cellulaire ou par médecine régénérative. Actuellement, bien que le diabète de type I puisse être contrôlé par des injections régulières d'insuline, ce traitement est loin d'être optimal et le défi auquel les chercheurs doivent maintenant faire face est de développer des stratégies permettant de remplacer les cellules β déficientes. La régénération *in vivo* constitue une approche thérapeutique intéressante puisqu'elle permettrait notamment d'éviter les problèmes liés aux allogreffes. Cependant, la régénération des cellules bêta chez les mammifères est peu efficace. Le poisson-zèbre représente, par contre, un modèle de choix pour étudier la régénération puisqu'il possède le remarquable pouvoir de régénérer rapidement et efficacement sa masse de cellules bêta après leur destruction ciblée [61]. Néanmoins, il est nécessaire de développer des outils qui permettraient d'identifier la source des nouvelles cellules bêta et qui faciliteraient l'identification des facteurs de transcription et les voies de signalisation impliqués dans la régénération des cellules bêta afin d'en comprendre les mécanismes.

Le but de mon doctorat s'inscrit dans cette démarche d'identification et de caractérisation chez le poisson-zèbre de progéniteurs pancréatiques multipotents qui donnent naissance à toutes les lignées pancréatiques incluant les cellules bêta. Afin de les identifier, il est donc essentiel de trouver des marqueurs spécifiques de ces cellules. Les travaux réalisés au laboratoire laissent à penser que les facteurs de transcription Nkx6.1 et Ascl1b pourraient être de bons candidats [1, 3]. En effet, le profil d'expression de Nkx6.1 doublé du fait que son inactivation entraîne une diminution du nombre du pool de progéniteurs pancréatiques [3] nous a conduit à formuler l'hypothèse qu'il pourrait être un élément clef des cellules multipotentes pancréatiques. D'autre part, Ascl1b, dont l'expression dans l'endoderme débute à 10hpf, semble être actuellement le premier marqueur pancréatique à être exprimé chez le poisson-zèbre (avant l'expression des premiers marqueurs pancréatiques connus que sont Nkx6.1, Pdx1, Neurod1) [1]. Cette observation soulève la possibilité d'une multipotentialité des premières cellules *ascl1b*+

Pour répondre à cette question, nous avons généré deux lignées transgéniques qui nous permettent de suivre le destin des cellules Nkx6.1+ et Ascl1b+. Nous avons également étudié leur interdépendance et leur relation avec la voie de signalisation Notch, qui joue un rôle important lors du développement pancréatique.

The page features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each with a darker blue center and a lighter blue outer ring. These circles are arranged in a descending sequence from top-right to bottom-right. Two thin, light blue lines intersect at the top-left corner, forming a large 'V' shape that frames the circles and the text.

Résultats

1. Destin des cellules pancréatiques *nkx6.1*⁺

Les expériences de destin cellulaire consistent à marquer toute cellule exprimant à un moment donné le facteur de transcription Nkx6.1. Pour réaliser cette expérience, nous avons voulu généré deux lignées transgéniques :

- Une lignée *Tg(nkx6.1:eGFP)* qui exprime la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) dans les cellules pancréatiques *nkx6.1*⁺
- Une lignée *Tg(nkx6.1:CreER^{T2})* qui exprime la recombinaise CRE inducible dans les cellules pancréatiques *nkx6.1*⁺.

Ce type d'expérience nécessitait au préalable d'identifier les régions génomiques du gène *nkx6.1* capables de diriger l'expression de la GFP et de la recombinaise CRE dans le pancréas. Ces éléments peuvent se trouver dans la région promotrice du gène et/ou dans des régions qui peuvent être situées à de grandes distances en aval ou en amont des régions transcrites.

1.1. Lignée transgénique Tg(*nkx6.1:eGFP*)

Afin de localiser les régions génomiques de *nkx6.1* dirigeant son expression dans le pancréas, nous avons recherché des régions conservées en comparant la séquence chez le poisson-zèbre avec celle de l'homme, du xénope et du poisson fugu. Dix séquences conservées entre espèces ont été identifiées loin en aval du gène, la première se situant à 11kb du gène et la dernière à 77Kb (**Figure 1**). Le gène qui suit ces séquences n'est pas conservé. Ces séquences non codantes conservées peuvent donc correspondre à des régions régulatrices impliquées dans la régulation du gène *nkx6.1*. Afin d'obtenir une lignée transgénique qui nous permet de récapituler l'expression endogène de Nkx6.1 dans le pancréas, deux stratégies ont été envisagées. Dans la première stratégie, nous avons cloné deux régions génomiques dans deux constructions différentes (le promoteur du gène dans la première et une région de 3kb contenant 2 des 11 séquences conservées dans la deuxième) afin de déterminer si elles étaient capables à elles seules de diriger l'expression de la GFP selon un profil pancréatique similaire à celui de la protéine endogène Nkx6.1. Dans la deuxième stratégie, nous avons utilisé dans un BAC (Bacterial artificial chromosome) contenant tout le locus du gène *nkx6.1*. Nous avons inséré, par recombinaison homologue, au niveau de son site d'initiation de la traduction, la région codante de la *GFP* pour qu'elle soit de cette façon sous le contrôle de tous les éléments régulateurs de *nkx6.1*.

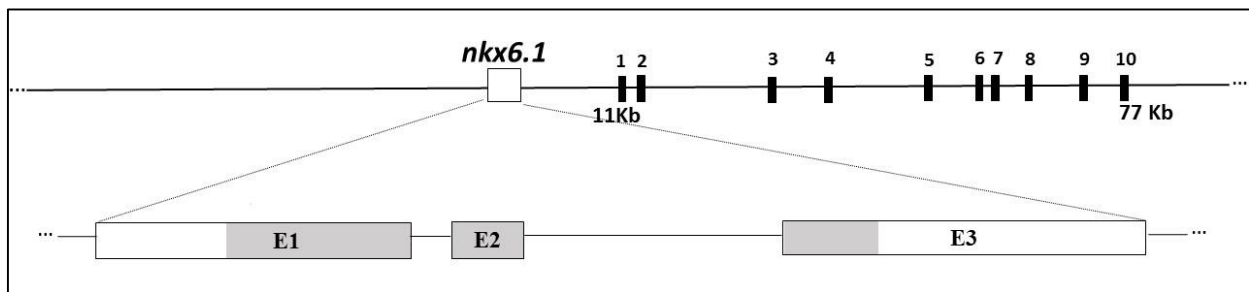


Figure 1 : Représentation schématique du gène *nkx6.1* et des 10 séquences conservées localisés en aval du gène (blocs noirs numérotés de 1-10)

1.1.1. Construction du transgène *nkx6.1:eGFP*

1.1.1.1. 1^{er} stratégie :

Dans le but de déterminer si la région promotrice est capable de diriger l'expression de *nkx6.1* selon un profil similaire à celui du gène *nkx6.1* endogène dans des poissons transgéniques, nous avons cloné le promoteur en amont d'une séquence codante pour la eGFP. Pour ce faire, nous avons effectué une recombinaison via le système Gateway (**Figure 2**). Cette technique permet via l'utilisation de sites de recombinaison spécifiques de cloner plusieurs fragments d'ADN dans un ordre et une orientation définie. Dans notre cas, la recombinaison spécifique de trois vecteurs (pCR8/GW/TOPO promoteur *nkx6.1*, p5E-MCS, p3E-eGFPpA) a permis le remplacement, dans le vecteur de destination pDest Tol2 pA-cg2, du gène de sélection négative *ccdB* et de résistance au chloramphénicol (*camR*) par le promoteur du gène *nkx6.1* et la région codante pour la eGFP (**Figure 2**). Cette construction contient aussi le promoteur *cmlc2* situé en amont d'une seconde séquence codante pour la eGFP. *Cmlc2* dirige uniquement l'expression de la eGFP dans le cœur, ce qui permet de sélectionner facilement les embryons ayant intégré notre construction lors du criblage des poissons transgéniques. Cette construction possède aussi deux séquences régulatrices *cis* minimales de l'élément Tol2 positionnées à ses extrémités 5' et 3'.

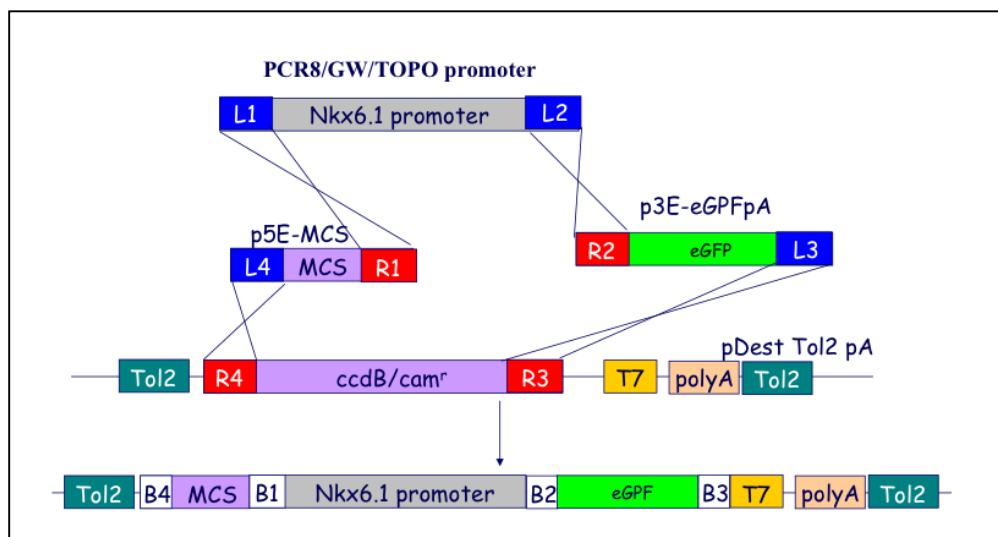


Figure 2 : Représentation schématique de la stratégie Gateway utilisée pour cloner la région promotrice de *Nkx6.1* en amont de la séquence codant pour la GFP.

En parallèle, nous avons réalisé une deuxième construction où nous avons cloné une région de 3 kb en amont d'un promoteur minimal (c-Fos) suivi de la eGFP. Cette région contient 2 séquences (**Figure 1 ; séquences n°1 et n°2**) hautement conservés de 168pb et 395pb qui présentent respectivement 75% et 85% d'identité avec la souris et l'humain.

Pour tester nos deux constructions, nous les avons injectées, en parallèle, dans des embryons de poisson-zèbre au stade 1 cellule en présence de l'ARNm codant pour la transposase. Cette enzyme en se liant aux sites TOL2 va transposer le transgène dans le génome du poisson-zèbre et va favoriser son insertion dans les cellules germinales. Que ce soit au niveau de la génération F0 ou F1, seule une expression de la GFP au niveau du cœur a été observée.

En conclusion, le promoteur seul et la région choisie ne sont pas capables de diriger l'expression de *nkx6.1* dans le pancréas.

1.1.1.2. 2^{ème} stratégie :

Nous avons utilisé un BAC qui contient le gène *nkx6.1* et les 10 séquences conservées identifiées loin en aval du gène (**Figure 3**). Notre but était de remplacer la région codante du gène *nkx6.1* dans le BAC par la région codante de la eGFP (**Figure 3**) (réalisé en collaboration avec Marielle Lebrun et l'équipe du professeur Vanderplasschen).

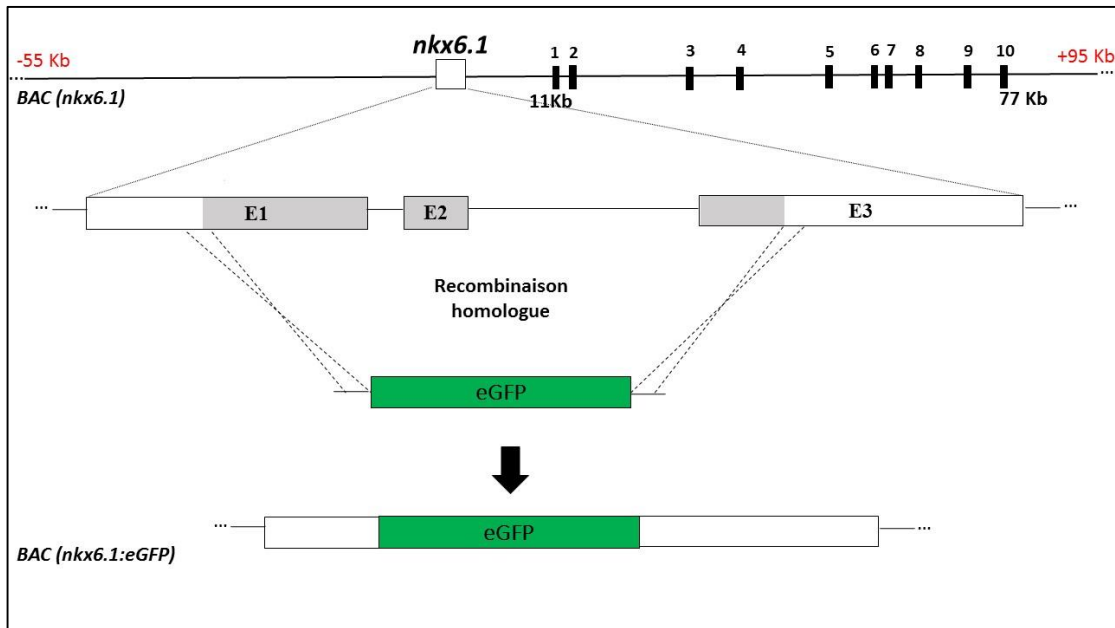


Figure 3 : Représentation schématique du BAC(*nkx6.1*) qui couvre une région de 55kb en amont et 95kb en aval du gène *nkx6.1*. La région de 95kb contient les 10 séquences conservées identifiées en aval du gène *nkx6.1* (le premier se situant à 11kb et le dernier à 77kb) (blocs noirs numérotés de 1 à 10). Par recombinaison homologue en utilisant le système GalK, la région codante (représentée en gris) du gène *nkx6.1* a été remplacée par le gène codant pour la eGFP (BAC(*nkx6.1* :eGFP)).

Pour modifier le BAC(*nkx6.1*), nous avons choisi une technique de recombinaison en bactéries décrite par Warming et al. [120] : le système GalK. La lignée bactérienne utilisée, SW102, dérivée de la lignée DY380, contient donc une copie défectueuse du prophage lambda, où les gènes codant pour les protéines de recombinaison sont sous le contrôle d'un répresseur thermosensible. La particularité de cette souche bactérienne est qu'elle contient aussi un opéron galactose (composé de 4 gènes) où seul le gène *galK* est absent. Ce gène *galK* code pour une galactokinase qui catalyse la première étape de la voie de dégradation du galactose. Il phosphoryle le galactose en galactose 1-phosphate.

La modification du BAC se déroule donc en deux étapes : une sélection *galK* positive et une sélection *galK* négative :

- **Etape 1 : Sélection GalK positive (Figure 4 : A-B)**

Nous avons d'abord amplifié par PCR une cassette contenant le gène *galK*. La première amorce utilisée contenait à son extrémité 5' une séquence de 50pb identique à la séquence située juste avant l'ATG de l'exon 1 du gène *nkx6.1*. La deuxième amorce contenait, quant à elle, à son extrémité 3' une séquence de 50pb identique à la séquence qui est située juste après le codon stop situé dans l'exon 3 du gène *nkx6.1*. L'expression des protéines de recombinaison a ensuite été induite par un choc thermique et puis la cassette a été électroporée dans les cellules SW102 contenant le BAC(*nkx6.1*) afin que la recombinaison homologe ait lieu. Les bactéries ont ensuite été étalées sur un milieu pauvre contenant uniquement du galactose comme source de carbone afin de ne sélectionner que les clones contenant le gène *galK*. Les colonies, apparues après 3 jours d'incubation, étaient toutes *galK* positives. Le remplacement de la région codante du gène *nkx6.1* par la cassette *galK* dans le BAC a été vérifié par PCR.

- **Etape 2 : Sélection GalK négative (Figure 4 : C-D)**

Dans un deuxième temps, nous avons amplifié par PCR une deuxième cassette contenant ici le gène codant pour la GFP. Cette cassette est bordée des mêmes séquences d'ADN identiques longues de 50pb pour permettre la recombinaison homologe. De nouveau, l'expression des protéines de recombinaison a été induite par un choc thermique. Ensuite, la cassette a été électroporée dans les cellules SW102 contenant le BAC(*nkx6.1:galK*) afin de remplacer par recombinaison homologe la cassette *galK* par la cassette eGFP. Les clones recombinants ont été, ici, sélectionnés sur un milieu qui contient du glycérol comme source de carbone et du 2-déoxy-galactose (DOG). La galactokinase peut aussi catalyser la phosphorylation du 2 deoxy-galactose. Le produit de cette réaction ne peut être métabolisé, ce qui mène à l'accumulation du 2-deoxygalactose-1-phosphate, un intermédiaire toxique pour la bactérie. De cette façon, ne survivent que les clones qui ont perdu le gène *galK*. A cette étape, nous avons eu beaucoup plus de faux positifs. Sur 100 PCR réalisées, nous avons identifié un clone qui contenait le gène eGFP. Le remplacement du gène *galK* par la cassette eGFP dans le BAC a été vérifié par de nombreuses PCR.

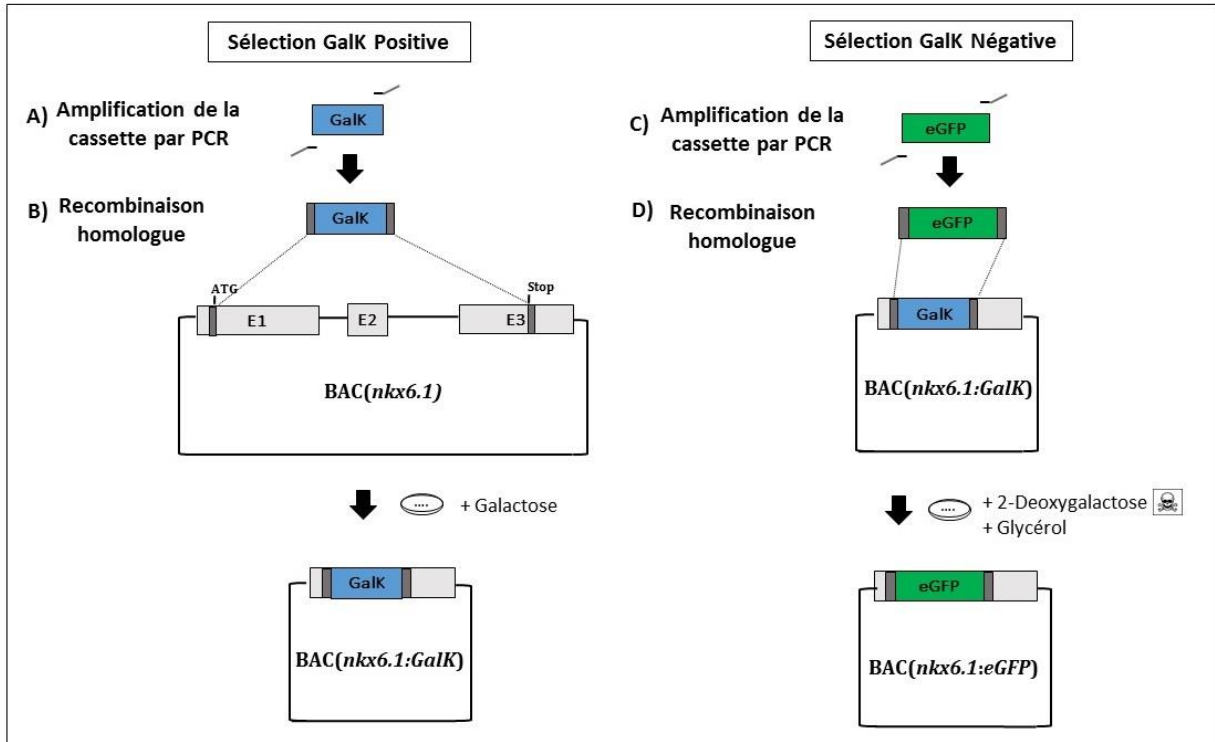


Figure 4 : Représentation schématique du système GalK pour modifier le BAC(*nkx6.1*)

1.1.2. Injection du transgène *nkx6.1:eGFP*

Le BAC(*nkx6.1 :eGFP*) a ensuite été purifié et puis injecté dans des embryons de poisson-zèbre au stade 1 cellule. Dans 5% des embryons injectés, une expression de la GFP dans le système nerveux (moins de 15 cellules) (**Figure 5, flèches blanches**) a été observée. Ces résultats étaient encourageants puisque *nkx6.1* est notamment exprimé dans le système nerveux. Les embryons dans lesquels nous n'observions pas de fluorescence n'ont, par contre, pas été gardés. Une centaine d'embryons ont finalement été sélectionnés (Génération F0). Seuls ont survécu, après 4 mois, 60 poissons. Nous les avons croisés entre eux afin de déterminer s'ils avaient intégré le transgène dans leur lignée germinale. Les différentes pontes issues des différents croisements ont été analysées à différents stades. Cependant, aucune expression de la GFP n'a été détectée (Génération F1).

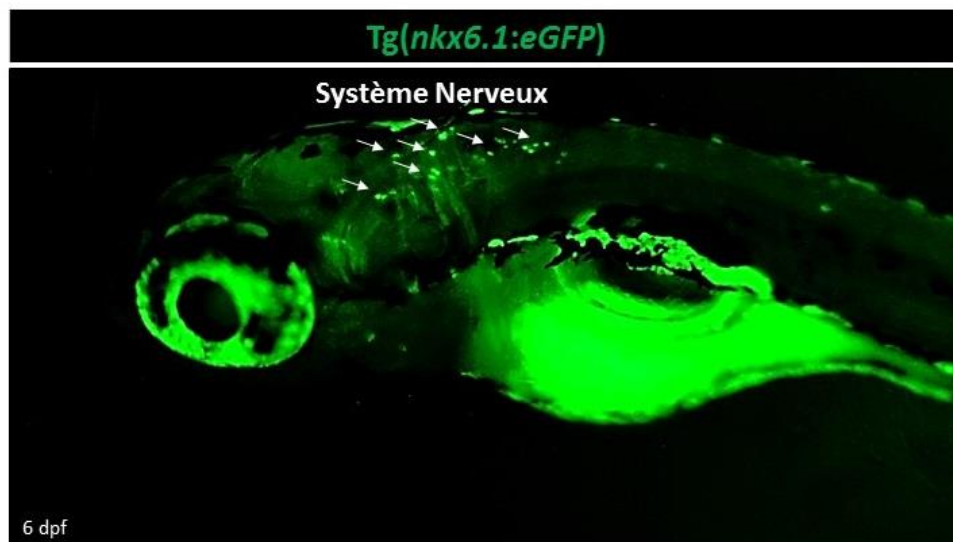


Figure 5 : Photo d'un embryon injecté avec le BAC(*nkx6.1 :eGFP*) âgé de 6 dpf (Génération F0). Les flèches blanches montres les cellules GFP+ observées dans le système nerveux. Il s'agit d'une vue latérale.

1.1.3. Nouvelle construction Tol2-BAC(*nkx6.1:eGFP*)

Sur base de la littérature et sur base des recommandations d'un autre laboratoire (Schulte-Merker group), nous avons modifié notre stratégie de départ. Au lieu de remplacer toute la région codante du gène par la GFP, nous l'avons inséré dans l'exon 1 du gène *nkx6.1* pour conserver la structure du gène (3 exons et 2 introns) et pour être sûr que la eGFP soit bien sous le contrôle de tous les éléments régulateurs du gène *nkx6.1* (**Figure 6**).

De plus, le taux d'intégration d'un BAC est particulièrement faible (1%). Afin d'augmenter son intégration dans les cellules germinales (20%) [121, 122], nous avons inséré une cassette (iTol2-amp) contenant les séquences Tol2 favorisant l'insertion du BAC par transposition dans le génome du poisson-zèbre. Cette cassette a été introduite dans le squelette du BAC(*nkx6.1*) par recombinaison homologue.

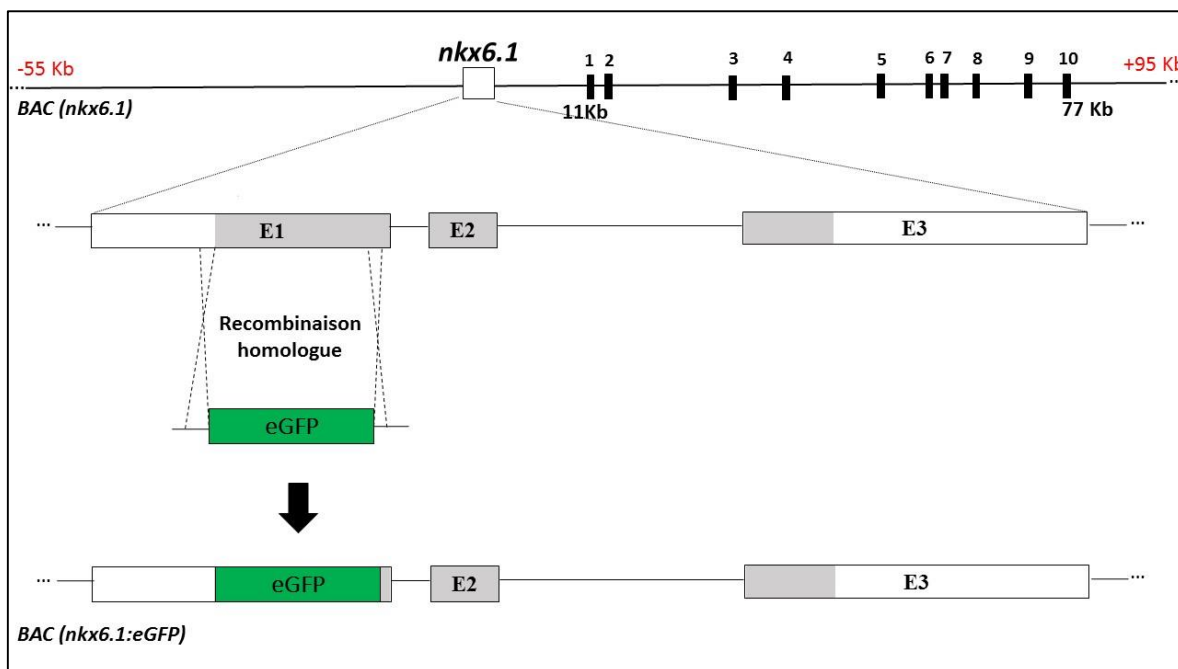


Figure 6 : Représentation schématique du BAC(*nkx6.1*) qui couvre une région de 55kb en amont et 95kb en aval du gène *nkx6.1*. Par recombinaison homologue en utilisant le système GalK, la cassette eGFP a été introduite dans l'exon 1 du gène *nkx6.1* remplaçant juste le début de la région codante (aa1 à 149) (BAC(*nkx6.1* :*eGFP*)). L'intron 1, l'intron 2, l'exon 2 et l'exon 3 ont ainsi été conservés.

Pour insérer la cassette contenant la séquence codante de la eGFP dans l'exon1 du gène *nkx6.1*, nous avons utilisé la technique GalK telle que décrite précédemment. A la fin de la première étape (la sélection GalK positive), les colonies apparues trois jours après l'électroporation avaient toutes inséré la cassette *galK* dans l'exon 1 du gène *nkx6.1*. Après la deuxième étape (la sélection GalK négative), seules deux colonies sur 70 avaient remplacé le gène *galK* par le gène de la eGFP dans l'exon 1 du gène *nkx6.1* du BAC. Ces colonies ont été vérifiées par de nombreuses PCR.

1.1.4. Injection de la nouvelle construction *nkx6.1:eGFP* dans des embryons de poissons zèbre et analyse de leurs descendance

Nous avons purifié la construction et puis injectée avec de l'ARNm codant pour de la transposase dans des oeufs de poisson-zèbre au stade 1 cellule. Les embryons injectés ont ensuite été analysés pendant plusieurs jours sous stéréomicroscope à fluorescence. Dans le système nerveux, nous avons observé des cellules fluorescentes (quelques cellules à plus 200 selon l'embryon) dans 15 à 20% des embryons injectés (Génération F0) (**Figure 8B**). L'expression du transgène étant mosaïque, et le nombre de cellules qui expriment *nkx6.1* dans le pancréas étant beaucoup moins nombreuses que dans le système nerveux, nous n'avons, par contre, pas observé de cellules GFP positives dans le pancréas. La comparaison de l'expression de la GFP et de la protéine endogène dans le système nerveux a confirmé la présence de la protéine GFP dans les cellules Nkx6.1+ (**Figure 8C-E, flèches blanches**).

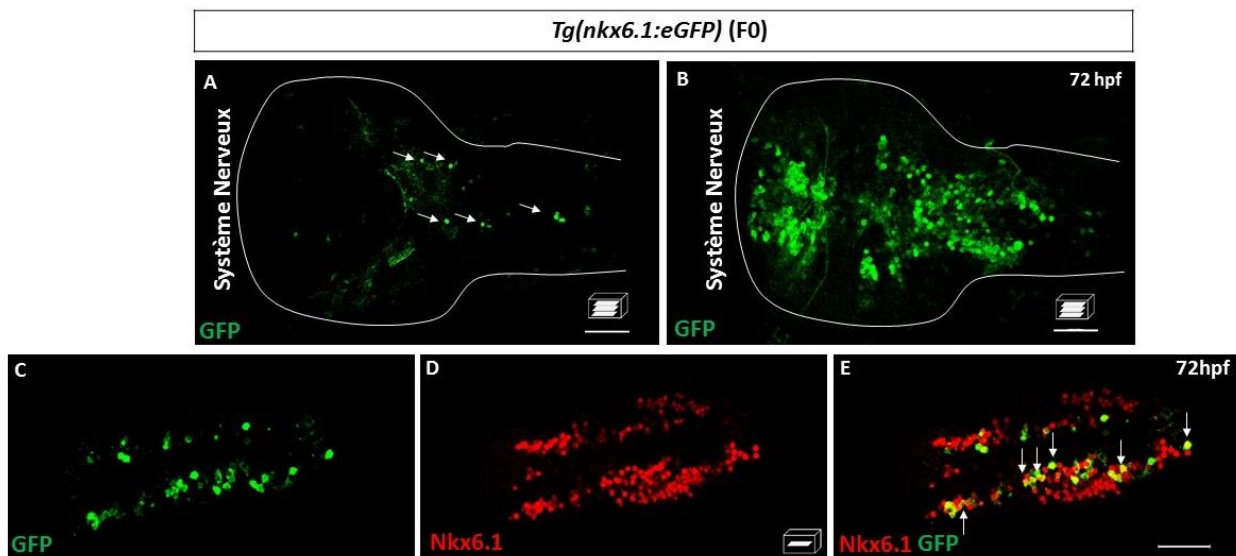


Figure 8 : Immunodétection de la GFP à 72hpf dans des embryons injectés avec la construction Tol2-BAC(*nkx6.1:eGFP*). Le nombre de cellules GFP positives dans le système nerveux varie d'un embryon à l'autre (de quelques cellules (A ; flèches blanches) à plus de 200(B)). (C-E) Comparaison de l'expression de Nkx6.1 endogène avec la GFP par immunohistochimie. Les flèches blanches montrent les cellules GFP+ / Nkx6.1+. Vues dorsales. Partie antérieure à gauche.

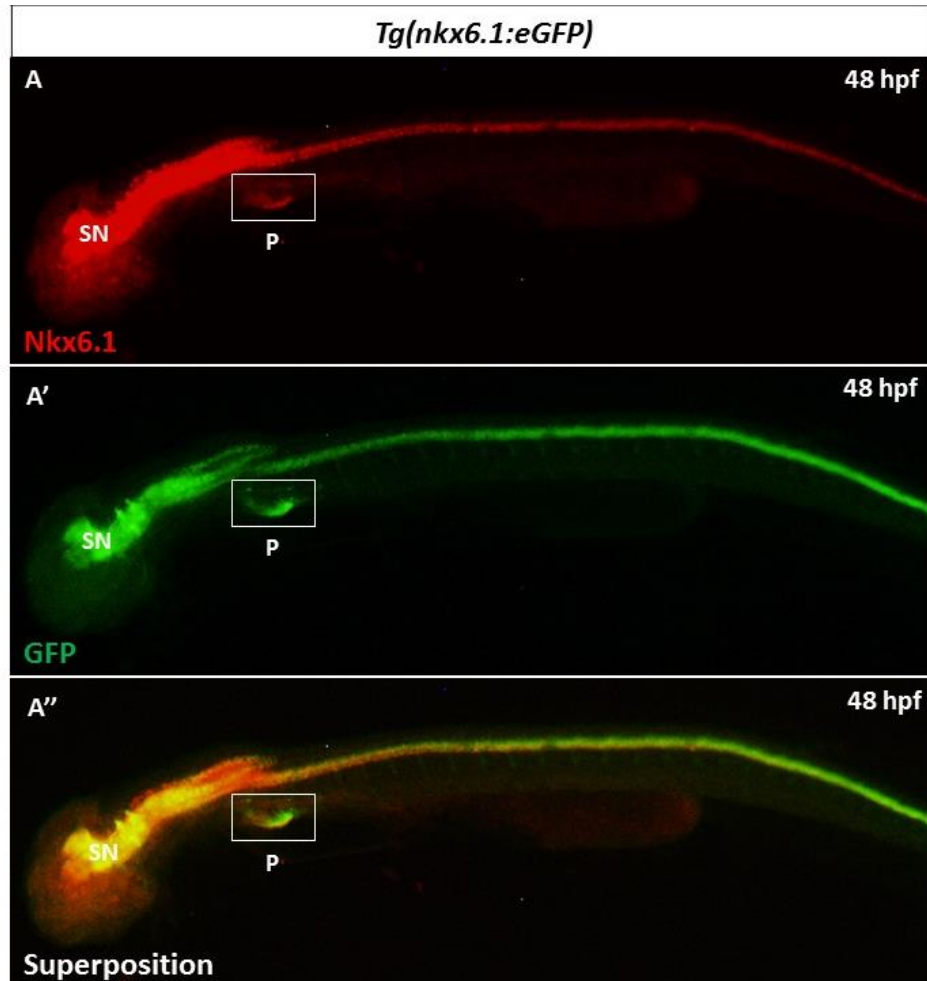


Figure 9: Immunodétection de la protéine endogène Nkx6.1 (en rouge) et de la GFP (en vert) dans la lignée *Tg(nkx6.1 :eGFP)* à 48hpf. La GFP est exprimée dans le pancréas et le système nerveux selon un profil d'expression qui est similaire à celui de la protéine endogène Nkx6.1. Vues latérales. Partie antérieure à gauche. P : pancréas ; SN : système nerveux. Photos prises au microscope à fluorescence.

Dès que les embryons sélectionnés sont parvenus à l'âge adulte (45 poissons), nous les avons croisés entre eux et avons analysés l'expression de la GFP dans leur descendance. En effet, en raison de l'intégration mosaïque de la construction, les cellules germinales des poissons fluorescents ne possèdent pas nécessairement le transgène. Seuls les poissons ayant intégré le transgène dans leur lignée germinale pourront générer des descendants exprimant la construction de manière stable. Les pontes obtenues après croisement ont toutes été observées sous stéréomicroscope à fluorescence pendant 6 jours et à différents moments de la journée. Nous avons identifié 12 embryons provenant de 6 pontes différentes dans lesquelles la GFP avait un profil d'expression qui est similaire à celui de la protéine endogène Nkx6.1. De plus, l'insertion du transgène dans le génome ne semblait pas avoir d'effet sur la croissance et le développement des embryons. Cependant, le niveau de fluorescence variait d'une lignée transgénique à l'autre. Seule la lignée avec la fluorescence la plus élevée a été conservée.

La lignée transgénique *Tg(Tol2-BAC(nkx6.1:eGFP))* choisie a été renommée *Tg(nkx6.1:eGFP)*. Elle exprime la GFP dans le système nerveux et dans le pancréas (**Figure 9A**) selon un profil d'expression qui reflète celui de la protéine endogène Nkx6.1 (**Figure 9A', A''**).

Une analyse détaillée de la localisation des deux protéines dans le pancréas en développement confirme la présence de la protéine GFP dans toutes les cellules Nkx6.1+ (**Figure 10B-E**). En effet, comme la protéine endogène Nkx6.1, la GFP est exprimée à la base de l'îlot endocrine à 24hpf (**Figure 10B ; îlot endocrine représenté en blanc**) et dans le bourgeon pancréatique ventral à 38hpf et à 48hpf (**Figure 10C-D**). A 4 jours, la GFP marque les canaux intra-pancréatiques et extra-pancréatiques comme Nkx6.1. (**Figure 10E**). Cependant, en comparant le profil d'expression de la protéine endogène avec celui de la GFP à des stades précoces, nous avons observé un petit retard d'expression de la GFP. En effet, à 17hpf, 75% des cellules Nkx6.1+ montre une expression détectable de la GFP (**Figure 10A**). A 14hpf, la protéine GFP n'est détectée que dans 20-30% des cellules Nkx6.1+. Un retard d'expression similaire est aussi observé dans le système nerveux. Inversement, quelques heures après le début de l'expression de la protéine endogène, des cellules GFP+/Nkx6.1- sont détectées (**flèches vertes, Figure 10B'-D',D''**). Ce résultat indique que la GFP persiste dans les cellules qui n'expriment plus Nkx6.1. Ce qui suggère que la protéine GFP a une plus haute stabilité que la protéine endogène Nkx6.1.

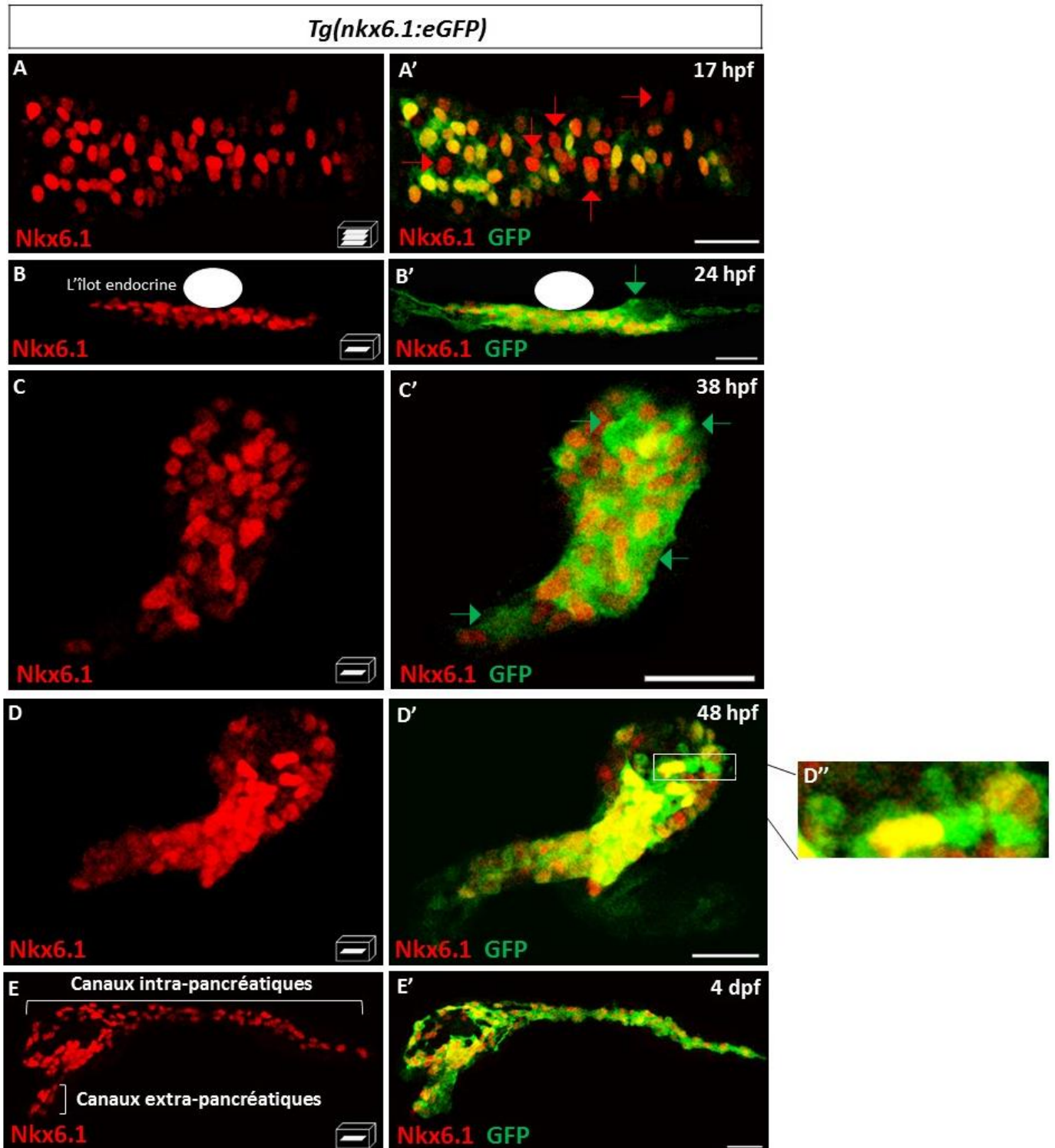


Figure 10: Immunodétection de la protéine endogène Nkx6.1 (en rouge) et de la GFP (en vert) dans le lignée *Tg(nkx6.1:eGFP)* à 17hpf (A), 24hpf (B), 38hpf (C), 48hpf (D) et 4dpf (E). Les flèches vertes montrent des cellules Nkx6.1-/GFP+ et des flèches rouges, les cellules Nkx6.1+/GFP-. (D'') Zoom qui montrent des cellules GFP+/Nkx6.1- et GFP+/Nkx6.1+. Toutes les vues sont ventrales avec la partie antérieure à gauche. Barre d'échelle = 30 μM

1.2. Lignée transgénique *Tg(nkx6.1:creER^{T2})*

Pour marquer de façon irréversible les cellules *nkx6.1+*, nous avons aussi voulu générer une lignée transgénique où la recombinaise Cre est sous le contrôle de tous les éléments régulateurs de *nkx6.1*.

1.2.1. Construction du transgène *nkx6.1:creER^{T2}*

Pour générer la construction, nous avons inséré dans l'exon 1 du gène *nkx6.1* (du iTol2-BAC(*nkx6.1*)) une cassette contenant le gène codant pour une recombinaise CRE inductible (*creER^{T2}*) (par la technique GalK tel que décrit précédemment) (**Figure 11**). La recombinaise utilisée dans la construction résulte de la fusion de la recombinaise originelle CRE au domaine de liaison du ligand (DLL) muté du récepteur de l'oestrogène humain (*ER^{T2}*) [123-125]. La modification du DLL empêche la liaison de l'oestrogène endogène mais permet la liaison d'un ligand synthétique, le tamoxifène. En absence du ligand tamoxifène, la recombinaise est séquestrée dans le cytoplasme des cellules où elle est inactive. La recombinaison de l'ADN par la CRE ne peut donc avoir lieu. En présence du ligand, la *creER^{T2}* migre dans le noyau et induit l'excision d'un segment d'ADN situé entre deux séquences cibles loxP. C'est donc l'expérimentateur qui en ajoutant le tamoxifène décide quand aura lieu cette recombinaison.

En plus du gène codant pour *creER^{T2}*, la cassette que nous avons insérée, contient aussi le gène codant pour la *eGFP* dans le but de faciliter l'identification des embryons qui auront intégré le transgène dans leur lignée germinale. Le gène codant pour la *eGFP* est séparé de la *creER^{T2}* par le peptide viral 2A (*eGFP-2A-creER^{T2}*) (**Figure 11**). Ce peptide permet une production indépendante de plusieurs protéines à partir d'un seul transgène [126].

Après de très nombreuses tentatives, nous avons identifié 5 clones par PCR qui ont intégré la cassette (*eGFP-2A-creER^{T2}*) dans l'exon 1 du gène *nkx6.1*.

1.2.2. Injection du transgène *nkx6.1:creER^{T2}*

Ensuite, nous avons injecté la construction Tol2-BAC(*nkx6.1:eGFP-2A-creERT²*) avec l'ARNm codant pour la transposase dans des embryons de poisson-zèbre au stade 1 cellule. Ensuite, nous avons observé et trié les embryons sous stéréomicroscope à fluorescence pendant plusieurs jours. Cependant, le nombre de cellules fluorescences observées dans le système nerveux étaient particulièrement faibles (généralement moins de 5 cellules). Dès que les embryons sont devenus adultes (65 poissons), nous les avons croisés entre eux. Malheureusement, aucune lignée transgénique stable n'a été identifiée.

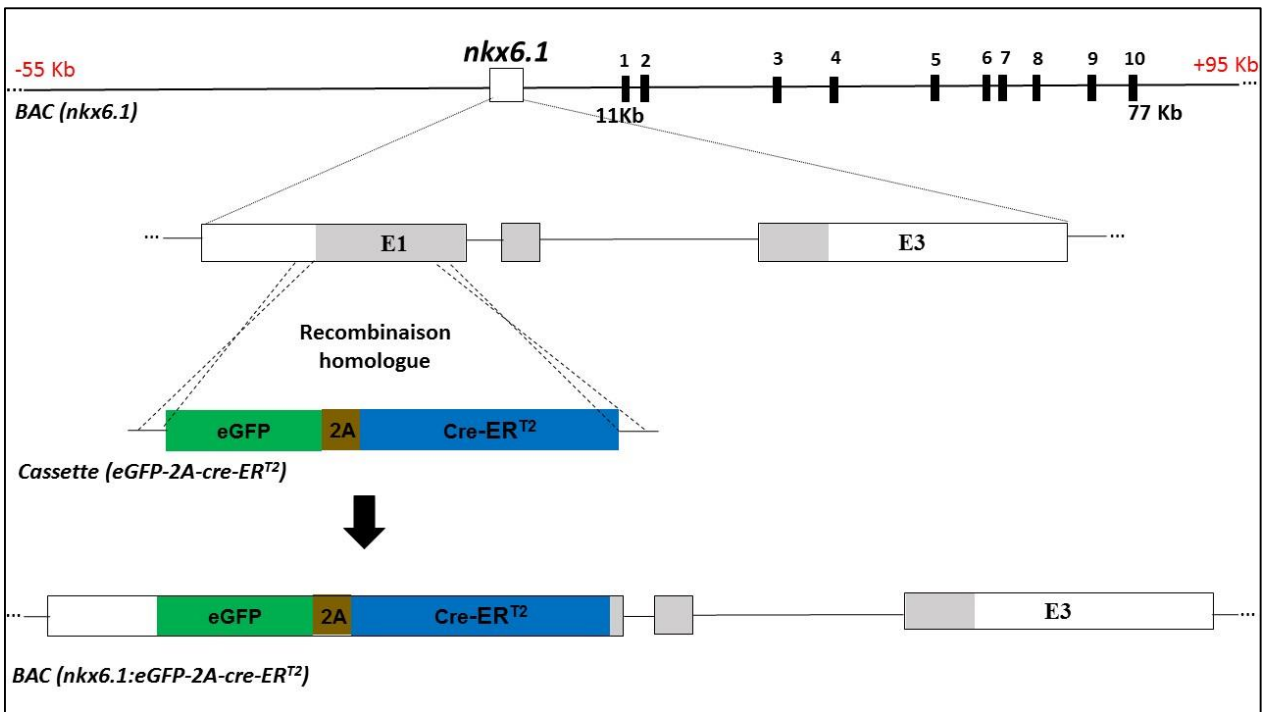


Figure 11 : Représentation schématique du *BAC(nkx6.1)*. Par recombinaison homologue en bactéries, la cassette *eGFP-2A-creERT²* a été introduite dans l'exon 1 du gène *nkx6.1* remplaçant juste le début de la région codante (aa 1 à 149) (*BAC(nkx6.1 :eGFP-2A-creERT²*). L'intron 1, l'intron 2, l'exon 2 et l'exon 3 ont ainsi été conservés. La cassette contient le gène codant pour la *eGFP* et le gène codant pour une *creERT²* inducible. Ils sont séparés par le peptide 2A.

1.3. Expérience de destin des cellules pancréatiques *nkx6.1+*

Afin de déterminer à quelles populations de cellules pancréatiques (cellules endocrines, acinaires et canalaire), les cellules qui expriment *nkx6.1* donnent naissance, nous avons réalisé une expérience de destin cellulaire à « court terme » en utilisant la stabilité de la GFP dans la lignée Tg(*nkx6.1:eGFP*) pour suivre la progéniture immédiate des cellules *nkx6.1+*.

Les premières cellules à se former durant l'embryogenèse sont les cellules endocrines du bourgeon pancréatique dorsal. Pour déterminer si les cellules *nkx6.1+* peuvent donner naissance à ces cellules endocrines, nous avons analysé l'expression du facteur de transcription Isl1 dans les embryons Tg(*nkx6.1:eGFP*). Nous avons utilisé ce facteur parce qu'il marque justement toutes les cellules endocrines matures. En analysant les embryons Tg(*nkx6.1:eGFP*) sous différentes vues au confocal et à l'aide du programme Imaris, nous avons détecté de la GFP dans $40 \pm 3.8\%$ des cellules Isl1+ (**Figure 12A**) alors que *nkx6.1* endogène n'est jamais co-exprimé avec *isl1* [3]. Ce résultat indique que les cellules *nkx6.1+* peuvent donner naissance à des cellules endocrines. Plus particulièrement, on retrouve de la GFP dans $35 \pm 18.8\%$ des cellules exprimant l'insuline, (n=21) (**Figure 12B**), dans $42 \pm 12.5\%$ des cellules produisant de la somatostatine (Sst) (n=4) (**Figure 12C**), et dans $77 \pm 3.7\%$ des cellules exprimant le glucagon (Gcg) (n=5) (**Figure 2D**). Il est frappant de constater que le pourcentage des cellules endocrines marqué par la GFP semble corrélérer avec le moment d'apparition des hormones. En effet, les premières cellules endocrines (les cellules exprimant l'insuline) apparaissent déjà dès 15hpf. Or nous avons constaté qu'à des stades précoces, toutes les cellules *Nkx6.1* ne sont pas GFP+ en raison d'un petit retard d'expression (**Figure 10A**). Les premières cellules *Nkx6.1+* qui se différencient en cellules productrices d'insuline sont donc GFP- ou GFP+ (environ 20% des cellules). Ce qui explique que seule une partie des cellules productrices d'insuline se retrouvent GFP+. Par contre, plus tard, quand les cellules exprimant le glucagon commencent à apparaître (vers 21hpf), la majorité des cellules *Nkx6.1+* qui partent en différenciation endocrine sont GFP+. Par conséquent, le pourcentage de cellules sécrétant le glucagon étant GFP+ augmente donc considérablement.

Les cellules *nkx6.1* représentent donc une population de cellules qui peut se différencier en cellules endocrines et notamment en cellules exprimant l'insuline, la somatostatine ou le glucagon.

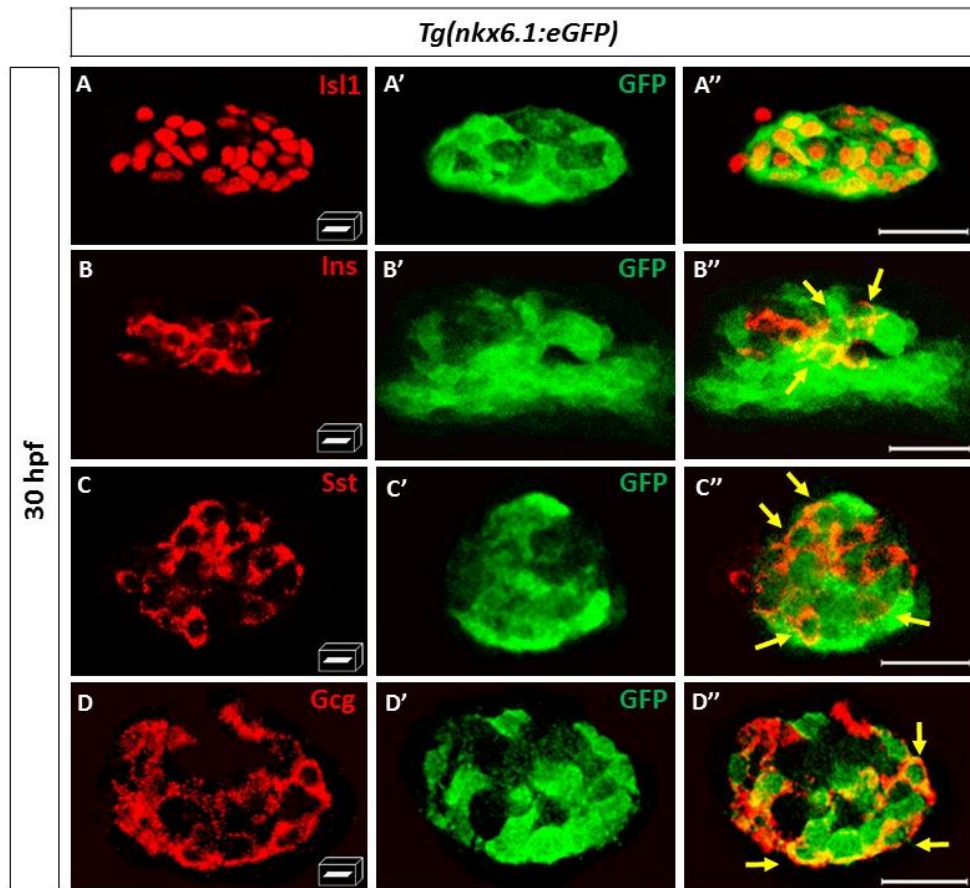


Figure 12: Les cellules *nkx6.1+* peuvent donner naissance aux cellules endocrines du bourgeon pancréatique dorsal. Immunodétection de la GFP et d'Isl1 (A), d'insuline (B), de la somatostatine (C) ou de glucagon (D) dans des embryons *Tg(nkx6.1:eGFP)* à 30hpf. On détecte de la GFP dans des cellules Isl1 (A') et dans des cellules exprimant l'insuline (B''), le glucagon (C'') et la somatostatine (D''). Les flèches jaunes indiquent des cellules *Nkx6.1+/GFP+*. Toutes les vues sont ventrales avec la partie antérieure à gauche. Barre d'Echelle = 20 μ M

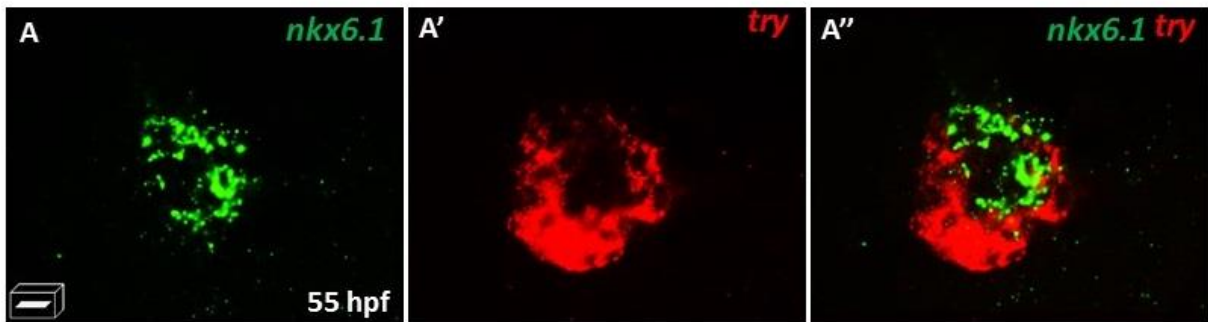


Figure 13: Comparaison de l'expression de *nkx6.1* et de *trypsine (try)* par double hybridation *in situ* fluorescente à 55hpf. *nkx6.1* ne colocalise pas avec *trypsine*. Toutes les vues sont ventrales avec la partie antérieure à gauche.

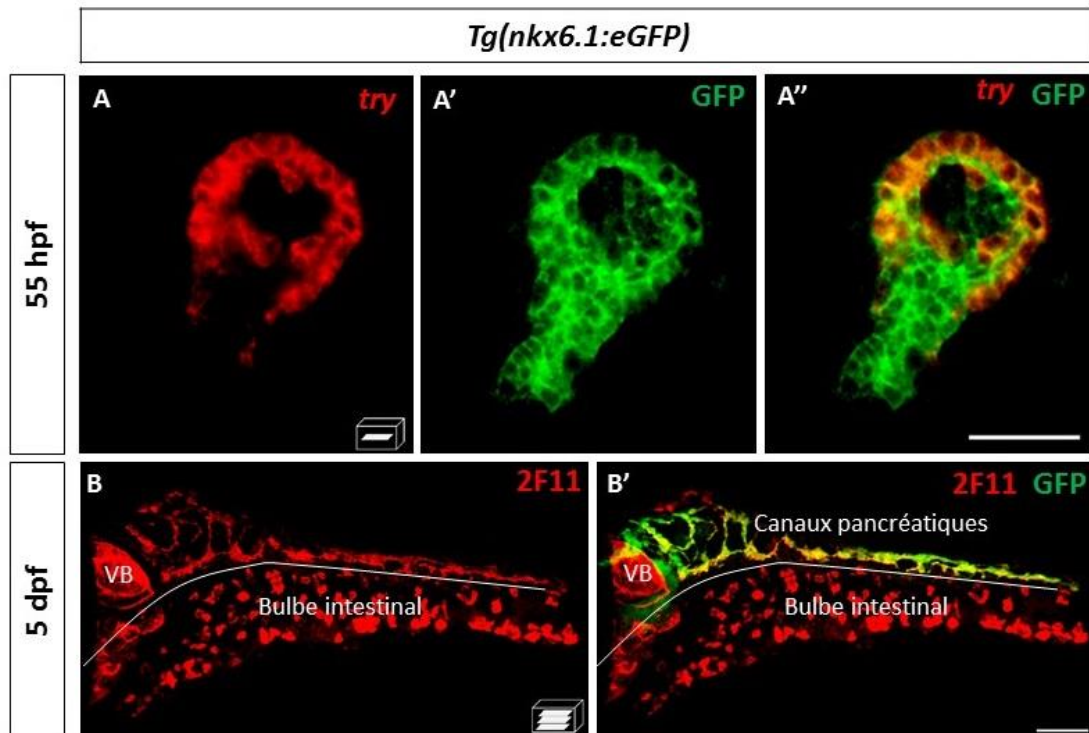


Figure 14: Les cellules *nkx6.1+* donnent naissance aux exocrines du bourgeon pancréatique ventral. (A) Double hybridation *in situ* fluorescente en utilisant la sonde *trypsine* suivie d'une immunodétection de la GFP dans des embryons *Tg(nkx6.1:eGFP)* à 55 hpf. La majorité des cellules *trypsine +* colocalise avec la GFP (B) Immunodétection de la GFP et de 2F11 (marqueur des canaux hépto-pancréatiques) dans des embryons *Tg(nkx6.1:eGFP)* à 5dpf. La ligne blanche sépare le bulbe intestinal des canaux pancréatiques. La GFP colocalise avec 2F11 dans les canaux pancréatiques. VB ; vésicule biliaire. Toutes les vues sont ventrales avec la partie antérieure à gauche. Barre d'Echelle = 20 μ M (A) ou 40 μ M (B).

Nkx6.1 endogène est aussi exprimé dès le début de la formation du bourgeon pancréatique ventral (vers 32hpf). Au cours du développement pancréatique, les cellules du bourgeon ventral se séparent ensuite en deux populations de cellules : les cellules de la lignée acinaire et les cellules de la lignée canalaire. A ce moment-là, Nkx6.1 endogène se retire uniquement à la lignée canalaire (55 hpf). A 4 dpf, Nkx6.1, est exprimé dans les cellules des canaux intra-pancréatiques et extra-pancréatiques (**comme montré sur la figure 10E**). Les cellules *nkx6.1*+ contribuent-elles à toutes les cellules du bourgeon pancréatique ventral (c'est-à-dire les cellules acinaires, canalaire et endocrines) ou ne donnent-elles naissance qu'aux cellules canalaire ? Comme attendu, nous détectons une expression de la GFP à 5 dpf dans les canaux pancréatiques marqués par l'anticorps 2F11 (**Figure 14B**).

Afin de déterminer si les cellules Nkx6.1 donnent aussi naissance aux cellules de la lignée acinaire, nous avons utilisé le facteur de transcription Trypsine qui marque les cellules acinaires matures. Contrairement à *nkx6.1* endogène qui ne colocalise jamais avec *trypsin* (**Figure 13**), on retrouve de la GFP dans une grande majorité des cellules acinaires ($70 \pm 25\%$ des cellules *trypsin*+ (n=8)) à 55hpf (**Figure 14A**). Ce résultat indique que les cellules *nkx6.1* peuvent se différencier en cellules acinaires.

Les cellules *nkx6.1* peuvent-elles aussi donner naissance aux îlots secondaires émergeant des canaux intra-pancréatiques [19, 20, 77] ? Comme les îlots secondaires ne sont pas facilement détectables à 5 jours, nous avons traité les larves *Tg(nkx6.1:eGFP)* avec un inhibiteur de la voie de signalisation Notch LY411575 (3 à 5 dpf). Ce traitement augmente le nombre de cellules endocrines qui émergent des canaux intra-pancréatiques [19, 77]. Pour visualiser les cellules endocrines, nous avons utilisé un mélange d'hormones pancréatiques (insuline, glucagon et somatostatine). Dans les larves traitées, comme attendu, le nombre de cellules endocrines dans l'îlot principal augmente et des îlots secondaires apparaissent dans la queue du pancréas (**flèches rouges, Figure 15B**). Ceux-ci coexpriment la GFP (n=4) (**flèches jaunes, Figure 15B**) ce qui indique que les cellules *nkx6.1*+ peuvent donner naissance aux îlots secondaires émergeant des canaux intra-pancréatiques.

Toutes ces données confirment que les cellules nkx6.1 peuvent se différencier en cellules acinaires, canalaire et endocrines du bourgeon pancréatique ventral et dorsal.

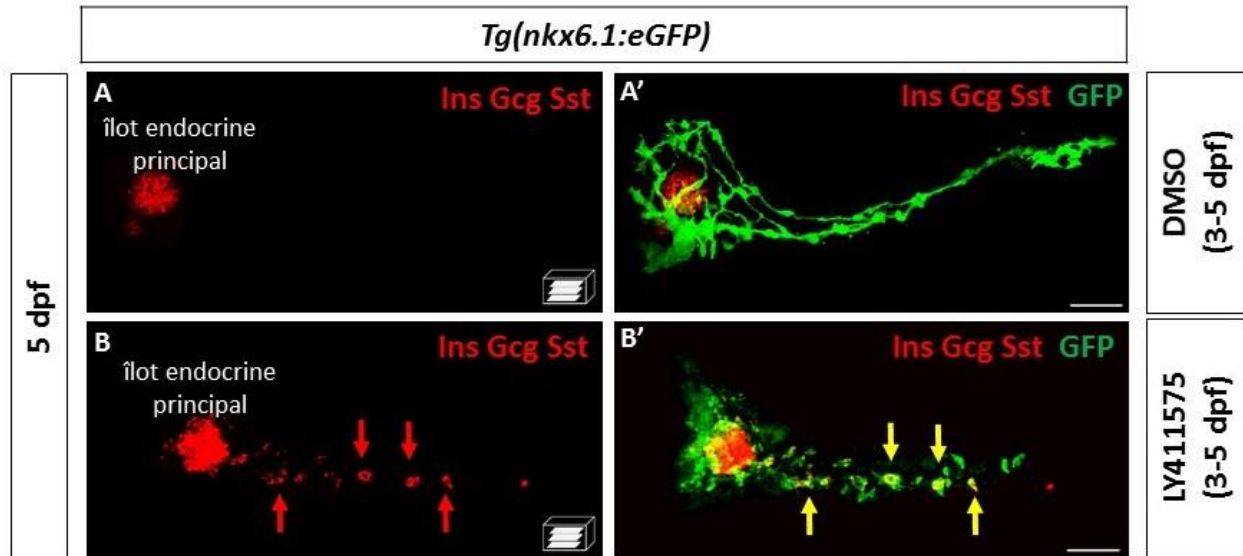


Figure 15: Les cellules *nkx6.1+* peuvent donner naissance aux cellules endocrines du bourgeon pancréatique ventral. (A-B) Immunodétection à 5 dpf de la GFP et d'insuline, de la somatostatine et de glucagon dans des embryons *Tg(nkx6.1 :eGFP)* traités de 3 à 5 dpf avec du DMSO (A) ou un inhibiteur de la voie de signalisation Notch, le LY411575 (B). Le traitement LY411575 induit une augmentation des cellules endocrines dans l'îlot principal et une apparition des îlots secondaires dans la queue du pancréas (flèches rouges). Les cellules endocrines (marquées par un mélange d'hormones) qui émergent des canaux intra-pancréatiques colocalisent avec la GFP. Les flèches jaunes indiquent les cellules endocrines *Nkx6.1+/hormones+* trouvées dans la queue du pancréas. Toutes les vues sont ventrales avec la partie antérieure à gauche. Barre d'Echelle = 40 μ M

1.4. Capacité proliférative des cellules pancréatiques *nkx6.1+*

Nous avons montré que Nkx6.1 marque une population de progéniteurs capable de donner naissance à tous les types pancréatiques. Dans le but de les caractériser, nous avons ensuite étudié la capacité proliférative des progéniteurs que Nkx6.1 marque durant le développement pancréatique par la technique de l'EDU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine). L'EDU est un nucléoside analogue de la thymidine qui s'incorpore durant la synthèse de l'ADN et permet de suivre la prolifération cellulaire.

L'EDU a été injecté dans des embryons à 15hpf et 36hpf pour étudier la prolifération des cellules Nkx6.1+ dans le bourgeon pancréatique dorsal et ventral en formation. Les embryons ont ensuite été fixés une heure après. Nous constatons que la majorité des cellules Nkx6.1+ prolifère pendant le développement du bourgeon pancréatique dorsal et ventral (**Figure 16A et 16B**).

Les cellules Nkx6.1+ représentent une population de progéniteurs qui prolifèrent durant le développement pancréatique.

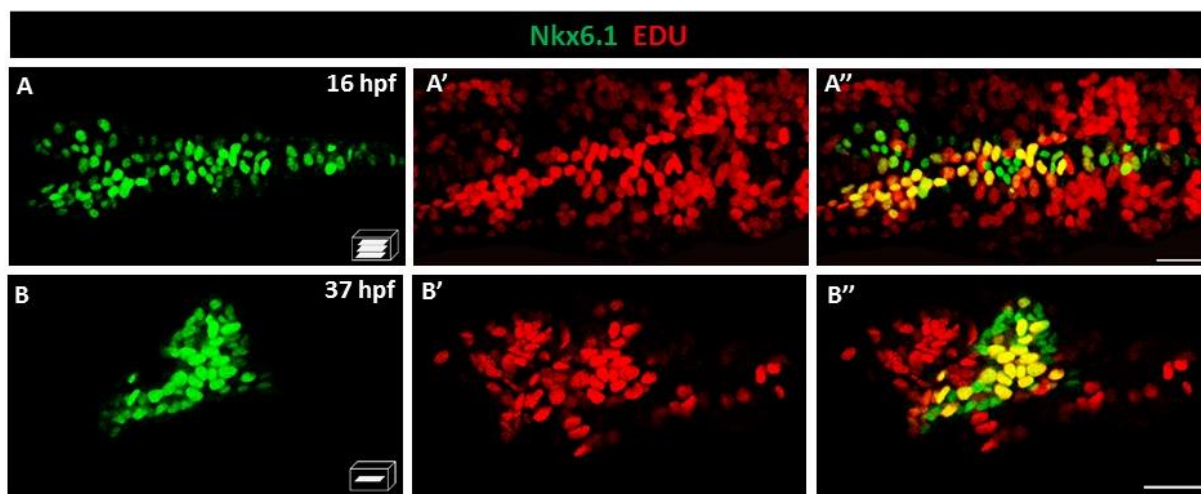


Figure 16: Les cellules *nkx6.1+* prolifèrent durant la formation des bourgeons pancréatiques dorsal et ventral. (A-B) Immunodétection de l'EDU et de la protéine endogène Nkx6.1 à 16hpf (A) et 37hpf (B). A ces stades-là, Nkx6.1 marque les progéniteurs du bourgeon dorsal et du bourgeon ventral. La majorité des cellules Nkx6.1+ prolifèrent (Nkx6.1+/EDU+). A-B : vues ventrales. La partie antérieure à gauche. Barre d'Echelle = 30 μ M (A-B).

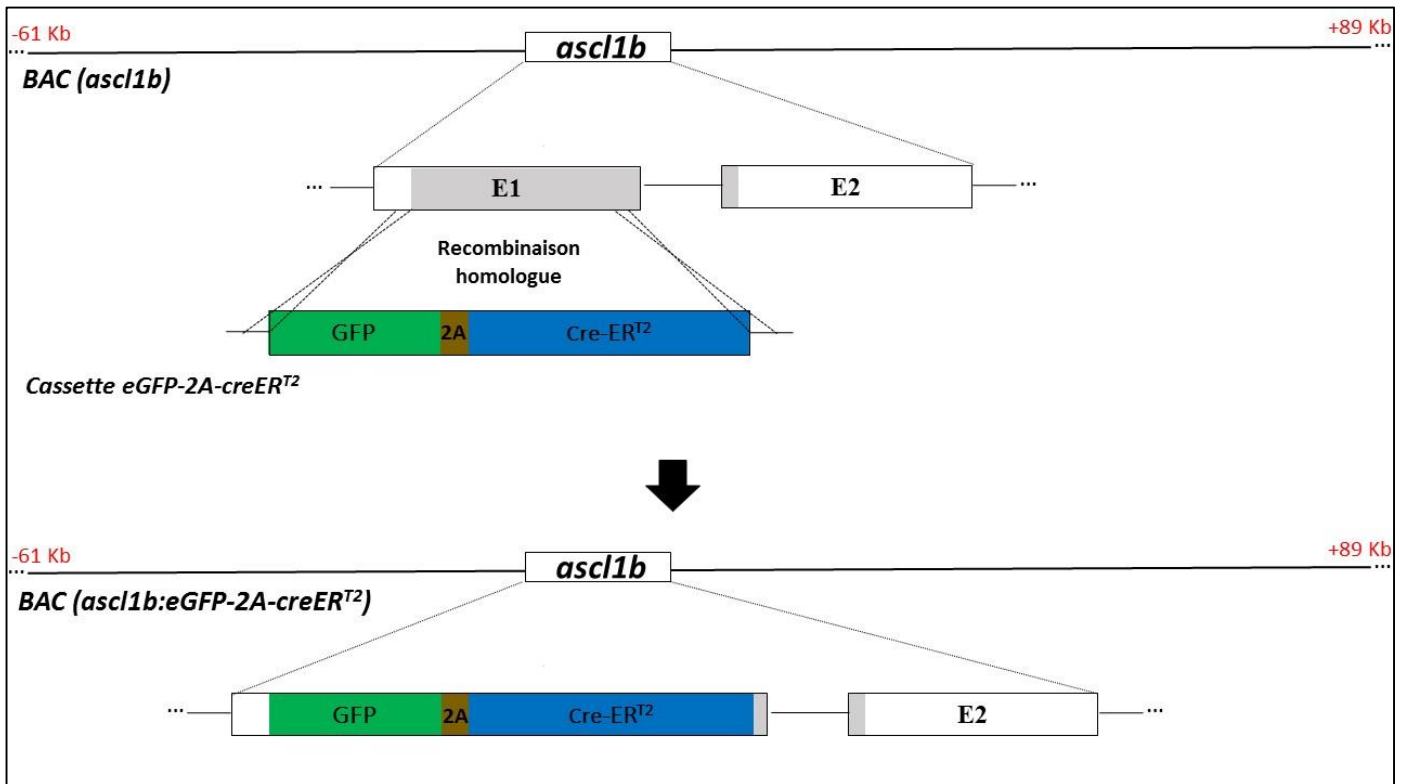


Figure 17 : Représentation schématique du BAC(*ascl1b*) et du BAC(*ascl1b*:GFP-2A-creER^{T2}). Par recombinaison homologue en utilisant la technique GalK, le début de la région codante de l'exon 1 du gène *ascl1b* a été remplacé par la cassette GFP-2A-creER^{T2} (aa 1 à 163). L'intron 1 et l'exon 2 ont ainsi été conservés.

2. Destin des cellules pancréatiques *ascl1b*⁺

2.1. Lignée transgénique Tg(*ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2}*)

Ascl1b, dont l'expression dans l'endoderme débute à 10hpf, semble être actuellement le premier marqueur pancréatique à être exprimé chez le poisson-zèbre (c'est-à-dire 1 à 2 heures avant l'expression des premiers marqueurs pancréatiques connus que sont *Nkx6.1*, *Sox4b*, *Pdx1*, *Neurod1*). Afin de déterminer si *Ascl1b* est exprimé dans les progéniteurs pancréatiques multipotents comme *Nkx6.1* ou dans les précurseurs de la lignée endocrine, nous avons généré une lignée transgénique Tg(*ascl1b :eGFP-2A-creER^{T2}*) qui nous permet de marquer de façon irréversible les cellules *ascl1b*⁺ et de déterminer leur destin.

2.2.1. Construction du transgène *ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2}*

Pour générer la lignée transgénique, nous avons aussi utilisé un BAC(*ascl1b*) qui couvre, en plus du gène *ascl1b*, une région de 61kb en amont et de 89kb en aval du gène. Par recombinaison homologe en bactéries (via le système Galk tel que décrit précédemment), nous avons inséré une cassette *GFP-2A-creER^{T2}* dans l'exon 1 du gène *ascl1b*. La structure du gène a ainsi été conservée (**Figure 17**).

Afin d'augmenter son intégration dans les cellules germinales, nous avons aussi inséré une cassette contenant les séquences Tol2 afin de favoriser l'insertion du BAC par transposition dans le génome du poisson-zèbre.

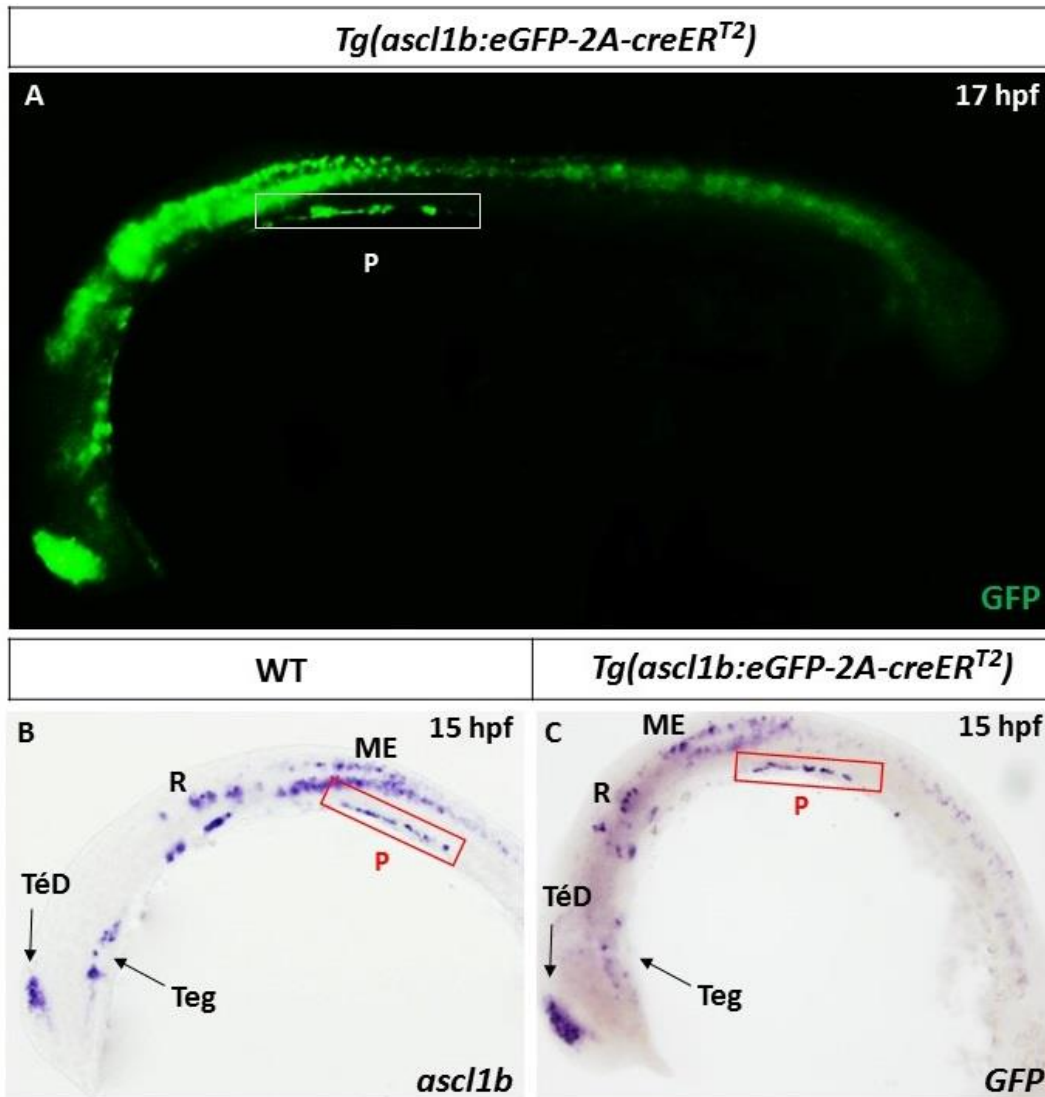


Figure 18: La lignée transgénique *Tg(ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2})* reflète l'expression endogène d'*ascl1b*. (A) Immunodétection de la GFP dans des embryons *Tg(ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2})* à 17hpf. (B-C) Hybridation in situ visible montrant l'expression endogène d'*ascl1b* dans un embryon WT (B) et de la GFP (C) dans un embryon *Tg(ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2})* à 15hpf. Vues latérales. Partie antérieure à gauche. P : pancréas, TéD : telencephalon dorsal, Teg : Tegmenton, ME : moelle épinière, R : rhombomères

2.2.2. Injection de la construction BAC(*ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2}*) dans des embryons de poissons zèbre et analyse de leurs descendance

Après purification, la construction et l'ARNm codant pour de la transposase ont été injectés dans des oeufs de poisson-zèbre au stade 1 cellule. Les embryons ont ensuite été analysés pendant plusieurs jours sous stéréomicroscope à fluorescence. Dans 15 à 20% des embryons injectés, nous avons observé des spots de cellules fluorescentes dans le système nerveux. Le profil d'expression de la GFP avait déjà un profil d'expression similaire à celui d'*ascl1b* endogène. Le nombre de cellules fluorescentes détectées variait d'un embryon injecté à l'autre (de 2-3 cellules à plus de 200 cellules) (Génération F0). Dès que les embryons sélectionnés sont parvenus à l'âge adulte (environ 75), nous les avons croisés afin d'identifier les poissons porteurs du transgène dans leur lignée germinale. Après de multiples croisements, trois lignées transgéniques qui reflétaient l'expression endogène d'*ascl1b* ont été identifiées (Génération F1). L'insertion du transgène dans le génome ne semblait pas avoir d'effet sur la croissance et le développement de l'embryon. Cependant, nous avons constaté que le niveau d'expression de la GFP était différent d'une lignée transgénique à l'autre. Seule la lignée transgénique avec la fluorescence la plus élevée a été gardée.

La lignée transgénique stable Tg(Tol2-BAC(*ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2}*)) obtenue a été renommée Tg(*ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2}*). Cette lignée montre une expression de la GFP dans le système nerveux et le pancréas (**Figure 18A**). La comparaison de l'expression d'*ascl1b* dans un embryon WT (**Figure 18B**) et de la GFP dans le Tg(*ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2}*) (**Figure 18C**) à 15hpf confirme la présence de la GFP dans les mêmes domaines d'expression qu'*ascl1b* endogène (dans des rhombomères, dans le télencéphalon dorsal, la moelle épinière et le pancréas) (**Figure 18B-C**). La lignée reflète bien l'expression endogène d'*ascl1b*.

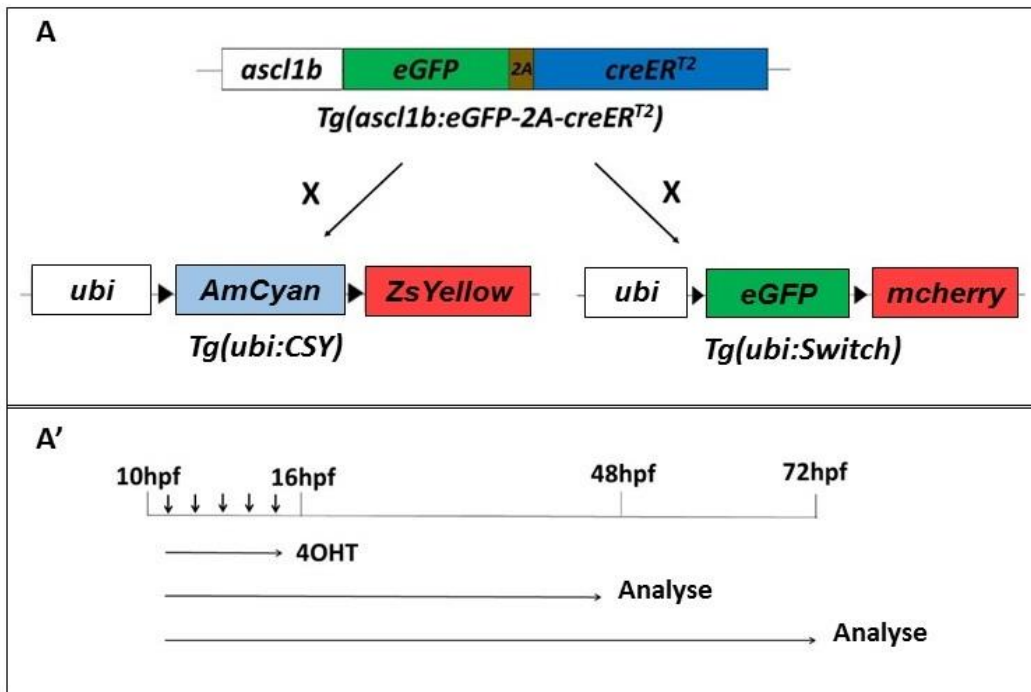


Figure 19: Traçage de lignée basé sur le système Cre/loxP. A : représentation schématique de l'expérience de destin cellulaire: la lignée $Tg(ascl1b :eGFP-2A-creERT2)$ a été croisée avec la lignée ($Tg(ubi:loxP-Cyan-loxP-zsyellow)$) (abrévée $Tg(ubi :CSY)$) ou $Tg(ubi :loxP-GFP-Lox-Cherry)$ (abrévée $Tg(ubi :Switch)$). A' : Plan de l'expérience. Les doubles transgéniques ont ensuite été traités 5 fois avec du 4OHT à 11, 12, 13, 14 et 15hpf (petites flèches) et fixés pour analyse à 48hpf ou 72hpf.

2.3. Expérience de destin cellulaire des cellules pancréatiques *ascl1b*+

Pour déterminer à quels types de cellules les cellules qui expriment *ascl1b* donnent naissance, nous avons réalisé une expérience de traçage de lignée basée sur le système Cre/LoxP. Ce type d'expérience permet de marquer de façon irréversible toute cellule exprimant à un moment donné le facteur de transcription *Ascl1b* et donc de suivre son destin.

Pour réaliser l'expérience, nous avons croisé la lignée transgénique *Tg(ascl1b :eGFP-2A-creER^{T2})* que nous avons générée avec une lignée rapportrice, déjà disponible au laboratoire (*Tg(ubi:loxP-Cyan-loxP-zsYellow)* (nommée aussi *Tg(ubi :CSY)*) [127] ou *Tg(ubi :loxP-GFP-Lox-Cherry)* (renommée aussi *Tg(ubi :Switch)*) [128] (**Figure 19A**). Dans le double transgénique, toute cellule exprimant *ascl1b* à un moment donné va également exprimer la recombinase CRE qui, en présence de tamoxifène, excisera la cassette Cyan ou GFP suivant la lignée rapportrice utilisée. Cette cellule va alors exprimer de façon permanente la protéine ZsYellow ou mCherry (=marqueur de recombinaison), même lorsque l'expression d'*ascl1b* sera éteinte.

Les conditions d'expérimentation ont d'abord dû être mises au point (à savoir le moment où on ajoute le tamoxifène, la concentration du tamoxifène et nombre de traitements à réaliser car le tamoxifène est très instable). Pour obtenir le marquage le plus complet possible, nous avons traité 5 fois les embryons doubles transgéniques avec du 4-hydroxytamoxifène de 11 à 15hpf, moment où l'expression d'*ascl1b* atteint son niveau d'expression maximal. Les embryons ont ensuite été analysés à 48hpf et à 72hpf (**Figure 19A'**). Comme attendu, aucune recombinaison n'a été observée dans les embryons simples transgéniques utilisés comme contrôle.

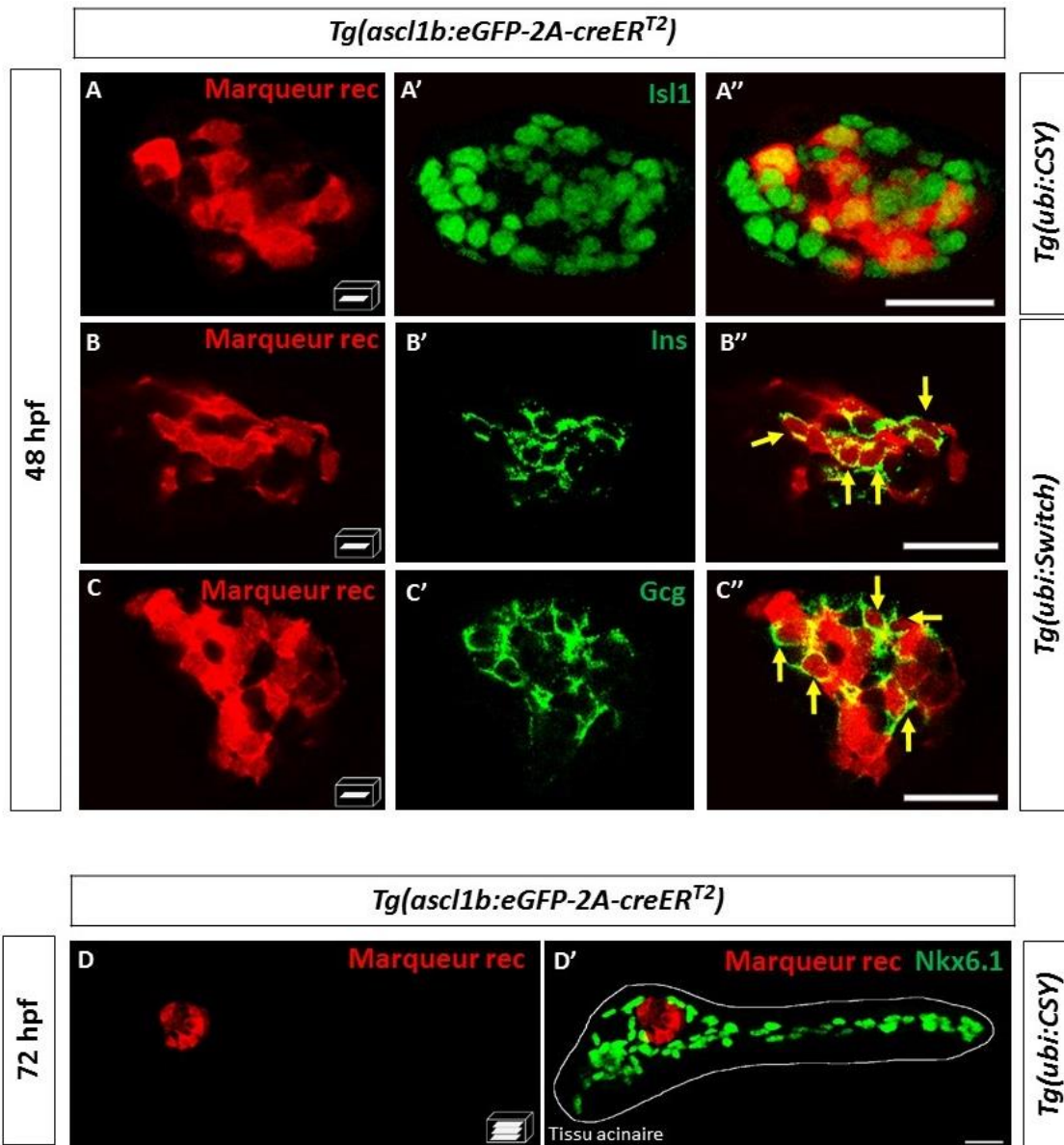


Figure 20: Les cellules *ascl1b+* donnent naissance aux cellules endocrines du bourgeon pancréatique dorsal mais pas aux cellules acinaires et canalaire du bourgeon pancréatique ventral. A-D : Traçage de lignée basé sur le système Cre/loxP. B-E : Immunodétection des marqueurs de recombinaison (=marqueur rec (ZsYellow ou mCherry)) et d'*Isl1* (B), d'Insuline (Ins) (C), de Glucagon (Gcg) (D) ou de *Nkx6.1* (E) dans des embryons doubles transgéniques traités au 4OHT. Dans ces embryons, on détecte de la mCherry ou du ZsYellow dans des cellules *Isl1+*, des cellules produisant le glucagon et des cellules exprimant l'insuline du bourgeon pancréatique dorsal. Dans le bourgeon ventral, le marqueur de recombinaison n'est pas exprimé dans les cellules des canaux marqués par *Nkx6.1* et dans le tissu acinaire délimité par la ligne blanche. Il reste localisé dans l'îlot endocrine. Les flèches jaunes indiquent les cellules coexprimant le marqueur de recombinaison (ZsYellow ou mCherry) et les hormones respectives (Ins ou Gcg).

Nous avons d'abord voulu déterminer si les cellules *ascl1b*⁺ peuvent se différencier en cellules endocrines matures du bourgeon dorsal et en cellules acinaires et canalaire du bourgeon pancréatique ventral. En analysant sous différentes vues les doubles transgéniques traités au 4OH au confocal et à l'aide du programme Imaris, nous avons détecté une expression des marqueurs de recombinaison (ZsYellow ou mCherry selon la lignée rapportrice utilisée) dans 38 ± 4.3 % (n=5) des cellules *Isl1* à 48hpf (**Figure 20A**). Nous avons utilisé ce facteur parce qu'il marque toutes les cellules endocrines matures. Ce résultat montre que les cellules *ascl1b*⁺ peuvent donner naissance aux cellules endocrines du bourgeon pancréatique dorsal. Plus spécifiquement, l'expression du marqueur de recombinaison a été détectée dans 58 ± 7.1 % des cellules exprimant l'insuline (n=9) (**Figure 20B**) et dans 59 ± 3.7 % des cellules exprimant le glucagon (n=9) (**Figure 20C**) à 48hpf.

Nous avons ensuite voulu déterminer si les cellules *Ascl1b*⁺ génèrent les cellules acinaires et canalaire du bourgeon pancréatique ventral. Alors que l'expression du marqueur de recombinaison, est clairement visible dans l'îlot endocrine, il n'est, par contre pas détecté à 72hpf dans les cellules canalaire marquées par *Nkx6.1* et dans le tissu acinaire qui les entoure (**Figure 20D**). Ce qui indique que les cellules *ascl1b*⁺ ne donnent pas naissance aux cellules exocrines du bourgeon pancréatique ventral.

Nous avons voulu savoir si les cellules *ascl1b*⁺ donnent naissance aux cellules endocrines tardives émergeant des canaux intra-pancréatiques. Cependant, comme les embryons ne survivaient pas quand nous les traitions à la fois au LY411575 (inhibiteur de la voie de signalisation Notch déjà utilisé précédemment) et au 4OH, nous avons dû réaliser une expérience de destin cellulaire à court terme basée sur la stabilité de la GFP. Comme attendu, un traitement au LY411575 de 3 à 5 dpf sur des larves *Tg(ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2})* conduit d'une part, à une apparition de l'expression d'*ascl1b:eGFP* dans la queue du pancréas (**Figure 21A'**) [1] et d'autre part à une apparition de petits îlots secondaires (**Figure 21B**). Comme montré sur la **Figure 21G'** (**flèches jaunes**), ces petits îlots, détectés par l'expression des hormones pancréatiques insuline et glucagon, expriment aussi la GFP.

En conclusion, nos données démontrent que les cellules *ascl1b*⁺ donnent exclusivement naissance aux cellules endocrines du bourgeon pancréatique dorsal et ventral.

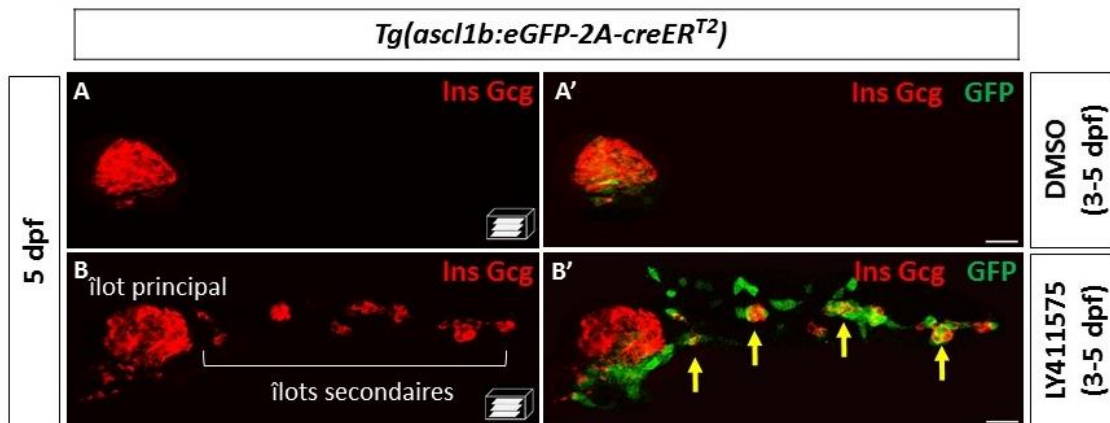


Figure 21: Les cellules *ascl1b*⁺ donnent naissance aux îlots secondaires qui émergent des canaux intra-pancréatiques. A-B : Traçage de lignée basé sur la stabilité de la GFP. Immunodétection de la GFP et des hormones insuline et glucagon à 5dpf dans des embryons *Tg(ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2})* traités de 3 à 5 dpf avec du DMSO (A) ou avec un inhibiteur de la voie de signalisation Notch, le LY411575 (B). Le traitement induit une apparition d'*ascl1b:eGFP* pancréas (B') et de petits îlots secondaires (B-B') dans le queue du pancréas. Les flèches jaunes montrent les îlots secondaires GFP⁺/hormones⁺ trouvées dans la queue du pancréas. Toutes les vues sont ventrales avec la partie antérieure à gauche. Barre d'Echelle = 20 µM

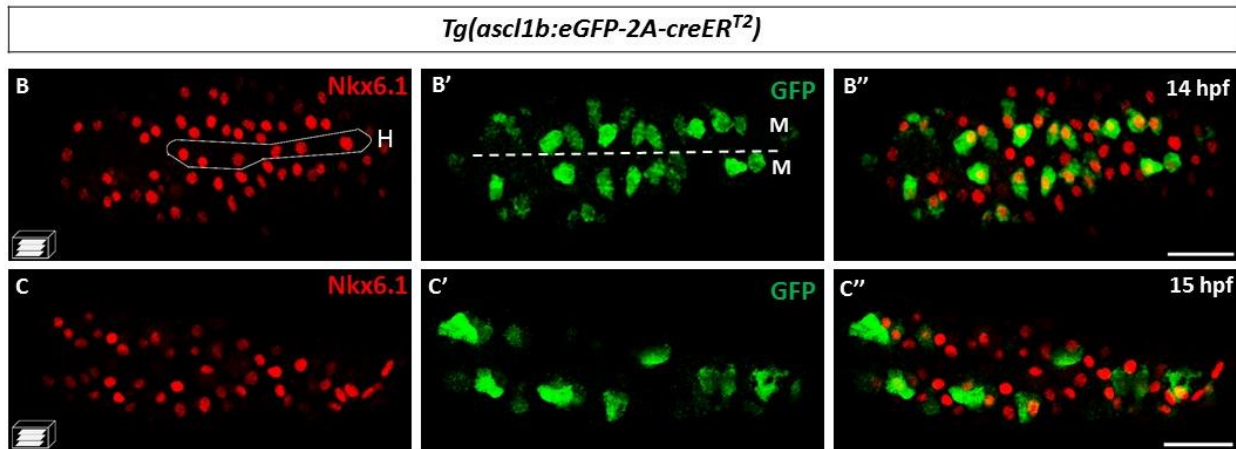
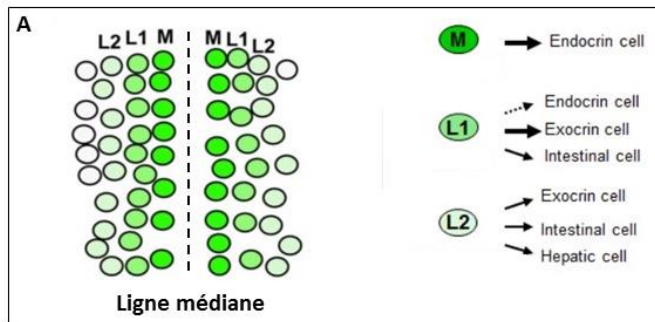


Figure 22: *nkx6.1* et *ascl1b* sont d'abord co-exprimés ensemble dans les précurseurs endocrines du bourgeon pancréatique dorsal mais rapidement leur domaine d'expression se ségrègent. (A) Représentation schématique de l'endoderme pancréatique à 6-8S. Le destin cellulaire des cellules endodermiques diffèrent selon leur localisation médio-latérale. Les cellules situées de part et d'autre de la lignée médiane donnent naissance aux cellules endocrines (rangée M). Les cellules situées sur la rangée L1 donnent principalement naissance aux cellules exocrines mais aussi à des cellules endocrines et à des cellules intestinales. Les cellules situées sur la rangée L2 donnent naissance à des cellules exocrines, intestinales et hépatiques [12, 13]. (B-C) Immunodétection de la protéine endogène *Nkx6.1* et de la GFP dans des embryons *Tg(ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2})* à 14hpf (B) et 15hpf (C). Le domaine d'expression de *Nkx6.1* est plus grand que celui d' *ascl1b:eGFP*. (B) A 14hpf, les cellules *ascl1b:eGFP+* expriment également *Nkx6.1*. (C) A 15 hpf, la majorité des cellules *ascl1b:eGFP* n'exprime plus *Nkx6.1*. Toutes les vues sont ventrales avec la partie antérieure à gauche. Barre d'Echelle = 40 μ M. H : hypochorde ; M : cellules médianes

3. Comparaison du profil d'expression de Nkx6.1 avec celui d'Ascl1b

Nous avons montré que Nkx6.1 est exprimé dans les progéniteurs pancréatiques multipotents et Ascl1b dans les précurseurs endocrines. Nous avons comparé ces deux populations de cellules en analysant l'expression de Nkx6.1 dans les embryons transgéniques *Tg(ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2})* par immunohistochimie.

A 14hpf, les cellules *ascl1b:eGFP* sont réparties en deux rangées de cellules localisées de part et d'autre de la ligne médiane (**Figure 22B'**). L'équipe de Stainier a montré qu'à ce stade-là les cellules endodermiques sont en fait réparties en 3 rangées de cellules (rangs M, L1 et L2) (**Figure 22A**) qui adoptent un destin cellulaire différent en fonction de leur localisation medio-latérale (**Figure 22A**) [12, 13]. Les cellules *ascl1b+* correspondent aux cellules endodermiques les plus médianes (**indiqué comme M sur la figure 22B'**) décrites pour donner naissance aux cellules endocrines pancréatiques [12, 13]. De plus, toutes les cellules *ascl1b:eGFP* expriment aussi Nkx6.1 (**Figure 22B''**). Cependant, le domaine d'expression de Nkx6.1 est plus large que le domaine d'expression d'*ascl1b:eGFP*. En effet, en plus de son expression dans l'hypochorde (**indiqué par H sur la figure 22B**), Nkx6.1 est exprimé aussi dans des cellules plus latérales, reporté comme donnant naissance aux cellules exocrines et aux cellules intestinales [13]. Nous avons montré qu'effectivement les cellules Nkx6.1+ donnent naissance aux cellules exocrines. En analysant l'expression de la GFP dans des embryons transgéniques *Tg(nkx6.1:eGFP)*, nous avons aussi constaté que la GFP n'est pas détectée que dans le pancréas et le système nerveux (**Figure 23A**) comme la protéine endogène Nkx6.1 (**Figure 23A**). En effet, les cellules intestinales marquées par *foxa3* expriment aussi de la GFP (**Figure 23 B,C,D**). Les cellules Nkx6.1+ se différencient aussi en cellules intestinales.

Le domaine d'expression de Nkx6.1 et d'Ascl1b se ségrège rapidement. A 15hpf, la majorité des cellules *ascl1b:eGFP* n'expriment plus Nkx6.1 (**Figure 22C**). Cette séparation est pratiquement terminée quand les premières cellules endocrines exprimant l'insuline apparaissent.

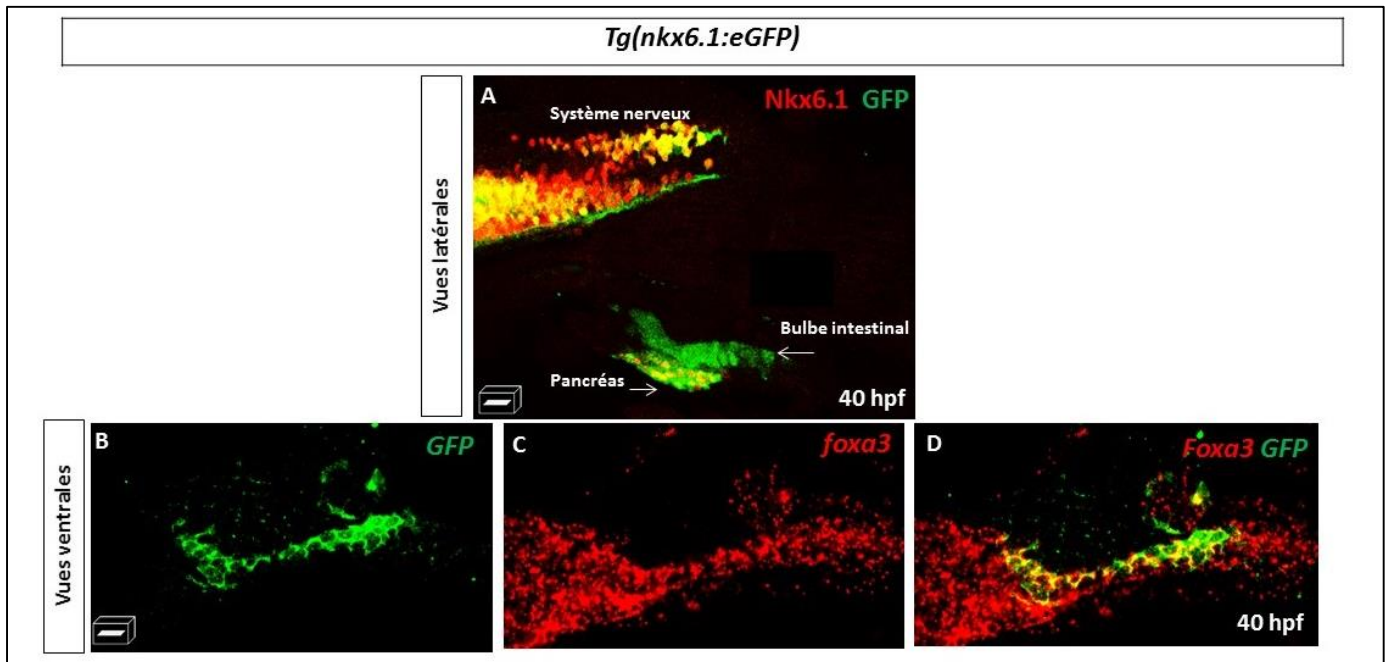


Figure 23: les cellules Nkx6.1+ donnent aussi naissance à des cellules intestinales (A) Immunodétection de la protéine endogène Nkx6.1 et de la GFP dans des embryons *Tg(nkx6.1:eGFP)* à 40hpf. La GFP est détectée dans le système nerveux et dans le pancréas, comme la protéine endogène Nkx6.1. La GFP marque aussi le bulbe intestinal mais pas Nkx6.1. (B-D) Hybridation in situ fluorescente en utilisant la sonde *foxa3* (C) suivie d'une immunodétection de la GFP (B) dans des embryons *Tg(nkx6.1:eGFP)* à 40hpf. La GFP colocalise avec *foxa3* (D). Vues latérales (A) ; Vues ventrales (B-D) ; La partie antérieure à gauche.

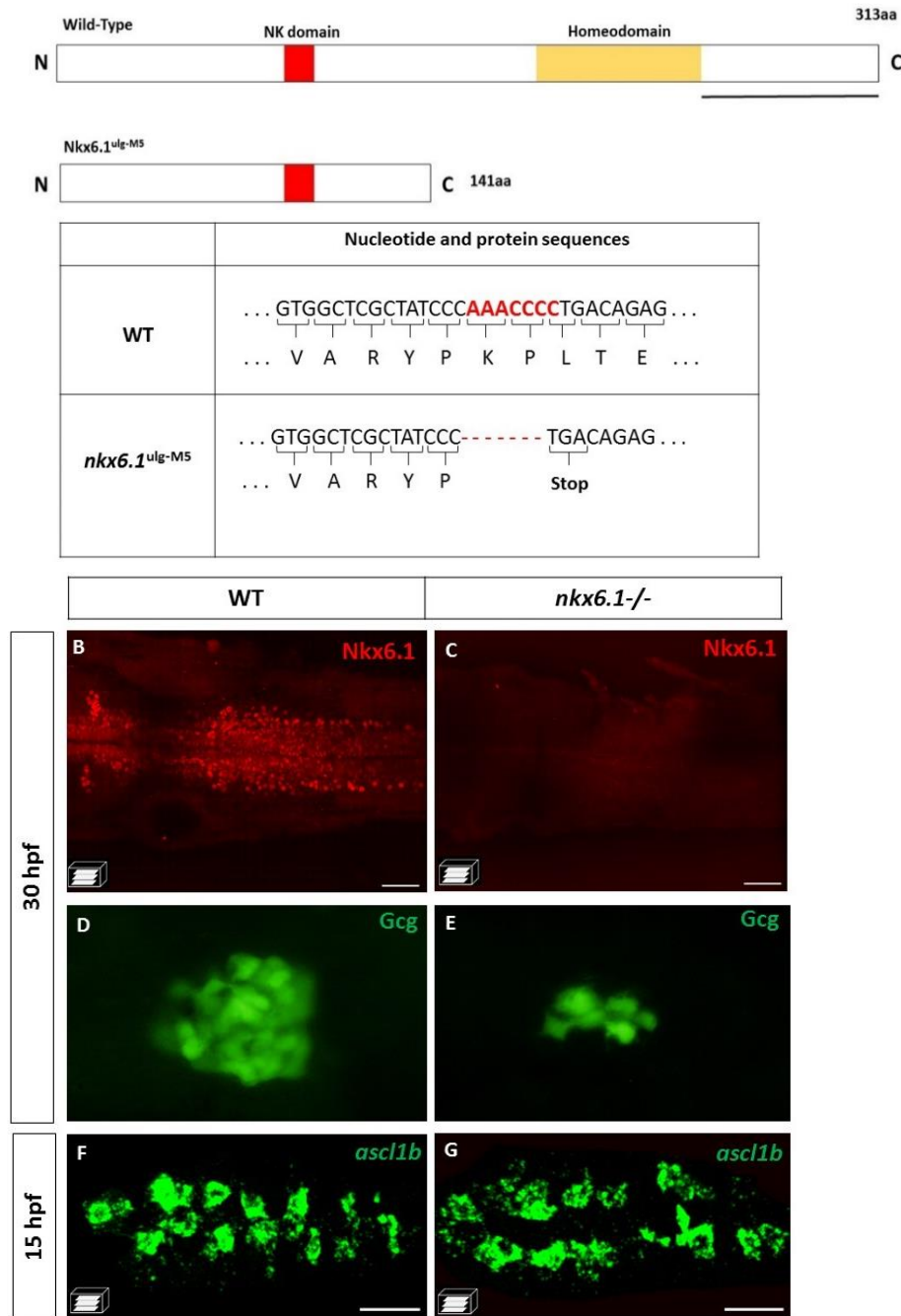


Figure 25: L'expression d'*ascl1b* n'est pas réprimée par Nkx6.1 (A) Représentation schématique de la protéine WT et de la protéine mutante Nkx6.1^{ulg-M5}. La boîte jaune représente l'homéodomaine et la boîte rouge représente le domaine NK. La région codante de la protéine mutante contient une délétion de 7pb (après aa 141) menant à l'apparition d'un codon STOP juste après la délétion. La ligne noire représente la région de la protéine reconnue par l'anticorps Nkx6.1. (B-C) Immunodétection de Nkx6.1 dans un embryon WT (B) et un embryon mutant *nkx6.1*^{-/-} (C). (D-E) :Immunodétection de Glucagon dans un embryon WT (D) et dans un embryon mutant *nkx6.1*^{-/-} (E). (F-G) Hybridation in situ fluorescente montrant l'expression d'*ascl1b* dans un embryon WT (F) et dans un embryon mutant *nkx6.1*^{-/-} (G). Toutes les vues sont ventrales avec la partie antérieure à gauche. Barre d'Echelle = 40 μM.

Pour déterminer si la séparation des deux domaines d'expression résulte d'une répression mutuelle, nous avons regardé si la perte d'*ascl1b* mènerait à une augmentation de l'expression de *nkx6.1* et vice-versa. Pour ce faire, nous avons utilisé deux lignées mutantes générées au laboratoire (Alice Bernard) par mutagenèse dirigée selon la technique CRISPR/cas9 (**Figure 24A et Figure 25A**). Cette technique est basée sur la reconnaissance ciblée d'une séquence d'ADN génomique par un ARN guide synthétique et par la coupure double-brin de la séquence cible par une endonucléase. Cette technique présente l'avantage d'être efficace, rapide et les mutations sont transmissibles à la descendance.

Dans le mutant *ascl1b*^{-/-}, la région codante contient une délétion de 11pb, ce qui conduit à un décalage du cadre de lecture (**Figure 24A**). Ce décalage mène à la production d'une région aberrante à la place de la seconde hélice du domaine bHLH. Cette hélice est essentielle pour la fonction de la protéine. Comme le mutant n'avait jamais été analysé, nous avons comparé le phénotype pancréatique déjà connu des embryons morphants *ascl1b* avec celui du mutant. Pour rappel, l'inactivation d'*ascl1b* par l'injection d'un morpholino mène à une réduction de tous les types endocrines [1] (Cf intro 4.1.2.1). Dans le mutant, la perte de fonction d'*ascl1b* conduit à une réduction du nombre de cellules produisant la somatostatine (**Figure 24C**), le glucagon et l'insuline, comme chez les morphants. Après cette vérification, nous avons analysé l'expression de Nkx6.1 dans le mutant *ascl1b*^{-/-} par immunohistochimie. Comme montré sur **la figure 24E**, elle n'est pas augmentée, ce qui veut dire qu'Ascl1b ne réprime pas l'expression de *nkx6.1*.

Dans le mutant *nkx6.1*^{-/-}, la région codante de la protéine contient une délétion de 7pb, ce qui conduit à l'apparition d'un codon stop juste après la délétion (**Figure 25A**). Dans la protéine tronquée, l'homéodomaine, situé après le codon stop, est absent (**Figure 25A**). La perte de la partie C-terminal de la protéine dans le mutant (**Figure 25A**) a d'abord été vérifiée par immunohistochimie. En effet, l'anticorps anti-Nkx6.1 ne détecte pas la protéine endogène dans le mutant car la région qu'il reconnaît normalement est perdue (**Figure 25A**). La **figure 25B-C** montre l'expression de Nkx6.1 dans le système nerveux d'un embryon WT et l'absence d'expression de la protéine endogène dans un embryon mutant. D'autre part, l'inactivation de Nkx6.1 dans le mutant mène aussi à une réduction drastique du nombre de cellules exprimant le glucagon (**Figure 25E**), comme reporté dans les morphants *nkx6.1* [3]. Le mutant présente donc le même phénotype pancréatique que lorsqu'on inactive *nkx6.1* avec l'injection d'un morpholino.

Après cette vérification, nous avons analysé l'expression d'*ascl1b* dans le mutant *nkx6.1*^{-/-} par hybridation in situ. La perte de fonction de Nkx6.1 dans le mutant n'augmente pas son expression (**Figure 25G**), ce qui signifie que Nkx6.1 ne réprime pas l'expression d'*ascl1b*.

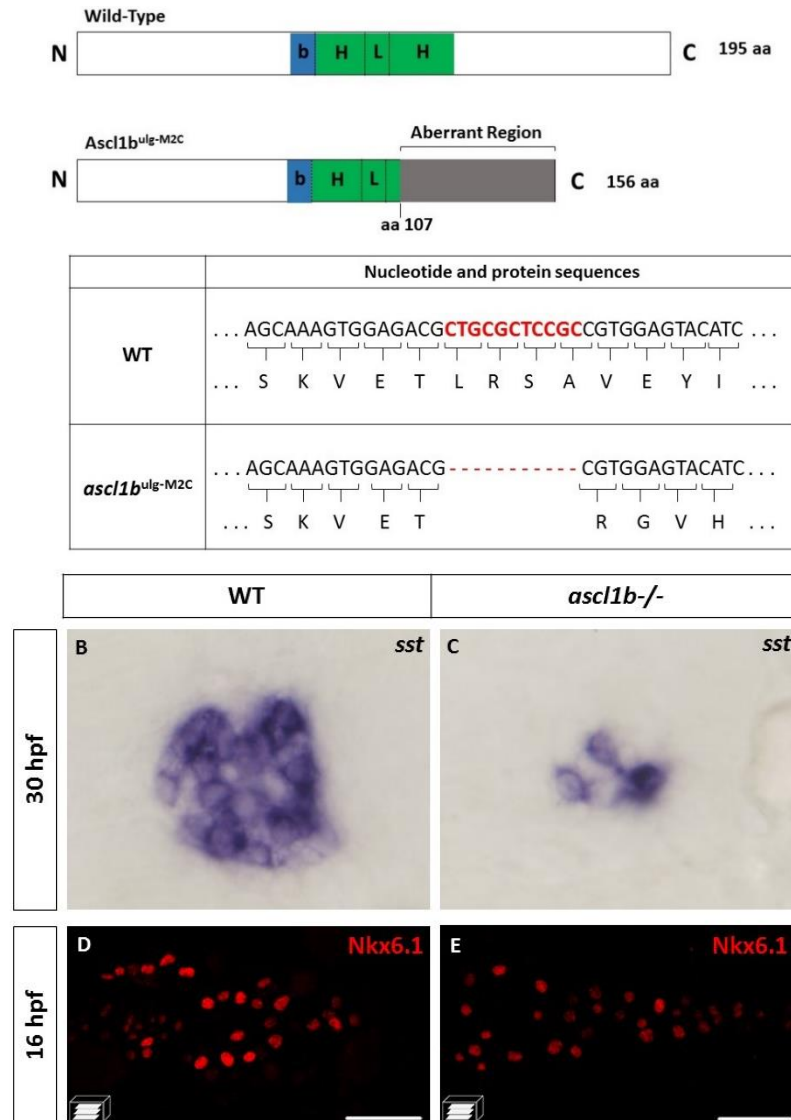


Figure 24: L'expression de *nkx6.1* n'est pas réprimée par *Ascl1b* (A) Représentation schématique de la protéine WT et de la protéine mutante *Ascl1b*^{ulg-M2C}. Le domaine basique (b) est représenté par une boîte bleue et le domaine hélice-boucle-hélice (HLH), par une boîte verte. La région codante de la protéine mutante contient une délétion de 11pb (après aa 107) qui mène à un décalage du cadre de lecture et à la production d'une région aberrante de 48pb à la place de la seconde hélice. (B-C) Hybridation in situ fluorescente montrant l'expression de la somatostatine dans un embryon mutant *ascl1b*^{-/-} (C) et d'un embryon WT à 30hpf (B). (D-E) Immunodétection de la protéine endogène Nkx6.1 dans un embryon WT (D) et dans un embryon mutant *ascl1b*^{-/-} (E). Toutes les vues sont ventrales avec la partie antérieure à gauche. Barre d'échelle = 40 μM.

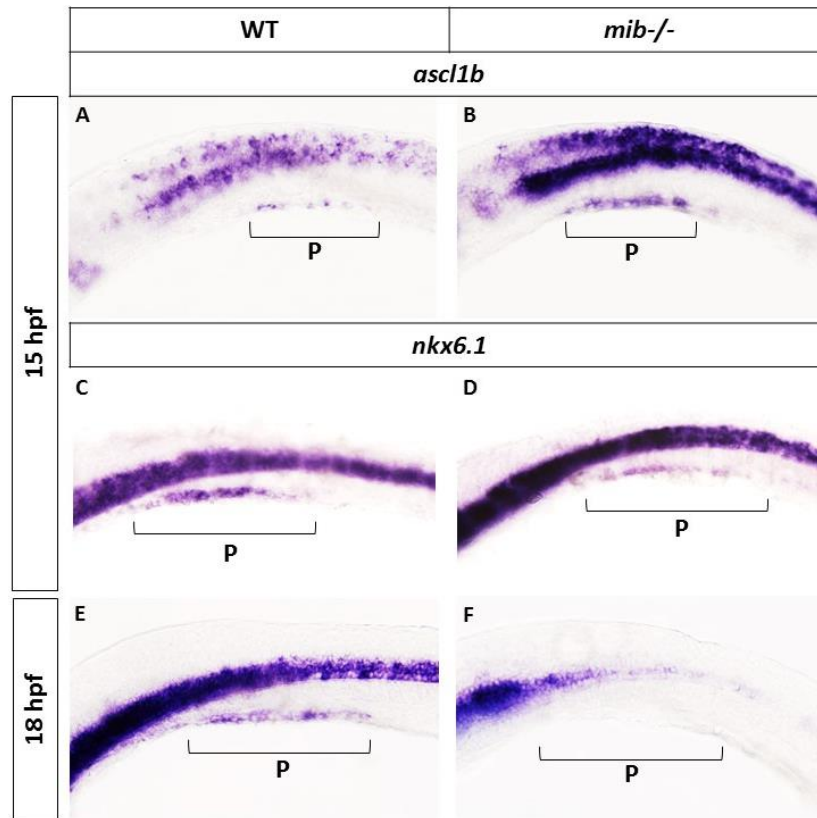


Figure 26: *nkx6.1* et *ascl1b* sont régulées de façon opposée par la voie de signalisation Notch dans le bourgeon pancréatique dorsal. (A-F) : Hybridations *in situ* visibles montrant l'expression de *nkx6.1* (C-F) à 15hpf et à 18hpf et d'*ascl1b* (A-B) à 15hpf dans des embryons WT (A,C,E) et des embryons mutants mind bomb (*mib*^{-/-}) (B,D,F). (E). Dans le mutant *mib*^{-/-}, on observe une augmentation de l'expression d'*ascl1b* dans le pancréas et le système nerveux (B) et une diminution de l'expression de *nkx6.1* à 15hpf (D). L'expression de *nkx6.1* dans le pancréas est perdue à 18hpf (F). Toutes les vues sont latérales avec la partie antérieure à gauche. P : pancréas.

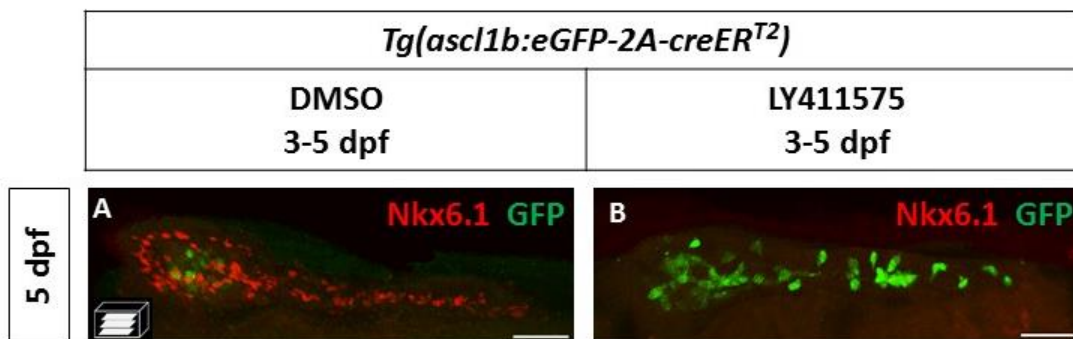


Figure 27: *nkx6.1* et *ascl1b* sont également régulées de façon opposée par la voie de signalisation Notch dans le bourgeon pancréatique ventral. (A-B) Immunodétection de la GFP et de la protéine Nkx6.1 à 5 dpf dans des embryons *Tg(ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2})* traités de 3 à 5 dpf avec du DMSO (A) ou avec un inhibiteur de la voie de signalisation Notch, le LY411475 (B). Dans les embryons traités au LY411575, on observe une perte de l'expression de Nkx6.1 et une apparition de l'expression d'*ascl1b:eGFP* au niveau des canaux pancréatiques. Toutes les vues sont ventrales avec la partie antérieure à gauche. Barre d'Echelle = 40 μM.

4. Effet de la voie de signalisation Notch sur l'expression d'*ascl1b* et de *nkx6.1*

La voie de signalisation Notch joue un rôle important dans le développement du pancréas chez la souris et le poisson-zèbre. Elle contrôle la différenciation des cellules pancréatiques en maintenant un *pool* de progéniteurs dans un état indifférencié afin d'empêcher une différenciation endocrine excessive [81, 102, 129, 130]. Chez la souris, Notch, en agissant sur l'expression de *Nkx6.1*, est aussi impliqué dans la ségrégation des progéniteurs multipotents en deux populations de cellules (les progéniteurs des cellules acinaires et les progéniteurs des cellules endocrines et canalaies) [9, 21].

Nous nous sommes posés la question de savoir si la ségrégation des domaines d'expression d'*ascl1b* et de *nkx6.1* ne serait pas contrôlée par la voie de signalisation Notch.

4.1. Inactivation de la voie de signalisation Notch : Perte de fonction

Nous avons ici analysé l'effet d'une inactivation de Notch sur l'expression de *nkx6.1* et d'*ascl1b*. L'expression des facteurs *ascl1b* et de *nkx6.1* a donc été étudiée dans le mutant *mind bomb* (*mib*^{-/-}) (Cf : intro4.1.1.3). Comme précédemment montré [1] (Cf 4.1.2.1.3), nous avons également observé une forte augmentation de l'expression d'*ascl1b* dans le système nerveux et dans le pancréas des embryons mutants *mib*^{-/-} à 15hpf (**Figure 26B**). Par contre, une perte de la voie Notch conduit au même stade à une diminution de l'expression pancréatique de *nkx6.1* (**Figure 26D**). A 18hpf, son expression est complètement perdue (**Figure 26F**). La voie de signalisation Notch est donc essentielle pour maintenir l'expression de *nkx6.1* dans le bourgeon pancréatique dorsal. Cependant son initiation ne dépend pas de la voie Notch. En effet, l'expression de *nkx6.1* n'est au départ pas affectée par une inactivation de la voie de signalisation Notch (13hpf) (**Figure 28D**) alors que, l'expression d'*ascl1b* est déjà augmentée (**Figure 28B**).

Des résultats similaires ont aussi été observés dans le bourgeon pancréatique ventral. En effet, un traitement de 3 à 5 jours avec un inhibiteur de la voie de signalisation Notch (LY411575)

mène aussi à une perte complète de l'expression de *Nkx6.1* et à une augmentation drastique de l'expression d'*ascl1b:eGFP* à 5 jours (**Figure 27B**). Ici aussi, l'initiation de l'expression de *Nkx6.1* dans le bourgeon pancréatique ventral ne dépend pas de la voie de signalisation Notch. En effet, son expression à 34hpf n'est pas perturbée dans les mutants *mib*^{-/-} (**Figure 28F**).

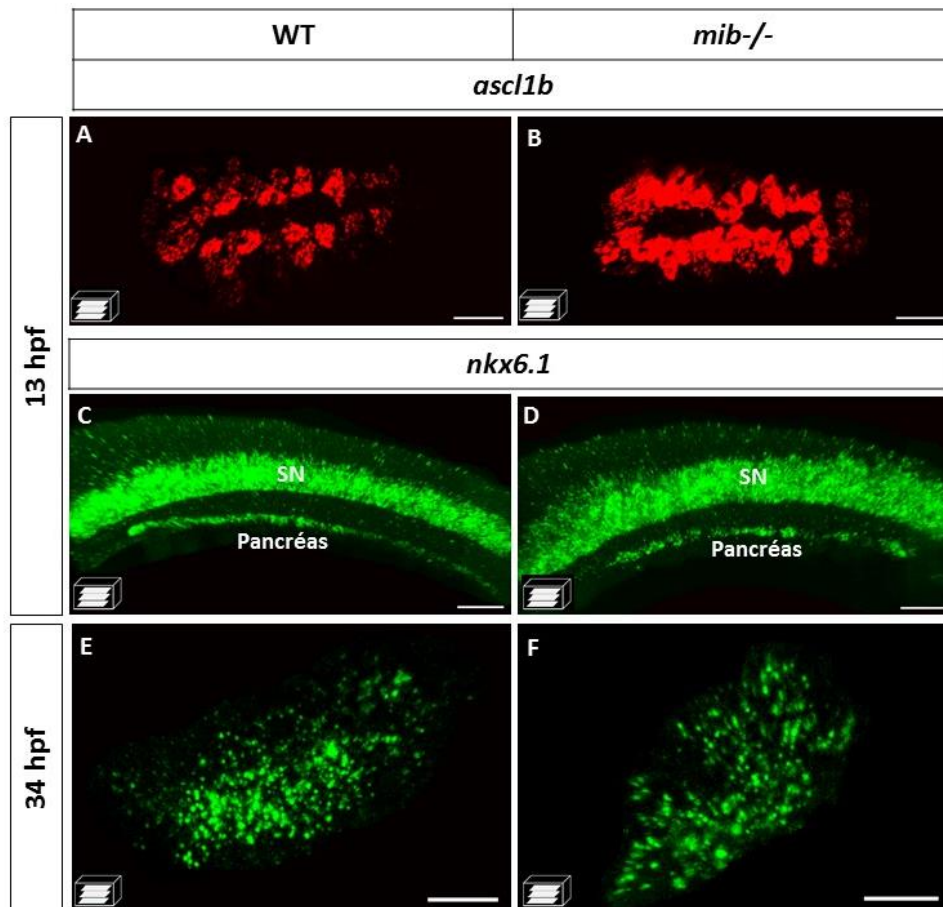


Figure 28: L'initiation de l'expression de *nkx6.1* est indépendante de la voie de signalisation Notch dans le bourgeon pancréatique dorsal et ventral. (A-D) Hybridations *in situ* fluorescentes montrant l'expression d'*ascl1b* (A-B) et de *nkx6.1* (C-D) à 13hpf dans des embryons WT (A,C) et des embryons mutants *mib*^{-/-} (B,D). (E-F) : Immunodétection de la protéine *Nkx6.1* à 34hpf dans un embryon WT (E) et un embryon mutant *mib*^{-/-} (F). Vues ventrales (A,B,E,F) ; Vues latérales (C-D) ; la partie antérieure à gauche. Barre d'Echelle = 40 μ M. SN ; système nerveux.

4.2. Activation de la voie de signalisation Notch : Gain de fonction

Nous avons ensuite étudié l'effet d'une surexpression de la voie de signalisation Notch sur l'expression d'*ascl1b* et de *nkx6.1* dans le bourgeon pancréatique dorsal. Pour ce faire, une lignée transgénique (*Tg(hsp70:Gal4)*) exprimant le gène *gal4* sous le contrôle d'un promoteur inductible a été croisée avec une seconde lignée transgénique (*Tg(UAS:NICD)*) dans laquelle l'expression du domaine intracellulaire de Notch (NICD) dépend de l'expression de Gal4 [91]. Dans le double transgénique, un choc thermique va induire l'expression de Gal4 qui va, en se liant sur la séquence UAS, activer l'expression du domaine intracellulaire de Notch.

Lorsque le choc thermique est réalisé à 11hpf (juste avant la formation du bourgeon pancréatique dorsal), nous observons une perte complète de l'expression d'*ascl1b* (**Figure 29B**) avec une augmentation simultanée de *nkx6.1* dans les doubles transgéniques (**Figure 29D**). Cette augmentation est encore plus importante à 30hpf (**Figure 29E**). Notre hypothèse est donc la suivante : lorsque la voie de signalisation Notch est surexprimée, la différenciation des cellules endocrines est bloquée et nous n'observons pas d'expression d'*ascl1b*. Comme les progéniteurs pancréatiques marqués par *Nkx6.1* continuent de proliférer mais ne se différencient pas, leur nombre augmente au cours du développement pancréatique.

En conclusion, toutes ces données montrent que la voie de signalisation Notch réprime l'expression d'*ascl1b* et maintient l'expression de *nkx6.1*. Par contre, l'initiation de *nkx6.1* est indépendante de la voie de signalisation Notch dans le bourgeon pancréatique dorsal et ventral.

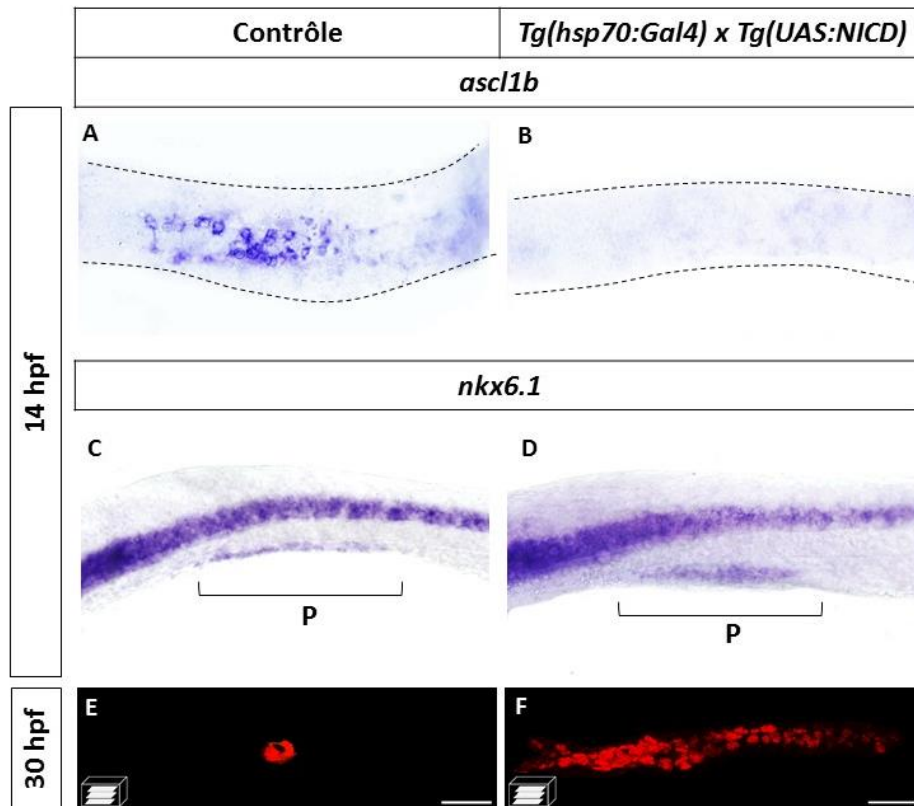


Figure 29: *nkx6.1* et *ascl1b* sont régulées de façon opposée par la voie de signalisation Notch dans le bourgeon pancréatique dorsal. (A-D) : Hybridations *in situ* visibles montrant l'expression de *nkx6.1* (C-D) et d'*ascl1b* (A-B) à 14hpf dans des embryons contrôles simples transgéniques (A,C) et dans des embryons doubles transgéniques (*Tg(hsp70 :Gal4)xTg(UAS :NICD)*) (B,D). La surexpression de NICD induit une perte de l'expression d'*ascl1b* (B) et une augmentation de l'expression de *nkx6.1* (D) à 14hpf dans le pancréas. (E-F) : Immunodétection de Nkx6.1 à 30hpf dans des embryons contrôles simples transgéniques (E) et dans des embryons doubles transgéniques (*Tg(hsp70 :Gal4)xTg(UAS :NICD)*) (F). L'augmentation de l'expression de Nkx6.1 est encore plus importante à 30hpf (F). Les embryons ont tous subi un choc thermique de 20 min à 11hpf. Vues ventrales (A,B,E,F) ; Vues latérales (C-D) ; la partie antérieure à gauche. Barre d'Echelle = 40 µM. P : pancréas.

5. Comparaison des cellules *nkx6.1+* avec les NRCs (Notch responsive cells)

Nkx6.1 est dépendant de la voie Notch pour maintenir son expression. Afin de déterminer à quel moment la voie de signalisation Notch est active dans les cellules *nkx6.1+*, nous avons comparé la localisation des NRCs (= Notch Responsive Cells) avec les cellules Nkx6.1+ dans deux lignées transgéniques (*Tg(TP1:VenusPest)* [77] ou *Tg(TP1:eGFP)* [19]). Dans ces lignées, les marqueurs fluorescents (VenusPest ou GFP) sont sous la dépendance d'une séquence de régulation (TP1) contenant des sites de liaison pour RBP-jk. L'expression de la GFP ou de la Venus est donc effective lorsque le domaine intracellulaire de Notch (NICD), lié à son cofacteur RBP-jk, fixe les sites de la séquence *Tp1*. De cette façon, nous pouvons détecter les cellules dans lesquelles la voie de signalisation Notch est activée.

Au début de la formation du bourgeon pancréatique dorsal (14hpf), Notch n'est activée que dans une sous-population de cellules Nkx6.1+ (**Figure 30A**). Trois heures plus tard (17hpf), la majorité des cellules Nkx6.1+ présentent une activité Notch (**Figure 30B**).

De façon similaire, au début de la formation du bourgeon pancréatique ventral (38hpf), la voie de signalisation Notch n'est activée que dans une sous-population de cellules Nkx6.1+ (**Figure 30C**). Plus tard, à 65hpf, le nombre de cellules Nkx6.1+ qui montre une activité Notch a augmenté (**Figure 30D**). A 4 jours, toutes les cellules Nkx6.1+ des canaux intra-pancréatiques (CIP) répondent à la voie de signalisation Notch. Par contre, les cellules des canaux extra-pancréatiques (CEP), marquée aussi par Nkx6.1, ne présentent pas d'activité Notch (**Figure 30E**).

En conclusion, ces résultats montrent que dans le bourgeon pancréatique dorsal et ventral, les cellules *nkx6.1+* acquièrent progressivement une activité Notch, essentielle pour maintenir son expression.

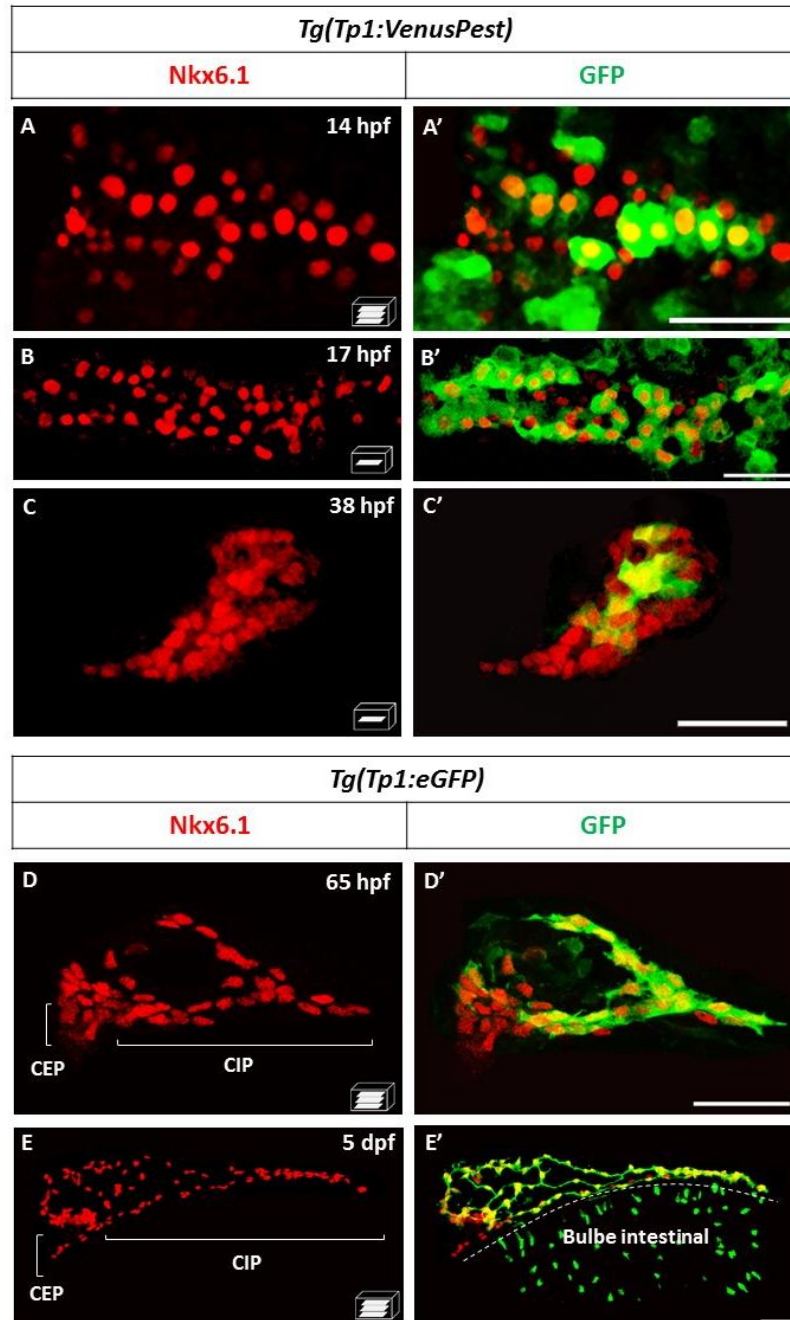
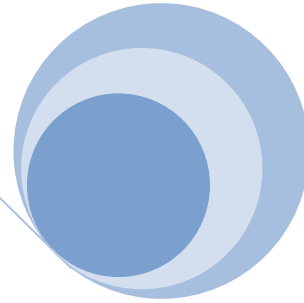
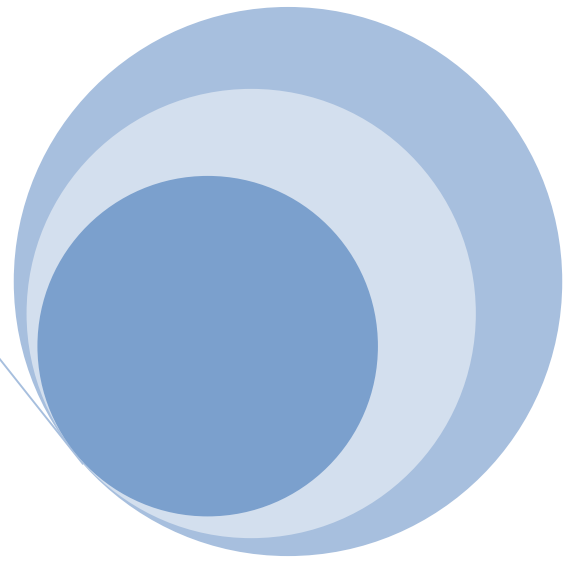
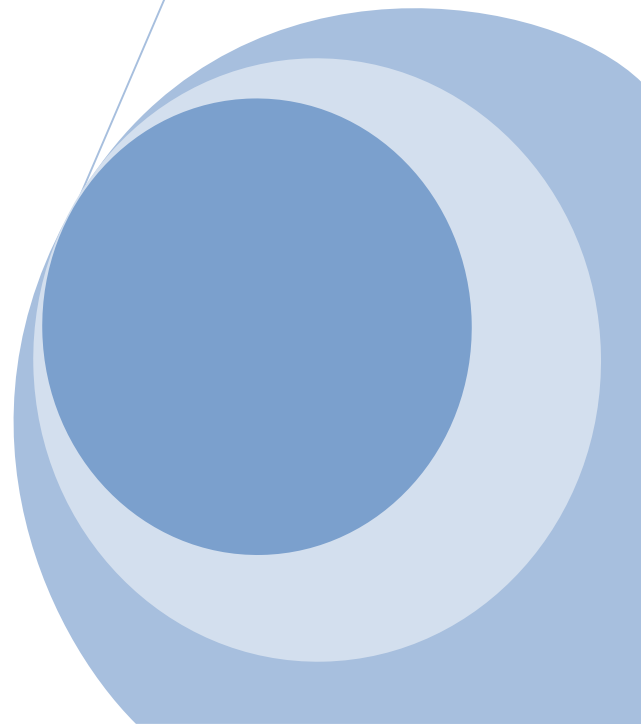


Figure 30: Le domaine d'expression pancréatique de Nkx6.1 inclus les NRCs. (A-E) Immunodétection de la protéine Nkx6.1 et de Venus dans des embryons *Tg(TP1 :VenusPest)* (A-C) ou de la GFP dans des embryons *Tg(TP1 :eGFP)* (D-E) à 14hpf (A), 17hpf (B), 38hpf (C), 65hpf (D) et 5dpf (E). Toutes les vues sont ventrales avec la partie antérieure à gauche. Barre d'Echelle = 40 µM. CEP : canaux extrapancréatiques ; CIP : canaux intrapancréatiques



Conclusions, Discussions et Perspectives



1. Conclusions et discussions

Dans cette étude, nous avons généré deux lignées transgéniques, *Tg(Tol2-BAC((nkx6.1 :eGFP))* et *Tg(Tol2-BAC(ascl1b:eGFP-2A-CreERT2))*, renommées respectivement *Tg(nkx6.1 :eGFP)* et *Tg(ascl1b:eGFP-2A-CreERT2)*, qui récapitulent l'expression endogène des gènes *nkx6.1* et *ascl1b*. Par des expériences de traçage de lignée (à « court terme » basée sur la stabilité de la GFP et basée sur le système Cre/loxP), nous avons déterminé le destin des cellules *ascl1b+* et des cellules *nkx6.1+* durant le développement pancréatique. Nous avons ainsi montré que *Nkx6.1* marquent une population de progéniteurs multipotents qui donnent naissance à toutes les lignées pancréatiques (cellules endocrines du bourgeon pancréatique dorsal et ventral, acinaires et canaux) alors qu'*Ascl1b* ne marque que les précurseurs de la lignée endocrine du bourgeon pancréatique dorsal et ventral.

1.1. La différenciation endocrine du bourgeon ventral présente des similitudes et des différences avec la cascade de différenciation des cellules endocrines du bourgeon dorsal

De façon assez surprenante, *Ascl1b* qui marque les précurseurs endocrines, commence à être exprimé dans la future région pancréatique à 10hpf [1], plus d'une heure avant l'apparition de *Nkx6.1* (11.5hpf) [3] qui est à ce jour le premier marqueur des progéniteurs pancréatiques multipotents connus. Cette observation amène le concept intéressant que les premières cellules localisées dans la future région pancréatique acquièrent une identité endocrine avant d'acquérir une identité pancréatique. Cependant, cette situation semble être restreinte au bourgeon pancréatique dorsal puisque *nkx6.1* est exprimé dès le début de la formation du bourgeon ventral alors que l'expression d'*ascl1b* n'est détectée que bien plus tard dans les précurseurs des cellules endocrines tardives.

Contrairement au bourgeon dorsal, la cascade de différenciation des cellules endocrines du bourgeon pancréatique ventral n'a encore été que très peu approfondie. Si on compare les mécanismes moléculaires contrôlant la différenciation des cellules endocrines du bourgeon dorsal avec ce qui est déjà connu dans le bourgeon ventral, on constate bon nombre de points communs.

Ainsi, de nombreux facteurs de transcription importants pour la différenciation des cellules endocrines du bourgeon dorsal, comme par exemple *Ascl1b*, *Neurod1*, *Isl1*, *Pdx1* ou *HB9*, sont aussi exprimés lors de la différenciation des cellules endocrines du bourgeon ventral [1, 74, 131]. De plus, la signalisation Delta-Notch contrôle la différenciation des cellules endocrines aussi bien dans le bourgeon dorsal que dans le bourgeon ventral en réprimant l'expression de deux facteurs de transcription de type ARP/ASCL : *Neurod1* et *Ascl1b* [1]. Dans les deux cas, le blocage de cette voie de signalisation conduit à une différenciation endocrine excessive [19, 77].

Malgré ces similarités, la cascade de différenciation des cellules endocrines du bourgeon ventral présente aussi des différences. Ainsi par exemple, le facteur de transcription *Isl1* dans le bourgeon ventral n'a pas le même rôle que dans le bourgeon dorsal. Une inactivation d'*isl1* conduit à une perte des cellules productrices de glucagon et à une diminution du nombre de cellules exprimant la somatostatine et l'insuline dans le bourgeon dorsal. Dans le bourgeon ventral, son inactivation mène, par contre, à une forte diminution du nombre de cellules produisant la somatostatine mais n'a pas d'effet sur la maturation des cellules exprimant le glucagon et l'insuline [131].

Ils seraient donc intéressant de caractériser plus en détail les mécanismes moléculaires contrôlant la différenciation endocrine du bourgeon ventral et éventuellement de la comparée avec la deuxième vague de différenciation chez la souris et voir si la différenciation endocrine qui a lieu au niveau des canaux pancréatiques en condition normal est la même qu'en condition de régénération.

1.2. **Nkx6.1 et Ascl1b sont d'abord co-exprimés dans le bourgeon pancréatique dorsal mais rapidement leur domaine se sépare.**

Après une expression qui se chevauche transitoirement dans le bourgeon pancréatique dorsal, le domaine d'expression de *nkx6.1* et d'*ascl1b* se sépare rapidement. Une répression mutuelle entre *Ascl1b* et *Nkx6.1* aurait pu expliquer la séparation des deux domaines d'expression dans deux populations de cellules, les progéniteurs pancréatiques et les précurseurs endocrines. Ce phénomène a en effet déjà été observé dans plusieurs tissus [9, 132, 133]. Ainsi, par exemple, dans le pancréas (cf introduction 4.2.1.1) chez la souris, des interactions antagonistes entre *Ptfla* et *Nkx6.1* conduisent à la séparation des progéniteurs pancréatiques multipotents en deux populations de cellules : les précurseurs des cellules acinaires et les précurseurs des cellules canalaire et endocrines [9]. Cependant, la cause de cette séparation n'est ici pas la conséquence d'une répression mutuelle entre *Ascl1b* et *Nkx6.1*. En effet, une perte de fonction dans le bourgeon dorsal de l'un des deux facteurs (Mutant *nkx6.1*^{-/-} ou *ascl1b*^{-/-}) n'augmente par l'expression de l'autre facteur (*Ascl1b* ou *Nkx6.1*).

Nous avons montré ici que la séparation des deux domaines d'expression est en fait due à une action opposée de la voie signalisation Notch sur l'expression d'*ascl1b* et de *nkx6.1*.

Par des expériences de perte et de gain de fonction, nous avons définitivement prouvé que la voie de signalisation Notch réprime l'expression d'*ascl1b* [1]. Ainsi, si la voie Notch est inactivée, l'inhibition de l'expression d'*ascl1b* et de *neurod1* [1] est levée. Ils déclenchent donc la cascade de différenciation endocrine dans les progéniteurs pancréatiques. Comme les cellules se différencient de manière excessive en cellules endocrines, nous observons un appauvrissement du pool de progéniteurs et une augmentation des précurseurs endocrines. Par contre, quand la voie de signalisation Notch est hyper-activée, elle réprime l'expression d'*ascl1b* et probablement l'expression de *neurod1*. Comme la cascade de différenciation endocrine est bloquée par l'inhibition d'*ascl1b* et de *neurod1*, les progéniteurs pancréatiques ne se différencient pas en cellules endocrines. Ils restent dans un état indifférencié. L'étude de Flasse et al. confirme ce résultat puisque dans le double morphant *ascl1b/neurod1*, la différenciation des cellules endocrines est aussi bloquée [1]. Dans les deux cas, nous n'observons pas de cellules endocrines matures.

En parallèle, nous avons également montré que Notch régule de façon opposée l'expression de *nkx6.1* puisque'une inactivation de Notch conduit à une diminution de l'expression de *nkx6.1*. Deux modèles peuvent être envisagés pour expliquer l'effet de Notch sur l'expression de *nkx6.1*. Dans le premier modèle, l'augmentation ou la diminution de l'expression de *nkx6.1*, observée dans les expériences de pertes et de gain de fonction, est une conséquence indirecte de l'effet de Notch sur le pool de progéniteurs : Ainsi, quand Notch est inactivé, les cellules se différencient donc de manière excessive en cellules endocrines. En conséquence, nous observons un appauvrissement du pool de progéniteurs. Comme Nkx6.1 marque les progéniteurs pancréatiques, l'expression de *nkx6.1* diminue également (**Figure 1A**) Par contre, quand la voie de signalisation Notch est hyper-activée, la cascade de différenciation endocrine est bloquée et les progéniteurs ne se différencient pas, ce qui cause une augmentation du pool de progéniteurs. En conséquence, nous observons une augmentation de l'expression de *nkx6.1* (**Figure 1B**).

Dans le deuxième modèle, Notch contrôle le pool de progéniteurs en agissant sur l'expression de *nkx6.1* (**Figure 2**). Plusieurs résultats supportent ce modèle. D'une part, Nkx6.1 a pour rôle d'agir sur l'établissement ou la maintenance du pool de progéniteurs dans le bourgeon dorsal. Ainsi, une inactivation de ce facteur conduit à une diminution du pool [3]. D'autre part, nous avons également montré que les cellules Nkx6.1 prolifèrent. Il serait intéressant de vérifier si Nkx6.1 régule la masse de progéniteurs en induisant leur prolifération. Par exemple, chez la souris, Sander a montré que Nkx6.1 régule la masse des cellules bêta en induisant leur prolifération [134]. De plus, une surexpression de Notch conduit à une augmentation de l'expression de *nkx6.1* et des progéniteurs pancréatiques puisqu'ils ne se différencient pas en cellules endocrines. Est-ce que Nkx6.1 induit la prolifération des progéniteurs pancréatiques chez le poisson-zèbre ? Pour confirmer cette hypothèse, deux expériences peuvent être réalisés. D'une part, nous pourrions regarder si les progéniteurs pancréatiques prolifèrent toujours dans le mutant *nkx6.1*^{-/-}. D'autre part, en bloquant Notch dans les morphants *nkx6.1*, les progéniteurs pancréatiques ne devraient plus augmenter si leur prolifération dépend de Nkx6.1.

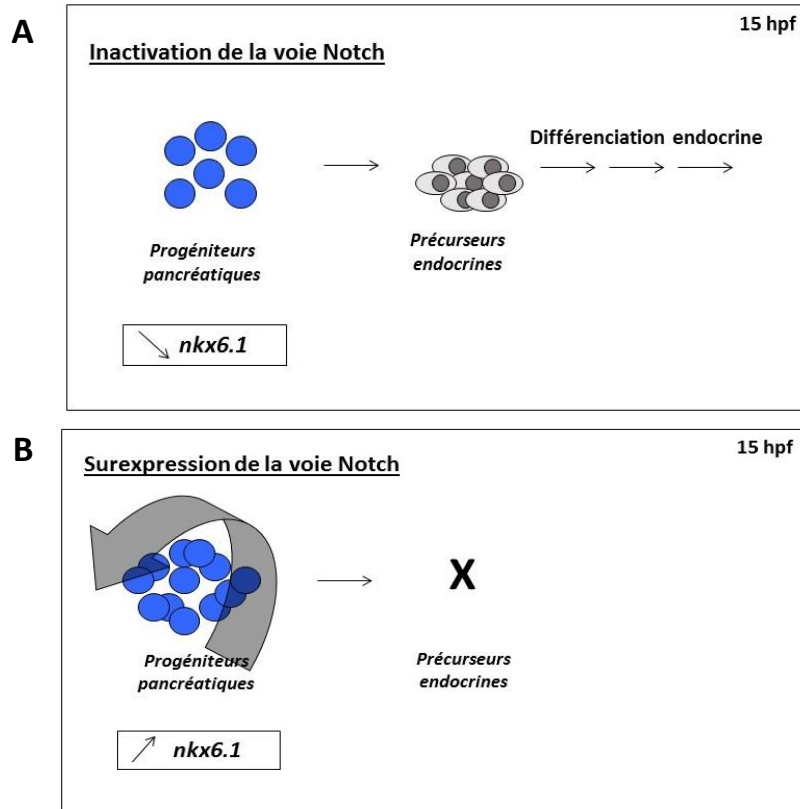


Figure 1 : Modèle 1. (A) La voie de signalisation contrôle la différenciation endocrine en maintenant un pool de progéniteurs dans un état indifférencié. Une inactivation de la voie de signalisation Notch conduit à une différenciation endocrine excessive, ce qui se caractérise par un appauvrissement du pool de progéniteurs. Comme *Nkx6.1* marque les progéniteurs pancréatiques et que ceux-ci partent en différenciation, l'expression de *nkx6.1* diminue. (B) La surexpression de la voie Notch bloque la différenciation endocrine, ce qui induit une augmentation du pool de progéniteurs. Par conséquent, on observe une augmentation de *nkx6.1*.

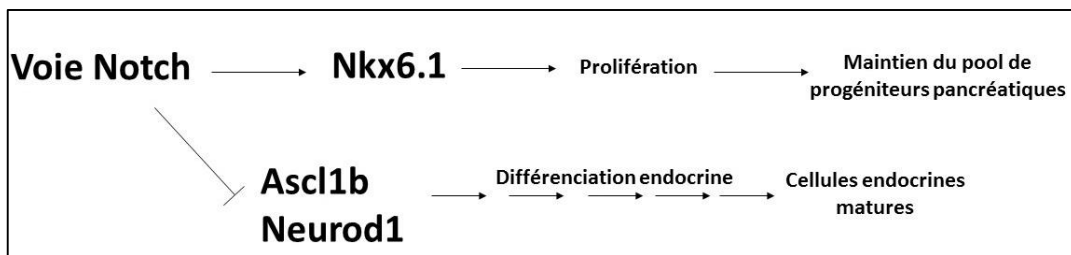


Figure 2 : Modèle 2. Notch contrôle le pool de progéniteurs pancréatiques en maintenant l'expression de *nkx6.1* et en réprimant l'expression d'*ascl1b* et de *neurod1* dans les progéniteurs pancréatiques. *Nkx6.1* agit sur le pool de progéniteurs en induisant leur prolifération. L'inhibition de l'expression d'*ascl1b* et de *neurod1* par Notch bloque la différenciation endocrine.

1.3. La voie de signalisation Notch maintient l'expression de *nkx6.1* mais n'est pas nécessaire pour son initiation

L'importance de la voie de signalisation Notch dans la régulation de l'expression de *Nkx6.1* avait déjà été démontrée chez la souris [9, 21, 117]. A la suite d'une inactivation de la voie de signalisation Notch, les cellules du tronc dans l'épithélium pancréatique perdent l'expression de *Nkx6.1* et acquièrent une identité acinaire. Inversement, une surexpression de la voie Notch favorise l'expression de *Nkx6.1* et exclut l'expression de *Ptf1a* dans les progéniteurs pancréatiques [9]. L'étude de Jensen a montré par Chip-seq que la voie de signalisation Notch (via RBJ-jK) peut agir directement sur l'expression de *Nkx6.1* à E12.5 et E15.5 mais plus à E17.5. Le contrôle de *Nkx6.1* par la voie de signalisation Notch semble donc limité dans le temps [117]. Pour voir si la voie de signalisation Notch agit directement sur l'expression de *Nkx6.1*, il serait intéressant de voir si la région sur laquelle se lie RBP-jk chez la souris est aussi conservée chez le poisson-zèbre.

En conclusion, comme chez la souris, nous avons montré chez le poisson-zèbre que la voie de signalisation Notch peut maintenir l'expression de *Nkx6.1* dans les deux bourgeons pancréatiques. En plus, nous avons montré qu'il n'est pas nécessaire pour son initiation.

Ce résultat est aussi en accord avec les résultats d'expériences que nous avons obtenus avec les lignées transgéniques (*Tg(Tp1 :VenusPest)* et *Tg(Tp1 :eGFP)*) qui nous permettent de détecter une activité Notch. Nous avons, en effet, montré que les cellules *Nkx6.1+* acquièrent une activité Notch progressivement au cours du développement pancréatique. Ainsi, dès le début de la formation du bourgeon pancréatique dorsal, seule une sous-population de cellules *Nkx6.1+* présente une activité Notch. Il faut attendre trois heures plus tard pour que la majorité des cellules qui expriment *Nkx6.1* soient Notch+. Ce phénomène est aussi observé dans le bourgeon ventral. Ce qui confirme bien que l'expression de *Nkx6.1* s'initie indépendamment de la voie de signalisation Notch.

1.4. Les cellules Nkx6.1 représentent une population de progéniteurs qui peut donner naissance à toutes les lignées pancréatiques, contrairement au NRCs

Les NRCs, représentent une population de progéniteurs récemment identifiée dans les canaux intra-pancréatiques. Des expériences de destin cellulaire ont montré qu'elles peuvent se différencier en cellules endocrines et en cellules canalaire mais pas en cellules acinaires [20]. Les cellules Nkx6.1 représentent une population de progéniteurs qui donnent, quant à elles, naissance, à tous les lignées pancréatiques (acinaires, canalaire et endocrines). Mais pourquoi, contrairement aux cellules Nkx6.1+, les NRCs ne donnent-elles pas naissance aux cellules acinaires ? En comparant les deux populations de cellules au début de la formation du bourgeon pancréatique ventral, nous avons constaté que les NRCs ne colocalise qu'avec une sous-population de cellules Nkx6.1+. Ce résultat pourrait expliquer pourquoi les NRCs, qui ne marquent qu'une petite partie du bourgeon ventral, ne peuvent se différencier qu'en cellules endocrines et en cellules canalaire alors que les cellules nkx6.1+, qui marquent tout le bourgeon ventral, peuvent donner naissance à toutes les lignées pancréatiques. Selon nos résultats, le bourgeon pancréatique ventral au départ est composé de deux populations de cellules (36hpf) : une population de cellules Ptf1a+/Nkx6.1+/NotchON et une population de cellules Ptf1a+/Nkx6.1+/NotchOFF. Nous avons émis l'hypothèse que les cellules Nkx6.1+/Ptf1a+/NotchON donnent naissance aux cellules canalaire et aux cellules endocrines tardives alors que les cellules Nkx6.1+/Ptf1a+/NotchOFF donnent naissance aux cellules acinaires. Cependant, ce modèle diffère des résultats de Wang et al. qui montrent que le bourgeon ventral est composé de deux populations de cellules qui ne se superposent pas : une population Ptf1a+ et une population de NRCs [20]. Les cellules Ptf1a+ entourent les NRCs. D'après eux, les cellules Ptf1a+ donnent naissance à la lignée acinaire et les cellules NRCs à la lignée canalaire et endocrine. Il est possible que cette différence soit due aux outils utilisés pour marquer les cellules NRCs: En effet, dans notre étude, nous avons utilisé la lignée transgénique (*Tp1bglob: VenusPEST*) qui nous permet de détecter les cellules « en temps réel » qui ont une activité Notch, tandis que Wang et collaborateurs ont utilisé une autre lignée transgénique (*Tp1bglob: hgmb1-mCherry*). Le transgénique que nous avons utilisé reflète plus la réalité car la demi-vie de la protéine VenusPEST est particulièrement courte [77]. Dès que les cellules n'ont plus d'activé Notch, rapidement on ne détecte plus la VenusPEST. La mCherry a, quant à elle, une demi-vie plus longue et persiste plus longtemps dans la cellule même si celle-ci

ne présente plus d'activité Notch. De plus, la mCherry met plus de temps à être détectée que la VenusPEST (données personnelles).

1.5. Nkx6.1 est aussi un marqueur des progéniteurs pancréatiques chez l'adulte

Chez l'adulte, l'expression de *nkx6.1* persiste dans le pancréas. Il est spécifiquement exprimé dans les cellules canalaire et dans les cellules centro-acinaires (CACs) (Isabelle Manfroid). Une analyse transcriptomique des cellules *nkx6.1 :eGFP* indique qu'elles expriment aussi d'autres gènes connus pour être des marqueurs de progéniteurs durant l'embryogenèse (*Pdx1*, *Sox9b*, *Hnf1b*, ...). Isabelle Manfroid a également montré que les cellules centro-acinaires sont capables de se répliquer et de donner naissance à d'autres cellules canalaire et à des cellules endocrines produisant l'insuline. De façon intéressante, *ascl1b* est également détecté dans le transcriptome des cellules *nkx6.1+ :eGFP* adultes, ce qui indique que certaines cellules canalaire initient un programme de différenciation endocrine et expriment donc transitoirement *ascl1b*. Ces résultats suggèrent qu'au moins certaines cellules canalaire peuvent se comporter comme progéniteurs pancréatiques chez adulte.

En conclusion, les cellules *Nkx6.1+* dans le pancréas représentent donc une population de progéniteurs multipotents chez l'embryon et chez l'adulte.

2. Perspectives

2.1. Rôle de Nkx6.1 dans le bourgeon pancréatique ventral

Le facteur Nkx6.1 étant exprimé dans le bourgeon pancréatique ventral puis dans les cellules canalaire, un des objectifs de ma thèse était de déterminer quel rôle ce facteur joue aussi dans la différenciation des cellules acinaires et canalaire puisque celui-ci n'était pas connu. Le mutant n'étant pas encore disponible à ce moment-là, nous avons étudié sa fonction en réalisant des expériences de perte de fonction par injection d'oligonucléotides anti-sens de type morpholinos (knock-down) dans des oeufs de poisson-zèbre au stade 1 cellule. Nous avons utilisé deux 2 morpholinos de « splicing » qui bloquent l'épissage normal de l'ARNm. Le premier ciblant la jonction intron1-exon2 et le deuxième ciblant la jonction exon2-intron2 du gène *nkx6.1*. Le phénotype que nous avons obtenu à 3 dpf était assez drastique. En effet, nous observions une réduction du tissu acinaire (**Figure 3B**) et une très forte réduction des canaux intra-pancréatiques et intra-hépatiques (**Figure 3D**). Malheureusement nous ne sommes pas parvenus à vérifier la spécificité des défauts observés chez les embryons injectés par une expérience dite de « rescue » par l'ARNm de Nkx6.1. En effet, il est possible que certains défauts pancréatiques observés à 3dpf soient dû à des effets non spécifiques liés aux morpholinos injectés. De plus, nous ne pouvions pas étudier le rôle de Nkx6.1 après 4 dpf car nos morpholinos n'étaient plus efficaces. Le mutant *nkx6.1*^{-/-}, maintenant disponible, va faciliter l'étude du rôle de Nkx6.1 dans la formation du tissu acinaire et canalaire. Nous pourrons comparer le phénotype pancréatique du morphant avec le phénotype du mutant. Ce mutant permettra aussi d'étudier le rôle de Nkx6.1 dans la formation des îlots secondaires qui émergent au niveau des canaux intrapancréatiques. Ce qui n'était pas possible avec les morpholinos puisque au-delà de 4 jours, ils ne sont plus efficaces.

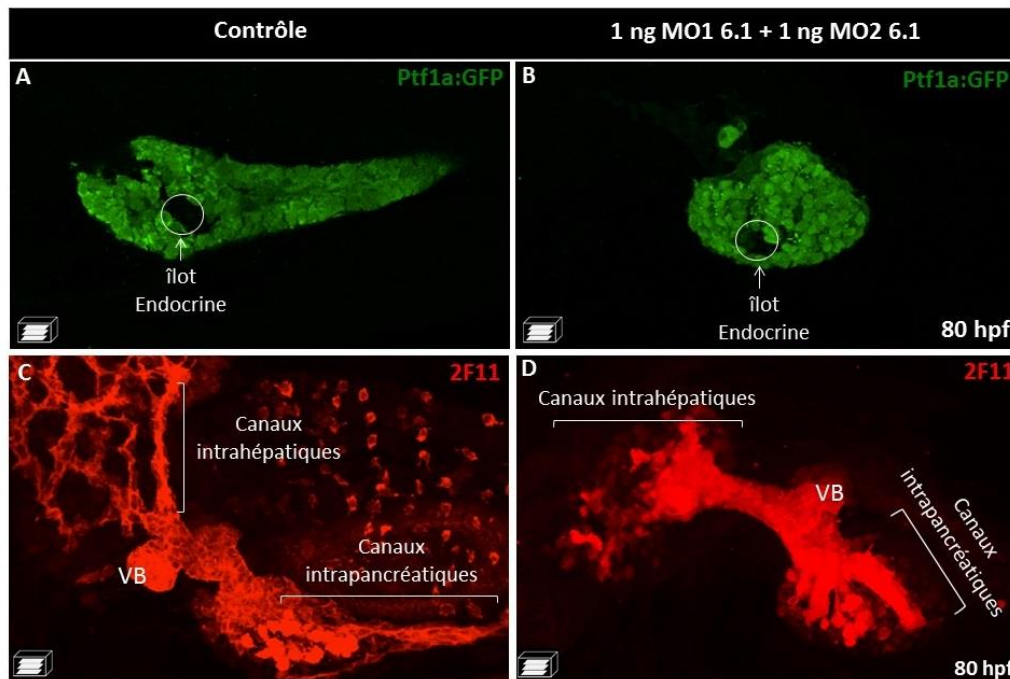


Figure 3 : Effet de la perte de fonction de *nkx6.1* sur la formation du tissu acinaire et canalaire. Le tissu acinaire est marqué par Ptf1a :eGFP et les canaux, par l'anticorps 2F11. (A-C) Embryons injectés avec un morpolino contrôle. (B) Dans les embryons injectés avec les deux morpholinos de splicing, le tissu acinaire (B) et les canaux intrapancréatiques et extrapancréatiques (D) sont fortement réduits (80hpf). Vues ventrales. La partie antérieure est à gauche. VB, vésicule biliaire.

Plus particulièrement, au cours de la formation du bourgeon pancréatique ventral, les progéniteurs de ce bourgeon se séparent progressivement en deux populations de cellules (60hpf) : les précurseurs de la lignée acinaire marquées par Ptf1a et les précurseurs de la lignée canalaire marquées par Nkx6.1 (60hpf). Le mutant *nkx6.1*^{-/-} et le mutant *ptf1a*^{-/-} étant maintenant disponibles, il serait intéressant de déterminer si la séparation des progéniteurs du bourgeon pancréatique ventral serait due dans ce cas-ci à une répression mutuelle entre Nkx6.1 et Ptf1a, comme c'est le cas chez la souris [9]. Si cette hypothèse est vérifiée, la fonction première des facteurs Nkx6.1 et Ptf1a dans le bourgeon pancréatique ventral seraient d'abord de déterminer le destin cellulaire en dirigeant les progéniteurs vers un destin acinaire ou canalaire.

2.2. Rôle de Nkx6.1 dans la régénération des cellules bêta chez la larve et chez le poisson-zèbre adulte

Contrairement aux mammifères, le poisson-zèbre adulte a la remarquable capacité de régénérer rapidement et spontanément les cellules bêta après leur destruction ciblée [61]. Les premiers travaux étudiant ce phénomène suggèrent une origine canalaire des nouvelles bêta en condition de régénération [63]. Au sein du laboratoire, Isabelle Manfroid et David Bergemann étudient en ce moment les mécanismes impliqués dans la régénération des cellules bêta à partir des canaux pancréatiques. Leur objectif est de comparer le transcriptome des cellules canalaire marquées par Nkx6.1 (obtenue par RNA-sequencing) en condition normale et en condition de régénération afin d'identifier les gènes candidats impliqués dans le processus de régénération.

Pour isoler les cellules canalaire en condition normale et en de régénération, ils ont croisé ma lignée transgénique Tg(*nkx6.1:eGFP*) avec la lignée Tg(*ins:nfsB-mCherry*) [61]. Le double transgénique permet d'isoler les cellules canalaire marquées par *nkx6.1:eGFP* et d'induire une destruction temporelle et ciblée des cellules bêta [61]. Pour réaliser l'ablation des cellules bêta, les doubles transgéniques sont traités au métronidazole. La nitroréductase (*nfsB*) (placé sous le contrôle du promoteur insuline) convertit cette prodrogue en un agent cytotoxique (**Figure 4**). En utilisant ce modèle, Pisharath et al. ont pu montrer qu'ils étaient en mesure de provoquer la mort cellulaire des cellules produisant l'insuline sans affecter les cellules voisines. Le poisson zèbre est ensuite capable de les régénérer efficacement et rapidement [61, 63].

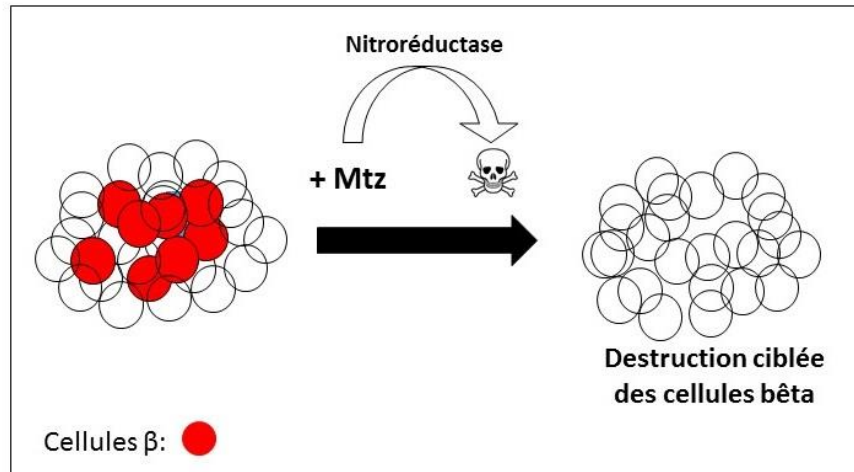


Figure 4 : Représentation schématique d'une ablation ciblée des cellules bêta. Lorsqu'on traite les embryons avec du métronidazole, la nitroréductase, placée sous le contrôle du promoteur de l'insuline, convertit cette prodrogue en agent toxique. Les cellules bêta, qui sont détectées par l'expression de la mcherry, sont alors détruites de façon ciblée.

Dès qu'ils auront obtenu le transcriptome des cellules canalaire après destruction ciblée des cellules bêta, ils pourront identifier les facteurs de transcription et les voies de signalisation impliqués dans la régénération des cellules bêta à partir des canaux pancréatiques. Avec ces résultats, nous pourrons mieux comprendre pourquoi le poisson-zèbre présente une remarquable capacité de régénérer les cellules bêta après leur ablation ciblée contrairement aux mammifères et voir comment on pourrait la stimuler. Ces travaux pourront peut-être aider à développer de nouvelles thérapies pour traiter les patients diabétiques.

The page features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each composed of concentric circles in different shades of blue. These circles are arranged in a vertical line, with the largest at the top and bottom, and a smaller one in the middle. Two thin blue lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the circles. The word 'Annexes' is centered in the middle of the page, underlined.

Annexes

Matériels et Méthodes

1. Lignées mutantes et lignées transgéniques utilisées :

Tg(hsp70l:Gal4)1.5^{kca4} renommé *Tg(hsp:Gal4)* and *Tg(UAS:myc-Notch1a-intra)^{kca3}* renommé *Tg(UAS:NICD)* [135], *Tg(Tp1bglob:eGFP)^{um14}* renommé *Tg(Tp1:eGFP)* [19], *Tg(TP1bglob:VenusPest)^{S940}* renommé *Tg(TP1:VenusPest)* [77], *Tg(Tp1bglob:H2BmCherry)^{S939}* renommée *Tg(Tp1:H2BmCherry)* [77], *Tg(ubi:loxP-EGFP-loxP-mCherry)* renommé *ubi:Switch* [128]; *Tg(ubi:loxP-AmCyan-loxP-ZsYellow)* renommé *ubi:CSY* [127]. Mutant *Mind Bomb* [136] ; Mutant *ascl1b*^{-/-} (Alice Bernard); Mutant *nkx6.1*^{-/-} (Alice Bernard).

2. Traitement LY411575

Les embryons *Tg(nkx6.1:eGFP)* et les embryons *Tg(ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2})* ont été traitées de 3 à 5 dpf au LY411475 (10µM) (Medchemexpress). Le traitement au DMSO 1% (DiMéthylSulfOxide) sert de traitement contrôle. Le traitement a été remplacé tous les jours.

3. Traitement au 4-hydroxytamoxifène

Le 4-hydroxytamoxifène (4OHT, Sigma H7904) a été dissous dans du DMSO pour arriver à une concentration stock de 10mM et aliquotés. Les tubes ont ensuite été stockés dans le noir à -70°C et ne peuvent être décongelé qu'une seule fois. Les embryons ont été traités 5 fois de 11 à 15hpf dans de l'E3 contenant 10 µM de 4OHT et garder dans le noir à 28°C tout le temps du traitement. Après les traitements, les embryons ont été lavés avec de l'E3 frais et fixés à 48hpf ou 72hpf.

3. Génération des lignées transgéniques *Tg(nkx6.1:eGFP)*, *Tg(nkx6.1:eGFP-2A-creER^{T2})* ; *Tg(ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2})*

3.1. Préparations des milieux de culture

Milieux de culture *liquides* :

- **Le milieu Luria-Bertani (LB)** : Mélanger 10g de bactotryptone, de 5g d'extrait de levure et de 10 g de NaCl dans un litre d'eau distillée et autoclaver.
- **Milieu M9** : Mélanger 6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0.5 g NaCl dans un litre distillée et autoclaver.
- **Milieu M63 (5x)** : Mélanger 10 g de (NH₄)₂SO₄, 68 g de KH₂PO₄ et 2.5 mg de FeSO₄·7H₂O dans un litre d'H₂O distillée; Ajuster le pH à 7 avec du KOH et autoclaver.

Milieux de culture *solides* :

- **Milieu LB** : Dissoudre 15 g d'agar dans un litre de milieu liquide Luria-Bertani. Le milieu chaud est coulé dans des boîtes de Pétri et se solidifie par refroidissement.
- **Milieu M63 +** : Dissoudre 15 g d'agar dans 800 ml d'H₂O distillée stérile, autoclaver. Ajouter 200ml de milieu liquide 5xM63, 1 ml de MgSO₄·7H₂O 1M, 10 ml de galactose 20% (wt/vol), 5 ml de d-biotine 0.2 mg/ml (filtré), 4.5 ml de leucine 10 mg/ml (filtré) et 500 µl de l'antibiotique approprié (conc final de 12.5mg/ml). Le milieu chaud est réparti dans des boîtes de Pétri et se solidifie par refroidissement.
- **Milieu DOG** : Dissoudre 15 g d'agar dans 800 ml d'H₂O distillée stérile, autoclaver. Ajouter 200ml de milieu liquide 5xM63, 1 ml de MgSO₄·7H₂O 1M, 10 ml de DOG 20% (wt/vol), 10ml de glycérol 20%, 5 ml de d-biotine 0.2 mg/ml (filtré), 4.5 ml de leucine 10 mg/ml (filtré) et 500 µl de l'antibiotique approprié (conc final de 12.5mg/ml). Le milieu chaud est réparti dans des boîtes de Pétri et se solidifie par refroidissement.
- **Milieu MacConkey** : Dissoudre 25 g d'agar MacConkey dans 500 ml d'H₂O, 5 ml de galactose 20% (wt/vol), autoclaver et ajouter l'antibiotique. Le milieu chaud est ensuite réparti dans des boîtes de Pétri et se solidifie par refroidissement.

3.2. Préparation des cellules compétentes SW102

La veille, une colonie de bactéries SW102 est prélevée à l'aide d'un cure-dent stérile et déposée dans 5 mL de LB liquide dans lequel l'antibiotique approprié a été ajouté (la tétracycline dans ce cas-ci). La pré-culture est ensuite incubée à 32°C sous agitation toute la nuit. Le lendemain matin, 25ml de LB liquide (+tétracycline) est inoculée avec 500 µl de pré-culture. La culture bactérienne est alors incubée à 32°C pendant 4 à 5 heures. Dès qu'elle atteint une densité optique à 600nm de 0.5-0.6, la croissance cellulaire est arrêtée en plaçant la culture 1 à 2 min sur glace. A partir de cette étape, les cellules doivent rester un maximum sur glace. La culture bactérienne est centrifugée pendant 5min à 5000rpm à 0°C. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est resuspendu gentiment dans 10 ml de ddH₂O préalablement refroidie. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot bactérien est resuspendu dans 10ml de ddH₂O froide. Les cellules sont centrifugées une dernière fois. Après élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans environ 50µl ddH₂O froide. Les cellules compétentes SW102 sont stockées sur glace avant l'électroporation.

3.3. Transformation des cellules compétentes SW102 par le *BAC:nkx6.1* (Imagenes, DKEY-173K2) ou *BAC:ascl1b* (Imagenes, DKEY-265N18)

1 à 5 µg de BACs *:nkx6.1* ou BACs *:ascl1b* sont ajoutées dans 25 µl de cellules compétentes SW102. Le mélange est transféré dans une cuvette d'électroporation de 0.1cm (Biorad). Après l'électroporation (200ohms, 25µF et 1.75kV), les bactéries transformées sont transférées dans un eppendorf contenant 1 ml de LB liquide et incubées à 32°C pendant une heure. Après cette étape, elles sont étalées sur du milieu LB gélosé dans lequel un antibiotique adéquat (dans ce cas-ci, le chloramphénicol) a été ajouté. Les colonies bactériennes apparaissent après une nuit d'incubation à 32°C. Les bactéries qui n'ont pas intégré le BAC, qui n'ont donc pas le gène de résistance à l'antibiotique, sont éliminées.

Liste de primers

Primers utilisés pour amplifier la cassette <i>Galk</i> pour la construction n°1 BAC(<i>nkx6.1 :Galk</i>)	
O180S	5'-GTCCTGCTTCTTGCGCGATATTTAGTTAAAGTTGTAGTTTGTGCTTGGTTcctgttgacaattaatcatcgga-3'
O181AS	5'-TTAATTTTGACACTTGAAGAATCTGACAACCCATTTCCCGTTTCTTT tcagcactgtcctgctcctt-3'-3'
Primers utilisés pour amplifier la cassette <i>eGFP</i> pour la construction n°1 BAC(<i>nkx6.1 :eGFP</i>)	
O186S	5'-GTCCTGCTTCTTGCGCGATATTTAGTTAAAGTTGTAGTTTGTGCTTGGTTatggtgagcaagggcgaggag-3'
O187AS	5'-TTAATTTTGACACTTGAAGAATCTGACAACCCATTTCCCGTTTCTTTtactgtacagctcgtccatg-3'
Primers utilisés pour amplifier la cassette <i>Galk</i> pour la construction n°2 BAC(<i>nkx6.1 :Galk</i>)	
O180S	5'-GTCCTGCTTCTTGCGCGATATTTAGTTAAAGTTGTAGTTTGTGCTTGGTTcctgttgacaattaatcatcgga-3'
O253AS	5'-GCATCTCTCCAGTGTGGGCTTGCATAACTCCAGGCCAGAATATCGGGGTTtcagcactgtcctgctcctt-3'
Primers utilisés pour amplifier la cassette <i>eGFP</i> pour la construction n°2 BAC(<i>nkx6.1 :eGFP</i>)	
O186S	5'-GTCCTGCTTCTTGCGCGATATTTAGTTAAAGTTGTAGTTTGTGCTTGGTTatggtgagcaagggcgaggag-3'
O256AS	5'-GCATCTCTCCAGTGTGGGCTTGCATAACTCCAGGCCAGAATATCGGGGTTtactgtacagctcgtccatg-3'
Primers utilisés pour amplifier la cassette <i>eGFP-2A-creER^{T2}</i> pour la construction n°3 BAC(<i>nkx6.1:eGFP-2A-creER^{T2}</i>)	
O238S	5'-GTCCTGCTTCTTGCGCGATATTTAGTTAAAGTTGTAGTTTGTGCTTGGTTatggtcacaagaagaagcgtaagg-3'
O239AS	5'-GCATCTCTCCAGTGTGGGCTTGCATAACTCCAGGCCAGAATATCGGGGTTcaagctgtggcagggaaacct-3'
Primers utilisés pour amplifier la cassette <i>Galk</i> pour la construction n°2 BAC(<i>ascl1b :Galk</i>)	
O275S	5'-GCGCATTACTCGCAAACCTCCCCTCTATTTATCTATTTATTTACGCGACcctgttgacaattaatcatcgga-3'
O256AS	5'-CGAACCATGTGGTGAAGTCCAGCAGTTCTTGCTCCTCGGAGCTGAGATGCtcaagcactgtcctgctcctt-3'
Primers utilisés pour amplifier la cassette <i>eGFP-2A-creER^{T2}</i> pour la construction BAC(<i>ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2}</i>)	
O277S	5'-GCGCATTACTCGCAAACCTCCCCTCTATTTATCTATTTATTTACGCGACatggtgagcaagggcgaggag-3'
O278AS	5'-CGAACCATGTGGTGAAGTCCAGCAGTTCTTGCTCCTCGGAGCTGAGATGCtcaagctgtggcagggaaacct-3'
Primers utilisés pour amplifier la cassette <i>iTol2-amp</i>	
O215S	5'-TTCTCTGTTTTGTCCGTGGAATGAACAATGGAAGTCGAGCTCATCGCTccctgctcagccgggccaagt-3'
O216AS	5'-AGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGAACCCCTTGCGGCCGCATattatgatcctctagatcagatc-3'

Tableau 1: Liste des primers utilisés pour amplifier les cassettes *galk*, *eGFP*, *iTol2-amp* et *eGFP-2A-creER^{T2}*. Les 50 pb ajoutés aux primers pour permettre la recombinaison homologue sont indiqués en majuscule.

3.4. Insertion de la cassette *galK* dans le BAC:*nkx6.1* et dans le BAC :*ascl1b* par recombinaison homologue

Pour le BAC :*nkx6.1*, la cassette *galK* a soit été insérée dans l'exon1 du gène *nkx6.1* (construction 2 et construction 3) ou a remplacé toute la région codante du gène (construction 1). Pour le BAC :*ascl1b*, la cassette *galK* a été insérée dans l'exon 1 du gène *ascl1b*.

3.4.1. Amplification de la cassette *galK* par PCR

Les paires d'amorces utilisées sont reprises dans le tableau 1.

Mélange		Cycles		
ADN (1 à 2 ng)	x µl	Dénaturation initiale	95°C	5 min
Tampon de réaction 5x Kapa HiFi	20 µl	Dénaturation	98°C	20 sec
Mélange de dNTPs (10 mM)	3 µl	Hybridation	60-75°C	15 sec
Primers sens (10 µM)	3 µl	Elongation	72°C	30 sec/kb
Primer anti-sens (10 µM)	3 µl	Elongation finale	72°C	5 min
ADN Polymérase KaPa Hifi	2 µl			
Eau	x µl			
	100 µl			

Tableau 2: Protocole de PCR dans le cas de l'utilisation de l' « ADN polymérase Kapa Hifi ». La température d'hybridation a été calculée pour chaque paire d'amorces. Le temps d'élongation dépend de la taille du fragment amplifié.

3.4.2. Digestion du produit de PCR par l'enzyme Dnp1 à 37°C toute la nuit

3.4.3. Purification sur gel du produit de PCR (QIAquick Gel Extraction Kit ; Quiagen)

3.4.4. Electroporation de la cassette galK dans les cellules SW102 (BAC:nkx6.1) ou les cellules SW102 (BAC:ascl1b)

Des cellules SW102 (contenant le *BAC:ascl1b* ou *BAC:nkx6.1*) compétentes sont d'abord préparées de la façon suivante : La veille, des bactéries SW102(+*BAC:nkx6.1*) ou des bactéries SW102(+*BAC:ascl1b*) sont prélevées à l'aide d'un cure-dent stérile et déposées dans 5 mL de LB liquide dans lequel l'antibiotique approprié a été ajouté (le chloramphénicol). La pré-culture est ensuite incubée à 32°C sous agitation toute la nuit. Le lendemain matin, cette pré-culture (500µl) va servir à ensemercer 25ml de LB liquide (+chloramphénicol). Dès que la culture atteint une densité optique à 600nm de 0.55-0.6 (3-4h), la croissance cellulaire est arrêtée en plaçant la culture 1 à 2 min sur glace (la culture devra rester un maximum sur glace pendant tout le reste de la préparation). La culture bactérienne est ensuite incubée à 42°C pendant exactement 15 min pour induire l'expression des protéines de recombinaison. Après cette étape, la culture est centrifugée pendant 5 min à 3000rpm à 0°C. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est gentiment resuspendu dans 25 ml de ddH₂O préalablement refroidie. Après centrifugation, le surnageant est jeté et culot est resuspendu dans 25ml de ddH₂O. Après une nouvelle étape de centrifugation, le surnageant est de nouveau éliminé et le culot est resuspendu dans 50 µl de ddH₂O. Les cellules compétentes sont gardées sur glace juste qu'à l'électroporation.

Au moment de l'électroporation, on ajoute 10 à 30 ng de produits de PCR dans 25 µl de cellules compétentes. Le mélange est ensuite transféré dans une cuvette d'électroporation 0.1cm (biorad). Après l'électroporation (200ohms, 25µF et 1.75kV), les bactéries transformées sont transférées dans un tube contenant 1 ml de LB et incubées à 32°C pendant une heure. Après cette étape, les bactéries sont lavées deux fois avec du milieu liquide M9 de la façon suivante : on prélève 1 ml de culture qu'on centrifuge à 13200 RPM pendant 15 sec. Le surnageant est enlevé à la pipette et le culot est resuspendu dans 1 ml de de milieu M9 et recentrifugé. Cette étape de lavage est répétée encore 1 fois. Les bactéries (50µl, 100µl et 250µl) sont finalement étalées sur du milieu M63 gélosé +. Ce milieu contient notamment du galactose comme source de carbone et du chloramphénicol. Les colonies bactériennes apparaissent après 3 jours d'incubation à 32°C. Les bactéries peuvent ensuite être étalées sur du milieu MacConkey gélosé pour identifier les bactéries GalK+. En effet, sur ce milieu, elles apparaissent de couleurs roses (**Figure 1**). A cette étape-ci, toutes les colonies sont GalK +. La bonne insertion de la cassette a été vérifiée par PCR sur

colonies. C'est une PCR qui s'effectue directement sur une colonie bactérienne permettant ainsi un criblage rapide et fiable des clones transformés. La colonie est resuspendue directement dans le mélange réactionnel de la PCR. Durant les premières étapes de dénaturation, les cellules sont lysées et leur ADN est libéré dans le milieu réactionnel. L'ADN peut alors servir de matrice.



Figure 1: Etalement de bactéries sur le milieu Mac Conkey. Les bactéries Galk+ sont roses et les bactéries Galk- sont blanches.

3.5. Remplacement du gène Galk par la eGFP et/ou eGFP-2A-creER^{T2} dans le BAC :*nkx6.1* :Galk et le BAC :*ascl1b* :Galk par recombinaison homologue

3.5.1. Amplification de la cassette par PCR (cf :3.4.1)

3.5.2. Digestion du produit de PCR par l'enzyme Dnp1 à 37°C toute la nuit

3.5.3. Purification sur gel du produit de PCR (QIAquick Gel Extraction Kit ; Quiagen)

3.5.4. Electroporation de la cassette eGFP et/ou de la eGFP-2A-creER^{T2} dans les cellules SW102 (BAC:*nkx6.1* :Galk) ou les cellules SW102 (BAC:*ascl1b* :Galk)

Des cellules SW102(BAC :*nkx6.1* :*Galk*) ou des SW102(BAC :*ascl1b* :*Galk*) compétentes sont d'abord préparées comme décrit dans le paragraphe 3.4.4.

Au moment de l'électroporation, on mélange délicatement 200 ng de produits de PCR dans 25 µl de cellules compétentes fraîchement préparées. Le mélange est ensuite transféré dans une cuvette d'électroporation 0.1cm (biorad). Après l'électroporation (200ohms, 25µF et 1.75kV), les bactéries transformées sont transférées dans un tube contenant 10 ml de LB et incubées à 32°C pendant 4 à 5 heures. Après cette étape, les bactéries sont lavées deux fois avec du milieu M9 de la façon suivante : on prélève 1 ml de culture qu'on centrifuge à 13200 RPM pendant 15 sec. Le surnageant est enlevé à la pipette et le culot est resuspendu dans 1 ml de milieu M9 et recentrifugé. Cette étape de lavage est répétée encore 1 fois. Les bactéries (50µl, 100µl et 250µl) sont finalement étalées sur du milieu DOG. Ce milieu contient du glycérol comme source de carbone, du chloramphénicol et du 2-deoxygalactose. Les colonies bactériennes apparaissent après 3 jours d'incubation à 32°C. Les bactéries peuvent ensuite être étalées sur du milieu MacConkey gélosé pour identifier les bactéries *Galk*- . Sur ce milieu, elles apparaissent de couleurs blanches (**Figure 1**). A cette étape-ci, ne poussent que les bactéries qui ont perdu la cassette *galk*. La bonne insertion de la cassette a été vérifiée par PCR sur colonies.

3.6. Insertion de la cassette iTol2-amp dans le squelette du BAC :*nkx6.1* et du BAC :*ascl1b* par recombinaison homologue

3.6.1. Amplification de la cassette par PCR (cf :3.4.1)

3.6.2. Digestion du produit de PCR par l'enzyme Dnp1 à 37°C toute la nuit

3.6.3. Purification sur gel du produit de PCR (QIAquick Gel Extraction Kit ; Quiagen)

3.6.4. Electroporation de la cassette iTol2-ampicilline dans les cellules SW102 (BAC:*nkx6.1*) ou les cellules SW102 (BAC:*ascl1b*)

Des cellules compétentes SW102 (BAC) sont d'abord préparées comme décrit dans le paragraphe 3.4.

Au moment de l'électroporation, le produit de PCR (cassette *itol2-amp*) est mélangé avec 25 µl de cellules compétentes SW102. Le mélange est ensuite transféré dans une cuvette d'électroporation de 0.1cm (Biorad). Après l'électroporation (200ohms, 25µF et 1.75kV), les bactéries transformées sont transférées dans un tube contenant 1 ml de LB liquide et incubées à 32°C pendant une heure. Après cette étape, les bactéries sont étalées sur du milieu LB gélosé dans lequel les antibiotiques adéquats (dans ce cas-ci, le chloramphénicol et ampicilline) ont été ajoutés. Les colonies bactériennes apparaissent après une nuit d'incubation à 32°C. Les bactéries qui n'ont pas intégré la cassette *iTol2-amp*, qui n'ont donc pas les gènes de résistance aux antibiotiques, sont éliminées.

3.7. Maxipréparation

Les constructions (*Tol2-BAC(nkx6.1:eGFP)*), (*Tol2-BAC(nkx6.1:eGFP-2A-creER^{T2})*) et (*Tol2-BAC(ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2})*) sont ensuite préparées en grande quantité à partir d'une culture bactérienne de 100ml en utilisant le kit « Invitrogen HiPure Midiprep ». Le protocole de base a été modifié.

Du milieu LB liquide (100ml) contenant du chloramphénicol et de l'ampicilline est inoculé avec une colonie SW102 (*Tol2-BAC(nkx6.1:eGFP)*), une colonie SW102 (*Tol2-BAC(nkx6.1:eGFP-2A-creER^{T2})*) ou une colonie SW102 (*Tol2-BAC(ascl1b:eGFP-2A-creER^{T2})*) et incubé à 37°C sous agitation toute la nuit. Le lendemain matin, la culture bactérienne est centrifugée à 9000g à température ambiante et ce pendant 15 minutes. Pendant ce temps, les colonnes sont équilibrées avec le tampon d'équilibration (10ml). Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot bactérien est resuspendu dans 8ml de tampon de resuspension contenant de la RNase. Les bactéries sont ensuite lysées par ajout du tampon de lyse (8ml). Après 5 min, un tampon de neutralisation (8ml) est ajouté. Les tubes sont ensuite centrifugés à 12000g pendant 10 min. Seul le surnageant est récupéré et versé dans la colonne équilibrée. La colonne est

ensuite lavée avec 10 ml de tampon de lavage. Les BACs sont ensuite élués avec 5ml de tampon d'éluion préchauffé à 50°C et puis est précipité par ajout de 3.5ml d'isopropanol. Après une centrifugation de 30min, le surnageant est éliminé. Le culot est lavé avec 3 ml d'éthanol 70%. Après une dernière centrifugation de 5 min, le surnageant est éliminé et on laisse sécher le culot à l'air libre. Dès qu'il est sec, le culot est resuspendu dans 100 µl de ddH₂O. De petits aliquots de « 400 ng » de BACs sont préparées et stockées directement à -20°C.

3.8. Injection

3.8.1. Méthode

La veille de l'injection, on place 2 mâles et 2 femelles, séparés par une cloison, dans un bac de croisement. Le lendemain, la cloison est ôtée et l'eau est changée (**Figure 2**). Dès que le cycle lumineux commence, les femelles se mettent à pondre et les mâles fécondent immédiatement les œufs.

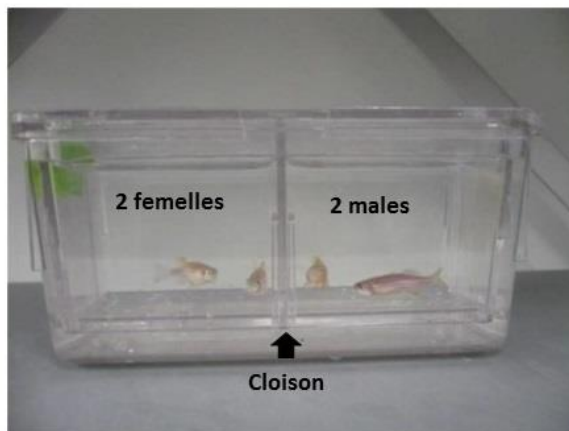


Figure 2 : Bac de croisement. La veille de l'injection, on place 2 mâles et 2 femelles, séparés par une cloison, dans un bac de croisement. Le jour de l'injection, la cloison est retirée et les œufs tombent au fond du bac.

Les œufs sont ensuite récoltés et placés dans une boîte de Pétri qui contient une lame porte-objet fixe qui servira de support lors de l'injection. Seuls les embryons qui sont au stade 1 cellule seront injectés.

Les aiguilles utilisées pour l'injection sont fabriquées à partir d'un capillaire de verre qui est d'abord chauffé (PB7 needle/electrode puller, Narishige, Japon) et puis étiré. L'aiguille est ensuite ouverte à l'aide d'une lame de scalpel. On réalise l'injection manuellement sous un binoculaire au moyen d'un microinjecteur (PICOSPRITZER II, Parker Instrumentation, Fairfield, NJ, USA) qui permet de régler la pression et le temps d'injection pour calibrer le volume de la goutte injectée. Les constructions sont injectées dans la cellule (**Figure 3**).

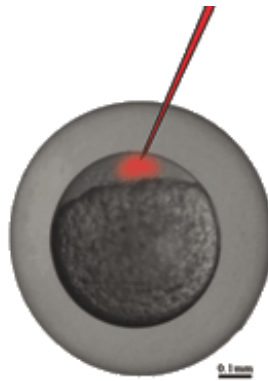


Figure 3 : Microinjection dans un œuf de poisson-zèbre au stade une cellule. L'injection s'effectue dans la cellule. De la rhodamine dextran (en rouge) est ajoutée à la solution à injecter.

Immédiatement après l'injection, les embryons sont transférés dans des boîtes de Pétri qui contiennent de l'E3 (5mM NaCl, 0.17mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, 10⁻⁵ % de bleu de méthylène) et un mélange de pénicilline et de streptomycine (pour empêcher les bactéries de contaminer le milieu). Les boîtes de Pétri sont ensuite stockées dans un incubateur à 28°C. Certaines manipulations ultérieures nécessitent l'absence de pigments. Dans ce cas, du PTU (propylthiouracil) (Sigma, St. Louis, USA) est rajouté au milieu. Cette molécule empêche l'apparition de pigments ce qui facilite l'analyse visuelle des embryons marqués. Le milieu doit être renouvelé tous les jours pendant 7 jours avant de les mettre en aquarium.

Lors de la microinjection, on ajoute de la rhodamine dextran aux solutions à injecter (**Figure 3**). On peut ainsi vérifier, au binoculaire à fluorescence, si l'injection a correctement été

réalisée et si la solution s'est bien répartie dans tout l'embryon. Les embryons morts, mal injectés ou non fécondés, sont ainsi éliminés. Les embryons injectés sont observés pendant plusieurs jours.

4. Immunohistochimie

Les embryons sont sacrifiés à l'aide de la tricaine et fixés dans de la PFA 2% pendant une nuit à 4°C ou pendant 4 heures à température ambiante. Le tampon de lavage est le PBSTr 0,3%. Pour que les anticorps puissent entrer dans les cellules, la peau et le sac vitellin doivent être enlevés et les tissus doivent être perméabilisés à l'aide du PBSTr 1%. Les embryons sont incubés 2h à température ambiante avec du tampon de blocage (PBSTr0,3%). Ensuite, les embryons sont incubés avec les anticorps primaires (**tableau 3**) dilués dans le tampon de blocage pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les embryons sont lavés plusieurs fois avec du PBSTr0,3%. Après l'étape de lavage, les embryons sont incubés 2h avec du tampon de lavage puis toute une nuit à 4°C avec les anticorps secondaires dilués dans du tampon de blocage. L'excès d'anticorps secondaires est enlevé avec plusieurs lavages au PBSTr0,3% et les embryons sont post-fixés avec de la PFA 1%.

Anticorps primaires	Dilutions
mCherry/dsRed, lapin, polyclonal (Living Colors DsRed Polyclonal Antibody, Clontech)	1:500
ZsYellow, lapin, polyclonal (The living colors anti-RCFP polyclonal pan from Clontech)	1:300
GFP, poulet (Aves lab)	1:1000
Nkx6.1, souris, monoclonal (clone F55A10)	1:20
Isl1, souris, monoclonal (Hybridoma bank)	1:50
Insulin, cochon d'inde (Dako)	1:500
Glucagon, souris (Sigma)	1:300
Somatostatine, lapin, polyclonal (MP Biomedicals)	1:300
2F11, souris, monoclonal (Abcam)	1:1000
Anticorps secondaires (Invitrogen)	1:500

Tableau 3: Anticorps utilisés

5. Test de prolifération

L'EDU (1mM EdU, DMSO 2%, phenolred 0,1%) est injecté dans le sac vitellin d'un embryon vivant. L'EDU se répartit alors rapidement à travers tout le corps. Afin de vérifier l'efficacité de l'injection, le colorant phénolred est injecté en même temps. Après l'injection, les embryons sont replacés pendant une heure dans un incubateur à 28°C. Une heure après l'injection, les embryons sont sacrifiés et fixés avec de la PFA 1%.

La révélation de l'EDU se fait grâce au kit Click-iT® EdU Alexa fluor 555. Après la révélation de l'EDU, une immunohistochimie classique peut suivre.

6. Synthèse des sondes

La sonde utilisée, complémentaire de l'ARNm du gène que l'on étudie, est une sonde antisens. Une sonde sens peut aussi être synthétisée et utilisée comme contrôle négatif. La sonde est synthétisée à partir de l'ADN linéarisé par une enzyme de restriction adéquate. L'ADN linéarisé est d'abord purifié par une extraction phénol-chloroforme (point 10). Il est ensuite transcrit par une ARN polymérase adéquate en présence de NTPs dont une petite quantité d'UTP sont marqués à la digoxigénine (stérol végétal reconnu par un anticorps spécifique qui n'affecte pas la capacité d'hybridation de la sonde (Chevalier, Yi et al. 1997) ou au DNP (dinitrophénol reconnu par un anticorps spécifique).

Le mélange de synthèse contient :

- 12 µl d'eau DEPC (Sigma, St. Louis, USA)
- 1 à 2 µg d'ADN linéarisé
- 2 µl de Dig/DNP-labelling mix 10X (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA)
- 2 µl de tampon de transcription 10X
- 1 µl d'inhibiteur de RNase (Fermentas, Germany)
- 2 µl de RNA polymérase du phage SP6, T7 ou T3

Après 2 heures d'incubation à 37°C, on ajoute 1 µl de DNase I (RNase free) et on incube 15 min à 37°C. La réaction est arrêtée avec 1 µl d'EDTA 0.5M pH=8. L'ARN est, quant à lui,

précipité dans un mélange qui contient 20 µg de glycogène, un dixième de volume d'acétate d'ammonium 5M et 2 volumes et demi d'éthanol RNase-free. La précipitation se fait pendant plusieurs heures à -70°C. Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot est lavé avec de l'éthanol 70% et séché à l'air libre. Une fois sec, il est suspendu dans 30 µl d'eau DEPC. Les sondes peuvent être conservées à -70°C après ajout d'1 µl d'inhibiteur de RNases et d'un volume de formamide.

Pour voir si la sonde a correctement été synthétisée, on peut préparer un gel de formaldéhyde et de MOPS. Ce gel est composé de 42.5ml d'eau DEPC dans lequel ont été dissous 0.75g d'agarose à chaud. 5 ml de tampon MOPS 10X et 2.75ml de formaldéhyde y sont ajoutés. On place 2 µl de sonde additionnée de 2 µl d'eau bidistillée et de 4 µl de tampon de chargement pendant 10 minutes à 80°C et puis sur glace. Avant de déposer la sonde dénaturée sur le gel, on ajoute 1µl de SYBRSafe. Un marqueur de poids moléculaire pour l'ARN est aussi utilisé (Invitrogen, USA).

7. Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est une technique qui permet de visualiser la localisation de transcrits spécifiques d'un gène au sein des cellules d'un embryon à un stade de développement donné.

7.1.Solution

- PBS 10 X : 0.8 % NaCl, 0.02 KCl, 0.2M de tampon PO₄ pH=7,3
- Tampon PO₄ pH=7.3 : 0.5M Na₂HPO₄, 0.5M NaH₂PO₄
- PBST 1X : PBS 1X, 0.1% Tween 20
- PFA 4% : 2g de paraformaldéhyde, 5 ml de PBS 10X, 45 ml d'eau bidistillée, 4 µl de NaOH 1M
- SSC 20X : 3M NaCl, 0.3 Na₃Citrate ajusté à pH=7 avec du HCl
- SSCT 2X : SSC 2X, 0.1% Tween 20
- SSCT 0,2X : SSC 0.2X, 0.1% Tween 20
- Mix d'hybridation – (Hyb mix -) : 50% de formamide, 5X SSC, 0.1% Tween 20 dans de

l'eau bidistillée et ajustée à pH=6 avec de l'acide citrique

- Mix d'hybridation + (Hyb mix +) : 50% de formamide, 5X SSC, 0.1% Tween 20, 50 µg/ml d'héparine et dans 500 µg/ml de Torula RNA dans de l'eau bidistillée et ajusté à pH=6 avec de l'acide citrique
- « Blocking buffer » : 2% de sérum de mouton, 2 mg/ml de BSA (Sigma, St. Louis, USA) dans du PBST
- « Staining buffer » : 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH=9.5, 0,1% de Tween 20
- « Staining solution » : 3,5 µl de NTB et 3,5 µl de BCIP par ml de « staining solution »
- MOPS 10X : 41.8 g de MOPS, 500 ml NaCl 100 mM, 300 ml d'eau bidistillée, 20 ml d'EDTA 500 mM pH=8, complété par de l'eau bidistillée jusqu'à un litre.
- TNT : 0,1 M Tris-HCl pH=7.5, 0.15 M NaCl, 0,5% Tween 20
- « Blocking buffer fluo » : TNT avec 0,5% de « blocking powder » provenant du kit Perkin Elmer TSATM Plus DNP (HRP) System

7.2.Hybridation *in situ* simple visible

7.2.1. Préparation des embryons

Les embryons sont déchorionés manuellement ou par un traitement à la pronase (= protéase qui hydrolyse le chorion). Après avoir atteint le stade de développement désiré, ils sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant minimum 2h à température ambiante ou pendant toute une nuit à 4°C. Les embryons sont ensuite lavés plusieurs fois avec du tampon PBST avant d'être déshydratés graduellement au méthanol. Le méthanol permet la conservation des embryons à - 20°C. Les embryons sont, ensuite, réhydratés progressivement dans du PBST.

7.2.2. Perméabilisation des embryons

Les embryons sont réhydratés progressivement dans du PBST. Ils sont ensuite digérés avec de la protéinase K (10µg/ml à 20µg/ml) (Merck, Germany) à température ambiante. Le temps d'incubation dépend du stade auquel on les a fixés (15 min / 24 heures). La protéinase K est éliminée par 2 rinçages au PBST. Les embryons sont, finalement, à nouveau fixés pendant 20 minutes dans du paraformaldéhyde 4% et puis lavés 5 fois avec du PBST.

7.2.3. Préhybridation et hybridation

Les embryons sont d'abord pré-hybridés 4h à 5h à 65°C dans 800 µl de Hyb mix+. Les embryons sont ensuite hybridés toute la nuit à 65°C dans 200 µl Hyb mix + auquel on ajoute 100 à 200 ng de sonde ARN antisens. Pour éliminer l'excès de sonde, les embryons sont ensuite lavés plusieurs fois :

- un lavage rapide dans du Hyb mix- à 65°C
- un lavage de 15 min à 65°C dans 75% Hyb mix-/ 25% 2 X SSC
- un lavage de 15 min à 65°C dans 50% Hyb mix-/ 50% 2 X SSC
- un lavage de 15 min à 65°C dans 25% Hyb mix-/ 75% 2 X SSC
- un lavage de 15 min à 65°C dans 2 X SSC
- Deux lavages de 30 min à 65°C dans 0,12 X SSC
- un lavage de 10 min à température ambiante dans 75% 0,2 X SSC/ 25% PBST
- un lavage de 10 min à température ambiante dans 50% 0,2 X SSC/ 50% PBST
- un lavage de 10 min à température ambiante dans 25% 0,2 X SSC/ 75% PBST
- un lavage de 10 min à température ambiante dans du PBST

7.2.4. Anticorps anti-DIG (ou anti-DNP)

Les embryons sont incubés dans du tampon de blocage pendant une à plusieurs heures à température ambiante et ensuite incubés dans une solution d'anticorps anti-DIG (ou anti-DNP), couplé à la phosphatase alcaline, diluée dans du tampon de blocage. Les embryons restent dans cette solution toute la nuit.

7.2.5. Révélation du marquage

Les embryons subissent huit lavages consécutifs de 10 minutes à température ambiante dans du PBST et trois lavages de 5 minutes dans le tampon de blocage. La révélation est réalisée dans du « staining solution » contenant les substrats NBT (Nitrobleu de tetrazolium) et BCIP (bromochloroindolophosphate). Les échantillons sont placés à l'obscurité. A partir de ce moment, les embryons sont surveillés au binoculaire. Le marquage apparaît au bout de quelques heures. Une fois le marquage jugé suffisant, on arrête la réaction grâce à une solution de PBST. Les embryons peuvent être stockés quelques jours dans cette solution à 4°C ou plus longtemps dans du

paraformaldéhyde 1% à 4°C.

7.3. Hybridation *in situ* double fluorescente

L'hybridation *in situ* double fluorescente permet de voir si 2 gènes colocalisent, c'est-à-dire sont exprimés dans le même tissu.

7.3.1. Préparation des embryons

7.3.2. Perméabilisation des embryons

7.3.3. Pré-hybridation et hybridation des embryons

(les 2 sondes sont incubées en même temps)

7.3.4. Lavages

7.3.5. Inactivation des peroxydases

voir
hybridation *in situ* simple

Les peroxydases endogènes sont inactivées par ajout de H₂O₂ 2% pendant 60 min. Après, les embryons sont lavés 4 fois 5 minutes à température ambiante dans 2 ml de TNT.

7.3.6. Préabsorption des anticorps anti-DIG-POD et anti-DNP-POD

Les embryons sont incubés pendant une à plusieurs heures dans du « tampon de blocage fluo » à température ambiante. Parallèlement, une préabsorption des 2 anticorps est réalisée. Chaque anticorps est incubé dans du « tampon de blocage fluo » contenant des embryons qui ont des âges différents et qui ont subi le même traitement que nos embryons à l'exception de l'étape d'hybridation à température ambiante pendant 2 à 3 heures.

7.3.7. Ajout de l'anticorps anti-DIG-POD (ou anti-DNP-POD) préabsorbé

Les embryons sont incubés toute la nuit à 4°C avec l'anticorps préalablement préabsorbé.

7.3.8. Révélation

Les embryons sont lavés plusieurs fois avec du TNT (solution saline). Ils sont ensuite

incubés 5 min dans un tampon « d'Amplification Diluent » (kit de Perkin Elmer), puis incubés 1h dans le tampon « d'Amplification Diluent » dans lequel on a ajouté le FITC couplé à la Tyramide (ou le Cy3 couplé à la tyramide). Les embryons sont ensuite lavés plusieurs fois au TNT, puis incubés dans du H₂O₂ 2% pour inactiver la peroxidase couplé au premier anticorps. Pour terminer, ils sont lavés plusieurs fois dans du TNT.

The page features a decorative graphic consisting of three overlapping blue circles of varying sizes, arranged in a diagonal line from the top right towards the bottom right. Two thin, light blue lines intersect at the top left and extend diagonally across the page, framing the circles and the title. The word "Bibliographie" is written in a bold, blue, sans-serif font and is underlined with a thick blue line.

Bibliographie

1. Flasse, L.C., et al., *Ascl1b and Neurod1, instead of Neurog3, control pancreatic endocrine cell fate in zebrafish*. BMC Biol, 2013. **11**: p. 78.
2. Masui, T., et al., *Early pancreatic development requires the vertebrate Suppressor of Hairless (RBPJ) in the PTF1 bHLH complex*. Genes Dev, 2007. **21**(20): p. 2629-43.
3. Binot, A.C., et al., *Nkx6.1 and nkx6.2 regulate alpha- and beta-cell formation in zebrafish by acting on pancreatic endocrine progenitor cells*. Dev Biol, 2010. **340**(2): p. 397-407.
4. Alanentalo, T., et al., *Cloning and analysis of Nkx6.3 during CNS and gastrointestinal development*. Gene Expr Patterns, 2006. **6**(2): p. 162-70.
5. Zhou, Q., et al., *A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis*. Dev Cell, 2007. **13**(1): p. 103-14.
6. Biemar, F., et al., *Pancreas development in zebrafish: early dispersed appearance of endocrine hormone expressing cells and their convergence to form the definitive islet*. Dev Biol, 2001. **230**(2): p. 189-203.
7. Kinkel, M.D. and V.E. Prince, *On the diabetic menu: zebrafish as a model for pancreas development and function*. Bioessays, 2009. **31**(2): p. 139-52.
8. Ober, E.A., H.A. Field, and D.Y. Stainier, *From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish*. Mech Dev, 2003. **120**(1): p. 5-18.
9. Schaffer, A.E., et al., *Nkx6 transcription factors and Ptfa function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors*. Dev Cell, 2010. **18**(6): p. 1022-9.
10. Hassan, B.A. and H.J. Bellen, *Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development?* Genes Dev, 2000. **14**(15): p. 1852-65.
11. Cabrera, O., et al., *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2334-9.
12. Chung, W.S. and D.Y. Stainier, *Intra-endodermal interactions are required for pancreatic beta cell induction*. Dev Cell, 2008. **14**(4): p. 582-93.
13. Chung, W.S., C.H. Shin, and D.Y. Stainier, *Bmp2 signaling regulates the hepatic versus pancreatic fate decision*. Dev Cell, 2008. **15**(5): p. 738-48.
14. Iype, T., et al., *The transcriptional repressor Nkx6.1 also functions as a deoxyribonucleic acid context-dependent transcriptional activator during pancreatic beta-cell differentiation: evidence for feedback activation of the nkx6.1 gene by Nkx6.1*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(6): p. 1363-75.
15. Collombat, P., et al., *Specifying pancreatic endocrine cell fates*. Mech Dev, 2006. **123**(7): p. 501-12.
16. Desgraz, R., C. Bonal, and P.L. Herrera, *beta-cell regeneration: the pancreatic intrinsic faculty*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(1): p. 34-43.
17. Field, H.A., et al., *Formation of the digestive system in zebrafish. II. Pancreas morphogenesis*. Dev Biol, 2003. **261**(1): p. 197-208.
18. Bertrand, N., D.S. Castro, and F. Guillemot, *Proneural genes and the specification of neural cell types*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(7): p. 517-30.
19. Parsons, M.J., et al., *Notch-responsive cells initiate the secondary transition in larval zebrafish pancreas*. Mech Dev, 2009. **126**(10): p. 898-912.
20. Wang, Y., et al., *Genetic inducible fate mapping in larval zebrafish reveals origins of adult insulin-producing beta-cells*. Development, 2011. **138**(4): p. 609-17.
21. Afelik, S. and J. Jensen, *Notch signaling in the pancreas: patterning and cell fate specification*. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2013. **2**(4): p. 531-44.
22. Kopp, J.L., et al., *Sox9+ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas*. Development, 2011. **138**(4): p. 653-65.
23. Pauls, S., et al., *Function and regulation of zebrafish nkx2.2a during development of pancreatic islet and ducts*. Dev Biol, 2007. **304**(2): p. 875-90.

24. Reichert, M. and A.K. Rustgi, *Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia*. J Clin Invest, 2011. **121**(12): p. 4572-8.
25. Garcia, M., et al., *Pancreatic duct secretion: experimental methods, ion transport mechanisms and regulation*. J Physiol Biochem, 2008. **64**(3): p. 243-57.
26. Brissova, M., et al., *Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy*. J Histochem Cytochem, 2005. **53**(9): p. 1087-97.
27. Wieczorek, G., A. Pospischil, and E. Perentes, *A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates)*. Exp Toxicol Pathol, 1998. **50**(3): p. 151-72.
28. Hauge-Evans, A.C., et al., *Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function*. Diabetes, 2009. **58**(2): p. 403-11.
29. Singh, V., et al., *Characterization of somatostatin receptor subtype-specific regulation of insulin and glucagon secretion: an in vitro study on isolated human pancreatic islets*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(2): p. 673-80.
30. Hazelwood, R.L., *The pancreatic polypeptide (PP-fold) family: gastrointestinal, vascular, and feeding behavioral implications*. Proc Soc Exp Biol Med, 1993. **202**(1): p. 44-63.
31. Verhulst, P.J. and I. Depoortere, *Ghrelin's second life: from appetite stimulator to glucose regulator*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(25): p. 3183-95.
32. Forouhi, N.G. and N.J. Wareham, *Epidemiology of diabetes*. Medicine (Abingdon), 2014. **42**(12): p. 698-702.
33. Notkins, A.L. and A. Lernmark, *Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues*. J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1247-52.
34. Doria, A., M.E. Patti, and C.R. Kahn, *The emerging genetic architecture of type 2 diabetes*. Cell Metab, 2008. **8**(3): p. 186-200.
35. Bottalico, J.N., *Recurrent gestational diabetes: risk factors, diagnosis, management, and implications*. Semin Perinatol, 2007. **31**(3): p. 176-84.
36. Galtier, F., *Definition, epidemiology, risk factors*. Diabetes Metab, 2010. **36**(6 Pt 2): p. 628-51.
37. Bellamy, L., et al., *Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Lancet, 2009. **373**(9677): p. 1773-9.
38. Boggi, U., et al., *Transplantation of the Pancreas*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
39. Shapiro, A.M., et al., *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen*. N Engl J Med, 2000. **343**(4): p. 230-8.
40. Rheinheimer, J., et al., *Human pancreatic islet transplantation: an update and description of the establishment of a pancreatic islet isolation laboratory*. Arch Endocrinol Metab, 2015. **59**(2): p. 161-70.
41. Ryan, E.A., et al., *Five-year follow-up after clinical islet transplantation*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2060-9.
42. Shapiro, A.M., *Islet transplantation in type 1 diabetes: ongoing challenges, refined procedures, and long-term outcome*. Rev Diabet Stud, 2012. **9**(4): p. 385-406.
43. Pagliuca, F.W., et al., *Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro*. Cell, 2014. **159**(2): p. 428-39.
44. D'Amour, K.A., et al., *Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(11): p. 1392-401.
45. Bouwens, L. and D.G. Pipeleers, *Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas*. Diabetologia, 1998. **41**(6): p. 629-33.
46. Butler, A.E., et al., *Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy*. Diabetologia, 2010. **53**(10): p. 2167-76.

47. Butler, A.E., et al., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2003. **52**(1): p. 102-10.
48. Martin-Pagola, A., et al., *Insulin protein and proliferation in ductal cells in the transplanted pancreas of patients with type 1 diabetes and recurrence of autoimmunity*. *Diabetologia*, 2008. **51**(10): p. 1803-13.
49. Soltani, S.M., et al., *Severely fibrotic pancreases from young patients with chronic pancreatitis: evidence for a ductal origin of islet neogenesis*. *Acta Diabetol*, 2013. **50**(5): p. 807-14.
50. Phillips, J.M., et al., *Patients with chronic pancreatitis have islet progenitor cells in their ducts, but reversal of overt diabetes in NOD mice by anti-CD3 shows no evidence for islet regeneration*. *Diabetes*, 2007. **56**(3): p. 634-40.
51. Bonner-Weir, S., et al., *In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(14): p. 7999-8004.
52. Yatoh, S., et al., *Differentiation of affinity-purified human pancreatic duct cells to beta-cells*. *Diabetes*, 2007. **56**(7): p. 1802-9.
53. Xiao, X., et al., *No evidence for beta cell neogenesis in murine adult pancreas*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(5): p. 2207-17.
54. Dor, Y., et al., *Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation*. *Nature*, 2004. **429**(6987): p. 41-6.
55. Nir, T., D.A. Melton, and Y. Dor, *Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(9): p. 2553-61.
56. Thorel, F., et al., *Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss*. *Nature*, 2010. **464**(7292): p. 1149-54.
57. Chera, S., et al., *Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic delta-cells into insulin producers*. *Nature*, 2014. **514**(7523): p. 503-7.
58. Inada, A., et al., *Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(50): p. 19915-9.
59. Xu, X., et al., *Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas*. *Cell*, 2008. **132**(2): p. 197-207.
60. Curado, S., et al., *Conditional targeted cell ablation in zebrafish: a new tool for regeneration studies*. *Dev Dyn*, 2007. **236**(4): p. 1025-35.
61. Pisharath, H., et al., *Targeted ablation of beta cells in the embryonic zebrafish pancreas using E. coli nitroreductase*. *Mech Dev*, 2007. **124**(3): p. 218-29.
62. Manfroid, I., et al., *Zebrafish sox9b is crucial for hepatopancreatic duct development and pancreatic endocrine cell regeneration*. *Dev Biol*, 2012. **366**(2): p. 268-78.
63. Moss, J.B., et al., *Regeneration of the pancreas in adult zebrafish*. *Diabetes*, 2009. **58**(8): p. 1844-51.
64. Howe, K., et al., *The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome*. *Nature*, 2013. **496**(7446): p. 498-503.
65. Warga, R.M. and C. Nusslein-Volhard, *Origin and development of the zebrafish endoderm*. *Development*, 1999. **126**(4): p. 827-38.
66. Warga, R.M. and C.B. Kimmel, *Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish*. *Development*, 1990. **108**(4): p. 569-80.
67. Heisenberg, C.P. and M. Tada, *Zebrafish gastrulation movements: bridging cell and developmental biology*. *Semin Cell Dev Biol*, 2002. **13**(6): p. 471-9.
68. Stainier, D.Y., *A glimpse into the molecular entrails of endoderm formation*. *Genes Dev*, 2002. **16**(8): p. 893-907.
69. Stafford, D. and V.E. Prince, *Retinoic acid signaling is required for a critical early step in zebrafish pancreatic development*. *Curr Biol*, 2002. **12**(14): p. 1215-20.

70. Stafford, D., et al., *Retinoids signal directly to zebrafish endoderm to specify insulin-expressing beta-cells*. *Development*, 2006. **133**(5): p. 949-56.
71. Kinkel, M.D., et al., *Cyp26 enzymes function in endoderm to regulate pancreatic field size*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(19): p. 7864-9.
72. Kinkel, M.D., et al., *Cdx4 is required in the endoderm to localize the pancreas and limit beta-cell number*. *Development*, 2008. **135**(5): p. 919-29.
73. Hesselson, D., et al., *Distinct populations of quiescent and proliferative pancreatic beta-cells identified by HOTCre mediated labeling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(35): p. 14896-901.
74. Kimmel, R.A., et al., *Requirement for Pdx1 in specification of latent endocrine progenitors in zebrafish*. *BMC Biol*, 2011. **9**: p. 75.
75. Chung, W.S., et al., *Suppression of Alk8-mediated Bmp signaling cell-autonomously induces pancreatic beta-cells in zebrafish*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(3): p. 1142-7.
76. Dong, P.D., et al., *Fgf10 regulates hepatopancreatic ductal system patterning and differentiation*. *Nat Genet*, 2007. **39**(3): p. 397-402.
77. Ninov, N., M. Boriuss, and D.Y. Stainier, *Different levels of Notch signaling regulate quiescence, renewal and differentiation in pancreatic endocrine progenitors*. *Development*, 2012. **139**(9): p. 1557-67.
78. Solar, M., et al., *Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth*. *Dev Cell*, 2009. **17**(6): p. 849-60.
79. Herrera, P.L., *Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages*. *Development*, 2000. **127**(11): p. 2317-22.
80. Mavropoulos, A., et al., *sox4b is a key player of pancreatic alpha cell differentiation in zebrafish*. *Dev Biol*, 2005. **285**(1): p. 211-23.
81. Zecchin, E., et al., *Distinct delta and jagged genes control sequential segregation of pancreatic cell types from precursor pools in zebrafish*. *Dev Biol*, 2007. **301**(1): p. 192-204.
82. Zecchin, E., et al., *Expression analysis of jagged genes in zebrafish embryos*. *Dev Dyn*, 2005. **233**(2): p. 638-45.
83. Haddon, C., et al., *Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis*. *Development*, 1998. **125**(3): p. 359-70.
84. Bierkamp, C. and J.A. Campos-Ortega, *A zebrafish homologue of the Drosophila neurogenic gene Notch and its pattern of transcription during early embryogenesis*. *Mech Dev*, 1993. **43**(2-3): p. 87-100.
85. Westin, J. and M. Lardelli, *Three novel Notch genes in zebrafish: implications for vertebrate Notch gene evolution and function*. *Dev Genes Evol*, 1997. **207**(1): p. 51-63.
86. Kim, M.Y., et al., *Regulation of Notch1 signaling by the APP intracellular domain facilitates degradation of the Notch1 intracellular domain and RBP-Jk*. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 11): p. 1831-43.
87. Baron, M., *An overview of the Notch signalling pathway*. *Semin Cell Dev Biol*, 2003. **14**(2): p. 113-9.
88. Fiuza, U.M. and A.M. Arias, *Cell and molecular biology of Notch*. *J Endocrinol*, 2007. **194**(3): p. 459-74.
89. Baron, M., et al., *Multiple levels of Notch signal regulation (review)*. *Mol Membr Biol*, 2002. **19**(1): p. 27-38.
90. Itoh, M., et al., *Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta*. *Dev Cell*, 2003. **4**(1): p. 67-82.
91. Scheer, N. and J.A. Campos-Ortega, *Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish*. *Mech Dev*, 1999. **80**(2): p. 153-8.

92. Chien, C.T., et al., *Neuronal type information encoded in the basic-helix-loop-helix domain of proneural genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13239-44.
93. Quan, X.J., et al., *Evolution of neural precursor selection: functional divergence of proneural proteins*. Development, 2004. **131**(8): p. 1679-89.
94. Gradwohl, G., et al., *neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1607-11.
95. Soyer, J., et al., *Rfx6 is an Ngn3-dependent winged helix transcription factor required for pancreatic islet cell development*. Development, 2010. **137**(2): p. 203-12.
96. Mellitzer, G., et al., *IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas*. EMBO J, 2006. **25**(6): p. 1344-52.
97. Petri, A., et al., *The effect of neurogenin3 deficiency on pancreatic gene expression in embryonic mice*. J Mol Endocrinol, 2006. **37**(2): p. 301-16.
98. Huang, H.P., et al., *Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(9): p. 3292-307.
99. Gu, G., J. Dubauskaite, and D.A. Melton, *Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors*. Development, 2002. **129**(10): p. 2447-57.
100. Schwitzgebel, V.M., et al., *Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas*. Development, 2000. **127**(16): p. 3533-42.
101. Jensen, J., et al., *Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation*. Diabetes, 2000. **49**(2): p. 163-76.
102. Apelqvist, A., et al., *Notch signalling controls pancreatic cell differentiation*. Nature, 1999. **400**(6747): p. 877-81.
103. Dalgin, G., et al., *Zebrafish mnx1 controls cell fate choice in the developing endocrine pancreas*. Development, 2011. **138**(21): p. 4597-608.
104. Gehring, W.J., et al., *Homeodomain-DNA recognition*. Cell, 1994. **78**(2): p. 211-23.
105. Otting, G., et al., *Protein--DNA contacts in the structure of a homeodomain--DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution*. EMBO J, 1990. **9**(10): p. 3085-92.
106. Kissinger, C.R., et al., *Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 A resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions*. Cell, 1990. **63**(3): p. 579-90.
107. Mirmira, R.G., H. Watada, and M.S. German, *Beta-cell differentiation factor Nkx6.1 contains distinct DNA binding interference and transcriptional repression domains*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14743-51.
108. Muhr, J., et al., *Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube*. Cell, 2001. **104**(6): p. 861-73.
109. Schisler, J.C., et al., *Stimulation of human and rat islet beta-cell proliferation with retention of function by the homeodomain transcription factor Nkx6.1*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(10): p. 3465-76.
110. Vallstedt, A., et al., *Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to Nkx6 genes in motor neuron and interneuron specification*. Neuron, 2001. **31**(5): p. 743-55.
111. Huang, H., N. Liu, and S. Lin, *Pdx-1 knockdown reduces insulin promoter activity in zebrafish*. Genesis, 2001. **30**(3): p. 134-6.
112. Yee, N.S., S. Yusuff, and M. Pack, *Zebrafish pdx1 morphant displays defects in pancreas development and digestive organ chirality, and potentially identifies a multipotent pancreas progenitor cell*. Genesis, 2001. **30**(3): p. 137-40.

113. Hesselson, D., R.M. Anderson, and D.Y. Stainier, *Suppression of Ptf1a activity induces acinar-to-endocrine conversion*. *Curr Biol*, 2011. **21**(8): p. 712-7.
114. Dong, P.D., et al., *Graded levels of Ptf1a differentially regulate endocrine and exocrine fates in the developing pancreas*. *Genes Dev*, 2008. **22**(11): p. 1445-50.
115. Rose, S.D., et al., *The role of PTF1-P48 in pancreatic acinar gene expression*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(47): p. 44018-26.
116. Pashos, E., et al., *Distinct enhancers of ptf1a mediate specification and expansion of ventral pancreas in zebrafish*. *Dev Biol*, 2013. **381**(2): p. 471-81.
117. Afelik, S., et al., *Notch-mediated patterning and cell fate allocation of pancreatic progenitor cells*. *Development*, 2012. **139**(10): p. 1744-53.
118. Zecchin, E., et al., *Evolutionary conserved role of ptf1a in the specification of exocrine pancreatic fates*. *Dev Biol*, 2004. **268**(1): p. 174-84.
119. Delous, M., et al., *Sox9b is a key regulator of pancreaticobiliary ductal system development*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(6): p. e1002754.
120. Warming, S., et al., *Simple and highly efficient BAC recombineering using galk selection*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(4): p. e36.
121. Suster, M.L., et al., *Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish*. *Nat Protoc*, 2011. **6**(12): p. 1998-2021.
122. Suster, M.L., K. Sumiyama, and K. Kawakami, *Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice*. *BMC Genomics*, 2009. **10**: p. 477.
123. Feil, R., et al., *Ligand-activated site-specific recombination in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(20): p. 10887-90.
124. Feil, R., et al., *Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **237**(3): p. 752-7.
125. Mosimann, C. and L.I. Zon, *Advanced zebrafish transgenesis with Tol2 and application for Cre/lox recombination experiments*. *Methods Cell Biol*, 2011. **104**: p. 173-94.
126. Kim, J.H., et al., *High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e18556.
127. Zhou, Y., et al., *Latent TGF-beta binding protein 3 identifies a second heart field in zebrafish*. *Nature*, 2011. **474**(7353): p. 645-8.
128. Mosimann, C., et al., *Ubiquitous transgene expression and Cre-based recombination driven by the ubiquitin promoter in zebrafish*. *Development*, 2011. **138**(1): p. 169-77.
129. Fujikura, J., et al., *Notch/Rbp-j signaling prevents premature endocrine and ductal cell differentiation in the pancreas*. *Cell Metab*, 2006. **3**(1): p. 59-65.
130. Jensen, J., et al., *Control of endodermal endocrine development by Hes-1*. *Nat Genet*, 2000. **24**(1): p. 36-44.
131. Wilfinger, A., V. Arkhipova, and D. Meyer, *Cell type and tissue specific function of islet genes in zebrafish pancreas development*. *Dev Biol*, 2013. **378**(1): p. 25-37.
132. Briscoe, J., et al., *A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube*. *Cell*, 2000. **101**(4): p. 435-45.
133. Olguin, H.C., et al., *Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination*. *J Cell Biol*, 2007. **177**(5): p. 769-79.
134. Taylor, B.L., J. Benthuyzen, and M. Sander, *Postnatal beta-cell proliferation and mass expansion is dependent on the transcription factor Nkx6.1*. *Diabetes*, 2015. **64**(3): p. 897-903.
135. Scheer, N., et al., *An instructive function for Notch in promoting gliogenesis in the zebrafish retina*. *Development*, 2001. **128**(7): p. 1099-107.
136. Haddon, C., et al., *Delta-Notch signalling and the patterning of sensory cell differentiation in the zebrafish ear: evidence from the mind bomb mutant*. *Development*, 1998. **125**(23): p. 4637-44.

Résumé

Le diabète survient lorsque le nombre ou la fonction des cellules β , productrices d'insuline est affecté. Le nombre de personnes atteintes par cette maladie croît de manière impressionnante d'année en année. Bien qu'il puisse être contrôlé par des injections régulières d'insuline, ce traitement est contraignant, coûteux et ne permet pas d'éliminer toute une série d'effets secondaires chez le patient diabétique. Un des challenges à l'heure actuelle est de développer des stratégies qui permettraient de remplacer ces cellules. La régénération *in vivo* constitue une approche thérapeutique attrayante. Cependant, cette régénération est peu efficace chez les mammifères et un défi majeur consisterait à la stimuler.

Contrairement aux mammifères, le poisson-zèbre (*Danio rerio*), est un modèle de choix pour étudier la régénération puisqu'il possède le remarquable pouvoir de régénérer les cellules β rapidement et efficacement après leur ablation ciblée. Néanmoins, il est important d'identifier et de caractériser les cellules pancréatiques qui donnent naissance aux cellules β afin de connaître l'ensemble des facteurs et voies de signalisation contrôlant leur formation.

Le but de mon doctorat s'est inscrit dans cette démarche d'identification et de caractérisation des cellules progénitrices. Pour ce faire, nous avons généré deux lignées transgéniques qui nous ont permis de suivre le destin des cellules exprimant le facteur de transcription Nkx6.1 et Ascl1b. Par des expériences de traçage de lignée, nous avons montré que les cellules Nkx6.1+ marquent des progéniteurs pancréatiques qui donnent naissance à toutes les lignées pancréatiques alors que les cellules Ascl1b marquent des précurseurs endocrines qui ne donnent naissance qu'à la lignée endocrine. Nous avons aussi montré qu'au début du développement pancréatique, les deux facteurs sont exprimés dans les mêmes cellules pancréatiques puis se séparent rapidement. Cette ségrégation n'est pas la conséquence d'une répression mutuelle entre Ascl1b et Nkx6.1 mais est due à un effet opposé de la voie de signalisation Notch qui maintient l'expression de *nkx6.1* et réprime l'expression d'*ascl1b*.