

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -  
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1**

**FACULTE DE MEDECINE LYON EST**

Année 2015 N° 59/2015

# **ROLE DES ONCOPROTEINES MAF DANS LES CELLULES ENDOCRINES ANTE-HYPOPHYSAIRES**

## **THESE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1

et soutenue publiquement le **10 avril 2015**

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

**Julie BEAUVY**

Née le 24/06/1986

à Saint Martin d'Hères (38)

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

---

. Président de l'Université	François-Noël GILLY
. Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales	François-Noël GILLY
. Secrétaire Général	Alain HELLEU

### **SECTEUR SANTE**

UFR DE MEDECINE LYON EST	Doyen : Jérôme ETIENNE
UFR DE MEDECINE LYON SUD – CHARLES MERIEUX	Doyen : Carole BURILLON
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES (ISPB)	Directrice: Christine VINCIGUERRA
UFR D'ODONTOLOGIE	Directeur : Denis BOURGEOIS
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE READAPTATION	Directeur : Yves MATILLON
DEPARTEMENT DE FORMATION ET CENTRE DE RECHERCHE EN BIOLOGIE HUMAINE	Directeur : Pierre FARGE

### **SECTEUR SCIENCES ET TECHNOLOGIES**

UFR DE SCIENCES ET TECHNOLOGIES	Directeur : Fabien de MARCHI
UFR DE SCIENCES ET TECHNIQUES DES ACTIVITES PHYSIQUES ET SPORTIVES (STAPS)	Directeur : Claude COLLIGNON
POLYTECH LYON	Directeur : Pascal FOURNIER
I.U.T.	Directeur : Christian COULET
INSTITUT DES SCIENCES FINANCIERES ET ASSURANCES (ISFA)	Directeur : Véronique MAUME-DESCHAMPS
I.U.F.M.	Directeur : Régis BERNARD
CPE	Directeur : Gérard PIGNAULT

## Faculté de Médecine Lyon Est

### Liste des enseignants 2014/2015

#### Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers Classe exceptionnelle Echelon 2

Cochat	Pierre	Pédiatrie
Cordier	Jean-François	Pneumologie ; addictologie
Etienne	Jérôme	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
Gouillat	Christian	Chirurgie digestive
Guérin	Jean-François	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
Mauguière	François	Neurologie
Ninet	Jacques	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie
Peyramond	Dominique	Maladie infectieuses ; maladies tropicales
Philip	Thierry	Cancérologie ; radiothérapie
Raudrant	Daniel	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
Rudigoz	René-Charles	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale

#### Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers Classe exceptionnelle Echelon 1

Baverel	Gabriel	Physiologie
Blay	Jean-Yves	Cancérologie ; radiothérapie
Borson-Chazot	Françoise	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale
Denis	Philippe	Ophtalmologie
Finet	Gérard	Cardiologie
Guérin	Claude	Réanimation ; médecine d'urgence
Lehot	Jean-Jacques	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
Lermusiaux	Patrick	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
Martin	Xavier	Urologie
Mellier	Georges	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
Michallet	Mauricette	Hématologie ; transfusion
Miossec	Pierre	Immunologie
Morel	Yves	Biochimie et biologie moléculaire
Mornex	Jean-François	Pneumologie ; addictologie
Neyret	Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
Ninet	Jean	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
Ovize	Michel	Physiologie
Ponchon	Thierry	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
Pugeat	Michel	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale
Revel	Didier	Radiologie et imagerie médicale
Rivoire	Michel	Cancérologie ; radiothérapie
Thivolet-Bejui	Françoise	Anatomie et cytologie pathologiques
Vandenesch	François	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
Zoulim	Fabien	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie



**Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers**  
**Première classe**

André-Fouet	Xavier	Cardiologie
Barth	Xavier	Chirurgie générale
Berthezene	Yves	Radiologie et imagerie médicale
Bertrand	Yves	Pédiatrie
Beziat	Jean-Luc	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
Boillot	Olivier	Chirurgie digestive
Braye	Fabienne	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
Breton	Pierre	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
Chassard	Dominique	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
Chevalier	Philippe	Cardiologie
Claris	Olivier	Pédiatrie
Colin	Cyrille	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
Colombel	Marc	Urologie
Cottin	Vincent	Pneumologie ; addictologie
D'Amato	Thierry	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
Delahaye	François	Cardiologie
Di Fillipo	Sylvie	Cardiologie
Disant	François	Oto-rhino-laryngologie
Douek	Philippe	Radiologie et imagerie médicale
Ducerf	Christian	Chirurgie digestive
Dumontet	Charles	Hématologie ; transfusion
Durieu	Isabelle	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie
Edery	Charles Patrick	Génétique
Fauvel	Jean-Pierre	Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie
Gaucherand	Pascal	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
Guenot	Marc	Neurochirurgie
Gueyffier	François	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
Guibaud	Laurent	Radiologie et imagerie médicale
Herzberg	Guillaume	Chirurgie orthopédique et traumatologique
Honorat	Jérôme	Neurologie
Lachaux	Alain	Pédiatrie
Lina	Bruno	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
Lina	Gérard	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
Mabrut	Jean-Yves	Chirurgie générale
Mertens	Patrick	Anatomie
Mion	François	Physiologie
Morelon	Emmanuel	Néphrologie
Moulin	Philippe	Nutrition
Négrier	Claude	Hématologie ; transfusion
Négrier	Marie-Sylvie	Cancérologie ; radiothérapie
Nicolino	Marc	Pédiatrie
Nighoghossian	Norbert	Neurologie
Obadia	Jean-François	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
Picot	Stéphane	Parasitologie et mycologie
Rode	Gilles	Médecine physique et de réadaptation
Rousson	Robert-Marc	Biochimie et biologie moléculaire
Roy	Pascal	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
Ruffion	Alain	Urologie
Ryvlin	Philippe	Neurologie
Scheiber	Christian	Biophysique et médecine nucléaire

Schott-Pethelaz	Anne-Marie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
Terra	Jean-Louis	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
Tilikete	Caroline	Physiologie
Touraine	Jean-Louis	Néphrologie
Truy	Eric	Oto-rhino-laryngologie
Turjman	Francis	Radiologie et imagerie médicale
Vallée	Bernard	Anatomie
Vanhems	Philippe	Epidémiologie, économie de la santé et prévention

## Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers Seconde Classe

Allaouchiche	Bernard	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
Argaud	Laurent	Réanimation ; médecine d'urgence
Aubrun	Frédéric	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
Badet	Lionel	Urologie
Bessereau	Jean-Louis	Biologie cellulaire
Boussel	Loïc	Radiologie et imagerie médicale
Calender	Alain	Génétique
Charbotel	Barbara	Médecine et santé au travail
Chapurlat	Roland	Rhumatologie
Cotton	François	Radiologie et imagerie médicale
Dalle	Stéphane	Dermato-vénéréologie
Dargaud	Yesim	Hématologie ; transfusion
Devouassoux	Mojgan	Anatomie et cytologie pathologiques
Dubernard	Gil	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
Dumortier	Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
Fanton	Laurent	Médecine légale
Faure	Michel	Dermato-vénéréologie
Fellahi	Jean-Luc	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
Ferry	Tristan	Maladie infectieuses ; maladies tropicales
Fourneret	Pierre	Pédopsychiatrie ; addictologie
Gillet	Yves	Pédiatrie
Girard	Nicolas	Pneumologie
Gleizal	Arnaud	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
Guyen	Olivier	Chirurgie orthopédique et traumatologique
Henaine	Roland	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
Hot	Arnaud	Médecine interne
Huissoud	Cyril	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
Jacquín-Courtois	Sophie	Médecine physique et de réadaptation
Janier	Marc	Biophysique et médecine nucléaire
Javouhey	Etienne	Pédiatrie
Juillard	Laurent	Néphrologie
Jullien	Denis	Dermato-vénéréologie
Kodjikian	Laurent	Ophtalmologie
Krolak Salmon	Pierre	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie
Lejeune	Hervé	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
Merle	Philippe	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
Michel	Philippe	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
Monneuse	Olivier	Chirurgie générale
Mure	Pierre-Yves	Chirurgie infantile
Nataf	Serge	Cytologie et histologie
Pignat	Jean-Christian	Oto-rhino-laryngologie
Poncet	Gilles	Chirurgie générale

Raverot	Gérald	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale
Ray-Coquard	Isabelle	Cancérologie ; radiothérapie
Richard	Jean-Christophe	Réanimation ; médecine d'urgence
Rossetti	Yves	Physiologie
Rouvière	Olivier	Radiologie et imagerie médicale
Saoud	Mohamed	Psychiatrie d'adultes
Schaeffer	Laurent	Biologie cellulaire
Souquet	Jean-Christophe	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
Vukusic	Sandra	Neurologie
Wattel	Eric	Hématologie ; transfusion

### **Professeur des Universités - Médecine Générale**

Letrilliart	Laurent
Moreau	Alain

### **Professeurs associés de Médecine Générale**

Flori	Marie
Lainé	Xavier
Zerbib	Yves

### **Professeurs émérites**

Chatelain	Pierre	Pédiatrie
Bérard	Jérôme	Chirurgie infantile
Boulanger	Pierre	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
Bozio	André	Cardiologie
Chayvialle	Jean-Alain	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
Daligand	Liliane	Médecine légale et droit de la santé
Descotes	Jacques	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie
Droz	Jean-Pierre	Cancérologie ; radiothérapie
Floret	Daniel	Pédiatrie
Gharib	Claude	Physiologie
Itti	Roland	Biophysique et médecine nucléaire
Kopp	Nicolas	Anatomie et cytologie pathologiques
Neidhardt	Jean-Pierre	Anatomie
Petit	Paul	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
Rousset	Bernard	Biologie cellulaire
Sindou	Marc	Neurochirurgie
Trepo	Christian	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
Trouillas	Paul	Neurologie
Trouillas	Jacqueline	Cytologie et histologie
Viale	Jean-Paul	Réanimation ; médecine d'urgence

### **Maîtres de Conférence – Praticiens Hospitaliers Hors classe**

Benchabib	Mehdi	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
-----------	-------	--

Bringuier	Pierre-Paul	Cytologie et histologie
Davezies	Philippe	Médecine et santé au travail
Germain	Michèle	Physiologie
Jarraud	Sophie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
Jouvet	Anne	Anatomie et cytologie pathologiques
Le Bars	Didier	Biophysique et médecine nucléaire
Normand	Jean-Claude	Médecine et santé au travail
Persat	Florence	Parasitologie et mycologie
Pharaboz-Joly	Marie-Odile	Biochimie et biologie moléculaire
Piaton	Eric	Cytologie et histologie
Rigal	Dominique	Hématologie ; transfusion
Sappey-Marinier	Dominique	Biophysique et médecine nucléaire
Streichenberger	Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
Timour-Chah	Quadiri	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
Voiglio	Eric	Anatomie
Wallon	Martine	Parasitologie et mycologie

### **Maîtres de Conférence – Praticiens Hospitaliers** **Première classe**

Ader	Florence	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
Barnoud	Raphaëlle	Anatomie et cytologie pathologiques
Bontemps	Laurence	Biophysique et médecine nucléaire
Chalabreysse	Lara	Anatomie et cytologie pathologiques
Charrière	Sybil	Nutrition
Collardeau Frachon	Sophie	Anatomie et cytologie pathologiques
Cozon	Grégoire	Immunologie
Dubourg	Laurence	Physiologie
Escuret	Vanessa	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
Hervieu	Valérie	Anatomie et cytologie pathologiques
Kolopp-Sarda	Marie Nathalie	Immunologie
Laurent	Frédéric	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
Lesca	Gaëtan	Génétique
Maucort Boulch	Delphine	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
Meyronet	David	Anatomie et cytologie pathologiques
Peretti	Noel	Nutrition
Pina-Jomir	Géraldine	Biophysique et médecine nucléaire
Plotton	Ingrid	Biochimie et biologie moléculaire
Rabilloud	Muriel	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
Ritter	Jacques	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
Roman	Sabine	Physiologie
Tardy Guidollet	Véronique	Biochimie et biologie moléculaire
Tristan	Anne	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
Vlaeminck-Guillem	Virginie	Biochimie et biologie moléculaire

### **Maîtres de Conférences – Praticiens Hospitaliers** **Seconde classe**

Casalegno	Jean-Sébastien	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
-----------	----------------	--

Chêne	Gautier	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
Duclos	Antoine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
Phan	Alice	Dermato-vénéréologie
Rheims	Sylvain	Neurologie
Rimmele	Thomas	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
Schluth-Bolard	Caroline	Génétique
Simonet	Thomas	Biologie cellulaire
Thibault	Hélène	Physiologie
Vasiljevic	Alexandre	Anatomie et cytologie pathologiques
Venet	Fabienne	Immunologie

#### **Maîtres de Conférences associés de Médecine Générale**

Chanelière	Marc
Farge	Thierry
Figon	Sophie

# JURY

**Président :**

Monsieur le Professeur Gérard RAVEROT

**Membres :**

Madame le Professeur Françoise BORSON-CHAZOT

Monsieur le Professeur Emmanuel JOUANNEAU

Monsieur le Docteur Chang Xian ZHANG

## REMERCIEMENTS

### **A Monsieur le Professeur Gérald RAVEROT**

*Rigueur, exigence*

Je vous remercie pour votre soutien, votre aide et votre rigueur tout au long de mon travail. Vous m'avez accompagnée dans mes premiers pas dans la recherche. Exigeant avec vous-avec votre entourage professionnel, comme vous semblez l'être avec vous-même, vous nous permettez de progresser dans notre futur métier et vous nous donnez les clefs pour devenir un bon endocrinologue.

Soyez assuré de toute ma reconnaissance.

### **A Madame le Professeur Françoise BORSON-CHAZOT**

*Responsabilité, ambition*

Vous m'avez également permis de progresser pendant ces années d'internat en endocrinologie. Je me permets de préciser que je suis fière de travailler dans un service dirigé par une femme. Féminité et puissance sont deux qualités difficilement atteignables et vous savez allier les deux. De plus, vous communiquez votre énergie et votre bonne humeur à votre entourage.

C'est pourquoi, je suis ravie de continuer à travailler avec vous prochainement. J'espère me montrer toujours digne de votre confiance.

### **A Monsieur le Professeur Emmanuel JOUANNEAU**

*Calme, expert*

Je suis très honorée que vous ayez accepté de participer à mon jury de thèse. Soyez assuré de mon très grand respect et de toute ma gratitude.

### **A Monsieur le Docteur Chang Xian ZHANG**

*Patience, pragmatisme*

Je vous remercie pour votre gentillesse, votre patience et vos conseils pertinents tout au long de mon travail de recherche. Gr ce   vous, j'ai appris à raisonner comme un chercheur (j'espère) et à aimer cette discipline. En outre, j'ai beaucoup apprécié vos qualités humaines. J'espère que nous aurons le plaisir de travailler ensemble dans le futur.

## REMERCIEMENTS

Mamou, sans toi, je n'en serai pas là. Tu nous as aimé tellement fort qu'on a trop d'amour à revendre ! Quelle patience pour accompagner ses enfants de la P1 à la thèse ! Alors ce soir, profite, car c'est aussi ta soirée !!

A Papa et les superbes qualités de ses défauts ! Je t'admire mon papa chéri, et je me souviens comme tu m'as « physiquement » soutenu en P1 !

Zazou, ma sœur chérie, je te croque tellement je t'aime ! Je suis fière de toi, comme dirait... J'espère passer encore de longs et bons moments avec toi et mon beauf !

A ma grande sœur Hélène, si douce et si belle ! A Loïc et à vos beaux garçons Erwan et Killian A Julien, qui restera à toujours dans nos cœurs et à Thomas, que l'on n'oublie pas.

Un grand merci à ma sœur de cœur Jelenas ! Je mets un « s » car maintenant vous êtes deux. à ton contact, le sang du Monténégro coule dans mes veines et pour me détendre pendant ses longues années d'internat je m'imaginais souvent à tes côtés, en brasse coulée dans les bouches de Kotor... Bon vent avec Brice... Chantal et Stanko doivent être comblés de joie

Aux poulettes, à Aude « ma grande » du tennis, « feu Roland Garros ! » et son Louka, A Reb et son œuf ! A ma Lili ; à nos souvenirs, du Mali à la boîte à Sardine, à nos moments à refaire le monde ! Maintenant, on vit plus qu'on analyse, et on avance ! Félicitations à toutes les 3, je suis fière de vous !!

A Melly, Margot, Brigitte, J.M. et Françoise, et aux Noël musicaux passés ensemble ! je pense parfois à une réorientation professionnelle avec vous !

A Mme Collet, vous m'avez appris la rigueur de la musique, et grâce à vous j'ai acquis une liberté d'expression musicale ! C'est un état d'esprit que j'ai employé pour réussir ensuite en médecine ! Vous restez un soutien et un guide dans toutes les étapes de mes études ! A Anne Laure et son fluide vital qui continue de me faire progresser !

A tous les potes de la P1 / P2 et aux moments inoubliables passés ensemble ! Qui d'entre nous ne regrette pas la période de la P2 à la D3 ?? A Aml, son enthousiasme et son bon caractère, A Willou et son meilleur caractère, A Mag qui contrebraque dans le mauvais sens qd « je rembobine », A Bébert et Larry nos futurs PUPH, A Kékile et sa petite famille, et à toute la dream team de Grenoble!

A nos 10ans d'amitié avec Ma Marionnette et Ma Marinette... A la P1 réussie en même temps... A Marion notre force tranquille et A Marinette, mon oreille attentive... A nos dernières vacances en voiler, à nos prochaines au ski, à nos futurs voyages à Nouméa...

Au temps révolu de l'erasmus, une parenthèse de bonheur imbibé dans la bière ! N'oubliez jamais Chacha, David et Laura, « Ich bin ein Freiburger » avant tout, parce que « es ist sehr sehr gut » !



A ma première co-interne Pascaline ! Toujours souriante, tu m'as appris la rigueur des néphrologues !

A Héloïse, Mélanie et Anahide de la PMA ! A toutes les fois où je vous fais rire malgré moi ! Ce fut un grand moment d'échange de connaissances sur le fonctionnement basique de l'homme et de la femme !

A Damien qui me détend avec ses histoires de la loupette, à Guillhem, Thomas et Sophie

UN GRAND MERCI donc à toute la famille ET les potes, pour m'avoir supportée à bosser trop souvent en vacances : au camping en Ardèche, au ski à Tignes et l'Alpe, à Villars en P1, à la Chaux de Fond dernièrement... et ce n'est pas fini...

Aux membres de « feu l'AJELY » : Julia et Cédric nos mentors, Guigui qui restera toujours président UNITED dans nos cœurs, Lulu avec qui je partagerai mon bureau pendant 2 belles années ! A Audrey et Aurélie qui seront à nos côtés, A celles qui sont déjà chefs : Amandine, Corinne, Cyrielle, Christelle

Et aux plus jeunes (profitez-en, l'internat ça rajeunit pas !) Lucien, Marion, Hélène, Pauline, Nicolaï, Cécile et aux plus petits encore,

A mes assistantes qui m'ont prise sous leurs ailes et m'ont vu grandir ! Marie Astrid, Laetitia, Claire B., Léopold, Claire S. et Juliette ...vous avez été d'une patience remarquable, ce qui permet à un interne en galère de survivre ! Aux équipes paramédicales !

A l'équipe de recherche, sans laquelle je n'aurais pu faire ce travail : A Philippe et ses conseils critiques formateurs, à Rémy et sa patience, à Doriane, Romain, Estelle, Sophie, Anca, à Charlotte et Elise de l'autre côté du labo, mais bien présentes !! A Pascale, Carole, Guillaume et Marie.

Et le meilleur pour la fin.... Un remerciement infini à mon Thibaut, merci pour ta patience ces derniers mois, nous allons profiter de notre été ! C'est toi qui compte, tout ce travail à coté, c'est superflu.

Même si elle prendra la poussière dans ta bibliothèque...

Je te dédie cette thèse...

## **Le Serment d'Hippocrate**

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans discrimination.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance.

Je donnerai mes soins à l'indigent et je n'exigerai pas un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement la vie ni ne provoquerai délibérément la mort.

Je préserverai l'indépendance nécessaire et je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je perfectionnerai mes connaissances pour assurer au mieux ma mission.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé si j'y manque.

I)	INTRODUCTION .....	4
A)	Hypophyse normale et pathologique.....	4
a.	L'hypophyse normale .....	4
b.	L'adénome hypophysaire .....	6
B)	Le néoplasie endocrinienne multiple de type 1 .....	8
a.	Présentation clinique.....	9
b.	L'aspect génétique et les modèles murins.....	11
c.	Les partenaires de ménine et leurs fonctions .....	13
C)	Les protéines Maf.....	16
a.	Description générale de la famille des protéines Maf : facteur de différenciation ou oncoprotéine ? .....	16
b.	Lien entre ménine et les oncoprotéines Maf: modèle de l'insulinome chez la souris NEM1 KO.....	19
II)	OBJECTIFS DE MON ETUDE.....	21
III)	MATERIELS ET METHODES .....	22
IV)	RESULTATS.....	25
A)	Expression de la protéine ménine dans l'hypophyse normale chez la souris.....	25
B)	Expression de MafB dans l'hypophyse de souris :.....	26
a.	L'hypophyse normale .....	26
b.	Le prolactinome des souris « <i>MEN1</i> Knock out » .....	26
C)	Expression de MafB dans l'hypophyse humaine .....	29
a.	MafB dans l'hypophyse normale.....	29
b.	MafB dans les tumeurs hypophysaires sporadiques.....	36
V)	DISCUSSION .....	47
A)	Chez la souris, l'hypophyse normale a une expression hétérogène de ménine .....	47
B)	MafA et MafB ne sont pas détectés dans l'hypophyse normale chez la souris.....	48
C)	Une expression ectopique de MafB a été détectée dans une proportion importante de prolactinomes murins dus à la NEM1 .....	49

D) Les effets possibles d'une expression ectopique de MafB dans le prolactinome en l'absence de <i>MEN1</i> .....	49
E) Pourquoi MafB n'est pas surexprimé dans la majorité des tumeurs hypophysaires en lien avec la NEM1 ? .....	51
F) L'hypophyse normale humaine exprime fortement MafB : Résultats différents entre l'homme et la souris .....	51
G) MafB, facteur de différenciation des cellules endocrines antéhypophysaires humaines ?.....	53
a. MafB connu comme facteur de différenciation dans la littérature .....	53
b. MafB pourrait être un facteur de différenciation hypophysaire .....	55
H) Hétérogénéité d'expression de MafB dans l'adénome hypophysaire sporadique humain : différents sous type de tumeurs semblent perdre l'expression de MafB.....	56
a. Quelques tumeurs gardent un marquage intense de MafB tandis que d'autres perdent son expression nucléaire.....	56
b. Délocalisation cytoplasmique de MafB dans certaines tumeurs .....	59
c. Corrélation à envisager entre la perte de MafB et l'agressivité de la tumeur ? .....	60
I) Quels sont les partenaires moléculaires de MafB potentiels dans l'hypophyse humaine ?.....	61
J) Biais de l'étude .....	64
K) Perspectives.....	65
VI) CONCLUSIONS .....	67
VII) REFERENCES .....	69

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

AP : ante-hypophyse

ACTH : Hormone corticotrope (Adrenocorticotrophic Hormone)

AR : Récepteur aux androgènes (Androgen Receptor)

$\beta$ -LPH :  $\beta$ -Lipotropine

CCND2 : Cycline D2

CDK : Kinase dépendante des cyclines (Cyclin Dependent Kinase)

CEBPD: CCAAT-enhancer-binding protein

Cre : Causes recombination

E : stades embryonnaires chez la souris, nombre de jour post coïtal

ER : Récepteur aux œstrogènes (Estrogen Receptor)

FGF4: Fibroblast Growth Factor

FSH: Folliculostimuline (Follicle Stimulating Hormone)

GH : Hormone de croissance (Growth Hormone)

GHE : Groupement Hospitalier Est

GPR101 : G protein-coupled receptors 101

GTE : Groupe des tumeurs endocrines

H. : Hôpital

H3K4 : Lysine 4 de l'histone H3

HMT : Histone méthyl-transférase

HOX : Gène homéotique, Homeobox

HPT : Hyperparathyroïdie primaire

KO : Knock out

LH : Hormone lutéinisante (Luteinizing Hormone)

LOH: Perte d'hétérozygotie (Loss Of Heterozygoty)

MafB : V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue B

MEF: Fibroblastes embryonnaires murins (Mouse Embryonic Fibroblasts)

*MEN1* : Gène de prédisposition aux NEM1 (Multiple Endocrine Neoplasia type 1)

MIN: Néoplasie intraépithéliale mammaire (Mammary Intraepithelial Neoplasia)

MLL : Mixed Lineage Leukemia

NEM1 : Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1

Pit-1 (ou POU1F1) : Pituitary-specific positive transcription factor 1

PP : Polypeptide pancréatique (Pancreatic Polypeptide)

PR: Récepteur à la progestérone (Progesterone Receptor)

PRL: Prolactine

Prop-1: Prophet of Pit-1

PSA-NCAM : Polysialylated-neural cell adhesion molecule

PTH: Hormone parathyroïdienne (Parathyroid Hormone)

PTTG: Pituitary Tumor Transforming Gene

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

TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor beta

TPIT: facteur de transcription à boîte T

TSH: Hormone thyroïdienne (Thyroid Stimulating Hormone)

TTT: Traitement

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VIP : Polypeptide vasointestinal (Vasointestinal Polypeptide)

WAP: Protéine du lait (Whey Acidic Protein)

WHO : World Health Organization

## **I) INTRODUCTION**

### **A) Hypophyse normale et pathologique**

Les adénomes hypophysaires sont les tumeurs intracrâniennes bénignes les plus fréquentes chez l'adulte (10 à 15%) [1]. Leur incidence est estimée à 0.02 voire 0.1% selon certains auteurs; la présence d'un incidentalome hypophysaire est observée dans 27% des autopsies [1]. Ces tumeurs dérivent de l'antéhypophyse.

#### **a. L'hypophyse normale**

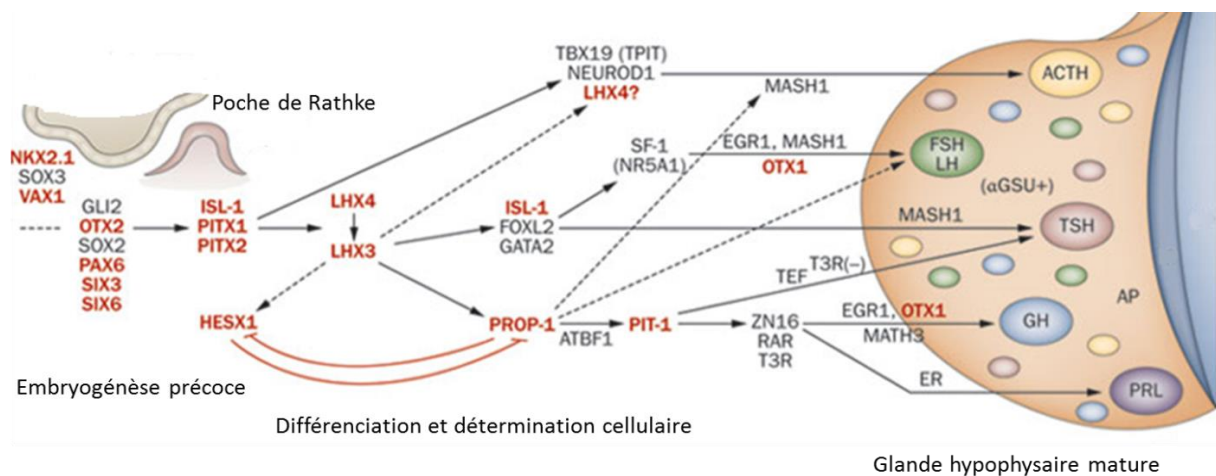
L'hypophyse normale est une glande neuroendocrine située à la base du cerveau, dans la selle turcique, et reliée à l'hypothalamus par une tige pituitaire qui la stimule via la sécrétion de neuro-hormones. L'hypophyse est divisée en deux lobes : l'antéhypophyse (adénohypophyse), et la posthypophyse (neurohypophyse). Les cellules antéhypophysaires se différencient par étape à partir d'un seul épithélium, la poche de Rathke (ébauche de la cavité buccale primitive, le stomodeum), tandis que la neurohypophyse est d'origine neuro-ectodermique et se compose d'axones de neurones sécréteurs hypothalamiques. L'hypophyse intermédiaire, située entre l'antéhypophyse et la posthypophyse, se développe chez certaines espèces animales comme la souris. Chez l'homme, l'hypophyse intermédiaire n'est visible qu'en période fœtale et jusqu'à l'âge de dix ans environ, puis disparaît à l'âge l'adulte.

L'adénome hypophysaire, au cœur de notre travail de recherche, dérive de l'antéhypophyse. De structure glandulaire, le lobe antérieur sécrète plusieurs hormones responsables de la régulation de la majeure partie du système endocrinien. L'antéhypophyse est ainsi constituée de 5 sous-types cellulaires : les cellules somatotropes (environ 50% d'entre elles) sécrètent l'hormone de croissance (GH) ; celles sécrétrices de prolactine (PRL) représentent jusqu'à 20 % de l'antéhypophyse, leur nombre augmentant pendant la grossesse ; Les cellules corticotropes (environ 20 % de la masse antéhypophysaire) synthétisent l'ACTH (corticotrophine), la  $\beta$ -LPH et la  $\beta$ -endorphine; Les cellules gonadotropes, sécrètent les gonadotrophines FSH et LH (occupant environ 10 % du volume), et enfin, les cellules thyrotropes (occupant seulement 5 % de la glande) sécrètent la TSH

(thyroïdostimuline). L'antéhypophyse, sous contrôle de l'hypothalamus, coordonne la sécrétion hormonale de l'organisme, en stimulant les différentes glandes endocrines.

L'antéhypophyse s'organise en cordons formés de cellules folliculo-stellaires centrales et de cellules endocrines périphériques. Elles sont entourées d'une lame basale au travers de laquelle les cellules endocrines déversent leurs sécrétions dans un réseau de capillaires sinusoïdes.

Au cours de l'embryogénèse, le processus de différenciation des cellules hypophysaires est orchestré par des facteurs de transcription tels que Pitx1/2, Pit-1, Prop-1, Hesx1 (Rpx) et Lhx3/4 assurant le développement antéhypophysaire puis, d'autres facteurs assurent une différenciation de lignées spécifiques (GH, PRL, ACTH, TSH, LH/FSH) (Figure 1). L'interaction de ces différents facteurs de transcription et leur niveau d'expression varient au cours du développement hypophysaire.



**Figure 1:** Facteurs de différenciation au cours du développement anté-hypophysaire

De [2]



## **b. L'adénome hypophysaire**

Les adénomes hypophysaires dérivent des 5 sous-types cellulaires composant l'antéhypophyse normale. Selon le type cytofonctionnel, les adénomes peuvent être sécrétants : les prolactinomes étant les plus fréquents (30 à 60% d'entre eux) [3], les adénomes somatotropes concernant 10 à 15% d'entre eux [3], les adénomes corticotropes, seulement 10% d'entre eux et les adénomes thyrotropes étant bien plus rares (< 1%). Certains adénomes peuvent être pluri-hormonaux (adénomes à GH et PRL ou à GH et SUalpha). Les adénomes non sécrétants ou non fonctionnels sont majoritaires (ils concernent plus de 50% des adénomes hypophysaires [4]) et incluent principalement les adénomes gonadotropes (30%) [3] et les adénomes non immunoréactifs.

Les adénomes hypophysaires sont considérés comme des tumeurs « bénignes » du fait de la rareté de la survenue de métastases, mais ces tumeurs sont associées à une certaine morbi-mortalité. Ces tumeurs sont classées comme invasives dans 45 à 55% des cas du fait de l'infiltration du sinus sphénoïdal, des sinus caverneux, de la dure-mère, de l'os et/ou des tissus avoisinants [5]. Chez certaines d'entre elles (10-20% environ) nous observons une vitesse de croissance rapide et des signes histologiques de prolifération, les faisant considérer comme des « adénomes atypiques » ou agressifs [6]. Il existe également des carcinomes hypophysaires (0.2%), caractérisés par la présence d'une ou plusieurs métastases à distance (cérébro-spinales ou systémiques), et ainsi considérés comme des tumeurs malignes. Malgré les avancées en techniques médicales et chirurgicales, une proportion significative d'adénome hypophysaire récidive ou progresse (environ 12.5% dans la littérature, avec un délai moyen de 6 ans) [7].

L'intervention chirurgicale reste le traitement de première intention, la radiothérapie ou radiochirurgie pouvant lui être associée. Les adénomes à prolactine sont généralement traités par agonistes dopaminergiques, alors que les adénomes somatotropes peuvent bénéficier de traitement par analogues de la somatostatine. Le temozolomide, une chimiothérapie habituellement indiquée dans les glioblastomes, peut être prescrit pour des adénomes « atypiques » de pronostic très péjoratif et résistants aux traitements conventionnels.

Les différents mécanismes de tumorigénèse sont peu connus, et nous ne pouvons clairement expliquer l'agressivité de certains adénomes. Les étiologies connues sont recensées dans la figure 2. Bien que la majorité des adénomes hypophysaires surviennent dans un contexte sporadique, 5 à 10% d'entre eux sont d'origine familiale [8]. Trois principaux gènes ont été identifiés, *MEN1*, *AIP* et *GPR101* principalement associés à des formes familiales d'adénomes somatotrope ou prolactinomes. La mutation du gène *AIP* cause une forme familiale isolée d'adénome hypophysaire, plus souvent agressif [9], une mutation de ce gène est retrouvée chez 11.7% des tumeurs hypophysaires sporadiques chez les jeunes de moins de trente ans [10]. La mutation du gène *GPR101* est responsable d'une acromégalie chez l'enfant, mais également à l'âge adulte [11].

Bien que rares, l'étude de ces formes familiales permet d'améliorer la compréhension des mécanismes de tumorigénèse ou d'agressivité tumorale ; ce qui est le cas de l'analyse des adénomes hypophysaires dus à la Néoplasie Endocrinienne de type I (NEM1).

Ainsi, nous nous sommes intéressés à la glande hypophysaire, la tumorigénèse des adénomes hypophysaires n'étant pas clairement comprise. De plus, l'analyse de ces formes familiales d'adénomes particulièrement agressifs contribue à la compréhension de mécanismes plus généraux de tumorigénèse.

Notre travail avait comme objectif de transposer les résultats obtenus à partir de l'étude d'un modèle murin de tumeurs hypophysaires à la tumorigénèse humaine dans le cadre d'une recherche translationnelle.

<p><b>Inherited</b>  MEN-1 with involvement of 11q13  Carney complex with involvement of 2p16 and 17q  Familial acromegaly with involvement of 11q13 and other loci  McCune-Albright syndrome with involvement of 20q13.2</p> <p><b>Hypothalamic</b>  Excess GHRH, CRH, TRH, or GnRH production</p> <p><b>Pituitary</b>  Hormone receptor abnormality  Signal transduction alterations (Gsp, CREB)  Growth factors and receptors - FGF, FGFR, NGF, NGFR, EGF, EGFR, VEGF, VEGFR, TGF<math>\alpha</math> and <math>\beta</math>  Activated oncogenes/cell cycle defects - PTTG, Ras, p27, p18, p16, cyclins  Loss of tumour suppressor gene function (11q13)</p> <p><b>Peripheral</b>  Target organ failure with feedback disruption, e.g. adrenal, thyroid and gonads</p> <p><b>Environmental</b>  None to date</p>	
<p>CRH - Corticotropin releasing hormone  EGF - Epidermal growth factor  FGF - Fibroblast growth factor  GHRH - Growth hormone releasing hormone  GnRH - Gonadotropin hormone releasing hormone  NGF - Nerve growth factor  PTTG - Pituitary tumour transforming gene  TGF – Transforming growth factor  TRH – Thyrotropin releasing hormone  VEGF – Vascular endothelial growth factor</p>	

**Figure 2** : étiologies possibles d'un adénome hypophysaire selon la classification WHO 2004 [1]

## **B) Le néoplasie endocrinienne multiple de type 1**

La Néoplasie endocrinienne multiple de type 1 (NEM1), aussi appelée le syndrome de Wermer, est une maladie autosomique dominante récessive due à une mutation du gène *MEN1* - menine (ch 11q13) [12]. Les patients atteints sont prédisposés à la formation de multiples tumeurs neuroendocrines.

### **a. Présentation clinique**

Bien que considérée comme rare, la NEM1 est la plus fréquente des néoplasies endocrines multiples, touchant 2 à 20 personnes sur 100000. Le degré de pénétrance est élevé, plus de 95% des patients présentant cette mutation développent des manifestations cliniques avant 50 ans [12]. Le sexe ratio est légèrement plus important pour les femmes (entre 52% et 58% selon les études) [13].

La formation de tumeurs endocrines touche principalement l'hypophyse, les parathyroïdes et le pancréas.

L'adénome parathyroïdien est l'atteinte la plus fréquente (il concerne 95% des patients) [12] et est responsable d'une hyperparathyroïdie primaire entraînant une hypercalcémie.

Par ailleurs, environ 90% des patients présentant une NEM1, développent une tumeur neuroendocrine entéro-pancréatique, comme le gastrinome, l'insulinome, le glucagonome, le somatostatine, la tumeur au polypeptide pancréatique (PP) ou la tumeur au polypeptide vasointestinal (VIP). Dans cette pathologie, les gastrinomes prédominent, sont observés chez 40% des patients [14], et peuvent être responsables d'un syndrome de Zollinger-Ellison. Les gastrinomes sont majoritairement localisés dans le duodénum, mais ils peuvent également être ectopiques, situés dans les voies biliaires ou le foie ; les localisations pancréatiques étant rares et parfois corrélées à une agressivité de la tumeur [14]. Par ailleurs, il existe des tumeurs d'îlots pancréatiques mixtes avec des cellules  $\alpha$ ,  $\beta$  et des cellules à PP. Ces différents types cellulaires peuvent sécréter respectivement du glucagon (glucagonome), de l'insuline (insulinome), et des polypeptides pancréatiques (PPomes). Bien que la majorité des tumeurs entéro-pancréatiques soient sécrétantes, une grande partie d'entre elles (20%) sont dites non fonctionnelles, comme les tumeurs à PP, et ne se traduisent par aucun signe clinique. Ces tumeurs non fonctionnelles ont pourtant un pronostic péjoratif, en raison de leur forte capacité à devenir malignes, et leur diagnostic plus tardif.

Les tumeurs corticosurrénales, quant à elles, concernent 35% des patients atteints par une NEM1 et sont habituellement non sécrétantes (mais elles peuvent parfois induire un hypercorticisme ou un hyperaldostérionisme) [14].

Selon le groupe des tumeurs endocrines (GTE), 20 à 40% des patients souffrant d'une NEM1, présentent un adénome hypophysaire. Les tumeurs hypophysaires sécrétant la PRL (prolactinomes) sont les plus fréquentes [15]. Il a été décrit que seulement 0.6 à 2.6% des tumeurs hypophysaires sporadiques sont associées à une mutation du gène *MEN1*. La prévalence serait plus fréquente chez les sujets jeunes de moins de trente ans, puisqu'elle attendrait 3.2% sur une cohorte de 174 patients présentant une tumeur hypophysaire [16]. Il est important de souligner que les tumeurs associées à une mutation du gène *MEN1* sont plus invasives et de plus grandes tailles que les tumeurs sporadiques [17] [18]. D'ailleurs, environ 85% des tumeurs hypophysaires s'intégrant dans une NEM1 sont des macro-adénomes, contre 64% des tumeurs sporadiques, et respectivement 30% d'entre elles sont invasives, contre 10% [19]. De plus, elles sont la plupart du temps pluri-sécrétantes ( $p=0.001$ ), et synthétisent principalement de l'hormone de croissance et de la prolactine. Il existe également des adénomes non fonctionnels (environ 28%) ou corticotropes (10%) [17]. En somme, les prolactinomes dans le cadre d'une NEM1 sont généralement plus résistants aux agonistes dopaminergiques, en comparaison aux adénomes sporadiques [20].

Plus rarement, les tumeurs neuroendocrines du thymus et les tumeurs carcinoïdes pulmonaires peuvent être associées à la NEM1, avec une prévalence de 2 et 8% respectivement [21]. D'autres types de tumeurs ont été décrits dans cette pathologie, comme les lipomes, les angiomes, les méningiomes et les collagénomes. Certains patients peuvent également développer des carcinomes des glandes parathyroïdes (moins de 10 cas décrits dans la littérature) et une mutation du gène *MEN1* a récemment été décrite dans ce contexte (c.129insA) [22].

En outre, les tumeurs neuroendocrines notamment entero-pancréatiques et carcinoïdes ont un risque métastatique plus élevé dans le cadre d'une NEM1 que dans les cas sporadiques [23] [24]. Le risque d'une dissémination métastatique est proche de 50% pour les insulinomes liés à une NEM1, contre moins de 10% dans les cas sporadiques. De

plus, les tumeurs neuroendocrines liées à une NEM1 sont plus agressives et plus résistantes au traitement par chimiothérapie, radiothérapie et chirurgie.

## **b. L'aspect génétique et les modèles murins**

**Le gène *MEN1*, suppresseur de tumeur**, composé de 10 exons, est localisé en 11q13. Il s'agit d'un gène oncosuppresseur, qui code pour une protéine de 610 acides aminés, principalement nucléaire, la ménine. Des mutations germinales hétérozygotes sont observées chez environ 90% des patients atteints, et sont dispersées sur toute la région codante du gène. Plus de 1336 mutations (germinales et sporadiques) ont été décrites dans la littérature [25]. Il semblerait que l'expression clinique de la NEM1 diffère entre les familles, ce qui est probablement dû à des mutations spécifiques du gène *MEN1*. Bien qu'aucune corrélation claire génotype-phénotype ne puisse être définie, en cas de mutation localisée au niveau du domaine d'interaction avec JunD, le risque de mortalité s'accroît [26]. De plus, dans une même famille, l'expression clinique peut varier également, ce qui résulte probablement de facteurs génétiques et épigénétiques additionnels [27].

*Bertolino et al.* [28] et d'autres [29] [30] ont étudié le rôle du gène *MEN1* dans les tumeurs endocrines, grâce à l'étude de modèles murins présentant une invalidation totale ou conditionnelle de ce gène. Plusieurs modèles murins existent, nous permettant d'étudier les conséquences fonctionnelles de l'inactivation du gène *MEN1* dans différents organes, et de comprendre les mécanismes conduisant au développement tumoral dans la NEM1.

Les souris nullizygotés (*MEN 1<sup>-/-</sup>*) pour le gène *MEN1* meurent au cours du développement embryonnaire à mi-gestation, à cause de multiples anomalies (hémorragies, fermeture anormale du tube neural, organogenèse incomplète du foie et du cœur [31], et anomalies du développement crânial et/ou facial [32]). Le rôle du gène *Men1* est donc essentiel pour le développement embryonnaire, notamment lors des différenciations osseuse et hématopoïétique. De plus, ménine semble indispensable à la survie et au développement des cellules endocrines pancréatiques lors de l'embryogénèse [33].

Les souris hétérozygotes pour *MEN1* ( $Men1^{+/-}$ ) apparaissent normales à la naissance, puis à l'âge d'un an, développent des tumeurs endocrines multiples avec une très forte pénétrance. Le spectre tumoral est très proche de la pathologie humaine [32] [34] [30], faisant de ces souris un bon modèle pour l'étude des mécanismes moléculaires liés à l'inactivation du gène chez les patients. Les souris  $Men1^{+/-}$  développent plus fréquemment des insulinomes, puis des adénomes parathyroïdiens, ainsi que des tumeurs hypophysaires et surrénaliennes. De plus, ces tumeurs sont associées à une perte du gène *MEN1*, gène totalement inactivé lors du développement de ces tumeurs, signifiant que la perte complète de ménine fonctionnelle est nécessaire au développement de ces tumeurs endocrines [35] [36]. La perte d'hétérozygotie (LOH) pour *MEN1* entraîne donc le développement de tumeurs dans les tissus endocrines.

Ces souris étant très utilisées comme modèle de la pathologie humaine, il a été démontré dans une étude, que la thérapie génique de remplacement du gène *MEN1* défectueux par un allèle fonctionnel (à l'aide d'un adénovirus recombinant) conduit à une réexpression de ménine dans les tumeurs hypophysaire et à une diminution de la prolifération cellulaire [37].

Afin de mieux étudier les conséquences directes de l'inactivation du gène *MEN1* au sein d'un tissu et d'un type cellulaire particulier, des modèles de « knock-out » conditionnel ciblant précisément les organes endocrines affectés dans la pathologie NEM1 ont été conçus par plusieurs équipes. Nous avons pu utiliser deux de ces modèles pour ce travail. Dans notre laboratoire, il a été généré un modèle *MEN1* knock-out conditionnel, où le gène *MEN1* était inactivé dans la glande mammaire, afin d'étudier les effets de la perte du gène *MEN1* dans cette glande. Des souris porteuses de deux allèles dits « floxés » du gène *MEN1* ( $Men1^{F/F}$ ) ont ainsi été croisées avec des souris transgéniques WapCre porteuses de transgènes exprimant l'enzyme Cre recombinase (Cre, Causes recombination) placée sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la glande mammaire WAP (whey acidic protein) [38]. Une fuite inattendue de l'expression du transgène WapCre dans les cellules hypophysaires à prolactine a été constatée conduisant à une invalidation de *MEN1*, dans les cellules lactotropes antéhypophysaires. Ces souris  $Men1^{F/F}$ -WapCre<sup>+</sup> développent ainsi des tumeurs hypophysaires de type prolactinomes dès l'âge de 9 mois [38].

De plus, nous avons à notre disposition un autre modèle de souris KO conditionnel de *MEN1* dans les cellules bêta pancréatiques, établi par une équipe australienne (Dr Nicholas K. Hayward, Queensland Institute of Medical Research) [30]. Ces souris *Men1<sup>F/F</sup>-RipCre<sup>+</sup>* expriment la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de l'insuline de rat (Rip : Rat insulin promoter), et développent pour 40% d'entre elles des adénomes d'îlot pancréatiques à 6 mois, et un insulinome à 10 mois avec une pénétrance complète [28] [29]. Nous avons constaté qu'il existe également une fuite de l'expression du transgène *RipCre* dans l'adénohypophyse, engendrant le développement de prolactinome également à 9 mois [39].

### **c. Les partenaires de ménine et leurs fonctions**

Le gène *MEN1* code pour une protéine ubiquitaire, principalement nucléaire, appelée ménine. Il est bien connu que cette protéine interagit avec de multiples partenaires. De nombreuses interactions protéiques ont été décrites, suggérant un large spectre d'activité de ménine, concernant la régulation de la transcription, le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation, la prolifération et l'apoptose, ainsi que le maintien de l'intégrité du génome [40].

*Les interactions entre ménine et d'autres protéines (figure 3) :*

Ménine se lie avec de nombreux facteurs de transcription, comme JunD ou les protéines Smad. Ménine peut ainsi réprimer l'activité transcriptionnelle de JunD [41], grâce à son interaction avec le corépresseur mSin3A (mammalian sin3 protein) et probablement par le recrutement d'histone déacétylase au niveau de la région promotrice [42]. A l'inverse, quand JunD est exprimé en l'absence de ménine, il devient un activateur de la prolifération cellulaire.

Ménine coopère avec les protéines Smad1, 3 et Smad 5, effectrices de la voie inhibitrice TGF- $\beta$ /BMP. Il a été décrit dans les tumeurs hypophysaires et les cellules parathyroïdiennes que ménine semble nécessaire au blocage de la prolifération cellulaire, par l'activation de la voie TGF- $\beta$  et la répression de la synthèse de plusieurs hormones sécrétées par des tissus atteints dans la pathologie NEM1 [43] [44].



L'interaction physique de ménine avec différents composants de la famille de régulateurs transcriptionnels NF- $\kappa$ B, p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), et p65M (RelA), réprime la transcription dépendante de NF- $\kappa$ B [45]. L'effet antiprolifératif de ménine pourrait d'ailleurs être dû à l'inhibition de NF- $\kappa$ B. De plus, ménine semble nécessaire à la signalisation Wnt/beta-catenine dans les îlots pancréatiques tumoraux [46]. Les mécanismes d'interaction de ménine dans cette voie Wnt/beta-catenine restent pour le moment controversés dans la littérature.

L'interférence de ménine avec des **cofacteurs de transcription** a été décrite, tels que le proto-oncogène Mixed Lineage Leukemia (MLL), initialement décrit comme une cible habituelle de translocations chromosomiques dans les leucémies aiguës [47]. Certaines mutations de ménine, retrouvées chez les patients NEM1 empêchent cette liaison, pouvant expliquer le mécanisme de tumorigénèse. De plus, des interactions physiques et fonctionnelles sont observées entre ménine et certains **récepteurs nucléaires**, comme par exemple le récepteur aux œstrogènes alphas (ER $\alpha$ ) [48] et le récepteur à la vitamine D, sachant que les souris déficientes pour le récepteur à la vitamine D (VDR-null mice) développent une hyperplasie parathyroïdienne [49].

#### *Ménine au cœur de la régulation cellulaire [40]*

Ménine est impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire, en inhibant l'action de facteurs prolifératifs, tels que les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines 4 et 2 (CDK4 et CDK2, Cyclin-Dependant Kinase). Par exemple, il a été démontré dans des insulinomes de souris déficientes pour *MEN1* [50] et dans des cellules épithéliales intestinales de rat, que l'inactivation de ménine augmente l'expression de gènes codant pour la cycline D1, la cycline D4 et la CDK4 [51]. Habituellement, les complexes cyclines-CDK stimulent la progression du cycle cellulaire pour le passage en phase G1.

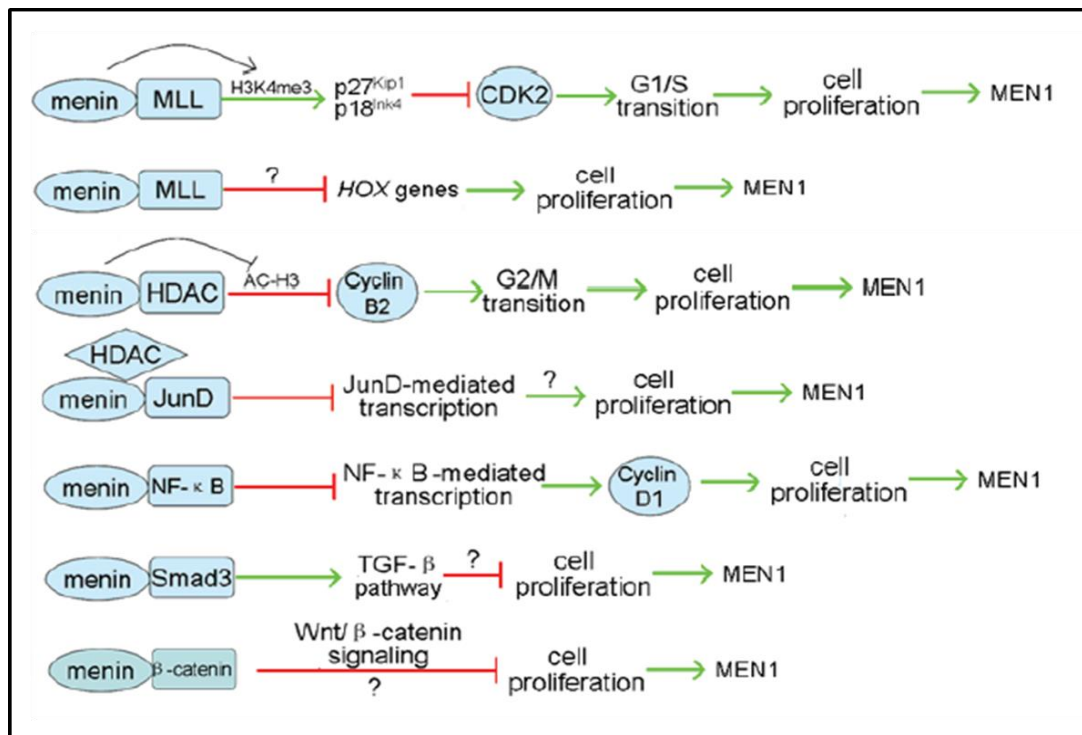
Par ailleurs, ménine semble être un médiateur de l'apoptose cellulaire, tout comme d'autres suppresseurs de tumeurs (p53, BCRA1,...). Ainsi, ménine active Bax et Bak [52], deux protéines pro-apoptotiques, essentielles au dysfonctionnement mitochondrial requis pour la mort cellulaire en réponse à divers stimuli [53]. Ménine peut également augmenter l'expression de caspase 8, une protéine pro-apoptotique, activée par de multiples récepteurs de mort cellulaire. Comme démontré dans les fibroblastes embryonnaires de souris,

l'inhibition du gène *MEN1* conduit à une diminution de l'expression de caspase 8 [52]. Chez l'humain, le promoteur de caspase 8 est activé par la protéine p53. Il est suspecté que ménine empêche la méthylation de la région promotrice du gène codant pour la caspase 8.

Concernant les interactions avec le système endocrinien, il a été montré que la surexpression de ménine inhibe le promoteur de plusieurs hormones comme l'insuline, la prolactine et la PTH (parathyroïde hormone) dans les cellules endocrines en culture [54] [55]. L'action inhibitrice de ménine, couplée à celle des Smad2 et 3 de la voie TGF- $\beta$  peut diminuer l'expression d'un facteur de transcription de l'hypophyse, Pit-1, indispensable à la génération et au maintien des lignées hypophysaires somatotropes, lactotropes et thyrotropes [56].

De plus, une étude plus récente utilisant un siRNA a révélé qu'une diminution de ménine impacte l'expression d'insuline dans les cellules  $\beta$  après une stimulation par glucose, suggérant que ménine est essentielle pour la fonction endocrine pancréatique.

**Les mécanismes moléculaires responsables de la spécificité neuroendocrine des mutations de ménine demeurent encore inconnus** [57]. Une des hypothèses est que ménine régule des facteurs endocriniens spécifiques, pour contrôler la prolifération et la différenciation cellulaire. L'identification de molécules cibles de ménine est donc un challenge, pour mieux comprendre la tumorigénèse due à l'inactivation du gène *MEN1*. De récentes études effectuées dans le laboratoire du Dr Zhang ont mis en évidence le rôle des protéines Maf et d'autres facteurs de transcription dans la tumorigénèse d'îlots cellulaires pancréatiques due à l'absence de ménine [58].



**Figure 3 :** Menine, supresseur de tumeur, interagit avec de nombreux facteurs de transcription (FT) et cofacteurs

[59]

### C) Les protéines Maf

#### a. Description générale de la famille des protéines Maf : facteur de différenciation ou oncoprotéine ?

Les facteurs de transcription membres de la famille Maf (Maf A, Maf B et c-Maf), sont connus pour leurs actions oncogéniques dans de nombreux tissus. Ils appartiennent à la famille AP1 (activating protein-1) [60], composée de facteurs de transcription dimériques, comme Jun, Fos ou ATF (activating transcription factor), qui lient des sites ADN, nommés les « AP1-binding sites » [61]. Le domaine ADN de liaison définit un spectre de gènes contrôlés par ce groupe de protéines, appelés « les gènes cibles » de ces facteurs de transcription [62]. La famille AP1 est caractérisée par sa capacité de liaison de séquences d'ADN : TRE (12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA)-responsive element) ou CRE (cAMP responsive élément) par leur domaine bZIP. L'espace où ces oncoprotéines Maf se lie spécifiquement est appelé le « Maf recognition élément » (ou MARE). La protéine Maf peut également se

dimériser avec d'autres protéines possédant le domaine bZIP, présent entre autres chez certains facteurs de transcription comme Jun ou Fos. Lorsqu'un hétérodimère est formé, la protéine Maf permet à celui-ci de se lier à l'ADN via le MARE et le facteur de transcription peut ainsi activer la transcription du ou des gènes associés.

Le groupe des protéines Maf inclut les grandes et petites Maf [60]. Le rôle des petites protéines Maf (MafF, MafG et MafK) n'a pas été décrit dans les cancers. En revanche, les grandes oncoprotéines comme MafA (L-Maf), MafB ou Maf (c-Maf) ont un potentiel oncogène décrit dans la littérature [60]. Les gènes codant pour les grandes Maf sont aussi impliqués dans le développement, la différenciation cellulaire précoce et terminale ; **leur rôle biologique semble spécifique selon les tissus concernés [63].**

#### *Les protéines Maf, facteurs de différenciation*

MafB (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue B) a un rôle important dans l'embryogénèse. MafB contrôle la différenciation neuronale qui régule le rythme respiratoire dans le cerveau, la différenciation ostéoclaste, la différenciation des podocytes dans le rein [61] et la maturation des cellules pancréatiques  $\alpha$  et  $\beta$ . De plus, MafB est initialement exprimé dans les myéloblastes, puis ensuite seulement dans les monocytes et les macrophages [64]. Il est requis pour la différenciation monocyttaire [65] et la phagocytose des macrophages [66].

Les souris invalidées pour le gène MafB décèdent à la naissance à cause d'anomalies neuronales intracérébrales au niveau de la commande de la respiration [67]. De plus, ces modèles murins développent des dysgénésies rénales dues à l'absence de différenciation des podocytes, une hypoplasie de l'oreille interne et une dysfonction macrophagique [68]. L'absence de MafB peut donner lieu à un syndrome ostéolytique multicentrique et carpotarsal.

Concernant MafA, cette protéine est exprimée dans les cellules pancréatiques  $\beta$  chez la souris pendant le développement embryonnaire et à l'âge adulte. MafA est impliqué dans la régulation de gènes cruciaux du métabolisme en particulier les gènes codant pour l'insuline pour GLUT2 (glucose transporter).

Les modèles murins déficients pour MafA développent quant à eux une intolérance au glucose et un diabète de type 2 [69].

### *Les protéines Maf et leur potentiel oncogène*

Les protéines Maf ont un rôle dans le développement des lymphomes à cellules T et du myélome multiple (MM). Le MM se caractérise principalement par une infiltration de cellules plasmocytaires dans la moelle osseuse et une production excessive d'une immunoglobuline monoclonale. Plus précisément, le début de la maladie est lié à une translocation chromosomique dans une cellule lymphoïde B. Cette translocation primaire juxtapose les forts promoteurs des gènes de synthèse des IG (« Ig enhancer ») et un oncogène sur le chromosome partenaire impliqué dans la translocation (par exemple cycline D1 sur le chromosome 11 ou cycline D3 sur le chromosome 6). Cette translocation constante est responsable de l'immortalisation de la cellule lymphoïde [70]. Cette translocation peut ainsi déréguler l'expression d'une oncoprotéine Maf (16q23-MAF; 20q12-MAFB ou 8q24.3-MAFA), menant à une augmentation de la protéine Maf et donc de ses gènes cibles comme la cycline D2 (en liant son promoteur) et l'intégrine B7 [70]. De plus, il a été décrit que les translocations t(14;16) and t(14;20) incluant cMaf sont associées à un pronostic péjoratif dans le myélome multiple [70]. Egalement, une surexpression de MafB a été décrite dans les lymphomes à cellules T [71]. Le pouvoir oncogénique des protéines Maf est également lié à leur capacité d'améliorer les interactions entre les cellules tumorales et avec le stroma [60].

### *Fine régulation spatiotemporelle*

L'expression des oncoprotéines Maf est régulée en fonction du moment du développement et du lieu. Les gènes cibles sont donc exprimés différemment selon le stade de différenciation. Ce phénomène est bien connu dans le pancréas où une cascade de gènes codant pour les grandes Maf sont exprimés. Il est important de préciser que les grandes protéines Maf peuvent réguler leur propre expression, car les séquences MARE sont présentes sur les promoteurs Maf, MafB et MafA [60]. Nous pouvons donc facilement imaginer qu'une simple dérégulation de leur pouvoir de transcription, transforme ces protéines clefs de la différenciation en pro-oncogènes.

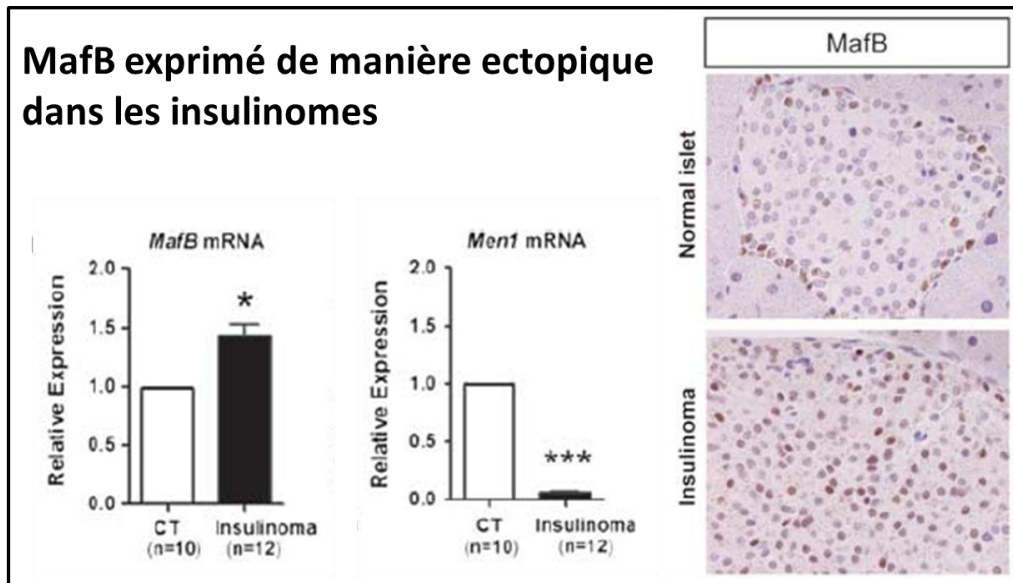
**b. Lien entre ménine et les oncoprotéines Maf:**  
**modèle de l'insulinome chez la souris NEM1 KO**

Dans ce contexte de recherche de facteurs endocriniens spécifiques impliqués dans la tumorigénèse de la NEM1, Lu *et al.* (2012) ont mis en évidence le possible rôle des oncoprotéines MafB dans les cellules  $\beta$  normales et dans l'insulinome développé chez des souris déficientes pour le gène *MEN1*. Chez les souris normales, MafB n'est présent que dans les cellules  $\alpha$  à l'âge adulte [72] [73], alors qu'il est exprimé dans les cellules  $\beta$  embryonnaires. MafB serait donc un facteur de différenciation précoce des cellules  $\beta$  chez la souris. En revanche, chez les souris gestantes et celles nourries avec un régime gras, MafB est ré-exprimé dans environ 30% des cellules  $\beta$  [58]. De plus, les souris « Knock out *MEN1* » présentent une réexpression ectopique de MafB dans les lésions précoces des cellules  $\beta$  et dans les insulinomes ; son expression étant corrélée au degré de prolifération cellulaire (Figure 4). En outre, quand l'expression de ménine est freinée par un siRNA dirigé contre l'ARNm de *MEN1* dans des lignées cellulaires de cellules  $\beta$ , l'expression de MafB augmente en regard, suggérant une régulation de MafB par ménine.

De manière surprenante, MafA, facteur de différenciation terminal des cellules  $\beta$ , est aussi dérégulé en l'absence de ménine dans les cellules et les tumeurs. Une diminution de l'expression de MafA, corrélée avec une augmentation du taux de prolifération des cellules  $\beta$ , a été observée dans les insulinomes de NEM1 de souris et d'humains [74]. Par ailleurs, il a été montré que l'inactivation de ménine dans des lignées cellulaires  $\beta$  altérerait l'expression de MafA en réponse à une stimulation par le glucose. Il s'avère que dans des cellules normales, ménine lie le promoteur de MafA et est donc nécessaire à sa transcription lors d'une stimulation par le glucose.

Ainsi, les données ci-dessus suggèrent que l'inactivation de ménine entraîne une dérégulation de l'expression de MafA et MafB, menant à une perturbation de la différenciation et de la prolifération cellulaire.

## MafB exprimé de manière ectopique dans les insulinomes



**Figure 4:** Souris *Men1*<sup>F/F-RipCre+</sup> “îlots de souris mutante de 12 mois et de souris contrôle

\* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$

[58]

## **II) OBJECTIFS DE MON ETUDE**

Le lien entre l'inactivation de ménine et la réactivation des oncoprotéines MafB dans l'insulinome a récemment été mis en évidence par l'équipe du Dr Chang Zhang (2012). Il nous semblait dès lors important de rechercher si un mécanisme identique était impliqué dans les autres tumeurs neuroendocrines dans un contexte de NEM1.

Nous nous sommes intéressés à l'hypophyse car d'une part, dans le cadre d'une NEM1, les tumeurs hypophysaires sont la plupart du temps des macro-adénomes invasifs, résistants au traitement médical. D'autre part, nous avons à disposition des tumeurs hypophysaires de souris et d'humains atteints d'une NEM1.

**L'objectif primaire de mon travail de recherche était donc de caractériser si MafB, agissant comme oncoprotéine, est surexprimé dans l'hypophyse tumorale des souris *MEN1* knock-out, par rapport à l'hypophyse normale.**

**Dans un second temps, nous avons caractérisé l'expression de MafB dans l'hypophyse normale humaine et les adénomes hypophysaires sporadiques.**



### III) MATERIELS ET METHODES

#### **Le modèle de la souris**

Comme explicité précédemment nous avons utilisé le modèle créé par le laboratoire de souris *MEN1* knock-out conditionnel (*Men1<sup>F/F</sup>-WapCre<sup>+</sup>*), et celui prêté par l'équipe australienne (*Men1<sup>F/F</sup>-RipCre<sup>+</sup>*). Des souris contrôles « sauvages » ont été également utilisées comme contrôle.

#### **Les tissus hypophysaires humains**

En collaboration avec le Dr Alexandre Vasiljevic, du laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques du CHU de Lyon-Est nous avons obtenu des coupes de 11 hypophyses normales juxta-tumorales réséquées lors d'une intervention chirurgicale pour adénome hypophysaire en 2013 et en 2014. Les interventions chirurgicales ont eu lieu au CHU de Lyon-Est et à l'hôpital Bretonneau (CHU) de Tour.

Nous avons pu obtenir également des adénomes hypophysaires sporadiques, avec au total 15 adénomes hypophysaires appartenant à des patients opérés en 2013 et 2014, dont 8 adénomes gonadotropes (nommés G1 à G8), 5 prolactinomes (nommés P1 à P5), 1 adénome somatotrope (S1) et 1 corticotrope (C1).

Les lames d'anatomopathologie ont été relues avec le Dr Alexandre Vasiljevic.

Les tumeurs hypophysaires ont été analysées à l'aide d'une classification clinico-anatomopathologique récemment publiée [75]. Elles sont ainsi classées en 4 grades selon la présence ou non d'une invasion et de marqueurs de prolifération. Les tumeurs non invasives sont classées 1, tandis que les tumeurs invasives sont classées 2. Lorsque des critères histologiques de prolifération (nombre de mitoses élevé, p53 détectée ou Ki 67 élevé) sont absents, les tumeurs sont classés a. A l'inverse, quand 2 sur 3 critères de prolifération sont présents, elles sont classées b [75]. Ainsi, 4 grades sont utilisés : 1a, 1b, 2a et 2b.

## L'immunofluorescence chez la souris

Des analyses par triple ou quadruple immunofluorescence ont été réalisées sur des tumeurs hypophysaires à prolactine de femelle. La lame d'hypophyse était initialement mise à l'étuve à 55°C pendant 30 minutes, afin de fixer la coupe. Ensuite, la section était déparaffinée dans 3 bains de xylène de 5 minutes chacun, puis réhydratée dans des bains d'alcool à 100%, 95%, et 70 % pendant 5 minutes chacun et rincée à l'eau distillée. Nous avons ensuite incubé le tissu dans du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.3% pendant 10 min afin de bloquer les peroxydases endogènes, puis rincé à l'eau distillée. Pour démasquer l'antigène, nous avons immergé la lame dans du tampon de démasquage (Vector-Lab H-3300), que nous avons fait chauffer pendant 5 minutes à 1000Watt jusqu'à ébullition, puis 10 minutes à 450 Watts. La lame a refroidi 1 heure dans le tampon. Nous avons lavé 3 fois la lame dans des bains de PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X). Après cela, une solution de blocage avec un diluant d'anticorps (Dako S3022) a été appliquée sur la section pendant 1 heure à température ambiante, pour minimiser le bruit de fond des liaisons non spécifiques de l'anticorps. Ensuite, nous avons incubé le tissu avec un premier anticorps primaire qui nécessitait une amplification: soit l'AC anti ménine (Bethyl Laboratory, Inc., Montgomery, TX, USA; dilution à 1:4000), soit l'AC anti MafB (Bethyl Laboratory, Inc., Montgomery, TX, USA; dilution à 1:2000), ou l'AC anti MafA (Bethyl Laboratory, Inc., Montgomery, TX, USA; dilution à 1:2000). Cet AC primaire était laissé pendant 1 nuit en chambre humide à 4°C.

Le lendemain, nous avons lavé 3 fois pendant 5 minutes dans du PBS. Nous avons appliqué l'anticorps secondaire à une dilution de 1/200 dans du diluant d'anticorps pendant 1 heure à température ambiante. Une amplification avec le kit ABC VECTASTAIN a ensuite été réalisée, ainsi qu'une amplification de la signalisation avec le TSA (Tyramine Signal Amplification) couplé à un fluorophore. Pour évaluer la co-sécrétion hormonale, nous avons utilisé un second AC primaire antihormones : soit l'AC anti prolactine (PRL C-17, sc-7805 Santa Cruz Biotechnology, Inc.; dilution à 1:20), soit l'AC anti hormone de croissance (Novocastra, United Kingdom; dilution à 1:200), que nous avons laissé incubé toute une nuit. Ces AC ne nécessitent pas d'amplification. L'anticorps secondaire était directement couplé à un fluorochrome. Du Dapi a été utilisé pour visualiser le noyau.

## **L'immunohistochimie chez l'homme**

Le premier jour, les mêmes étapes ont été exécutées, comme celles de l'IF, avec la pose d'un AC primaire laissé une nuit. L'AC primaire utilisé était l'AC anti-hMafB, afin de détecter la protéine MafB dans les cellules humaines. Cet anticorps non commercial, nommé anti-hMAFB2 (mouse monoclonal antibodies, clone IF4), réagissait spécifiquement avec l'antigène de MafB exprimé dans les fibroblastes embryonnaires de la souris et dans le pancréas chez la souris, sans réaction croisée avec d'autres membres de la famille MAF. La spécificité de l'AC est donc bonne. Ces anticorps ont ensuite été validés par IHC pour la détection de MafB endogène humain sur des coupes humaines pancréatiques fixées [76], alors qu'aucun autre AC anti-hMafB commercialisé ne donne une détection satisfaisante de MAFB humain.

Le lendemain, l'anticorps secondaire biotinylé a été appliqué à une dilution de 1/200 dans du diluant d'anticorps pendant 1 heure à température ambiante. Ensuite, l'anticorps secondaire a été amplifié le lendemain en utilisant le protocole standard d'immunohistochimie (HRP – Peroxyde – DAB). Nous avons rincé 3 fois pendant 5 minutes dans du PBS. Nous avons ensuite ajouté le chromogène (DAB), laissé pendant 2 minutes 30, puis nous avons rincé à l'eau distillée. Nous avons appliqué de l'hématoxyline pendant 2 minutes 30, puis nous avons effectué à nouveau un lavage à l'eau pendant 10 minutes. Le tissu a ensuite été déshydraté dans 3 bains d'alcool à 70%, 95%, puis 100% pendant 5 minutes chacun et trempé dans 2 bains de xylène pendant 2 minutes chacun. Enfin, la lame a été montée pour l'observation.

#### IV) RESULTATS

##### A) Expression de la protéine ménine dans l'hypophyse normale chez la souris

Nous avons analysé en détail l'expression de ménine dans différents sous types cellulaires de l'hypophyse normale de souris, par triple IF. Etant donné que les prolactinomes et les adénomes somatotropes sont les tumeurs hypophysaires les plus fréquentes dans le cadre de la NEM1, nous avons focalisé notre analyse sur ces deux types cellulaires. Nous avons trouvé que, dans l'hypophyse normale, l'expression de ménine semble hétérogène entre les cellules endocrines, notamment entre les cellules à GH et à PRL (Figures 5a, b, c, d). Bien que la majorité des cellules hypophysaires endocrines (cellules à noyau bien rond) expriment ménine, le niveau d'expression varie selon les cellules, avec une minorité de cellules qui expriment peu, voire pas ménine (Figure 5b). En étudiant la co-expression de ménine et prolactine ou de ménine et GH, nous observons que les cellules à GH expriment plus fortement ménine (Figure 5c). En revanche, ménine est aussi présente dans les cellules à prolactine, mais le niveau d'expression semble plus faible et hétérogène (Figure 5d).

Afin de s'assurer de l'absence de ménine dans les prolactinomes de souris *Men1<sup>F/F</sup>-WapCre<sup>+</sup>* et *Men1<sup>F/F</sup>-RipCre<sup>+</sup>*, nous avons réalisé la même analyse par IF chez cinq souris. Comme attendu, aucune expression de ménine n'a été retrouvée dans les cellules tumorales (Figure 5 e et f).

## **B) Expression de MafB dans l'hypophyse de souris :**

### **a. L'hypophyse normale**

Afin d'investiguer le rôle éventuel des protéines Maf dans la tumorigénèse des prolactinomes liés à la NEM1, nous avons dans un premier temps étudié l'expression des oncoprotéines MafA et MafB dans l'hypophyse normale, par IF. Nous n'avons détecté ni MafA ni MafB dans les cellules normales hypophysaires endocrines normales, dans huit hypophyses testées (Figure 6b, c). Un petit nombre de cellules étaient positives pour l'AC anti MafB mais elles ne co-exprimaient pas la prolactine et arboraient un noyau aplati. Ces données suggèrent que ce marquage ne corresponde pas à des cellules endocrines hypophysaires (Figure 6b). De plus, la co-expression de ménine et MafB dans les cellules probablement endocrines était faible ou absente (Figure 6a).

### **b. Le prolactinome des souris « *MEN1* Knock out »**

A l'inverse, un fort immunomarquage de MafB a été découvert dans 5 des 20 (25%) prolactinomes de souris NEM1 testés (Figure 6d, e). Le marquage de MafB était nucléaire, et principalement présent dans les cellules sécrétant de la prolactine. En moyenne, nous avons détecté 5 à 20% de cellules tumorales positives pour MafB. Plus précisément, MafB est surexprimé dans 2 prolactinomes sur 12 testés de souris transgéniques *Men1<sup>F/F</sup>-WapCre<sup>+</sup>* ; et dans 3 sur 8 des tumeurs testées de souris *Men1<sup>F/F</sup>-RipCre<sup>+</sup>* (tableau 1).

MafA n'a été détecté dans aucun des prolactinomes testés, quelque soit la dilution utilisée (Figure 6f).

La coloration jaune (Fig6 f.) est un artefact de marquage qui correspond aux cellules sanguines.

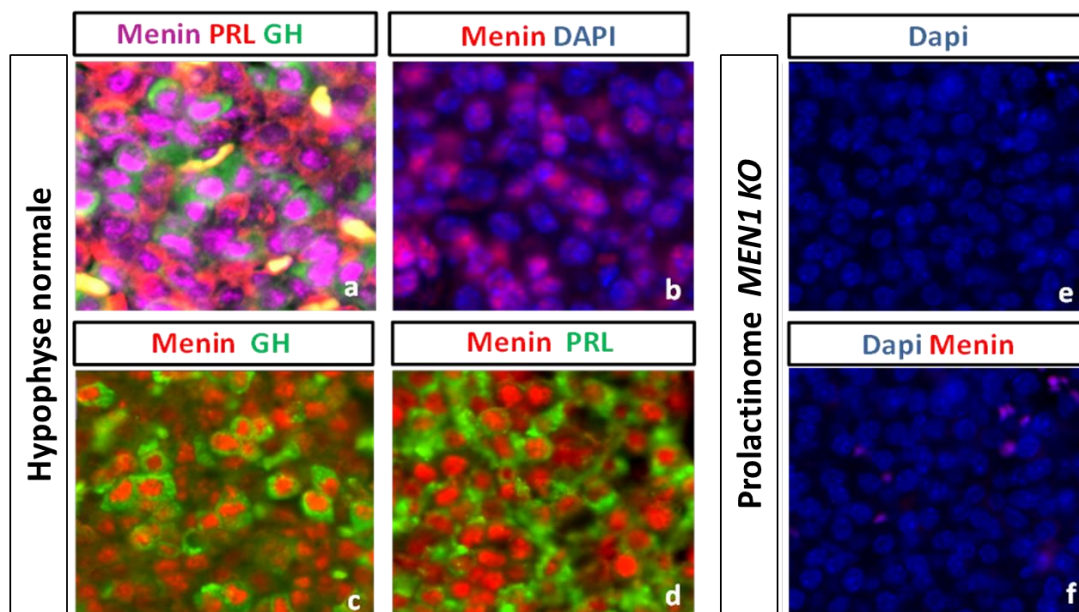
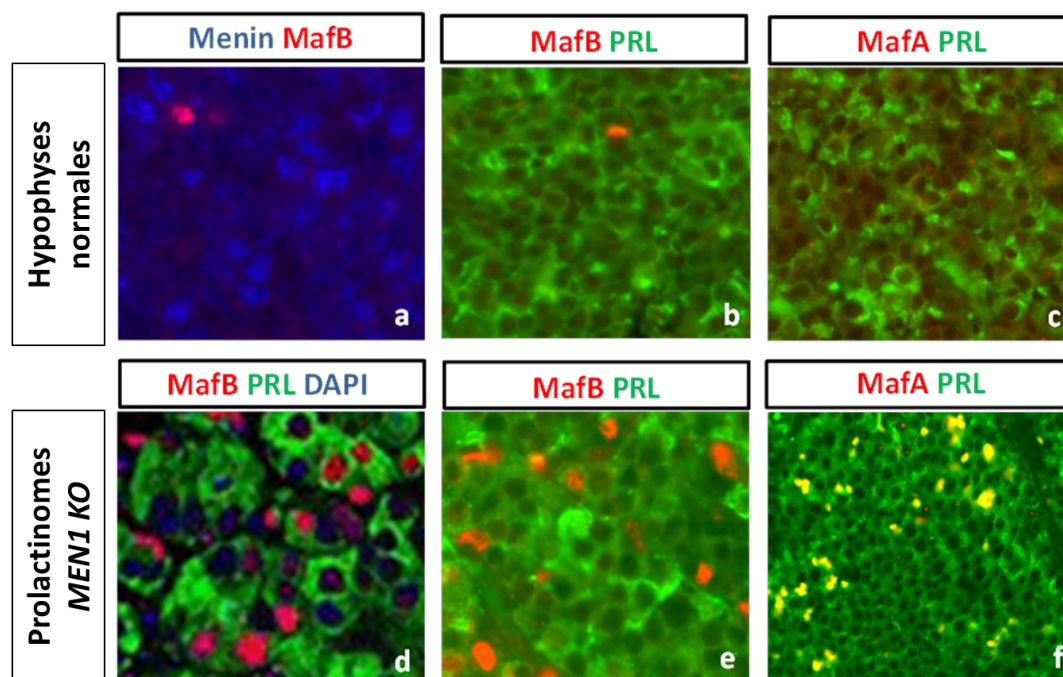


Figure 5: Immunofluorescence: ménine dans l'hypophyse normale de souris expression de ménine hétérogène dans les cellules à PRL et à GH (Fig.5a); expression de ménine et DAPI (Fig.5b); ménine dans les cellules à GH et PRL (Fig.5c and 5d respectivement); ménine dans le prolactinome de souris "*MEN1 KO*": expression de ménine et DAPI dans les prolactinomes (Fig.5e and 5f).



Figures 6: Immunofluorescences: expression de MafB et MafA dans des souris contrôles et mutantes : colocalisation de Ménine et MafB dans l'hypophyse normale (Fig. 6a), expression de MafB (Fig.6b) et de MafA (Fig.6c) dans l'hypophyse normale expression de MafB dans différents prolactinomes (Fig. 6d et 6e), expression de MafA dans les prolactinomes (Fig. 6f).

**Tableau 1 : Expression de MafB dans différents prolactinomes de souris**

Modèles de souris	Augmentation de l'expression de MafB	Pas de changement dans l'expression de MafB
Souris <i>Men1F/F-WapCre+</i>	2	10
Souris <i>Men1F/F-RipCre+</i>	3	5
<b>TOTAL souris mutantes testées</b>	<b>5</b>	<b>15</b>

## **C) Expression de MafB dans l'hypophyse humaine**

### **a. MafB dans l'hypophyse normale**

#### *Caractéristiques des hypophyses normales*

Concernant les onze hypophyses normales testées, le sexe ratio était : 1 homme contre 10 femmes, et l'âge moyen était de 50 ans (patients âgés de 38 à 73 ans). Quatre hypophyses normales ont été décrites sans adénome retrouvé lors de la résection chirurgicale, tandis que sept d'entre elles étaient adjacentes à des tumeurs gonadotropes, à prolactine, somatotropes et corticotropes. Ces hypophyses normales testées sont nommées I à XI et leurs caractéristiques cliniques, anatomopathologiques ainsi que leur provenance sont détaillées dans les tableaux 2, 3 et 4. Une hypophyse normale a pu subir les conséquences d'un traitement par Dostinex au préalable (hypophyse VIII, tableau 3).

Le tableau 2 décrit les caractéristiques des hypophyses normales sans tumeur adjacente retrouvée (hypophyses I à IV). Le tableau 3 regroupe les hypophyses adjacentes à des adénomes corticotropes (hypophyses V à VIII); tandis que le tableau 4 montre les hypophyses adjacentes à des tumeurs somato-prolactiniques (hypophyses IX à XI).

#### *Expression de MafB dans l'hypophyse normale*

Dans l'hypophyse normale nous observons une expression nucléaire intense de MafB, dans toutes les cellules endocrines. Ceci n'a encore jamais été décrit dans la littérature (exemple de 2 hypophyses normales Figure 8a, b, c et d). Toutefois le marquage est relativement hétérogène, certaines cellules étant fortement positives et d'autres moins (Figure 9, exemple de l'hypophyse VII dans le tableau 3).

Nous prenons ensuite l'exemple de l'hypophyse XI (dans le tableau 4) pour préciser la spécificité de ce marquage. Bien que remaniée et richement vascularisée, cette hypophyse est considérée comme normale. Nous observons les hématies non positives pour l'AC anti hMafB, alors que les cellules endocrines (cellules à noyau bien arrondi) expriment fortement cette protéine (Figure 8c, d et Figure 10). Au total, sur 11 hypophyses normales testées, 9 sont fortement positives pour MafB, mais une hypophyse normale (de femme, non juxtaumorale) n'exprime que faiblement MafB (hypophyse IV , tableau 2) et une autre l'exprime de manière modérée (hypophyse VIII, tableau 3). L'hypophyse exprimant de



manière modérée MafB a été traitée auparavant par Dostinex et a déjà subi une intervention chirurgicale.

Une hypophyse juxtatumorale exprimant intensément MafB est bordée par des cellules tumorales corticotropes que l'on différencie par leur taille plus grande, voire certaines monstruosité cellulaires. Ces cellules tumorales sont plus abondantes, volumineuses et agglomérées, et en outre, elles expriment plus faiblement voire pas MafB (Figure 15).

Le tableau 5 récapitule les résultats retrouvés dans les hypophyses normales : 82% des hypophyses normales expriment fortement MafB (dont la seule hypophyse d'homme III (tableau 2) testée), alors que dans 18% d'entre elles il est retrouvé une expression de MafB faible à modérée.

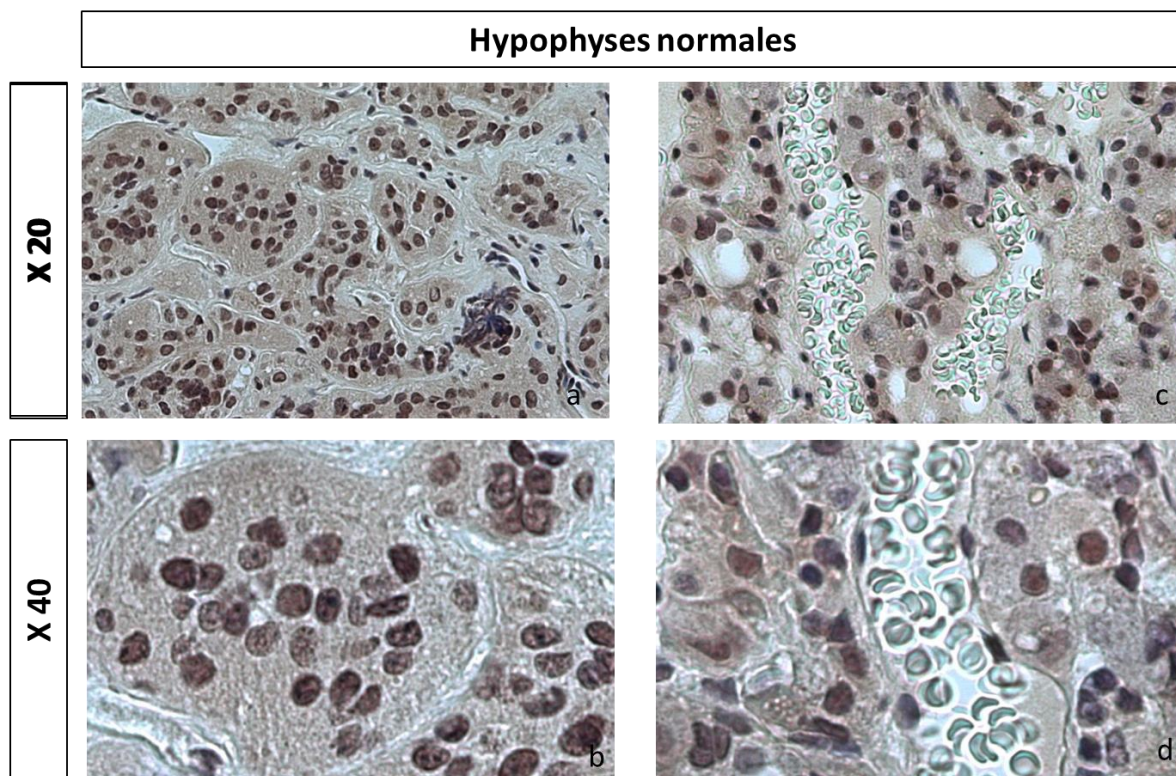
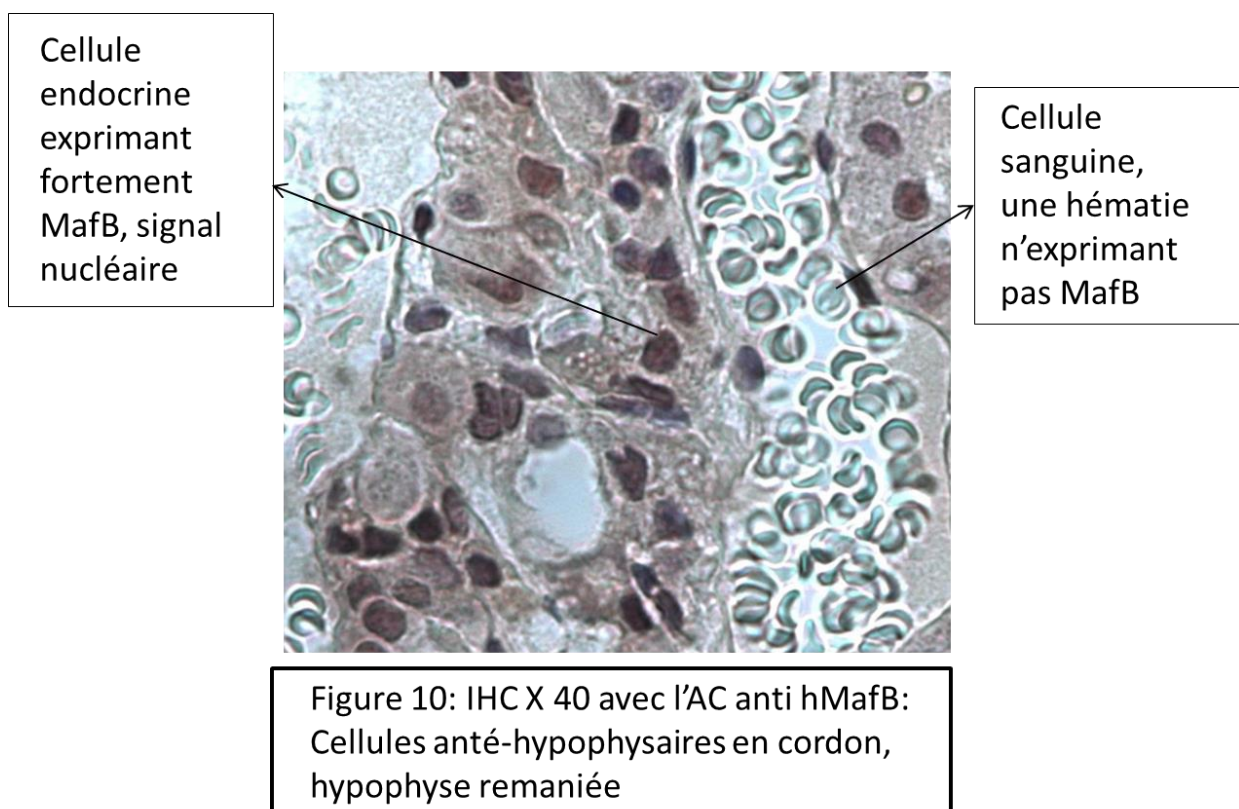
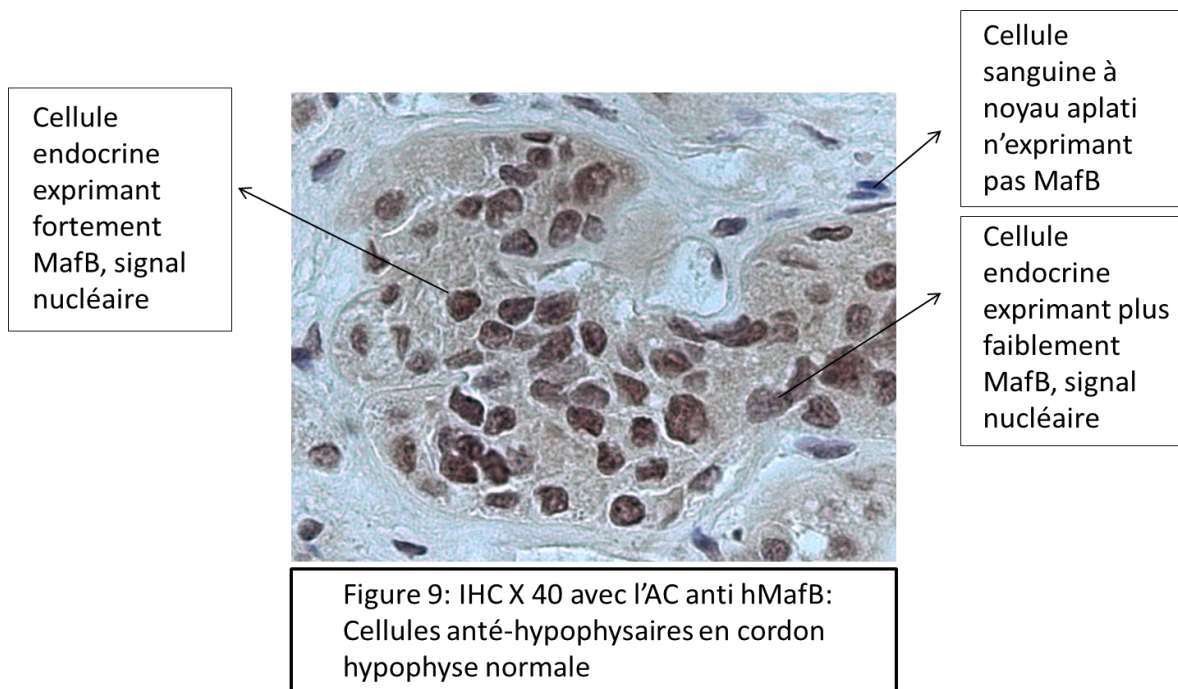
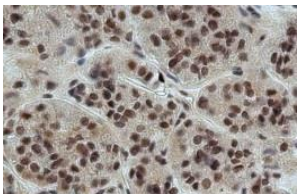
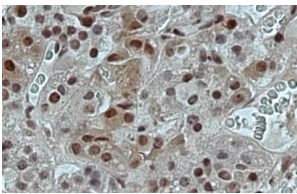
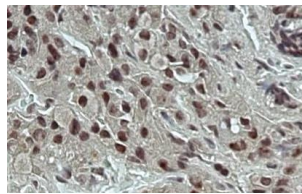
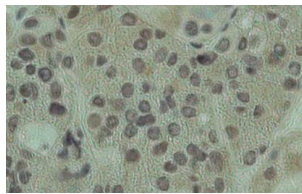
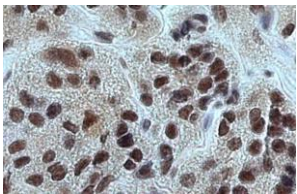
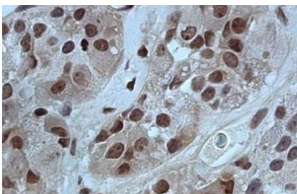
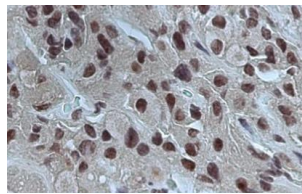
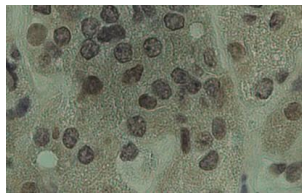


Figure 8 IHC: hypophyses normales humaines avec l'AC anti hMafB: expression nucléaire et intense de MafB dans les cellules endocrines hypophysaires

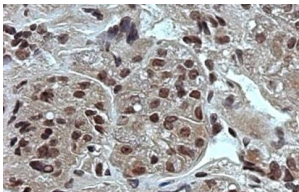
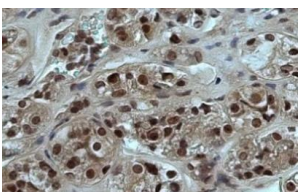
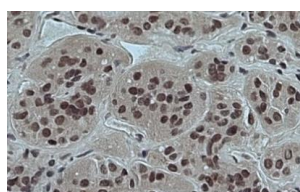
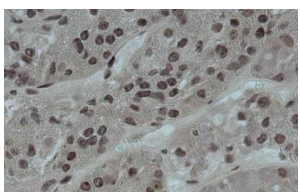
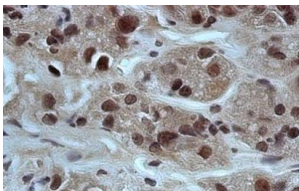
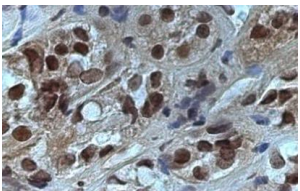
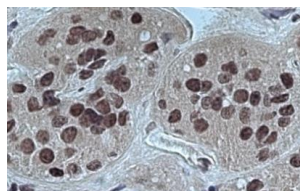
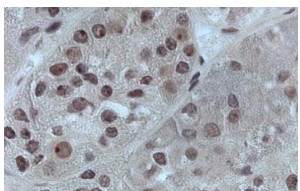


**Tableau 2 : Hypophyses normales humaines non juxta tumorales**

Référence hypophyse normale	I	II	III	IV
<b>Hypophyse normale</b>	Oui	Oui	Oui	Oui
<b>Non juxtatumorale</b>	Doute sur prolactinome 7mm non retrouvé	Suspicion adénome somato-prolactinique non retrouvé	Pas de tumeur retrouvée	Pas de tumeur retrouvée
<b>Sexe</b>	Femme	Femme	<b>Homme</b>	Femme
<b>Age</b>	38 ans	40 ans	56 ans	46 ans
<b>Invasion tumeur adjacente</b>	Non	Non	Inconnu	Inconnu
<b>Sécrétion tumeur adjacente</b>	Inconnue	Oui	doute préopératoire sur adénome corticotrope	Inconnu
<b>Traitement antérieur</b>	Inconnu	Inconnu	Non	Non
<b>Marquage MafB</b>	<b>Marquage intense</b>	<b>Marquage intense</b>	<b>Marquage intense</b>	<b>Faible marquage</b>
<b>Provenance</b>	Hopital Bretonneau	Hôpital Bretonneau	GHE	GHE
<b>IHC x 20</b>				
<b>IHC x 40</b>				



**Tableau 3 : Hypophyses normales humaines juxta-tumorales d'un adénome corticotrope**

Référence hypophyse normale	V	VI	VII	VIII
<b>Hypophyse normale</b>	Oui	Oui, pas de cell de Crooke	Oui	Oui
<b>Juxtatumorale ?</b>	Oui, micro-adénome corticotrope	Oui, adénome corticotrope	Oui, micro-adénome corticotrope	Oui, adénome macro- corticotrope
<b>Sexe</b>	Femme	Femme	Femme	Femme
<b>Age</b>	56 ans	73 ans	44 ans	46 ans
<b>Invasion tumeur adjacente</b>	Non	Non	Dure mère, selle turcique	Non
<b>Sécrétion tumeur adjacente</b>	Oui	Oui	Oui	Oui
<b>Traitement antérieur</b>	Non	Non	Non	Reprise chirurgicale, ttt antérieur Dostinex
<b>Marquage MafB</b>	<b>Marquage intense</b>	<b>Marquage intense</b>	<b>Marquage intense</b>	<b>Marquage modéré</b>
<b>Provenance</b>	GHE	GHE	GHE	GHE
<b>IHC x 20</b>				
<b>IHC x 40</b>				

**Tableau 4 : Hypophyses normales humaines juxta-tumorales d'un adénome somato-prolactinique**

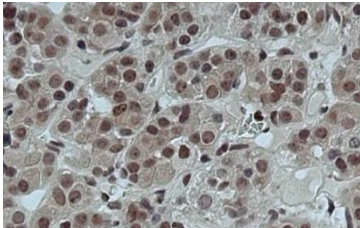
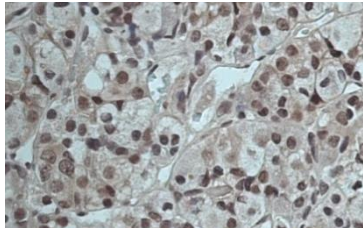
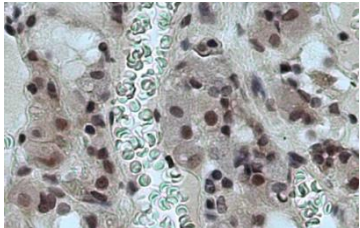
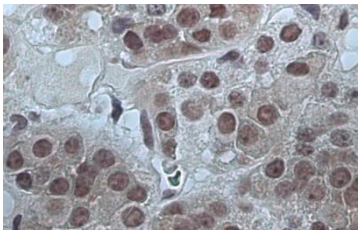
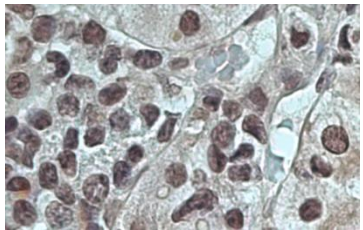
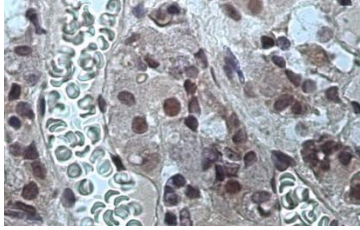

Référence hypophyse normale	IX	X	XI
<b>Hypophyse normale</b>	Oui	Oui	Remaniée, vascularisation
<b>Juxtatumorale</b>	Oui, adénome somatotrope	Oui, micro-adénome somatotrope	Oui, adénome somato-prolactinique
<b>Sexe</b>	Femme	Femme	Femme
<b>Age</b>	38 ans	51 ans	58 ans
<b>Invasion tumeur adjacente</b>	Non	Non	Non
<b>Sécrétion tumeur adjacente</b>	Oui	Oui	Inconnue
<b>Traitement antérieur</b>	Inconnu	Non	Inconnu
<b>Marquage MafB</b>	<b>Marquage intense</b>	<b>Marquage intense</b>	<b>Marquage intense</b>
<b>Provenance</b>	Hôpital Bretonneau	GHE	Hôpital Bretonneau
<b>IHC x 20</b>			
<b>IHC x 40</b>			

TABLEAU 5 de synthèse: Expression de MafB dans l'hypophyse normale

Hypophyses normales humaines	Expression intense de MafB	Expression faible à modérée de MafB
NOMBRE: 11	9	2 
POURCENTAGE	<b>82%</b>	18%

## **b. MafB dans les tumeurs hypophysaires sporadiques**

### *Caractéristiques des adénomes sporadiques*

Quinze adénomes hypophysaires ont été testés, le sexe ratio étant : 8 hommes contre 7 femmes. L'âge moyen des patients était de 54 ans (patients âgés de 27 à 81 ans). La cohorte de tumeurs analysées correspond à des adénomes réséqués successivement. Les adénomes gonadotropes sont plus nombreux dans notre cohorte, car ils représentent le sous-type d'adénome opéré le plus fréquent. Les caractéristiques cliniques, anatomopathologiques ainsi que la provenance de ces tumeurs sont décrites dans les tableaux 6, 7, 8 et 9. Un adénome avait reçu un traitement préalable par Dostinex (tumeur P2, tableau 8). Nous ne connaissons pas toutes les caractéristiques de certains adénomes.

### *Expression de MafB dans l'adénome sporadique*

De manière générale, dans l'adénome hypophysaire l'expression de MafB est plus hétérogène (Figure 11, exemple d'un prolactinome, tumeur P2). Un adénome montre même une perte totale de l'expression de MafB (adénome gonadotrope, tumeur G8, Figure 12 : 1a, 1b), tandis que plusieurs tumeurs ont une expression diminuée et hétérogène (comme l'adénome gonadotrope, tumeur G7, Figure 12 : 2a, 2b). Par ailleurs, différentes tumeurs arborent une expression modifiée de MafB, avec une délocalisation cytoplasmique et une perte d'expression nucléaire (prolactinome, tumeur P4, Figure 13 : 5a et 5b et détails Figure 14). Enfin, certaines d'entre-elles ont une expression conservée intense de MafB (comme l'adénome somatotrope S1 Figure 13 : 6a et 6b).



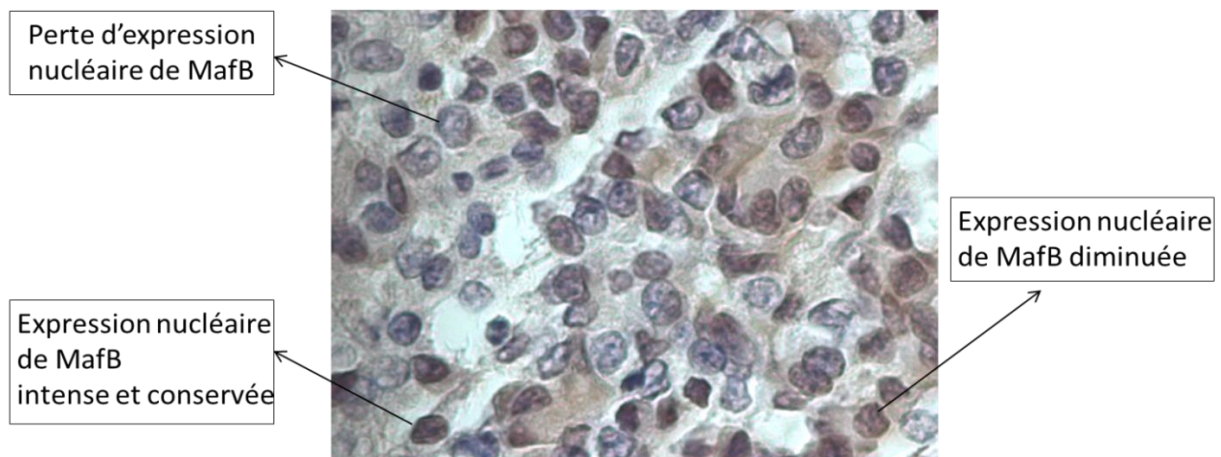


Figure 11 : IHC X 40 avec l'AC anti hMafB : prolactinome (tumeur P2) : expression hétérogène de MafB avec perte de l'expression nucléaire de MafB dans certaines cellules et conservation de son expression dans d'autres.

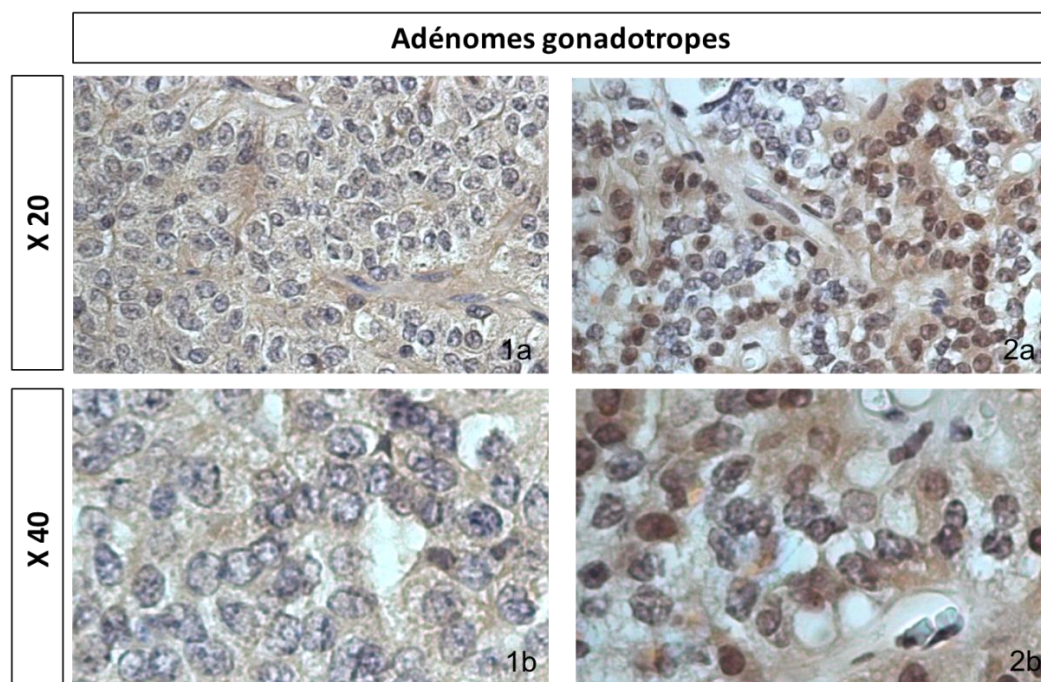


Figure 12: IHC de deux adénomes gonadotropes avec l'AC anti hMafB:  
 1a et 1b: perte de l'expression nucléaire de MafB (tumeur G8)  
 2a et 2b hétérogénéité dans les cellules endocrines (tumeur G7)



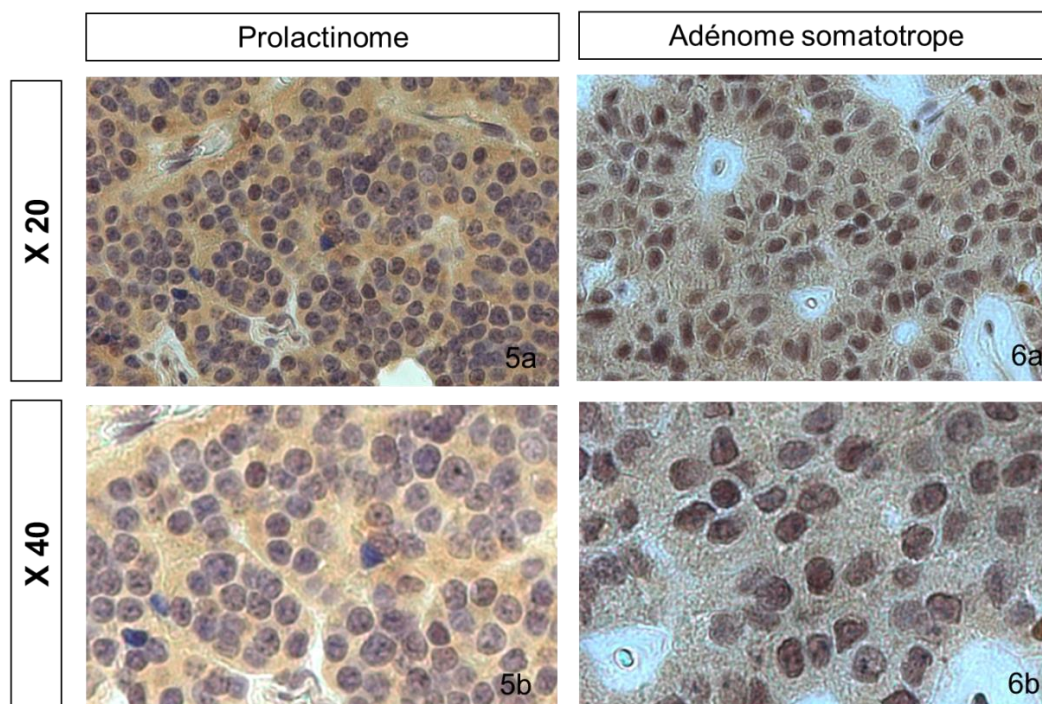


Figure 13: IHC avec l'AC anti hMafB; 5: prolactinome (tumeur P4): perte de l'expression nucléaire de MafB et délocalisation cytoplasmique; 6: adénome somatotrope (tumeur S1): expression intense de MafB

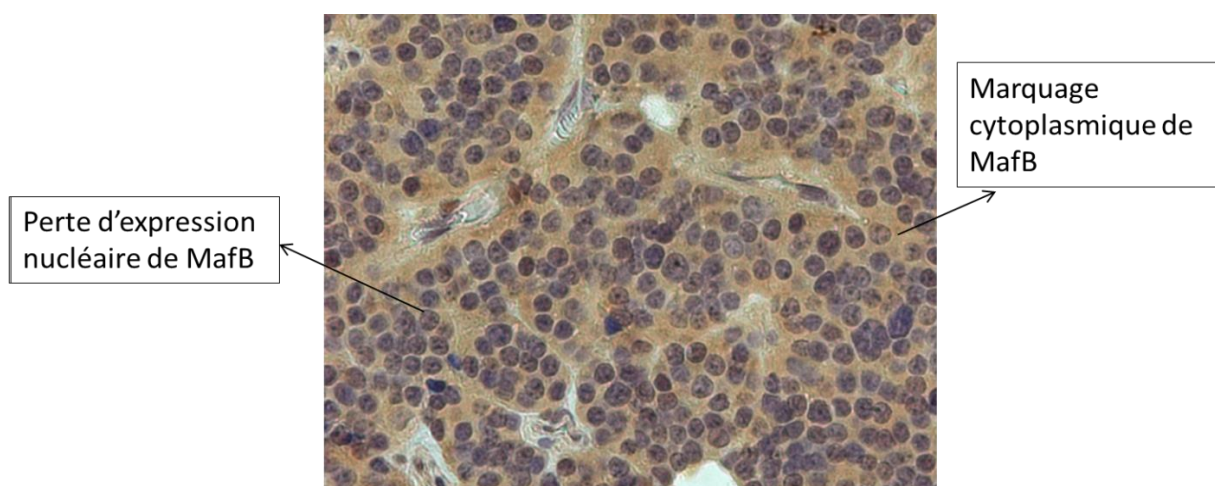


Figure 14 : IHC X 20 avec l'AC anti hMafB : prolactinome (tumeur P4) : perte de l'expression nucléaire de MafB délocalisation cytoplasmique du marquage

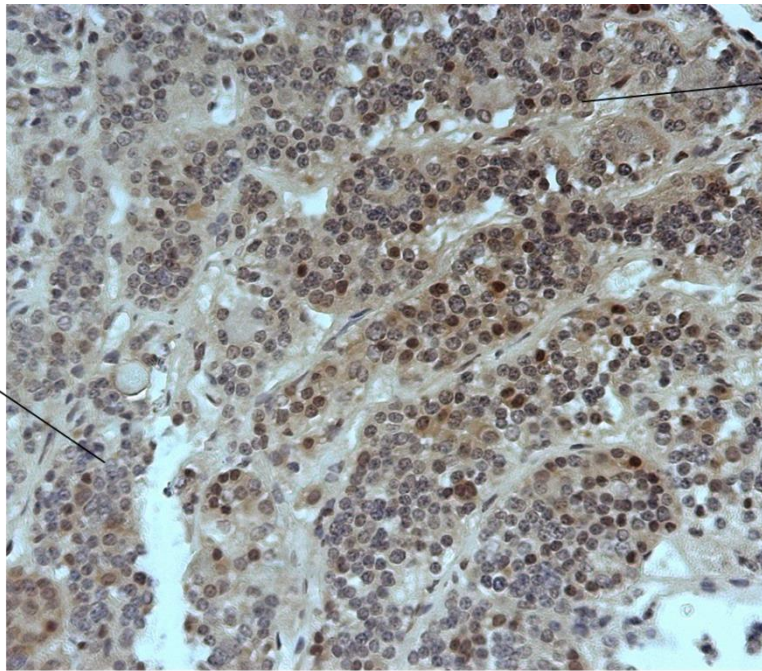
Les 5 prolactinomes (tumeurs P1, P2, P3, P4 et P5 dans les tableaux 8 et 9) ont en moyenne une expression nucléaire moins intense de MafB, négative à faible, et 2 d'entre eux ont une délocalisation cytoplasmique de MafB (tumeurs P3 et P4). Le seul adénome somatotrope testé (tumeur S1, tableau 9) garde une expression assez intense de MafB (mais moindre que dans l'hypophyse normale). Tandis que dans les 8 adénomes gonadotropes (tumeurs G1 à G8 dans les tableaux 6 et 7) les résultats sont plus hétérogènes, avec certaines tumeurs qui arborent un marquage positif de MafB (moindre que dans l'hypophyse normale), et d'autres un marquage très faible, voire négatif (tumeur G8).

Dans l'unique adénome corticotrope testé, le marquage de MafB semble considérablement diminué, alors que de l'hypophyse normale juxta-tumorale a pu être observée. Nous remarquons une perte franche du marquage de MafB dans les cellules tumorales par comparaison aux cellules normales (Figure 15 ; hypophyse normale V et adénome corticotrope C1 respectivement dans les tableaux 3 et 9).

Au total, cinq types de tumeurs semblent se distinguer (que nous récapitulons dans le tableau 10) : celles gardant une expression forte de MafB (tumeur gonadotrope G1 et somatotrope S1), celles arborant une expression hétérogène de MafB entre les différentes cellules tumorales sécrétant à priori la même hormone (tumeurs gonadotropes G2, G3, G5, G6 et G7 et les prolactinomes P1 et P2 et une tumeur corticotrope C1), une tumeur ayant une expression diminuée relativement homogène de MafB dans les différentes cellules tumorales (prolactinome P5), et une perdant totalement l'expression de MafB (adénome gonadotrope G8), et enfin, celles où l'on remarque une délocalisation cytoplasmique de MafB (adénome gonadotrope G4 et prolactinomes P3 et P4).

**En somme, 87% des tumeurs semblent perdre l'expression nucléaire de MafB, au moins en partie.**

Perte  
d'expression  
nucléaire de  
MafB dans  
les cellules  
tumorales



Cellules  
endocrines  
normales avec  
un marquage  
intense de MafB

Figure 15 : IHC X 20 avec l'AC anti hMafB: adénome corticotrope (tumeur C1): perte de l'expression nucléaire dans les cellules tumorales, et cellules normales juxtatumorales ayant un marquage intense de MafB

### *Corrélation expression Maf B et grading pronostic*

Huit adénomes sont classés 1a (non invasifs, sans critères de prolifération). Sept d'entre eux ont un marquage de MafB hétérogène (tumeurs G2, G3, G5, G6 ; G7, P1 et C1) et un seul montre un marquage assez intense de MafB (adénome S1).

Deux adénomes ont une classification 1b (non invasifs mais avec des critères de prolifération positifs) et présentent une délocalisation cytoplasmique de MafB (adénomes P3 et P4).

Trois adénomes sont classés 2a (invasifs sans critères de prolifération) : l'un a un marquage assez intense de MafB (G1), un autre une délocalisation cytoplasmique (G4), et un dernier ne présente aucun marquage de MafB (G8).

Enfin, un adénome est classé 2b (invasif et proliférant) et présente un marquage hétérogène de MafB (P2).

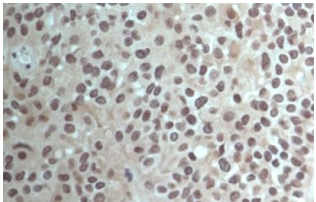
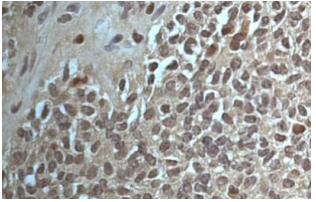
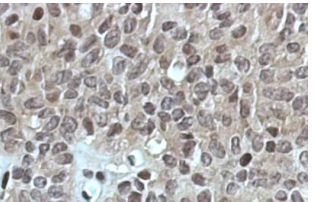
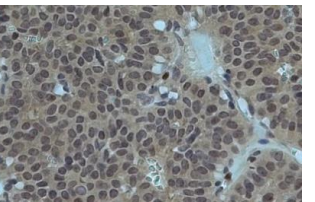
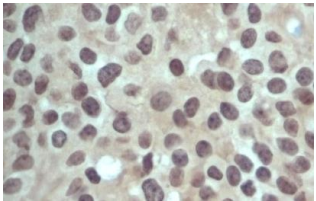
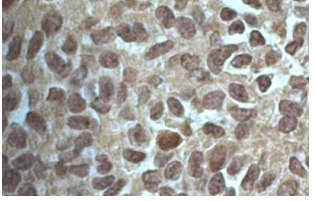
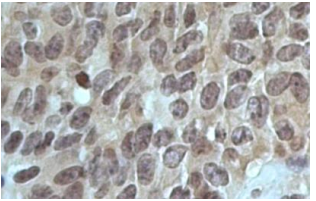
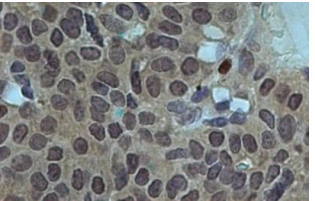
Un adénome n'a pu être classé car nous ne connaissons pas son statut invasif. Il ne présente pas de critère de prolifération et le marquage de MafB est positif mais faible (P5).

Pour le moment, nous ne pouvons pas établir de corrélation entre la perte d'expression nucléaire ou la délocalisation cytoplasmique de MafB avec l'invasivité de la tumeur ni avec les critères de prolifération.

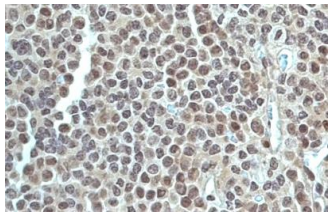
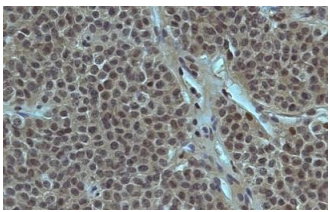
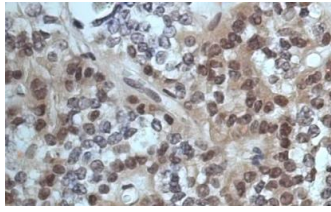
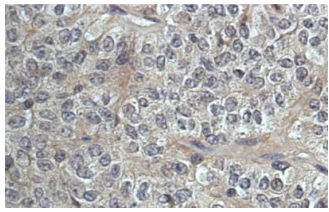
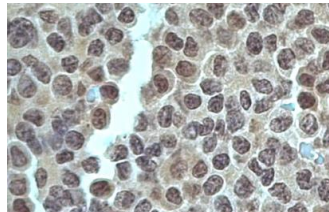
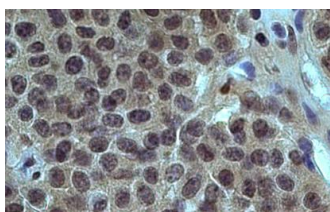
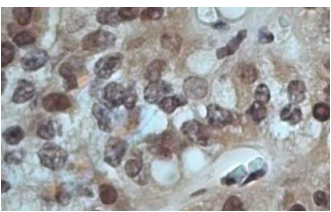
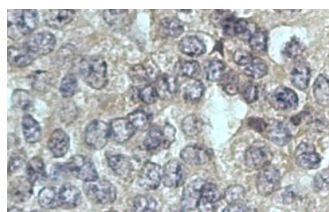
Nous ne retrouvons pas de corrélation non plus entre le sexe, l'âge, la taille de la tumeur, le caractère sécrétant ou non, l'analyse immunohistochimique et l'intensité de MafB. Il n'y a pas de corrélation non plus avec un traitement antérieur de cet adénome (médical ou chirurgical).



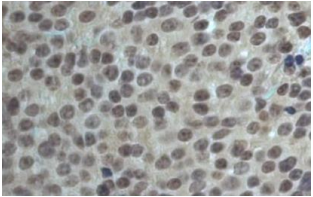
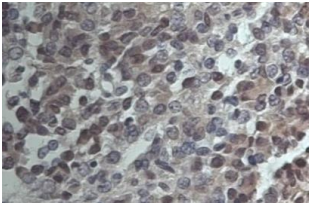
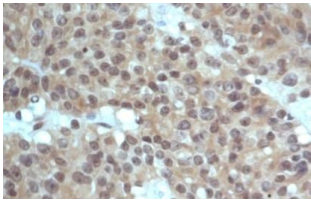
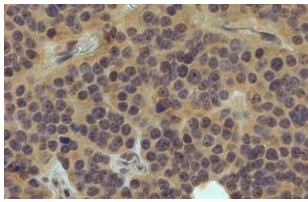
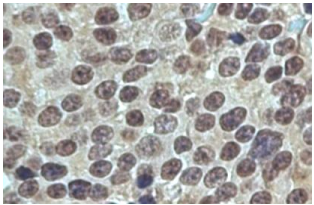
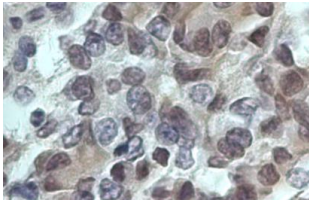
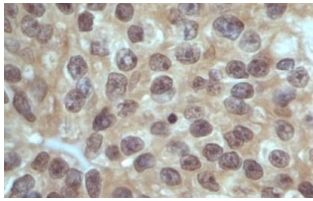
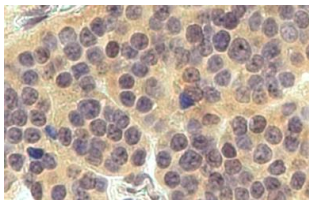
**Tableau 6 : Adénomes gonadotropes**

Référence	G1	G2	G3	G4
Type d'adénome	gonadotrope	gonadotrope	gonadotrope	gonadotrope
Sexe	homme	Femme	homme	homme
Age	72 ans	60 ans	59 ans	68 ans
Taille adénome	macro-adénome	macro-adénome	adénome géant	macro-adénome
Sécrétant	non	non	non	non
Expression AC ChrA	diffuse intense 100%	diffuse, faible	diffuse modérée	100% fortement
Expression AC hormones	65% BFSH	intense 35% BFSH	8% BFSH	35% BLH fortement
Expression AC hormones	50% BLH	faible 15% BLH	14% BLH	18% BFSH, 65% R. E2
p53	positive faible	0	positive faible	0
ki67	2	0	0	0
mitose	1	0	0	1
Invasivité	sinus	non	non	oui à priori
Classification	2a	1a	1a	2a
Traitement médical	Pas de ttt	Pas de ttt	Pas de ttt	Pas de ttt
Provenance	GHE	GHE	GHE	GHE
Marquage MafB	positif assez intense	positif hétérogène	hétérogène	positif cytoplasmique, négatif nucléaire
Image IHC X 20				
Image IHC X 40				

**Tableau 7 : Adénomes gonadotropes**

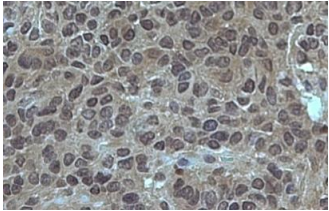
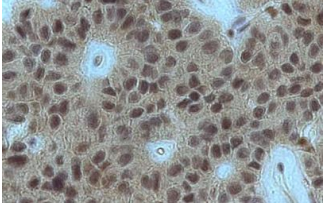
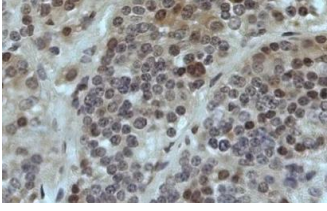
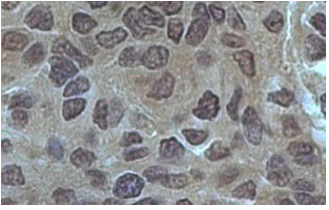
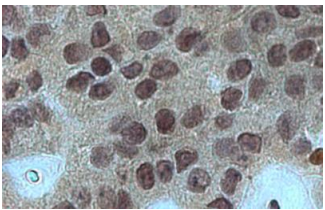
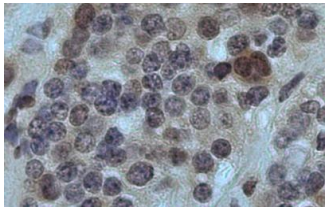
Référence	G5	G6	G7	G8
Type d'adénome	gonadotrope	gonadotrope	gonadotrope	gonadotrope
Sexe	femme	homme	homme	Femme
Age	40 ans	61 ans	73 ans	81 ans
Taille adénome	macro-adénome	macro-adénome	macro-adénome	macro-adénome
Sécrétant	non	non	non	non
Expression AC ChrA	diffuse faible	100%	60% hétérogène	faible 10%
Expression AC hormones	modéré 15% BFSH	25% BFSH faible	85% B FSH intense	intense 65% BFSH
Expression AC hormones	faible 5% BLH	12% BLH	15% BLH faible, 80% R. E2	moyen 15% BLH
p53	0	positif faible	0	0
ki67	0	1,5	0	0
mitose	0	0	0	0
Invasivité	non	non	non	oui
Classification	1a	1a	1a	2a
Traitement médical	Pas de ttt	Pas de ttt	Pas de ttt	Pas de ttt
Provenance	GHE	GHE	GHE	H. Bretonneau
Marquage MafB	hétérogène positif et faible	hétérogène positif et faible	hétérogène positif et négatif	pas de marquage nucléaire
Image IHC X 20				
Image IHC X 40				

**Tableau 8 : Prolactinomes**

Référence	P1	P2	P3	P4
Type d'adénome	prolactinome	prolactinome	prolactinome	prolactinome
Sexe	femme	femme	homme	Femme
Age	27 ans	42 ans	27 ans	33 ans
Taille adénome	micro-adénome	macro-adénome	macro-adénome	micro-adénome
Sécrétant	non	oui	oui fortement	Aucune donnée
Expression AC ChrA	rares		20% faible	rare
Expression AC hormones	95% PRL intense	100% PRL	100% PRL	100% PRL
Expression AC hormones	85% p KL1		95% Rec E2 modéré	intense Rec E2
p53	0	positive faible	positive fort	positive
ki67	2,6	3	6	3,6
mitose	1	0	0	0
Invasivité	non	Oui, sinus caverneux gche	non	non
Classification	1a	2b	1b	1b
Traitement médical	intolérance	Dostinex jusqu'en 2008	Pas de tt	Pas de tt
Provenance	GHE	GHE	GHE	H. Bretonneau
Marquage MafB	hétérogène positif et faible	hétérogène positif et négatif	nucléaire faible et négatif, positif cytoplasmique	négatif nucléaire, positif cytoplasmique
Image IHC X 20				
Image IHC X 40				



**Tableau 9 Prolactinome, adénome somatotrope et corticotrope**

Référence	P5	S1	C1
Type d'adénome	prolactinome	somatotrope	corticotrope
Sexe	homme	homme	femme
Age	49 ans	64 ans	56 ans
Taille adénome	Inconnue	macro-adénome	micro-adénome
Sécrétant	Inconnu	oui	Oui
Expression AC ChrA	5%	100% granulaire	
Expression AC hormones	100% PRL fortement	100% GH fortement	100% ACTH, 100% B endorphine
Expression AC hormones		80% SSTR2 modéré	100% pancytokératine KL1
p53	positif faible	0	0
ki67	2,5	0	0.5
mitose	1	0	0
Invasivité	Inconnue	non	non
Classification	a	1a	1a
Traitement médical	Inconnu	Pas de ttt	Pas de ttt
Provenance	H. Bretonneau	GHE	GHE
Marquage MafB	positif faible	positif assez intense	hétérogène, faible et négatif
Image IHC X 20			
Image IHC X 40			



**Tableau 10 : Marquage de MafB dans les adénomes hypophysaires**

Adénomes hypophysaires	Marquage nucléaire fort de MafB	Marquage hétérogène de MafB, de fort à négatif	Marquage nucléaire faible homogène de MafB	Délocalisation cytoplasmique MafB	Perte de marquage de MafB
NOMBRE 15	2	8	1	3	1
POURCENTAGE	13%	53%	7%	20%	7%

## V) DISCUSSION

Les mécanismes impliqués dans la tumorigénèse hypophysaire restent peu connus. Mon travail a permis de mettre en évidence un sous-type de tumeur hypophysaire surexprimant MafB, dans le cadre d'une NEM1 chez la souris. Ces résultats sont en accord avec la surexpression de MafB dans les insulinomes liés à l'absence de ménine.

### A) Chez la souris, l'hypophyse normale a une expression hétérogène de ménine

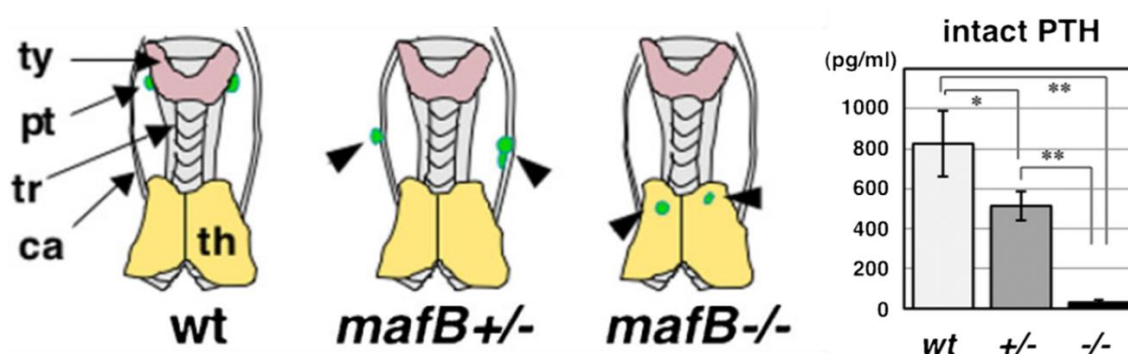
Dans la littérature, il a été décrit dans l'hypophyse normale humaine un marquage nucléaire intense de ménine en immunohistochimie (IHC), de manière homogène dans toutes les cellules endocrines antéhypophysaires {Theodoropoulou, 2004 #8100}. Une double IHC avait été réalisée avec chaque anticorps anti-hormones, affirmant une expression intense de ménine dans chaque lignée cellulaire. En utilisant la triple-IF, nous avons retrouvé une expression hétérogène de ménine entre les différentes cellules, dans l'hypophyse normale de souris. Les cellules à hormone de croissance semblent exprimer plus fortement ménine, par rapport aux autres types cellulaires. Les analyses par IF sont des techniques plus sensibles, qui permettent probablement de mieux discriminer des différences dans l'intensité des marquages nucléaires et de co-localiser ce signal avec celui d'autres hormones. L'analyse de l'expression de ménine dans l'hypophyse normale est donc plus fine grâce à cette méthode. Il sera intéressant de poursuivre la caractérisation de l'expression de la ménine dans l'hypophyse normale humaine.

La signification d'une telle distribution hétérogène de ménine est inconnue. Nous ne pouvons conclure pour le moment, que les cellules exprimant fortement ménine sont plus sensibles à une perte de cette protéine. En revanche, nous pouvons nous interroger sur le rôle de ménine dans chaque lignée cellulaire hypophysaire et sa fonction endocrinienne. Nos données suggèrent aussi qu'une minorité de cellules endocrines n'expriment pas ménine, sachant que le sous-type sécrétoire de ces cellules n'a pas été déterminé. Cependant, l'absence de signal dans certaines cellules peut être liée aux variations expérimentales et des travaux complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

## B) MafA et MafB ne sont pas détectés dans l'hypophyse normale chez la souris

Ni MafA ni MafB ne sont détectés dans les cellules endocrines normales de l'hypophyse chez la souris. L'immunomarquage positif de MafB dans quelques cellules hypophysaires est observé dans des cellules à noyaux aplatis, n'exprimant pas ménine et ne sécrétant pas la prolactine. Ces noyaux appartiennent probablement à des cellules du système immunitaire, comme les macrophages. Dans la littérature, il est décrit que MafB est sélectivement exprimé dans les monocytes et les macrophages (mais pas dans les autres cellules hématopoïétiques) [64]. De plus, dans l'hypophyse normale, richement vascularisée, il est retrouvé la présence de nombreux macrophages [77].

L'absence de protéines Maf dans l'hypophyse normale de souris peut être liée à son origine embryonnaire. Les cellules pancréatiques endocrines dérivent de l'endoderme [78], tandis que l'antéhypophyse se développe à partir de la poche de Rathke, une invagination de l'ectoderme. Élément intéressant, MafB a été récemment décrit comme régulateur de l'expression de la PTH et du développement parathyroïdien, une autre glande endocrine dérivant de l'endoderme. MafB semble exprimé dans les glandes parathyroïdes en développement et matures. Chez les modèles murins déficients pour MafB, la glande parathyroïde ne se sépare pas du thymus et ne migre pas jusqu'à la glande thyroïde, l'expression et la sécrétion de PTH étant altérées (Figure 16) [79].



### Role de MafB décrit dans la glande parathyroïde

ty: thyroïde, pt: parathyroïdes, tr: trachée, th: thymus, ca: artères carotides

wt: souris normales "wild type", *MafB*<sup>+/-</sup>: souris hétérozygotes pour MafB, *MafB*<sup>-/-</sup>: souris homozygotes pour MafB  
\*p<0,05, \*\* p<0,01

Figure 16 [79]

### **C) Une expression ectopique de MafB a été détectée dans une proportion importante de prolactinomes murins dus à la NEM1**

Nous avons observé une expression ectopique de MafB dans 25% des prolactinomes testés, recueillis auprès des deux modèles murins transgéniques à notre disposition. Des analyses par triple IF nous ont permis de déterminer que la majorité des cellules positives pour MafB, correspondaient à des cellules tumorales sécrétant la prolactine. La proportion de cellules positives pour MafB variait de 2 à 20%, ce qui est inférieur mais proche de ce qui avait été observé dans les insulinomes dans la NEM1. De plus, il a été démontré qu'en dépit d'une expression relativement faible de MafB dans certains tissus tumoraux, cette oncoprotéine induit efficacement une croissance cellulaire [63].

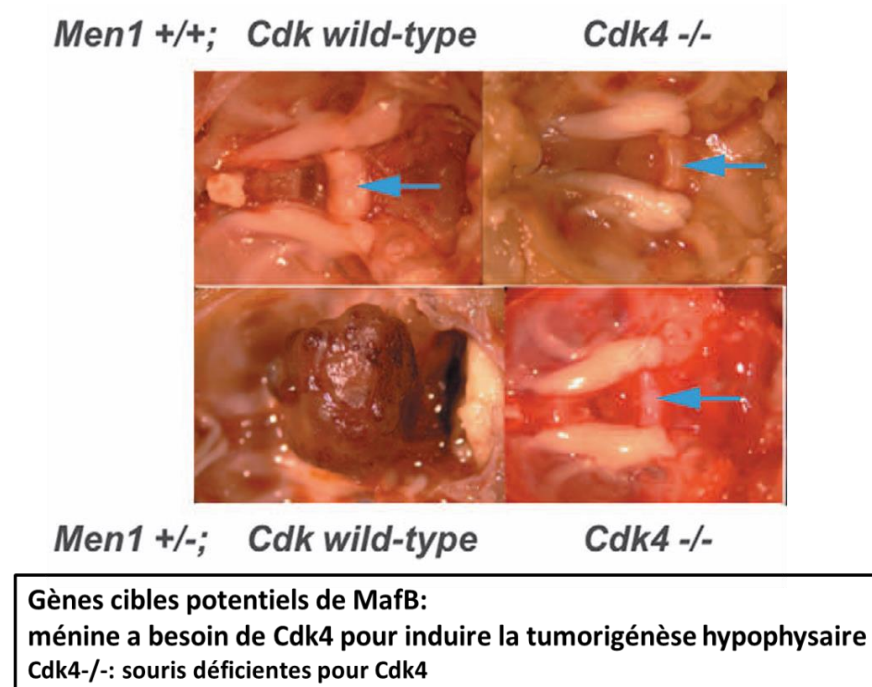
Néanmoins, il est important de préciser que ces données sont préliminaires. Un plus grand nombre d'échantillons de tumeurs doit être analysé et d'autres expériences effectuées, afin de confirmer ces données; quantification par qRT-PCR, étude de la cinétique d'expression de MafB au cours du développement tumoral. Pour confirmer l'expression ectopique de MafB dans les cellules tumorales, des analyses par triple ou quadruple IF avec des facteurs de transcription spécifiques des cellules hypophysaires (comme Pitx1 et pit1) seront nécessaires. Si ces données se confirment dans le futur, ce groupe de prolactinomes surexprimant MafB pourrait être le reflet d'un sous type moléculaire de tumeurs chez la souris, dues à l'inactivation de MEN1.

### **D) Les effets possibles d'une expression ectopique de MafB dans le prolactinome en l'absence de MEN1**

D'importants gènes cibles de MafB décrits dans la littérature, sont appelés les « régulateurs du cycle cellulaire », comme les cyclines D2 (CCND2) et B1 [58]. Les gènes des cyclines D (D1, D2 et D3) sont exprimés à faible niveau dans les cellules latentes, mais en réponse à divers stimuli, leur transcription et leur expression sont augmentées dans les cellules en prolifération [80]. Par exemple dans le myélome multiple, les cyclines D sont souvent dérégulées, et les facteurs de transcription Maf ou MafB ciblant CCND2 sont surexprimés dans 7% des tumeurs [81]. Dans les modèles cellulaires de tumeurs hypophysaires du rat (GH3 et ATT20), la cycline D3 est la plupart du temps surexprimée [82]. De plus, la surexpression de cycline B1, régulant la division cellulaire de la phase G2 à la

phase M, a été décrite dans de multiples types de cancers, comme le cancer du sein, et est corrélée à un pronostic péjoratif [83]. Il est important de préciser que la surexpression de cycline D2 a été rapportée dans les insulinomes de NEM1 [50]. La régulation des cyclines D2 et B par ménine a également été documentée [84].

Ces cyclines interagissent positivement avec les CDK4 ou les CDK6 pour augmenter la phosphorylation dans les rétinoblastomes (RBI), et de cette manière, améliorent la transition du cycle cellulaire de la phase G1 à S. De plus, la CDK4 semble avoir un rôle essentiel dans la prolifération des cellules endocrines, comme cela a été démontré dans cette étude, où les souris « *CDK4* knock-out » présentent une hypoplasie antéhypophysaire et pancréatique, dès la naissance. En outre, la suppression des CDK4 chez les souris « *MEN1* knock-out », inhibe complètement la tumorigénèse hypophysaire et des îlots pancréatiques (Figure 17) [85]. Cela implique que la tumorigénèse hypophysaire due à l'absence de ménine dépend de la CDK4. Nous pouvons ainsi suspecter que la diminution d'inhibiteurs de CDK peut contribuer à l'activation ectopique de CDK4 dans les cellules hypophysaires précancéreuses déficientes en ménine.



**Figure 17 :** [85]

**E) Pourquoi MafB n'est pas surexprimé dans la majorité des tumeurs hypophysaires en lien avec la MEN1 ?**

Nous avons remarqué que 75% des prolactinomes déficients pour *MEN1* testés ne présentent pas d'expression ectopique de MafB, tandis que tous les insulinomes « *MEN1* knock-out » testés sur-expriment MafB. Bien que l'antéhypophyse et les îlots pancréatiques soient tous deux des tissus endocrines, ils ont des origines embryonnaires et des fonctions endocrines distinctes, régulées par différents gènes et voies de signalisation. Il est admis que l'inactivation du gène *MEN1* n'est pas impliquée dans les tumeurs hypophysaires sporadiques [86] [87], alors qu'une mutation de ce gène est retrouvée dans plus de 30% des tumeurs pancréatiques sporadiques et parathyroïdiennes. Ainsi, ces résultats peuvent refléter des mécanismes différents impliqués dans la tumorigénèse des cellules pancréatiques et hypophysaires. Si cela est effectivement le cas, il sera intéressant dans le futur d'élucider les conséquences moléculaires spécifiques de l'inactivation de *MEN1* dans les cellules hypophysaires.

**F) L'hypophyse normale humaine exprime fortement MafB : Résultats différents entre l'homme et la souris**

Nous retrouvons une expression différente de MafB entre la souris et l'humain dans l'hypophyse normale. MafB est exprimé fortement dans les cellules endocrines de 9 hypophyses normales humaines, sur 11 testées ; alors que chez la souris, nous n'avons pas retrouvé d'immunomarquage de MafB. Il semble donc exister une régulation différente de l'expression du gène codant pour MafB dans l'hypophyse entre les deux espèces. Il est ainsi difficile d'imaginer que MafB ait une action pro-oncogène dans l'hypophyse humaine.

Nous pouvons mettre en parallèle ces résultats divergents avec ce qui a été décrit au sujet des protéines Maf dans le pancréas. Dans le modèle animal de la souris, MafB est exprimé dans les cellules alfa et beta pendant l'embryogénèse [88] [89], mais à l'âge adulte, MafB devient spécifique des cellules alfa et activateur du gène du glucagon [72]. Concernant MafA chez la souris, il est exprimé seulement dans les cellules B durant l'embryogénèse et à l'âge adulte [90]. Inversement, il a été mis en évidence chez l'humain adulte une expression de MafB dans environ 67% des cellules à glucagon mais aussi 53% des cellules à insuline [76]

[91] [92]. Chez l'humain adulte, MafA est exprimé dans plus de la moitié des cellules alpha [76].

Nous pouvons comparer ces résultats avec ce qui a été décrit dans la littérature concernant l'hypophyse : dans une étude analysant les différences d'expression des gènes entre l'hypophyse normale et pathologique, les comparaisons entre l'humain et le rat retrouvaient d'importantes divergences. En effet, les différences d'expression de gènes entre les hypophyses normales et les prolactinomes chez les rats et les humains concernaient respectivement 2339 gènes et 427 gènes. Seulement 54 d'entre eux ayant une expression différentielle entre l'état normal et le pathologique se chevauchaient entre les deux espèces [93].

Nous utilisons le modèle de la souris afin de mieux comprendre les mécanismes pathologiques chez l'homme. Cependant, chaque espèce possède des caractéristiques physiologiques propres et les tumeurs ne se développent pas toutes de la même manière entre l'homme et l'animal. Les projets de recherche « Mouse ENCODE Project » et le « National Human Genome Research Institute » permettent de mieux comprendre les différences d'expression des gènes entre ces deux espèces, sachant que 75 millions d'années se sont écoulées depuis que l'origine de l'espèce humaine s'est individualisée de celle de la souris. Environ la moitié des sites de liaison des facteurs de transcription (activateurs et promoteurs de gènes) décrits chez la souris, ne sont pas retrouvés chez l'homme et le quart d'entre eux a migré vers une position différente [94]. Finalement, même si l'homme et la souris partagent de nombreux gènes, ils ne sont pas exprimés ni régulés de manière identique : **le degré d'expression de nombreux gènes semble plus spécifique d'espèce que spécifique d'organe** [95]. Par conséquent, à chaque nouvelle hypothèse, la représentativité des résultats chez l'animal en termes de modèle tumoral reste à démontrer chez l'homme.

**G) MafB, facteur de différenciation des cellules endocrines antéhypophysaires humaines ?**

MafB est fortement exprimé dans les cellules hypophysaires normales. Les protéines Maf dans l'hypophyse, doivent-elles être considérées comme des oncoprotéines, ou des protéines structurales, indispensables à la différenciation des tissus et au fonctionnement de cette glande endocrine ?

**a. MafB connu comme facteur de différenciation dans la littérature**

Dans la littérature, il a été décrit le rôle des protéines Maf dans la différenciation cellulaire d'autres glandes endocrines. Au cours de l'embryogénèse du pancréas chez la souris, MafA et MafB ne sont synthétisées que dans les cellules endocrines. MafB semble être un facteur de transcription crucial qui régule l'expression hormonale, la formation de vésicules et l'insulino-sécrétion et permet donc la maturation de la cellule beta [89]. Pendant l'embryogénèse, MafB se lie au promoteur des gènes codant pour le glucagon ou l'insuline chez la souris [88]. D'un autre côté, Maf A est un activateur spécifique du gène de l'insuline. Chez la souris, MafB et MafA sont des facteurs de transcription qui apparaissent relativement tardivement dans le développement des cellules pancréatiques. Nous pouvons donc supposer que MafB a un tel rôle dans l'hypophyse normale humaine, notamment sur la sécrétion et l'excrétion d'autres hormones et nous interroger sur les gènes cibles de MafB dans l'hypophyse. Cependant, un tel rôle n'a pour le moment pas été décrit.

De plus, MafB a été dépeint comme un facteur de transcription essentiel dans la masculinisation des organes génitaux externes, notamment pour la formation de l'urètre de type masculin, sachant qu'il est exprimé dans le tubercule génital masculin. MafB agirait comme un gène effecteur régulé par les androgènes, connus comme essentiels à la masculinisation des organes génitaux externes, mais dont le mécanisme d'action est peu compris.

Les organes génitaux de souris « MafB knock out » ont des anomalies urétrales, ce qui pourrait expliquer la physiopathologie de l'hypospade. De plus, une exposition aux androgènes en l'absence de MafB ne permet pas une masculinisation de l'urètre (en revanche, la taille des organes génitaux reste normale). MafB, sous l'exposition des



androgènes, semble donc être un élément clé dans cette étape, et permet ainsi d'expliquer certaines anomalies durant l'embryogénèse [96].

Durant les stades embryonnaires de différenciation sexuelle et de la formation des gonades chez la souris, l'expression des facteurs de transcription Maf a été étudiée (entre E11.5 et E13.5) [97]. Dans les testicules de souris, il a été démontré que MafB est exprimé dans l'épithélium coelomique pendant les premiers stades du développement (E11.5), puis son expression est réduite aux cellules de Leydig, lors de la différenciation. Tandis que c-Maf suit la tendance inverse et n'est exprimé ensuite que par les cellules interstitielles qui ne sont pas des cellules de Leydig. Ainsi, de E12.5 à E13.0, toutes les cellules interstitielles expriment de manière transitoire, à la fois MafB et c-Maf. Puis deux types cellulaires se différencient : les cellules de Leydig exprimant MafB et les cellules non Leydigienne qui expriment c-Maf [97].

Nous pouvons mettre ces résultats en parallèle avec ce qui est retrouvé dans le pancréas murin : les précurseurs neuroendocrines expriment MafA et MafB, puis plus tardivement, MafA est exprimé sélectivement dans les cellules  $\beta$  et MafB dans les cellules  $\alpha$  [98]. Nous nous interrogeons sur la régulation des grandes protéines Maf (MafA, MafB et c-Maf) durant l'embryogénèse hypophysaire humaine, qui serait à comparer avec leur expression à l'âge adulte.

Chez la drosophile, il est décrit un rôle de MafA, MafB et c-Maf dans le développement des gonades, par la modulation des interactions et de l'adhésion entre les cellules [99].

Dans la lignée myéloïde, une surexpression de MafB dans les myéloblastes entraîne une différenciation macrophagique [65].

En dépit de leurs actions oncogéniques, les protéines Maf peuvent ainsi avoir une activité de suppresseur de tumeur, spécifique selon le contexte cellulaire, expliquant leur rôle physiologique dans la différenciation terminale [60]. C'est pourquoi, dans les tissus où MafB a un rôle dans la différenciation terminale, cette protéine permet de garder les cellules latentes, tandis que dans les autres tissus où MafB n'est habituellement pas exprimé, il gagnerait un pouvoir oncogénique, comme dans certains lymphomes à cellules T par exemple [63].

## **b. MafB pourrait être un facteur de différenciation hypophysaire**

Bien que la taille de l'échantillon d'hypophyses normales testées dans notre travail soit petite, **82% d'entre elles expriment fortement MafB**. Le traitement par Dostinex et une première prise en charge chirurgicale, dans le cas de l'expression modérée de MafB (hypophyse VIII), peuvent être à l'origine de cette baisse d'expression. Le fait qu'une seule hypophyse normale (IV) n'exprime que faiblement MafB peut être dû à un artefact de l'expérience. Il sera nécessaire de tester plus d'hypophyses normales pour tirer des conclusions définitives.

Nous avons eu à notre disposition principalement des hypophyses normales de femmes ménopausées. Il n'y aurait donc pas d'imprégnation hormonale particulière pouvant influencer cette forte expression de MafB, pour ces hypophyses de femmes. De plus, une expression intense de MafB a également été mise en évidence dans l'hypophyse masculine (III).

MafB peut-il être considéré comme un facteur de transcription clé des cellules hypophysaires, tels que ceux décrits dans la littérature ; ceci reste une question soulevée. Est-ce que MafB s'apparente à un facteur de transcription terminal comme Prop1 [100], présent dans tous les types cellulaires ? A l'inverse peut-il être comparé à un facteur de transcription plus spécifique d'une lignée tel que Tpit (spécifique de la lignée cellulaire de la POMC) [101] ? Contrairement à Tpit, MafB n'est pas un facteur de transcription spécifique de l'hypophyse, car comme nous l'avons précisé précédemment, il est présent dans d'autres organes.

Il est vrai que si MafB s'avère être un facteur de différenciation terminale des cellules endocrines, il n'est probablement pas exprimé dans tous les sous-types cellulaires de manière identique. Une analyse par triple immunofluorescence permettrait une description plus fine des différences d'expression entre les cellules et une co-localisation avec les sécrétions hormonales, pour mettre en évidence un sous-type cellulaire exprimant MafB.

**H) Hétérogénéité d'expression de MafB dans l'adénome hypophysaire sporadique humain : différents sous type de tumeurs semblent perdre l'expression de MafB**

**a. Quelques tumeurs gardent un marquage intense de MafB tandis que d'autres perdent son expression nucléaire**

Les tumeurs hypophysaires sont des tumeurs bénignes qui gardent un degré de différenciation assez élevé, avec un faible index de prolifération [102]. En parallèle, nous observons que certaines tumeurs gardent une expression nucléaire intense de MafB.

Il nous semble que MafB est exprimé plus faiblement dans les cellules tumorales hypophysaires, par rapport aux cellules normales où l'expression est très intense. Existe-t-il une perte d'expression d'un gène clef de la différenciation cellulaire lors du processus tumoral ? La diminution de MafB est-elle responsable d'une augmentation de la prolifération ; comme la diminution de MafA est associée à une augmentation du taux de prolifération des cellules d'insulinome chez le rat [74] ?

La perte d'expression de MafB semble différente d'une tumeur à une autre. Les autres facteurs de transcription hypophysaires ont également une expression variable selon le type hormonal de tumeur. Les mécanismes reliant les facteurs de différenciation hypophysaires et la prolifération cellulaire dans un adénome ne sont pas clairement compris dans la littérature [93]. Il a cependant été démontré une diminution du facteur de transcription hypophysaire CEBPD dans les prolactinomes de rats et d'humains, en parallèle d'une augmentation de la prolifération et de la sécrétion de prolactine. Une réexpression de CEBP dans des cellules tumorales GH3 de rat diminue la prolifération cellulaire de presque 50%, ainsi que l'hyperprolactinémie [93]. En temps normal, le facteur de transcription CEBP aurait tendance à réprimer la sécrétion de prolactine, en interagissant avec Pit1. Le CEBP a une action antiproliférative spécifique dans les cellules à prolactine, mais pas dans d'autres organes. Sa spécificité d'action dans ce tissu peut être liée à la présence de Pit1.

Si MafB a effectivement un rôle dans la différenciation terminale hypophysaire et une activité anti-oncogénique, il semble logique d'observer une diminution de son expression dans l'hypophyse tumorale. Ceci entraînerait potentiellement une perte de l'activation de protéines pro-apoptotiques comme décrit dans la littérature [103].

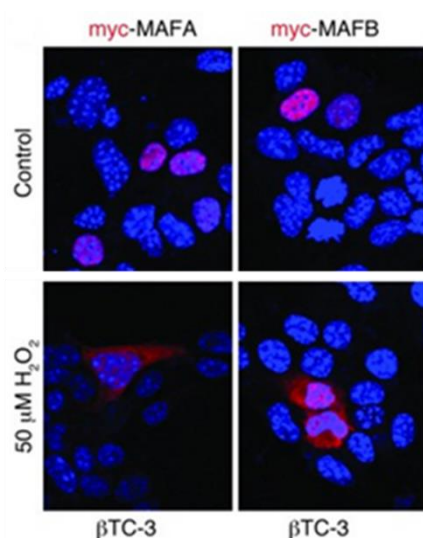
Il serait intéressant d'évaluer l'expression de ce facteur dans les carcinomes hypophysaires, tumeurs métastatiques bien moins différenciées. Similairement, l'expression de cMaf est retrouvée diminuée dans les cancers de la prostate chez l'homme, lorsque l'on compare au tissu normal, suggérant que c-Maf agirait dans ce tissu comme un suppresseur de tumeur [104].

De plus, nous avons à notre disposition un transcriptome de 90 tumeurs hypophysaires sporadiques (*Raverot et al*, unpublished data, HYPOPRONOS) (Figure 18), qui mettait en évidence un sous-groupe de prolactinomes et d'adénomes gonadotropes sur-exprimant MafB ; ceci évoquant initialement que le mécanisme de tumorigénèse identifié dans l'insulinome pouvait être extrapolé à certaines tumeurs pituitaires sporadiques. Certes, les premières observations chez la souris, indiquent une action pro-oncogène de MafB dans l'hypophyse, mais les résultats que nous avons ensuite obtenus chez l'homme semblent contradictoires et nous ont poussés à élaborer une autre hypothèse. Cette expression de MafB limitée à un faible nombre d'adénomes hypophysaires du transcriptome humain, peut être interprétée comme une synthèse persistante d'un facteur clef de différenciation endocrine. L'expression de ce facteur serait plutôt diminuée lors de la tumorigénèse, signant une dédifférenciation cellulaire chez l'homme.



## b. Délocalisation cytoplasmique de MafB dans certaines tumeurs

Lors d'un stress, l'hypothèse d'une délocalisation cytoplasmique de certaines protéines nucléaires indispensables au bon fonctionnement de cellules endocrines, a déjà été décrite dans la littérature. Nous avons l'exemple de MafA, facteur de transcription nucléaire exprimé dans les cellules B pancréatiques adultes chez l'homme. Lors d'une mise en culture de cellules B tumorales soumises à un stress oxydatif (par eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), il est observé une délocalisation cytoplasmique de cette protéine, ainsi qu'une déphosphorylation [105]. Les observations sont identiques concernant MafB dans ce type cellulaire (Figure 19). Le lien entre le stress oxydatif et la tumorigénèse est connu [106] [107]. Nous pouvons donc imaginer, dans le cadre de certains sous type de tumeurs hypophysaires, qu'un stress cellulaire entraîne une inactivation et une délocalisation cytoplasmique de MafB. L'inactivation de facteurs de transcription lors de la tumorigénèse peut être causée par des facteurs environnementaux.



**Figure 19:**  
Délocalisation cytoplasmique de facteurs de transcription  
en réponse à un stress cellulaire  
cellules BTC-3: cellules tumorales pancréatiques

[105]

Dans les cellules, un état de stress peut impacter l'activité, la stabilité et la distribution cellulaire de certains facteurs de transcription clefs. Nous pouvons imaginer que MafB joue un rôle dans l'ontogénèse de l'hypophyse normale, mais aussi dans les mécanismes de tumorigénèse, lors d'une dérégulation, voire une mutation de celui-ci.

Selon les tissus, MafB agirait donc comme une oncoprotéine ou une protéine suppresseur de tumeur ; comme d'autres protéines décrites dans la littérature telles que ménine [57].

### **c. Corrélation à envisager entre la perte de MafB et l'agressivité de la tumeur ?**

MafB étant présent dans l'hypophyse normale adulte, il est probablement un facteur de transcription clef de la différenciation cellulaire hypophysaire chez l'homme. La dérégulation de cette protéine pourrait être à l'origine d'un mécanisme de tumorigénèse. Est-ce que ménine régule MafB dans l'hypophyse humaine, et si oui de quelle manière, reste une énigme non résolue.

Nous n'avons pas mis en évidence dans ce travail une augmentation des critères d'agressivité de ces tumeurs (taille, grade clinico-anatomopathologique) en parallèle d'une perte d'expression de MafB. Ceci est probablement dû à la petite taille de notre cohorte de tumeurs. En revanche, nous remarquons une tendance, 6 sur les 7 adénomes ayant une expression hétérogène de MafB, présentent un grade clinico-anatomopathologique plutôt de bon pronostic, nommé 1a. A l'inverse, 2 des 3 adénomes montrant une délocalisation cytoplasmique arborent des critères de prolifération positifs (classés b).

Des marqueurs anatomopathologiques d'agressivité des tumeurs hypophysaires ont été décrits dans la littérature, comme l'expression de PSA-NCAM [108], endocan [109], PTTG [110], FGFR4 (un facteur de croissance), VEGF et d'autres marqueurs moléculaires [111] ou altérations génétiques [112], probablement associés à l'invasivité ou l'agressivité de ces tumeurs. Des marqueurs pronostics de prolifération, régulant le cycle cellulaire, sont aussi décrits, tels que la mutation de la p53 (protéine apoptotique), une augmentation du ki67 et du nombre de mitoses [75], ou la présence de cyclines, en particulier la cycline D1. Des atypies cellulaires, des mitoses anormales, une néoangiogenèse et des embolies vasculaires peuvent être observés dans les carcinomes hypophysaires [6].

I) Quels sont les partenaires moléculaires de MafB potentiels dans l'hypophyse humaine ?

MafB a été récemment décrit comme régulateur de l'expression de la parathormone (PTH) et du développement des parathyroïdes chez la souris et semble exprimé dans la parathyroïde mature [79]. MafB régule l'expression de la PTH en entrant en interaction avec un autre facteur de transcription lors de sa liaison au promoteur du gène de la PTH : le « Lial cell missing 2 » (Gcm2) [79], facteur spécifique du tissu parathyroïdien contrôlant son organogénèse. Gcm2 est également indispensable lors des étapes plus tardives du développement parathyroïdien, comme pour l'expression du gène de la PTH. Leur action synergique avec MafB permet l'activation de la transcription du gène de la PTH. MafB est donc en interaction, dans les glandes parathyroïdes chez la souris, avec des gènes clefs du développement de cet organe endocrine et l'on peut imaginer un parallélisme dans l'hypophyse.

De plus, nous avons pu mettre en évidence une expression de MafB dans l'adénome parathyroïdien que nous avons obtenu au centre d'anatomopathologie de Lyon Sud (Figure 20). De même, l'expression de MafB semble hétérogène d'une cellule tumorale à l'autre. Son rôle reste à définir, ainsi que sa présence ou non dans la glande parathyroïde normale humaine. La présence de MafB dans plusieurs glandes endocrines laisse présager un rôle essentiel de cette protéine dans les tissus endocrines.

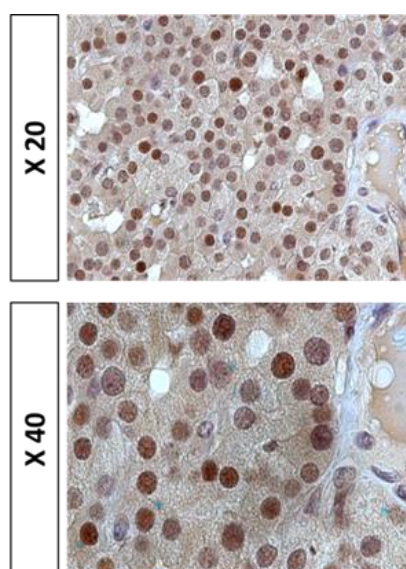


Figure 20: IHC avec l'AC anti hMafB:  
adénome parathyroïdien:  
expression hétérogène de MafB



Comme nous l'avons décrit ci-dessus, MafB permet d'activer la transcription du gène du glucagon chez la souris. Pax-6 (la protéine paired box 6) est aussi un facteur de transcription pour le gène du glucagon. Ces deux facteurs de transcription se lient au promoteur G1 du gène du glucagon. Il a été démontré que l'interaction de MafB avec Pax-6, permet une activation bien améliorée de la transcription du glucagon, par action synergique [113].

De même, dans l'hypophyse, la régulation des hormones nécessite l'action de multiples facteurs de transcription, agissant sur les promoteurs ou activateurs des gènes codant pour les hormones. Ainsi, une combinaison de tels facteurs coopère pour intégrer les signaux nécessaires au développement et à la fonction endocrine de l'hypophyse, pour la production homéostatique des hormones [114]. Par exemple, dans la cellule corticotrope, une interaction est nécessaire entre les facteurs Tpit, bHLH (dont NeuroD) et Pitx1 pour la transcription de la POMC. De plus, le recrutement de coactivateur (tels Nur77) [115] ou de corépresseur (comme le récepteur aux glucocorticoïdes) [116]) interagissent avec les facteurs de transcription hypophysaires pour réguler la synthèse de la POMC.

MafB joue-t-il un rôle dans le contrôle de la morphogénèse, la différenciation des lignées cellulaires ou la prolifération, et quel gène régule-t-il ? MafB interagit-il avec d'autres facteurs de transcription hypophysaires, des coactivateurs ou des corépresseurs de la transcription ?

Selon le tissu, les protéines Maf peuvent donc avoir une activité dite « antagoniste », ce qui est décrit dans d'autres familles d'oncoprotéines, comme dans la famille Jun [60] [63], ou les protéines Notch [117]. Les oncoprotéines Maf peuvent avoir une activité anti-oncogénique, liée à leur fort pouvoir de différenciation terminale par l'activation d'une protéine inhibitrice du cycle cellulaire p27. Elles auraient aussi un pouvoir pro-apoptotique par l'inhibition de MYB ou l'induction de la transcription de p53 [103]. Les protéines Maf peuvent aussi inhiber la voies de prolifération HRAS ou BRAF, et probablement la voie Ras/Raf/ERK, dans des conditions spécifiques de culture cellulaire [63].

Si l'on compare MafB au facteur de transcription CEBPD des cellules à prolactine décrit plus haut, une réexpression de ce facteur, entraîne une diminution des protéines régulant le cycle cellulaire : c-Myc (proto-oncogène), cycline D1, cycline B1 et survivine (protéine inhibitrice de l'apoptose [93].

Ces mécanismes pourraient expliquer les conséquences d'une diminution de MafB dans les cellules tumorales hypophysaires.

Les petites Maf protéines ne sont à priori pas impliquées dans le cancer et auraient plutôt des propriétés antioxydantes [60]. Les petites protéines Maf peuvent rentrer en compétition avec les larges Maf au niveau des domaines de liaison et réprimer ainsi la transcription de gènes cible de larges Maf [118]. C'est pourquoi le ratio entre les petites et les larges oncoprotéines Maf peut avoir un retentissement biologique. Cela pourrait peut-être expliquer les propriétés si divergentes des larges protéines Maf. L'expression modérée de leurs gènes cibles peut permettre la différenciation de tissus spécifiques, tandis qu'en l'absence pathologique des petites protéines Maf, les larges Maf entraîneraient une surexpression de gènes, à l'origine de leur pouvoir oncogène.

Les résultats antagonistes que nous décrivons dans cette étude sont donc en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature, à savoir que l'activité des protéines Maf est fortement dépendante du type cellulaire, de l'environnement et de leur statut de phosphorylation [63].

## J) Biais de l'étude

**Nous ne pouvons exclure un biais important de cette étude**, qui est le travail sur des hypophyses juxta-tumorales, qui ont donc pu subir des modifications moléculaires par des phénomènes paracrines par exemple. L'étude aura une plus grande puissance si nous effectuons les marquages sur des hypophyses strictement normales. Il est en revanche difficile de récupérer des hypophyses strictement normales sur des autopsies, car elles souffrent très rapidement d'ischémie et se nécrosent. De plus, la population de cette cohorte d'hypophyses normales est majoritairement féminine, et nous pouvons nous interroger sur l'effet d'une imprégnation hormonale féminine sur l'expression de MafB. Cependant, l'unique hypophyse masculine exprime fortement MafB également.

Un autre biais important de cette étude, est que le bruit de fond de ces images d'immunohistochimie est conséquent, notamment dans les tumeurs. Nous ne pouvons différencier pour le moment une éventuelle délocalisation cytoplasmique d'un bruit de fond. En outre, les variations entre les marquages peuvent être liées au fixateur des tumeurs, qui divergent d'un centre à l'autre (entre le GHE et l'hôpital Bretonneau). En effet, selon le fixateur utilisé, le bruit de fond peut être modifié.

Une première relecture avec le Dr A. Vasiljevic, anatomopathologiste, nous a permis de conclure que le marquage nucléaire observé dans les hypophyses normales était bien réel ; les marquages observés dans l'hypophyse pathologique sont, quant à eux, plus sujets à discussion et doivent être confirmés sur un plus grand nombre de tumeurs.

La variabilité de ces expériences réalisées manuellement peut fausser les résultats. Il est donc nécessaire de reproduire les IHC à l'aide d'automates sur un plus grand nombre d'hypophyses.

## **K) Perspectives**

De nombreuses expérimentations sont envisageables pour confirmer nos hypothèses. Il faudrait tout d'abord prouver l'expression de MafB dans l'hypophyse normale humaine en quantifiant les protéines MafB (par Western blot) et l'expression d'ARNm de MafB (par Northern blot).

Nous pourrions aussi préciser la présence de MafB dans chaque sous-type cellulaire de l'hypophyse normale : les cellules gonadotropes, somatotropes, à prolactine, corticotropes et thyrotropes. Pour cela, une double immunofluorescence peut être réalisée avec des AC anti MafB en co-marquage avec les AC anti hormones hypophysaires.

Il sera ensuite intéressant d'évaluer l'expression de MafB au cours du développement embryonnaire à l'aide d'hypophyses de fœtus humains, afin de déterminer le stade embryonnaire d'apparition de MafB.

A l'aide de cultures cellulaires, nous pourrions évaluer l'impact d'une surexpression de MafB dans des lignées cellulaires de tumeurs hypophysaires (cellules somatotropes GH3, corticotropes ATT20, etc.).

Ensuite, il sera intéressant de définir les interactions moléculaires de MafB dans l'hypophyse. Peut-on faire une analogie avec celles décrites au sein d'autres organes, dans la littérature?

Dans un second temps nous pourrions caractériser l'expression de MafB dans une plus grande proportion d'adénomes hypophysaires, afin de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre sa perte d'expression et des critères d'agressivité cliniques, radiologiques ou anatomopathologique de prolifération (Ki67, mitoses, p53). Devant l'hétérogénéité des marquages dans les tumeurs hypophysaires, il sera intéressant de qualifier les cellules restant positives pour MafB et celles devenant négatives pour MafB. Ensuite, nous pourrions analyser MafB dans les tumeurs, en amplifiant les séquences de nucléotides par PCR, afin de mettre en évidence une éventuelle mutation de MafB.

Par ailleurs, il serait intéressant d'évaluer la présence des autres protéines grandes Maf (MafA et c-Maf notamment) dans l'hypophyse humaine normale et pathologique, sachant que leur rôle a été décrit dans d'autres glandes endocrines [90].

## **VI) CONCLUSIONS**

Les adénomes hypophysaires sont les tumeurs intracrâniennes bénignes les plus fréquentes chez l'adulte. La physiopathologie des tumeurs hypophysaires et les mécanismes associés à l'agressivité tumorale restent mal élucidés. La majorité des adénomes hypophysaires surviennent dans un contexte sporadique, tandis que 5 à 10% d'entre eux sont d'origine familiale. Ces adénomes hypophysaires familiaux peuvent s'intégrer dans le cadre d'une Néoplasie Endocrinienne Multiple de type I (NEM1), et sont plus fréquemment des macro-adénomes invasifs, plurisécrétants.

La NEM1 est une maladie rare, mais l'étude des mécanismes de tumorigénèse associés à cette pathologie permet de caractériser les voies moléculaires impliquées dans l'agressivité de certaines tumeurs sporadiques. En effet, alors que la protéine ménine est ubiquitaire, les mutations du gène MEN1 conduisent exclusivement à la prolifération de certaines glandes endocrines, sans que les mécanismes en soient clairement compris. Pour tenter de répondre à cette question, l'équipe de recherche du Dr Chang Zhang a mis en évidence dans les insulinomes de « souris MEN1Knock out » une expression ectopique de MafB responsable de la prolifération cellulaire.

La poursuite de ces travaux chez la souris normale et « MEN1 knock-out », nous a permis de mettre en évidence une expression ectopique de MafB dans près de 25% des tumeurs hypophysaires à prolactine, tandis que l'hypophyse normale n'exprime pas cette protéine.

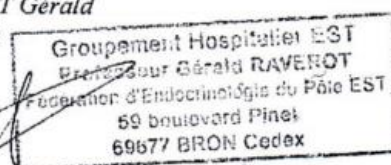
L'objectif principal de notre étude a donc été d'analyser, par immunohistochimie, l'expression de MafB dans l'hypophyse humaine normale ou tumorale, dans le cadre d'une recherche translationnelle.

Chez l'homme, dans l'anté-hypophyse normale, MafB est fortement exprimé dans la majorité des cellules endocrines suggérant qu'il puisse être un facteur de la différenciation terminale des cellules antéhypophysaires, comme cela a été décrit dans d'autres organes (notamment dans les parathyroïdes chez la souris ou dans le rein chez l'homme). L'étude de 15 tumeurs hypophysaires a montré que l'expression de MafB était variable, allant d'une forte expression homogène à une perte d'expression totale ou une délocalisation cytoplasmique. Du fait de ce faible effectif de tumeurs étudiées, nous n'avons pas pu corréler l'expression variable de MafB aux caractéristiques clinico-biologiques ou anatomopathologiques de ces tumeurs. Toutefois, la perte d'expression partielle ou complète dans de nombreuses tumeurs hypophysaire serait ainsi un marqueur de différenciation tumorale.

En conclusion, notre étude est la première à caractériser l'expression de MafB dans l'hypophyse humaine normale et tumorale. Nous n'avons pas pu déterminer son rôle dans la tumorigénèse hypophysaire, mais nos résultats nous encouragent à poursuivre ce travail sur un plus grand effectif, afin de mieux définir le rôle de MafB dans le contrôle de la croissance ou de la sécrétion tumorale. L'étude parallèle du modèle animal et de notre cohorte de tumeurs hypophysaires humaines devrait nous aider à apporter ces réponses. Ces résultats pourront ensuite être étendus à l'étude d'autres glandes endocrines, en particulier les parathyroïdes.

Le Président de la thèse,  
**RAVEROT Gérard**

Signature



Vu et permis d'imprimer  
Lyon, le **19 MARS 2015**

VU :  
Le Doyen de la Faculté de Médecine  
Lyon-Est



Professeur Jérôme ETIENNE

VU :  
Pour Le Président de l'Université  
Le Président du Comité de Coordination  
des Etudes Médicales



Professeur François-Noël GILLY

## VII) REFERENCES

1. DeLellis RA (2004) Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press. 320 p. p.
2. Prince KL, Walvoord EC, Rhodes SJ (2011) The role of homeodomain transcription factors in heritable pituitary disease. *Nat Rev Endocrinol* 7: 727-737.
3. Mete O, Asa SL (2012) Clinicopathological correlations in pituitary adenomas. *Brain Pathol* 22: 443-453.
4. Tjornstrand A, Gunnarsson K, Evert M, Holmberg E, Ragnarsson O, et al. (2014) The incidence rate of pituitary adenomas in western Sweden for the period 2001-2011. *Eur J Endocrinol* 171: 519-526.
5. Meij BP, Lopes MB, Ellegala DB, Alden TD, Laws ER, Jr. (2002) The long-term significance of microscopic dural invasion in 354 patients with pituitary adenomas treated with transsphenoidal surgery  
résumé français: analyse signifiante de l'invasion de la dure mère; 354 patients  
=> prédit risque de tissu résiduel. *J Neurosurg* 96: 195-208.
6. Raverot G, Castinetti F, Jouanneau E, Morange I, Figarella-Branger D, et al. (2012) Pituitary carcinomas and aggressive pituitary tumours: merits and pitfalls of temozolomide treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 76: 769-775.
7. Righi A, Agati P, Sisto A, Frank G, Faustini-Fustini M, et al. (2012) A classification tree approach for pituitary adenomas. *Hum Pathol* 43: 1627-1637.
8. Cuny T, Barlier A (2013) The significance of MEN1 mutations in pituitary carcinomas. *Biomark Med* 7: 567-569.
9. Beckers A, Aaltonen LA, Daly AF, Karhu A (2013) Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene. *Endocr Rev* 34: 239-277.
10. Tichomirowa MA, Barlier A, Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ronchi C, et al. (2011) High prevalence of AIP gene mutations following focused screening in young patients with sporadic pituitary macroadenomas. *Eur J Endocrinol* 165: 509-515.
11. Trivellin G, Daly AF, Faucz FR, Yuan B, Rostomyan L, et al. (2014) Gigantism and acromegaly due to Xq26 microduplications and GPR101 mutation. *N Engl J Med* 371: 2363-2374.
12. Calender A, Giraud S, Cougard P, Chanson P, Lenoir G, et al. (1995) Multiple endocrine neoplasia type 1 in France: clinical and genetic studies. *J Intern Med* 238: 263-268.
13. Goudet P, Bonithon-Kopp C, Murat A, Ruzsiewski P, Niccoli P, et al. (2011) Gender-related differences in MEN1 lesion occurrence and diagnosis: a cohort study of 734 cases from the Groupe d'etude des Tumeurs Endocrines. *Eur J Endocrinol* 165: 97-105.
14. Marx S, Spiegel AM, Skarulis MC, Doppman JL, Collins FS, et al. (1998) Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical and genetic topics. *Ann Intern Med* 129: 484-494.
15. Casanueva FF, Molitch ME, Schlechte JA, Abs R, Bonert V, et al. (2006) Guidelines of the Pituitary Society for the diagnosis and management of prolactinomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65: 265-273.
16. Cuny T, Pertuit M, Sahnoun-Fathallah M, Daly A, Occhi G, et al. (2013) Genetic analysis in young patients with sporadic pituitary macroadenomas: besides AIP don't forget MEN1 genetic analysis. *Eur J Endocrinol* 168: 533-541.



17. Trouillas J, Labat-Moleur F, Sturm N, Kujas M, Heymann MF, et al. (2008) Pituitary tumors and hyperplasia in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome (MEN1): a case-control study in a series of 77 patients versus 2509 non-MEN1 patients. *Am J Surg Pathol* 32: 534-543.
18. Verges B, Boureille F, Goudet P, Murat A, Beckers A, et al. (2002) Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 457-465.
19. Gsponer J, De Tribolet N, Deruaz JP, Janzer R, Uske A, et al. (1999) Diagnosis, treatment, and outcome of pituitary tumors and other abnormal intrasellar masses. Retrospective analysis of 353 patients. *Medicine (Baltimore)* 78: 236-269.
20. Beckers A, Betea D, Valdes Socin H, Stevenaert A (2003) The treatment of sporadic versus MEN1-related pituitary adenomas. *J Intern Med* 253: 599-605.
21. Pieterman CR, Conemans EB, Dreijerink KM, de Laat JM, Timmers M, et al. (2014) Thoracic and duodenopancreatic neuroendocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocr Relat Cancer*.
22. Juodele L, Serapinas D, Sabaliauskas G, Krasauskiene A, Krasauskas V, et al. (2011) Carcinoma of two parathyroid glands caused by a novel MEN1 gene mutation - a rare feature of the MEN 1 syndrome. *Medicina (Kaunas)* 47: 635-639.
23. Machens A, Schaaf L, Karges W, Frank-Raue K, Bartsch DK, et al. (2007) Age-related penetrance of endocrine tumours in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): a multicentre study of 258 gene carriers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67: 613-622.
24. Dy BM, Que FG, Thompson GB, Young WF, Rowse P, et al. (2014) Metastasectomy of neuroendocrine tumors in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Am J Surg* 208: 1047-1053; discussion 1052-1043.
25. Lemos MC, Thakker RV (2008) Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat* 29: 22-32.
26. Thevenon J, Bourredjem A, Faivre L, Cardot-Bauters C, Calender A, et al. (2013) Higher risk of death among MEN1 patients with mutations in the JunD interacting domain: a Groupe d'etude des Tumeurs Endocrines (GTE) cohort study. *Hum Mol Genet* 22: 1940-1948.
27. Lips CJ, Dreijerink KM, Hoppener JW (2012) Variable clinical expression in patients with a germline MEN1 disease gene mutation: clues to a genotype-phenotype correlation. *Clinics (Sao Paulo)* 67 Suppl 1: 49-56.
28. Bertolino P, Tong WM, Herrera PL, Casse H, Zhang CX, et al. (2003) Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer Res* 63: 4836-4841.
29. Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, McNally SR, Swain GP, et al. (2003) Of mice and MEN1: Insulinomas in a conditional mouse knockout. *Mol Cell Biol* 23: 6075-6085.
30. Loffler KA, Biondi CA, Gartside M, Waring P, Stark M, et al. (2007) Broad tumor spectrum in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 1. *Int J Cancer* 120: 259-267.
31. Bertolino P, Radovanovic I, Casse H, Aguzzi A, Wang ZQ, et al. (2003) Genetic ablation of the tumor suppressor menin causes lethality at mid-gestation with defects in multiple organs. *Mech Dev* 120: 549-560.
32. Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, Garrett-Beal L, Emmert-Buck MR, et al. (2001) A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1118-1123.

33. Fontaniere S, Duvillie B, Scharfmann R, Carreira C, Wang ZQ, et al. (2008) Tumour suppressor menin is essential for development of the pancreatic endocrine cells. *J Endocrinol* 199: 287-298.
34. Bertolino P, Tong WM, Galendo D, Wang ZQ, Zhang CX (2003) Heterozygous Men1 mutant mice develop a range of endocrine tumors mimicking multiple endocrine neoplasia type 1. *Mol Endocrinol* 17: 1880-1892.
35. Harding B, Lemos MC, Reed AA, Walls GV, Jeyabalan J, et al. (2009) Multiple endocrine neoplasia type 1 knockout mice develop parathyroid, pancreatic, pituitary and adrenal tumours with hypercalcaemia, hypophosphataemia and hypercorticotesteronaemia. *Endocr Relat Cancer* 16: 1313-1327.
36. Larsson C, Skogseid B, Oberg K, Nakamura Y, Nordenskjold M (1988) Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature* 332: 85-87.
37. Walls GV, Lemos MC, Javid M, Bazan-Peregrino M, Jeyabalan J, et al. (2012) MEN1 gene replacement therapy reduces proliferation rates in a mouse model of pituitary adenomas. *Cancer Res* 72: 5060-5068.
38. Seigne C, Auret M, Treilleux I, Bonnavion R, Assade F, et al. (2013) High incidence of mammary intraepithelial neoplasia development in Men1-disrupted murine mammary glands. *J Pathol* 229: 546-558.
39. Biondi CA, Gartside MG, Waring P, Loffler KA, Stark MS, et al. (2004) Conditional inactivation of the MEN1 gene leads to pancreatic and pituitary tumorigenesis but does not affect normal development of these tissues. *Mol Cell Biol* 24: 3125-3131.
40. Yang Y, Hua X (2007) In search of tumor suppressing functions of menin. *Mol Cell Endocrinol* 265-266: 34-41.
41. Huang J, Gurung B, Wan B, Matkar S, Veniaminova NA, et al. (2012) The same pocket in menin binds both MLL and JUND but has opposite effects on transcription. *Nature* 482: 542-546.
42. Matkar S, Thiel A, Hua X (2013) Menin: a scaffold protein that controls gene expression and cell signaling. *Trends Biochem Sci* 38: 394-402.
43. Sowa H, Kaji H, Kitazawa R, Kitazawa S, Tsukamoto T, et al. (2004) Menin inactivation leads to loss of transforming growth factor beta inhibition of parathyroid cell proliferation and parathyroid hormone secretion. *Cancer Res* 64: 2222-2228.
44. Kaji H, Canaff L, Lebrun JJ, Goltzman D, Hendy GN (2001) Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming growth factor type beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3837-3842.
45. Heppner C, Bilimoria KY, Agarwal SK, Kester M, Whitty LJ, et al. (2001) The tumor suppressor protein menin interacts with NF-kappaB proteins and inhibits NF-kappaB-mediated transactivation. *Oncogene* 20: 4917-4925.
46. Cao Y, Liu R, Jiang X, Lu J, Jiang J, et al. (2009) Nuclear-cytoplasmic shuttling of menin regulates nuclear translocation of {beta}-catenin. *Mol Cell Biol* 29: 5477-5487.
47. Ziemer-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R, 3rd, Patel Y, et al. (1991) Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10735-10739.
48. Dreijerink KM, Mulder KW, Winkler GS, Hoppener JW, Lips CJ, et al. (2006) Menin links estrogen receptor activation to histone H3K4 trimethylation. *Cancer Res* 66: 4929-4935.

49. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, et al. (2008) Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 29: 726-776.
50. Fontaniere S, Tost J, Wierinckx A, Lachuer J, Lu J, et al. (2006) Gene expression profiling in insulinomas of Men1 beta-cell mutant mice reveals early genetic and epigenetic events involved in pancreatic beta-cell tumorigenesis. *Endocr Relat Cancer* 13: 1223-1236.
51. Ratineau C, Bernard C, Poncet G, Blanc M, Josso C, et al. (2004) Reduction of menin expression enhances cell proliferation and is tumorigenic in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 279: 24477-24484.
52. Schnepf RW, Mao H, Sykes SM, Zong WX, Silva A, et al. (2004) Menin induces apoptosis in murine embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 279: 10685-10691.
53. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, et al. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292: 727-730.
54. Sayo Y, Murao K, Imachi H, Cao WM, Sato M, et al. (2002) The multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin, inhibits insulin production in rat insulinoma cells. *Endocrinology* 143: 2437-2440.
55. Namihiro H, Sato M, Murao K, Cao WM, Matsubara S, et al. (2002) The multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin, inhibits the human prolactin promoter activity. *J Mol Endocrinol* 29: 297-304.
56. Lacerte A, Lee EH, Reynaud R, Canaff L, De Guise C, et al. (2004) Activin inhibits pituitary prolactin expression and cell growth through Smads, Pit-1 and menin. *Mol Endocrinol* 18: 1558-1569.
57. Gracanin A, Dreijerink KM, van der Luijt RB, Lips CJ, Hoppener JW (2009) Tissue selectivity in multiple endocrine neoplasia type 1-associated tumorigenesis. *Cancer Res* 69: 6371-6374.
58. Lu J, Hamze Z, Bonnavion R, Herath N, Pouponnot C, et al. (2012) Reexpression of oncoprotein MafB in proliferative beta-cells and Men1 insulinomas in mouse. *Oncogene* 31: 3647-3654.
59. Wu T, Hua X (2011) Menin represses tumorigenesis via repressing cell proliferation. *Am J Cancer Res* 1: 726-739.
60. Eychene A, Rocques N, Pouponnot C (2008) A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 683-693.
61. Karin M, Liu Z, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240-246.
62. Kappelmann M, Bosserhoff A, Kuphal S (2013) AP-1/c-Jun transcription factors: Regulation and function in malignant melanoma. *Eur J Cell Biol*.
63. Pouponnot C, Sii-Felice K, Hmitou I, Rocques N, Lecoine L, et al. (2006) Cell context reveals a dual role for Maf in oncogenesis. *Oncogene* 25: 1299-1310.
64. Sieweke MH, Tekotte H, Frampton J, Graf T (1996) MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* 85: 49-60.
65. Kelly LM, Englmeier U, Lafon I, Sieweke MH, Graf T (2000) MafB is an inducer of monocytic differentiation. *EMBO J* 19: 1987-1997.
66. Sato-Nishiwaki M, Aida Y, Abe S, Shibata Y, Kimura T, et al. (2013) Reduced number and morphofunctional change of alveolar macrophages in MafB gene-targeted mice. *PLoS One* 8: e73963.

67. Blanchi B, Kelly LM, Viemari JC, Lafon I, Burnet H, et al. (2003) MafB deficiency causes defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth. *Nat Neurosci* 6: 1091-1100.
68. Moriguchi T, Hamada M, Morito N, Terunuma T, Hasegawa K, et al. (2006) MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol Cell Biol* 26: 5715-5727.
69. Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, Esaki R, Harada A, et al. (2005) MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* 25: 4969-4976.
70. Bergsagel PL, Chesi M (2013) V. Molecular classification and risk stratification of myeloma. *Hematol Oncol* 31 Suppl 1: 38-41.
71. Morito N, Yoh K, Fujioka Y, Nakano T, Shimohata H, et al. (2006) Overexpression of c-Maf contributes to T-cell lymphoma in both mice and human. *Cancer Res* 66: 812-819.
72. Artner I, Le Lay J, Hang Y, Elghazi L, Schisler JC, et al. (2006) MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells. *Diabetes* 55: 297-304.
73. Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA (2007) Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell* 12: 817-826.
74. Hamze Z, Vercherat C, Bernigaud-Lacheretz A, Bazzi W, Bonnavion R, et al. (2013) Altered MENIN expression disrupts the MAFA differentiation pathway in insulinoma. *Endocr Relat Cancer* 20: 833-848.
75. Trouillas J, Roy P, Sturm N, Dantony E, Cortet-Rudelli C, et al. (2013) A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathol* 126: 123-135.
76. Bonnavion R, Jaafar R, Kerr-Conte J, Assade F, van Stralen E, et al. (2013) Both PAX4 and MAFA are expressed in a substantial proportion of normal human pancreatic alpha cells and deregulated in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 8: e72194.
77. Arras M, Hoche A, Bohle R, Eckert P, Riedel W, et al. (1996) Tumor necrosis factor-alpha in macrophages of heart, liver, kidney, and in the pituitary gland. *Cell Tissue Res* 285: 39-49.
78. Herrera PL, Huarte J, Sanvito F, Meda P, Orci L, et al. (1991) Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene. *Development* 113: 1257-1265.
79. Kamitani-Kawamoto A, Hamada M, Moriguchi T, Miyai M, Saji F, et al. (2011) MafB interacts with Gcm2 and regulates parathyroid hormone expression and parathyroid development. *J Bone Miner Res* 26: 2463-2472.
80. Ciemerych MA, Kenney AM, Sicinska E, Kalaszczyńska I, Bronson RT, et al. (2002) Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev* 16: 3277-3289.
81. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, et al. (2005) Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 106: 296-303.
82. Qian X, Kulig E, Jin L, Lloyd RV (1998) Expression of D-type cyclins in normal and neoplastic rat pituitary. *Endocrinology* 139: 2058-2067.
83. Pandey JP, Kistner-Griffin E, Namboodiri AM, Iwasaki M, Kasuga Y, et al. (2014) Higher levels of antibodies to the tumor-associated antigen cyclin B1 in cancer-free individuals than in patients with breast cancer. *Clin Exp Immunol*.

84. Yang Y, Gurung B, Wu T, Wang H, Stoffers DA, et al. (2010) Reversal of preexisting hyperglycemia in diabetic mice by acute deletion of the Men1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20358-20363.
85. Gillam MP, Nimbalkar D, Sun L, Christov K, Ray D, et al. (2014) MEN1 tumorigenesis in the pituitary and pancreatic islet requires Cdk4 but not Cdk2. *Oncogene*.
86. Wrocklage C, Gold H, Hackl W, Buchfelder M, Fahlbusch R, et al. (2002) Increased menin expression in sporadic pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 56: 589-594.
87. Theodoropoulou M, Cavallari I, Barzon L, D'Agostino DM, Ferro T, et al. (2004) Differential expression of menin in sporadic pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer* 11: 333-344.
88. Artner I, Blanchi B, Raum JC, Guo M, Kaneko T, et al. (2007) MafB is required for islet beta cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3853-3858.
89. Artner I, Hang Y, Mazur M, Yamamoto T, Guo M, et al. (2010) MafA and MafB regulate genes critical to beta-cells in a unique temporal manner. *Diabetes* 59: 2530-2539.
90. Matsuoka TA, Artner I, Henderson E, Means A, Sander M, et al. (2004) The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2930-2933.
91. Dorrell C, Schug J, Lin CF, Canaday PS, Fox AJ, et al. (2011) Transcriptomes of the major human pancreatic cell types. *Diabetologia* 54: 2832-2844.
92. Dai C, Brissova M, Hang Y, Thompson C, Poffenberger G, et al. (2012) Islet-enriched gene expression and glucose-induced insulin secretion in human and mouse islets. *Diabetologia* 55: 707-718.
93. Tong Y, Zhou J, Mizutani J, Fukuoka H, Ren SG, et al. (2011) CEBPD suppresses prolactin expression and prolactinoma cell proliferation. *Mol Endocrinol* 25: 1880-1891.
94. Carninci P (2014) Genomics: mice in the ENCODE spotlight. *Nature* 515: 346-347.
95. Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, et al. (2014) A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* 515: 355-364.
96. Suzuki K, Numata T, Suzuki H, Raga DD, Ipulan LA, et al. (2014) Sexually dimorphic expression of Mafb regulates masculinization of the embryonic urethral formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 16407-16412.
97. DeFalco T, Takahashi S, Capel B (2011) Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Dev Biol* 352: 14-26.
98. Nishimura W, Kondo T, Salameh T, El Khattabi I, Dodge R, et al. (2006) A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic beta-cells. *Dev Biol* 293: 526-539.
99. Li MA, Alls JD, Avancini RM, Koo K, Godt D (2003) The large Maf factor Traffic Jam controls gonad morphogenesis in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 5: 994-1000.
100. Usui T, Nakamura Y, Mizuta H, Murabe H, Muro S, et al. (2000) Functional significance of prop-1 gene expression in pituitary adenomas. *Endocr J* 47 Suppl: S85-89.
101. Vallette-Kasic S, Figarella-Branger D, Grino M, Pulichino AM, Dufour H, et al. (2003) Differential regulation of proopiomelanocortin and pituitary-restricted transcription factor (TPIT), a new marker of normal and adenomatous human corticotrophs. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3050-3056.
102. Farrell WE, Clayton RN (2000) Molecular pathogenesis of pituitary tumors. *Front Neuroendocrinol* 21: 174-198.

103. Hale TK, Myers C, Maitra R, Kolzau T, Nishizawa M, et al. (2000) Maf transcriptionally activates the mouse p53 promoter and causes a p53-dependent cell death. *J Biol Chem* 275: 17991-17999.
104. Watson JE, Doggett NA, Albertson DG, Andaya A, Chinnaiyan A, et al. (2004) Integration of high-resolution array comparative genomic hybridization analysis of chromosome 16q with expression array data refines common regions of loss at 16q23-qter and identifies underlying candidate tumor suppressor genes in prostate cancer. *Oncogene* 23: 3487-3494.
105. Guo S, Dai C, Guo M, Taylor B, Harmon JS, et al. (2013) Inactivation of specific beta cell transcription factors in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 123: 3305-3316.
106. Wu Q, Ni X (2015) ROS-Mediated DNA Methylation Pattern Alterations in Carcinogenesis. *Curr Drug Targets* 16: 13-19.
107. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
108. Trouillas J, Daniel L, Guigard MP, Tong S, Gouvernet J, et al. (2003) Polysialylated neural cell adhesion molecules expressed in human pituitary tumors and related to extrasellar invasion. *J Neurosurg* 98: 1084-1093.
109. Cornelius A, Cortet-Rudelli C, Assaker R, Kerdraon O, Gevaert MH, et al. (2012) Endothelial expression of endocan is strongly associated with tumor progression in pituitary adenoma. *Brain Pathol* 22: 757-764.
110. Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, et al. (1999) Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 761-767.
111. Galland F, Lacroix L, Saulnier P, Dessen P, Meduri G, et al. (2010) Differential gene expression profiles of invasive and non-invasive non-functioning pituitary adenomas based on microarray analysis. *Endocr Relat Cancer* 17: 361-371.
112. Rickert CH, Dockhorn-Dworniczak B, Busch G, Moskopp D, Albert FK, et al. (2001) Increased chromosomal imbalances in recurrent pituitary adenomas. *Acta Neuropathol* 102: 615-620.
113. Planque N, Leconte L, Coquelle FM, Benkhelifa S, Martin P, et al. (2001) Interaction of Maf transcription factors with Pax-6 results in synergistic activation of the glucagon promoter. *J Biol Chem* 276: 35751-35760.
114. Dattani MT, Robinson IC (2000) The molecular basis for developmental disorders of the pituitary gland in man. *Clin Genet* 57: 337-346.
115. Kovalovsky D, Paez Pereda M, Labeur M, Renner U, Holsboer F, et al. (2004) Nur77 induction and activation are necessary for interleukin-1 stimulation of proopiomelanocortin in AtT-20 corticotrophs. *FEBS Lett* 563: 229-233.
116. Riebold M, Kozany C, Freiburger L, Sattler M, Buchfelder M, et al. (2015) A C-terminal HSP90 inhibitor restores glucocorticoid sensitivity and relieves a mouse allograft model of Cushing disease. *Nat Med* 21: 276-280.
117. Radtke F, Raj K (2003) The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 3: 756-767.
118. Kataoka K, Noda M, Nishizawa M (1996) Transactivation activity of Maf nuclear oncoprotein is modulated by Jun, Fos and small Maf proteins. *Oncogene* 12: 53-62.

---

**Résumé :** Les adénomes hypophysaires sont les tumeurs intracrâniennes bénignes les plus fréquentes chez l'adulte. La physiopathologie des tumeurs hypophysaires et les mécanismes associés à l'agressivité tumorale restent mal élucidés. La majorité des adénomes hypophysaires surviennent dans un contexte sporadique, tandis que 5 à 10% d'entre eux sont d'origine familiale. Ces adénomes hypophysaires familiaux peuvent s'intégrer dans le cadre d'une Néoplasie Endocrinienne Multiple de type I (NEM1), et sont plus fréquemment des macro-adénomes invasifs, plurisécrétants.

La NEM1 est une maladie rare, mais l'étude des mécanismes de tumorigénèse associés à cette pathologie permet de caractériser les voies moléculaires impliquées dans l'agressivité de certaines tumeurs sporadiques. Pour mieux comprendre ces mécanismes, l'équipe de recherche du Dr Chang Zhang a mis en évidence dans les insulinomes de « souris *MEN1* knock out » une expression ectopique de MafB responsable de la prolifération cellulaire. La poursuite de ces travaux chez la souris normale et « *MEN1* knock-out », nous a permis de révéler une expression ectopique de MafB dans près de 25% des tumeurs hypophysaires à prolactine, tandis que l'hypophyse normale n'exprime pas cette protéine.

L'objectif principal de notre étude a été d'analyser, par immunohistochimie, l'expression de MafB dans l'hypophyse humaine normale ou tumorale, dans le cadre d'une recherche translationnelle.

**MATERIEL ET METHODE :** Nous avons obtenu du laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques du CHU de Lyon-Est 11 hypophyses normales juxta-tumorales et 15 adénomes hypophysaires sporadiques réséqués lors d'une intervention chirurgicale pour adénome hypophysaire en 2013 et en 2014. Nous avons effectué sur ces coupes des analyses par IHC.

**RESULTATS :** Quatre-vingt-deux pourcent des hypophyses normales humaines expriment fortement MafB, dans la majorité des cellules endocrines. Les adénomes hypophysaires humains ont, quant à eux, une expression diminuée et hétérogène de MafB. Au total, dans 87% des tumeurs hypophysaires, l'expression nucléaire de MafB est diminuée, au moins en partie.

**CONCLUSION :** Notre étude est la première à caractériser l'expression de MafB dans l'hypophyse humaine normale et tumorale. Chez l'homme, MafB pourrait être un facteur clé de la différenciation des cellules antéhypophysaires, comme cela a été décrit dans d'autres organes. Ainsi, la perte d'expression partielle ou complète dans de nombreuses tumeurs hypophysaires serait un marqueur de dédifférenciation tumorale. Nos résultats nous encouragent à poursuivre ce travail sur un plus grand effectif, afin de mieux définir le rôle de MafB dans le contrôle de la croissance ou de la sécrétion tumorale.

---

**MOTS CLES :** Oncoprotéine MafB, Hypophyse, Tumorigénèse, Néoplasie endocrinienne multiple

---

**JURY :** Président : Monsieur le Professeur Gérald Raverot

Membres : Madame le Professeur Françoise Borson Chazot  
Monsieur le Professeur Emmanuel Jouanneau  
Monsieur le Docteur Chang Xian Zhang

---

**DATE DE SOUTENANCE :** vendredi 10 avril 2015

---

Adresse de l'auteur : 61 rue RACHAIS, 69 007 LYON  
votre mail : julie.beauvy@gmail.com