Université catholique de Louvain
Faculté de Pharmacie et des Sciences Biomédicales
de Duve Institute

Expression et rôles de KRAS au cours du développement embryonnaire

Marie-Albane Minati

Mars 2023

Membres du jury

Promoteur

Professeur Patrick Jacquemin
Université catholique de Louvain

Membres internes

Professeur Jean-Baptiste Demoulin (Président)
Université catholique de Louvain

Professeur Guido Bommer (Secrétaire)
Université catholique de Louvain

Professeur Frédéric Lemaigre
Université catholique de Louvain

Membres externes

Docteure Francesca Rochais
Marseille Medical Genetics, France

Professeur Eric Bellefroid
Université libre de Bruxelles, Belgique

Remerciements

Voici la fin d'une longue et intense aventure…

Cette aventure qui a été jonchée d'obstacles et d'émotions diverses allant de la peur, du stress, en passant par la joie, la fierté… a été possible grâce à l'aide précieuse de nombreuses personnes… A vous qui m'avez aidé d'une manière ou d'une autre : MERCI !

Je remercie les Professeurs Patrick Jacquemin et Frédéric Lemaigre de m'avoir accueillie lors de mon stage de master et de m'avoir donné l'envie d'entamer une thèse. Ce stage m'a permis d'avoir un premier pied dans le laboratoire LPAD.. et oui, sans ce stage, cette aventure doctorale n'aurait pas été possible !

Je remercie le Télévie (et tous ses donateurs) qui a rendu cette aventure possible en finançant mon projet.

Je remercie les membres internes et externes de mon jury de thèse, les Professeurs Jean-Baptiste Demoulin, Guido Bommer, Frédéric Lemaigre, Patrick Jacquemin, Eric Bellefroid et la Docteure Francesca Rochais. Merci à vous pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ma thèse ainsi que pour vos questions, conseils et idées. Merci aux membres de mon comité d'accompagnement pour avoir accepté, dès le début de cette aventure, de m'accompagner durant l'entièreté de mon parcours doctoral. Merci pour votre participation à mes comités, ainsi que pour vos nombreuses questions et remarques scientifiques qui m'ont permis d'évoluer scientifiquement.

Je remercie particulièrement le Professeur Patrick Jacquemin, mon promoteur de thèse. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de travailler sur plusieurs projets de recherches. Même si tous les projets sur lesquelles j'ai travaillé n'ont pu aboutir à une belle finalité (..alalala ces souris KPC…), je ressors avec un énorme bagage scientifique. J'ai apprécié travailler avec vous. Merci !!!

Je remercie également le Professeur Frédéric Lemaigre. Merci pour vos remarques, commentaires et questions lors de nos réunions de laboratoire et de nos journées scientifiques. Votre regard extérieur a aidé à construire les différents projets sur lesquelles j'ai travaillé.

Patrick et Frédéric, merci pour tous ce que vous avez pu m'apprendre au sein de votre laboratoire.

Je remercie (les anciens, les actuels et les nouveaux) LPADiens et GEPIstes. Merci à vous ! Sans vous cette aventure n'aurait pas été la même. Vous avez mis des paillettes dans ma vie de doctorante ☺

Je remercie particulièrement Maxime, mon fillot qui est devenu mon collègue de dos ;) Merci pour les nombreuses discussions scientifiques et non scientifiques, les

pauses papotes mais aussi de m'avoir supportée dans les moments de doutes (ou plutôt, tu devrais me remercier de t'avoir supporté .. alala que j'aime bien te taquiner ☺). Courage pour la dernière ligne droite de ta thèse !

Je remercie Mohamad pour ses conseils et de m'avoir donné l'opportunité de participer à deux études enrichissantes.

Je remercie Malak, membre de le team KRAS4A/KRAS4B, pour ses conseils et son aide. Quelle galère ces anticorps … on s'en souviendra !

Je remercie Marine et Hajar, deux techniciennes en or. La vie dans notre laboratoire-bureau était tellement super avec vous. Nos pauses cafés sont inoubliables ☺ Merci pour tous.

Je remercie particulièrement Sabine. Merci pour ton aide, ton écoute attentive et tes nombreux conseils scientifiques et personnels.

Je remercie Catalina. On a commencé ensemble et on finit ensemble. Quelle parcours ! Merci pour tes conseils.

Je remercie également Dan. Merci pour les pauses papotes, rigolade et discussion sur le monde merveilleux du western blot ☺ Courage pour la fin !

Je remercie aussi Manon, Melina, Celine, Kamar et Jean. Merci pour les petites pauses et les longguuees discussions « scientifiques » (ou pas ☺) des temps de midi. Avec vous, les pauses étaient bien trop courtes ☺

Je remercie également ceux qui m'ont aidé à me préparer pour cette dernière étape importante. Merci de m'avoir cuisiné .. et même grillé..

Mes derniers remerciement sont pour ma famille.

Je remercie mes parents. Maman, Papa merci d'avoir toujours cru en moi. Merci de m'avoir poussée à faire ce que j'aime. Surtout, merci de ne pas m'avoir considérée comme une psychopathe lors de ma première dissection de souris. Oui à 10 ans, je voulais déjà observer les organes de souris sous un microscope … Sans vous cette thèse n'aurait pas vu le jour. Merci de m'avoir soutenue (mais surtout de m'avoir supportée..) dans les moments de doute, de colère mais aussi de joie. Vous m'avez toujours soutenue et pour cela : MERCI !!

Merci Hugues, mon « petit » frère, de m'avoir supportée et de me supporter encore … Je sais ce n'est pas facile ☺

Merci Margot, ma future belle-sœur. Merci d'avoir pris part à cette aventure et d'avoir pris de ton temps pour corriger le manuscrit.

Merci Nani, merci Babou.

Merci Tonton, à cause de toi je ne suis pas médecin mais grâce à toi, je suis docteure !! (je te l'avais promis ☺).

Merci à vous qui vous êtes toujours intéressé à ce que je faisais et étudiais durant ma thèse. Quelle KRASse ☺

A tous : MERCI !

Table des matières

MEMBRES DU JURY **3**

REMERCIEMENTS **5**

TABLE DES MATIÈRES **9**

RÉSUMÉ **11**

ABRÉVIATIONS **13**

INTRODUCTION **15**

1. De la découverte des protéines RAS virales à la découverte de KRAS 17
2. La structure génétique et protéique de KRAS 18
   - *2.1. Le gène KRAS* *18*
   - *2.2. La structure protéique de KRAS* *19*
   - *2.3. Les modifications post-traductionnelles régulant KRAS* *22*
3. Voies de signalisation liées à la protéine KRAS 25
   - *3.1. Effecteurs en amont de KRAS* *25*
     - 3.1.1. Les récepteurs à tyrosines kinases 25
     - 3.1.2. Les récepteurs à cytokines 26
     - 3.1.3. Les sous-unités β des protéines G hétérotrimériques 27
   - *3.2. Réaction catalysée par KRAS* *27*
   - *3.3. Effecteurs en aval de KRAS* *28*
     - 3.3.1. Les voies de signalisation des protéines kinases activées par l'action mitogène 28
       - 3.3.1.1. La voie MAPK-ERK 29
       - 3.3.1.2. La voie MAPK-JNK 30
       - 3.3.1.3. La voie MAPK-p38/SAP 30
     - 3.3.2. La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR 31
     - 3.3.3. Les autres voies de signalisation 31
4. Les fonctions de KRAS 32
   - *4.1. Les fonctions physiologiques de KRAS* *32*
   - *4.2. Le rôle de KRAS dans le développement embryonnaire* *33*
   - *4.3. Le rôle de KRAS dans les pathologies* *35*
     - 4.3.1. KRAS et les cancers 35
     - 4.3.2. L'implication de KRAS dans les RASopathies 37

OBJECTIFS DE LA THÈSE **41**

RÉSULTATS **43**

1. L'expression de la protéine KRAS se restreint progressivement au cours de l'embryogenèse et de l'âge adulte. 45
   - *1.1. Abstract* *47*
   - *1.2. Introduction* *48*
   - *1.3. Materials and methods* *49*
   - *1.4. Results* *51*
   - *1.5. Discussion* *63*

1.6. Reference *66*
1.7. Supplementary figures *69*
2. KRAS, PAR LE BIAIS DE SON ISOFORME D'ÉPISSAGE KRAS4B, EST NÉCESSAIRE POUR LE DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA. 73
2.1. Abstract *75*
2.2. Introduction *76*
2.3. Materials and methods *77*
2.4. Results *80*
2.5. Discussion *91*
2.6. Reference *93*
2.7. Supplementary Figures *96*

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 103

1. APPORT DE NOTRE ÉTUDE D'EXPRESSION À LA BIOLOGIE DES PROTÉINES RAS 105
2. LA GÉNÉRATION DE NOUVEAUX MODÈLES MURINS POUR ÉTUDIER LES FONCTIONS D'ISOFORMES D'ÉPISSAGE DE KRAS ET LEUR VALIDATION 106
3. ANALYSE CROISÉE DE NOS ÉTUDES D'EXPRESSION DE KRAS ET DES RÔLES DE KRAS LORS DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CHEZ LA SOURIS 108
4. COMPARAISON DES RÔLES DE KRAS4A ET KRAS4B LORS DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE MURIN 108
5. ANALYSE COMPARATIVE DES PHÉNOTYPES OBSERVÉS DANS NOTRE ÉTUDE ET DES PHÉNOTYPES DÉCRITS DANS LA LITTÉRATURE 109
6. LES RÔLES DE KRAS DANS LE DÉVELOPPEMENT ET LES FONCTIONS PLACENTAIRES 111
6.1. Développement du placenta murin *111*
6.2. Implication de KRAS dans la différenciation des progéniteurs placentaires *114*
6.3. Implication de KRAS dans l'apport de nutriment : lien direct ou indirect ? *115*
6.4. Implication de KRAS dans l'apport d'oxygène *116*
7. RÔLE DE KRAS DANS LE DÉVELOPPEMENT CARDIAQUE 118
7.1. Développement du cœur *118*
7.2. Implication de KRAS dans la différenciation des cellules progénitrices cardiaques *121*
7.3. Hypoxie : cause de la malformation cardiaque ? *121*
7.4. L'axe placenta-cœur : KRAS est-il aussi impliqué ? *122*
8. LES RASOPATHIES : QU'EN EST-IL DU PHÉNOTYPE PLACENTAIRE ET CARDIAQUE ? 123
9. PERSPECTIVES 124

RÉFÉRENCES 127

ANNEXES 145

1. ÉLABORATION D' ANTICORPS RECONNAISSANT SPÉCIFIQUEMENT L'ISOFORME KRAS4A 147
2. LE N-ACÉTYLCYSTÉINE RÉDUIT LES RÉPONSES PRO-OXYDANTES ET INFLAMMATOIRES LORS DE LA PANCRÉATITE ET LA TUMORIGENÈSE DU PANCRÉAS 151
3. L'INACTIVATION GÉNÉTIQUE DE LA PÉROXIRÉDOXINE-I ENTRAVE LA CROISSANCE DES CELLULES CANCÉREUSES PANCRÉATIQUES HUMAINES 173

Résumé

Kras, un oncogène fréquemment muté dans de nombreux cancers, est, dans sa version sauvage/non mutée, essentiel au développement embryonnaire car son absence entraîne une létalité *in utero*. Par ailleurs, ce gène est soumis à un épissage alternatif générant deux isoformes appelées *Kras4A* et *Kras4B*. Le ciblage membranaire de ces deux isoformes est réalisé par des mécanismes différents, suggérant des fonctions distinctes pour ces isoformes. Bien que le rôle critique de ce gène ait été démontré dans le développement, le(s) rôle(s) respectif(s) de KRAS4A et KRAS4B dans les fonctions développementales de KRAS sont encore inconnus.

Dans ce contexte, le but de cette thèse est, premièrement, d'identifier le patron d'expression de KRAS au cours du développement embryonnaire et, deuxièmement, d'élucider les rôles développementaux de KRAS et de ses deux isoformes d'épissage, KRAS4A et KRAS4B, au cours de ce même processus.

Dans un premier temps, le modèle murin *citrine-Kras*, qui permet la production d'une protéine fusion Citrine-KRAS, a été utilisé afin de mettre en évidence le patron d'expression de KRAS par l'intermédiaire d'un immunomarquage ciblant la Citrine, et donc indirectement KRAS. Ce modèle nous a permis de montrer que KRAS est exprimée dans un large éventail d'organes et de tissus, chez l'embryon. Cependant, cette expression tend à diminuer vers la naissance jusqu'au stade adulte, où la dynamique d'expression varie selon les organes et devient limitée à des types cellulaires spécifiques. De plus, nous avons constaté que l'expression de KRAS au stade adulte est détectable à la membrane cellulaire et dans le cytoplasme, et que cette répartition subcellulaire diffère selon les types cellulaires.

Dans un deuxième temps, des modèles murins déficients en KRAS4A ou en KRAS4B (*Kras4A*$^{-/-}$ et *Kras4B*$^{-/-}$) ont été générés et caractérisés, afin de comparer les phénotypes présents dans ces modèles à ceux présents dans un modèle déficient en KRAS (*Kras*$^{-/-}$). Cette analyse a mis en évidence, chez les embryons *Kras*$^{-/-}$, une létalité *in utero* à E15,5 liée à des anomalies placentaires et cardiaques, tout comme cela a été montré chez les embryons *Kras4B*$^{-/-}$ (à l'exception du phénotype cardiaque présent à une fréquence plus faible). Les embryons *Kras4A*$^{-/-}$ ne présentaient, quant à eux, aucune létalité ou anomalie du développement.

En conclusion, le travail mené lors de cette thèse a permis de révéler une dynamique inattendue dans l'expression développementale, tissulaire, cellulaire et subcellulaire de KRAS. Bien que KRAS soit largement exprimée au cours du développement embryonnaire, cette protéine joue un rôle critique dans le développement placentaire et cardiaque. De plus, KRAS4B est l'isoforme jouant un rôle majeur dans ces processus.

Abréviations

4OHT	Hydroxytamoxifène (4-hydroxytamoxifène)
CAAX	C représente la cystéine, A tout résidu aliphatique et X tout résidu non-chargé
CDC42	*Cell division control protein 42 homolog*
COSMIC	*The Catalog of Somatic Mutations in Cancer*
CRC	Cancer colorectal (*Colorectal cancer*)
Cre	Cre recombinase
DLK	*Dual leucine zipper kinase*
DOCK	*Dedicator of cytokinesis*
EGF	Facteur de croissance épidermique *(Epidermal growth factor)*
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique *(Epidermal growth factor receptor)*
Ela	Élastase
ELMO	*Engulfment and cell motility*
ERK	*Extracellular signal regulated kinase*
FAK	*Focal adhesion kinase*
FT	Farnesyl transférase
GAP	*GTPase activating protein*
G-CSF	*Granuocyte-colony-stimulating factor*
GEF	*Guanine exchange factor*
GRB2	*Growth factor receptor bound protein 2*
HRAS	*Harvey rat sarcoma*
ICMT	Isoprénylcystéine carboxyl-méthyltransférase
JAK2	*Janus kinase 2*
JNK	*Jun amino-terminal kinases*
kDa	Kilodalton
KRAS	*Kirsten rat sarcoma*
LSL	LoxP-STOP-LoxP
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MAPKK	*Mitogen-activated protein kinase kinase*
MAPKKK	*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*
MAPKKKK	*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase*
MEF	*Mouse embryonic fibroblastes*
MEK	*Mitogen-activated protein kinase kinase*
MLK	*Mixed lineage kinase*
mTOR	*Mammalian target of rapamycin*
NF1	Neurofibrine 1
NRAS	*Neuroblastoma rat sarcoma*
NSCLC	Cancer du poumon non à petites cellules *(Non small cell lung carcinoma)*

P48	Protéine de 48 kDa
PanIN	Néoplasies intraépithéliales pancréatiques
PAT	Palmitoyltransférase
PDAC	Adénocarcinome canalaire pancréatique *(Pancreatic ductal adenocarcinoma)*
PDE d	Phosphodiestérase-δ
PDK1	Kinase 1 dépendante du phosphoinositide
Pdx1	*Pancreatic and duodenal homeobox 1*
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKC	Protéine kinase C
PKG2	Protéine kinase dépendante du GMPc 2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PTB	*Phosphotyrosine binding*
RAC	*Ras-related C3 botulinum toxin substrat*
RAF	*Rapidly accelerated fibrosarcoma*
RAL	*RAS-like protein*
RalGDS	*Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*
RAS	*Rat Sarcoma*
RBD	*RAS binding domain*
RCE1	Enzyme de conversion des RAS (*RAS converting enzyme 1*)
RE	Réticulum endoplasmique
RHO	*RAS homologous*
RHV	Région hypervariable
RTK	Récepteurs à tyrosine kinase
RT-qPCR	*Real time – quantitative polymerase chain reaction*
SAP	*Stress-activated protein kinases*
SH2	*Src homology 2*
SOS	*Son of sevenless*
TBK1	*TANK binding 1*
TIAM 1	*T-cell lymphoma invasion and metastasis 1*
TNF	*Tumor necrosis factor*

Introduction

1. De la découverte des protéines RAS virales à la découverte de KRAS

L'histoire de la découverte du gène humain *KRAS* découle de la découverte des oncogènes viraux du sarcome du rat (*Ras*, de l'anglais *Rat sarcoma*).

Cette histoire débute dans les années soixante lorsque J.J. Harvey isole un rétrovirus transformant capable d'induire, rapidement, le développement de sarcomes chez le rat. Ce rétrovirus a été nommé *Harvey-Murine Sarcoma Virus* (Harvey, 1964). Lors de la caractérisation de celui-ci, il été mis en évidence que la capacité de transformation de ce dernier était le résultat de la recombinaison d'un génome rétroviral et d'un gène murin, nommé *Harvey Ras* (*Hras*) (Harvey, 1964). Quelques années plus tard, en 1967, un autre rétrovirus capable, lui, d'induire une érythroblastose ainsi que des sarcomes chez le rat, a été isolé et appelé *Kirsten-Murine Sarcoma Virus* (Kirsten & Mayer, 1967). Ce virus oncogène a été identifié comme étant le résultat de la recombinaison d'un génome rétroviral et d'un gène murin, appelé *Kirsten Ras (Kras)*, apparenté mais différent du gène *Hras* (Scolnick, 1981).

Une vingtaine d'années après la découverte initiale de Harvey, des homologues mammaliens des *Ras* viraux ont été découverts (Langbeheim et al., 1980). A la suite de cela, des homologues humains ont été isolés à partir de lignées cellulaires cancéreuses. Le premier homologue à avoir été isolé est l'homologue humain du gène viral *Hras.* Cet homologue, localisé sur le bras court du chromosome 11, a été appelé *HRAS* et a été isolé à partir d'une lignée cellulaire humaine de cancer de la vessie (de Martinville et al., 1983 ; Der et al., 1982 ; Parada et al., 1982). Rapidement, un deuxième homologue humain a été découvert. Cet homologue a été nommé *KRAS* et est lui, situé sur le bras court du chromosome 12 (Sakaguchi et al., 1983). Le dernier homologue humain identifié est localisé sur le bras court du chromosome 1 et a été nommé *NRAS,* en raison du fait qu'il a été isolé à partir de cellules provenant d'un neuroblastome humain (Hall et al., 1983). Ces homologues codent pour des protéines de 21 kilodaltons (kDa) et sont capables de lier des nucléotides de guanine (Chang, Furth, et al., 1982 ; Chang, Gonda, et al., 1982 ; Kirsten et al., 1970 ; McBride et al., 1983 ; Shimizu et al., 1983). Ces trois gènes humains ont été regroupés dans une famille de gènes appelée *RAS*.

Avec cette courte explication de la découverte des gènes *RAS*, nous pouvons nous rendre compte que, initialement, le nom *Ras* était utilisé pour désigner des gènes viraux transduits du génome murin et responsables de la propriété fortement oncogénique des virus tumoraux. Or, actuellement, le terme *RAS* désigne une famille de gènes composé de trois oncogènes retrouvés fréquemment mutés dans de nombreux cancers chez l'Homme. Ces trois gènes sont *HRAS*, *NRAS*, et *KRAS*, notre gène d'intérêt dans cette thèse.

Depuis la découverte des gènes *RAS* et de leur caractère oncogène (Reddy et al., 1982 ; Tabin et al., 1982 ; Taparowsky et al., 1982), la famille *RAS* a été au centre de l'attention de nombreux groupes de recherche. Une recherche intensive sur la structure, la biochimie et la biologie des protéines RAS, dont la protéine KRAS, a eu lieu… et se poursuit encore intensivement aujourd'hui.

Les chapitres suivants de cette introduction tenteront de résumer les principaux résultats des différentes recherches menées sur KRAS.

2. La structure génétique et protéique de KRAS

2.1.Le gène *KRAS*

Tout d'abord, il est important de savoir que le gène *KRAS* est un gène présentant un haut degré de conservation entre de nombreuses espèces, telles que les primates, les rongeurs, les levures (*Saccharomyces Cerevisiae, Schyzosaccharomyces Pombe*), ou les invertébrés (*Drosophila Melanogaster, Caenorhabditis Elegans*)(Ellis et al., 1983 ; Fukui, Kaziro, et al., 1986 ; Gallwitz et al., 1983 ; Greenwald & Broach, 1990).

Cette forte conservation dans la séquence du locus de *KRAS* a été mis en évidence dans une étude dans laquelle les auteurs ont comparé les séquences nucléotidiques des gènes *RAS* humains (dont *KRAS)* aux régions nucléotidiques correspondantes d'autres espèces de mammifères (Watzinger et al., 1998). De plus, les quelques variations existantes entre ces séquences nucléotidiques sont sans effet sur la séquence en acides aminés de la protéine KRAS. Cette observation est également valable pour les autres protéines RAS. Ces résultats montrent donc l'existence d'une forte pression évolutive sur la séquence en acides aminés de notre protéine d'intérêt, et des protéines RAS, en général.

Comme mentionné ci-avant, le locus génétique de *KRAS* est localisé sur le bras court du chromosome 12, plus précisément en position 12p12.1 (**Figure 1A**) (Sakaguchi et al., 1983). Par ailleurs, le gène *KRAS* partage une forte homologie de séquence avec les autres membres de la famille *RAS* (*HRAS* et *NRAS*). L'ensemble des gènes de cette famille possède une région promotrice contenant de multiples boites GC (G faisant référence à la guanine et C à la cytosine), sans boite TATA (où T signifie thymine, et A adénine) ou CCAT, des caractéristiques semblables aux promoteurs de gènes domestiques (gènes qui assurent les fonctions indispensables à la vie de tous les types cellulaires) (Lowndes et al., 1989). De plus, l'ensemble des gènes de cette famille sont composés de quatre exons codants mais différent fortement dans leur longueur, en raison de grandes différences dans la taille de leurs introns (allant de 6 kilobases (kb) à 50 kb).

Le gène *KRAS* a la particularité d'avoir un double quatrième exon codant dans son locus (**Figure 1B**). Ces deux exons, nommés exon 4A et exon 4B, contiennent

la séquence codant pour la partie carboxy-terminale (C-terminale) de la protéine et permettent de générer deux isoformes différentes par l'épissage alternatif du quatrième exon (Karnoub & Weinberg, 2008). Les deux isoformes d'épissage ainsi générées sont nommées KRAS4A et KRAS4B, en référence au quatrième exon utilisé lors de la transcription. Ces deux isoformes se différencient donc par leur partie C-terminale et sont constituées de 189 (KRAS4A) et 188 (KRAS4B) acides aminés (aa), après la traduction de leur ARNm.

Concernant les spécificités d'expression de *KRAS4A* et de *KRAS4B*, il a été mis en évidence, par une étude quantifiant l'ARNm des deux isoformes par RT-qPCR (de l'anglais *real time – quantitative polymerase chain reaction,* réaction en chaine par polymérase quantitative en temps réel), que l'ARNm *KRAS4B* est le variant d'épissage de *KRAS* le plus exprimé (Tsai et al., 2015).

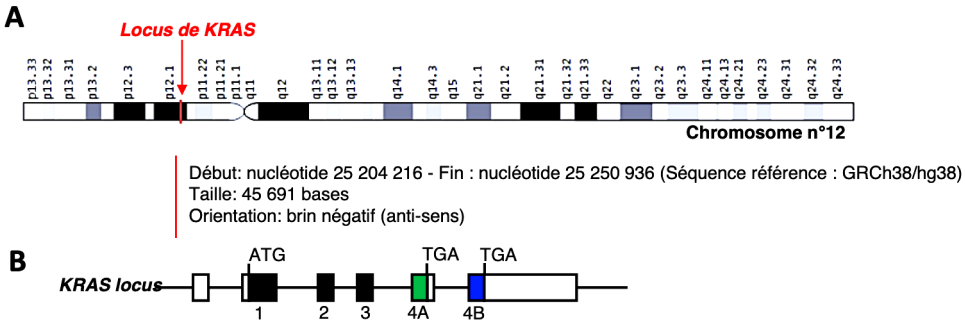


Figure 1: **Structure génétique de *KRAS***. (**A**) Illustration du chromosome 12 humain. La localisation du locus de *KRAS* est représentée par un trait rouge en position p12.1 (adapté de https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KRAS). (**B**) Représentation de la structure génomique de *KRAS* par des boites blanches (séquences transcrites non-codantes) et des boites noires (séquences codantes). Les exons 4A et 4B sont représentés par une boite verte et une boite bleue, respectivement.

2.2.La structure protéique de KRAS

La protéine KRAS, considérée de manière générale, est composée de quatre régions formant deux domaines (**Figure 2A**). La première région correspond aux 86 premiers aa amino-terminaux (région N-terminale ; 100% d'homologie avec HRAS et NRAS) et la seconde aux 80 aa suivants (78% de conservation avec les autres RAS). Ces deux régions forment le domaine G qui représente le domaine catalytique de KRAS. La troisième région consiste, quant à elle, au reste de la séquence en aa, à l'exception des quatre derniers aa qui forment la quatrième région. Ces quatre aa forment le motif CAAX C-terminal (où C représente la cystéine, A tout résidu aliphatique et X tout résidu non-chargé). Ces deux dernières régions protéiques forment le deuxième domaine de la protéine, appelé région hypervariable (RHV). Il

est à spécifier que cette RHV est spécifique à chaque protéine RAS, car cette région ne possède qu'un degré de conservation de 8% entre les différentes protéines RAS.

De manière plus détaillée, le domaine G de KRAS (aa 1 à 165), qui constitue la base de la fonction GTPase de cette protéine, est semblable à un pli de Rossmann, un motif structurel protéique présent dans les protéines qui lient les nucléotides ; il est composé d'une structure contenant 6 feuillets β et 5 hélices α, séparés par 10 boucles. De plus, il est formé de deux lobes : un lobe effecteur, compris entre les résidus 1 et 86, et le lobe allostérique, compris entre les résidus 87 et 165 (Lu et al., 2016). Plus précisément, le domaine G est constitué de trois régions, nommé interrupteur I (communément appelé *switch I*), interrupteur II (*switch II*), et la boucle P (*loop-P*). Ces régions permettent la liaison des nucléotides de guanine et forment l'interface de liaison pour les protéines effectrices ou régulatrices. La RHV de KRAS (résidus 165 à 188 ou 189), quant à elle, représente une structure C-terminale flexible contenant le motif CAAX qui permet l'ancrage membranaire de la protéine. Les deux isoformes de KRAS, KRAS4A et KRAS4B, sont différenciées par leur RHV et, également, par les modifications post-traductionnelles que subit cette région (Ahearn et al., 2018).

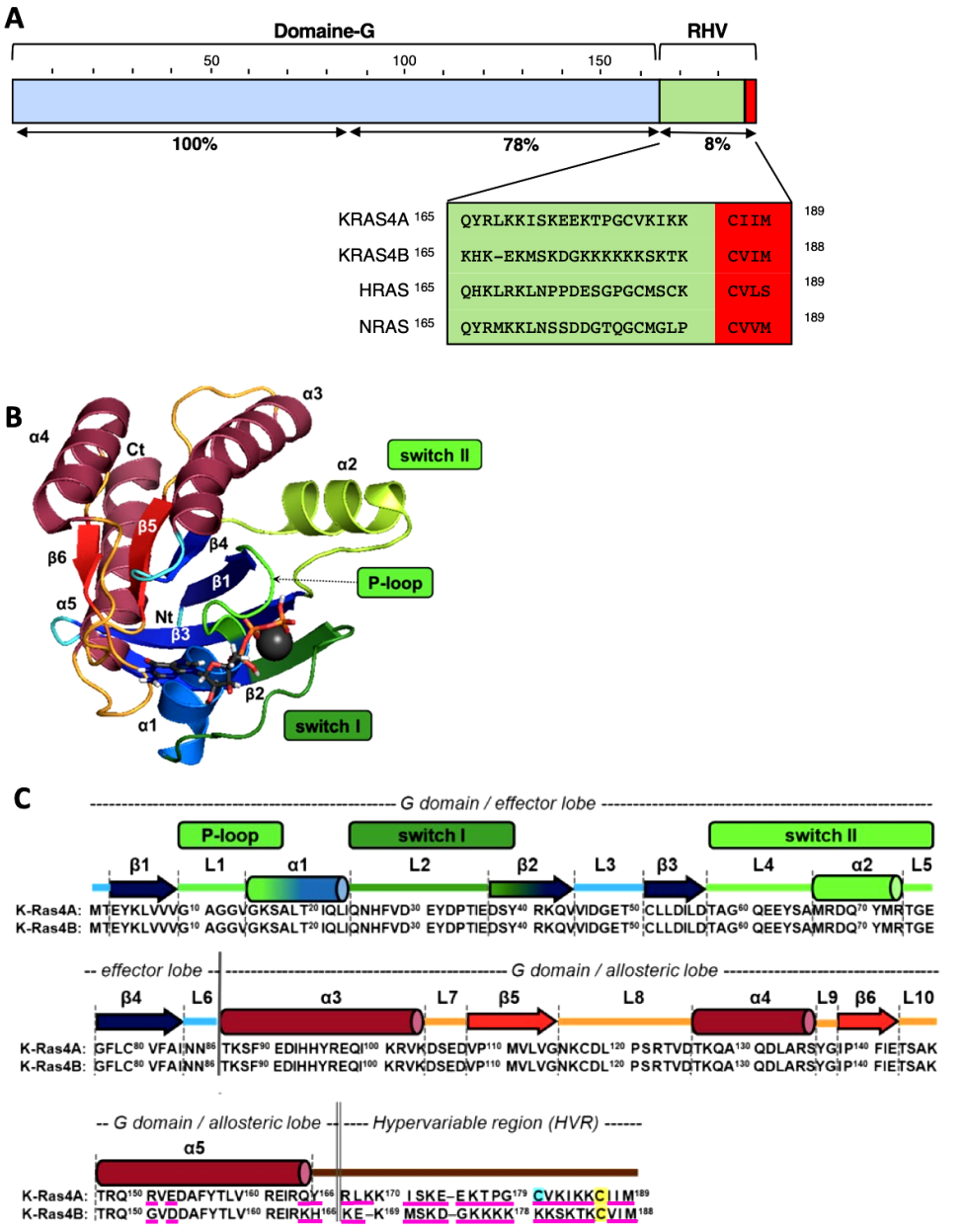


Figure 2. Structure protéique de KRAS. (**A**) Structure générale de KRAS et degré d'homologie (%) avec les autres membres de la famille RAS, HRAS et NRAS. La boite bleue représente le domaine G de la protéine et est constituée des deux premières régions de la protéine. La boite verte et rouge représentent la région hypervariable de la protéine (RHV). Il est à noter que la boite rouge représente plus particulièrement le motif CAAX (où C signifie

cystéine, A tout résidu aliphatique et X tout résidu non chargé). (**B**) Structure 3D de KRAS (adapté de (Pálfy et al., 2020)). (**C**) Alignement de la séquence en aa de KRAS4A et KRAS4B. Les résidus qui différent entre les deux isoformes sont soulignés en rose. Les éléments structuraux secondaires, ainsi que les régions de la boucle P (*P-loop*), de l'interrupteur I (*switch I*) et de l'interrupteur II (*switch II*) sont indiqués au-dessus de la séquence colorée de la même manière que dans **B**. Le domaine G (lobes effecteur et allostérique) et la RHV sont également indiqués.

2.3. Les modifications post-traductionnelles régulant KRAS

De manière générale, la RHV de KRAS4A et KRAS4B est farnésylée, protéolysée et carboxyméthylée. KRAS4A est, en plus, palmitoylée étant donné qu'elle ne possède pas, comme KRAS4B, une région polybasique riche en lysine (^{175}KKKKKK^{180}) facilitant l'ancrage à la membrane plasmique (**Figure 3A**) (Ahearn et al., 2018 ; Chakrabarti et al., 2016).

Ces modifications post-traductionnelles s'acquièrent de manière séquentielle (**Figure 3B**) (Haidar & Jacquemin, 2021). La première étape consiste à une lipidation par la farnésyl transférase (FT). Pour induire cette modification, la FT utilise la cystéine du motif CAAX de KRAS comme substrat, et catalyse l'ajout d'un groupe farnésyl (chaine linéaire à 15 carbones) par une liaison thioéther stable sur celle-ci. Cette première modification post-traductionnelle augmente légèrement l'affinité de KRAS pour les membranes. Cependant, cette affinité n'est pas suffisante pour permettre l'ancrage à la membrane, mais permet toutefois à KRAS de se déplacer vers la surface du réticulum endoplasmique (RE) où l'étape suivante de ses modifications a lieu. La localisation de KRAS au RE va permettre à la protéine d'interagir avec l'enzyme de conversion des RAS (communément appelée RCE1, de l'anglais *RAS-converting enzyme 1*). Il s'en suit une protéolyse catalysée par RCE1 qui entraîne le clivage des aa AAX liées à la cystéine. La deuxième étape consiste donc à générer une nouvelle extrémité C-terminale caractérisée par la présence d'une farnésyl-cystéine (Manolaridis et al., 2013). Ensuite, cette farnsésyl-cystéine subit une méthyl-estérification de son groupe carboxyle par l'enzyme isoprénylcystéine carboxyl-méthyltransférase (ICMT). Cette étape a pour conséquence une méthylation de KRAS qui permet d'augmenter son affinité membranaire. La neutralisation de la charge négative par la méthylation a pour conséquence de diminuer la répulsion entre la membrane plasmique et KRAS (Hancock et al., 1991). Il est à noter que la méthylation du carboxyle par ICMT est la seule réaction de transformation du CAAX qui est réversible (Hancock et al., 1991). Par conséquent, les modifications post-traductionnelles que subit le motif CAAX de KRAS ont pour objectif de remodeler la région hydrophile de l'extrémité C-terminale afin de la rendre plus hydrophobe. L'hydrophobicité nouvellement créée va permettre de faciliter l'insertion de KRAS à la membrane plasmique, localisation importante pour son activité biologique.

Cependant, pour permettre un adressage efficace à la membrane plasmique, un « second signal » au sein de la RHV est nécessaire. Ce « second signal » est différent selon que l'on considère KRAS4A ou KRAS4B. Dans le cas de KRAS4A, le second signal est une palmitoylation induite par la palmitoyltransférase (PAT) au niveau de l'appareil de golgi. Cette enzyme catalyse l'ajout d'un palmitoyle sur le résidu cystéine 180 de KRAS4A par une liaison thioester (Schroeder et al., 1997). Dans le cas de KRAS4B, le « second signal » est donné par la région polybasique C-terminale, formée de huit résidus lysines de l'isoforme 4B. Ces résidus chargés positivement vont favoriser l'interaction de KRAS4B avec la membrane plasmique, car une liaison électrostatique se forme entre les charges positives et les têtes de phospholipides chargées négativement (Silvius et al., 2006). Il est à noter que la RHV de KRAS4A est également chargée positivement ; cependant, la charge positive n'est pas aussi importante que celle présente dans l'isoforme KRAS4B (Chakrabarti et al., 2016). Cette différence est due au fait que les lysines présentes dans la séquence en aa de KRAS4B sont presque continues, tandis qu'elles ne le sont pas dans la séquence en aa de KRAS4A. Ces lysines sont également moins nombreuses dans la séquence protéique de l'isoforme 4A (Tsai et al., 2015). De plus, l'isoforme 4B interagit avec l'enzyme phosphodiestérase-δ (PDEδ), une navette membranaire favorisant sa translocation à la membrane plasmique (Dharmaiah et al., 2016 ; Klein et al., 2019).

En résumé, les RHV des deux isoformes de KRAS subissent des modifications post-traductionnelles différentes permettant leur adressage à la membrane plasmique. KRAS4A est farnésylée et palmitoylée, tandis que KRAS4B est seulement farnésylée car elle possède une région riche en lysines (**Figure 3**).

En plus des modifications post-traductionnelles permettant l'adressage des deux isoformes de KRAS à la membrane plasmique, KRAS4B peut subir une phosphorylation des résidus tyrosine 32, tyrosine 64 et sérine 181 (**Figure 3A**). Il a été mis en évidence que la phosphorylation de la sérine 181, qui se trouve dans la région polybasique de KRAS4B et qui est médiée par la protéine kinase C (PKC) ou la protéine kinase dépendante du GMPc 2 (PKG2), induit une diminution de l'affinité de l'isoforme pour la membrane plasmique (Bivona et al., 2006 ; Jang et al., 2015). Cette phosphorylation semble neutraliser partiellement les charges positives des résidus lysine, favorisant la dissociation de KRAS4B de la membrane plasmique (Cho et al., 2016).

En comparaison avec les autres membres de la famille RAS (HRAS et NRAS), seule KRAS4B n'est pas palmitoylée. Les protéines KRAS4A, HRAS et NRAS subissent une palmitoylation qui leur confèrent une affinité 100 fois plus élevée pour la membrane plasmique comparé à la protéine farnésylée seule (Shahinian & Silvius, 1995). Ainsi, la séquence de la RHV et le statut de palmitoylation des protéines RAS régissent la préférence de ces dernières pour les membranes plasmiques (Eisenberg et al., 2013). Par exemple, il a été démontré que la RHV de KRAS4B, chargée positivement, favorise l'ancrage dans des membranes acides désordonnées, ce qui

n'est pas le cas de HRAS ou de NRAS (Chavan et al., 2015 ; Nussinov et al., 2019). La composition des membranes est donc un facteur important dans la signalisation spécifique des RAS. Les isoformes RAS peuvent également être ubiquitinylées de manière différentielles, ce qui peut affecter leur statut de fixation à la membrane (Ahearn et al., 2018 ; Dohlman & Campbell, 2019 ; Sasaki et al., 2011).

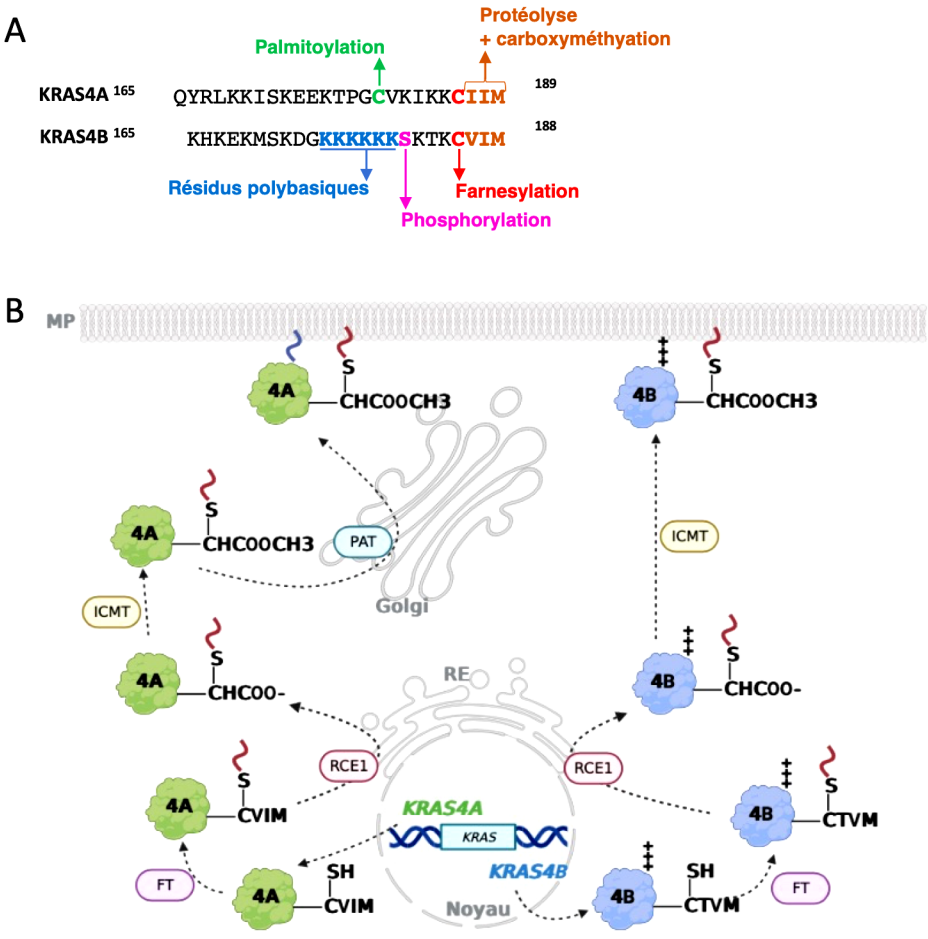


Figure 3. Modifications post-traductionnelles de KRAS4A et KRAS4B. (**A**) Représentation de la séquence carboxy-terminale des deux isoformes d'épissage de KRAS, KRAS4A et KRAS4B, et de leurs modifications post-traductionnelles. (**B**) Illustration des étapes d'acquisition des modifications. La protéine KRAS4A est représentée en vert et la protéine KRAS4B en bleu. Le lipide rouge représente le farnésyl, le lipide bleu représente le palmitoyle et les quatre charges positives sur KRAS4B représentent le site polybasique. FT, farnésyl transférase ; RCE1, enzyme 1 de conversion des RAS (*RAS-converting enzyme 1*) ; ICM, isoprénylcystéine carboxyl-méthyltransférase ; PAT, palmitoyltransférase. (généré avec BioRender)

3. Voies de signalisation liées à la protéine KRAS

3.1.Effecteurs en amont de KRAS

La voie de signalisation de KRAS débute lorsqu'un ligand se lie à un récepteur localisé à la membrane cellulaire. Les récepteurs capables de mener à l'activation de KRAS sont les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) (par exemple, le récepteur du facteur de croissance épidermique, EGFR, *epidermal growth factor receptor*), les récepteurs de cytokines (par exemple, le récepteur de l'interleukine-2 (IL-2)) et les sous-unités β des protéines G hétérotrimériques (Crespo et al., 1994).

3.1.1. Les récepteurs à tyrosines kinases

Les récepteurs RTK (à l'exception du récepteur à l'insuline) sont des monomères localisés à la membrane plasmique. La liaison du ligand à son récepteur, par exemple la liaison du facteur de croissance épidermique (EGF, *epidermal growth factor*) au EGFR, induit la dimérisation de ce dernier, ce qui active l'autophosphorylation des domaines cytoplasmiques du récepteur (**Figure 4**) (Jiang & Hunter, 1999 ; Lemmon & Schlessinger, 1994 ; Schlessinger, 2000). Il est à noter que le processus induisant la dimérisation du récepteur est spécifique à chaque type de ligand-récepteur.

L'autophosphorylation des tyrosines des domaines cytoplasmiques du récepteur induit le recrutement à la membrane plasmique de nombreuses protéines de signalisation via les sites de liaison SH2 (de l'anglais, *src homology 2*) ou PTB (de l'anglais, *phosphotyrosine binding*). Une protéine intéressante, dans le cadre de la voie de signalisation de KRAS et pouvant se lier au domaine SH2, est la protéine adaptatrice GRB2 (de l'anglais, *growth factor receptor bound protein 2*) (**Figure 4**). Le complexe que forme GRB2 avec le RTK va permettre la translocation de la protéine SOS (de l'anglais, *son of sevenless*) à la membrane plasmique, rapprochant cette dernière de la protéine KRAS qui est ancrée à la membrane plasmique. SOS, facteur d'échange de guanine, va pouvoir, lorsqu'elle est localisée à la membrane plasmique, induire le déplacement du GDP lié à KRAS, permettant ainsi la liaison de KRAS au GTP et son activation (**Figure 4**) (Lemmon & Schlessinger, 1994, 2010 ; Rozakis-Adcock et al., 1995 ; Schlessinger, 2000).

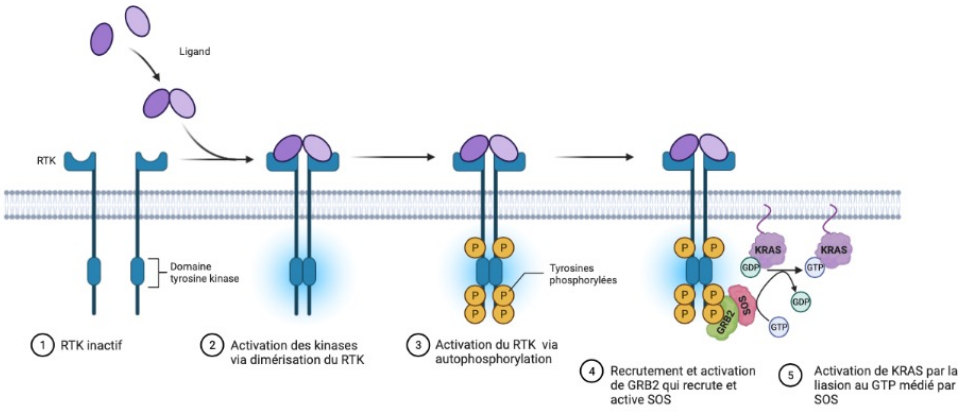


Figure 4. Activation de KRAS par les récepteurs tyrosines kinases (RTK). P, phosphate; GRB2, *growth factor receptor bound protein 2*; SOS, *son of sevenless*; GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate (généré avec BioRender).

3.1.2. Les récepteurs à cytokines

Lorsqu'une cytokine se lie à son récepteur localisé à la membrane plasmique, cela induit l'activation de la Janus kinase 2 (JAK2). JAK2 activée va phosphoryler les résidus tyrosines présents dans le domaine cytoplasmique du récepteur et serviront de site d'accueil pour les protéines adaptatrice. GRB2 peut donc se lier au récepteur phosphorylé, entrainant la translocation de SOS à la membrane plasmique, et donc, l'échange de GDP sur la protéine KRAS (**Figure5)** (Winston & Hunter, 1996).

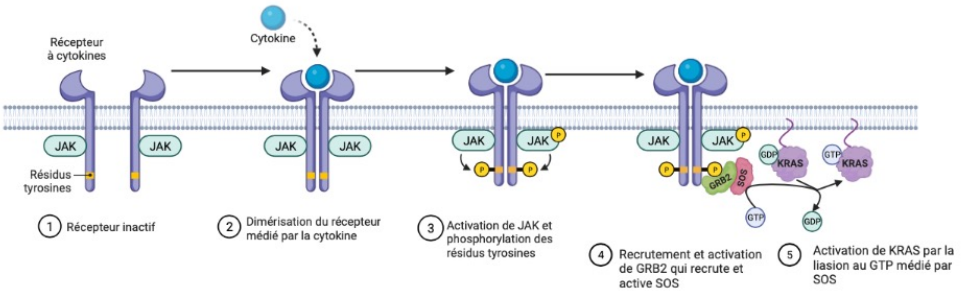


Figure 5. Activation de KRAS par les récepteurs de cytokines. JAK, janus kinase; P, phosphate; GRB2, *growth factor receptor bound protein 2*; SOS, *son of sevenless*; GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate (généré avec BioRender).

3.1.3. Les sous-unités β des protéines G hétérotrimériques

Concernant les récepteurs couplés aux protéines G, ils sont capables d'activer KRAS par l'intermédiaire de l'activation de protéine tyrosine kinase. Ces tyrosines kinases, après activation, permettront la translocation de SOS à la membrane via le recrutement des protéines adaptatrice, telle que GRB2 (D. K. Saini et al., 2009).

3.2.Réaction catalysée par KRAS

La réaction induite par KRAS, petite GTPase, est donc initiée par la liaison d'un ligand à son récepteur. KRAS agit comme un interrupteur moléculaire et existe sous deux états conformationnels : un état actif, lorsque la protéine est liée à un GTP (que l'on peut assimiler à un interrupteur en position « *ON* »), et un état inactif, lorsqu'elle est liée à un GDP (que l'on peut assimiler à un interrupteur en position « *OFF* ») (Barbacid, 1987 ; Lowy & Willumsen, 1993).

Lorsque KRAS est dans un état conformationnel actif, liée au GTP, les deux régions interrupteurs (pour rappel, régions également appelées *switches*) de sa structure protéique sont dans une conformation fermée. Cette conformation expose les résidus de l'interface du domaine de liaison à RAS (RBD, de l'anglais *RAS binding domain*) (Gasper & Wittinghofer, 2019 ; Spoerner et al., 2001 ; Vetter & Wittinghofer, 2001), permettant une interaction avec les effecteurs en aval, incluant par exemple RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase**)**, RalGDS (*Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*) et PLC (phospholipase C) (Hobbs et al., 2016). Lorsque le phosphate du GTP est hydrolysé, KRAS, alors liée au GDP, agit comme un ressort libérant les régions interrupteurs I et II (*switch I et II*) dans une conformation ouverte (**Figure 6A**).

Bien que KRAS possède une activité GTPase intrinsèque, le cycle actif/inactif doit être assisté par d'autres protéines car cette activité intrinsèque est trop faible pour être significative. Pour contrer ce problème, des protéines activatrices de GTPase (GAP, de l'anglais *GTPase activating protein*) peuvent multiplier l'hydrolyse par 100.000, augmentant ainsi de manière significative la vitesse d'hydrolyse du GTP et donc l'inactivation de KRAS. Les facteurs d'échange de la guanine (GEF, de l'anglais *guanine exchange factor*) favorisent, quant à eux, la fixation du GTP en diminuant l'affinité de KRAS pour le GDP fixé et en catalysant son remplacement par le GTP. Les protéines GAPs et GEFs sont donc des protéines indissociables de la bonne activité de KRAS (**Figure 6B**) (Jančík et al., 2010 ; Rajalingam et al., 2007).

En conclusion, l'activation de KRAS par un effecteur positionné en amont permet la liaison de KRAS au GTP, induisant alors un changement de sa conformation permettant la liaison et l'activation d'effecteurs en aval.

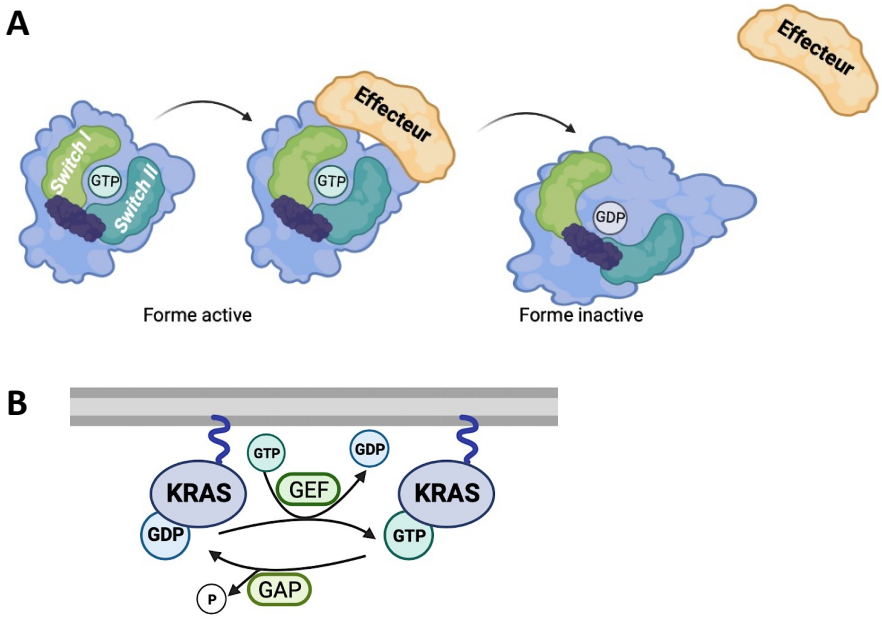


Figure 6. Réaction catalysée par KRAS. (**A**) Illustration du changement de conformation de KRAS. Lorsque KRAS est liée au GTP, les régions interrupteur I et II (*Switch* I et II) se rapprochent et permettent la liaison de l'effecteur. Lorsque la protéine est liée au GDP, les régions interrupteur I et II s'éloignent. (**B**) Schéma récapitulant la réaction catalysée par KRAS. GEF, *guanine exchange factor*; GAP, *GTPase activating protein*; GTP, guanosine triphosphate; GDP, guanosine diphosphate; P, phosphate. (généré avec BioRender)

3.3.Effecteurs en aval de KRAS

Lors de l'activation de KRAS, sa liaison avec les effecteurs en aval active de nombreuses voies de signalisation qui induisent de nombreux effets : suppression de l'apoptose, promotion de la croissance cellulaire, transformation cellulaire, angiogenèse, migration, différenciation, … Les deux « grandes » voies de signalisation activées par KRAS sont les voies des protéines kinases activées par l'action mitogène, et la voie de signalisation du phosphoinositide 3-kinase.

3.3.1. Les voies de signalisation des protéines kinases activées par l'action mitogène

La voie de signalisation des protéines kinases activées par l'action mitogène, plus communément appelée MAPK (de l'anglais, *mitogen-activated protein kinase*) (**Figure 7**), est une voie composée de protéines kinases induites par différents stimuli et activées séquentiellement par phosphorylation. L'initiation de cette voie peut se

faire suite à la liaison de KRAS au GTP qui induit l'activation d'une MAPK kinase kinase kinase (MAPKKKK) qui, elle-même active une MAPK kinase kinase (MAPKKK), qui elle-même active une MAPK kinase (MAPKK) qui finalement active une MAPK spécifique qui induit une réponse biologique. Cette voie s'active donc, en cascade, par des phosphorylations séquentielles (Cuevas et al., 2007). Il existe trois grandes familles de MAPK : les protéine ERKs (*extracellular-signal-regulated kinase*), les JNKs (*jun amino-terminal kinases*) et les p38/SAP (*stress-activated protein kinases*).

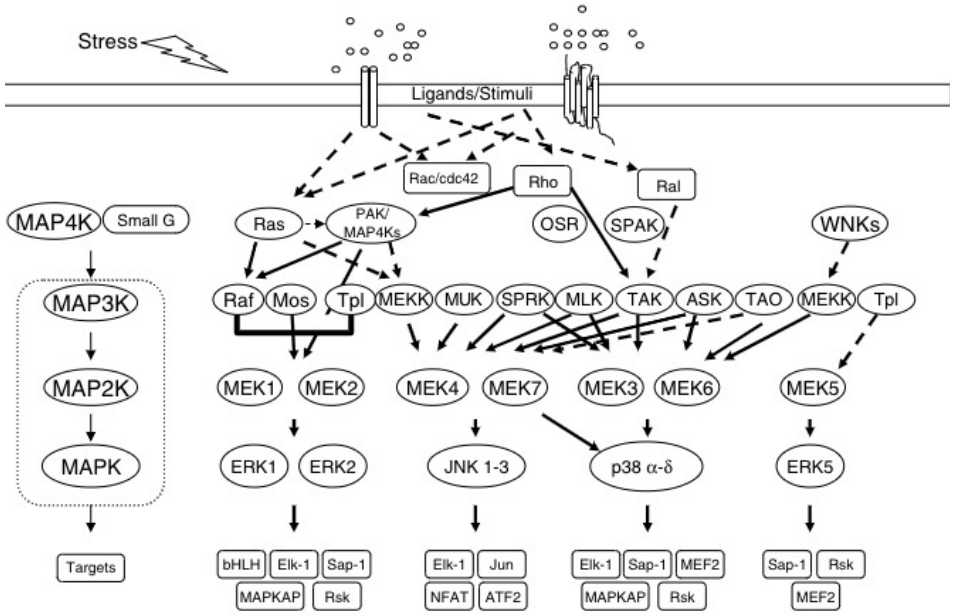


Figure 7. Voie de signalisation MAPK. Schéma illustrant les trois grande voies MAPK (Raman et al., 2007)

3.3.1.1. La voie MAPK-ERK

La voie MAPK-ERK est aussi appelée RAF-MEK-ERK. Lorsque KRAS est activée par des facteurs de croissance (tel que l'EGF), elle peut recruter à la membrane plasmique une des trois protéines kinases spécifiques de la sérine/thréonine, plus communément appelée RAF (A-RAF, B-RAF et C-RAF). Ce recrutement induit un changement de conformation de RAF promouvant sa dimérisation (homologue ou hétérologue) et donc, son activation (Lavoie & Therrien, 2015 ; Terrell & Morrison, 2019). Le domaine catalytique de RAF, qui est alors activé, va se lier à MEK1/2 (de l'anglais, *mitogen-activated protein kinase kinase*) et l'activer par phosphorylation. MEK1/2 va à son tour phosphoryler, et donc activer ERK1/2 qui va se transloquer au noyau cellulaire et qui à son tour va

phosphoryler (et activer) de multiples protéines induisant la croissance et la différenciation cellulaire (McKay & Morrison, 2007 ; Shaul & Seger, 2007).

En quelques mots, KRAS activée active RAF qui phosphoryle et active MEK, qui à son tour phosphoryle et active ERK.

3.3.1.2. La voie MAPK-JNK

La voie JNK est la voie des MAPK activée de manière générale par des stress environnementaux (tels que les rayons ultraviolets, le stress oxydatif et les dommages à l'ADN), par des cytokines inflammatoires et par des facteurs de croissance (G. L. Johnson & Nakamura, 2007).

Dans le contexte des effecteurs en aval de KRAS, cette voie est initiée, par exemple, avec l'activation de KRAS par des cytokines pro-inflammatoires (tel que l'IL-2) ou des ultraviolets activant des récepteurs tyrosines kinases (par exemple : le récepteur à l'EGF, à l'interleukine 1 et au TNF (*tumor necrosis factor*) (Rosette & Karin, 1996)). KRAS activée permet l'activation indirecte de petites GTPases de la famille RHO (*RAS homologous*), tel que CDC42 (*cell division control protein 42 homolog*) et RAC (*RAS-related C3 botulinum toxin substrate*). KRAS active TIAM-1 et FAK (*focal adhesion kinase*) ce qui permet l'activation de ELMO, un partenaire de DOCK1, une protéine GEF capable d'activer RAC et CDC42 (Maldonado et al., 2020). Ces GTPases activent à leur tour les MAPKKK, MEKK1/4, MLK2/3 (*mixed lineage kinase*), et DLK (*dual leucine zipper kinase*). Les MAPKKK, à leur tour, activent MKK4 et MKK7 qui activent à leur tour JNK1/2/3. Cette voie joue un rôle important dans l'apoptose, l'inflammation, la production de cytokines, et le métabolisme (Dhanasekaran & Reddy, 2008 ; G. Huang et al., 2009 ; Rincón & Davis, 2009).

3.3.1.3. La voie MAPK-p38/SAP

La voie p38/SAP est la voie des MAPK activée de manière générale par les stress environnementaux et les cytokines inflammatoires, comme la voie JNK. Cependant, dans le contexte lié à KRAS, cette voie est activée par des facteurs de croissance activant des récepteurs tyrosines kinases (par exemple, l'activation du récepteur G-CSF (*granulocyte-colony-stimulating factor*) par son facteur de croissance (Loesch & Chen, 2008)). L'activation de KRAS permet l'initiation de la voie p38/SAP par l'intermédiaire de l'activation de RAC et CDC42, tout comme la voie JNK. La MAPK p38 est activé par les MAPKK MKK3 et MKK6 qui sont elles-mêmes activées par les MAPKKK MLK2/3, MEKK, ASK, TAK1 et TAO1/2. Lorsque p38 est activé, il peut activer des facteurs de transcription mais également d'autres kinases en aval, telles que MK2/3, PRAK, et MSK1/2. Cette voie joue un rôle très important dans l'inflammation, l'apoptose, la différenciation cellulaire et la régulation du cycle cellulaire (Cuadrado & Nebreda, 2010 ; Cuenda & Rousseau, 2007).

3.3.2. La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR

L'activation de KRAS permet également l'activation de la voie PI3K-AKT-mTOR. Cette voie de signalisation est connue pour jouer un rôle important dans les processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et le transport du glucose.

Lorsque KRAS est active, elle peut se lier à la sous-unité p110α de la PI3K qui est ainsi activée et va alors convertir le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3). Le PIP3 formé va activer la phosphorylation du résidu thréonine 308 de AKT par la kinase 1 dépendant du phosphoinositide (PDK1). Cependant pour avoir une activation complète d'AKT, le complexe mTOR (*mammalian target of rapamycin*) doit phosphoryler la sérine 473 de la protéine AKT (Kilic et al., 2017). AKT complétement activée va pouvoir alors se transloquer dans le noyau pour aller activer ou inhiber des voies en aval et réguler ainsi la prolifération, l'apoptose et le métabolisme cellulaire (Hoxhaj & Manning, 2020).

La protéine AKT lorsqu'elle est pleinement active peut aller, soit activer des protéines cibles du complexe mTOR (régulant la prolifération, la survie, le métabolisme, la synthèse des protéines, et la transcription), soit induire la séquestration de BAD (de l'anglais *BCL2 associated agonist of cell death,* protéine pro-apoptotique dite à « BH3 seulement ») par 14-3-3 (inhibition de l'apoptose par augmentation de la liaison de BAD à 14-3-3) (She et al., 2005).

3.3.3. Les autres voies de signalisation

KRAS, après sa liaison au GTP et donc son activation, peut elle-même activer RalGDS. RalGDS activé agit comme un échangeur GTP/GDP favorisant la conversion du GDP en GTP pour les protéines de type RAS (RAL, *RAS-like protein*) (Seger & Krebs, 1995). Les protéines RAL activées permettent d'activer les effecteurs suivants : la phospholipase D (PLD) qui est associée à l'endocytose, CDC42 associé à la migration cellulaire, et TANK binding 1 (TBK1) associé à l'immunité virale.

KRAS permet également l'activation de TIAM1 activant par la suite RAC1, associé à la migration, l'adhésion, et la formation du cytosquelette d'actine (Vigil et al., 2010). Finalement, un dernier effecteur connu de KRAS est le PLCε (Rhee, 2001).

En conclusion, ces différentes précisions sur les effecteurs en aval de KRAS nous montrent que les signaux médiés par cette protéine sont complexes et liés à de nombreux processus essentiels à la vie cellulaire.

4. Les fonctions de KRAS

Nous allons aborder ici la question des effets de l'activation de KRAS au niveau de la cellule ou de l'organisme, tant sur le plan physiologique que pathologique.

4.1.Les fonctions physiologiques de KRAS

Afin de comprendre les fonctions physiologiques de KRAS et des deux autres protéines de la famille RAS (HRAS et NRAS) chez l'Homme, les chercheurs ont utilisé différentes approches jouant sur le haut degré de conservation de ces gènes entre les espèces. Ces études ont permis de mettre en évidence que les gènes *RAS* sont requis pour la survie (Temeles et al., 1984) et l'accouplement des levures (Fukui, Kozasa, et al., 1986). Par la suite, des mutants *RAS* ont été étudiés chez des invertébrés, ce qui a permis de mettre en évidence le rôle de ces gènes dans le processus de développement de la vulve chez *Caenorhabditis elegans* (Han & Sternberg, 1990) et le développement des cellules photoréceptrices chez *Drosophila melanogaster* (Simon et al., 1991).

De plus, des études *in vitro* ont mis en évidence que les protéines RAS, dont KRAS, jouent un rôle crucial dans la prolifération. Ce rôle essentiel a été démontré par l'inhibition de la phase S du cycle cellulaire après injection d'anticorps inhibant RAS dans des cellules fibroblastiques de type 3T3 (Mulcahy et al., 1985). De même, il a été démontré que ces protéines jouaient un rôle essentiel dans la différenciation cellulaire, à savoir l'induction de la différenciation neuronale des cellules PC12 du phéochromocytome ou de la différenciation adipocytaire des cellules fibroblastiques 3T3-L1 (Bar-Sagi & Feramisco, 1985 ; Benito et al., 1991).

En outre, les protéines RAS sont également importantes pour la régulation de la migration cellulaire. Ce rôle a été montré par l'induction de l'expression du facteur de motilité autocrine (AMF, *autocrine mobility factor*) par RAS et par la régulation des protéines RHO, importants régulateurs de la migration cellulaire (Yamauchi et al., 2005). Il a également été démontré que ces protéines régulent le trafic vésiculaire via l'activation de la voie RAL (Hofer et al., 1994).

En résumé, KRAS est au centre de nombreux processus cellulaires importants, comme par exemple la prolifération et la différenciation cellulaire chez les mammifères (Bar-Sagi & Feramisco, 1985 ; Birchmeier et al., 1985 ; Noda et al., 1985). Le rôle essentiel de cette protéine dans des processus cellulaires clés apparaît encore plus important quand il est surexprimé ou inactivé.

4.2.Le rôle de KRAS dans le développement embryonnaire

Dès les années 90, des chercheurs ont essayé de comprendre le rôle de KRAS, non pas d'un point de vue cellulaire mais plutôt d'un point de vue de l'organisme. Pour cela, ils ont généré un modèle murin génétiquement modifié permettant d'inactiver l'expression de *Kras* (Johnson et al., 1997 ; Koera et al., 1997).

Ces études ont mis en évidence le rôle essentiel de *Kras* dans le développement embryonnaire chez la souris, étant donné que les embryons dépourvus de protéine KRAS ($Kras^{-/-}$) présentaient un grave défaut de croissance et mouraient *in utero* aux alentours du jour embryonnaire (E) 15,5 (Johnson et al., 1997 ; Koera et al., 1997). Une analyse plus poussée de ces embryons a démontré qu'ils étaient caractérisés par une anémie, un défaut de développement du foie fœtal (nommé dé-cellularisation par les auteurs) (Johnson et al., 1997), un défaut de développement dans les tissus neuronaux caractérisé par une forte mortalité cellulaire, et une atrophie du myocarde ventriculaire (Koera et al., 1997).

Comparativement à KRAS, les deux autres membres de la famille RAS ne sont pas essentiels au développement embryonnaire. Cette différence a été démontrée par la génération de modèles murins n'exprimant pas la protéine NRAS ($Nras^{-/-}$) ou HRAS ($Hras^{-/-}$) (Nakamura et al., 2008 ; Umanoff et al., 1995). Ces souris dépourvues de NRAS ou de HRAS présentaient une viabilité et une croissance normales (Umanoff et al., 1995). Cependant, il a été mis en évidence qu'il existait un chevauchement fonctionnel partiel entre KRAS, HRAS, et NRAS (Nakamura et al., 2008). Ainsi, il a été montré que les souris $Kras^{+/-}Nras^{-/-}$ meurent *in utero* ou rapidement après la naissance (au jour postnatal (P) 0 et P2), démontrant que la viabilité des souris $Nras^{-/-}$ est dépendante de l'expression normale de *Kras*. De plus, les souris $Hras^{-/-}Nras^{-/-}$ sont obtenues avec un ratio inférieur au ratio mendélien attendu, et présentaient un faible taux de fertilité. Ces informations suggèrent un chevauchement des fonctions des protéines HRAS et NRAS dans le développement, la croissance postnatale, et la fertilité (Esteban et al., 2001). De plus, les souris n'exprimant pas HRAS et NRAS présentent un défaut de maturation pulmonaire, suggérant que seule, l'expression de KRAS n'est pas suffisante pour un développement pulmonaire correct (Fuentes-Mateos et al., 2019). Finalement, une autre étude caractérisant des embryons $Hras^{-/-}Kras^{-/-}$ a mis en évidence que les embryons meurent *in utero* plus précocement que les embryons $Kras^{-/-}$ (Nakamura et al., 2008).

Par ailleurs, des souris modifiées génétiquement pour exprimer *Hras* sous le contrôle du promoteur de *Kras* dans des embryons $Kras^{-/-}$ (souris nommées $Kras^{(Hras)}$) ont montré que ces souris étaient obtenues dans le ratio mendélien attendu. Néanmoins, il s'est avéré que les souris $Kras^{(Hras)}$ souffraient d'hypertension artérielle et de cardiomyopathie lors de leur caractérisation (Potenza et al., 2005). Ces résultats mettent en lumière que HRAS peut remplacer fonctionnellement

KRAS lors du développement embryonnaire, mais également que KRAS joue un rôle critique dans le développement cardiaque.

Finalement, une équipe de chercheurs a modifié génétiquement une souris afin d'obtenir des allèles nuls pour le gène *Hras* et *Nras* et des allèles conditionnels d'inactivation pour le gène *Kras,* et a nommé son modèle *Hras*$^{-/-}$*Nras*$^{-/-}$*Kras*$^{flox/flox}$. Ce modèle, après croisement avec une souris exprimant la CreER de façon ubiquiste, et après traitement à l'hydroxytamoxifène (4-OHT), n'exprimera aucune protéine RAS et sera considéré comme « *RASless* ». Lorsque les RAS sont éliminées de manière systémique chez les souris adultes, ces dernières meurent rapidement de défaillance d'organes (Lechuga et al., 2021). Cependant, ce modèle murin a permis de réaliser une étude plus approfondie du rôle des RAS dans certains processus cellulaires grâce à la génération de fibroblastes embryonnaires murins (appelés couramment MEF, de l'anglais *mouse embryonic fibroblasts*). Les MEF générés seront considérés comme des MEF RASless après traitement au 4-OHT.

La caractérisation de ces MEF RASless a permis de mettre en évidence le rôle essentiel des protéines RAS dans le processus de prolifération et de migration des fibroblastes murins. En effet, lorsque les MEF sont dépourvus de RAS, ils entrent dans un état non-prolifératif (sans mortalité cellulaire) et deviennent incapables de migrer (Drosten et al., 2010). Cependant, cet état est réversible ; en effet, si on y réexprime une des isoformes RAS, ces MEF RASless récupèrent leur capacité de prolifération et de migration. Il est ainsi apparu que l'expression ectopique de HRAS, NRAS ou KRAS4B était suffisante pour permettre la prolifération et la migration en l'absence de l'expression des RAS endogènes (Drosten et al., 2010). Par ailleurs, seule l'activation constitutive de composants de la voie MAPK-ERK (et non pas de la voie PI3K-AKT ou RalGEF) était suffisante pour rétablir la prolifération et la migration dans les MEF RASless (Drosten et al., 2010)..

Toutes ces études mettent ainsi en évidence le rôle important de KRAS comme régulateur principal du développement embryonnaire chez la souris. Elles renforcent l'idée du chevauchement des fonctions des 3 membres de la famille RAS, et suggèrent également que l'importance de KRAS lors du processus de développement embryonnaire serait une conséquence de la force de son promoteur ou des caractéristiques de son expression spatio-temporelle, plutôt que la conséquence d'une signalisation particulière de KRAS par rapport aux autres protéines RAS (Castellano & Santos, 2011 ; Nakamura et al., 2008).

4.3.Le rôle de KRAS dans les pathologies

4.3.1. KRAS et les cancers

Les gènes de la famille *RAS* sont des oncogènes que l'on retrouve fréquemment mutés dans un très grand nombre de cancers humains. Le profil mutationnel, la fréquence de mutation, et le membre de la famille *RAS* muté est spécifique à chaque type de cancer.

Selon la base de données « *The Catalog of Somatic Mutations in Cancer* » (COSMIC), *KRAS* est l'isoforme de la famille *RAS* la plus fréquemment mutée dans les cancers. Le gène *KRAS* est muté dans environs 22% des tumeurs reprisent dans COSMIC, contre 8% pour *NRAS*, et 3% pour *HRAS*. De plus, *KRAS* muté est associé à des cancers hautement mortels, tels que l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC, de l'anglais *pancreatic ductal adenocarcinoma*) (la mutation *KRAS* est présente dans 90% des PDAC), le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC, *non small cell lung carcinoma*) et le cancer colorectal (CRC, *colorectal cancer*) (Prior et al., 2012).

Les mutations dans *KRAS* sont toutes activatrices et confèrent à la protéine mutée une forte activité de transformation ; elles ont comme conséquence l'activation constitutive de la voie MAPK, indépendamment de l'activation d'un récepteur, et mènent à une prolifération incontrôlée. De manière générale, ces mutations induisent une diminution de l'hydrolyse du GTP, suite à une diminution de l'interaction de la protéine mutée avec les GAP. KRAS mutée est ainsi bloquée dans sa conformation active.

De plus, ces mutations ponctuelles faux-sens sont fréquemment retrouvées dans le codon 12 (G12), le codon 13 (G13) ou le codon 61 (Q61) (Wood et al., 2016). Cependant, la fréquence et le type de mutation identifiés dans les cancers KRAS-dépendant sont spécifiques à chaque type de cancer. Par exemple, la mutation G12D est préférentiellement présente dans le PDAC tandis la mutation G12C est plus présente dans le NSCLC(L. Huang et al., 2021).

Afin de comprendre le processus oncogénique induit par une mutation *KRAS* et de disposer de modèles précliniques pour des études pharmacologiques, des modèles murins génétiquement modifiés pouvant exprimer KRAS mutée ont été générés. Ces modèles présentent, pour la plupart, une mutation *Kras* précédée d'une cassette LoxP-stop-LoxP (LSL) introduite dans le locus endogène de *Kras*. La cassette LSL consiste à une cassette stop flanquée de deux sites LoxP qui permettent l'excision de celle-ci après recombinaison homologue par la Cre recombinase (Cre) ou sa version inductible, la Cre^{ER} (protéine de fusion formée de la Cre et du domaine de liaison au ligand du récepteur aux estrogènes dont l'activité sera induite par injection de tamoxifène, un estrogène de synthèse)(H. Kim et al., 2018). Pour permettre les études fondamentales ou précliniques d'une tumeur spécifique *Kras*-dépendante, les

souris *Kras*$^{LSL\text{-}mutation}$ sont croisées avec des souris exprimant la Cre ou la Cre^{ER} sous la régulation d'un promoteur spécifique du type cellulaire ou de l'organe que l'on veut étudier. Par exemple, le modèle *Elastase(Ela)-Cre*^{ER} ; *Kras*$^{LSL\text{-}G12V/+}$ est un modèle où *Kras*^{G12D} est exprimée dans les cellules acinaires pancréatiques et est utilisé pour les études sur le PDAC (Guerra et al., 2007).

De manière générale, les recherches étudiant le rôle de KRAS dans la tumorigenèse ont mis en évidence le rôle initiateur de la protéine mutée dans le développement tumoral. Ce rôle a été montré, par exemple, dans des études où *Kras*^{muté} est exprimé dans le poumon (après instillation d'une Cre dans les voies respiratoires) (Jackson et al., 2001) ou le pancréas (par croisement avec des souris *Pdx1-Cre* ou *P48-Cre ;* souris où la *Cre* est sous la régulation transcriptionnelle de *Pdx1* ou *p48,* gènes exprimés spécifiquement dans les progéniteurs pancréatiques) (Hingorani et al., 2003, 2005). Dans ces modèles, les souris ne développent que rarement une tumeur ou du moins, rarement une tumeur avec un caractère agressif. Le caractère agressif de la tumeur s'acquiert suite à la combinaison avec une autre mutation oncogénique, ou avec une mutation dans un suppresseur de tumeur, tel que Tp53.

De manière plus détaillée, la caractérisation des modèles murins *Pdx1-Cre ;* *Kras*$^{LSL\text{-}G12D/+}$ et *P48-Cre ;* *Kras*$^{LSL\text{-}G12D/+}$ a mis en évidence le développement de lésions prénéoplasiques, appelées néoplasies intraépithéliales pancréatiques (communément abréviées en PanIN) dans les pancréas de ces souris. Seul un faible nombre de souris développent un PDAC (Hingorani et al., 2003). Cette observation a été renforcée par des études ultérieures utilisant des modèles où *Kras*^{mute} est exprimée spécifiquement dans les cellules acinaires pancréatiques adultes (*Ela-tTA ; TetO-Cre ;* *Kras*$^{LSL\text{-}G12V/+}$ *et ElaCreER ;* *Kras*$^{LSLG12D/+}$), après traitement à la doxycycline ou au tamoxifène. Les souris de ces modèles développent, après induction d'une pancréatite, des lésions de type PanIN en grand nombre. Pour obtenir le développement d'un PDAC dans ces modèles, l'ajout d'un transgène codant pour un suppresseur de tumeur muté est nécessaire (Guerra et al., 2007). Ces observations montrent qu'une mutation survenant dans *Kras* mène au développement de PDAC, si elle est associée à un contexte inflammatoire et à une autre mutation.

Les modèles murins exprimant une protéine KRAS mutée sont toujours utilisés à l'heure actuelle dans les études fondamentales et précliniques de tumeurs *KRAS*-dépendantes.

4.3.2. L'implication de KRAS dans les RASopathies

Les RASopathies sont définies comme un regroupement de syndromes génétiques induits par une mutation germinale d'un gène codant pour un effecteur de la voie de signalisation RAS/MAPK (Bentires-Alj et al., 2006). Ces syndromes du développement comprennent la Neurofibromatose de type 1, le syndrome de Noonan, le syndrome de Noonan avec lentigines multiples (anciennement appelé syndrome Léopard), le syndrome de Costello, le syndrome cardio-facio-cutané, le syndrome de Legius, le syndrome de malformation capillaire-malformation artérioveineuse, et le syndrome de la fibromatose gingivale héréditaire de type 1(Hernández-Porras & Guerra, 2017).

Les personnes atteintes de ces syndromes partagent des caractéristiques communes incluant des malformations cardiaques, des anomalies faciales, cutanées, musculosquelettiques, oculaires, et un défaut neurocognitif (Rauen, 2013). Cependant, chaque syndrome présente des caractéristiques qui lui sont propres et diffère dans la prédisposition au développement de tumeurs malignes. Néanmoins, le développement de tumeurs n'est pas la caractéristique principale des RASopathies (Rodriguez-Viciana et al., 2006).

La première étude faisant mention d'une RASopathies date des années nonante et a mis en évidence le lien entre un défaut de la voie de signalisation RAS/MAPK et le développement d'un syndrome. Ce lien a été démontré par l'association du développement de la Neurofibromatose 1 (une des RASopathies la plus courante) et la présence de mutations entrainant la perte d'expression de la neurofibrine 1 (NF1, une protéine GAP) et donc, d'une voie RAS défectueuse (Xu et al., 1990). Ensuite, il a été mis en évidence que des mutations germinales activatrices de *HRAS* étaient responsables du développement du syndrome de Costello (Aoki et al., 2005). Le syndrome de Legius est quant à lui causé par une mutation inactivatrice de *SPRED1*, un régulateur négatif de la voie RAS. De plus, le syndrome de Noonan inclut des patients présentant des mutations dans le gène *PTPN11* (gène codant pour la protéine SHP2, régulateur en amont des RAS), *SOS1,* et également dans deux des gènes de la famille *RAS,* à savoir *KRAS* et *NRAS*, ainsi que dans *RAF1, BRAF* et *MEK1*. Cependant, l'ensemble des gènes/mutations responsables de ces syndromes ne sont toujours pas caractérisés à 100%.

Ces dernières années, afin de comprendre comment les mutations germinales de la voie RAS mènent au développement de ces syndromes, des modèles murins génétiquement modifiés ont été générés pour permettre d'étudier les conséquences biologiques des mutations, définir le type cellulaire d'origine d'une malformation/anomalie, d'établir une corrélation génotype/phénotype, de caractériser la prédisposition tumorale, et de réaliser des études précliniques (Hernández-Porras & Guerra, 2017). Le premier modèle à avoir été généré est un modèle murin n'exprimant aucune protéine NF1 et a permis de montrer qu'un

problème au niveau de cette protéine menait effectivement au développement de symptômes similaires à la Neurofibromatose (Brannan et al., 1994). Un autre exemple de modèle est un modèle murin où une mutation G16D a été introduite dans le gène *Ptpn11* et a été utilisé pour mieux comprendre le syndrome de Noonan (Araki et al., 2004). Un dernier exemple est une souris mimant le syndrome de Costello qui a été générée en introduisant une mutation G12V dans le gène de *Hras* (Schuhmacher et al., 2008).

Concernant la présence de mutations *KRAS* dans les RASopathies, la fréquence de mutations est faible (<5%). Toutefois, la mutation *KRAS* a été trouvée chez des patients souffrant du syndrome de Noonan, du syndrome cardio-facio-crânial et du syndrome de Costello. Les mutations *KRAS* identifiées après séquençage de l'ADN des patients ont été caractérisées comme étant des mutations héréditaires ou *de novo*, localisées à des endroits différents que les *hotspots* oncogéniques. On peut citer comme exemples de mutation, la mutation $KRAS^{D135V}$ (identifiée chez des patients souffrant d'un syndrome de Noonan sévère ou atteint du syndrome cardio-facio-crânial) (Kim et al., 2017 ; Schubbert et al., 2006 ; Zenker et al., 2006), la mutation $KRAS^{V14I}$ (identifiée chez des patients atteints du syndrome de Noonan) (Ko et al., 2008 ; Schubbert et al., 2006), la mutation $KRAS^{Q23R}$ (identifiée chez des patients atteints du syndrome de Noonan)(J. Kim et al., 2017), la mutation $KRAS^{T58I}$ (identifiée chez des patients atteints du syndrome de Noonan) (Schubbert et al., 2006), et la mutation $KRAS^{P34R}$ (présente chez un patient atteint du syndrome cardio-facio-crâniale). Les mutations hétérozygotes gain de fonction trouvées chez ces patients induisent un tableau clinique spécifique à la mutation exprimée, rendant l'étude de ces syndromes compliquée.

Pour comprendre l'impact de ces mutations sur la fonction de KRAS, des études à caractère biochimique ont été réalisées. Comparativement aux mutations oncogéniques de *KRAS* survenant le plus souvent sur le codon G12, G13 ou Q61, les mutations germinales de *KRAS* surviennent à de nombreuses localisations, telles que K5, V14, Q22, P34, T58, G60, V152, D153 et F156 (Dunnett-Kane et al., 2020). Ces mutations germinales peuvent être classées en cinq groupes fonctionnels décrits dans le **tableau 1** (Gremer et al., 2011). L'ensemble des mutations identifiées dans les RASopathies liées à *KRAS* sont caractérisées par la production d'une protéine mutée hyperactive, comme c'est le cas dans le cancer. Cependant, les mutations liées aux RASopathies présentent un caractère moins délétère que les mutations oncogéniques (Schubbert et al., 2007). Les différences de localisation entre les mutations germinales et oncogéniques de *KRAS* ne sont toujours pas expliquées.

Tableau 1. Classification des mutations de la lignée germinale de *KRAS* et leurs effets (adapté de (Gremer et al., 2011))

Classe	Mutation	Effets
A	K5N, T58I, D153V	État d'activation le plus élevé Signalisation en aval plus importante Mécanisme non identifié
B	V14I	Augmentation de l'échange de nucléotide intrinsèque Augmentation de la réaction catalysée par les GEF
C	Q22R	Altération de l'hydrolyse stimulée par les GAP
D	Q22E, R156L	Augmentation des échanges de nucléotides Résistance aux GAP
E	P34L, P34L, G60R	Insensible aux GAP Interaction réduite avec les effecteurs

Par ailleurs, des modèles murins génétiquement modifiés pour exprimer une des mutations *KRAS* que l'on retrouve dans ces pathologies ont été générés et étudiés afin de mieux comprendre le développement de ces syndromes et de trouver un traitement. Ainsi, concernant le syndrome de Noonan, 18 mutations germinales différentes ont été signalées dans le locus de *KRAS*, chaque type de mutation conférant un spectre d'anomalies spécifiques à celle-ci. La mutation la plus fréquemment identifiée dans ce syndrome est le remplacement d'une valine en position 14 par une isoleucine ($KRAS^{V14I}$). Le modèle murin reproduisant cette mutation a été généré ($Kras^{V14I}$). La caractérisation de ce modèle a montré que les souris hétérozygotes ($Kras^{V14I/+}$) étaient obtenues dans le ratio mendélien attendu et présentaient un phénotype léger ; tandis que les souris homozygotes ($Kras^{V14I/V14I}$) étaient caractérisées par une mortalité périnatale causée par une insuffisance cardiaque et des défauts hématopoïétiques. Les souris $Kras^{V14I/V14I}$ présentent de nombreuses malformations/anomalies associées au syndrome de Noonan ; un retard de croissance, une dysmorphie crânio-faciale et des malformations cardiaques (hyperplasie cardiaque et amincissement des valves aortiques) (Hernández-Porras et al., 2014, 2015). En revanche, une pénétrance incomplète de la létalité a été observée et la présence d'allèles modificateurs a été suggérée comme étant à l'origine de cette observation. Afin de tester cette hypothèse, une équipe a caractérisé ce modèle murin dans deux fonds génétiques différents (C57BL/6J.OlaHsd et 129S2/SvPasCrl). Les résultats suggèrent que les modificateurs génétiques associés à ces fonds génétiques affectent le développement du cœur et son fonctionnement aux premiers stades de la

vie postnatale, ainsi que la sévérité des altérations hématopoïétiques (Hernández-Porras et al., 2015). Finalement, ce modèle murin a été utilisé dans des études précliniques, ce qui a permis de montrer que l'administration d'un inhibiteur de MEK chez la femelle gestante permet d'éviter la létalité périnatale et prévient le développement de la dysmorphie crânio-faciale, ainsi que les malformations cardiaques (Hernández-Porras et al., 2014). En outre, nous pouvons citer comme autres exemples de modèles murins du syndrome de Noonan, les souris $Kras^{T58I/+}$ qui présentent un défaut du développement crânio-facial, une hypertrophie du myocarde et une splénomégalie, et les souris $Kras^{P34R/+}$qui présentent, elles, une létalité précoce et des défaut cardiopulmonaires (tel qu'une augmentation de la superficie des valves aortiques, mitrales et tricuspides, ainsi qu'une diminution de la superficie de la valve pulmonaire) (Wong et al., 2020).

Objectifs de la thèse

A partir des années 80, le rôle que tiennent les protéines de la famille RAS (HRAS, NRAS et les deux isoformes d'épissage de KRAS, KRAS4A et KRAS4B) dans la physiologie, le développement embryonnaire, le cancer, ainsi que dans les maladies génétiques a retenu l'attention de nombreux chercheurs. Les études portant sur le rôle développemental des protéines RAS ont permis de mettre en évidence que, seule, la protéine KRAS est un régulateur majeur du développement embryonnaire murin.

Bien que ce rôle essentiel de KRAS dans le développement embryonnaire ait été démontré, il existe encore à l'heure actuelle un manque important de connaissances sur le patron d'expression de KRAS ainsi que sur les rôles spécifiques de cette protéine, et de ses isoformes d'épissage, dans ce processus.

Dans ce contexte, nous abordons dans cette thèse les deux objectifs suivants :

1. La première partie de notre étude cherchera à mettre en évidence le patron d'expression de KRAS au cours du développement embryonnaire, ainsi qu'après la naissance chez la souris. Pour atteindre cet objectif, et en raison de l'absence d'anticorps ciblant KRAS fonctionnant dans des expériences d'immunomarquages, le modèle murin *citrine-Kras* a été utilisé.

2. La deuxième partie de notre étude se concentrera sur l'élucidation des rôles de KRAS et de ses deux isoformes d'épissage, KRAS4A et KRAS4B, au cours du développement embryonnaire chez la souris. Afin d'atteindre cet objectif, trois modèles murins (*Kras*$^{-/-}$, *Kras4A*$^{-/-}$, *Kras4B*$^{-/-}$) ont été générés et étudiés.

Résultats

1. L'expression de la protéine KRAS se restreint progressivement au cours de l'embryogenèse et de l'âge adulte.

Dans la première partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés au patron d'expression de KRAS. Pour cela, nous avons utilisé le modèle murin *citrine-Kras* afin de mettre en évidence notre protéine d'intérêt, par l'intermédiaire d'un immunomarquage de la Citrine. Ce modèle nous a permis de montrer que la protéine KRAS est exprimée dans un large éventail de tissus et d'organes lors du développement embryonnaire. Cependant, l'expression de cette protéine diminue progressivement jusqu'au stade adulte, et sa dynamique d'expression varie selon les organes et devient de plus en plus spécifique à certains types cellulaires.

Ce chapitre est une mise en forme au format de ma thèse de l'article déjà publié : « Minati MA, Assi M, Libert M, Cordi S, Lemaigre F, Jacquemin P. *KRAS protein expression becomes progressively restricted during embryogenesis and in adulthood*. Front Cell Dev Biol. 2022 Sep 27 ;10 :995013 ».

Dans cet article, j'ai contribué à la conception expérimentale, à l'acquisition des données, à l'analyse, et à l'interprétation des résultats, ainsi qu'à la rédaction et la révision du manuscrit.

KRAS protein expression becomes progressively restricted during embryogenesis and in adulthood

Marie-Albane Minati[1,†], Mohamad Assi[1,†], Maxime Libert[1], Sabine Cordi[1], Frédéric Lemaigre[1] and Patrick Jacquemin[1,*]

[1]Université catholique de Louvain, de Duve Institute, Liver and Pancreas Differentiation Unit, Brussels, Belgium

[†]These authors share first authorship

* Correspondence: Patrick Jacquemin patrick.jacquemin@uclouvain.be.

Keywords: KRAS, development, epithelial cells, mesenchymal cells, mouse models

1.1. Abstract

KRAS mutants are common in many cancers and wild-type KRAS is essential in development as its absence causes embryonic lethality. Despite this critical role in development and disease, the normal expression pattern of KRAS protein is still largely unknown at the tissue level due to the lack of valid antibodies.

To address this issue, we used the *citrine-Kras* mouse model in which the Citrine-KRAS (Cit-K) fusion protein functions as a validated surrogate of endogenous KRAS protein that can be detected on tissue sections by immunolabeling with a GFP antibody. In the embryo, we found expression of KRAS protein in a wide range of organs and tissues. This expression tends to decrease near birth, mainly in mesenchymal cells. During transition to the adult stage, the dynamics of KRAS protein expression vary among organs and detection of KRAS becomes restricted to specific cell types. Furthermore, we found that steady state KRAS protein expression is detectable at the cell membrane and in the cytoplasm and that this subcellular partitioning differed among cell types.

Our results reveal hitherto unanticipated dynamics in developmental, tissular, cell-specific and subcellular expression of KRAS protein. They provide insight into the reason why specific cell-types are sensitive to KRAS mutations during cancer initiation.

1.2. Introduction

The RAS family is composed of three genes, *Nras, Hras and Kras*, that encode four proteins called NRAS, HRAS and two splice isoforms of KRAS, namely KRAS4A and KRAS4B. RAS are small GTPases that cycle between "on/off" states with the help of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins (GAPs) which stimulate the active GTP-bound and inactive GDP-bound states, respectively (Barbacid, 1987 ; Lowy & Willumsen, 1993). The GTP-GDP exchange which regulates KRAS activity occurs at the plasma membrane (Simanshu et al., 2017 ; Stephen et al., 2014) where KRAS is anchored through prenylation. This membrane localization is essential for its activity (Cox et al., 2015) and results in the activation of downstream signaling pathways, such as the RAF-MEK-ERK signaling cascade (Simanshu et al., 2017). Trafficking of Kras between different cellular compartments has also been described as a process regulating its activity (Prior & Hancock, 2012). It should be noted that these studies are based on the use of tagged forms of KRAS which are overexpressed in cell lines and may behave differently from endogenous KRAS(Prior & Hancock, 2012).

The role of RAS in homeostasis, embryonic development, cancer, and genetic disorders gained the attention of researchers already in the eighties. Particularly, the role of *Ras* genes in embryonic development was first assessed using knockout mouse models. Mice lacking NRAS and HRAS showed normal viability and growth (Umanoff et al., 1995 ; Ise et al., 2000), while those lacking KRAS presented with a severe growth defect and died *in utero* around E15.5 (Korea et al., 1997 ; Johnson et al., 1997). Rescue experiments identified partial functional overlap between KRAS and HRAS or NRAS (Nakamura et al., 2008). Further analysis of $Kras^{-/-}$ embryos revealed that they displayed features of anemia, fetal liver defect (decellularization) (Johnson et al., 1997), motor neuronal defect (cell death) and ventricular myocardium atrophy (Korea et al., 1997). All these studies highlight KRAS as a master regulator of embryonic mouse development.

The expression pattern of the mouse *Kras* gene characterized by Northern blotting and quantitative real-time PCR revealed substantial variations in *Kras* expression among different organs and during development, from embryogenesis to adulthood (Leon et al., 1987 ; Newlaczyl et al., 2017). At the protein level, despite the importance of KRAS in health and disease, the lack of KRAS antibodies functional for tissue immunostaining prevented the characterization of KRAS protein expression and subcellular localization *in vivo* (Waters et al., 2017). Therefore, understanding RAS-driven developmental defects and tumor initiation remains complex.

To fill this gap of knowledge, we assessed KRAS protein expression at different stages of mouse embryonic development and in adults, using the $Kras^{Cit}$ mouse model, which has been recently developed by our lab (Assi et al., 2021). This model expresses a fusion protein called Citrine-KRAS (Cit-K), in which the fluorescent

protein Citrine is fused in-frame with KRAS, and is transcribed under the control of the endogenous Kras promoter. Therefore, Cit-K faithfully reproduces the tissular expression pattern of KRAS protein, as well as its subcellular localization which can be assessed easily on tissue sections using a GFP antibody; importantly, Cit-K binds GTP and does not impact embryonic development, postnatal growth, and fertility of mice that homozygously express Cit-Kras (*Kras*$^{cit/cit}$) (Assi et al., 2021). In the present paper, using this mouse model, we identified a dynamic organ- and cell-specific KRAS protein expression profile throughout mouse development and in adults.

1.3. Materials and methods

Mice

All procedures described in this study were performed with the approval of the animal welfare committee of the UCLouvain Health Sciences Sector (Brussels, Belgium; ethic number: 2021/UCL/MD/054).

Kras^{Cit} mice expressing Cit-K have been described (Assi et al., 2021).

Embryo and organ collection

Embryos were collected at E13.5, E15.5 and E17.5 and were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 6-10 hours before embedding in paraffin. Tissues dissected from 8-week-old mice were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 4-6 hours before embedding in paraffin.

Immunofluorescent labeling

Six-µm tissue sections were deparaffinized and antigen retrieval was performed by heating the slides for 20 minutes in Tris-EDTA (pH 9) buffer in Lab Vision PT Module (Thermo Fisher Scientific). Sections were rinsed 5 min in phosphate-buffered saline (PBS), and permeabilized in PBS, 0.3% Triton X-100 (Sigma Aldrich) for 5 min at room temperature. After permeabilization, tissue sections were blocked in PBS, 3% low-fat milk, 10% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100 (blocking buffer) for 45 min at room temperature. Primary antibodies were diluted in blocking buffer and incubated with the samples overnight at 4°C. Primary antibodies and antibody dilution are listed in **Table 1**. Then, slides were washed with 0.1% Triton X-100 in PBS. Secondary antibodies were diluted in PBS, 10% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100, applied at 1/1000 dilution and incubated for 1 h at 37°C. Finally, sections were treated with the lipofuscin autofluorescence quencher (TrueBlack 23007, VWR) for 10 sec. GFP labeling of *Kras*$^{+/+}$ tissue sections served as control to monitor the background level. Micrographs were taken with an Axiovert 200 fluorescent microscope (Zeiss) using the AxioVision software or with Cell Observer Spinning Disk Confocal Microscope using the ZEN software.

Quantifications were performed on at least 3-5 fields per stage/organ using the FIJI (ImageJ) or ZEN softwares.

Table 1. Antibody used

Antibodies	Origin	Dilution	Reference
α-actinin	Mouse	1/750	Sigma (A7811)
CD31	Rat	1/250	Dianova (D130)
E-CADHERIN	Mouse	1/1000	BD Biosciences (610182)
GFP	Goat	1/250	Abcam (ab6673)
HNF4	Mouse	1/350	R&D systems (PP-H1415-00)
NeuN	Mouse	1/100	Merck (MAB377)
SOX2	Rabbit	1/100	Abcam (ab97959)
SOX9	Rabbit	1/500	Home Made

Analysis of KRAS subcellular localization

To study the subcellular localization of KRAS at the adult stage, immunofluorescence labeling for Cit-K, E-CADHERIN and DNA was performed on lung, intestine, pancreas and kidney sections of 8-week-old *Kras*$^{cit/cit}$ mice. Pictures of the sections were taken with the Cell Observer Spinning Disk Confocal Microscope using the ZEN software. To quantify the subcellular location of Cit-K, ZEN software was used: membrane *versus* cytoplasmic localization of Cit-K (green) was assessed semi-quantitatively by superimposing it to the signal intensity of E-CADHERIN (red; membrane) and DAPI (blue; nucleus), the area between E-CADHERIN and DAPI labeling being considered as cytoplasmic. Red, green and blue signal intensities were quantified along a line crossing the cell from one side to the other and passing through the nucleus. A discrete score of 0, 1, or 2 was assigned according to the signal intensity: 0 (0-50 arbitrary units (A.U.)), 1 (50-100 A.U.), and 2 (100-150 A.U). Quantifications were performed on 10 cells per cell type.

Western blotting

E15.5 embryonic or 8-week-old adult tissues from *Kras*$^{Cit/Cit}$ or *wild-type* mice were lysed and sonicated in lysis buffer composed of 50mM Tris-Cl, 150mM Sodium Chloride, 0.25% Sodium Deoxycholate, 1% NP-40, 1mM Sodium Orthovanadate, 2% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) and containing Protease inhibitor (11836153001, Sigma Aldrich). Samples were kept on ice during the procedure. Then, samples were centrifuged (14000 g, 15 min, at 4°C) to pellet cell debris. Proteins were quantified using a Bradford assay. Samples containing 30 or 50 µg total proteins were separated on 12.5% SDS polyacrylamide gels. PVDF membranes (ISEQ00010, Millipore) were blocked with a solution of 5% low-fat milk diluted in Tris-buffered saline (TBS)/0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with primary

antibodies against KRAS (own antibody) (Assi et al., 2020) or HSC70 (Santa Cruz sc-7298) (dilution 1:1000 for all antibodies). Then, membranes were washed with TBS/0.1% Tween-20 and incubated with secondary antibodies for 1 h at RT. After incubation, membranes were washed with TBS/, 0.1% Tween-20 and revealed using SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (34577, Thermo Fisher). HSC70 was used as loading control. Pictures were taken with the Fusion Solo S imaging system (Viber). Densitometry was measured using the FIJI software (ImageJ) and the ratio of the protein of interest over HSC70 was calculated.

Statistical analysis

Data were presented as means ± standard error of the mean (SEM). Statistical significance between two groups was calculated using unpaired Student's t-test. For all statistical analyses, the level of significance was set at $p<0.05$. Analyses were performed using GraphPad Prism software (version 9, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). *,$p<0.05$; **,$p<0.01$; ***,$p<0.001$; ****,$p<0.0001$; ns, not significant**.**

1.4. Results

KRAS protein is widely expressed during mouse embryogenesis

To determine the expression pattern of KRAS, we used $Kras^{Cit}$ mice which produce a Citrine-KRAS (Cit-K) fusion protein under control of the endogenous *Kras* transcriptional regulatory elements (Assi et al., 2021) (**Figure 1A**). Therefore, detection of Cit-K on paraffin-embedded tissue sections with help of anti-GFP antibodies (citrine is an improved version of YFP) is a faithful substitute for detection of endogenous KRAS protein.

We generated homozygous $Kras^{cit/cit}$, thereby allowing Cit-K to be detected with the best efficiency. Western blot analyses on embryonic organs, including liver, intestine and brain revealed the presence of Cit-K at the expected molecular weight (**Figure 1B**). Immunohistochemistry on $Kras^{cit/cit}$ E15.5 embryos showed that most organs express Cit-K protein, whereas no specific signal was detected in $Kras^{+/+}$ controls (**Figure 1C**): a high level of expression was particularly seen in the brain, the lung, the liver, and the intestine. Notably, no/very weak expression was observed in the heart and the inner layer of the bladder. Immunofluorescent labeling of Cit-K on several organs confirmed the wide expression of KRAS (**Figure 1D**). The specificity of the immunostaining and immunofluorescent labeling in the $Kras^{cit/cit}$ embryos was confirmed by comparing it with the much lower level of staining and autofluorescence detected in $Kras^{+/+}$ embryos (**Figure 1C-D**). Since Cit-K serves as a surrogate for KRAS, these analyses document for the first time the broad expression profile of KRAS protein during embryonic mouse development.

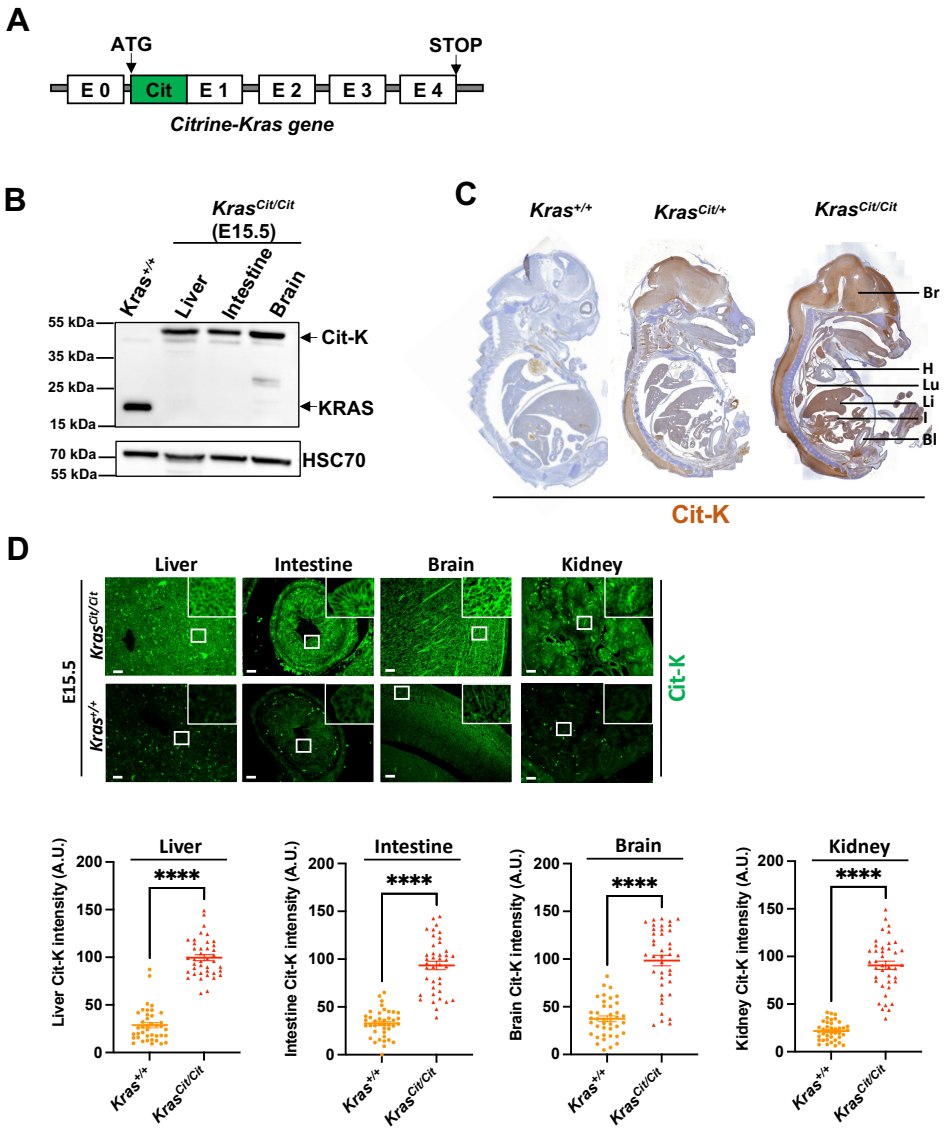


Figure 1. Citrine-KRAS (Cit-K) fusion protein is expressed in E15.5 *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos. (**A**) Construction of the *Kras*$^{Cit/Cit}$ mouse model generation using the CRISPR/Cas9 technology. (**B**) Western blot on liver, intestine, and brain protein lysates of E15.5 *Kras*$^{cit/cit}$ embryos. A KRAS antibody has been used to detect both KRAS and Cit-K. Heat shock cognate protein 70 (HSC70) has been used as loading control. Wild-type KRAS is detected to ~ 22 kDa and Citrine-KRAS is detected to ~ 48 kDa, as expected. The *Kras*$^{+/+}$ line corresponds to a protein extract from cells expressing wild-type Kras to show wild-type KRAS at the expected size of ~ 22 kDa. (**C**) Immunohistochemistry using a GFP antibody (brown) on a whole section of E15.5 *Kras*$^{+/+}$, *Kras*$^{cit/+}$ and *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos counterstained

with hematoxylin (blue). As expected, weak background was observed on the *Kras*$^{+/+}$ embryo, while the staining was most intense on the *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryo. Bl, bladder; Br, brain; H, heart; I, intestine; Li, liver; Lu, lung. (**D**) Cit-K immunolabeling on E15.5 organ sections of *Kras*$^{+/+}$ and *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos. With the exception of intense non-specific labeling in tissue-resident red blood cells, no Cit-K labeling is observed in *Kras*$^{+/+}$ embryos. Graphs represent Cit-K intensity measured by FIJI software. One dot represents the mean of three measures of signal intensity on one cell. Data are represented as mean +/- SEM of 40 cells (n=4 mice). Statistical significance was tested by Student's t-test. ****, $p<0.0001$. A.U.: arbitrary unit.

KRAS protein expression gradually decreases in the mesenchymal compartment during mouse embryonic development

To study how the expression of KRAS evolves during embryonic development and cell differentiation, we first investigated Cit-K expression during lung development at E13.5, E15.5 and E17.5. By comparing these 3 stages, we observed a decrease of Cit-K expression over time (**Figure 2A-B**). This decrease mainly affected the lung mesenchyme: quantification of labeling obtained with anti-VIMENTIN and anti-E-CADHERIN antibodies showed that Cit-K expression remained constant in lung E-CADHERIN-positive epithelial cells (**Supplementary Figure S1A-B**), but significantly decreased in VIMENTIN-positive mesenchyme during progression of embryogenesis (**Figure 2A-B**).

The embryonic lung can be divided into a proximal and a distal portion, according to the expression of two SRY-box transcription factors, SOX2 and SOX9: SOX2 is found in the proximal airway epithelium whereas SOX9 is present in the distal lung epithelium (Hawkins et al., 2016). To investigate how KRAS expression evolved in the epithelium of both portions, we performed co-labeling of Cit-K and SOX factors. We observed that Cit-K expression decreased in the SOX2$^+$ cells but stayed constant in SOX9$^+$ cells (**Figure 2A-B**).

In intestine and kidney, progressive decrease of Cit-K expression was observed during embryogenesis, and, like in the lung, the decrease was predominant in the mesenchymal compartment (**Figure 3A-D**). Similar conclusions could be drawn from the analysis of the developing heart (**Figure 4A-B**). In contrast, in the nervous system, namely in the brain or dorsal root ganglia, the dynamics of Cit-K expression appeared different: brain neurons labeled for the marker NeuN showed increased Cit-K expression during development, whereas a decrease was detected in dorsal root ganglia (**Figure 4C-D**).

Finally, we investigated KRAS expression in the embryonic liver. Cit-K expression showed a transient decrease in the mesenchyme between E13.5 and E15.5, but no additional reduction was detected at E17.5. In the epithelial compartment (Supplementary Figure S1C-D), Cit-K expression remained constant

at all three stages tested in the SOX9^{+} (cholangiocytes) and HNF4^{+} (hepatoblasts and hepatocytes) cells (**Figure 5A-B**).

We concluded that KRAS protein expression in development is dynamic and tissue-specific, and that overall it is maintained in epithelial cells but tends to become progressively reduced in the mesenchymal compartment of several organs.

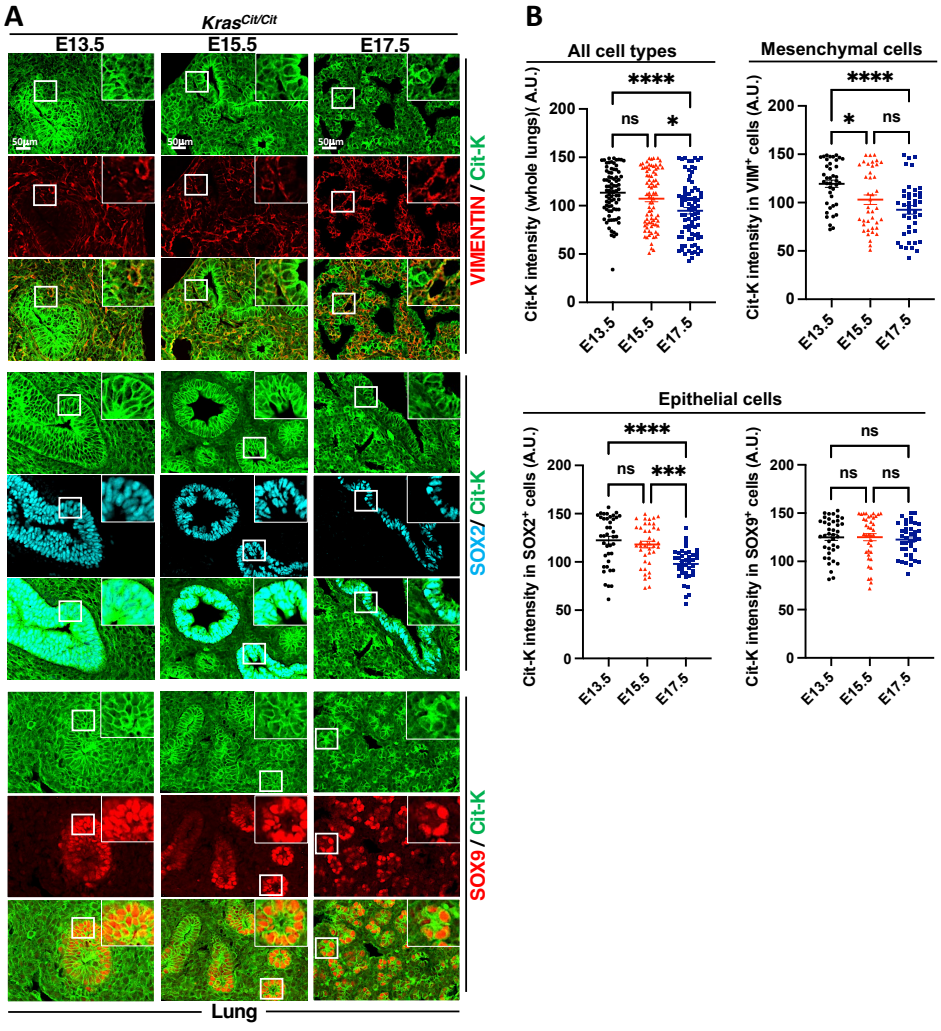


Figure 2. Cit-K is expressed in the developing lung. (**A**) Cit-K, VIMENTIN (VIM), SOX2 and SOX9 immunolabelling performed on lung sections of *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos at E13.5, E15.5 and E17.5. (**B**) Quantification by FIJI software of Cit-K signal intensity. One dot represents the mean of three measures of signal intensity of one cell. Data are represented as mean +/- SEM of 80 or 40 cells (n=4 embryos). Statistical significance was tested by Student's t-test. *, $p<0.05$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.0001$; ns, not significant. A.U.: arbitrary unit.

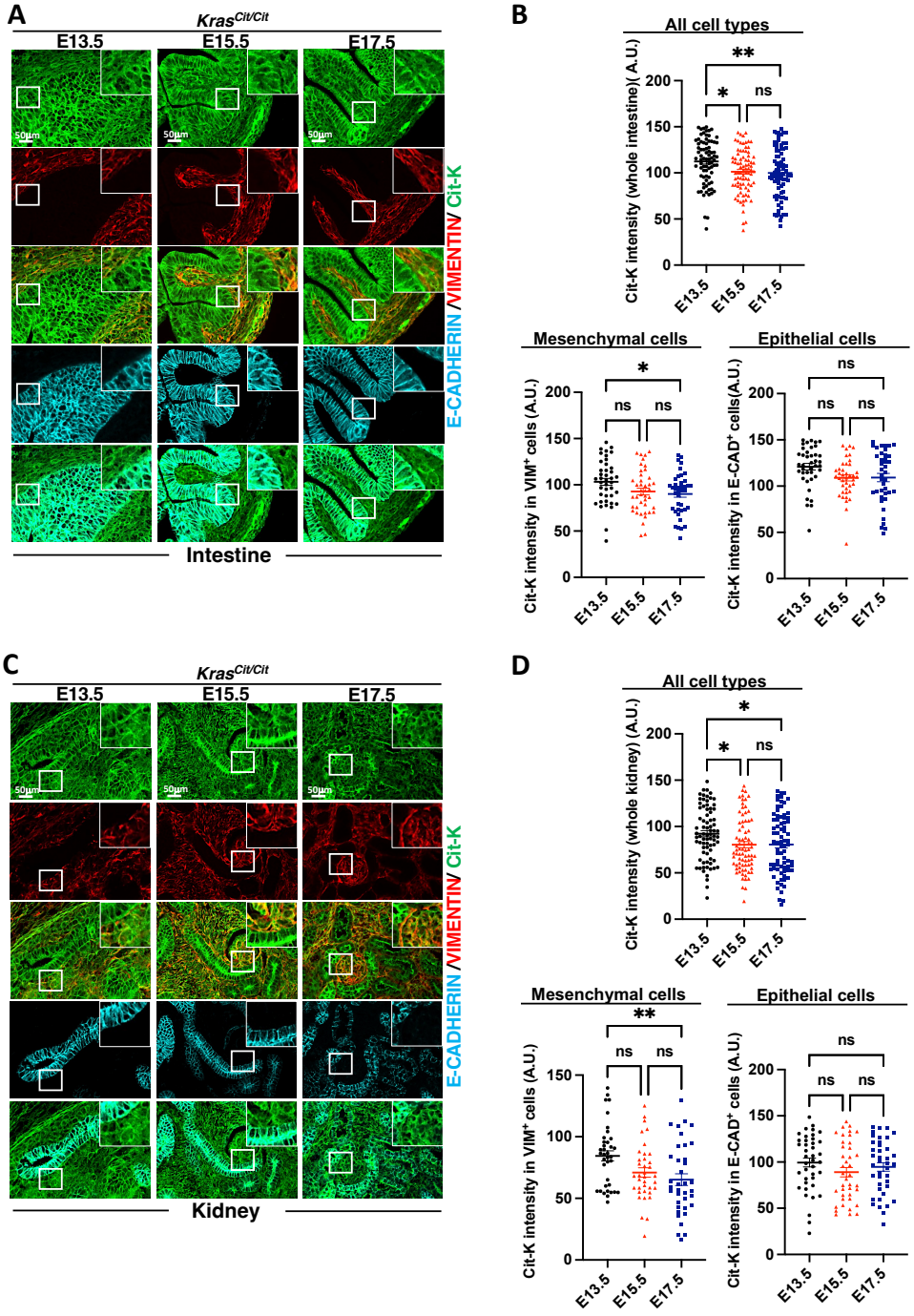

A
Kras Cit/Cit
E13.5
E15.5
E17.5
50µm
E-CADHERIN /VIMENTIN/ Cit-K
Intestine
B
All cell types
Cit-K intensity (whole intestine)(A.U.)
Mesenchymal cells
Epithelial cells
Cit-K intensity in VIM+ cells (A.U.)
Cit-K intensity in E-CAD+ cells(A.U.)
ns
C
Kras Cit/Cit
Kidney
D
All cell types
Cit-K intensity (whole kidney) (A.U.)
Mesenchymal cells
Epithelial cells

Figure 3. Cit-K expression is found in the developing intestine and kidney. (**A** and **C**) Immunolabeling for Cit-K, VIMENTIN (VIM) and E-CADHERIN (E-CAD) performed on embryonic intestine (**A**) and kidney (**C**) sections of $Kras^{Cit/Cit}$ embryos at E13.5, E15.5 and E17.5. (**B** and **D**) Quantification by FIJI software of Cit-K signal intensity in mesenchymal (VIM^+) and epithelial ($E\text{-}CAD^+$) cells of the embryonic intestine (**B**) and kidneys (**D**). One dot represents the mean of three measures of signal intensity of one cell. Data are represented as mean +/- SEM of 80 (n=4 embryos). Statistical significance was tested by Student's t-test. *, $p<0.05$; ns, not significant. A.U.: arbitrary unit.

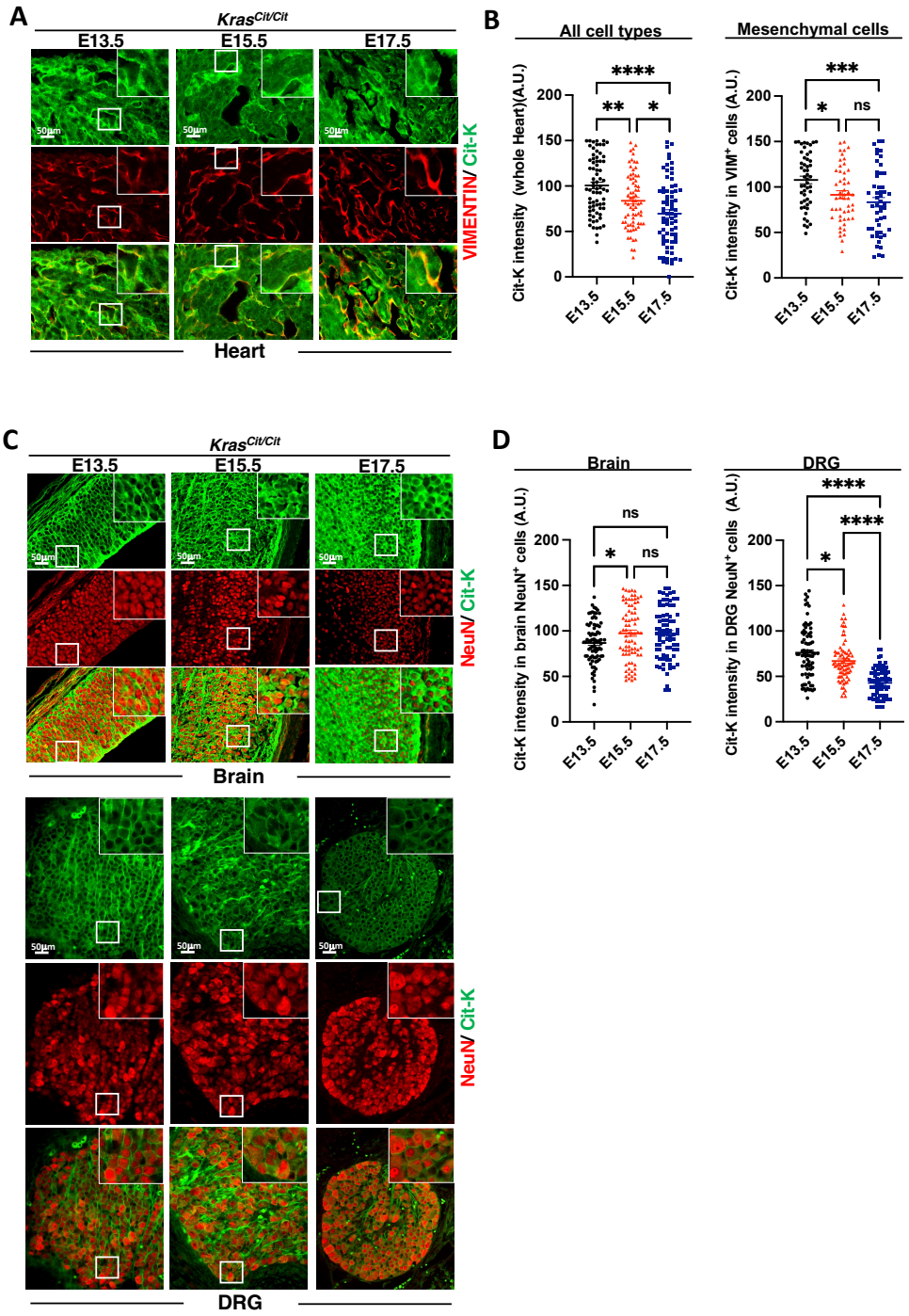

A
Kras Cit/Cit
E13.5
E15.5
E17.5
50µm
VIMENTIN/ Cit-K
Heart
B
All cell types
Mesenchymal cells
Cit-K intensity (whole Heart)(A.U.)
Cit-K intensity in VIM+ cells (A.U.)
****
**
*
***
ns
0
50
100
150
200
E13.5
E15.5
E17.5
C
Kras Cit/Cit
NeuN/ Cit-K
Brain
DRG
D
Brain
DRG
Cit-K intensity in brain NeuN+ cells (A.U.)
Cit-K intensity in DRG NeuN+ cells (A.U.)

Figure 4. Cit-K expression is present in heart, dorsal root ganglion (DRG), and brain. (**A**) Immunolabeling for Cit-K and VIMENTIN (VIM) on heart sections of *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos at E13.5, E15.5 and E17.5. (**B**) Quantification by FIJI software of Cit-K signal intensity in whole heart tissue and mesenchymal (VIM^{+}) cells. Data are represented as mean +/- SEM of 80 (n=4 embryos). (**C**) Immunolabelling for Cit-K and NeuN (epithelial neuronal cell) on brain and dorsal root ganglion (DRG) sections of *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos at E13.5, E15.5 and E17.5. Comparison between DRG sections of *Kras*$^{+/+}$ and *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos (not shown) indicate that strong Cit-K labeling observed in nervous fibers is non-specific and can be explained by the auto-fluorescence of nervous fibers. (**D**) Quantification by FIJI software of Cit-K signal intensity in epithelial neuronal (NeuN^{+}) cells. One dot represents the mean of three measures of signal intensity in one cell. Data are represented as mean +/- SEM of 80 cells (n=4 embryos). Statistical significance was tested by Student's t-test. *, p<0.05; ***, p<0.001; ****, p<0.0001 and ns, not significant. A.U.: arbitrary unit.

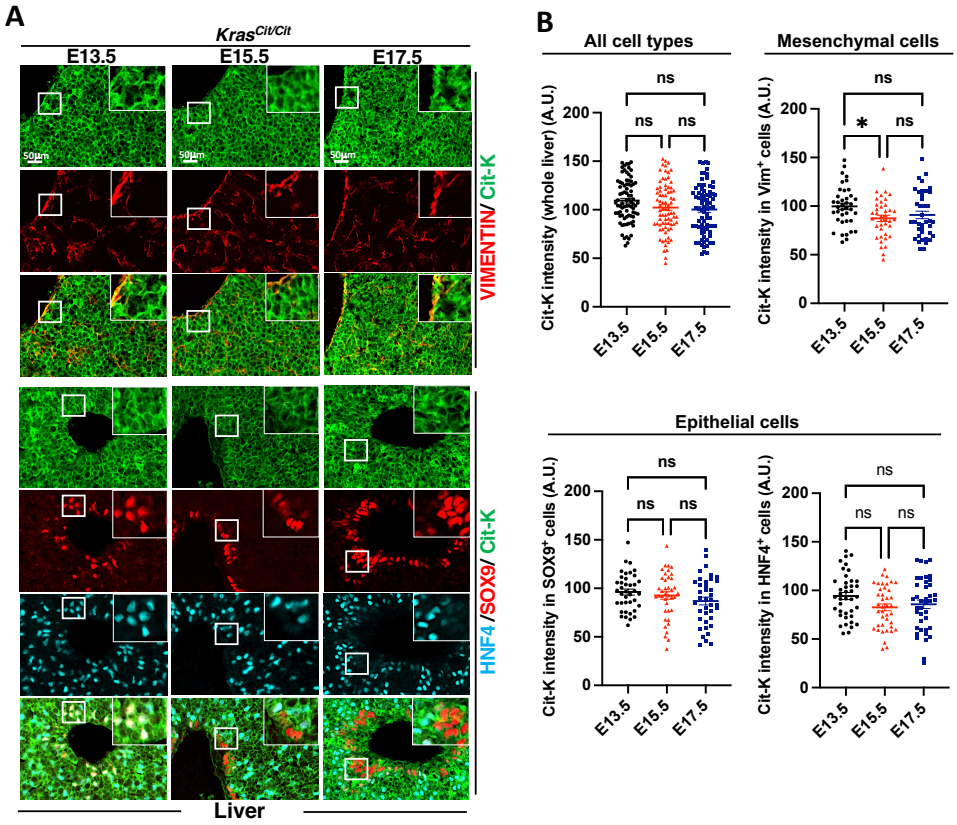


Figure 5. Cit-K is expressed in embryonic liver. (**A**) Immunolabeling for Cit-K, VIMENTIN (VIM), SRY-box transcription factor 9 (SOX9), and Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) performed on liver sections of *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos at E13.5, E15.5 and E17.5. (**B**) Quantification by FIJI software of Cit-K signal intensity in the whole liver, mesenchymal (VIM^{+}) cells, and two types of liver epithelial cells (SOX9^{+} or HNF4^{+} cells). One dot represents the mean of three measures of signal intensity in one cell. Data are represented as

mean +/- SEM of 80 or 40 cells (n=4 embryos). Statistical significance was tested by Student's t-test. *, $p<0.05$; ns, not significant. A.U.: arbitrary unit.

In adult tissues, KRAS protein expression is found in specific cell types

Next, we studied how the pattern and levels of expression of KRAS evolved from the embryonic to the adult stage, and thus characterized Cit-K expression in several adult tissues and compared it with the embryonic period. We observed that Cit-K expression was maintained at a high level in E-CADHERIN$^+$ epithelial cells of lung and intestine (**Figure 6A**). Cit-K expression in VIMENTIN$^+$ mesenchymal cells of the intestine was lower after birth as compared to E17.5, resulting in a ratio of the intensity of epithelial Cit-K labeling on mesenchymal Cit-K labeling that increases over time (**Figure 6A**). In lung, this ratio remained unchanged between E17.5 and adult stage.

In kidney, this ratio decreased because of persistent high expression of Cit-K in the VIMENTIN$^+$ glomerular cells and lowering expression in epithelia (**Figure 6A** and **B**). Conversely, the epithelial Cit-K/mesenchymal Cit-K ratio increased in liver between E17.5 and adults (**Figure 6A** and **B**); this increase resulted from stable Cit-K expression in the VIMENTIN$^+$ compartment, essentially comprising the periportal mesenchyme, associated with rising Cit-K expression in the biliary epithelial cells. Importantly, Cit-K expression dropped after birth in hepatocytes, while Cit-K expression was observed in sinusoidal cells (**Supplementary Figure S2A-C**).

Cit-K expression in heart was in sharp contrast to that in other organs, because it decreased drastically after birth (**Figure 6A** and **C**); this result was also confirmed by Western blotting (**Figure 6D**). Low Cit-K expression remained detectable in VIMENTIN$^+$ cells, while Cit-K was nearly not detected in the cardiomyocytes (**Supplementary Figure S3A**). Finally, Cit-K was absent in adult smooth and skeletal muscles (**Figure S3B** and not shown). Taken together, our results reveal a highly dynamic and cell-type specific profile of KRAS protein expression which varies substantially from one organ to the other during growth from the prenatal to the adult period (**Figure 6E**).

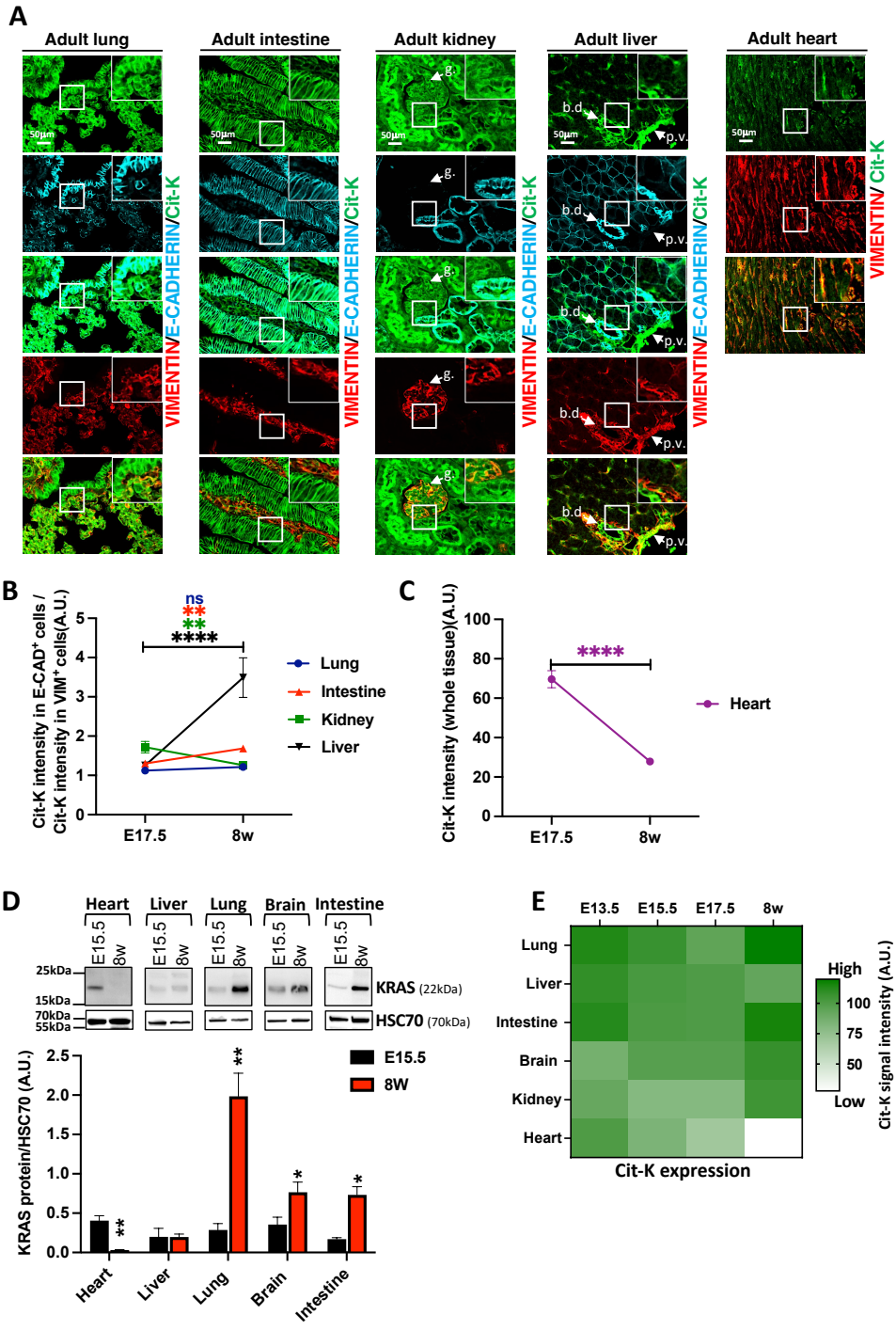

A
Adult lung
Adult intestine
Adult kidney
Adult liver
Adult heart
VIMENTIN/E-CADHERIN/Cit-K
VIMENTIN/ Cit-K
50µm
g.
b.d
p.v.
B
Cit-K intensity in E-CAD+ cells / Cit-K intensity in VIM+ cells(A.U.)
ns
**
**
****
Lung
Intestine
Kidney
Liver
E17.5
8w
C
Cit-K intensity (whole tissue)(A.U.)
****
Heart
D
Heart
Liver
Lung
Brain
Intestine
E15.5
8w
25kDa
15kDa
70kDa
55kDa
KRAS (22kDa)
HSC70 (70kDa)
KRAS protein/HSC70 (A.U.)
E15.5
8W
E
E13.5
E15.5
E17.5
8w
Lung
Liver
Intestine
Brain
Kidney
Heart
Cit-K expression
High
100
75
50
Low
Cit-K signal intensity (A.U.)

Figure 6. KRAS shows an organ- and cell type-specific expression pattern in adult mice. (**A**) Immunolabelling performed on lung, intestine, kidney, liver, and heart sections of 8-week-old *Kras*$^{Cit/Cit}$ mice for Cit-K, E-CADHERIN, as epithelial cell marker, and VIMENTIN (VIM), as mesenchymal cell marker. g, glomerulus; bd, bile duct; pv, portal vein. (**B**) Graph representing the ratio between the intensity of Cit-K labeling in epithelial E-CAD^{+} cells and that in mesenchymal VIM^{+} cells at E17.5 and the adult stage (8w, 8 weeks). Data are represented as mean +/- SEM of 40 cells (n=4 mice). (**C**) Graph representing the Cit-K signal intensity (right) in the heart during embryogenesis and at the adult stage. Data are represented as mean +/- SEM of 40 cells (n=4 mice). (**D**) Western blot analysis on total heart, liver, lung, brain and intestine lysate from E15.5 embryos (n=4) and adult CD1 mice. A KRAS antibody has been used to detect KRAS. Heat shock cognate protein 70 (HSC70) has been used as loading control. Measure was performed by FIJI software, and statistical significance between E17.5 and 8w or E15.5 and 8w were tested by Student's t-test. Data are represented as mean +/- SEM. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.0001$; ns, not significant. A.U.: arbitrary unit. (**E**) Heatmap summarizing the Cit-K expression levels observed in the different organs at the different developmental stages indicated. The heatmap generated with Graphpad Prism was constructed from the mean levels of Cit-K expression measured in the different tissues at different times. A.U.: arbitrary unit.

KRAS protein expression is detected at the cell membrane and in the cytoplasm

Many *in vitro* studies have shown that KRAS has to be localized to the cell membrane to activate its downstream signaling pathways (reviewed in Haidar & Jacquemin, 2021). However, we found that the steady-state localization of Cit-K was predominant at the membrane in a number of tissues, and cytoplasmic in others. Our observations above (see for example the kidney in **Figure 6A**) suggest that this is not always the case *in vivo*. Low magnification pictures at first sight indicated that lung bronchiolar cells and intestinal enterocytes showed KRAS enrichment at the cell membrane, while alveolar cells, pancreatic endocrine cells and renal tubular cells showed the presence of significant amount of KRAS in their cytoplasm (**Figure 7A**). Indeed, confocal imaging of co-labeling with GFP, E-CADHERIN, and DAPI enabled us to subcellularly locate Cit-K and to semi-quantitatively assess its subcellular distribution, as described in Materials and Methods. This revealed that in the bronchiolar cells and enterocytes, Cit-K was preferentially present at the cell membrane, while in the alveolar, endocrine and tubular cells, Cit-K was equally partitioned between the membrane and the cytoplasm (**Figure 7B**). Double immunolabeling for Cit-K and for a marker of lysosomes, endoplasmic reticulum, and mitochondria indicated that Cit-K does not colocalize with these cellular organelles (**Supplementary Figure 4**).

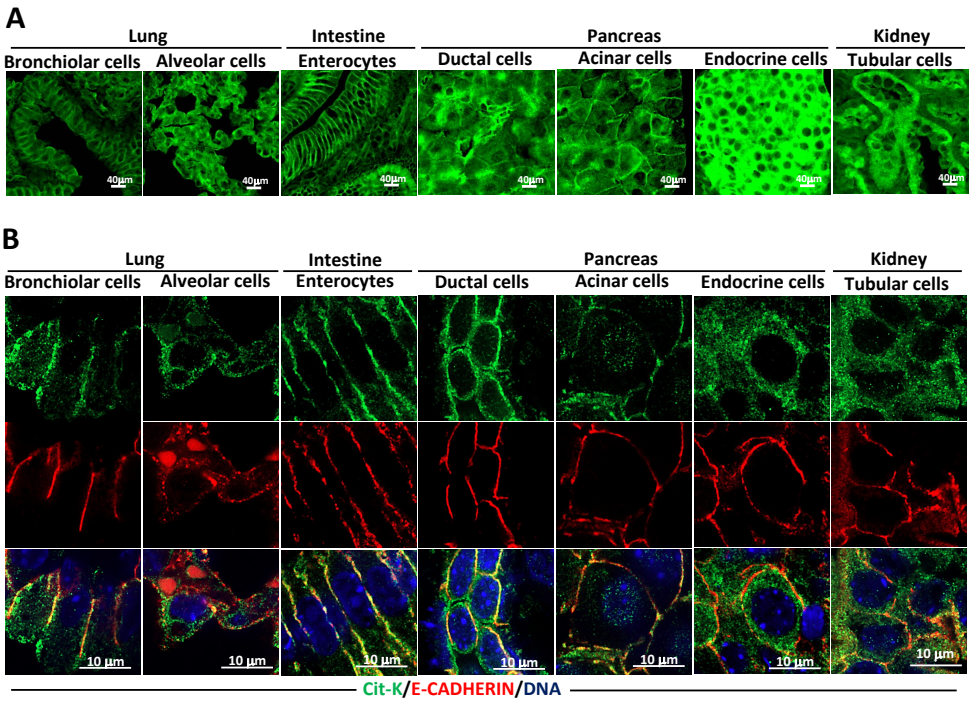


Figure 7. The cellular localization of KRAS varies according to the cell type. (**A**) Immunolabelling performed on lung, intestine, pancreas, and kidney sections of 8-week-old *Kras*$^{cit/cit}$ mice for Cit-K. (**B**) Confocal images of Cit-K and E-CADHERIN (E-CAD; used as a cell membrane marker) immunolabelling performed on lung, intestine, pancreas, and kidney sections of 8-week-old *Kras*$^{cit/cit}$ mice. DAPI was used to visualize cell nuclei.

1.5. Discussion

Since its discovery more than 40 years ago, multiple functions have been attributed to KRAS, including in cell proliferation, differentiation and apoptosis. From immunostaining studies performed shortly after its discovery (Chesa et al., 1987 and Furth et al., 1987), it was assumed that KRAS was expressed ubiquitously; however, these studies have not been confirmed, and their conclusions were challenged when the capacity of available anti-KRAS antibodies to immunostain KRAS on tissues was questioned (Waters et al., 2017).

Previous KRAS expression data obtained by Northern or Western blotting came from bulk samples, preventing a clear idea of its expression pattern at the cell level. To address this issue in the absence of valid antibodies, we used the *Kras*^{cit} mouse model which allows to detect the expression of KRAS using a GFP antibody (Assi et al., 2021). It should be noted that our *Kras*^{Cit} mouse model detects both splicing

isoforms of KRAS, KRAS4 and KRAS4B. As the *Kras*^{Cit} fusion gene is located in the endogenous *Kras* locus, the resulting mRNA is expected to be spliced identically to endogenous *Kras* mRNA, yielding Cit-K4A and Cit-K4B proteins in an identical expression ratio to KRAS4A and KRAS4B proteins.

Our results show that KRAS is widely expressed in embryonic tissues. As embryogenesis progresses, its expression becomes tissue-restricted; this restriction is most prominent in the mesenchymal compartment, allowing us to conclude that KRAS expression is epithelial-enriched as birth approaches. After birth, this trend continues and is also accompanied by preferential expression in specific cell types. Low KRAS expression in the mesenchyme may explain why KRAS is weakly expressed in sarcomas and why *KRAS* mutations are rare in this type of cancer (AACR Project GENIE Consortium, 2017). From a functional point of view, it would be interesting to study whether the effectors downstream of KRAS are identical between epithelial and mesenchymal cell types. This could help understanding why KRAS gene amplification is associated with epithelial-to-mesenchymal transition and the degree of dedifferentiation in pancreatic cancer (Mueller et al., 2018).

A comparison of *Kras* mRNA (Leon et al., 1987) and Cit-K expression confirms the presence of *Kras* mRNA and KRAS protein in many organs. This comparison also confirms the absent or very low expression in skeletal muscle. In contrast, this study revealed significant expression of *Kras* mRNA in the heart. This difference compared to our study can be explained by the fact that we do not observe any expression in the cardiomyocytes, but that an expression is indeed detected in other cell types of the heart (e.g. in CD31^{+} cells) or by the presence of post-transcriptional regulatory mechanisms. The absence of KRAS expression in cardiomyocytes is surprising as a heart defect is probably the cause of the death in *Kras*$^{-/-}$ embryos (Korea et al., 1997). This can be explained either by an early expression of KRAS in the cardiomyocytes (before E13.5) or by the defect of another organ which affects the developing heart.

Interestingly, we observe KRAS expression in liver sinusoidal cells, a specialized endothelial cell type found notably in the organ. This observation may be linked to the discovery that *KRAS* mutations in these cells specifically lead to the development of hepatic vascular cavernomas (Janardhan et al., 2020), a benign tumor of the liver characterized by the presence of dilated endothelial-lined vascular spaces.

Our data show KRAS protein expression in several tissues. Muscle cells are a notable exception, regardless of their type (skeletal, cardiac, or smooth), as they exhibit low or undetectable KRAS expression. This suggests that the presence of a thin ventricular myocardium observed in *Kras*$^{-/-}$ embryos (Koera et al., 1997) results from a non-cell autonomous mechanism or from dysfunction of another organ that indirectly impacts cardiomyocyte function.

KRAS activity requires its location at the cell membrane, but our study reveals that KRAS can be observed in significant amounts in the cytoplasm in a subset of cell types. This is in sharp contrast with cultured cell lines where KRAS is essentially membrane-bound. Therefore, our *Kras*^{Cit} mouse model represents an interesting tool to investigate the subcellular location of KRAS in tissues in a physiological or pathophysiological setting. In that context, the induction of enzymes that catalyze post-translational modifications of KRAS necessary for its membrane localization was shown to be highly context-dependent (Assi et al., 2020). Moreover, cytoplasmic expression of KRAS was associated with resistance of pancreatic acinar cells to tumor-promoting KRAS mutations: KRAS mutants were expressed, but not properly located for exerting their function (Assi et al., 2020). We therefore speculate that our present data showing KRAS predominantly in the cytoplasm of pancreatic endocrine cells provides an explanation to the insulin-producing β cells' refractoriness to KRAS-mediated transformation (Gidekel Friedlander et al., 2009). A limitation of our study is the use of a fusion protein which could be processed differently and present a different trafficking from the endogenous form; still our validation of the Cit-K fusion protein (Assi et al., 2021) does not support this.

In conclusion, our results unravel the developmental, tissular, cell-specific and subcellular expression profile of KRAS protein, and provide insight into the mechanisms conferring sensitivity to KRAS mutations during tumor initiation. They also underscore the usefulness of *Kras*^{Cit} mice, and suggest the development of similar approaches to investigate the biology of the other two members of the RAS family, NRAS and HRAS.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

MM, MA and PJ contributed to conception and design of the study. MM, MA, ML and SC performed the data acquisition. MM performed the statistical analysis. MM, MA and PJ performed the data analysis and data interpretation. MM wrote the first draft of the manuscript. MM, MA, and PJ contributed to manuscript revision. FL critically revised the manuscript. All authors approve the submitted version.

Funding

This work was supported by grants from the Foundation for Cancer Research (#2018-078, and #2018-076 to F.P. Lemaigre and P. Jacquemin) and Télévie (#7.4595.15 and #7.4502.16 to F.P. Lemaigre and P. Jacquemin). MM and ML hold a Télévie fellowship. MA is Research Assistant at the National Fund for Scientific Research (FRS-FNRS, Belgium). P. Jacquemin is Research Director at FRS-FNRS, Belgium.

Acknowledgments

The authors thank the members of the LPAD laboratory for help and discussions, Jean-Nicolas Lodewyckx and Hajar Dahou for mouse genotyping, and Bruno Maricq for their help in mouse care.

1.6. Reference

AACR Project GENIE Consortium. (2017). AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. Cancer Discovery, 7(8), 818–831. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0151

Assi, M., Achouri, Y., Loriot, A., Dauguet, N., Dahou, H., Baldan, J., Libert, M., Fain, J. S., Guerra, C., Bouwens, L., Barbacid, M., Lemaigre, F. P., & Jacquemin, P. (2021). Dynamic Regulation of Expression of KRAS and Its Effectors Determines the Ability to Initiate Tumorigenesis in Pancreatic Acinar Cells. Cancer Research, 81(10), 2679–2689. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2976

Assi, M., Pirlot, B., Stroobant, V., Thissen, J.-P., & Jacquemin, P. (2020). A Novel KRAS Antibody Highlights a Regulation Mechanism of Post-Translational Modifications of KRAS during Tumorigenesis. International Journal of Molecular Sciences, 21(17), 6361. https://doi.org/10.3390/ijms21176361

Barbacid, M. (1987). ras GENES. Annual Review of Biochemistry, 56(1), 779–827. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.004023

Chesa, P. G., Rettig, W. J., Melamed, M. R., Old, L. J., & Niman, H. L. (1987). Expression of p21ras in normal and malignant human tissues: lack of association with proliferation and malignancy. Proceedings of the National Academy of Sciences, 84(10), 3234–3238. https://doi.org/10.1073/pnas.84.10.3234

Cox, A. D., Der, C. J., & Philips, M. R. (2015). Targeting RAS membrane association: Back to the future for anti-RAS drug discovery? Clinical Cancer Research, 21(8), 1819–1827. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3214

Furth, M. E., Aldrich, T. H., & Cordon-323 Cardo, C. (1987). Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissues. Oncogene, 1(1), 47–58. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3125507

Gidekel Friedlander, S. Y., Chu, G. C., Snyder, E. L., Girnius, N., Dibelius, G., Crowley, D., Vasile, E., DePinho, R. A., & Jacks, T. (2009). Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. Cancer Cell, 16(5), 379–389. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.027

Haidar, M., & Jacquemin, P. (2021). Past and future strategies to inhibit membrane

localization of the kras oncogene. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 22, Issue 24). MDPI. https://doi.org/10.3390/ijms222413193

Hawkins, F., Rankin, S. A., Kotton, D. N., & Zorn, A. M. (2016). The Genetic Programs Regulating Embryonic Lung Development and Induced Pluripotent Stem Cell Differentiation. In A. Jobe, J. Whitsett, & S. Abman (Eds.), Fetal and Neonatal Lung Development (pp. 1–21). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/CBO9781139680349.002

Janardhan, H. P., Meng, X., Dresser, K., Hutchinson, L., & Trivedi, C. M. (2020). KRAS or BRAF mutations cause hepatic vascular cavernomas treatable with MAP2K–MAPK1 inhibition. Journal of Experimental Medicine, 217(7). https://doi.org/10.1084/jem.20192205

Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hatta, T., Otani, H., Aiba, A., & Katsuki, M. (1997). K-Ras is essential for the development of the mouse embryo.

Leon, J., Guerrero, I., & Pellicer, A. (1987). Differential expression of the ras gene family in mice. Molecular and Cellular Biology, 7(4), 1535–1540. https://doi.org/10.1128/mcb.7.4.1535-1540.1987

Lowy, D. R., & Willumsen, B. M. (1993). FUNCTION AND REGULATION OF RAS. Annual Review of Biochemistry, 62(1), 851–891. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.004223

Mueller, S., Engleitner, T., Maresch, R., Zukowska, M., Lange, S., Kaltenbacher, T., Konukiewitz, B., Öllinger, R., Zwiebel, M., Strong, A., Yen, H. Y., Banerjee, R., Louzada, S., Fu, B., Seidler, B., Götzfried, J., Schuck, K., Hassan, Z., Arbeiter, A., … Rad, R. (2018). Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. Nature, 554(7690), 62–68. https://doi.org/10.1038/nature25459

Nakamura, K., Ichise, H., Nakao, K., Hatta, T., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., & Katsuki, M. (2008). Partial functional overlap of the three ras genes in mouse embryonic development. Oncogene, 27(21), 2961–2968. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210956

Newlaczyl, A. U., Coulson, J. M., & Prior, I. A. (2017). Quantification of spatiotemporal patterns of Ras isoform expression during development. Scientific Reports, 7 https://doi.org/10.1038/srep41297

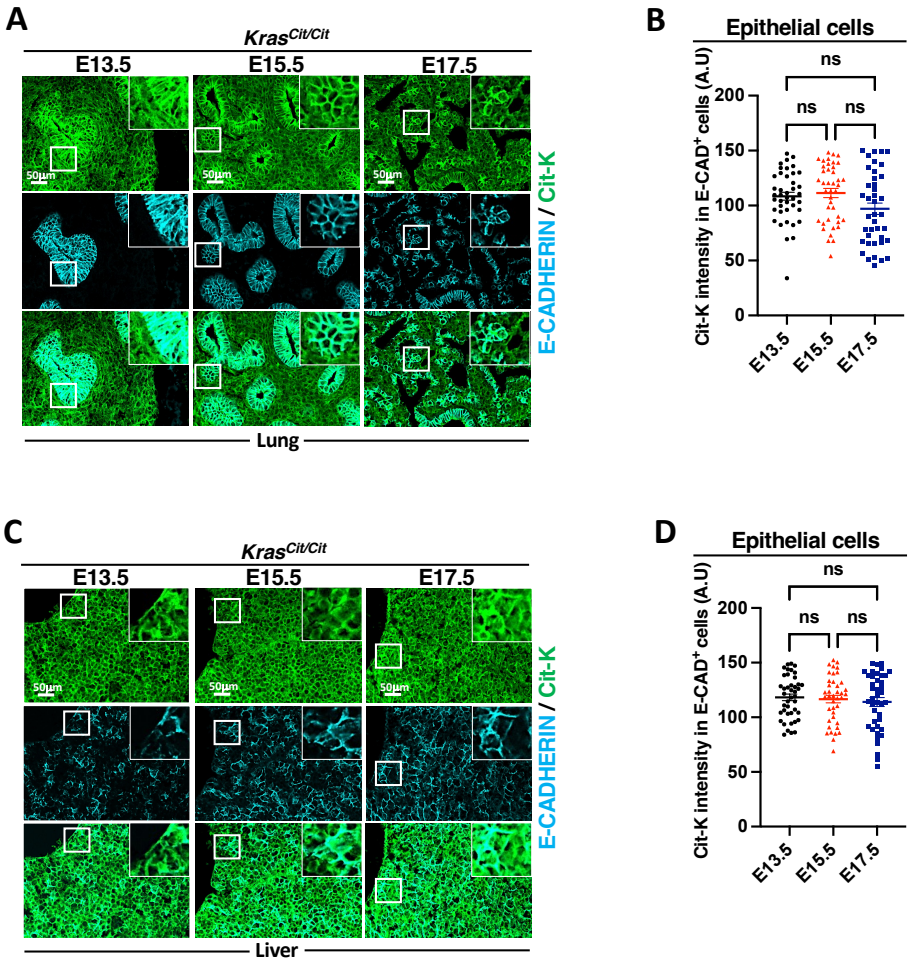
Prior, I. A., & Hancock, J. F. (2012). Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. Seminars in Cell & Developmental Biology, 23(2), 145–153. https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2011.09.002

Simanshu, D. K., Nissley, D. v, & McCormick, F 361 . (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. Cell, 170(1), 17–33. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009

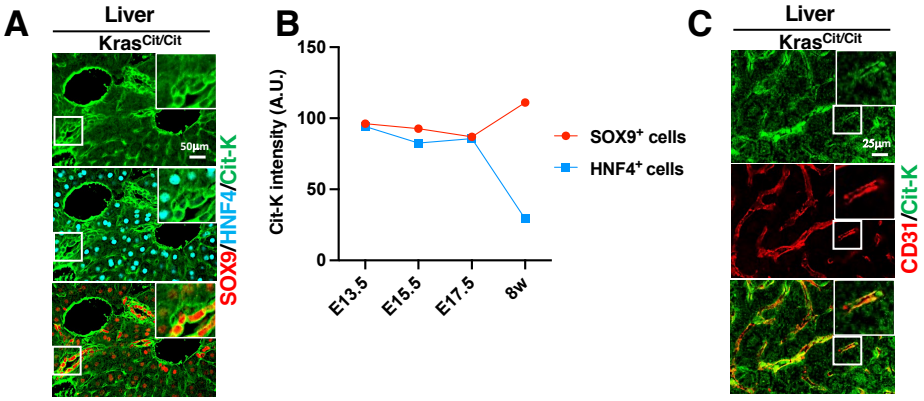
Stephen, A. G., Esposito, D., Bagni, R. G., & McCormick, F. (2014). Dragging ras back in the ring. Cancer Cell, 25(3), 272–281. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.017

Waters, A. M., Ozkan-Dagliyan, I., Vaseva, A. v., Fer, N., Strathern, L. A., Hobbs, G. A., Tessier- Cloutier, B., Gillette, W. K., Bagni, R., Whiteley, G. R., Hartley, J. L., McCormick, F., Cox, A. D., Houghton, P. J., Huntsman, D. G., Philips, M. R., & Der, C. J. (2017). Evaluation of the selectivity and sensitivity of isoform- and mutation-specific RAS antibodies. Science Signaling, 10(498), eaao3332. https://doi.org/10.1126/scisignal.aao3332

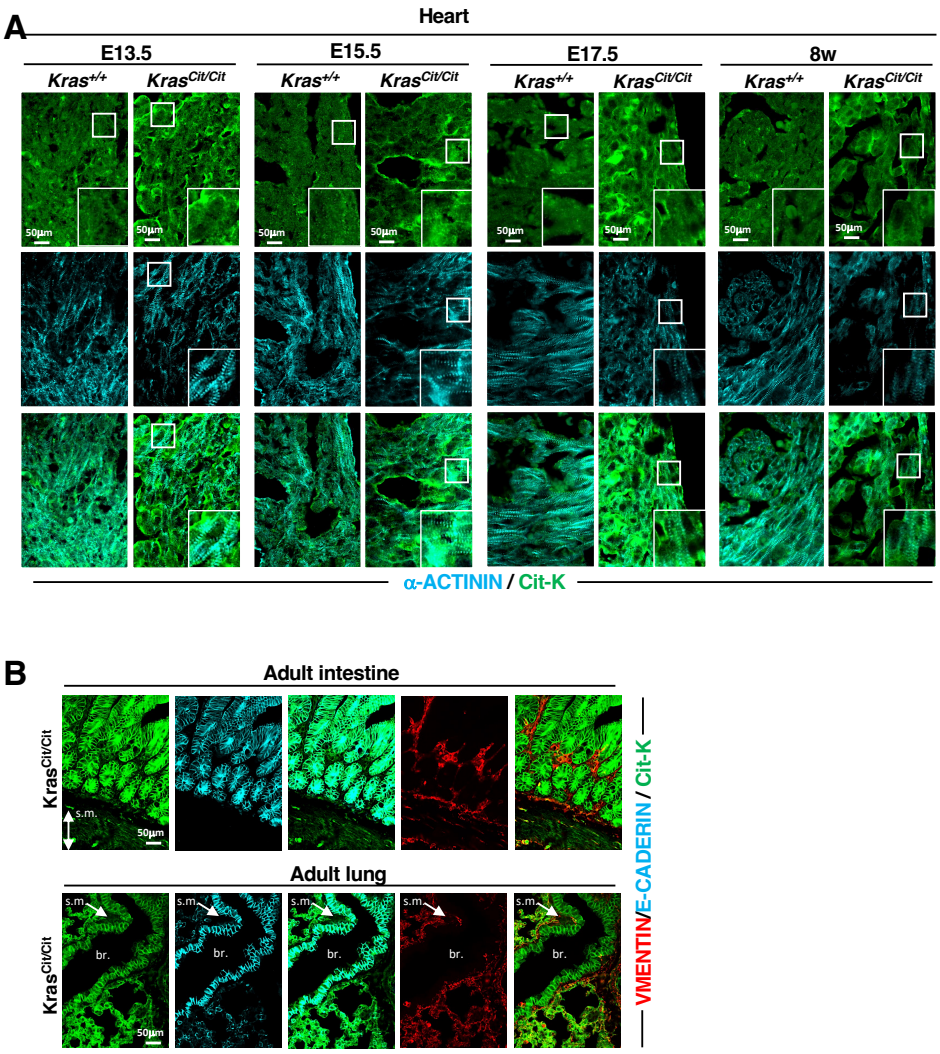
1.7. Supplementary figures



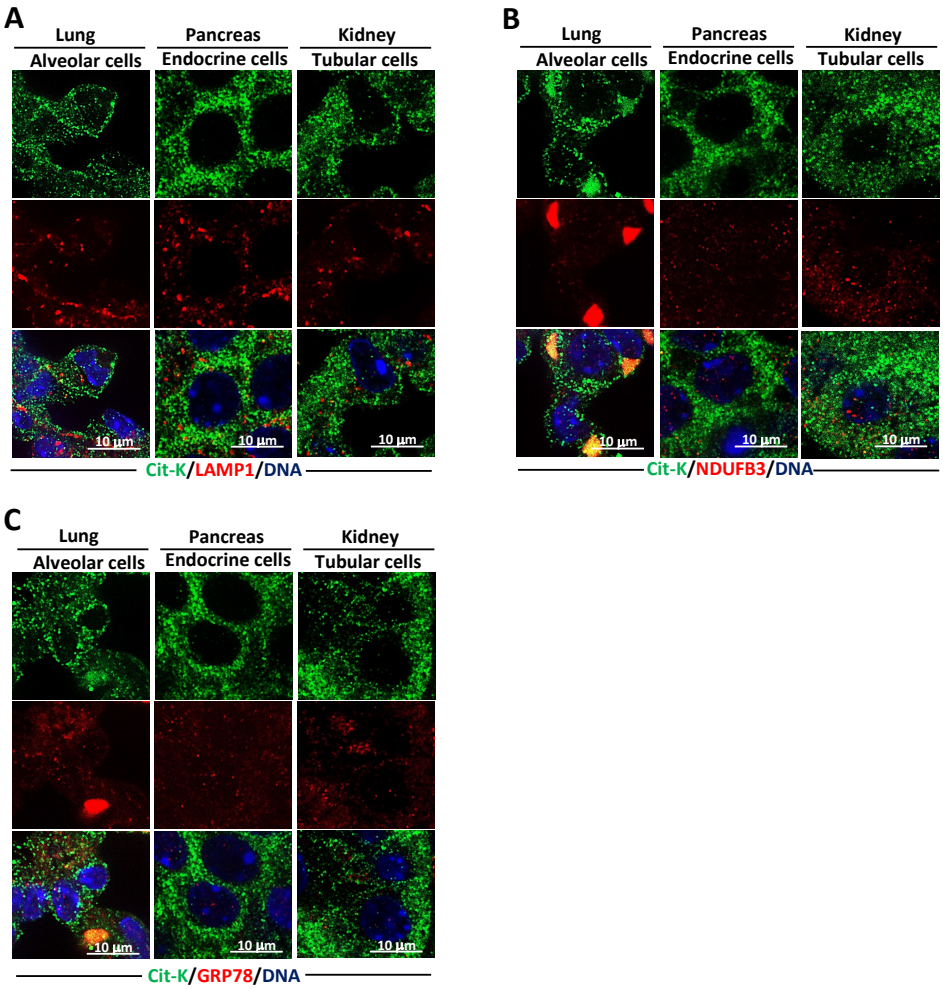
Supplementary Figure 1. KRAS expression is maintained in epithelial cells during lung and liver development. (**A**) Cit-K and E-CADHERIN (E-CAD) immunolabeling performed on lung sections of *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos at E13.5, E15.5 and E17.5. (**B**) Quantification by FIJI software of Cit-K labeling intensity in lung epithelial (E-CAD^{+}) cells. (**C**) Cit-K and E-CAD immunolabeling performed on liver sections of *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos at E13.5, E15.5 and E17.5. (**D**). Quantification by FIJI software of Cit-K labeling intensity in liver epithelial E-CAD^{+} cells. In B and D, one dot represents the mean of three measures of signal intensity of one cell. Data are mean +/- SEM of 40 cells (n=4 embryos). Statistical significance was tested by Student's t-test. ns, not significant.



Supplementary Figure 2. KRAS expression increases in cholangiocytes but decreases in hepatocytes at the adult stage. (**A**) Immunolabeling performed on adult liver sections of *Kras*$^{Cit/Cit}$ mice for Cit-K, SRY-box transcription factor 9 (SOX9) and Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4). (**B**) Graph showing the signal intensity of Cit-K labeling in SOX9+ and HNF4+ cells in the three embryonic and adult stages. Quantification was performed by FIJI software. Data are mean +/- SEM of 40 cells (n=4 embryos). A.U.: arbitrary unit. (**C**) Immunolabeling performed on adult liver sections of *Kras*$^{Cit/Cit}$ mice for Cit-K and CD31, used as marker of hepatic sinusoids.



Supplementary Figure 3. KRAS is not expressed in cardiomyocytes. (**A**) Immunolabeling for Cit-K and α-ACTININ (used as a marker for cardiomyocytes) performed on E13.5, E15.5, E17.5, and adult (8-week-old) heart sections of *Kras*$^{Cit/Cit}$ mice. (**B**) Immunolabelling performed on adult intestine (top) and intestine (bottom) sections of 8-week-old *Kras*$^{Cit/Cit}$ mice for Cit-K, E-CADHERIN, as epithelial cell marker, nand VIMENTIN (VIM), as mesenchymal cell marker. br, bronchiole; sm, smooth muscle. The double-headed arrow shows the thickness of intestinal smooth muscle.



Supplementary Figure 4. KRAS is not associated with cellular organelles. Immunolabeling for Cit-K, LAMP1 (marker of lysosomes) (**A**), NDUFB3 (marker of mitochondria) (**B**), and GRP78 (marker of endoplasmic reticulum) (**C**) performed on adult (8-week-old) lung, pancreas, and kidney sections of *Kras*$^{Cit/Cit}$ mice. DAPI was used to visualize cell nuclei.

2. KRAS, par le biais de son isoforme d'épissage KRAS4B, est nécessaire pour le développement du placenta.

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous nous sommes penchés sur les rôles de KRAS et de ses deux isoformes d'épissage, KRAS4A et KRAS4B dans le développement embryonnaire murin. Pour cela, nous avons généré et caractérisé deux modèles murins, le premier déficient en KRAS4A, et le second déficient en KRAS4B. Nous avons ensuite comparé les phénotypes observés à ceux présents dans un modèle murin déficient en KRAS. Cette caractérisation phénotypique nous a permis de mettre en évidence que le caractère essentiel de KRAS lors du développement embryonnaire était dû à son rôle critique dans le développement placentaire et cardiaque. De plus, nous avons montré que KRAS4B est l'isoforme assurant majoritairement les fonctions de KRAS lors du développement embryonnaire.

Ce chapitre rassemble donc les résultats d'une série d'expériences réalisées dans le but de mieux comprendre les rôles de KRAS et de ses isoformes d'épissage dans le développement embryonnaire. Le manuscrit décrivant ces résultats n'a pas encore été soumis à publication dans la mesure où des expériences de *single nucleus RNA sequencing* (snRNA-seq) et de phospho-protéomiques réalisées sur des échantillons de placentas doivent encore être finalisées avant d'être incluses dans ce manuscrit. Les résultats de ces expériences sont ainsi en train de fournir des explications mécanistiques sur les phénotypes des modèles murins décrits dans notre présente étude.

Dans cette étude, j'ai contribué à la conception expérimentale, à l'acquisition des données, à l'analyse et à l'interprétation des résultats, ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

KRAS through its splicing isoform KRAS4B is required for placental development

Marie-Albane Minati[1], Younes Achouri[1], Sophie Pirenne[1], Francesca Rochais[2], Patrick Jacquemin[1,*]

[1] Université catholique de Louvain, de Duve Institute, Brussels, Belgium

[2] Aix-Marseille Université, INSERM, Marseille Medical Genetics, Marseille, France

* Correspondance : Patrick Jacquemin. Email : patrick.jacquemin@uclouvain.be

Keywords: KRAS4A, KRAS4B, development, placenta, heart

2.1. Abstract

Besides its well-known roles in cancer, KRAS is also important for embryogenesis, as its absence causes embryonic lethality. The precise mechanisms underlying the developmental functions of KRAS, as well as the respective roles of its two splicing isoforms, KRAS4A and KRAS4B, are still incompletely characterized. To address these issues, we generated *Kras4A knock-out* (*Kras4A*$^{-/-}$) and *Kras4B*$^{-/-}$ mouse models using CRISPR/Cas9 technology, and we compared the phenotypes of these models to those of a *Kras*$^{-/-}$ model (in which both isoforms are simultaneously inactivated).

We observed that *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos show a lethality that starts around E13.5, while *Kras4A*$^{-/-}$ embryos develop normally. A detailed analysis of the latter revealed no phenotypic abnormality. In contrast, a dual phenotype, cardiac and placental, was observed in *Kras*$^{-/-}$ embryos, while only the placental phenotype was present in *Kras4B*$^{-/-}$ embryos. The cardiac phenotype was complex, combining ventricular non-compaction, ventricular septal defects, double outlet right ventricle, and overriding aorta. The placental phenotype was associated with a small placental size, and a marked decrease in glycogen trophoblast cells. This phenotype was related to the presence of hypoglycemia and hypoxia in *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos. Thus, our study confirms the predominant role of KRAS4B in the developmental functions performed by KRAS, but also reveals hidden functions of KRAS4A. Importantly, it identifies for the first time a role for KRAS in the differentiation process of a specific cell type and the biological defects caused by a loss of KRAS.

2.2.Introduction

The GTPase Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) has initially been identified by its oncological properties, and subsequently been shown to exhibit functions during mammalian embryogenesis. Studies about the developmental role of KRAS using knock-out (KO) mouse models have highlighted that the lack of KRAS induces severe growth defects resulting in *in utero* death around E15.5 (L. Johnson et al., 1997 ; Koera et al., 1997). Detailed characterization of *Kras*$^{-/-}$ embryos revealed that they present features of anemia, fetal liver defect (decellularization) (L. Johnson et al., 1997), motor neuronal defect (cell death), and ventricular myocardium atrophy (Koera et al., 1997).

Kras gene is subject to an alternative splicing event which leads to the generation of two proteins, KRAS4A and KRAS4B. The two mRNA isoforms are differentiated by the presence of an alternative fourth exon. As this fourth exon is also the last one, this means that at the protein level, the two isoforms differ only by their C-terminal end. This C-terminus is essential for membrane targeting of both isoforms, a process that is essential for their activity. The two isoforms have a CAAX (cysteine - aliphatic amino acid - aliphatic amino acid - serine or methionine) consensus sequence at their end which is modified by the successive activity of three enzymes to lead to the addition of a farnesyl group at the C-terminal end (Haidar & Jacquemin, 2021). Hydrophobicity created by this farnesylation is not sufficient to anchor KRAS4A and KRAS4B to the membrane. To increase the membrane affinity, KRAS4A undergoes a palmitoylation on a cysteine upstream to the CAAX motif while the KRAS4B uses a polybasic lysine domain (Lowy & Willumsen, 1993). The fact that KRAS isoforms anchor to the membrane through different mechanisms suggests that both isoforms have distinct membrane localizations and/or functions.

An important question related to the functions of the two isoforms is their respective place and level of expression. In the absence of KRAS4A antibodies functioning in a reproducible manner, their expression pattern was determined at the transcription level by qRT-PCR. If *Kras4B* represents the major isoform in terms of expression level, *Kras4A* nevertheless shows dynamically and spatially regulated expression through embryogenesis (Newlaczyl et al., 2017). A study of KRAS4A-deficient mice showed that these mice are healthy and fertile, indicating that KRAS4A is dispensable for embryonic development (Plowman et al., 2003). More recently, a study of KRAS4B-deficient mice found that these mice die perinatally (Salmón et al., 2021). They display heart abnormalities, strongly resembling those observed in *Kras*$^{-/-}$ embryos. These results indicate that the developmental functions of KRAS are most likely mediated by KRAS4B. Interestingly, however, it has been shown that KRAS4A can perform these functions as well, as mice with a *Kras4A* cDNA knock-in in the *Kras* locus (preventing KRAS4B expression) are viable, with no apparent phenotype (Chen et al., 2021). This suggests that the developmental properties of KRAS4B rely, at least in part, on its expression specificities.

Although informative about the roles of KRAS4A and KRAS4B during development, these different studies did not provide mechanistic data on how KRAS (and its splicing isoforms) exerts its functions. Furthermore, in a way that probably cannot be explained by a difference in genetic background, these studies describe phenotypes (with the exception of the cardiac phenotype) that are not found between them. To clarify the functions of KRAS, as well as those of its splicing isoforms, and gain mechanistic insight underlying their functions, we generated KRAS4A- or KRAS4B-deficient mouse models. We then characterized their phenotypes in detail, and performed a comparison with a mouse model of *Kras* inactivation (which loses both isoforms). Unexpectedly, we have identified new roles for KRAS in heart septation and placenta development, the latter role being supported by KRAS4B.

2.3. Materials and methods

Mice

All procedures described in this study were performed with the approval of the animal welfare committee of the UCLouvain Health Sciences Sector (Brussels, Belgium, reference 2021/UCL/MD/054).

Embryos deficient in KRAS were generated by breeding $Kras^{LSL\text{-}G12D/+}$ mice (Jackson et al., 2001) to obtain $Kras^{LSL\text{-}G12D/LSL\text{-}G12D}$ embryos. The presence of the LSL cassette precluding the transcription of the *Kras* gene, these mice cannot express KRAS and thus represent a model of functional *Kras* KO. For this reason, we call them here $Kras^{-/-}$.

$Kras4A^{-/-}$ and $Kras4B^{-/-}$ were generated using the cloning-free CRISPR-Cas9 system(Aida et al., 2015). To target the mouse *Kras* gene we used CRISPR direct software for designing the guide RNA (http://crispr.dbcls.jp/). The guide RNA was designed to target *Kras* exon 4A or 4B, as shown in Figure 1. A ribonucleoprotein complex containing 2.4 pmol/µl crRNA/tracrRNA and 200 ng/µl Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3 (IDT, 1081059) was injected into the pronucleus of B6D2F2 mouse zygotes. Injected zygotes were transferred into oviduct of CD1 pseudo-pregnant female mice. Indel mutations were detected in the offspring by sequencing of PCR products. Breeding between $Kras4A^{+/-}$ mice generated $Kras4A^{-/-}$ mice, and breeding between $Kras4B^{+/-}$ mice generated $Kras4B^{-/-}$ mice.

$Kras^{Cit}$ mice expressing a Citrine-KRAS fusion protein (Cit-K) have been described (Assi et al., 2021). All strains used in the present study were maintained in a CD1-enriched background.

Tetraploid complementation

Generation of tetraploid-diploid chimeras was performed as previously described (Eakin & Hadjantonakis, 2006). Two-cell stage embryos were harvested from oviducts of embryonic day (E) 1.5 CD1 females and used to obtain tetraploid

embryos by electrofusion. The blastomeres were electro-fused in culture medium containing 0.3 M mannitol. CF-150B pulse generator and an electrode with a 1000-µm gap were used. Two square 120 V pulses for 40 µs duration were applied. Embryos were washed and transferred into a drop of KSOM medium. Embryo fusion were checked every 10-15 minutes under a stereo microscope. The fused embryos were transferred to a new drop of KSOM medium soon after fusion and allowed to develop to 4-cell stage (overnight at 37°C, 5% C02). Eight-cell stage diploid embryos were harvested from oviducts of E2.5 *Kras*$^{+/-}$ females mated with *Kras*$^{+/-}$ males. The zona pellucida of the embryos was dissolved in Acid Tyrode solution. The embryos were used immediately after to set up the aggregation. In each aggregation well, two tetraploid embryos "sandwiched" one diploid embryo. Embryos were then incubated at 37°C, 5% CO2. The next day, the aggregates that have formed a single embryo were selected and transferred into the oviduct of CD1 mice. We transferred a total of 106 embryos; 18 E15.5 living embryos were recovered, of which only one was KO for *Kras*, suggesting that *Kras*$^{-/-}$ embryos are particularly sensitive to in vitro manipulations.

Histological staining

Staining was performed on 6 µm-sections of formalin-fixed paraffin-embedded tissues. Tissue sections were deparaffinized 3 x 3 minutes in xylene, rehydrated in successive baths of 99%, 95%, 70%, 30% ethanol, and distillated water. For hematoxylin and eosin staining, sections were stained 14 seconds in Mayer's Hemalun solution (1.09249.1000, Millipore) and washed with tap water for 5 minutes. Then, sections were stained 7 seconds in Eosin solution (3137.2, Roth) and washed with tap water until stain fades. Periodic acid Shiff staining was performed using the Periodic Acid Shiff Staining Kit (395-1KT, Merck), following the manufacturer's protocol. After staining, tissue sections were shortly washed with 70%, 95% and 100% ethanol, and xylene before mounting slides with DPX (005790500, VWR).

Immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescent labeling

Embryos were fixed for 6 hours at 4°C in 4% paraformaldehyde before embedding in paraffin. Six-mm tissue sections were deparaffinized and antigen retrieval was performed by heating the slides for 20 minutes in Tris-EDTA buffer (pH 9) in Lab Vision PT Module (Thermo Fisher Scientific) or for 10 minutes in citrate buffer (pH 6) in a microwave. Sections were washed 5 minutes in phosphate-buffered saline (PBS), and permeabilized in PBS, 0.3% Triton X-100 (Sigma Aldrich) for 5 minutes at room temperature (RT). Then, tissue sections were blocked in PBS, 3% low-fat milk, 10% bovine serum albumin (BSA), 0.3% Triton X-100 (blocking buffer) for 45 minutes at RT. Primary antibodies (Table 1) were diluted in blocking buffer and incubated with the samples overnight at 4°C. Primary antibodies and antibody dilution are listed in Table 1. Then, slides were washed with PBS, 0.1% Triton X-100. Fluorescent-dye conjugated secondary antibodies were diluted in

PBS, 10% BSA, 0.3% Triton X-100, applied at 1/1000 dilution, and incubated for 1 hour at 37°C. For IHC, secondary antibodies conjugated with the horseradish peroxidase were incubated with the samples at 37°C for 1 hour, before DAB staining.

For immunofluorescent labeling, pictures were taken with an Axiovert 200 fluorescent microscope (Zeiss) using the AxioVision software, or with Cell Observer Spinning Disk Confocal Microscope using the ZEN software. For IHC, pictures were selected after scanning performed on Panoramic P250 Flash III (3DHistec). Quantifications were performed on at least 3-5 fields per stage/organ using the FIJI (ImageJ) or ZEN (Zeiss) softwares.

Table 1. Primary antibodies used.

Antibodies	Origin	Experiment	Dilution	Reference
CD31	Rat	IF	1/250	Dianova (D130)
CD45	Rabbit	IHC	1/100	Abcam (ab10558)
Cleaved CASPASE3	Rabbit	IHC	1/200	Cell signaling (9661S)
GFP	Goat	IF	1/250	Abcam (ab6673)
HIF-1a	Rabbit	WB	1/500	Cell signaling (36169S)
ISL1	Mouse	IF	1/200	DHSB (39.4D5 and 40.2D6)
Ki67	Mouse	IHC	1/200	Abcam (ab16667)
KRAS	Rabbit	WB	1/250	Homemade
KRAS4B	Mouse	WB	1/250	Merck (WH0003845M1)
NCAM1	Rabbit	IF/IHC	1/200	Proteintech (14255-1-AP)
PODXL	Mouse	IF	1/50	Bio-Techne (MAB1556)
STRA6	Rabbit	IF	1/100	Merck (ABN1662)
TER119	Rat	IHC	1/250	BD Bioscience (552370)
TPBPA	Rabbit	IIHC	1/100	Abcam (ab104401)

Western blotting

Tissues at E13.5 or E15.5 from *Kras*$^{-/-}$, *Kras4A*$^{-/-}$, *Kras4B*$^{-/-}$ or control *(+/+)* embryos were lysed in a buffer composed of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM sodium chloride, 0.25% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) and containing protease inhibitor cocktail (11836153001, Sigma Aldrich). Samples were kept on ice during the procedure. Then, samples were centrifuged (14000 g, 15 minutes, at 4°C) to pellet cell debris. Proteins were quantified using a Bradford assay. Samples containing 30 or 50 mg total proteins were separated on 12.5% SDS polyacrylamide gels. PVDF membranes (ISEQ00010, Millipore) were blocked with a solution of 5% low-fat milk diluted in Tris-buffered saline (TBS), 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich) for 1 hour at RT. Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (listed in Table 1). Then, membranes were washed with TBS, 0.1% Tween-20 and incubated with secondary antibodies for 1 hour at RT. After incubation, membranes were washed with TBS, 0.1% Tween-20 and revealed using SuperSignal™ West

Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (34577, Thermo Fisher), or SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34095, Thermo Fisher). HSC70 was used as loading control. Pictures were taken with the Fusion Solo S imaging system (Viber). Densitometry was measured using the FIJI software (ImageJ), and the ratio of the protein of interest over HSC70 was calculated.

Detection of tissue hypoxia

Hypoxia was detected with both a HIF-1α antibody and the Hypoxyprobe kit (HP1, Hypoxyprobe). Hypoxyprobe kit consist of pimonidazole hydrochloride solution and mouse monoclonal antibody for detection of pimonidazole adducts in hypoxic tissue. Pimonidazole hydrochloride solution (60 mg/kg) was injected intravenously in E13.5 pregnant females. Two hours later, pregnant females were euthanized by cervical dislocation, and embryos with their placenta were collected. Then, samples were fixed in 4 % paraformaldehyde for 6 hours at 4°C, before embedding in paraffin. Hypoxia, defined as partial pressure of oxygen (pO_2) < 10 mmHg, was investigated on 6-mm transverse embryo and placenta sections using manufacturer's protocol, and visualized as brown stain following immunochemistry using DAB chromogen detection.

Blood glucose measurement

Embryonic bloods were collected and glycemia were measured using a glucometer (Bayer Contour Next).

Statistical analysis

Data were presented as means ± standard error of the mean (SEM). Statistical significance of the difference between the percentage of KO embryos/mice that we have obtained compared to the expected 25% Mendelian percentage (**Figure 2A**) was calculated by Chi-squared test. The percentages of KO embryos/mice per stages were calculated from total embryos/mice ranging from 38 to 200. For the other experiments, statistical significance of the difference between two groups (groups contain embryos/mice ranging from 3 to 10) was calculated using unpaired Student's t-test. For all statistical analyses, the level of significance was set at $p<0.05$. Analyses were performed using GraphPad Prism software (version 9, GraphPad Software Inc). *,$p<0.05$; **,$p<0.01$; ***,$p<0.001$; ****,$p<0.0001$; ns, not significant**.**

2.4. Results

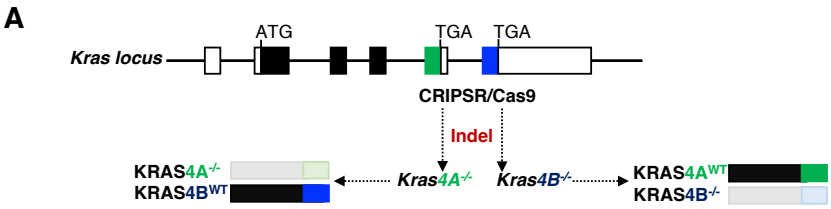
Generation of mouse models lacking the KRAS4A or KRAS4B isoform

To identify the specific roles of each isoform during embryonic development, we aimed to delete the C-terminus of each isoform which is required for targeting to the cell membrane and hence essential for their biological activity. To this end, we used the CRISPR/Cas9 technique to introduce an indel into the 5' part of exon 4 (**Figure 1A and B**). Furthermore, this localization allows the elimination of the α5-helix

which has been shown to be essential for the stability of KRAS4B, so that the protein generated following the presence of the indel is unstable and rapidly degraded (Salmón et al., 2021). Although the three-dimensional structure of KRAS4A is not known, AlphaFold predicts with very high confidence the presence of an α-helix at the corresponding sequence (https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P01116), suggesting that the loss of this sequence will also affect the stability of KRAS4A.

By following this strategy, two founders were identified for each model. One founder of the *Kras4A*$^{-/-}$ colony had a 14-nucleotide deletion and one founder of the *Kras4B*$^{-/-}$ colony had a 13-nucleotide deletion; proteins predicted from these deletions were 11 and 23 fewer amino acids than KRAS4A and KRAS4B, respectively (**Figure 1C**). The other two founders had a deletion that moved up the intron upstream of exon 4, which did not allow us to predict the protein sequences encoded by these mutated alleles (**Figure 1C**). In the 4 founders, the indels induced the loss of the stabilizing α-helix and the sequence allowing localization to the membrane.

In the absence of a reliable KRAS4A antibody, we sought to detect the presence of the mutant proteins by Western blot using antibodies for KRAS (detecting the two isoforms) and KRAS4B. For the two *Kras4A* founders, no difference was observed in the intensity of the 21kDa bands obtained with the KRAS and KRAS4B antibodies for +/+ and -/- mice (**Figure 1D**); this is very probably explained by the fact that the expression of the 4A isoform is markedly lower in the liver (organ used here as the source of the proteins tested in Western Blotting) than that of the 4B isoform (Salmón et al., 2021). Importantly, no band smaller than 21kDa was observed with the KRAS antibody, indicating that the mutant forms were rapidly degraded, as expected. In addition, the loss of KRAS4A did not affect the expression level of KRAS4B, which was equivalent between the two genotypes (**Figure 1D**). For both *Kras4B* founders, as expected, no band was observed with the KRAS4B antibody, while no band smaller than 21kDa was found with the KRAS antibody; only two weak bands around 21kDa, corresponding more probably to KRAS4A, were observed with the KRAS antibody (**Figure 1D**). These results confirm that the generated mutations induce inactivation of the corresponding KRAS splicing isoforms.



B

Exon 4A AGAGTGGAGGATGCTTTTTATACATTGGTGAGAGAGATCCGACAGTACAGATTGAAAAAA
ATCAGCAAAGAAGAAAAGACTCCTGGCTGTGTGAAAATTAAAAAATGCGTTATAATGTAA

Exon 4B GGTGTTGACGATGCCTTCTATACATTAGTCCGAGAAATTCGAAAACATAAAGAAAAGATG
AGCAAAGATGGGAAGAAGAAGAAGAAGAAGTCAAGGACAAGGTGTACAGTTATGTGA

C

	Founder	Indel	Terminal amino acid sequence
		Kras4A wild-type :	RVEDAFYTLVREIRQYRLKKISKEEKTPGCVKIKKCVIM (39 aa)
Kras4A-/-	F605	**Del-14N**	RVEDGERDPTVQIEKNQQRRKDSRLCEN (28 aa)
	F606	**Del-59N Ins-1N**	Undetermined (deletion in upstream intron and 5' part of 4A exon)
		Kras4B wild-type:	GVDDAFYTLVREIRKHKEKMSKDGKKKKKKSRTRCTVM (38 aa)
Kras4B-/-	F635	**Del-13N**	GVDDAFEKFENIKKR (15 aa)
	F3575	**Del-201N**	Undetermined (deletion in upstream intron and 5' part of 4B exon)

D

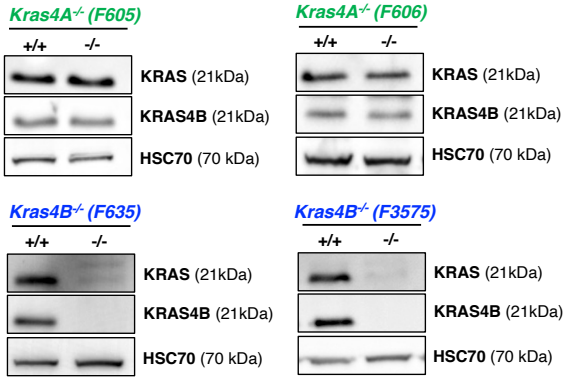


Figure 1. Generation of the *Kras4A*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ mouse models. (**A**) Scheme depicting the generation of the *Kras4A*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ models using CRISPR/Cas9. Genomic structure of the *Kras* locus is represented by white (non-coding sequences) and black boxes (coding-sequences). Exons 4A and 4B correspond to the green and blue boxes, respectively. The strategy used aims to insert or delete (indel) nucleotides in exons 4A and 4B by non-homologous DNA end-joining following Cas9 cleavage. (**B**) Nucleotide sequences of exons 4A and 4B, with the sequences corresponding to the single guide RNA used (yellow), and the PAM motifs (red). (**C**) Characteristics of the founders used to generate the *Kras4A*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ models. The codes (F…) correspond to the founder mice (2 founders per model). Indel indicates the number of nucleotides (N) inserted (Ins) and/or deleted (Del) in exons 4A or 4B for each model. Terminal amino acid sequence indicates the single-letter amino acid sequence encoded by exons 4A (green) and 4B (blue) from the *wild-type* allele, as well as

the aa sequences predicted following the presence of indels in the different models. (**D**) Western blotting performed on liver extracts from embryos descending from the two founders (F605 and F606) of the *Kras4A*$^{-/-}$ colony and the two founders (F635 and F3575) of the *Kras4B*$^{-/-}$ colony. Due to the presumably lower expression of KRAS4A, no decreased KRAS expression (detected with an antibody recognizing both isoforms) is seen in *Kras4A*$^{-/-}$ embryos. KRAS4B expression (detected with an antibody specifically recognizing KRAS4B) is not affected in *Kras4*$^{-/-}$ mice. In *Kras4B*$^{-/-}$ embryos, KRAS4B expression is completely lost, while low KRAS4A expression is detected using the antibody recognizing both isoforms. Heat shock cognate protein 70 (HSC70) was used as loading control.

Embryonic lethality observed in the absence of KRAS is associated with the loss of KRAS4B

To determine the respective role of each isoform in embryonic development, we were first interested in studying whether they are necessary for embryonic development. For this, we analyzed the frequency of *Kras4A*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos found at different embryonic stages and after birth, and compared these frequencies to those observed for *Kras*$^{-/-}$ embryos.

While *Kras4A*$^{-/-}$ mice are viable (**Figure 2A**) and fertile (data not shown), embryonic lethality starting between E13.5 and E15.5 was observed both in *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos (**Figure 2A**). No *Kras*$^{-/-}$ mice were detected the day after birth, while rare *Kras4B*$^{-/-}$ (1/98 at P1 and 1/168 at P21) mice could be observed. Analysis of the macroscopic phenotype of E15.5 embryos highlighted that *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos are characterized by a small size compared to control littermates; paleness and hemorrhages were also occasionally seen in *Kras*$^{-/-}$ embryos (**Figure 2B**). The weight of KO embryos in both models was reduced by about 1.5 times compared to their littermates, as were their placenta weight (about 2.0 times lower) and the liver weight of *Kras*$^{-/-}$ embryos (**Figure 2C**). When the organ/embryo weight ratio was calculated, no difference was nevertheless observed for the liver/embryo ratio between control and KO embryos, while for the placenta, a significantly lower ratio was observed for KO embryos (**Figure 2D**). These results indicate that the mortality of *Kras*$^{-/-}$ embryos relies on the loss of KRAS4B. They suggest that KO placental function is defective, possibly explaining the smaller size of KO embryos.

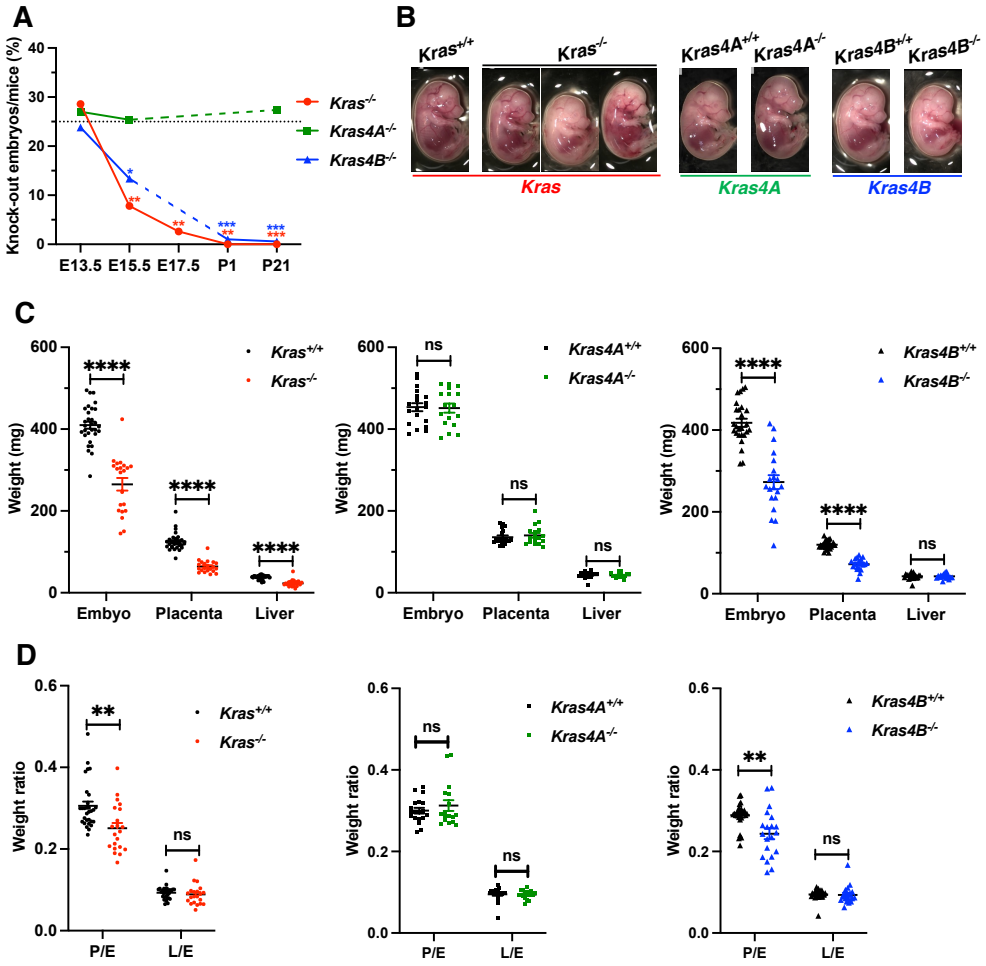


Figure 2. *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ mice die in utero and have an impaired growth. (**A**) Percentage of *Kras*$^{-/-}$ (red line), *Kras4A*$^{-/-}$ (green line) and *Kras4B*$^{-/-}$ (blue line) mice as a function of the embryonic (E) or postnatal (P) stage. Black dot line represents the expected Mendelian percentage (25%) of knock-out (KO) embryos/mice. (**B**) Pictures showing the macroscopic phenotype of E15.5 embryos. *Kras*$^{-/-}$ embryos are frequently smaller and some of them present a paleness (embryo in the middle) and haemorrhagic signs (embryo on the right). *Kras4A*$^{-/-}$ embryos present a normal macroscopic phenotype whereas *Kras4B*$^{-/-}$ embryos are also frequently smaller. (**C**) Graphs showing the weight of E15.5 embryo, placenta and liver in the *Kras*$^{-/-}$, *Kras4A*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ models and their control (+/+) counterparts. (**D**) Graphs showing the placenta/embryo (P/E) and liver/embryo (L/E) weight ratios at E15.5 for the *Kras*$^{-/-}$, *Kras4A*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos and their control (+/+) counterparts.

The absence of KRAS does not impact cell proliferation or apoptosis

The smaller size of the KO embryos could be explained by a weaker proliferation. To evaluate this process, Ki67 immunostaining was performed on whole embryo sections. No difference was observed between control and *Kras*$^{-/-}$ embryos (**Supplementary Figure S1A**). Similarly, we did not observe any difference in the level of apoptosis (**Supplementary Figure S1A**). As these results are negative, we did not seek to confirm them for isoform knockouts, and therefore assume that KRAS4A and KRAS4B do not have roles in these processes by themselves. Our results contrast with those of previous studies that described increased apoptosis in neuronal tissues (Koera et al., 1997) and liver (Johnson et al., 1997) of *Kras*$^{-/-}$ embryos. To ensure that apoptosis could not be decreased specifically in one of these organs, apoptosis was quantified more precisely in neuronal tissues and the liver; again, no difference was observed (**Supplementary Figure S1B**).

However, we observed that some *Kras*$^{-/-}$ livers (about 40%) present an abnormal histology (**Supplementary Figure S2A**), similar to the hypocellularity phenotype described in a previous study and possibly related to apoptotic process (Johnson et al., 1997). As our cleaved caspase-3 labeling does not support this hypothesis (see above), we explored other possible explanations. This could result from defective fetal liver hematopoiesis; however, no difference was observed in the erythroid (TER199 immunostaining) and lymphoid (CD45 immunostaining) lineages between control and KO livers (**Supplementary Figure S2B**). This could also originate from a dilation of the hepatic sinusoids. Importantly, a detailed pathological observation and CD31 immunolabeling led to the conclusion that it was indeed the case (inset in **Supplementary Figure S2A** and **S2C**). In conclusion, as the liver phenotype remains mild, none of the experiments performed here can explain the reasons for the death of KO embryos, which must be sought elsewhere.

The absence of KRAS and, to a lesser extent, its splicing isoform KRAS4B impair cardiac morphogenesis

Gross examination of tissue sections did not allow the identification of macroscopic phenotypes affecting the various organs of the *Kras*$^{-/-}$, *Kras4A*$^{-/-}$, and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos, except for the *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ hearts for which the morphogenesis seems to be altered. To deepen this point, histological analysis of E15.5 hearts was performed and revealed conotruncal heart defects in 75% of the *Kras*$^{-/-}$ and 14% of the *Kras4B*$^{-/-}$ hearts, including ventricular septal defects (VSD; 6/8 and 1/7, respectively), double outlet right ventricle (DORV; 3/8 *Kras*$^{-/-}$), overriding aorta (oAo; 1/7 *Kras4B*$^{-/-}$) and ventricular non-compaction (NC; 5/8 *Kras*$^{-/-}$). No defect was observed in *Kras4A*$^{-/-}$ hearts or control littermates (0/6 and 0/31, respectively; $P<0.001$) (**Figure 3A and B**).

Our results suggest that KRAS is required for arterial pole development and may control early cardiac progenitor cell deployment. To explore this possibility, we performed immunofluorescence experiments on Citrine-KRAS E10.5 embryos (Assi

et al., 2021). This revealed preferential KRAS expression in Isl1^{+} cardiac progenitors (**Supplementary Figure 3**); together, these results support a role for KRAS in controlling cardiac progenitor cell development. Finally, to exclude any potential secondary impact of placental defects on cardiac morphogenesis, *Kras*$^{-/-}$ embryo tetraploid complementation was performed. Our results show that tetraploid complementation failed to rescue cardiac defects observed in *Kras*$^{-/-}$ mutant embryos (**Figure 3A and B**); this suggests a direct role for KRAS in cardiac morphogenesis.

A

	WT	*Kras*$^{-/-}$	*Kras4A*$^{-/-}$	*Kras4B*$^{-/-}$	Tetraploid compensated *Kras*$^{-/-}$
Total	31	8	6	7	1
Normal (%)	31 (100%)	2 (25%)	6 (100%)	6 (86%)	0
Defects (%)	0 0(%)	6 (75%)	0 (0%)	1 (14%)	1 (100%)
OAo	-	-	-	1	-
DORV	-	3	-	-	1
VSD	-	6	-	1	1
NC	-	5	-	-	1

B

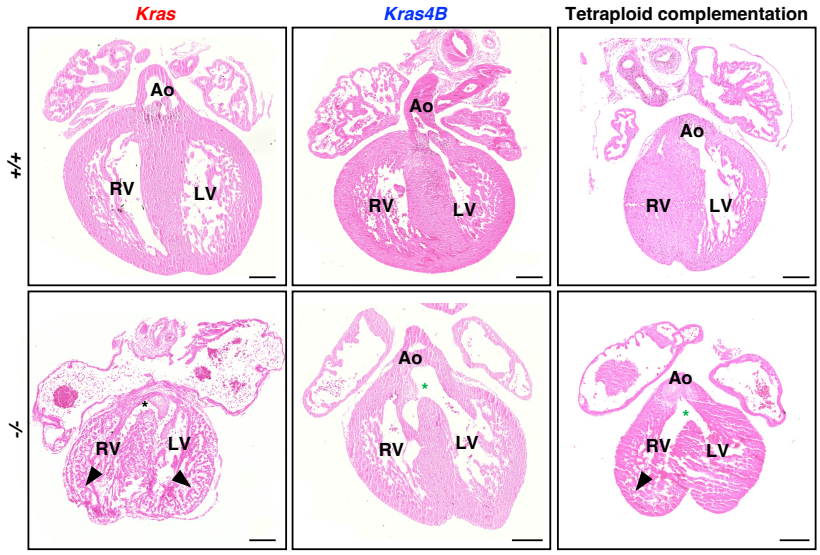


Figure 3. *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos, but not *Kras4A*$^{-/-}$ embryos, develop congenital heart defects. (**A**) Cardiac defects scored after analysis of histological sections at E15.5 *Kras*$^{-/-}$, *Kras4A*$^{-/-}$, *Kras4B*$^{-/-}$, tetraploid complemented *Kras*$^{-/-}$, and *Kras*$^{+/+}$ embryos. OAo, overriding aorta; DORV, double outlet right ventricle; VSD, ventricular septal defect; NC, non-compaction. (**B**) Eosin-stained sections of E15.5 hearts revealing that *Kras*$^{-/-}$, *Kras4B*$^{-/-}$,

and tetraploid complemented *Kras*$^{-/-}$ embryos display congenital heart defects including membranous ventricular septal defect (asterisk) associated with an overriding aorta (green asterisk) and ventricular non-compaction (arrowhead). Ao, aorta; LV, left ventricle; RV, right ventricle. Scale bars: 200 µm.

Placental cell differentiation and maternal blood sinuses are affected by the absence of KRAS and its splicing isoform KRAS4B

Since both KRAS and KRAS4B loss are associated with embryonic lethality, but *Kras4B*$^{-/-}$ embryos die without cardiac phenotype, it appears that the cardiac phenotype is not the cause of the death. To investigate the reason for this lethality, we performed an analysis of KO placentas, as placental development appears to be defective in both models (see above).

While serial sections of placentas from the different models confirmed that the size of the *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ placentas were smaller, histological staining did not reveal any clearly visible disturbances in their general organization (**Figure 4A**): staining with periodic acid-Schiff (PAS; stains glycogen trophoblast cells present in the junctional zone) and TPBPA (trophoblast-specific protein α; labels progenitors of many trophoblast subtypes found in the junctional zone), which allows to delineate the two major layers of the mouse placenta, the junctional zone (JZ) and the labyrinth (L), showed that the relative surface of the two layers was not modified in the *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ placentas, in comparison to *Kras*$^{+/+}$ placentas (**Supplementary Figure 4**). This indicates that the smaller size of KO placentas is not explained by a major perturbation in one of the two layers, but rather by a decrease in the absolute size of each of the layers.

Careful microscopic examination suggested that the maternal blood sinuses found in the labyrinth were enlarged in KO placentas. To clarify this point, we performed immunolabeling for PODXL, a marker for sinusoidal trophoblast giant cells (S-TGC) (Marsh & Blelloch, 2020), which line the maternal blood sinuses. This labeling revealed approximately 2-fold enlargement of the maternal sinuses in *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ placentas, compared control placentas (**Figure 4B**). PAS staining also suggested a decreased number of glycogen trophoblast cells (GC) in KO placentas. To explore this possibility, we performed NCAM1 immunostaining, and observed approximately 2 times less GC in *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ placentas than in control placentas (**Figure 4C**). To verify that this phenotype is indeed cell-autonomous, we analyzed the expression of KRAS in the placenta using E15.5 *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos. A global view of the labyrinth layer showed extensive expression of KRAS (**Supplementary Figure 5A**), while colabeling with NCAM revealed that KRAS was expressed in GC cells (**Supplementary Figure 5B**); this indicates that the phenotype is likely cell-autonomous. Together, these results identify deficiencies in KO placentas and show for the first time that KRAS, through KRAS4B, is involved in the differentiation process of a specific cell type.

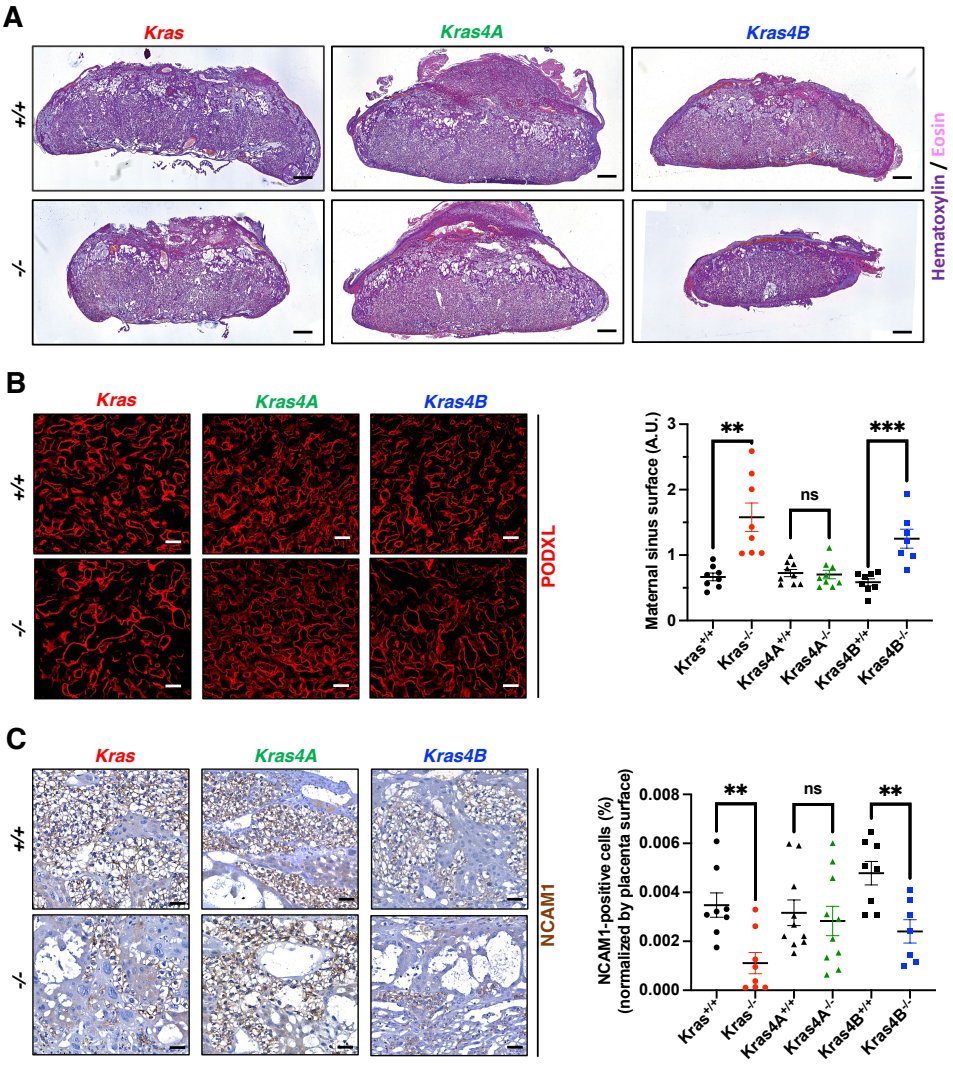


Figure 4. Placental development is disrupted in *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ mouse models. (**A**) Hematoxylin and eosin staining performed on E15.5 placenta sections of *Kras, Kras4A*, and *Kras4B* control (+/+) and *knock-out* (-/-) embryos. Scale bar: 500 µm. (**B**) PODXL (Podocalyxin; marker of sinusoidal trophoblast giant cells surrounding the maternal blood sinuses) immunolabeling on E15.5 placenta from control (+/+), *Kras*$^{-/-}$, *Kras4A*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos. Graph shows the surface of the maternal blood sinuses (A.U.: arbitrary unit) determined by FIDJI (Image J) software. One dot represents data obtained on a placenta. Scale bar: 50 µm. (**C**) NCAM1 (Neural Cell Adhesion Molecule 1; marker of glycogen trophoblast cells, in brown) immunostaining on E15.5 placenta from control (+/+), *Kras*$^{-/-}$, *Kras4A*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos. Graph represents the quantification of the percentage of NCAM1-positive glycogen trophoblast cells normalized according to the surface of the

placentas using Halo software. One dot represents data obtained on a placenta. Scale bar: 50 μm. Statistical significance between control (+/+) and *knock-out* (-/-) placentas of each model were tested by Student's t-test. Data are represented as mean +/- SEM. *, $p<0.05$; **; $p<0.01$; ***; $p<0.001$; ****; $p<0.0001$; ns, not significant.

Hypoglycemia and hypoxia are detected in the absence of KRAS and its splicing isoform KRAS4B

The placental dysfunctions identified above could disrupt several of its functions, including glucose and oxygen supply to the embryo. To test this possibility, we first measured the glycaemia of E15.5 embryos. While normal glycemia is observed in *Kras4A*$^{-/-}$ embryos, a 2-fold decrease in blood glucose was found in *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos compared to control embryos (about 20 mg/dl vs 40mg/dl) (**Figure 5A**). This clearly shows that KO embryos suffer from hypoglycemia.

Oxygen levels were first estimated in E13.5 embryos and placentas using pimonidazole as a reductively activated probe in hypoxic cells (see Materials and methods for further explanation). In this way, we found a statistically significant nearly 3-fold increase in pimonidazole-protein adducts in *Kras*$^{-/-}$ embryos, and a statistically non-significant 1.5-fold increase in KO placentas, compared to control embryos and placentas (**Figure 5B**). The presence of hypoxia in the *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ tissues was confirmed by detection of approximatively two-fold higher expression of HIF-1α in the latter (**Figure 5C**). Taken together, these results show that vital biological parameters are already markedly disrupted in *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos, moreover for hypoxia at a stage (E13.5) where mortality is not yet observed among these (see **Figure 2A**).

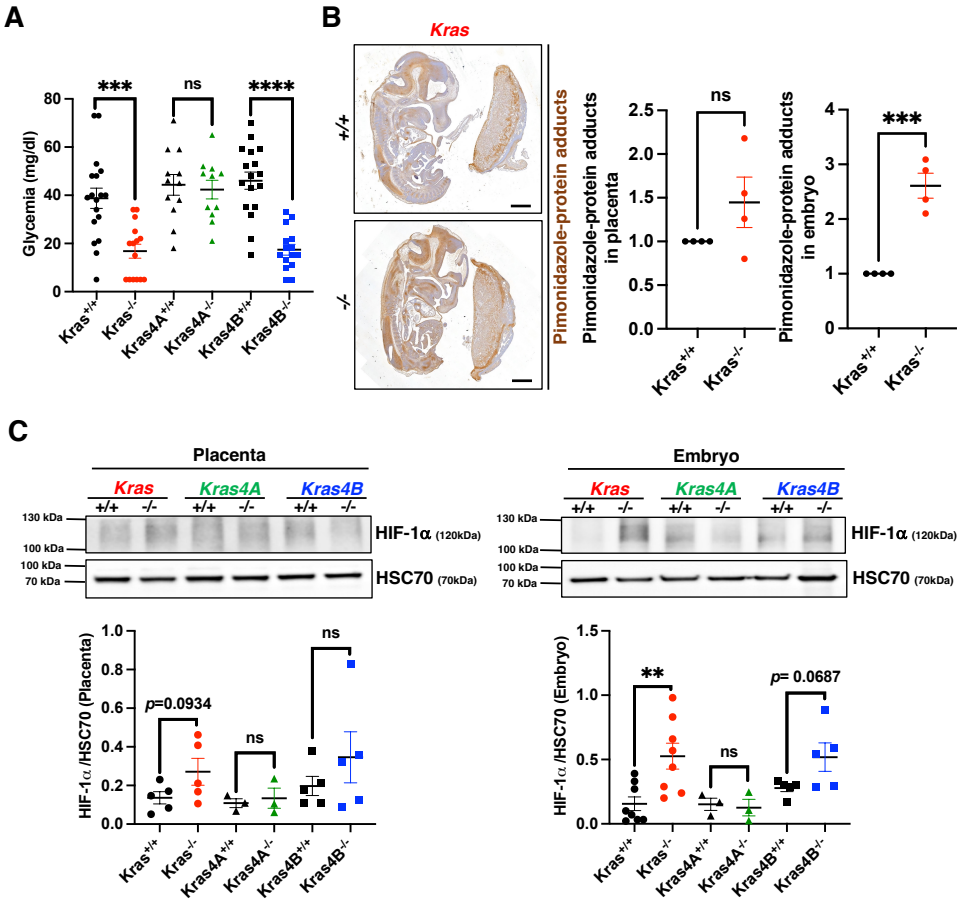


Figure 5. Hypoglycemia and hypoxia are present in *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos. (**A**) Glycemia of E15.5 *Kras*, *Kras4A*, and *Kras4B* control (+/+) and *knock-out* (-/-) embryos. Only KO embryos with still beating hearts were eligible for blood glucose measurements. (**B**) Detection of tissue hypoxia on transverse sections of E13.5 *Kras*$^{-/-}$ and control (+/+) placentas and embryos using pimonidazole hydrochloride (Hypoxyprobe) which generates piminidazole-protein adducts (brown staining). Adduct levels were arbitrarily set to 1 in *Kras*$^{+/+}$ embryos. Scale bar: 1000 µm. (**C**) Western blot analysis on protein extracts from E13.5 *Kras*, *Kras4A*, and *Kras4B* control (+/+) and *knock-out* (-/-) placentas and embryos using an HIF-1α antibody to detect tissue hypoxia. Heat shock cognate protein 70 (HSC70) was used as loading control. Quantifications of the HIF-1α/HSC70 ratio were performed by FIJI software. On the graphs, one dot represents data obtained from one embryo. Statistical significance between control (+/+) and *knock-out* (-/-) samples were tested by Student's t-test. Data are represented as mean +/- SEM. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001; ns, not significant.

2.5. Discussion

Although KRAS has been the subject of a tremendous amount of studies over the past 40 years, important aspects of its biology are still incompletely known. Thus, we know that KRAS is essential for embryonic development, but we do not yet know the mechanisms by which KRAS supports embryonic survival. Similarly, there are indications that its functions are carried out by its splicing isoform called KRAS4B, but a rigorous comparison of the respective roles of its two isoforms has never been performed. In the present work, we sought to answer these questions.

Our work shows similarities but also differences with previous studies (L. Johnson et al., 1997 ; Koera et al., 1997 ; Salmón et al., 2021). Thus, it confirms that embryos deficient in KRAS begin to die around E15.5, the differences between studies on the precise timing of mortality being easily attributable to differences in the genetic backgrounds of the mouse models used. The same explanation can be put forward for the presence of a previously described neuronal phenotype (Koera et al., 1997) that we do not observe, or for the cardiac phenotype which we describe and which is more complex than those already described (Koera et al., 1997 ; Salmón et al., 2021). The major difference is the placental phenotype which we are the first to describe. As previous studies described relatively mild phenotypes which alone could not explain the observed early mortalities, we believe that this difference is not due to a question of background, but rather to the analysis of the placenta which was probably not performed in the previous studies.

Our study is also the first that within the same work generates mouse models with the inactivation of the different KRAS splicing isoforms and compares their phenotypes. We confirm that KRAS4B is the isoform that provides the majority of the developmental functions of KRAS, as both *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ models exhibit embryonic mortality and the same placental phenotype. However, we reveal a minor role for KRAS4A that has not been identified so far. At first glance, KRAS4A has no function, as the *Kras4A*$^{-/-}$ model is not associated with lethality or any other phenotype. This minor role can be observed when comparing the survival curves of the *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ models. So, we can see that *Kras4B*$^{-/-}$ embryos live a little longer than *Kras*$^{-/-}$ embryos. A similar observation was made in another study (Salmón et al., 2021). In addition, significantly fewer *Kras4B*$^{-/-}$ embryos develop a cardiac phenotype, compared to *Kras*$^{-/-}$ embryos. This shows that in these two situations, KRAS4A is able to compensate, at least partially, for the loss of KRAS4B. However, KRAS4A was unable to take over KRAS4B's role in the placenta. The reasons behind this partial compensation are not understood. This could be due to the fact that KRAS4A is not expressed in the placenta, or that although expressed, KRAS4A is mechanistically not able to take over the placental functions of KRAS4B.

Interestingly, the simultaneous presence of cardiac and placental phenotypes is reminiscent of similar situations already observed in humans and mice (Barak et al.,

2008 ; Jones et al., 2015 ; Matthiesen et al., 2016 ; Rychik et al., 2018). These situations contributed to the idea that there is a placenta-heart axis which refers to the existence of multiple common pathways that are critical for the development of the two organs (Andescavage & Limperopoulos, 2021). Seeking to see if the placental phenotype was at the origin of the cardiac phenotype, we carried out a tetraploid complementation experiment. As we observe that the cardiac phenotype is still present after complementation, we conclude that the coexistence of these two phenotypes in *Kras*$^{-/-}$ embryos is not related to this axis, and that the cardiac phenotype is more likely explained by a role of KRAS in early heart development. To support this role, we show that KRAS is expressed in cardiac progenitors, in sharp contrast to its absence later in embryonic cardiomyocytes (Minati et al., 2022).

The placental phenotype that we have identified in *Kras*$^{-/-}$ and *Kras4B*$^{-/-}$ embryos is dual. First, we observe a small placenta; strikingly, this reduction in size is even greater than that expected due to the reduced size of the KO embryos that we observe. This indicates that this reduction probably originates at an early stage of placental development. Hence, it supports a role of KRAS in amplifying a pool of trophoblast progenitors whose progeny will give rise to the different types of trophoblasts in the junctional and labyrinth zones. The second placental phenotype is a reduced number of GC. GC together with parietal trophoblast giant cells and spongiotrophoblast cells derive from tripotent precursors present in the ectoplacental cone; this suggests that KRAS also plays a more specific and late role in the commitment and/or proliferation of GC.

GC, located in the junctional zone and the decidua, have the ability to store glycogen, and as such, it has been assumed that they are an important source of glucose to support the growth of the embryo and placenta; accordingly, reduced placental glycogen content is frequently associated with embryonic growth restriction (Tunster et al., 2020). Thus, the decrease in GC could both explain the reduced size of KO placentas and embryos and the hypoglycemia found in the latter.

In addition to hypoglycemia, KO embryos also develop hypoxia, which suggests that maternal oxygen supply through the placenta is deficient. This supply takes place at an exchange interface located in the junctional zone. A thickening of this interface can lead to embryonic hypoxia (Winterhager et al., 2018), but our observations did not reveal such a thickening (data not shown). In contrast, the enlargement of the maternal blood sinuses found in KO placentas is accompanied by a statistically non-significant decrease of about 10% in the perimeter of the sinuses (data not shown), probably because these sinuses are less convoluted. This decrease, associated with the reduced size of the KO placentas, probably diminishes the exchange surface available with the maternal blood and consequently the maternal oxygen supply, and could thus partly explain the hypoxia of the KO embryos.

In humans, KRAS activating mutations are associated with the presence of rasopathies (Rauen, 2013). Conversely, no KRAS inactivating mutation has been

associated to date with a human pathology. Based on the results obtained in mice, such a mutation is suspected to lead to fetal lethality. Even if exome sequencing of unexplained stillbirth did not identify a KRAS mutation in this condition (Stanley et al., 2020), it remains interesting to continue to search for such a mutation with the idea of better understanding unexplained deaths before birth.

In conclusion, our study has reinforced the knowledge of KRAS functions during embryonic development, revealing a role of KRAS in the placenta and showing that KRAS was able to control the differentiation process of a type of trophoblast.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

MM and PJ contributed to conception and design of the study. MM and FR performed the data acquisition. MM performed the statistical analysis. YA generated the mouse models and performed the tetraploid complementation. SP performed the histopathological analysis of the liver. MM, SP, FR and PJ performed the data analysis. MM and PJ performed the data interpretation. MM and PJ wrote the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the Université catholique de Louvain (Fonds Spéciaux de Recherche) and the FRS-FNRS (Crédit de Recherche) to PJ. MM and SP hold a Televie fellowship. PJ is Research Director at FRS-FNRS, Belgium.

Acknowledgments

The authors thank the members of the LPAD laboratory for help and discussions, Maxime Libert for COSD acquisition, Jean-Nicolas Lodewycks and Hajar Dahou for mouse genotyping, and Bruno Maricq for his help with mouse care.

2.6. Reference

Aida, T., Chiyo, K., Usami, T., Ishikubo, H., Imahashi, R., Wada, Y., Tanaka, K. F., Sakuma, T.,Yamamoto, T., & Tanaka, K. (2015). Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. Genome Biology, 16(1). https://doi.org/10.1186/s13059-015-0653-x

Andescavage, N. N., & Limperopoulos, C. (2021). Placental abnormalities in congenital heartdisease. Translational Pediatrics, 10(8), 2148156–2142156. https://doi.org/10.21037/TP-20-347

Assi, M., Achouri, Y., Loriot, A., Dauguet, N., Dahou, H., Baldan, J., Libert, M.,

Fain, J. S., Guerra,C., Bouwens, L., Barbacid, M., Lemaigre, F. P., & Jacquemin, P. (2021). Dynamic Regulation of Expression of KRAS and Its Effectors Determines the Ability to Initiate Tumorigenesis in Pancreatic Acinar Cells. Cancer Research, 81(10), 2679–2689. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2976

Barak, Y., Sadovsky, Y., & Shalom-Barak, T. (2008). PPAR signaling in placental development and function. PPAR Research, 2008. https://doi.org/10.1155/2008/142082

Chen, W. C., To, M. D., Westcott, P. M. K., Delrosario, R., Kim, I. J., Philips, M., Tran, Q., Bollam, S. R., Goodarzi, H., Bayani, N., Mirzoeva, O., & Balmain, A. (2021). Targeting KRAS4A splicing through the RBM39/DCAF15 pathway inhibits cancer stem cells. Nature Communications, 12(1). https://doi.org/10.1038/s41467-021-24498-

Eakin, G. S., & Hadjantonakis, A. K. (2006). Production of chimeras by aggregation of embryonic stem cells with diploid or tetraploid mouse embryos. Nature Protocols, 1(3), 1145–1153. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.173

Haidar, M., & Jacquemin, P. (2021). Past and future strategies to inhibit membrane localization of the kras oncogene. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 22, Issue 24). MDPI. https://doi.org/10.3390/ijms222413193

Jackson, E. L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., & Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. Genes and Development, 15(24), 3243–3248. https://doi.org/10.1101/gad.943001

Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R. T., Umanoff, H., Edelmann, W., Kucherlapati, R., & Jacks, T. (1997). K- ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N- ras. Genes & Development, 11(19), 2468–2481. https://doi.org/10.1101/gad.11.19.2468

Jones, H. N., Olbrych, S. K., Smith, K. L., Cnota, J. F., Habli, M., Ramos-Gonzales, O., Owens, K. J., Hinton, A. C., Polzin, W. J., Muglia, L. J., & Hinton, R. B. (2015). Hypoplastic left heart syndrome is associated with structural and vascular placental abnormalities and leptin dysregulation. Placenta, 36(10), 1078–1086. https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2015.08.003

Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hatta, T., Otani, H., Aiba, A., & Katsuki, M. (1997). K-Ras is essential for the development of the mouse embryo.

Lowy, D. R., & Willumsen, B. M. (1993). FUNCTION AND REGULATION OF RAS. Annual Review of Biochemistry, 62(1), 851–891. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.004223

Marsh, B., & Blelloch, R. (2020). Single nuclei RNA-seq of mouse placental labyrinth development. ELife, 9, 1–27. https://doi.org/10.7554/eLife.60266

Matthiesen, N. B., Henriksen, T. B., Agergaard, P., Gaynor, J. W., Bach, C. C., Hjortdal, V. E., & Østergaard, J. R. (2016). Congenital Heart Defects and Indices of Placental and Fetal Growth in a Nationwide Study of 924 422 Liveborn Infants. Circulation, 134(20), 1546–1556. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021793

Minati, M. A., Assi, M., Libert, M., Cordi, S., Lemaigre, F., & Jacquemin, P. (2022). KRAS protein expression becomes progressively restricted during embryogenesis and in adulthood. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 10. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.995013

Newlaczyl, A. U., Coulson, J. M., & Prior, I. A. (2017). Quantification of spatiotemporal patterns of Ras isoform expression during development. Scientific Reports, 7. https://doi.org/10.1038/srep41297

Rauen, K. A. (2013). The RASopathies. In Annual Review of Genomics and Human Genetics (Vol.14, pp. 355–369). https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153523

Rychik, J., Goff, D., McKay, E., Mott, A., Tian, Z., Licht, D. J., & Gaynor, J. W. (2018). Characterization of the Placenta in the Newborn with Congenital Heart Disease: Distinctions Based on Type of Cardiac Malformation. Pediatric Cardiology, 39(6), 1165–1171. https://doi.org/10.1007/S00246-018-1876-X

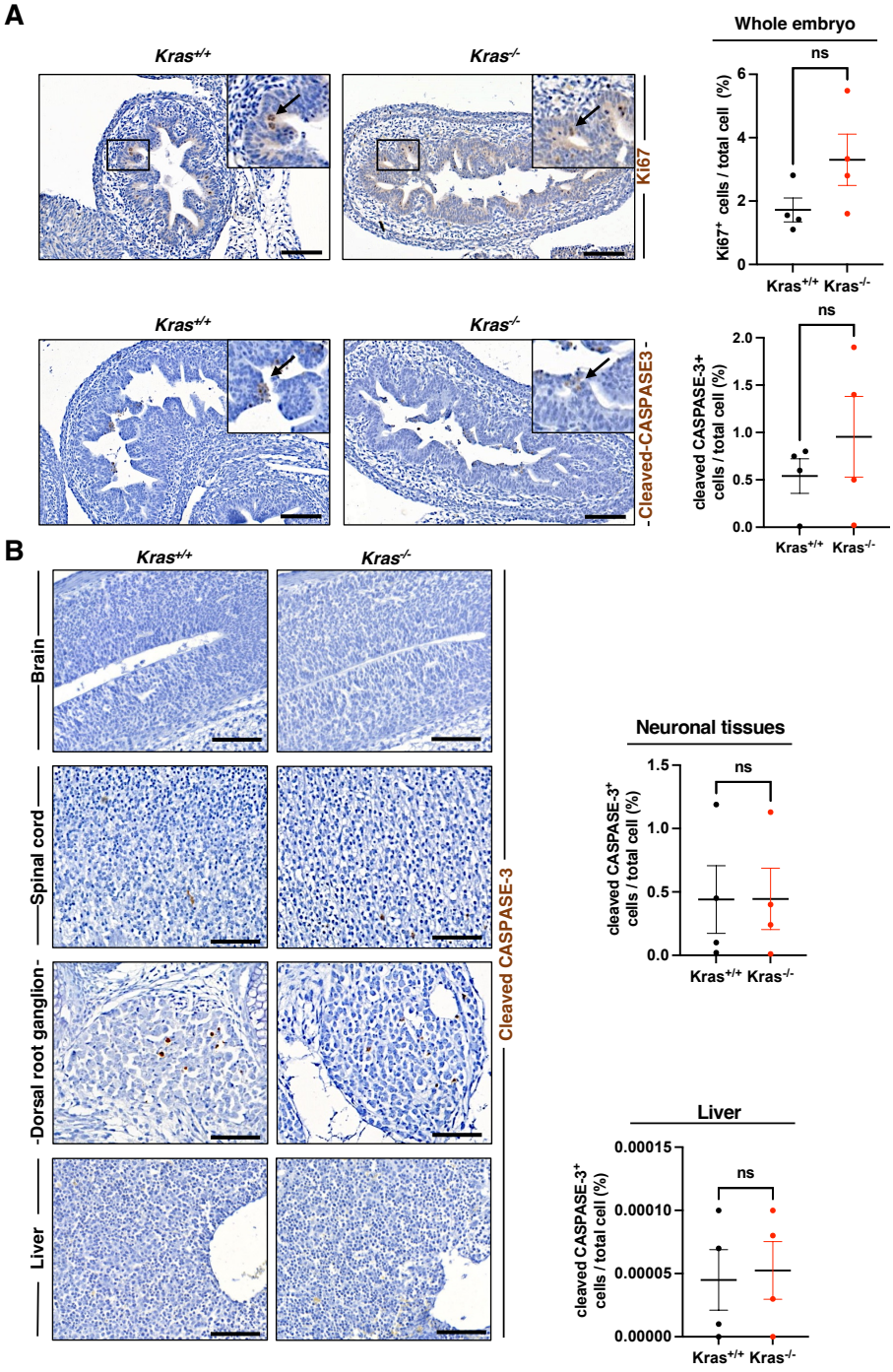
Salmón, M., Paniagua, G., Lechuga, C. G., Fernández-García, F., Zarzuela, E., Álvarez-Díaz, R., Musteanu, M., Guerra, C., Caleiras, E., Muñoz, J., Ortega, S., Drosten, M., & Barbacid, M. (2021). KRAS4A induces metastatic lung adenocarcinomas in vivo in the absence of the KRAS4B isoform. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 118(30). https://doi.org/10.1073/pnas.2023112118

Stanley, K. E., Giordano, J., Thorsten, V., Buchovecky, C., Thomas, A., Ganapathi, M., Liao, J., Dharmadhikari, A. v., Revah-Politi, A., Ernst, M., Lippa, N., Holmes, H., Povysil, G., Hostyk, J., Parker, C. B., Goldenberg, R., Saade, G. R., Dudley, D. J., Pinar, H., … Goldstein, D. B. (2020). Causal Genetic Variants in Stillbirth. New England Journal of Medicine, 383(12), 1107–1116. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1908753

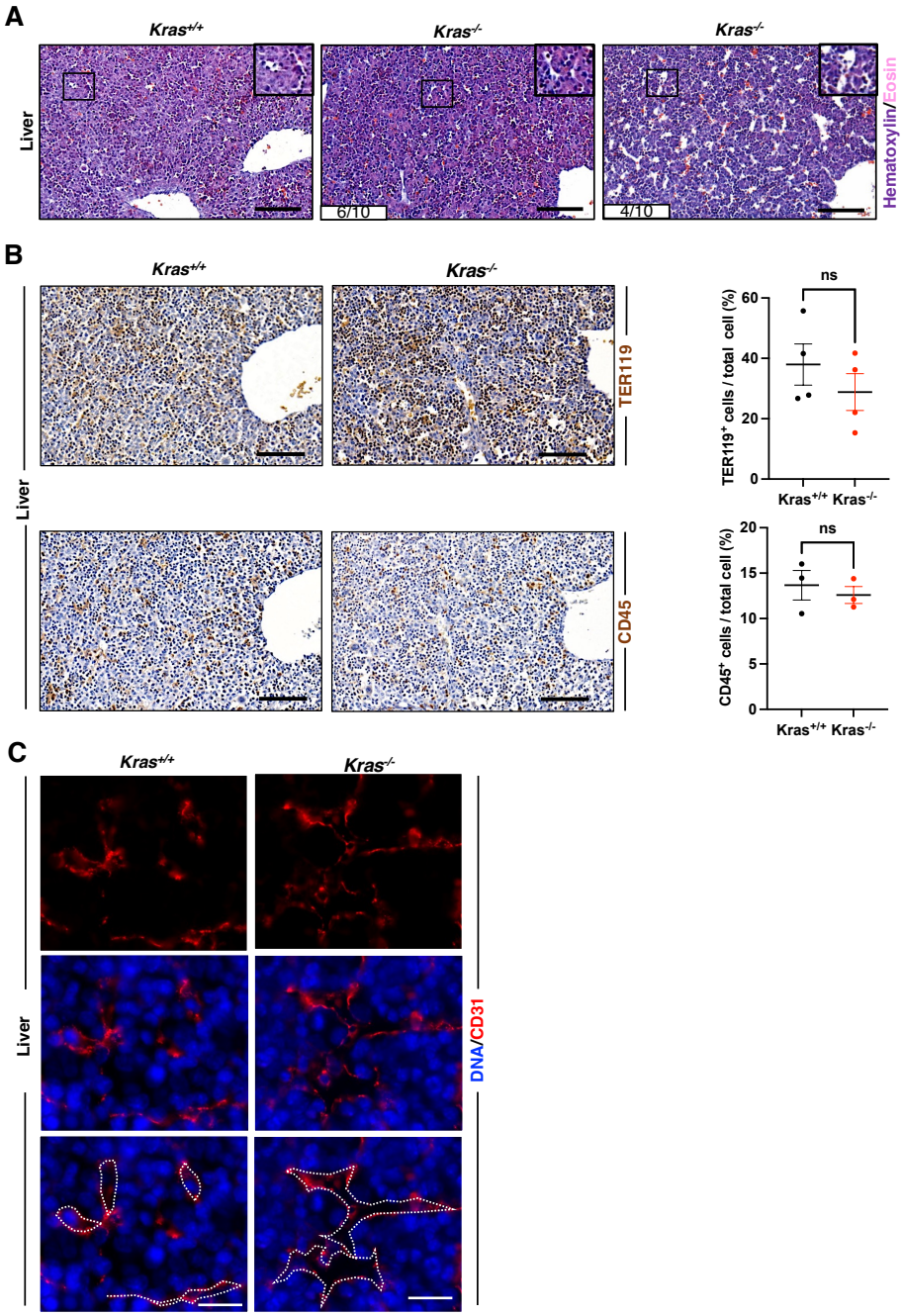
Tunster, S. J., Watson, E. D., Fowden, A. L., & Burton, G. J. (2020). Placental glycogen stores and fetal growth: insights from genetic mouse models. Reproduction, 159(6), R213–R235. https://doi.org/10.1530/REP-20-0007

Winterhager, E., Zenclussen, A. C., Plösch, T., Perez-Garcia, V., Hemberger, M., & Woods, L. (2018). Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth-New Insights From Mouse Models. Frontiers in Endocrinology, 9, 570. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00570

2.7.Supplementary Figures

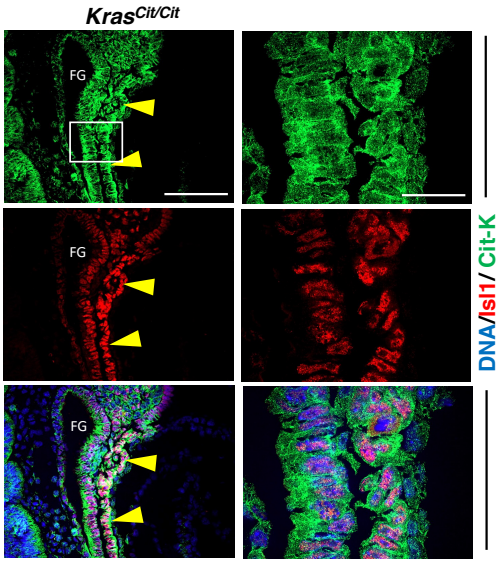


Supplementary Figure S1. The absence of KRAS does not affect proliferation or apoptosis. (**A**) Immunohistochemistry for Ki67 and cleaved-CASPASE3 on whole sections from *Kras*$^{+/+}$ and *Kras*$^{-/-}$ embryos. Intestine is used to show positive staining. Graphs represent the quantification of the percentage of positive cells normalized according to the total number of cells using Halo software. One dot represents data obtained on one whole embryo. Scale bar: 100 μm. (**B**) Immunohistochemistry for cleaved-CASPASE3 on neuronal tissues (brain, spinal cord and dorsal root ganglions) from *Kras*$^{+/+}$ and *Kras*$^{-/-}$ embryos. Graph represents the quantification of the percentage of positive cells present in neuronal tissues normalized according to the total number of cells using Halo software. One dot represents data obtained on neuronal tissues of one embryo. Data are represented as mean +/- SEM. ns, not significant.

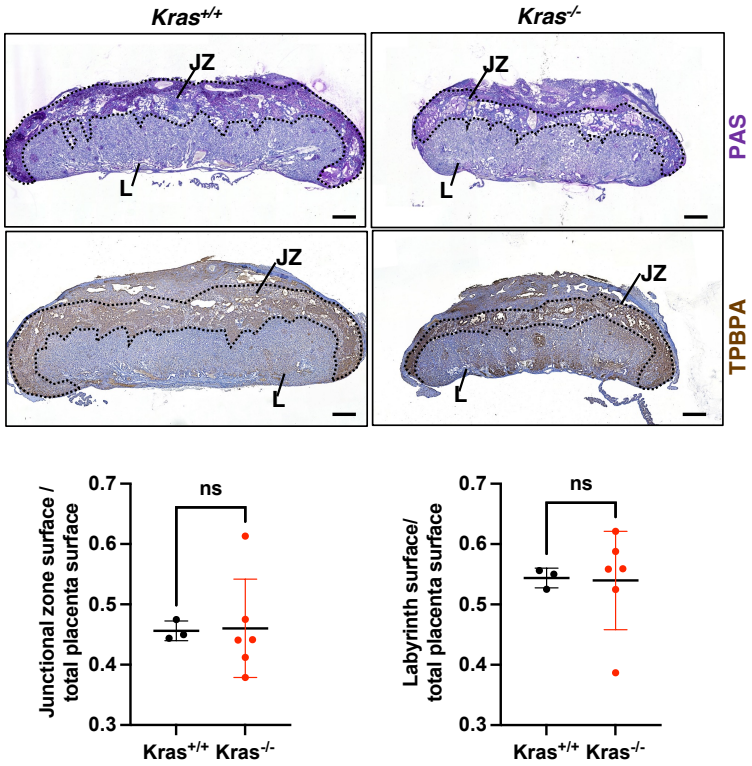

A
Kras+/+
Kras-/-
Kras-/-
Liver
6/10
4/10
Hematoxylin/Eosin
B
Kras+/+
Kras-/-
Liver
TER119
CD45
ns
TER119+ cells / total cell (%)
60
40
20
0
Kras+/+ Kras-/-
ns
CD45+ cells / total cell (%)
20
15
10
5
0
Kras+/+ Kras-/-
C
Kras+/+
Kras-/-
Liver
DNA/CD31

Supplementary Figure S2. Embryos lacking KRAS show a normal liver phenotype, except for some of them in which sinusoidal dilation is observed. (**A**) Hematoxylin and Eosin staining of E15.5 liver section from *Kras*$^{+/+}$ and *Kras*$^{-/-}$ embryos showing normal histological structure (6 /10 *Kras*$^{-/-}$ embryos) or sinusoidal dilatation (4 /10 *Kras*$^{-/-}$ embryos). Scale bar: 100 µm. (**B**) Immunohistochemistry for TER119 and CD45 on liver sections from *Kras*$^{+/+}$ and *Kras*$^{-/-}$ embryos. Graphs represent the quantification of the percentage of positive cells normalized according to the total number of cells using Halo software. One dot represents data obtained on one liver. Scale bar: 100 µm. Data are represented as mean +/- SEM. ns, not significant. (**C**) Immunofluorescent labeling for CD31 on liver sections from *Kras*$^{+/+}$ and *Kras*$^{-/-}$ embryos. Dotted lines surround the hepatic sinusoids. Scale bar: 40 µm.

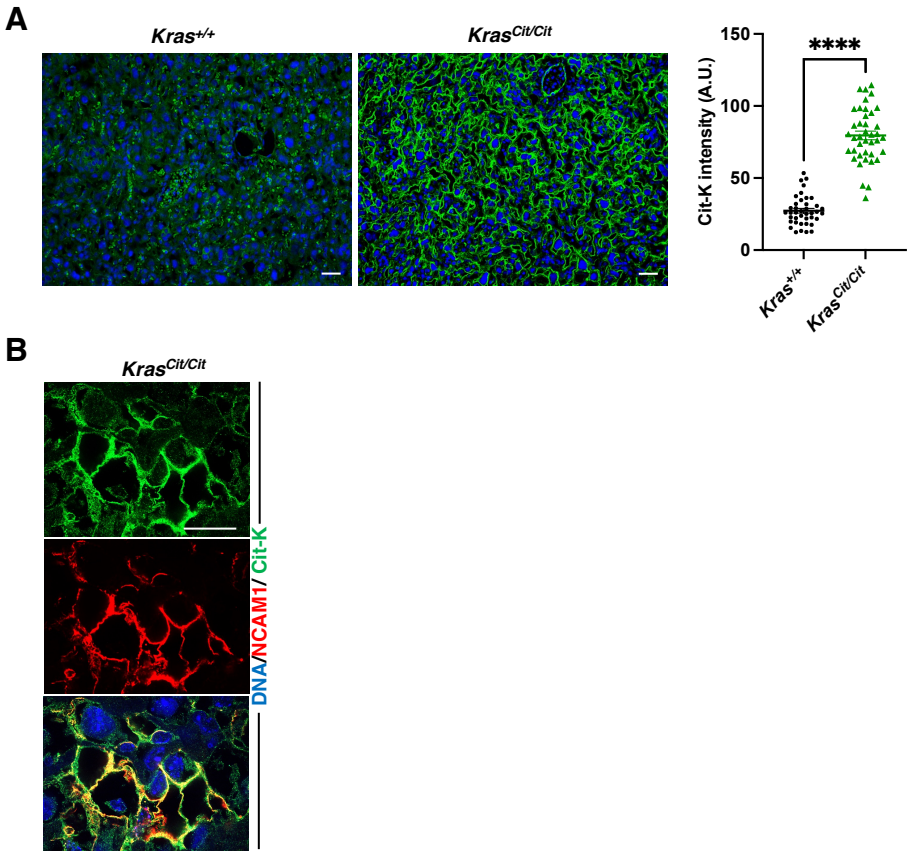
.



Supplementary Figure S3. KRAS is expressed in cardiac progenitors. Immunofluorescent labelling for Citrine-KRAS (Cit-K, using a GFP antibody) and ISLET 1 (Isl1, for the cardiac progenitors) performed on E10.5 *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos. The white square corresponds to the magnified regions on the right. FG, foregut. Yellow arrow heads: cardiac progenitors. Scale bars: 100 µm, and 20 µm for the magnified regions.



Supplementary Figure S4. The absence of KRAS does not affect the proportion of the junctional zone and labyrinth in placenta. Periodic acid Schiff (PAS) staining and immunochemistry for TPBPA (Trophoblast specific protein alpha, junctional zone marker) on placenta sections from *Kras*$^{+/+}$ and *Kras*$^{-/-}$ embryos. Graphs represent the quantification of the surface of the junctional zone or labyrinth normalized according to the total placenta surface using Halo software. One dot represents data obtained on one placenta. Data are represented as mean +/- SEM. Scale bar: 500 µm. ns, not significant.



Supplementary Figure S5. Citrine-KRAS (Cit-K) is expressed in placental cells. (**A**) Cit-K immunolabeling on E15.5 placenta section of *Kras*$^{+/+}$ and *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos. With the exception of intense non-specific labeling in tissue-resident red blood cells, no Cit-K labeling is observed in *Kras*$^{+/+}$ embryos. Graph represents Cit-K intensity measured by FIJI software. One dot represents the mean of three measures of signal intensity on one cell. Data are represented as mean +/- SEM of 40 cells (n=4 mice). Statistical significance was tested by Student's t-test. ****, p<0.0001. A.U.: arbitrary unit. Scale bar: 40 µm. (**B**) Immunolabeling for Cit-K and NCAM1 (Neural cell adhesion marker 1, glycogen trophoblast cell marker) performed on placenta sections of E15.5 *Kras*$^{Cit/Cit}$ embryos. Scale bar : 20 µm

Discussion générale et perspectives

Mon travail de thèse de doctorat s'est intéressé à la protéine KRAS, une protéine participant à de nombreuses fonctions cellulaires importantes et jouant un rôle clé dans le processus de développement embryonnaire chez la souris (L. Johnson et al., 1997 ; Koera et al., 1997).

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes concentrés sur le patron d'expression de *Kras* en utilisant le modèle murin *citrine-Kras* (modèle exprimant une protéine de fusion formée de la Citrine, analogue de la GFP, et de KRAS). Ce modèle, développé au laboratoire (Assi et al., 2021), nous a permis de mettre en évidence la localisation de notre protéine d'intérêt par l'intermédiaire d'un immunomarquage ciblant la Citrine et donc, KRAS. Nous avons montré dans cette étude que KRAS est exprimée à E13,5 dans de très nombreux organes embryonnaires, tels que le poumon, les intestins, le foie, le cerveau, ... Par ailleurs, le niveau d'expression de KRAS diminue progressivement jusque l'âge adulte pour devenir de plus en plus spécifique à certains types cellulaires.

Dans la deuxième partie de mon travail, nous avons étudié les rôles de KRAS et de ses deux isoformes d'épissage, KRAS4A et KRAS4B, dans le développement embryonnaire. Pour cela, nous avons développé et caractérisé deux modèles murins, un modèle déficient en KRAS4A et un modèle déficient en KRAS4B, et comparé les phénotypes observés à ceux présents dans un modèle déficient en KRAS. Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence le rôle majeur de KRAS4B lors du développement embryonnaire chez la souris. En effet, l'absence de KRAS induit une létalité *in utero* liée à des anomalies placentaires et cardiaques, tout comme cela a été observé en l'absence de KRAS4B (à l'exception du phénotype cardiaque présent à une fréquence plus faible). L'absence de KRAS4A, quant à elle, n'induit aucune létalité ou défaut de développement.

1. Apport de notre étude d'expression à la biologie des protéines RAS

Depuis 4 décennies, KRAS a été l'objet de très nombreuses études ; PubMed indique ainsi que plus de 24 000 publications lui sont consacrées. Certaines de ces publications se sont intéressées à son patron d'expression ; dans ce contexte, que pouvait-on attendre de notre étude au moment où nous avons décidé d'initier un travail sur la caractérisation de son expression ?

D'une façon étonnante par rapport à l'intérêt existant pour la protéine KRAS, aucun anticorps fonctionnant en immunomarquage sur coupes de tissus n'existe encore à ce jour (Waters et al., 2017). Mon laboratoire d'accueil a aussi essayé de développer un tel anticorps ; cependant, si le sérum obtenu a permis de mieux connaître certains aspects de la régulation de l'activité de KRAS (Assi et al., 2020), il ne fonctionnait pas en immunomarquage.

Dans ce contexte, les études consacrées à l'expression de KRAS ont mis en évidence la présence de son ARN, par Northern blotting, hybridation *in situ*, ou RT-qPCR, ou de sa forme protéique, essentiellement par Western blotting. Ces études ont abouti à l'idée que KRAS était largement exprimée, mais elles n'ont pas apporté d'informations sur l'expression de KRAS à l'échelle cellulaire. Le but de notre travail était précisément de pouvoir caractériser son patron d'expression à cette échelle. Nous avons pour cela utilisé le modèle *citrine-Kras*, et avons ainsi mis en évidence des particularités de l'expression de KRAS encore inconnues à ce jour, permettant ainsi de mieux comprendre pourquoi des types cellulaires spécifiques sont plus sensibles aux mutations de KRAS que d'autres lors de l'initiation du cancer.

La grande question qui reste en suspens à propos des protéines RAS est celle relative au rôle prépondérant que KRAS tient au sein de cette famille. Est-ce dû essentiellement à son expression plus large ou à une fonction spécifique, unique à KRAS ? En l'absence d'anticorps HRAS et NRAS fonctionnant en immunomarquage, notre étude montre que l'approche que nous avons suivie, avec la génération de ce modèle permettant l'expression d'une protéine fusion Citrine-KRAS, a porté ses fruits, et pourrait ainsi inciter d'autres à développer des modèles similaires afin de mieux comprendre la biologie des protéines RAS.

2. La génération de nouveaux modèles murins pour étudier les fonctions d'isoformes d'épissage de KRAS et leur validation

Lors de notre caractérisation phénotypique des modèles *Kras4A*$^{-/-}$ et *Kras4B*$^{-/-}$, nous avons mis en évidence des phénotypes spécifiques. Afin de confirmer que ceux-ci sont effectivement la conséquence de la déficience en KRAS4A ou KRAS4B, nous devions valider leur absence dans nos modèles.

Pour réaliser cette validation, nous avons décidé, tout d'abord, de réaliser une analyse par Western blotting quantifiant l'abondance de KRAS4A et de KRAS4B. Cependant, nous avons été confrontés à un problème majeur. Ainsi, après avoir testé la spécificité d'anticorps commerciaux, il est apparu qu'aucun de ces anticorps n'était réellement spécifique à KRAS4A, confirmant les résultats d'une étude de l'équipe de Channing Der (Waters et al., 2017). Nous avons donc cherché à produire des anticorps anti-KRAS4A par immunisation de lapins à l'aide d'injections d'un peptide spécifique à l'isoforme 4A (soit un peptide non modifié, soit un peptide palmitoylé). Après tests de nos anticorps, il s'est avéré qu'ils étaient spécifiques à l'isoforme 4A, mais qu'ils étaient incapables de détecter des niveaux d'expression endogène de KRAS4A (voir partie **Annexes**, **section 1**).

À la suite de ce problème et dû à la nécessité de valider nos modèles, nous nous sommes tournés vers une méthode de validation plus sensible, la spectrométrie de masse ciblée. Ce choix a été orienté par les résultats obtenus dans une étude récente

dans laquelle les auteurs ont réussi à détecter les protéines KRAS4A et KRAS4B dans des échantillons d'organes provenant de souriceaux (Salmón et al., 2021). Une première expérience (collaboration avec la plate-forme de spectrométrie de masse et Didier Vertommen, Institut de Duve), suivant le protocole de Salmon et al. (2021), a été réalisée sur un échantillon de foie adulte *Kras*$^{+/+}$ et a permis de confirmer qu'il nous était possible de détecter les deux isoformes (KRAS4A et KRAS4B). À la suite de ce résultat, nous avons réalisé une seconde expérience sur des échantillons de foie embryonnaire à E13,5 (ce stade a été choisi car, pour rappel, les embryons *Kras*$^{-/-}$ et *Kras4B*$^{-/-}$ commencent à mourir à E15,5) de l'ensemble de nos génotypes. Étonnement, aucune protéine KRAS n'a été détectée dans les échantillons analysés (y compris dans notre contrôle *Kras*$^{+/+}$).

Afin de comprendre l'origine du problème, nous avons tout d'abord comparé le protocole utilisé à celui de Salmon et al. (2021). La différence majeure est l'utilisation d'une librairie spectrale générée par Prosit lors d'une première acquisition non ciblée dans l'étude de Salmon et *al*. (2021). Cette librairie avait pour but d'automatiser la recherche des peptides spécifiques des deux isoformes lors de la deuxième acquisition, elle, ciblée. Dans notre cas, une acquisition ciblée a directement été réalisée, et les peptides ont été cherchés manuellement. Cette différence de protocole ne permet pas d'expliquer, à elle seule, l'absence de détection des peptides de KRAS.

Nous avons émis deux hypothèses pour expliquer ce problème de détection dans nos échantillons embryonnaires. La première hypothèse serait que les peptides générés sont trop peu abondants pour être détectés, comparativement aux peptides générés à partir de l'échantillon de foie adulte. Cette hypothèse est, cependant, peu probable étant donné que nous détectons facilement KRAS4B lors d'analyses par Western blotting (voir **Figure 1**, **section 2** de la partie **résultat**). La deuxièmement hypothèse serait la présence d'une compétition de charge entre nos peptides d'intérêts et d'autres peptides, entrainant ainsi une perte de détection. Cette hypothèse étant la plus probable, nous avons décidé d'inclure des standards internes (peptides synthétiques lourds marqués au ^{13}C ou ^{15}N) dans notre prochaine expérience. Ces standards nous permettront de déterminer exactement où nos peptides cibles se situent lors de l'acquisition, et de là, de déterminer si l'absence de détection est due à une perte de signal causée par une interférence, ou par l'absence des peptides d'intérêts. Obtenir ces résultats nous permettront de confirmer nos résultats de Western blotting, qui montrent déjà une invalidation de chaque isoforme dans le modèle correspondant, et de quantifier précisément la modification éventuelle d'expression de l'isoforme restante dans chacun des modèles.

3. Analyse croisée de nos études d'expression de KRAS et des rôles de KRAS lors du développement embryonnaire chez la souris

Les résultats de notre étude d'expression mettent en lumière que KRAS est largement exprimée à E13,5. Cependant, notre deuxième étude montre que l'absence de KRAS lors du développement embryonnaire n'induit un défaut de développement majeur que dans le placenta et le cœur.

Bien qu'une expression de KRAS à la membrane, témoin très probable de son activité, ait été observée dans de nombreux organes tels que le poumon et les intestins, aucun phénotype majeur n'a été observé dans ces organes chez les embryons n'exprimant pas KRAS. Cette absence de phénotype suggère une compensation de l'expression et des rôles de KRAS par un autre membre de la famille RAS, à savoir HRAS et NRAS.

Afin de confirmer la possibilité d'une compensation, il serait intéressant de quantifier l'abondance protéique des protéines HRAS et NRAS en l'absence de KRAS dans les organes présentant un phénotype normal, et de comparer ces abondances en présence de KRAS. Une augmentation d'une ou des deux isoformes RAS, suggérerait la présence d'un mécanisme de compensation. En revanche, une absence d'expression dans des souris contrôles, ou une absence d'augmentation dans le modèle *Kras*$^{-/-}$, suggèrerait l'absence d'un rôle clé de KRAS dans ces organes. Cette dernière possibilité irait dans le sens d'une étude qui a montré que, chez des souris déficientes en HRAS et NRAS (*Hras*$^{-/-}$*Nras*$^{-/-}$) un défaut de maturation pulmonaire était présent, malgré la présence de KRAS (Fuentes-Mateos et al., 2019). Ce résultat indique donc que soit KRAS n'est pas essentielle au développement pulmonaire et explique ainsi l'absence de phénotype dans les poumons de nos souris déficientes en KRAS (*Kras*$^{-/-}$), soit qu'un dosage adéquat des membres de la famille RAS, lié à une redondance fonctionnelle entre membres, est requis pour un développement normal.

Finalement, les phénotypes placentaires et cardiaques dus à l'absence de KRAS suggèrent un (des) rôle(s), ou une expression, spécifique(s), unique(s), et essentiel(s) au développement de ces deux organes.

4. Comparaison des rôles de KRAS4A et KRAS4B lors du développement embryonnaire murin

Lors de notre caractérisation phénotypique des différents modèles murins (*Kras*$^{-/-}$, *Kras4A*$^{-/-}$ et *Kras4B*$^{-/-}$), nous avons mis en lumière que la létalité observée à E15,5 chez les embryons *Kras*$^{-/-}$ est due à la présence d'une malformation placentaire et cardiaque. Il en va de même pour les embryons *Kras4B*$^{-/-}$, bien que la malformation cardiaque y soit présente à une fréquence plus faible, comparativement aux

embryons *Kras*$^{-/-}$. Par contre, aucune létalité ou malformation n'a été observée dans les souris *Kras4A*$^{-/-}$. Ces résultats indiquent que l'isoforme KRAS4B est essentielle à la survie et au développement embryonnaire. KRAS4B est donc l'isoforme majeure du développement embryonnaire murin.

Nos résultats montrent aussi que l'isoforme 4B n'est pas indispensable au développement cardiaque. En effet, la majorité des embryons *Kras4B*$^{-/-}$ ne présentent pas d'anomalie cardiaque. L'isoforme 4A compense donc la perte d'expression de l'isoforme 4B et permet, la plupart du temps, une cardiogenèse normale. Pour compléter ces données, il serait intéressant de réaliser une quantification de l'abondance protéique de KRAS4A et KRAS4B dans des échantillons de cœur d'embryons *Kras4A*$^{-/-}$ et d'embryons *Kras4B*$^{-/-}$, et de comparer ces résultats aux abondances présentent dans des échantillons provenant d'embryons *Kras*$^{+/+}$. Les résultats obtenus nous permettraient de comprendre si KRAS4A y est initialement exprimée, ou si son expression est augmentée en réponse à la perte de l'isoforme 4B. La compensation fonctionnelle de KRAS4A dans le processus de cardiogenèse des embryons *Kras4B*$^{-/-}$ est une nouvelle information importante. A l'heure actuelle, KRAS4A était considérée comme n'ayant aucun rôle développemental (Newlaczyl et al., 2017). De ce fait, cette isoforme a été sous-étudiée jusqu'à présent.

Ce résultat est à rapprocher d'autres qui ont montré l'importance de KRAS4A lors du processus de tumorigenèse. Ainsi, il apparaît que *KRAS4A* est le transcrit majoritairement exprimé dans les lignées cellulaires dérivées de différents cancers (Tsai et al., 2015). De façon importante, il a aussi été montré que l'expression de *Kras4A*^{G12V} est une condition suffisante à l'induction de tumeurs pulmonaires métastatiques (Salmón et al., 2021).

L'ensemble de ces résultats indiquent que KRAS4B est l'isoforme jouant un rôle majeur dans le développement embryonnaire et le cancer, bien que KRAS4A présente un rôle non négligeable dans ces processus.

5. Analyse comparative des phénotypes observés dans notre étude et des phénotypes décrits dans la littérature

Les phénotypes que nous avons mis en évidence lors de la caractérisation de notre modèle *Kras*$^{-/-}$ et *Kras4B*$^{-/-}$ présentent des similitudes et des divergences avec les phénotypes déjà décrits de ces modèles. Une variabilité phénotypique importante, concernant aussi bien la présence d'une anomalie que sa fréquence, est observée entre notre étude et les études précédemment publiées, ainsi qu'entre ces études elles-mêmes.

Ainsi, si nous comparons les phénotypes décrits dans la littérature chez les embryons *Kras*$^{-/-}$, nous nous rendons compte que les deux études caractérisant ce modèle (L. Johnson et al., 1997 ; Koera et al., 1997) observent des phénotypes

différents. Une première étude a montré que la létalité observée dans les embryons *Kras*$^{-/-}$ était différente selon le fond génétique du modèle murin. En effet, les embryons de fond génétique mixte BL/6 :129/Sv meurent *in utero* entre E12,5 et la naissance, tandis que les embryons de fond génétique pure 129/Sv meurent entre E12,5 et E14,5. De plus, les embryons étaient caractérisés par une petite taille, une anémie et la présence d'anomalies hépatiques (tel que la présence d'un foie de petite taille, pâle et apoptotique) (Johnson et al., 1997). Par contre, la deuxième étude a montré que les embryons *Kras*$^{-/-}$ (fond génétique BL/6) étaient caractérisés par une létalité présente entre E12,5 et la naissance, la présence d'une anomalie cardiaque (myocarde ventriculaire de faible épaisseur) et d'une forte mortalité cellulaire dans les tissus neuronaux (Koera et al., 1997).

Comparativement à ces études, nous avons montré que les embryons *Kras*$^{-/-}$ (fond génétique CD1) étaient caractérisés par une létalité présente entre E13,5 et la naissance, une petite taille, la présence d'anomalies cardiaques (ventricule droit à double issue, défaut du septum ventriculaire, et non-compaction du myocarde) et placentaires.

Une variabilité phénotypique est également observée dans le modèle *Kras4B*$^{-/-}$, lorsque l'on compare les données déjà publiées aux données que nous avons générées. En effet, nous avons observé dans notre modèle déficient en KRAS4B (fond génétique CD1) une létalité présente entre E13,5 et le jour suivant la naissance, et un phénotype placentaire associé, chez un très faible nombre d'embryons, à un phénotype cardiaque. Par contre, le modèle *Kras4B*$^{-/-}$ (fond génétique mixte BL/6 :129/Sv) caractérisé précédemment montrait une létalité entre E18,5 et le jour suivant la naissance, associée à la présence d'un phénotype cardiaque (hypertrabéculation liée à un défaut de compaction) (Salmón et al., 2021).

La différence la plus marquante entre ces études est le phénotype placentaire que nous sommes les seuls à observer. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que l'analyse de cet organe est souvent négligée et que pour cette raison, les auteurs des autres études sont passés à côté de ce phénotype. Cette possibilité est substanciée par le fait que les phénotypes embryonnaires décrits ne peuvent expliquer à eux seuls une mortalité débutant aussi précocement qu'à E12,5. La présence d'un phénotype placentaire aide dans ce contexte à expliquer cette mortalité précoce. Les autres différences importantes se rapportent à la présence de phénotypes hépatiques et neuronaux qui pourraient s'expliquer par les différences de fonds génétiques existant entre les modèles des différentes études. Une même explication pourrait également être avancée pour expliquer les différences observées au niveau du phénotype cardiaque et de la fenêtre de temps au cours de laquelle une mortalité est observée. Ces différences suggèrent la présence de locus modificateurs liés aux fonds génétiques.

Si l'on compare maintenant les phénotypes observés dans les modèles *Kras*$^{-/-}$ et *Kras4B*$^{-/-}$, on constate que la seule délétion de l'isoforme 4B permet de retarder

sensiblement la fenêtre de mortalité. Cette constatation conduit à la conclusion que l'isoforme 4A tient un rôle, ne fût-ce que mineur, dans la fonction de survie assurée par KRAS. Un autre rôle de KRAS4A apparaît également dans la cardiogenèse dans la mesure où seule une petite proportion d'embryons *Kras4B*$^{-/-}$ montrent un phénotype cardiaque, à l'inverse de la situation observée chez les embryons *Kras*$^{-/-}$ où ce phénotype est plus fréquent. Ainsi, notre travail permet pour la première fois d'assigner des fonctions développementales précises à KRAS4A.

6. Les rôles de KRAS dans le développement et les fonctions placentaires

Notre étude ayant pour but de définir les rôles de KRAS et de ses isoformes lors du développement embryonnaire a mis en évidence que l'absence de cette protéine induisait un développement placentaire défectueux. Pour bien comprendre la portée de ces résultats, quelques explications sur le développement du placenta sont nécessaires. Des différences existent dans la façon dont le placenta se développe entre mammifères. Les explications ci-dessous se rapportent au développement du placenta murin.

6.1. Développement du placenta murin

De manière générale, le placenta peut être assimilé à un organe composite formé de deux grandes lignées cellulaires distinctes : la lignée cellulaire trophoblastique et le mésoderme extra-embryonnaire (**Figure 1**). La lignée cellulaire trophoblastique est la première lignée à se différencier au cours du développement ; elle génère exclusivement différents types de trophoblastes. Pour sa part, le mésoderme extra-embryonnaire provient de la masse cellulaire interne et contribue à la formation des capillaires fœtaux du placenta (formés de cellules endothéliales) (Winterhager et al., 2018). De plus, le placenta est un organe composé également de tissus maternels. Les tissus maternels sont issus de la caduque (aussi appelée décidua) qui est formée lors du processus de décidualisation, réaction de l'endomètre suite à l'implantation du blastocyste (Ramathal et al., 2010).

Le placenta débute sa formation entre E3,5 et E4,5, lors de la formation du blastocyste, (**Figure 1**) lorsque les cellules du trophectoderme (TE) forment les cellules géantes trophoblastiques (TGC, de l'anglais *trophoblast giant cell*) qui aideront à l'implantation. Après l'implantation, l'ectoderme extra-embryonnaire (ExE) se forme à partir des cellules polaires du TE qui recouvrent la masse cellulaire interne. Les cellules nouvellement formées de l'extrémité proximale de l'ExE vont ensuite se différencier et constituer le cône ectoplacentaire (CEP). Ensuite, les cellules bordant le CEP vont se différencier en TGC secondaires et, par invasion du stroma endométrial, vont entrer en contact avec les artères maternelles (aux alentours

de E9,5). Ce processus permet au sang maternel d'être acheminé vers le placenta dans des conduits formés de trophoblastes.

Lorsque la gastrulation débute (**Figure 1A**), l'ectoderme chorionique (formé par la différenciation des cellules de l'EXE) et l'allantois (All) (formé à partir du mésoderme extra-embryonnaire) sont constitués. Il s'ensuit une fusion chorio-allantoïque (E8,5) qui induit la fusion de cellules individuelles trophoblastiques, pour ainsi former les syncytiotrophoblastes (SynT). Ces cellules nouvellement formées vont constituer une interface d'échanges et de transport également appelé membrane interhémisphérique du placenta. Cette interface d'échange (**Figure 1B**) n'est pas seulement constituée de SynT chez la souris. L'ensemble de l'interface est en fait constituée d'un total de quatre couches cellulaires continues : on trouve ainsi, en partant du côté fœtal pour aller vers le côté maternel, une couche de cellules endothéliales fœtales (dérivées du mésoderme extra-embryonnaire), deux couches de SynT (SynT-I et SynT-II, respectivement) et une couche de TGC sinusoïdaux (s-TGC, probablement issus du trophoblaste chorionique) (**Figure 1B**). Il est à noter que les s-TGC forment les sinus maternels à travers lesquels le sang maternel (amené par les artères et les canaux spiralés tapissés de trophoblastes) percole et permet, ainsi, aux nutriments et à l'oxygène d'être transportés pour atteindre le sang fœtal circulant dans les capillaires fœtaux (délimités par les cellules endothéliales). Les étapes de formation de la membrane interhémisphérique se réalisent vers E9,5-10,5 et conduisent à la formation du labyrinthe, compartiment principal du placenta murin.

Ce placenta est également constitué d'un deuxième compartiment important, la zone jonctionnelle (ZJ, compartiment situé entre la caduque et le labyrinthe) (**Figure 1**). Cette couche placentaire est composée de trois types cellulaires issus de la différenciation de cellules originaires du CEP ; les spongiotrophoblastes (SpT), les trophoblastes à glycogènes (GT, de l'anglais *glycogen trophoblast*) et une couche de TGC bordant directement la caduque. Il est à noter que les GT s'associent souvent aux espaces sanguins maternels (canaux ou sinus). En raison de leur contenu en glycogène et de leur localisation, les GT serviraient de réserve d'énergie, pouvant fournir des nutriments supplémentaires au placenta et/ou à l'embryon. En outre, la ZJ constitue le principal compartiment endocrinien du placenta, étant donné les grandes quantités d'hormones, de facteurs de croissance et de cytokines produits par celui-ci.

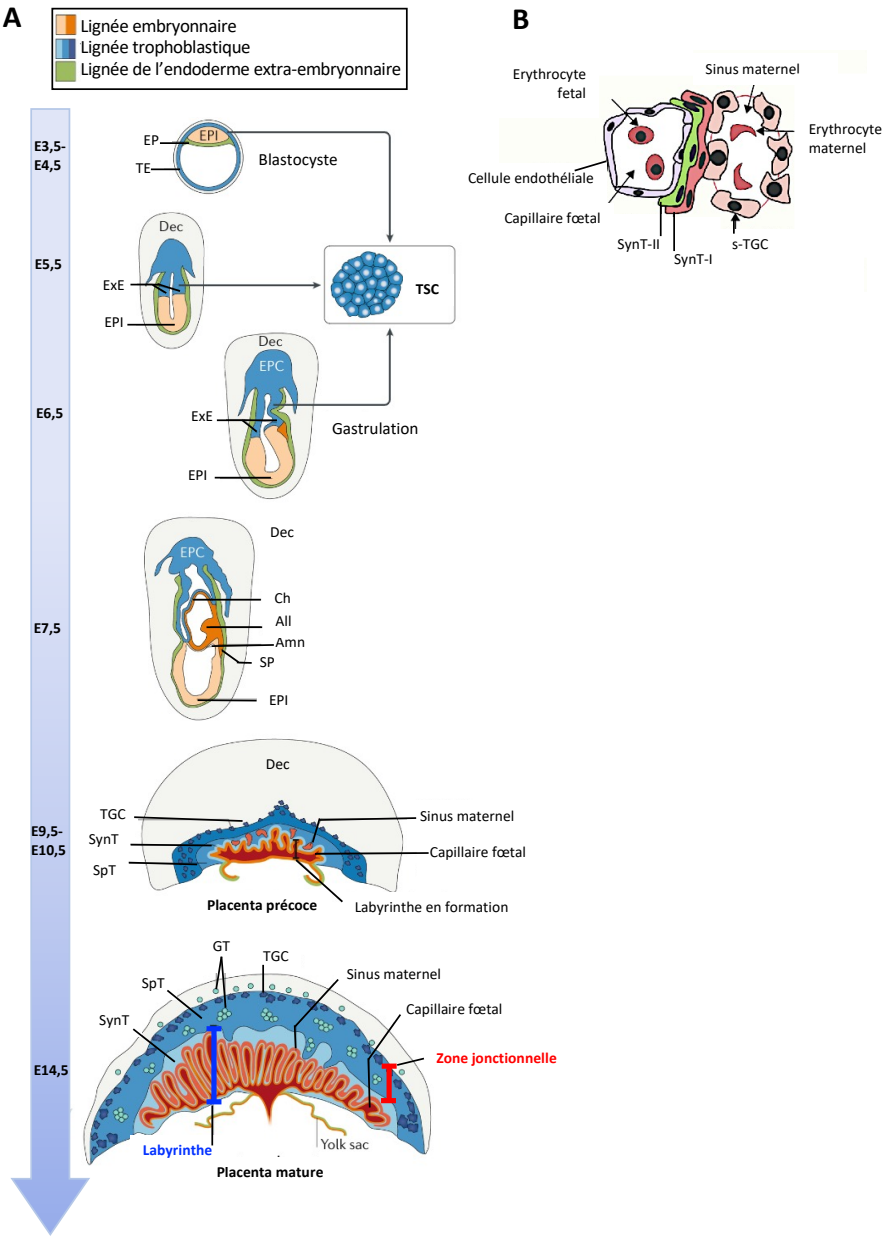


Figure 1. Illustration du développement placentaire. (**A**) Schéma représentant les différentes grandes étapes du développement placentaire. TE, trophectoderme ; EPI, épiblaste ; EP, endoderme primitif ; ExE, ectoderme extra-embryonnaire ; Amn, amnios ; Ch, chorion ; All, allantoïs ; SP, strie primitive ; SynT, syncytiotrophoblaste ; Dec, décidua ; TGC, cellules géantes trophoblastiques ; SpT, spongiotrophoblastes et GT, trophoblastes à glycogène (adapté de Hemberger et al., 2020).(**B**) Schéma de la zone d'échange du labyrinthe (adapté de Nadeau et al., 2012).

6.2. Implication de KRAS dans la différenciation des progéniteurs placentaires

Lors de la caractérisation du phénotype placentaire des embryons déficients en KRAS (*Kras*$^{-/-}$), nous avons mis en évidence une hypotrophie du placenta (petite taille et petit poids) ainsi qu'une diminution significative du nombre de GT. Ces observations suggèrent un rôle de KRAS dans la prolifération et la différenciation des cellules souches trophoblastiques.

Nos données identifient également un rôle de KRAS dans la différenciation des cellules souches trophoblastiques en un type cellulaire placentaire particulier, les GT. Les GT sont l'un des trois composants de la ZJ du placenta. Ce compartiment placentaire, composé à la fois de GT, de SpT, et de TGC, agit comme un compartiment endocrinien indispensable à la survie de l'embryon. Ainsi, deux études ayant caractérisé le phénotype de souris déficientes en *Mash,2* (gène sujet à empreinte parentale, exprimé par les cellules du CEP à partir du chromosome hérité de la mère) ont mis en évidence que l'absence d'expression de ce gène induisait une létalité embryonnaire (aux alentours de E10) associée à un développement défectueux de la ZJ (Guillemot et al., 1995 ; Tanaka et al., 1997). S'il a été supposé dans un premier temps que les GT se différenciaient à partir des SpT (Adamson et al., 2002 ; Georgiades et al., 2002), des données ont ensuite mis en évidence que les GT exprimaient spécifiquement le gène *Pcdh12* et que l'expression de celui-ci se faisait au sein d'une petite population de cellules du CEP, ce qui suggère un processus de différenciation ne reposant pas sur les SpT (Bouillot et al., 2006 ; Rampon et al., 2005). Cette hypothèse a été renforcée par une analyse de données issues de snRNA-seq de placenta qui suggèrent que les différents types de trophoblastes se différencient à partir de progéniteurs multipotents (Marsh & Blelloch, 2020).

Les fonctions de ce type cellulaire particulier sont toujours non-élucidées à ce jour. L'hypothèse principale est que les GT peuvent fournir un apport d'énergie complémentaire lors du développement de l'embryon (Coan et al., 2006). L'apport de nutriment faisant l'objet d'une section distincte de cette discussion, l'impact potentiel de la diminution de GT sur cet apport est discuté dans la section suivante.

En résumé, la diminution de GT observée en l'absence de KRAS suppose un rôle de KRAS dans la différenciation des cellules progénitrices issues du CEP en GT. Les données de snRNA-seq que nous avons collectées et analysées avec l'aide de Laurent Gattot et Axelle Loriot (Institut de Duve), et que nous devons terminer de conforter, montrent aussi une diminution des GC dans les placentas *Kras*$^{-/-}$. Nos résultats révèlent ainsi pour la première fois un rôle de KRAS dans le processus de différenciation d'un type cellulaire bien précis.

6.3. Implication de KRAS dans l'apport de nutriment : lien direct ou indirect ?

L'une des fonctions principales du placenta est de fournir un apport adéquat de nutriments afin de permettre un développement intra-utérin adéquat (Knipp et al., 1999). Les résultats que nous avons obtenus lors de la caractérisation des embryons déficients en KRAS mettent en évidence la présence d'un défaut de croissance et d'une hypoglycémie. Ces phénotypes pourraient s'expliquer par un apport inadéquat de nutriments. Dans ce contexte, l'hypoglycémie observée reflète un défaut dans l'apport de glucose, un hydrate de carbone essentiel au développement embryonnaire (Larqué et al., 2013). La faible concentration de glucose dans le sang des embryons *Kras*$^{-/-}$ pourrait s'expliquer par un défaut de l'apport de ce carbohydrate par la mère. Cependant, cette explication peut être écartée dans la mesure où les femelles portant les embryons analysés ont une glycémie allant de 112 mg/dl et 139 mg/dl (une glycémie normale chez une souris gestante se situe aux alentours de 125 mg/dl (Sadler & Hunter, 1987)), et que les embryons exprimant KRAS (*Kras*$^{+/+}$ et *Kras*$^{+/-}$*)* de la même portée présentent une glycémie plus élevée (aux environs de 40 mg/ml), indiquant un apport adéquat de glucose par la mère.

La présence d'un placenta de petite taille et le faible nombre de GT pourrait au moins en partie expliquer l'hypoglycémie. En effet, il est connu qu'un défaut placentaire est associé à un déficit de croissance. En fait, jusqu'à la mi-gestation, le sac vitellin (tissu extra-embryonnaire issu de l'hypoblaste et créant un lien avec la mère afin d'assurer un apport régulier en métabolites et oxygène (Ross & Boroviak, 2020)) répond aux besoins nutritionnels de l'embryon tandis qu'à partir de E10, les nutriments sont apportés par le placenta (Winterhager et al., 2018). De ce fait, il est attendu qu'un petit placenta, comme celui observé chez les embryons *Kras*$^{-/-}$, ne pourra pas répondre aux besoins nutritionnels nécessaires à l'embryon et induira donc un retard de croissance. De plus, les GT sont présents en faible nombre dans les placentas KO. Il est connu qu'en fin de gestation, la croissance de l'embryon nécessite une quantité importante d'énergie. Le glycogène stocké dans les vacuoles cytoplasmiques des GT pourrait être rapidement converti en glucose, et être ensuite libéré dans le sang maternel circulant dans la ZJ. Ces GT aideraient donc à fournir la quantité d'énergie nécessaire à l'embryon (Coan et al., 2006). Par conséquent, nous pouvons imaginer que le nombre réduit de GT présents dans le placenta des embryons *Kras*$^{-/-}$ n'est pas suffisant pour fournir l'énergie nécessaire lors des dernières étapes du développement.

Par ailleurs, et d'un point de vue fonctionnel, nos données de phospho-protéomique mettent en évidence de nombreuses perturbations de la phosphorylation de transporteurs de type SLC (de l'anglais, *solute carrier*). Ces modifications de phosphorylation (à confirmer par Western blotting) suggèrent une perturbation de la fonction des transporteurs concernés et, par conséquent, un mauvais transport du (des) nutriment(s) concerné(s), pouvant potentiellement expliquer le retard de

croissance des embryons *Kras*$^{-/-}$. D'une façon importante, un transporteur du glucose, SLC2A1, également appelé GLUT1, présente une perturbation de sa phosphorylation. Dans le placenta, le transport de glucose est assuré par deux transporteurs, GLUT1 et GLUT3. Comparé à GLUT1, GLUT3 présente néanmoins une K_m (constante de Michaelis) pour le glucose plus faible que GLUT1 et n'est par ailleurs situé que du côté maternel (Knipp et al., 1999). Si la perturbation de phosphorylation observée de GLUT1 entraine une fonction défectueuse, nous pouvons imaginer que le transport de glucose est alors insuffisant, étant donné que GLUT3 ne pourra pas compenser la perte fonctionnelle de GLUT1. Cela pourrait conduire à une hypoglycémie pouvant mener à un retard de croissance. KRAS jouerait donc un rôle direct dans l'apport de nutriment par une régulation des transporteurs de type SLC, dont GLUT1. Ce rôle supposé est renforcé par les résultats d'études sur les cancers. En effet, dans de nombreuses lignées cellulaires de cancer colorectal, l'augmentation de l'expression de GLUT1, et donc de l'absorption de glucose, dépend de la présence de la forme oncogénique de KRAS (Yun et al., 2009).

Ainsi, KRAS induirait un retard de croissance et une hypoglycémie en contrôlant à la fois le processus de différenciation des GT et l'activité de transporteurs de nutriments.

6.4. Implication de KRAS dans l'apport d'oxygène

Une seconde fonction importante du placenta est le transfert de l'oxygène de la mère vers le fœtus. Un apport adéquat de ce gaz est essentiel pour la survie et le développement de l'embryon. Or, la présence d'une hypoxie a été mise en évidence chez les embryons *Kras*$^{-/-}$ par une augmentation significative de l'abondance de HIF-1α et de la formation d'adduits de pimonidazole. Une tendance à l'hypoxie a également été observée dans le placenta de ces embryons.

Pour chercher à comprendre l'origine de cette perturbation, il faut savoir que l'hypoxie intra-utérine peut être associée à de nombreuses conditions ; elle peut avoir une origine maternelle, placentaire, ou embryonnaire, et entrainer de nombreuses conséquences. Cette hypoxie peut être classifiée en trois sous-types : l'hypoxie pré-placentaire (la mère et l'embryon sont hypoxiques), l'hypoxie utéro-placentaire (l'oxygénation du sang maternel est normale mais la circulation placentaire est impactée) et l'hypoxie post-placentaire (seul l'embryon est hypoxique) (Kingdom & Kaufmann, 1997). Dans le cadre de cette discussion, seules les hypoxies utéro-placentaire et post-placentaire retiendront notre attention.

Si nous considérons la présence d'une hypoxie significative seulement chez l'embryon, nous nous trouvons dans le cas d'une hypoxie post-placentaire. Ce type d'hypoxie trouve son origine dans une perfusion embryo-placentaire insuffisante. Celle-ci peut être causée par une défaillance cardiaque embryonnaire progressive ou par la présence d'une anomalie génétique. Cependant, nous pouvons exclure cette

hypothèse car une hypoxie est observée dans les embryons déficients en KRAS4B (*Kras4B*$^{-/-}$), alors que ceux-ci ne présentent majoritairement pas de phénotype cardiaque.

Si nous considérons maintenant l'hypoxie de l'embryon et la tendance hypoxique dans le placenta, nous nous trouvons dans le cas d'une hypoxie utéro-placentaire. Dans ce type d'hypoxie, le sang maternel, normalement oxygéné, n'arrive pas à entrer correctement dans le tissu placentaire (Kingdom & Kaufmannb, 1997). Si le sang maternel rencontre des difficultés à entrer dans le labyrinthe, compartiment placentaire où les échanges d'oxygène se réalisent, nous pouvons imaginer qu'en réponse à ce phénomène, les espaces transportant ce sang se dilatent. Cette hypothèse peut ainsi expliquer la dilatation des sinus maternels que nous observons. Dans ce cas, la dilatation des sinus maternels peut, hypothétiquement, créer une dépression dans ces cavités et donc favoriser l'entrée du sang maternel.

Par ailleurs, si la dilatation des sinus maternels peut être considérée comme une conséquence de l'hypoxie, elle peut également être considérée comme une cause. Dans ce cas, l'hypoxie embryonnaire serait la conséquence d'une modification du gradient de pression partiel de l'oxygène. En effet, une dilatation des espaces où se trouve le sang maternel oxygéné pourrait entrainer une diminution de la pression partielle en oxygène (PO_2) dans ces sinus. Ce changement de PO_2 va alors modifier le gradient de PO_2 fœto-maternel qui existe entre les cavités où circule le sang de l'embryon et les cavités où circule le sang maternel. Or, ce gradient est essentiel à la bonne diffusion de l'oxygène à travers la membrane interhémisphérique (B. S. Saini et al., 2020).

Il faut aussi considérer le fait que l'oxygène doit traverser une interface d'échange formée de 4 couches cellulaires, la membrane interhémisphérique. L'épaisseur de cette dernière impacte donc la diffusion de l'oxygène vers l'embryon. Il est connu qu'un épaississement de cette membrane induit le développement d'une hypoxie embryonnaire (Winterhager et al., 2018). Cependant, à ce stade, nos observations n'ont pas mis en évidence un tel épaississement. Afin d'écarter définitivement cette hypothèse, il serait intéressant de quantifier précisément l'épaisseur de cette membrane en examinant des coupes histologiques de labyrinthe à un grossissement de 20 000 fois, par microscope électronique à balayage (Langford et al., 2018).

Finalement, le défaut de transport de l'oxygène du placenta vers l'embryon pourrait être la conséquence d'une hémoglobine non fonctionnelle, plutôt que d'un défaut placentaire. Après diffusion à travers la membrane interhémisphérique, l'oxygène doit en effet se lier à l'hémoglobine du sang embryonnaire afin d'être transporté puis libéré dans les différents tissus. Une hypothèse serait donc que KRAS participerait à la bonne production/fonction de l'hémoglobine fœtale (HbF). Cette hypothèse ne peut être écartée car des études ont mis en évidence un lien potentiel entre KRAS, NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, facteur de transcription jouant un rôle dans la réponse antioxydante lors d'un stress oxydatif et

dans la régulation du métabolisme du fer, de l'hème et de l'hémoglobine (Kasai et al., 2018)), et la régulation des gènes de la globine (Kansanen et al., 2013 ; Tao et al., 2014 ; Zhu et al., 2019). Ainsi, un modèle murin de drépanocytose (modèle murin humanisé d'anémie falciforme) dans lequel *Nrf2* est inactivé montre une mortalité *in utero* associée à une diminution de l'expression de HbF (Ryan et al., 1997). Cette diminution résulte d'une régulation directe et indirecte de l'expression de HbF par NRF2 (Zhu et al., 2018). Comme la transcription de *Nrf2* est régulée par la forme oncogénique de KRAS (Kansanen et al., 2013 ; Tao et al., 2014), on peut penser que l'absence de KRAS entrainera une diminution de l'expression de la globine.

7. Rôle de KRAS dans le développement cardiaque

Notre travail a mis en évidence la présence de malformations cardiaques causées par l'absence de KRAS. Pour discuter de la portée de ces résultats, quelques explications sur le développement du cœur sont nécessaires.

7.1. Développement du cœur

La première étape du développement cardiaque consiste en la formation, à partir du mésoderme cardiogénique, des croissants cardiaques formés du premier et du second champ cardiaque, vers E7,5 (Chong et al., 2014). Ce processus est initié suite à l'expression de FGF (de l'anglais *fibroblast growth factor*), BMP (*bone morphogenic protein*), MESP1/2 (*mesodermal posterior 1 and 2*), et TBX6 (*T-box transcription factor 6)* du mésoderme voisin (Wilsbacher & McNally, 2016). A E8,0, les cellules progénitrices présentes dans les croissants cardiaques, composés de cellules précurseurs endocardiques et myocardiques et exprimant GATA 4/5/6 (*GATA binding factor 4, 5 and 6*), NKX2.5 (*Homeobox protein Nkx 2.5*), et TBX5 (*T-box transcription factor 5*), vont migrer vers la ligne médiane de l'embryon afin de former le tube cardiaque (**Figure 2**). Dès lors, le tube cardiaque nouvellement formé sera constitué d'une couche externe myocardique et d'une couche interne endocardique, séparées par une matrice acellulaire. A ce même stade, la contraction des cellules myocardiques commence.

Par la suite, aux alentours de E8,5, le tube cardiaque va s'enrouler sur la droite créant une courbure externe à partir de laquelle se forment les deux ventricules ; c'est l'étape du *looping* cardiaque. Lors de cette étape, les cellules issues du second champ cardiaque, au niveau des pôles d'entrée et de sortie, vont commencer à migrer vers l'intérieur. La matrice acellulaire va également disparaitre petit à petit au niveau des futures chambres principales, à savoir les oreillettes et les ventricules, tandis qu'elle va s'accumuler dans la zone de jonction entre les oreillettes et ventricules, appelée jonction auriculo-ventriculaire, et dans le canal de sortie afin de former les coussins endocardiques (Chong et al., 2014). Lors de ces processus, les gènes *Nkx2.5, T-box* et *Gata* sont toujours exprimés (Wilsbacher & McNally, 2016).

Après le looping cardiaque et l'établissement de l'asymétrie gauche-droite (vers E9,0), le cœur subit une croissance importante. Quatre chambres vont alors se former et un élargissement des parois ventriculaires se réalise. Lors de cette phase de croissance cardiaque, les cardiomyocytes prolifèrent à partir de la couche sous-épicardique sous forme d'un maillage de faisceaux contractiles, appelé myocarde trabéculaire. Les cardiomyocytes trabéculaires sont relativement gros et sont juxtaposés à l'endothélium, théoriquement pour fournir des nutriments et favoriser les échanges gazeux, avant que la vascularisation coronaire ne se développe (Wilsbacher & McNally, 2016). A E10,5, la convergence des pôles d'entrée et de sortie a lieu, ainsi que la migration de cellules progénitrices de la crête neurale vers le cœur. Ces cellules vont alors contribuer à la formation de la voie de sortie, du septum auriculo-ventriculaire, et des valves cardiaques (Chong et al., 2014). A E11,5, le processus de compactage débute et se poursuit jusqu'à la naissance. Au cours de ce processus, les cardiomyocytes des régions externes des ventricules prolifèrent à un rythme nettement plus élevé que les cardiomyocytes des régions internes, et les cardiomyocytes individuels adoptent une morphologie plus petite et plus dense (Wilsbacher & McNally, 2016). Finalement, à E14,5, la délimitation des quatre cavités est définie et la septation est complète (Chong et al., 2014).

Du point de vue des origines cellulaires des différents types de cellules cardiaques, les cellules du premier champ cardiaque participent presque exclusivement à la formation du myocarde et de l'endocarde du ventricule gauche, tandis que les cellules progénitrices du second champ cardiaque forment presque exclusivement le myocarde et l'endocarde du ventricule droit et de la voie de sortie. Les oreillettes sont, quant à elles, constituées d'un mixte de progéniteurs venant des deux champs. Les vaisseaux d'entrée sont, eux, composés principalement de cellules progénitrices de la crête neurale, et en moindre mesure de progéniteurs du second champ cardiaque (Chong et al., 2014).

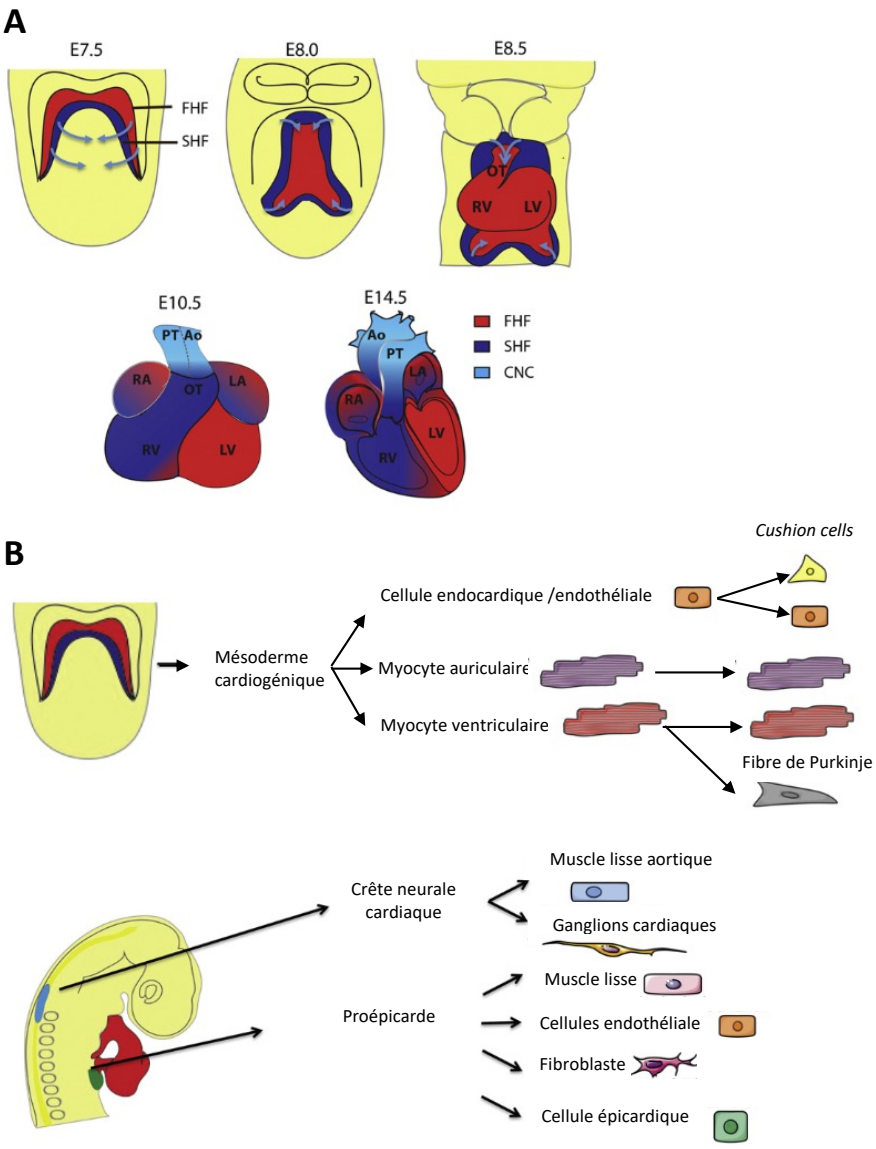


Figure 2. Cardiogenèse et origine des types cellulaires cardiaques. (**A**) Schéma illustrant les grandes étapes de la formation du cœur. Le premier champ cardiaque est représenté en rouge (FHF, de l'anglais *first heart field*), le second champ cardiaque est représenté en bleu (SHF, de l'anglais, *second heart field*), la crête neurale cardiaque est représentée en bleu clair (CNC, de l'anglais *cardiac neural crest*). Les abréviations proviennent de l'anglais : AO, *Aorta* ; LA, *left atria* ; LV, *left ventricle* ; OT, *outflow tract* ; PT, *pulmonary trunk* ; RA, *right atria* ; RV, *right ventricle*. (**B**) Les différentes lignées cellulaires cardiaques et leur origine. (adapté de Chong et al., 2014).

7.2. Implication de KRAS dans la différenciation des cellules progénitrices cardiaques

Lors de la caractérisation de nos embryons déficients en KRAS, une malformation cardiaque, comprenant la présence d'un défaut de compaction du myocarde, d'une anomalie septale ventriculaire (VSD, de l'anglais *ventricular septal defect*) et d'un ventricule droit à double sortie (DORV, de l'anglais *double outlet right ventricle*) a été mise en évidence.

Pour tenter de comprendre l'origine du phénotype, il faut mentionner que des mutations de *TBX5, NKX2.5* et *GATA4* sont associées à des défauts de septation cardiaque, incluant le VSD, chez l'Homme (Wolf & Basson, 2010). Par contre, une perturbation de l'induction, de la spécification, et de la migration des cellules de la crête neurale semble être le principal facteur induisant des défauts des voies de sortie, tel que le DORV (Kloesel et al., 2016). KRAS serait donc impliqué à la fois dans la régulation des progéniteurs cardiaques exprimant *Tbx5, Nkx2.5* et *Gata*4 et de ceux de la crête neurale. Les anomalies cardiaques observées dans les embryons *Kras*$^{-/-}$ seraient ainsi une conséquence d'une embryogenèse cardiaque incomplète dans la mesure où la population de cellules progénitrices cardiaques impactée par l'absence de KRAS permet la formation du cœur, mais de manière imparfaite. Il est à noter que si l'absence de KRAS bloquait complètement la formation du cœur de façon précoce, la mortalité embryonnaire serait observée aux alentours de E10.

Afin de comprendre à quel stade du développement cardiaque KRAS est indispensable, il serait intéressant de caractériser les anomalies cardiaques des embryons KO à des stades plus précoces. En effet, les cellules pouvant être à l'origine des malformations observées dans nos embryons *Kras*$^{-/-}$ ont des rôles clés lors de la cardiogenèse entre E8,0 et E11,5 (pour rappel, les cellules exprimant les gènes *Tbx5, Nkx2.5* et *Gata4* forment le tube cardiaque vers E8,0, les cellules de la crête neurale migrent vers E10,5 et la compaction a lieu à partir de E11,5). Analyser les cœurs à des stades précoces (E8,0-E11,5) nous permettrait donc d'étudier l'impact de l'absence de KRAS sur l'expression des gènes impliquée dans ces processus. Nous pourrions également caractériser la différenciation, en cardiomyocytes, de cellules souches pluripotentes induites humaines (cellules hiPS, de l'anglais *human induced pluripotent stem cell*) (Karakikes et al., 2015), dans lesquelles *KRAS* serait inactivée.

7.3. Hypoxie : cause de la malformation cardiaque ?

Nous avons ci-avant cherché à expliquer l'hypoxie présente dans les embryons déficients en KRAS sous l'angle d'une perturbation de la fonction placentaire. Dans cette section, nous allons la discuter comme pouvant être la cause de la perturbation du développement cardiaque.

L'hypoxie peut être vue, en effet, comme étant la cause de la malformation cardiaque. Effectivement, la cardiogenèse est un processus sensible aux perturbations du taux en oxygène, des perturbations de ces taux induisant des malformations cardiaques (Yuan et al., 2017). Ainsi, pour une cardiogenèse correcte, les cellules du tube cardiaque doivent se trouver dans un état hypoxique, tandis que les cellules progénitrices du second champ cardiaque doivent être dans un état normoxique. La présence inhabituelle d'une hypoxie dans l'environnement des cellules du second champ cardiaque induit le développement de diverses malformations qui incluent un VSD, un DORV, un amincissement de la paroi ventriculaire, une hyperplasie du ventricule droit, une dilatation du ventricule droit, une persistance du *truncus arteriosus* et des anomalies cardiaques complexes telles qu'une aorte chevauchante avec VSD (Yuan et al., 2017). Plus l'hypoxie est importante, plus les anomalies sont graves. Ces observations suggèrent que les malformations cardiaques sont induites par l'hypoxie. Pour confirmer cette possibilité, on pourrait placer une femelle gestante portant des embryons *Kras*$^{-/-}$ en hyperoxie. L'hyperoxie maternelle permettrait, potentiellement, un transfert d'oxygène plus important menant à une normoxie ou hypoxie plus faible. Si les défauts cardiaques sont absents ou moins importants, nous pourrions conclure que l'hypoxie induit les anomalies cardiaques.

7.4. L'axe placenta-cœur : KRAS est-il aussi impliqué ?

Lors du développement embryonnaire, le placenta et le cœur représentent deux structures vasculaires critiques ayant une ontogenèse commune. Le développement parallèle de ces deux organes est appelé « axe placenta-cœur » (Andescavage & Limperopoulos, 2021). Lors de leur développement précoce, le placenta et le cœur partagent de multiples voies (telle que la voie Wnt/β-caténine) et micronutriments essentiels (tel que le folate) (Hemberger & Cross, 2001). L'existence d'un tel axe suppose qu'un problème lié à un gène impliqué dans celui-ci induirait une anomalie de développement dans ces deux organes (Hemberger & Cross, 2001). De plus, des études chez la souris et chez l'Homme font mention de l'association entre la présence d'une anomalie de développement placentaire et cardiaque.

Ainsi, chez la souris, des études caractérisant des modèles murins génétiquement modifiés montrent que la présence d'un placenta anormal (petite taille, anomalie de structure) est fréquemment associée à la présence d'une anomalie cardiaque. Par exemple, une inactivation du récepteur *Pparγ* est caractérisée par la présence d'une anomalie de vascularisation du placenta et par la présence d'un myocarde ventriculaire de faible épaisseur (Barak et al., 1999).

Par ailleurs, quelques études chez l'Homme ont fait un lien entre la présence d'un placenta de petit poids et la présence d'anomalie cardiaque congénitale chez le nouveau-né (Jones et al., 2015 ; Matthiesen et al., 2016 ; Rychik et al., 2018). Il a été mis en évidence que le poids moyen du placenta chez les nouveau-nés atteints de

malformations cardiaques était plus faible que chez les nouveau-nés sans pathologie cardiaque. Une étude danoise a, également, montré que la diminution de poids était plus importante chez les bébés présentant une tétralogie de Fallot (TF), suivi d'un DORV et/ou d'un VSD (Matthiesen et al., 2016). Il est à noter que cette étude associe également le faible poids du placenta et la présence de TF, DORV ou VSD, à un faible poids du nourrisson (Matthiesen et al., 2016). De là, Andescavage & Limperopoulos (2021) ont réalisé un résumé des études humaines associant des anomalies placentaires (à savoir anomalie de taille, de forme, de fonction, …) à une anomalie cardiaque congénitale.

L'ensemble de ces informations suggèrent que dans notre modèle murin déficient en KRAS (*Kras*$^{-/-}$*),* l'anomalie placentaire (placenta de petite taille, sinus maternels dilatés et diminution des GT) pourrait être fonctionnellement liée à la présence des anomalies cardiaques. Cependant, notre expérience de complémentation tétraploïde montre que, malgré un placenta fortement enrichit en cellules, un embryon *Kras*$^{-/-}$ complémenté présente toujours un VSD. Ce résultat montre ainsi que le phénotype cardiaque n'est pas associé au phénotype placentaire dans notre modèle.

8. Les RASopathies : qu'en est-il du phénotype placentaire et cardiaque ?

Les RASopathies sont définies comme un regroupement de syndromes génétiques induits par une mutation germinale d'un gène codant pour un effecteur de la voie de signalisation RAS/MAPK (Bentires-Alj et al., 2006). Les patients atteints de RASopathie souffrent habituellement de malformations cardiaques, d'anomalies faciales, cutanées, musculosquelettiques, oculaires, et d'un défaut neurocognitif (Rauen, 2013). Les mutations de *KRAS* responsables du développement de ce syndrome sont toutes des mutations gain de fonction. Par contre, dans le cadre de notre étude, nous avons étudié l'inactivation de ce gène. Quels sont les points marquants d'une analyse croisée des phénotypes ?

Un premier point marquant est que les organes affectés par une mutation gain de fonction de KRAS sont plus nombreux que ceux affectés par une perte de fonction de KRAS. Ceci s'explique plus que probablement par l'existence de mécanismes de redondance fonctionnelle avec HRAS et NRAS quand KRAS est inactivée, la mutation gain de fonction pouvant, elle, faire sentir ses effets même quand d'autres RAS sont présents.

Par ailleurs, il apparait que le cœur est affecté par les deux types de mutation. En effet, les patients atteints du syndrome de Noonan, l'une des RASopathies, souffrent de malformations cardiaques congénitales dans 50 à 80% des cas, incluant une sténose pulmonaire (rétrécissement de la voie d'éjection pulmonaire induisant une obstruction du flux sanguin du ventricule droit vers l'artère pulmonaire) et une cardiomyopathie hypertrophique (hypertrophie du muscle cardiaque). Cependant, si

ce syndrome est lié à la présence de $KRAS^{muté}$, les patients souffrent de malformations cardiaques congénitales dans 100% des cas (Nosan et al., 2013). Par contre, dans notre étude, l'inactivation de *Kras* induit la non-compaction du myocarde reflétant un myocarde plus fin. Ces informations montrent que la présence d'une mutation activatrice mène à l'hypertrophie myocardique tandis qu'une mutation inactivatrice mène à l'hypotrophie myocardique. Ainsi, bien que les phénotypes soient opposés, la malformation cardiaque est toujours présente.

Les RASopathies sont également caractérisées par un retard mental. Dans le cadre de notre étude, nous n'avons pas pu évaluer la présence ou non d'un déficit cognitif étant donné que les embryons $Kras^{-/-}$ meurent *in utero*. De plus, nous ne pouvons pas exclure la présence d'un défaut de fonction neuronal, bien qu'aucun défaut de développement majeur du cerveau n'a été mis en évidence lors de notre caractérisation.

Finalement, notre étude a mis en évidence une anomalie placentaire lors de l'inactivation de *Kras*. Du point de vue des RASopathies, et par référence au phénotype cardiaque, on pourra s'attendre à un placenta plus gros (ou à des perturbations cellulaires plus subtiles) en présence d'une mutation gain de fonction de KRAS. Cependant, aucune étude n'a encore fait référence à une anomalie du placenta. Ayant maintenant identifié un phénotype placentaire associé à une mutation de KRAS, il serait intéressant à l'avenir d'étudier le placenta de ces patients avec RASopathies afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, en particulier si KRAS est directement impliquée dans l'axe de développement cœur-placenta.

9. Perspectives

En résumé, mon travail de thèse apporte de nouvelles informations concernant le rôle essentiel de KRAS dans le développement embryonnaire murin. Ainsi, nous révélons que KRAS est essentiel au développement du placenta et nous montrons pour la première fois que KRAS, au-delà de ces fonctions bien connues dans la prolifération cellulaire, était capable de contrôler un processus de différenciation cellulaire. Nous montrons aussi que c'est l'isoforme d'épissage KRAS4B qui assure ses fonctions placentaires.

Dans les perspectives ouvertes par nos résultats, un aspect « humain » pourrait être développé en testant *in vitro* certaines hypothèses. Effectivement, comme expliqué précédemment, nous pourrions imaginer de tester le rôle de KRAS dans la différenciation de cellules souches trophoblastiques humaines, ainsi que dans la différenciation de cellules progénitrices cardiaques humaines.

Ensuite, une dimension « biomédicale » pourrait être à l'avenir apportée à ce travail en essayant d'établir un lien entre la présence de malformation cardiaque et la présence potentielle d'une mutation inactivatrice de *KRAS*. Dans cette optique,

des cohortes de patients pédiatriques diagnostiqués comme étant porteurs de malformations cardiaques (VSD, DORV et non compaction du myocarde) pourraient être établies afin de réaliser un dépistage de la présence d'une anomalie dans le gène de *KRAS* par séquençage de l'ADN génomique en ciblant ce gène. De manière hypothétique, si une mutation de *KRAS* est identifiée chez des patients, il serait intéressant d'analyser les données sur le placenta (poids, taille, aspect macroscopique…), si de telles données ont été recueillies, ou dans le meilleur des cas réaliser une analyse histologique, si un échantillon a été collecté. Dans le but d'apporter cette dimension à notre projet, une cohorte pédiatrique de 50 patients présentant des malformations cardiaques est en cours de séquençage et d'analyse dans le laboratoire du Docteure F. Rochais (MMG, Marseil Medical Genetics).

Finalement, l'absence de donnée signalant la présence d'une mutation inactivatrice de *KRAS* chez l'Homme suggère le caractère létal d'une telle mutation, comme cela est observé chez la souris. Dès lors, il serait intéressant d'analyser ou de collecter des échantillons d'ADN de cohorte d'interruption de grossesse en raison de la mise en évidence d'une atteinte fœtale (anomalie cardiaque et/ou placentaire) ou d'enfants mort-nés présentant une anomalie cardiaque et/ou placentaire.

Pour conclure, le travail mené lors de ma thèse a permis de montrer le patron d'expression de KRAS et de mettre en évidence les rôles de cette protéine dans le développement embryonnaire chez la souris. Bien que KRAS soit exprimée dans la plupart des organes embryonnaires, cette protéine joue un rôle essentiel dans le développement du placenta et du cœur chez la souris. Ainsi, les embryons déficients en KRAS meurent *in utero* d'une malformation placentaire et cardiaque. De plus, KRAS4B est l'isoforme jouant le rôle crucial de KRAS dans le développement.

Cependant, ce travail ne permet pas de résoudre la question de l'étendue de la redondance entre KRAS4A et KRAS4B, ou entre KRAS, HRAS et NRAS. En effet, KRAS4A compense la perte d'expression de KRAS4B lors du développement cardiaque, mais aucune compensation n'a lieu lors du développement placentaire. Cela veut-il dire que KRAS4B est la seule isoforme exprimée dans le placenta, ou qu'elle soit la seule à présenter une fonction particulière qui ne peut pas être compensée par KRAS4A, ou HRAS et/ou NRAS ? Ainsi, malgré les nouvelles informations qu'apporte notre travail, de nombreuses questions restent encore sans réponse à propos des isoformes d'épissages de KRAS, et plus généralement, à propos des isoformes RAS.

Références

AACR Project GENIE Consortium. (2017). AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discovery*, *7*(8), 818–831. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0151

Adamson, S. L., Lu, Y., Whiteley, K. J., Holmyard, D., Hemberger, M., Pfarrer, C., & Cross, J. C. (2002). Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Developmental Biology*, *250*(2), 358–373. https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)90773-6

Ahearn, I., Zhou, M., & Philips, M. R. (2018). Posttranslational Modifications of RAS Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *8*(11), a031484. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031484

Aida, T., Chiyo, K., Usami, T., Ishikubo, H., Imahashi, R., Wada, Y., Tanaka, K. F., Sakuma, T., Yamamoto, T., & Tanaka, K. (2015). Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome Biology*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s13059-015-0653-x

Andescavage, N. N., & Limperopoulos, C. (2021). Placental abnormalities in congenital heart disease. *Translational Pediatrics*, *10*(8), 2148156–2142156. https://doi.org/10.21037/TP-20-347

Aoki, Y., Niihori, T., Kawame, H., Kurosawa, K., Ohashi, H., Tanaka, Y., Filocamo, M., Kato, K., Suzuki, Y., Kure, S., & Matsubara, Y. (2005). Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nature Genetics*, *37*(10), 1038–1040. https://doi.org/10.1038/ng1641

Araki, T., Mohi, M. G., Ismat, F. A., Bronson, R. T., Williams, I. R., Kutok, J. L., Yang, W., Pao, L. I., Gilliland, D. G., Epstein, J. A., & Neel, B. G. (2004). Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation. *Nature Medicine*, *10*(8), 849–857. https://doi.org/10.1038/nm1084

Assi, M., Achouri, Y., Loriot, A., Dauguet, N., Dahou, H., Baldan, J., Libert, M., Fain, J. S., Guerra, C., Bouwens, L., Barbacid, M., Lemaigre, F. P., & Jacquemin, P. (2021). Dynamic Regulation of Expression of KRAS and Its Effectors Determines the Ability to Initiate Tumorigenesis in Pancreatic Acinar Cells. *Cancer Research*, *81*(10), 2679–2689. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2976

Assi, M., Pirlot, B., Stroobant, V., Thissen, J.-P., & Jacquemin, P. (2020). A Novel KRAS Antibody Highlights a Regulation Mechanism of Post-Translational Modifications of KRAS during Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 6361. https://doi.org/10.3390/ijms21176361

Barak, Y., Nelson, M. C., Ong, E. S., Jones, Y. Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K. R., Koder, A., & Evans, R. M. (1999). PPARγ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular Cell*, *4*(4), 585–595. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80209-9

Barak, Y., Sadovsky, Y., & Shalom-Barak, T. (2008). PPAR signaling in placental development and function. *PPAR Research*, *2008*. https://doi.org/10.1155/2008/142082

Barbacid, M. (1987). *ras* GENES. *Annual Review of Biochemistry*, *56*(1), 779–827. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.004023

Bar-Sagi, D., & Feramisco, J. R. (1985). Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell*, *42*(3), 841–848. https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90280-6

Benito, M., Porras, A., Nebreda, A. R., & Santos, E. (1991). Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes induced by transfection of ras oncogenes. *Science (New York, N.Y.)*, *253*(5019), 565–568. https://doi.org/10.1126/science.1857988

Bentires-Alj, M., Kontaridis, M. I., & Neel, B. G. (2006). Stops along the RAS pathway in human genetic disease. *Nature Medicine*, *12*(3), 283–285. https://doi.org/10.1038/nm0306-283

Birchmeier, C., Broek, D., & Wigler, M. (1985). RAS proteins can induce meiosis in xenopus oocytes. *Cell*, *43*(3), 615–621. https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90233-8

Bivona, T. G., Quatela, S. E., Bodemann, B. O., Ahearn, I. M., Soskis, M. J., Mor, A., Miura, J., Wiener, H. H., Wright, L., Saba, S. G., Yim, D., Fein, A., Pérez de Castro, I., Li, C., Thompson, C. B., Cox, A. D., & Philips, M. R. (2006). PKC Regulates a Farnesyl-Electrostatic Switch on K-Ras that Promotes its Association with Bcl-Xl on Mitochondria and Induces Apoptosis. *Molecular Cell*, *21*(4), 481–493. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.012

Bouillot, S., Rampon, C., Tillet, E., & Huber, P. (2006). Tracing the glycogen cells with protocadherin 12 during mouse placenta development. *Placenta*, *27*(8), 882–888. https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2005.09.009

Brannan, C. I., Perkins, A. S., Vogel, K. S., Ratner, N., Nordlund, M. L., Reid, S. W., Buchberg, A. M., Jenkins, N. A., Parada, L. F., & Copeland, N. G. (1994). *Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues*.

Castellano, E., & Santos, E. (2011). Functional specificity of Ras isoforms: So similar but so different. *Genes and Cancer*, *2*(3), 216–231. https://doi.org/10.1177/1947601911408081

Chakrabarti, M., Jang, H., & Nussinov, R. (2016). Comparison of the Conformations of KRAS Isoforms, K-Ras4A and K-Ras4B, Points to Similarities and Significant Differences. *Journal of Physical Chemistry B*, *120*(4), 667–679. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.5b11110

Chang, E. H., Furth, M. E., Scolnick, E. M., & Lowy, D. R. (1982). Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature*, *297*(5866), 479–483. https://doi.org/10.1038/297479a0

Chang, E. H., Gonda, M. A., Ellis, R. W., Scolnick, E. M., & Lowy, D. R. (1982). Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(16), 4848–4852. https://doi.org/10.1073/pnas.79.16.4848

Chavan, T. S., Muratcioglu, S., Marszalek, R., Jang, H., Keskin, O., Gursoy, A., Nussinov, R., & Gaponenko, V. (2015). Plasma membrane regulates Ras signaling networks. *Cellular Logistics*, *5*(4), e1136374. https://doi.org/10.1080/21592799.2015.1136374

Chen, W. C., To, M. D., Westcott, P. M. K., Delrosario, R., Kim, I. J., Philips, M., Tran, Q., Bollam, S. R., Goodarzi, H., Bayani, N., Mirzoeva, O., & Balmain, A. (2021). Targeting KRAS4A splicing through the RBM39/DCAF15 pathway inhibits cancer stem cells. *Nature Communications*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-021-24498-7

Chesa, P. G., Rettig, W. J., Melamed, M. R., Old, L. J., & Niman, H. L. (1987). Expression of p21ras in normal and malignant human tissues: lack of association with proliferation and malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(10), 3234–3238. https://doi.org/10.1073/pnas.84.10.3234

Cho, K.-J., Casteel, D. E., Prakash, P., Tan, L., van der Hoeven, D., Salim, A. A., Kim, C., Capon, R. J., Lacey, E., Cunha, S. R., Gorfe, A. A., & Hancock, J. F. (2016). AMPK and Endothelial Nitric Oxide Synthase Signaling Regulates K-Ras Plasma Membrane Interactions via Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase 2. *Molecular and Cellular Biology*, *36*(24), 3086–3099. https://doi.org/10.1128/MCB.00365-16

Chong, J. J. H., Forte, E., & Harvey, R. P. (2014). Developmental origins and lineage descendants of endogenous adult cardiac progenitor cells. In *Stem Cell Research* (Vol. 13, Issue 3, pp. 592–614). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.09.008

Coan, P. M., Conroy, N., Burton, G. J., & Ferguson-Smith, A. C. (2006). Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Developmental Dynamics*, *235*(12), 3280–3294. https://doi.org/10.1002/DVDY.20981

Cox, A. D., Der, C. J., & Philips, M. R. (2015). Targeting RAS membrane association: Back to the future for anti-RAS drug discovery? *Clinical Cancer Research*, *21*(8), 1819–1827. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3214

Crespo, P., Xu, N., Simonds, W. F., & Gutkind, J. S. (1994). Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein βγ subunits. *Nature*, *369*(6479), 418–420. https://doi.org/10.1038/369418a0

Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal*, *429*(3), 403–417. https://doi.org/10.1042/BJ20100323

Cuenda, A., & Rousseau, S. (2007). p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1773*(8), 1358–1375. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.03.010

Cuevas, B. D., Abell, A. N., & Johnson, G. L. (2007). Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene*, *26*(22), 3159–3171. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210409

de Martinville, B., Giacalone, J., Shih, C., Weinberg, R. A., & Francke, U. (1983). Oncogene from Human EJ Bladder Carcinoma Is Located on the Short Arm of Chromosome 11. *Science*, *219*(4584), 498–501. https://doi.org/10.1126/science.6297001

Der, C. J., Krontiris, T. G., & Cooper, G. M. (1982). Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses (human tumors/transfection/retroviruses). In *Proc. NatL Acad. Sci. USA* (Vol. 79).

Dhanasekaran, D. N., & Reddy, E. P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, *27*(48), 6245–6251. https://doi.org/10.1038/onc.2008.301

Dharmaiah, S., Bindu, L., Tran, T. H., Gillette, W. K., Frank, P. H., Ghirlando, R., Nissley, D. v., Esposito, D., McCormick, F., Stephen, A. G., & Simanshu, D. K. (2016). Structural basis of recognition of farnesylated and methylated KRAS4b by PDEδ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(44). https://doi.org/10.1073/pnas.1615316113

Dohlman, H. G., & Campbell, S. L. (2019). Regulation of large and small G proteins by ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(49), 18613–18623. https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.011068

Drosten, M., Dhawahir, A., Sum, E. Y. M., Urosevic, J., Lechuga, C. G., Esteban, L. M., Castellano, E., Guerra, C., Santos, E., & Barbacid, M. (2010). Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival. *The EMBO Journal*, *29*(6), 1091–1104. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.7

Dunnett-Kane, V., Burkitt-Wright, E., Blackhall, F. H., Malliri, A., Evans, D. G., & Lindsay, C. R. (2020). Germline and sporadic cancers driven by the RAS pathway: parallels and contrasts. In *Annals of Oncology* (Vol. 31, Issue 7, pp. 873–883). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.03.291

Eakin, G. S., & Hadjantonakis, A. K. (2006). Production of chimeras by aggregation of embryonic stem cells with diploid or tetraploid mouse embryos. *Nature Protocols*, *1*(3), 1145–1153. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.173

Eisenberg, S., Laude, A. J., Beckett, A. J., Mageean, C. J., Aran, V., Hernandez-Valladares, M., Henis, Y. I., & Prior, I. A. (2013). The role of palmitoylation in regulating Ras localization and function. *Biochemical Society Transactions*, *41*(1), 79–83. https://doi.org/10.1042/BST20120268

Ellis, R. W., DeFeo, D., Papageorge, A., & Scolnick, E. M. (1983). Expression of endogenous p21 ras genes. *Progress in Clinical and Biological Research*, *119*, 67–77.

Esteban, L. M., Vicario-Abejón, C., Fernández-Salguero, P., Fernández-Medarde, A., Swaminathan, N., Yienger, K., Lopez, E., Malumbres, M., McKay, R., Ward, J. M., Pellicer, A., & Santos, E. (2001). Targeted Genomic Disruption of H- ras and N- ras , Individually or in Combination, Reveals the Dispensability of Both Loci for Mouse Growth and Development . *Molecular and Cellular Biology*, *21*(5), 1444–1452. https://doi.org/10.1128/mcb.21.5.1444-1452.2001

Fuentes-Mateos, R., Jimeno, D., Gómez, C., Calzada, N., Fernández-Medarde, A., & Santos, E. (2019). Concomitant deletion of HRAS and NRAS leads to pulmonary immaturity,

respiratory failure and neonatal death in mice. *Cell Death & Disease*, *10*(11), 838. https://doi.org/10.1038/s41419-019-2075-2

Fukui, Y., Kaziro, Y., & Yamamoto, M. (1986). Mating pheromone-like diffusible factor released by Schizosaccharomyces pombe. *The EMBO Journal*, *5*(8), 1991–1993. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04454.x

Fukui, Y., Kozasa, T., Kaziro, Y., Takeda, T., & Yamamoto, M. (1986). Role of a ras homolog in the life cycle of schizosaccharomyces pombe. *Cell*, *44*(2), 329–336. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90767-1

Furth, M. E., Aldrich, T. H., & Cordon-Cardo, C. (1987). Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissues. *Oncogene*, *1*(1), 47–58. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3125507

Gallwitz, D., Donath, C., & Sander, C. (1983). A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-has/bas proto-oncogene product. *Nature*, *306*(5944), 704–707. https://doi.org/10.1038/306704a0

Gasper, R., & Wittinghofer, F. (2019). The Ras switch in structural and historical perspective. *Biological Chemistry*, *401*(1), 143–163. https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0330

Georgiades, P., Fergyson-Smith, A. C., & Burton, G. J. (2002). Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta*, *23*(1), 3–19. https://doi.org/10.1053/plac.2001.0738

Gidekel Friedlander, S. Y., Chu, G. C., Snyder, E. L., Girnius, N., Dibelius, G., Crowley, D., Vasile, E., DePinho, R. A., & Jacks, T. (2009). Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer Cell*, *16*(5), 379–389. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.027

Greenwald, I., & Broach, J. R. (1990). Cell fates in C. elegans: in medias ras. *Cell*, *63*(6), 1113–1116. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90403-2

Gremer, L., Merbitz-Zahradnik, T., Dvorsky, R., Cirstea, I. C., Kratz, C. P., Zenker, M., Wittinghofer, A., & Ahmadian, M. R. (2011). Germline KRAS Mutations Cause Aberrant Biochemical and Physical Properties Leading to Developmental Disorders. *Human Mutation*, *32*(1), 33. https://doi.org/10.1002/HUMU.21377

Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Cañamero, M., Grippo, P. J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E. P., & Barbacid, M. (2007). Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell*, *11*(3), 291–302. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.012

Guillemot, F., Caspary, T., Tilghman, S. M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Anderson, D. J., Joyner, A. L., Rossant, J., & Nagy, A. (1995). Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development. *Nature Genetics*, *9*(3), 235–242. https://doi.org/10.1038/ng0395-235

Haidar, M., & Jacquemin, P. (2021). Past and future strategies to inhibit membrane localization of the kras oncogene. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 24). MDPI. https://doi.org/10.3390/ijms222413193

Hall, A., Marshall, C. J., Spurr, N. K., & Weiss, R. A. (1983). Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature*, *303*(5916), 396–400. https://doi.org/10.1038/303396a0

Han, M., & Sternberg, P. W. (1990). let-60, a gene that specifies cell fates during C. elegans vulval induction, encodes a ras protein. *Cell*, *63*(5), 921–931. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90495-Z

Hancock, J. F., Cadwallader, K., & Marshall, C. J. (1991). Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B). *The EMBO Journal*, *10*(3), 641–646. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07992.x

Harvey, J. J. (1964). An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature*, *204*(4963), 1104–1105. https://doi.org/10.1038/2041104b0

Hawkins, F., Rankin, S. A., Kotton, D. N., & Zorn, A. M. (2016). The Genetic Programs Regulating Embryonic Lung Development and Induced Pluripotent Stem Cell Differentiation. In A. Jobe, J. Whitsett, & S. Abman (Eds.), *Fetal and Neonatal Lung Development* (pp. 1–21). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/CBO9781139680349.002

Hemberger, M., & Cross, J. C. (2001). Genes governing placental development. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *12*(4), 162–168. https://doi.org/10.1016/S1043-2760(01)00375-7

Hemberger, M., Hanna, C. W., & Dean, W. (2020). Mechanisms of early placental development in mouse and humans. *Nature Reviews. Genetics*, *21*(1), 27–43. https://doi.org/10.1038/s41576-019-0169-4

Hernández-Porras, I., Fabbiano, S., Schuhmacher, A. J., Aicher, A., Cañamero, M., Cámara, J. A., Cussó, L., Desco, M., Heeschen, C., Mulero, F., Bustelo, X. R., Guerra, C., & Barbacid, M. (2014). K-RasV14I recapitulates noonan syndrome in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(46), 16395–16400. https://doi.org/10.1073/pnas.1418126111

Hernández-Porras, I., & Guerra, C. (2017). Modeling RASopathies with genetically modified mouse models. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1487, pp. 379–408). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6424-6_28

Hernández-Porras, I., Jiménez-Catalán, B., Schuhmacher, A. J., & Guerra, C. (2015). The impact of the genetic background in the Noonan syndrome phenotype induced by K-Ras V14I . *Rare Diseases*, *3*(1), e1045169. https://doi.org/10.1080/21675511.2015.1045169

Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Hitt, B. A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L. A., Crawford, H. C., Putt, M. E., Jacks, T., Wright, C. V. E., Hruban, R. H., Lowy, A. M., & Tuveson, D. A. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, *4*(6), 437–450. https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00309-X

Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., Rustgi, A. K., Chang, S., & Tuveson, D. A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D

cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, *7*(5), 469–483. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.023

Hobbs, G. A., Der, C. J., & Rossman, K. L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of Cell Science*. https://doi.org/10.1242/jcs.182873

Hofer, F., Fields, S., Schneider, C., & Martin, G. S. (1994). Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(23), 11089–11093. https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.11089

Hoxhaj, G., & Manning, B. D. (2020). The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews. Cancer*, *20*(2), 74–88. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7

Huang, G., Shi, L. Z., & Chi, H. (2009). Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. *Cytokine*, *48*(3), 161–169. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.08.002

Huang, L., Guo, Z., Wang, F., & Fu, L. (2021). KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 386. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00780-4

Jackson, E. L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., & Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes and Development*, *15*(24), 3243–3248. https://doi.org/10.1101/gad.943001

Janardhan, H. P., Meng, X., Dresser, K., Hutchinson, L., & Trivedi, C. M. (2020). KRAS or BRAF mutations cause hepatic vascular cavernomas treatable with MAP2K–MAPK1 inhibition. *Journal of Experimental Medicine*, *217*(7). https://doi.org/10.1084/jem.20192205

Jančík, S., Drábek, J., Radzioch, D., & Hajdúch, M. (2010). Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2010*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2010/150960

Jang, H., Abraham, S. J., Chavan, T. S., Hitchinson, B., Khavrutskii, L., Tarasova, N. I., Nussinov, R., & Gaponenko, V. (2015). Mechanisms of Membrane Binding of Small GTPase K-Ras4B Farnesylated Hypervariable Region. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(15), 9465–9477. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.620724

Jiang, G., & Hunter, T. (1999). Receptor signaling: When dimerization is not enough. *Current Biology*, *9*(15), R568–R571. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80357-1

Johnson, G. L., & Nakamura, K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: Regulation, function and role in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1773*(8), 1341–1348. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.12.009

Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R. T., Umanoff, H., Edelmann, W., Kucherlapati, R., & Jacks, T. (1997). K- *ras* is an

essential gene in the mouse with partial functional overlap with N- *ras*. *Genes & Development*, *11*(19), 2468–2481. https://doi.org/10.1101/gad.11.19.2468

Jones, H. N., Olbrych, S. K., Smith, K. L., Cnota, J. F., Habli, M., Ramos-Gonzales, O., Owens, K. J., Hinton, A. C., Polzin, W. J., Muglia, L. J., & Hinton, R. B. (2015). Hypoplastic left heart syndrome is associated with structural and vascular placental abnormalities and leptin dysregulation. *Placenta*, *36*(10), 1078–1086. https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2015.08.003

Kansanen, E., Kuosmanen, S. M., Leinonen, H., & Levonenn, A. L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology*, *1*(1), 45–49. https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2012.10.001

Karakikes, I., Ameen, M., Termglinchan, V., & Wu, J. C. (2015). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Insights into Molecular, Cellular, and Functional Phenotypes. *Circulation Research*, *117*(1), 80. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305365

Karnoub, A. E., & Weinberg, R. A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(7), 517–531. https://doi.org/10.1038/nrm2438

Kasai, S., Mimura, J., Ozaki, T., & Itoh, K. (2018). Emerging Regulatory Role of Nrf2 in Iron, Heme, and Hemoglobin Metabolism in Physiology and Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, *5*(OCT), 242. https://doi.org/10.3389/FVETS.2018.00242

Kilic, U., Caglayan, A. B., Beker, M. C., Gunal, M. Y., Caglayan, B., Yalcin, E., Kelestemur, T., Gundogdu, R. Z., Yulug, B., Yılmaz, B., Kerman, B. E., & Kilic, E. (2017). Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice. *Redox Biology*, *12*, 657–665. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.006

Kim, H., Kim, M., Im, S.-K., & Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory Animal Research*, *34*(4), 147. https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147

Kim, J., Cho, S. Y., Yang, A., Jang, J.-H., Choi, Y., Lee, J.-E., & Jin, D.-K. (2017). An atypical case of Noonan syndrome with KRAS mutation diagnosed by targeted exome sequencing. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, *22*(3), 203–207. https://doi.org/10.6065/apem.2017.22.3.203

Kingdom, J. C. P., & Kaufmannb, P. (1997). CURRENT TOPIC Oxygen and Placental Villous Development: Origins of Fetal Hypoxia. In *Placenta* (Vol. 18).

Kirsten, W. H., & Mayer, L. A. (1967). Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *Journal of the National Cancer Institute*, *39*(2), 311–335.

Kirsten, W. H., Schauf, V., & McCoy, J. (1970). Properties of a murine sarcoma virus. *Bibliotheca Haematologica*, *36*, 246–249. https://doi.org/10.1159/000391714

Klein, C. H., Truxius, D. C., Vogel, H. A., Harizanova, J., Murarka, S., Martín-Gago, P., & Bastiaens, P. I. H. (2019). PDEδ inhibition impedes the proliferation and survival of human colorectal cancer cell lines harboring oncogenic KRas. *International Journal of Cancer*, *144*(4), 767–776. https://doi.org/10.1002/ijc.31859

Kloesel, B., Dinardo, J. A., & Body, S. C. (2016). Cardiac Embryology and Molecular Mechanisms of Congenital Heart Disease: A Primer for Anesthesiologists. In *Anesthesia and Analgesia* (Vol. 123, Issue 3, pp. 551–569). Lippincott Williams and Wilkins. https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001451

Knipp, G. T., Audus, K. L., & Soares, M. J. (1999). Nutrient transport across the placenta. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 38).

Ko, J. M., Kim, J.-M., Kim, G.-H., & Yoo, H.-W. (2008). PTPN11, SOS1, KRAS, and RAF1 gene analysis, and genotype–phenotype correlation in Korean patients with Noonan syndrome. *Journal of Human Genetics*, *53*(11–12), 999–1006. https://doi.org/10.1007/s10038-008-0343-6

Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hatta, T., Otani, H., Aiba, A., & Katsuki, M. (1997). *K-Ras is essential for the development of the mouse embryo*.

Langbeheim, H., Shih, T. Y., & Scolnick, E. M. (1980). Identification of a normal vertebrate cell protein related to the p21 src of Harvey murine sarcoma virus. *Virology*, *106*(2), 292–300. https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90252-4

Langford, M. B., Outhwaite, J. E., Hughes, M., Natale, D. R. C., & Simmons, D. G. (2018). Deletion of the Syncytin A receptor Ly6e impairs syncytiotrophoblast fusion and placental morphogenesis causing embryonic lethality in mice. *Scientific Reports 2018 8:1*, *8*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-018-22040-2

Larqué, E., Ruiz-Palacios, M., & Koletzko, B. (2013). Placental regulation of fetal nutrient supply. In *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* (Vol. 16, Issue 3, pp. 292–297). https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32835e3674

Lavoie, H., & Therrien, M. (2015). Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *16*(5), 281–298. https://doi.org/10.1038/nrm3979

Lechuga, C. G., Salmón, M., Paniagua, G., Guerra, C., Barbacid, M., & Drosten, M. (2021). *RASless MEFs as a Tool to Study RAS-Dependent and RAS-Independent Functions* (pp. 335–346). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1190-6_21

Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (1994). Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends in Biochemical Sciences*, *19*(11), 459–463. https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90130-9

Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*, *141*(7), 1117–1134. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011

Leon, J., Guerrero, I., & Pellicer, A. (1987). Differential expression of the ras gene family in mice. *Molecular and Cellular Biology*, *7*(4), 1535–1540. https://doi.org/10.1128/mcb.7.4.1535-1540.1987

Loesch, M., & Chen, G. (2008). The p38 MAPK stress pathway as a tumor suppressor or more? *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, *13*, 3581–3593. https://doi.org/10.2741/2951

Lowndes, N. F., Paul, J., Wu, J., & Allan, M. (1989). c-Ha-ras gene bidirectional promoter expressed in vitro: location and regulation. *Molecular and Cellular Biology*, *9*(9), 3758–3770. https://doi.org/10.1128/mcb.9.9.3758-3770.1989

Lowy, D. R., & Willumsen, B. M. (1993). FUNCTION AND REGULATION OF RAS. *Annual Review of Biochemistry*, *62*(1), 851–891. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.004223

Lu, S., Jang, H., Muratcioglu, S., Gursoy, A., Keskin, O., Nussinov, R., & Zhang, J. (2016). Ras Conformational Ensembles, Allostery, and Signaling. *Chemical Reviews*, *116*(11), 6607–6665. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00542

Maldonado, M. del M., Medina, J. I., Velazquez, L., & Dharmawardhane, S. (2020). Targeting Rac and Cdc42 GEFs in Metastatic Cancer. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00201

Manolaridis, I., Kulkarni, K., Dodd, R. B., Ogasawara, S., Zhang, Z., Bineva, G., Reilly, N. O., Hanrahan, S. J., Thompson, A. J., Cronin, N., Iwata, S., & Barford, D. (2013). Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the intramembrane protease Rce1. *Nature*, *504*(7479), 301–305. https://doi.org/10.1038/nature12754

Marsh, B., & Blelloch, R. (2020). Single nuclei RNA-seq of mouse placental labyrinth development. *ELife*, *9*, 1–27. https://doi.org/10.7554/eLife.60266

Matthiesen, N. B., Henriksen, T. B., Agergaard, P., Gaynor, J. W., Bach, C. C., Hjortdal, V. E., & Østergaard, J. R. (2016). Congenital Heart Defects and Indices of Placental and Fetal Growth in a Nationwide Study of 924 422 Liveborn Infants. *Circulation*, *134*(20), 1546–1556. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021793

McBride, O. W., Swan, D. C., Tronick, S. R., Gol, R., Klimanis, D., Moore, D. E., & Aaronson, S. A. (1983). Regional chromosomal localization of N- *ras* , K- *ras* -1, K- *ras* -2 and *myb* oncogenes in human cells. *Nucleic Acids Research*, *11*(23), 8221–8236. https://doi.org/10.1093/nar/11.23.8221

McKay, M. M., & Morrison, D. K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*, *26*(22), 3113–3121. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210394

Minati, M. A., Assi, M., Libert, M., Cordi, S., Lemaigre, F., & Jacquemin, P. (2022). KRAS protein expression becomes progressively restricted during embryogenesis and in adulthood. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.995013

Mueller, S., Engleitner, T., Maresch, R., Zukowska, M., Lange, S., Kaltenbacher, T., Konukiewitz, B., Öllinger, R., Zwiebel, M., Strong, A., Yen, H. Y., Banerjee, R., Louzada, S., Fu, B., Seidler, B., Götzfried, J., Schuck, K., Hassan, Z., Arbeiter, A., … Rad, R. (2018). Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature*, *554*(7690), 62–68. https://doi.org/10.1038/nature25459

Mulcahy, L. S., Smith, M. R., & Stacey, D. W. (1985). Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature*, *313*(5999), 241–243. https://doi.org/10.1038/313241a0

Nadeau, V., Bissonauth, V., & Charron, J. (2012). Le rôle des kinases Mek1 et Mek2 dans la formation de la barrière hématoplacentaire chez la souris. In *Medecine/Sciences* (Vol. 28, Issue 4, pp. 409–415). https://doi.org/10.1051/medsci/2012284019

Nakamura, K., Ichise, H., Nakao, K., Hatta, T., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., & Katsuki, M. (2008). Partial functional overlap of the three ras genes in mouse embryonic development. *Oncogene*, *27*(21), 2961–2968. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210956

Newlaczyl, A. U., Coulson, J. M., & Prior, I. A. (2017). Quantification of spatiotemporal patterns of Ras isoform expression during development. *Scientific Reports*, *7*. https://doi.org/10.1038/srep41297

Noda, M., Ko, M., Ogura, A., Liu, D., Amano, T., Takano, T., & Ikawa, Y. (1985). Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. *Nature*, *318*(6041), 73–75. https://doi.org/10.1038/318073a0

Nosan, G., Bertok, S., Vesel, S., Yntema, H. G., & Paro-Panjan, D. (2013). A lethal course of hypertrophic cardiomyopathy in noonan syndrome due to a novel germline mutation in the KRAS gene: Case study. *Croatian Medical Journal*, *54*(6), 574–578. https://doi.org/10.3325/cmj.2013.54.574

Nussinov, R., Tsai, C. J., & Jang, H. (2019). Oncogenic KRas mobility in the membrane and signaling response. *Seminars in Cancer Biology*, *54*, 109–113. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.02.009

Pálfy, G., Menyhárd, D. K., & Perczel, A. (2020). Dynamically encoded reactivity of Ras enzymes: opening new frontiers for drug discovery. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 39, Issue 4, pp. 1075–1089). Springer. https://doi.org/10.1007/s10555-020-09917-3

Parada, L. F., Tabin, C. J., Shih, C., & Weinberg, R. A. (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*, *297*(5866), 474–478. https://doi.org/10.1038/297474a0

Plowman, S. J., Williamson, D. J., O'Sullivan, M. J., Doig, J., Ritchie, A.-M., Harrison, D. J., Melton, D. W., Arends, M. J., Hooper, M. L., & Patek, C. E. (2003). While K- ras Is Essential for MouseDevelopment, Expression of the K- ras 4A Splice VariantIsDispensable . *Molecular and Cellular Biology*, *23*(24), 9245–9250. https://doi.org/10.1128/mcb.23.24.9245-9250.2003

Potenza, N., Vecchione, C., Notte, A., de Rienzo, A., Rosica, A., Bauer, L., Affuso, A., de Felice, M., Russo, T., Poulet, R., Cifelli, G., de Vita, G., Lembo, G., & di Lauro, R. (2005). Replacement of K-Ras with H-Ras supports normal embryonic development despite inducing cardiovascular pathology in adult mice. *EMBO Reports*, *6*(5), 432–437. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400397

Prior, I. A., & Hancock, J. F. (2012). Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *23*(2), 145–153. https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2011.09.002

Prior, I. A., Lewis, P. D., & Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of ras mutations in cancer. In *Cancer Research* (Vol. 72, Issue 10, pp. 2457–2467). https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2612

Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U. R., & Albert, Š. (2007). Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1773*(8), 1177–1195. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.01.012

Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. In *Oncogene* (Vol. 26, Issue 22, pp. 3100–3112). https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210392

Ramathal, C. Y., Bagchi, I. C., Taylor, R. N., & Bagchi, M. K. (2010). Endometrial decidualization: of mice and men. *Seminars in Reproductive Medicine*, *28*(1), 17–26. https://doi.org/10.1055/s-0029-1242989

Rampon, C., Prandini, M. H., Bouillot, S., Pointu, H., Tillet, E., Frank, R., Vernet, M., & Huber, P. (2005). Protocadherin 12 (VE-cadherin 2) is expressed in endothelial, trophoblast, and mesangial cells. *Experimental Cell Research*, *302*(1), 48–60. https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2004.08.024

Rauen, K. A. (2013). The RASopathies. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *14*, 355–369. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENOM-091212-153523

Reddy, E. P., Reynolds, R. K., Santos, E., & Barbacid, M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*, *300*(5888), 149–152. https://doi.org/10.1038/300149a0

Rhee, S. G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annual Review of Biochemistry*, *70*, 281–312. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.281

Rincón, M., & Davis, R. J. (2009). Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunological Reviews*, *228*(1), 212–224. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00744.x

Rodriguez-Viciana, P., Tetsu, O., Tidyman, W. E., Estep, A. L., Conger, B. A., Cruz, M. S., McCormick, F., & Rauen, K. A. (2006). Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science*, *311*(5765), 1287–1290. https://doi.org/10.1126/science.1124642

Rosette, C., & Karin, M. (1996). Ultraviolet Light and Osmotic Stress: Activation of the JNK Cascade Through Multiple Growth Factor and Cytokine Receptors. *Science*, *274*(5290), 1194–1197. https://doi.org/10.1126/science.274.5290.1194

Ross, C., & Boroviak, T. E. (2020). Origin and function of the yolk sac in primate embryogenesis. *Nature Communications 2020 11:1*, *11*(1), 1–14. https://doi.org/10.1038/s41467-020-17575-w

Rozakis-Adcock, M., van der Geer, P., Mbamalu, G., & Pawson, T. (1995). MAP kinase phosphorylation of mSos1 promotes dissociation of mSos1-Shc and mSos1-EGF receptor complexes. *Oncogene*, *11*(7), 1417–1426.

Ryan, T. M., Ciavatta, D. J., & Townes, T. M. (1997). Knockout-Transgenic Mouse Model of Sickle Cell Disease. *Science*, *278*(5339), 873–876. https://doi.org/10.1126/science.278.5339.873

Rychik, J., Goff, D., McKay, E., Mott, A., Tian, Z., Licht, D. J., & Gaynor, J. W. (2018). Characterization of the Placenta in the Newborn with Congenital Heart Disease: Distinctions Based on Type of Cardiac Malformation. *Pediatric Cardiology*, *39*(6), 1165–1171. https://doi.org/10.1007/S00246-018-1876-X

Sadler, T. W., & Hunter, E. S. (1987). Hypoglycemia: How little is too much for the embryo? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *157*(1), 190–193. https://doi.org/10.1016/S0002-9378(87)80378-2

Saini, B. S., Morrison, J. L., & Seed, M. (2020). Gas Exchange across the Placenta. In *Respiratory Disease in Pregnancy* (pp. 34–56). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/9781108163705.005

Saini, D. K., Chisari, M., & Gautam, N. (2009). Shuttling and translocation of heterotrimeric G proteins and Ras. *Trends in Pharmacological Sciences*, *30*(6), 278–286. https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.04.001

Sakaguchi, A. Y., Naylor, S. L., Shows, T. B., Toole, J. J., McCoy, M., & Weinberg, R. A. (1983). Human c-Ki- *ras* 2 Proto-Oncogene on Chromosome 12. *Science*, *219*(4588), 1081–1083. https://doi.org/10.1126/science.6823569

Salmón, M., Paniagua, G., Lechuga, C. G., Fernández-García, F., Zarzuela, E., Álvarez-Díaz, R., Musteanu, M., Guerra, C., Caleiras, E., Muñoz, J., Ortega, S., Drosten, M., & Barbacid, M. (2021). KRAS4A induces metastatic lung adenocarcinomas in vivo in the absence of the KRAS4B isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(30). https://doi.org/10.1073/pnas.2023112118

Sasaki, A. T., Carracedo, A., Locasale, J. W., Anastasiou, D., Takeuchi, K., Kahoud, E. R., Haviv, S., Asara, J. M., Pandolfi, P. P., & Cantley, L. C. (2011). Ubiquitination of K-Ras Enhances Activation and Facilitates Binding to Select Downstream Effectors. *Science Signaling*, *4*(163). https://doi.org/10.1126/scisignal.2001518

Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, *103*(2), 211–225. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00114-8

Schroeder, H., Leventis, R., Rex, S., Schelhaas, M., Nägele, E., Waldmann, H., & Silvius, J. R. (1997). S-Acylation and plasma membrane targeting of the farnesylated carboxyl-terminal peptide of N-ras in mammalian fibroblasts. *Biochemistry*, *36*(42), 13102–13109. https://doi.org/10.1021/bi9709497

Schubbert, S., Bollag, G., Lyubynska, N., Nguyen, H., Kratz, C. P., Zenker, M., Niemeyer, C. M., Molven, A., & Shannon, K. (2007). Biochemical and Functional Characterization of Germ Line KRAS Mutations . *Molecular and Cellular Biology*, *27*(22), 7765–7770. https://doi.org/10.1128/mcb.00965-07

Schubbert, S., Zenker, M., Rowe, S. L., Böll, S., Klein, C., Bollag, G., van der Burgt, I., Musante, L., Kalscheuer, V., Wehner, L. E., Nguyen, H., West, B., Zhang, K. Y. J., Sistermans, E., Rauch, A., Niemeyer, C. M., Shannon, K., & Kratz, C. P. (2006).

Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nature Genetics*, *38*(3), 331–336. https://doi.org/10.1038/ng1748

Schuhmacher, A. J., Guerra, C., Sauzeau, V., Cañamero, M., Bustelo, X. R., & Barbacid, M. (2008). A mouse model for Costello syndrome reveals an Ang II-mediated hypertensive condition. *Journal of Clinical Investigation*, *118*(6), 2169–2179. https://doi.org/10.1172/JCI34385

Scolnick, E. M. (1981). Transformation by rat-derived oncogenic retroviruses. *Microbiological Reviews*, *45*(1), 1–8. https://doi.org/10.1128/mr.45.1.1-8.1981

Seger, R., & Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *9*(9), 726–735.

Shahinian, S., & Silvius, J. R. (1995). Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes. *Biochemistry*, *34*(11), 3813–3822. https://doi.org/10.1021/bi00011a039

Shaul, Y. D., & Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1773*(8), 1213–1226. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.005

She, Q.-B., Solit, D. B., Ye, Q., O'Reilly, K. E., Lobo, J., & Rosen, N. (2005). The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell*, *8*(4), 287–297. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.09.006

Shimizu, K., Goldfarb, M., Suard, Y., Perucho, M., Li, Y., Kamata, T., Feramisco, J., Stavnezer, E., Fogh, J., & Wigler, M. H. (1983). Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*(8), 2112–2116. https://doi.org/10.1073/pnas.80.8.2112

Silvius, J. R., Bhagatji, P., Leventis, R., & Terrone, D. (2006). K-ras4B and prenylated proteins lacking "second signals" associate dynamically with cellular membranes. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(1), 192–202. https://doi.org/10.1091/mbc.e05-05-0408

Simanshu, D. K., Nissley, D. v, & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, *170*(1), 17–33. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009

Simon, M. A., Bowtell, D. D. L., Dodson, G. S., Laverty, T. R., & Rubin, G. M. (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell*, *67*(4), 701–716. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90065-7

Spoerner, M., Herrmann, C., Vetter, I. R., Kalbitzer, H. R., & Wittinghofer, A. (2001). Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(9), 4944–4949. https://doi.org/10.1073/pnas.081441398

Stanley, K. E., Giordano, J., Thorsten, V., Buchovecky, C., Thomas, A., Ganapathi, M., Liao, J., Dharmadhikari, A. v., Revah-Politi, A., Ernst, M., Lippa, N., Holmes, H., Povysil,

G., Hostyk, J., Parker, C. B., Goldenberg, R., Saade, G. R., Dudley, D. J., Pinar, H., … Goldstein, D. B. (2020). Causal Genetic Variants in Stillbirth. *New England Journal of Medicine*, *383*(12), 1107–1116. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1908753

Stephen, A. G., Esposito, D., Bagni, R. G., & McCormick, F. (2014). Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell*, *25*(3), 272–281. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.017

Tabin, C. J., Bradley, S. M., Bargmann, C. I., Weinberg, R. A., Papageorge, A. G., Scolnick, E. M., Dhar, R., Lowy, D. R., & Chang, E. H. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature*, *300*(5888), 143–149. https://doi.org/10.1038/300143a0

Tanaka, M., Gertsenstein, M., Rossant, J., & Nagy, A. (1997). Mash2 acts cell autonomously in mouse spongiotrophoblast development. *Developmental Biology*, *190*(1), 55–65. https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8685

Tao, S., Wang, S., Moghaddam, S. J., Ooi, A., Chapman, E., Wong, P. K., & Zhang, D. D. (2014). Oncogenic KRAS confers chemoresistance by upregulating NRF2. *Cancer Research*, *74*(24), 7430–7441. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1439

Taparowsky, E., Suard, Y., Fasano, O., Shimizu, K., Goldfarb, M., & Wigler, M. (1982). Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature*, *300*(5894), 762–765. https://doi.org/10.1038/300762a0

Temeles, G. L., Defeo-Jones, D., Tatchell, K., Ellinger, M. S., & Scolnick1, E. M. (1984). Expression and Characterization of ras mRNAs from Saccharomyces cerevisiae. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 4, Issue 11).

Terrell, E. M., & Morrison, D. K. (2019). Ras-Mediated Activation of the Raf Family Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *9*(1). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033746

Tsai, F. D., Lopes, M. S., Zhou, M., Court, H., Ponce, O., Fiordalisi, J. J., Gierut, J. J., Cox, A. D., Haigis, K. M., & Philips, M. R. (2015). K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(3), 779–784. https://doi.org/10.1073/pnas.1412811112

Tunster, S. J., Watson, E. D., Fowden, A. L., & Burton, G. J. (2020). Placental glycogen stores and fetal growth: insights from genetic mouse models. *Reproduction*, *159*(6), R213–R235. https://doi.org/10.1530/REP-20-0007

Umanoff, H., Edelmann, W., Pellicert, A., & Kucherlapati, R. (1995). The murine N-ras gene is not essential for growth and development (gene targeting/embryonic stem cells/oncogenes). In *Genetics* (Vol. 92).

Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5545), 1299–1304. https://doi.org/10.1126/science.1062023

Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature Reviews. Cancer*, *10*(12), 842–857. https://doi.org/10.1038/nrc2960

Waters, A. M., Ozkan-Dagliyan, I., Vaseva, A. v., Fer, N., Strathern, L. A., Hobbs, G. A., Tessier-Cloutier, B., Gillette, W. K., Bagni, R., Whiteley, G. R., Hartley, J. L., McCormick, F., Cox, A. D., Houghton, P. J., Huntsman, D. G., Philips, M. R., & Der, C. J. (2017). Evaluation of the selectivity and sensitivity of isoform- and mutation-specific RAS antibodies. *Science Signaling*, *10*(498), eaao3332. https://doi.org/10.1126/scisignal.aao3332

Watzinger, F., Mayr, B., Haring, E., & Lion, T. (1998). High sequence similarity within ras exons 1 and 2 in different mammalian species and phylogenetic divergence of the ras gene family. *Mammalian Genome*, *9*(3), 214–219. https://doi.org/10.1007/s003359900728

Wilsbacher, L., & McNally, E. M. (2016). Genetics of Cardiac Developmental Disorders: Cardiomyocyte Proliferation and Growth and Relevance to Heart Failure. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *11*(1), 395–419. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044336

Winston, L. A., & Hunter, T. (1996). Intracellular signalling: putting JAKs on the kinase MAP. *Current Biology : CB*, *6*(6), 668–671. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(09)00445-x

Winterhager, E., Zenclussen, A. C., Plösch, T., Perez-Garcia, V., Hemberger, M., & Woods, L. (2018). Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth-New Insights From Mouse Models. *Frontiers in Endocrinology | Www.Frontiersin.Org*, *9*, 570. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00570

Wolf, M., & Basson, C. T. (2010). The molecular genetics of congenital heart disease: A review of recent developments. In *Current Opinion in Cardiology* (Vol. 25, Issue 3, pp. 192–197). https://doi.org/10.1097/HCO.0b013e328337b4ce

Wong, J. C., Perez-Mancera, P. A., Huang, T. Q., Kim, J., Grego-Bessa, J., Alzamora, M. del pilar, Kogan, S. C., Sharir, A., Keefe, S. H., Morales, C. E., Schanze, D., Castel, P., Hirose, K., Huang, G. N., Zenker, M., Sheppard, D., Klein, O. D., Tuveson, D. A., Braun, B. S., & Shannon, K. (2020). KrasP34R and KrasT58I mutations induce distinct RASopathy phenotypes in mice. *JCI Insight*, *5*(21). https://doi.org/10.1172/jci.insight.140495

Wood, K., Hensing, T., Malik, R., & Salgia, R. (2016). Prognostic and Predictive Value in *KRAS* in Non–Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncology*, *2*(6), 805. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0405

Xu, G., Lin, B., Tanaka, K., Dunn, D., Wood, D., Gesteland, R., White, R., Weiss, R., & Tamanoit, F. (1990). The Catalytic Domain of the Neurofibromatosis Type 1 Gene Product Stimulates ras GTPase and Complements ira Mutants of S. cerevisiae. In *Cell* (Vol. 63).

Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Tanoue, A., Shooter, E. M., & Chan, J. R. (2005). Ras activation of a Rac1 exchange factor, Tiam1, mediates neurotrophin-3-induced Schwann cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(41), 14889–14894. https://doi.org/10.1073/pnas.0507125102

Yuan, X., Qi, H., Li, X., Wu, F., Fang, J., Bober, E., Dobreva, G., Zhou, Y., & Braun, T. (2017). Disruption of spatiotemporal hypoxic signaling causes congenital heart disease in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(6), 2235–2248. https://doi.org/10.1172/JCI88725

Yun, J., Rago, C., Cheong, I., Pagliarini, R., Angenendt, P., Rajagopalan, H., Schmidt, K., Willson, J. K. v., Markowitz, S., Zhou, S., Diaz, L. A., Velculescu, V. E., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Papadopoulos, N. (2009). Glucose Deprivation Contributes to the Development of *KRAS* Pathway Mutations in Tumor Cells. *Science*, *325*(5947), 1555–1559. https://doi.org/10.1126/science.1174229

Zenker, M., Lehmann, K., Schulz, A. L., Barth, H., Hansmann, D., Koenig, R., Korinthenberg, R., Kreiss-Nachtsheim, M., Meinecke, P., Morlot, S., Mundlos, S., Quante, A. S., Raskin, S., Schnabel, D., Wehner, L.-E., Kratz, C. P., Horn, D., & Kutsche, K. (2006). Expansion of the genotypic and phenotypic spectrum in patients with KRAS germline mutations. *Journal of Medical Genetics*, *44*(2), 131–135. https://doi.org/10.1136/jmg.2006.046300

Zhu, X., Oseghale, A. R., Nicole, L. H., Li, B., & Pace, B. S. (2019). Mechanisms of NRF2 activation to mediate fetal hemoglobin induction and protection against oxidative stress in sickle cell disease. *Experimental Biology and Medicine*, *244*(2), 171–182. https://doi.org/10.1177/1535370219825859/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1535370219825859-FIG2.JPEG

Zhu, X., Xi, C., Thomas, B., & Pace, B. S. (2018). Loss of NRF2 function exacerbates the pathophysiology of sickle cell disease in a transgenic mouse model. *Blood*, *131*(5), 558–562. https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-10-810531

Annexes

1. Élaboration d' anticorps reconnaissant spécifiquement l'isoforme KRAS4A

Dans cette thèse, le deuxième objectif consistait à élucider le rôle des deux isoformes d'épissage de KRAS, KRAS4A et KRAS4B. Pour atteindre cet objectif, deux modèles murins ont été générés ; le premier modèle consistait en une souris déficiente en KRAS4A et le second consistait en une souris déficiente en KRAS4B.

Nous avions prévu de valider l'absence de KRAS4 ou KRAS4B dans nos modèles par Western blotting à l'aide d'anticorps spécifiques de chaque isoforme. Pour sélectionner les anticorps KRAS4A et KRAS4B, nous nous sommes basés sur une étude évaluant la spécificité (et l'absence de réactivité croisée) d'anticorps RAS disponibles sur le marché (Waters et al., 2017). Sur base des résultats de cette étude, nous avons testé l'unique anticorps anti-KRAS4A encore disponible et validé par cette étude (produit par Proteintech (#16156-1-AP)) et un anticorps KRAS4B (produit par Merck (#WH0003845M1)). La publication montrait que ces anticorps ne présentaient aucune réactivité croisée avec les autres isoformes de la famille RAS. Cependant, après avoir réalisé une validation de la spécificité dans notre laboratoire, il est apparu que si l'anticorps anti-KRAS4B était capable de reconnaître l'isoforme 4B, l'anticorps anti-KRAS4A n'était pas capable de détecter des niveaux endogènes de KRAS4 (comme cela était précisé dans la publication).

Étant donné la nécessité d'avoir un anticorps anti-KRAS4A permettant de valider nos modèles murins, nous avons décidé de produire notre propre anticorps. Dans ce but, et par l'intermédiaire d'Eurogentec, des lapins ont été immunisés avec un peptide spécifique de la séquence C-terminale de KRAS4A (**Figure 1A**). Ensuite, les sera de ces lapins ont été testés par Western blotting effectué sur des lysats totaux de cellules surexprimant KRAS4A (cellules transfectées avec *pV5-KRAS4A*^{G12V}), ou KRAS4B (cellules transfectées avec *pCitrine-KRAS4B*) (**Figure 1B**). Ces expériences ont mis en lumière que l'anticorps produit était bien spécifique à l'isoforme 4A. Étant donné qu'il est connu dans la littérature que les niveaux d'expression endogène de cette isoforme sont difficiles à détecter, nous avons ensuite testé l'anticorps sur des lysats totaux provenant de poumons sains (*Kras*^{WT}) et tumoraux (*Kras*^{G12D}) qui expriment l'isoforme 4A (**Figure 1C**). Malheureusement, cette expérience a mis en évidence que l'anticorps produit ne permettait pas la détection de KRAS4A endogène.

Ce résultat peut s'expliquer par différentes hypothèses. Premièrement, la sensibilité de l'anticorps produit n'est peut-être pas assez élevée pour détecter les niveaux d'expression endogène de KRAS4A. Deuxièmement, l'anticorps reconnaît KRAS4A lorsqu'il est surexprimé car, dans ce cas, il n'est pas processé par ses enzymes de modification. En effet, en condition de surexpression, la machinerie cellulaire permettant de réaliser les modifications post-traductionnelles nécessaires à l'activité de KRAS4A doit faire face à des quantités très importantes de KRAS4A

et verrait alors son activité inhibée. En d'autres termes, l'anticorps serait capable de reconnaître une forme native qui n'est pas palmitoylée ; dans une cellule non-transfectée, la palmitoylation créerait un encombrement stérique ne permettant pas la liaison anticorps-peptide.

Sur base de cette hypothèse, afin d'obtenir un anticorps anti-KRAS4A capable de détecter les niveaux endogènes de la protéine, nous avons produit un deuxième anticorps. Pour cette deuxième production, un peptide modifié avec un groupement palmityl (peptide produit par Vincent Stroobant) (**Figure 1D**) a été injecté lors de l'immunisation des lapins (étape réalisée par l'équipe de Jean-Paul Dehoux). Les sera de ces lapins ont, tout d'abord, été testés sur des lysats totaux d'échantillons de cellules surexprimant KRAS4A, ce qui a permis de montrer la spécificité de notre anticorps pour l'isoforme 4A (données non montrées). Malheureusement, après avoir testé les sera obtenus sur des lysats totaux d'échantillons de pancréas et de poumons tumoraux ($Kras^{G12D}$), il s'avère que ce dernier ne peut détecter KRAS4A endogène. Pour augmenter les chances de détection de la protéine endogène, nous avons également réalisé une immunoprécipitation avec un anticorps Pan-RAS (**Figure 1F**), suivi d'un Western blot avec l'anticorps anti-KRAS4A. Cependant, ce fut encore un échec.

Au vu de ces résultats et de la nécessité de valider nos modèles, nous avons décidé de réaliser cette validation par spectrométrie de masse ciblée. Cette validation est toujours en cours.

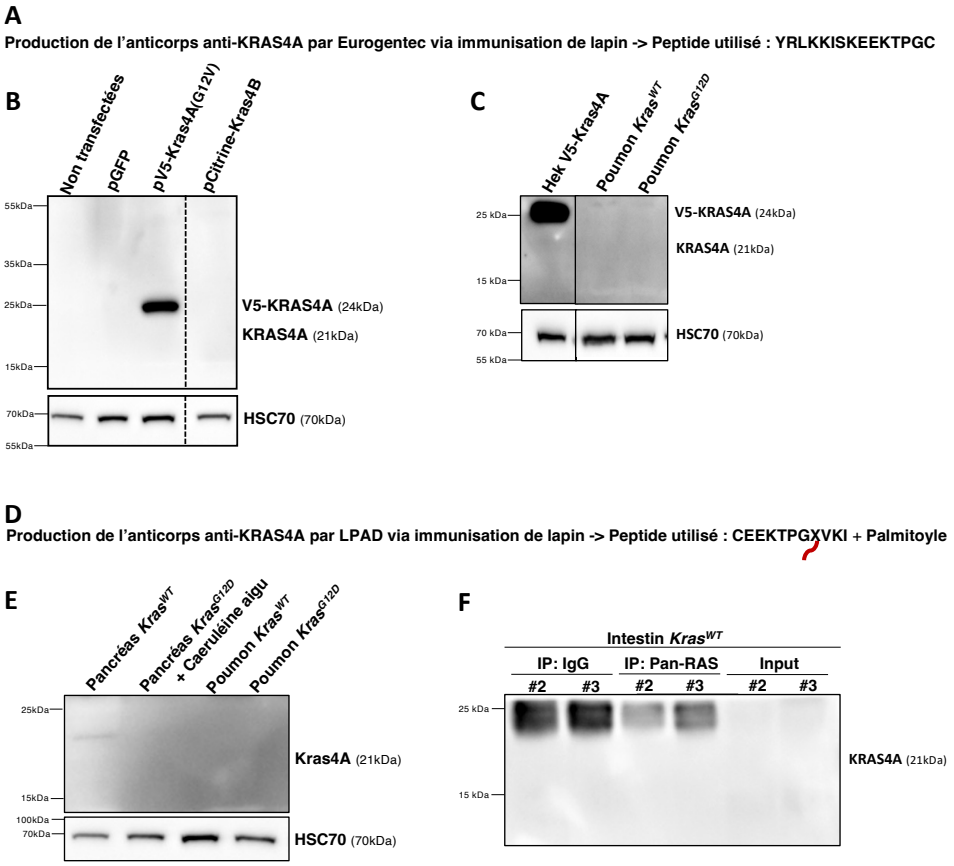


Figure 1. Validation des anticorps ciblant KRAS4A. (**A**) Peptide utilisé pour la première production par l'intermédiaire de Eurogentec. (**B**) Western blot réalisé avec l'anticorps KRAS4A d'Eurogentec sur des lysats totaux provenant de cellules HEK transfectées avec le vecteur d'expressionpV5-Kras4A(G12V), pCitrine-Kras4B, et pGFP. L'anticorps KRAS4A produit permet la détection de V5-KRAS4 (~ 24kDa). Heat shock cognate protein 70 (HSC70) a été utilisé comme contrôle de charge. (**C**) Western blot réalisé avec l'anticorps KRAS4A d'Eurogentec sur des lysats totaux provenant de poumons sains ($Kras^{WT}$) ou tumoraux ($Kras^{G12D}$). La condition Hek-V5-KRAS4A a été utilisée comme contrôle positif et Heat shock cognate protein 70 (HSC70), comme contrôle de charge. (**D**) Peptide utilisé pour la deuxième production de l'anticorps KRAS4. Le lipide rouge indique la position du groupement palmityl. X : palmityl-cystéine (**E**) Western blot réalisé avec la seconde production de l'anticorps KRAS4A sur des lysats totaux de pancréas ou de poumons sains ($Kras^{WT}$) ou tumoraux ($Kras^{G12D}$). Aucune protéine KRAS4A n'est détectée. *Heat shock cognate protein 70* (HSC70) a été utilisé comme contrôle de charge. (**F**) Western blot réalisé avec la seconde production de l'anticorps KRAS4A sur des échantillons d'intestins immuno-précipités avec un anticorps Pan-RAS. Aucune protéine KRAS4A n'est détectée.

2. Le N-acétylcystéine réduit les réponses pro-oxydantes et inflammatoires lors de la pancréatite et la tumorigenèse du pancréas

Dans l'article intitulé "*N-Acetylcysteine reduces the pro-oxidant and inflammatory responses during pancreatitis and pancreas tumorigenesis*", j'ai contribué aux expériences (analyses par western-bots, analyse du contenu en glutathion, immunomarquages et colorations) et aux quantifications présentées dans l'ensemble des figures. J'ai également participé à l'élaboration des figures et à la rédaction, lors de la révision.

antioxidants

MDPI

Article

N-Acetylcysteine Reduces the Pro-Oxidant and Inflammatory Responses during Pancreatitis and Pancreas Tumorigenesis

Marie-Albane Minati, Maxime Libert, Hajar Dahou, Patrick Jacquemin * and Mohamad Assi *

Liver and Pancreas Differentiation (LPAD) Group, de Duve Institute, Université Catholique de Louvain, 1200 Brussels, Belgium; marie-albane.minati@uclouvain.be (M.-A.M.); maxime.l.libert@uclouvain.be (M.L.); hajar.dahou@uclouvain.be (H.D.)

* Correspondence: patrick.jacquemin@uclouvain.be (P.J.); m.assi@uclouvain.be (M.A.); Tel.: +32-2764-75-31 (P.J. & M.A.)

Abstract: Pancreatitis, an inflammation of the pancreas, appears to be a main driver of pancreatic cancer when combined with *Kras* mutations. In this context, the exact redox mechanisms are not clearly elucidated. Herein, we treated mice expressing a $Kras^{G12D}$ mutation in pancreatic acinar cells with cerulein to induce acute pancreatitis. In the presence of $Kras^{G12D}$, pancreatitis triggered significantly greater redox unbalance and oxidative damages compared to control mice expressing *wild-type Kras* alleles. Further analyses identified the disruption in glutathione metabolism as the main redox event occurring during pancreatitis. Compared to the *wild-type* background, $Kras^{G12D}$-bearing mice showed a greater responsiveness to treatment with a thiol-containing compound, N-acetylcysteine (NAC). Notably, NAC treatment increased the pancreatic glutathione pool, reduced systemic markers related to pancreatic and liver damages, limited the extent of pancreatic edema and fibrosis as well as reduced systemic and pancreatic oxidative damages. The protective effects of NAC were, at least, partly due to a decrease in the production of tumor necrosis factor-α (TNF-α) by acinar cells, which was concomitant with the inhibition of NF-κB(p65) nuclear translocation. Our data provide a rationale to use thiol-containing compounds as an adjuvant therapy to alleviate the severity of inflammation during pancreatitis and pancreatic tumorigenesis.

Keywords: antioxidants; cancer; edema; inflammation; pancreas

check for updates

Citation: Minati, M.-A.; Libert, M.; Dahou, H.; Jacquemin, P.; Assi, M. N-Acetylcysteine Reduces the Pro-Oxidant and Inflammatory Responses during Pancreatitis and Pancreas Tumorigenesis. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1107. https://doi.org/10.3390/antiox10071107

Academic Editors: Don-Kyu Kim and Kamalakannan Radhakrishnan

Received: 27 April 2021
Accepted: 7 July 2021
Published: 11 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Acute pancreatitis is defined as a transient and local inflammation of the pancreas characterized by immune cell infiltration and edema [1]. In the absence of appropriate medical care, acute pancreatitis can lead to systemic multiorgan failure and death. The mortality of patients with severe pancreatitis is around 5% [2]. Pancreatitis first affects acinar cells; it causes acinar-to-ductal metaplasia (ADM) and promotes an excessive release of digestive acinar enzymes, which results more widely in pancreatic damage and dysfunction [3]. In the presence of oncogenic mutations in the *Kirsten rat sarcoma* (*Kras*) gene, pancreatitis has been shown to promote the development of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) from acinar cells [4–6].

Emerging studies confirm the importance of reactive oxygen species (ROS) in PDAC pathophysiology [7,8]. Yet, the precise redox changes driven by pancreatitis during PDAC initiation are still not clearly elucidated. Indeed, multiple studies have characterized the redox alterations occurring during inflammation-induced metabolic dysfunction and pancreatitis in *wild-type* rodents [9–16]; however, there is a lack of information regarding the main redox changes taking place during the initiation of pancreas tumorigenesis (presence of *Kras* mutations). To fill this gap of knowledge in the field, we herein compared mice expressing *Kras wild-type* alleles (control mice) with those expressing acinar-specific mutated $Kras^{G12D}$ oncogenic allele. We found that pancreatitis induced greater redox unbalance and oxidative damages during pancreas tumorigenesis in mice bearing $Kras^{G12D}$

mutation. Strikingly, *Kras*^{G12D} mice were more responsive to supplementation with the thiol-rich compound, N-acetylcysteine (NAC), as evidenced by a reduction in inflammation severity and systemic and pancreatic oxidative damages. Therefore, using this comparative approach, our study demonstrates that *Kras*^{G12D} mutation aggravates redox unbalance in the presence of pancreatitis. It also provides a rationale to use thiol-containing compounds as an adjuvant therapy, not only for pancreatitis, but also in the context of pancreatic tumorigenesis.

2. Materials and Methods

2.1. Human Material and Ex Vivo Culture

Pancreata from human heart-beating cadaveric donors were processed by the Beta Cell Bank (Brussels, Belgium) affiliated to the Euro-Transplant Foundation (Leiden, The Netherlands). A full written consent was obtained and the medical ethical committee of the Vrije Universiteit Brussel Hospital approved the use of donor pancreata (ethic approval number: B.U.N. 143201732606). Culture protocol was performed as previously described [17]. This culture spontaneously induces ADM and mimics the molecular mechanisms driven by inflammation. Cells were maintained in 3D suspension culture for 3 days in Advanced RPMI 1640 medium (12633-012, Thermo Fisher, Merelbeke, Belgium) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (F7524, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium), 1% penicillin-streptomycin (15070-063, Life Technologies, Merelbeke, Belgium) and 0.1 mg/mL soybean trypsin inhibitor (17075-029, Life Technologies, Merelbeke, Belgium), at 37 °C and 5% CO_2. On the day of isolation (day 0), 100 µL of cells, corresponding to the normal fraction, was snap-frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C, for future protein extraction.

2.2. Mice Models and Treatments

All procedures described were approved by the animal welfare committee of the University of Louvain Medical School (ethic number: 2017/UCL/MD/020). *Wild-type* (*WT*) and *ElastaseCreER-LSLKras*^{G12D} (*Ela-Kras*^{G12D}) mice were maintained in a CD1-enriched background; this mouse model allows the expression of a mutated *Kras*^{G12D} allele specifically in acinar cells to study pancreas tumorigenesis process. *ElaCreER* and *LSLKras*^{G12D} mice have been described previously [5,18]; these mice were bred in our animal facility to obtain an *Ela-Kras*^{G12D} background. In select experiments, *ElaCreER* and/or *LSLKras*^{G12D} mice were bred with LSLRosa$^{\text{yellow fluorescence protein (YFP)/YFP}}$ mice to obtain *ElaCreER*$^{YFP/YFP}$ (*Ela*$^{YFP/YFP}$) and *ElaCreER-LSLKras*$^{G12D;\ YFP/YFP}$ (*Ela-Kras*$^{G12D;\ YFP/YFP}$) mice; since the Elastase promoter is selectively expressed in pancreatic acinar cells, these mice allow the specific isolation and study of YFP-positive acinar cells. Adult *Ela*$^{YFP/YFP}$, *Ela-Kras*$^{G12D;\ YFP/YFP}$ and *Ela-Kras*^{G12D} mice (6-week-old) were first treated with tamoxifen (30 mg/mL in corn oil) by oral gavage (T5648-1G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) and 4-hydroxytamoxifen (0.3 mg/mL in corn oil) by subcutaneous injection (H7904-25mg, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) to recombine the LSL stop cassettes and allow the expression of *Kras*^{G12D} and/or *YFP* from their respective endogenous locus. To induce acute pancreatitis, *WT* and *Ela-Kras*^{G12D} mice received intraperitoneal injections of cerulein (100-150 µL in phosphate buffered saline, PBS) (125 µg/kg; 24252, Eurogentec, Seraing, Belgium) for 5 days. We must note that lower amounts of cerulein could be injected depending on the used mouse strain (e.g., Black-6 mice could be injected with 60 µg/kg of cerulein). In addition to cerulein injections, a set of *WT* and *Ela-Kras*^{G12D} mice received intraperitoneal N-acetylcysteine (NAC) (1 g/kg; A7250-50G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) injections. For transcriptomic analyses on isolated YFP-positive acinar cells, *Ela*$^{YFP/YFP}$ and *Ela-Kras*$^{G12D;\ YFP/YFP}$ mice received cerulein injections for 3 days (125 µg/kg). Mice were sacrificed at 8 weeks of age by cervical dislocation and tissues were collected for subsequent analyses.

2.3. Ex Vivo Culture of Primary Mouse Acinar Cells

Cultures of dissociated mouse pancreata that mimic ADM were isolated as previously described [19]. This culture spontaneously mimics the molecular mechanism driven by

inflammation. Briefly, pancreata were cut into small pieces and digested with collagenase P (11213865001, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) (0.35 mg/mL of collagenase in Hank's balanced salt solution (HBSS) buffer, 14025-100, Life Technologies, Merelbeke, Belgium). Collagenase incubation was performed for 15 min at 37 °C with 180 rotations per minute (rpm). The cell suspension was washed three times with HBSS/5% FBS and filtered through 500 µm (43-50500-50, ImTec Diagnostics, Antwerp, Belgium) and 100 µm (CLS431752-50EA, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) strain filters. Finally, cells were dropped gently on a cushion of 30% FBS and centrifuged at 1000 rpm, for 2 min. The day of isolation (day 0) is equivalent to normal pancreas. Metaplasia was induced by maintaining acinar cells in 3D suspension culture, for 3 days, in Advanced RPMI supplemented with 5% FBS, 1% penicillin-streptomycin and 0.1 mg/mL soybean trypsin inhibitor, at 37 °C and 5% CO_2.

2.4. Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS) in Primary Acinar Cells

Primary mouse acinar cells were isolated as described above and maintained in culture for 1 or 3 days. At the different timepoints, cells were washed with PBS and incubated for 30 min with 5 µM DCFDA probe at 37 °C (ab113851, Abcam, Cambridge, UK). Then, cells were washed once with PBS and pelleted by centrifugation (1200 rpm, 1 min). The pellet was resuspended in 1 mL PBS and cells were distributed in the wells of an opaque 96-well plate. Finally, DCFDA fluorescence was measured using a microplate reader (GloMax, Promega, Leiden, The Netherlands) at Excitation/Emission = 485/535 nm.

2.5. Detection of 4-Hydroxynonenal (4-HNE) Adducts by Immunoblot

This analysis was performed as described previously [20,21]. Proteins (50 µg) were separated on 12.5% SDS polyacrylamide gels. After transfer, PVDF membranes (ISEQ00010, Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium) were incubated with a reducing solution (100 mM MOPS (M1254-100G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) and 250 mM sodium borohydride, pH 8 (452882-100G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium)) for 15 min, at room temperature (RT). Membranes were then washed with ultrapure water and PBS (3 × 5 min). Membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibody (ab46545, Abcam, Cambridge, UK) in 5% low-fat milk diluted in PBS/0.25% Tween-20(P2287-500mL, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium). The next day, membranes were incubated with the secondary antibodies for 1 h at RT in 5% low-fat milk diluted in PBS/0.25% Tween-20.

2.6. Detection of Protein Carbonyls by Immunoblot

Protein carbonyls analysis was performed as described previously [21]. Briefly, 25 µg of total protein was derivatized with 1% Dinitrophenylhydrazine following manufacturer's instructions (ab178020, Abcam, Cambridge, UK) and then separated by electrophoresis on 12.5% SDS polyacrylamide gels. Proteins were transferred on PVDF membranes, which were incubated with a blocking solution of 1% BSA in PBS/0.05% Tween-20, containing primary antibodies, overnight at 4 °C. The next day, membranes were washed and incubated with secondary antibodies in 5% low-fat milk diluted in PBS/0.05% Tween-20, for 1 h at RT.

2.7. Detection of Protein Expression by Immunoblot

Tissues and cells were lysed in 50 mM Tris-base-HCl, 150 mM NaCl and 1% NP40 (I8896-50ML, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) buffer. Protease and phosphatase (1183615-3001 and 04906837001, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) inhibitors were added just before lysis. Samples were maintained on ice during the procedure. Cell debris were pelleted by centrifugation (14,000× *g*, 10 min, at 4 °C). Proteins were quantified using a Bradford assay (23200, Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium). Samples containing 30 to 50 µg of total proteins were electrophoresed on 7.5% to 12.5% SDS polyacrylamide gels. PVDF membranes were blocked with a solution of 5% low-fat milk diluted in Tris-buffered saline (TBS)/0.1% Tween-20. Membranes were incubated overnight with primary antibodies, at 4 °C. The used antibodies are listed in Table 1. The next day, membranes were washed

with TBS/0.1% Tween-20 and incubated with the secondary antibodies for 1 h, at RT. After incubation, membranes were washed again and revealed using chemiluminescence (kits 34577 and 34094, Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium). Pictures were taken with a Fusion Solo S machine (Vilber, Collégien, France). Densitometric analysis was performed using the Image Studio Lite Ver 5.2 software (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

Table 1. Antibodies used in western blot (WB) and immunohistochemistry (IHC) experiments. CST, cell signaling technology; SCB, Santa-Cruz biotechnology.

Antibody	Reference	Dilution	Application
Superoxide dismutase 1 (SOD1)	37385T, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	WB
Catalase (CAT)	12980T, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	WB
Sulfiredoxin (SRX)	14273-1-AP, Proteintech, Leon-Rot, Germany	1/500	WB
Xanthine oxidase (XO)	Sc398548, SCB, Heidelberg, Germany	1/500	WB
Mitogenic oxidase 1 (MOX1)	Sc518023, SCB, Heidelberg, Germany	1/500	WB
Peroxiredoxin-I (PRX-I)	NBP1-82558, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA	1/1000	WB
Glutathione peroxidase 1 (GPx1)	AF3798-SP, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA	1/1000	WB
4-Hydroxynonenal (4-HNE)	ab46545, Abcam, Cambridge, UK	1/500	WB
Protein carbonyls	ab178020, Abcam, Cambridge, UK	1/5000	WB
Heat shock cognate (HSC70)	Sc7298, SCB, Heidelberg, Germany	1/2000	WB
Nuclear factor Kappa B(NF-κB(p65))	8242S, CST, Leiden, The Netherlands	1/100	IHC
Phospho-Extracellular signal-regulated kinase ($P\text{-}ERK^{T202/Y204}$)	9101S, CST, Leiden, The Netherlands	1/100	IHC
CD45	ab10558, Abcam, Cambridge, UK	1/100	IHC

2.8. Measurement of Reduced and Disulfide Glutathione

Fresh pancreata were homogenized and deproteinated in a solution of 5% 5-sulfosalicylic acid (SSA; S2130-100G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium). After centrifugation (8000× *g*, 10 min), supernatant was diluted with double-deionized water to obtain a 0.5% SSA concentration. Then, reduced glutathione (GSH) and disulfide glutathione (GSSG) were measured according to manufacturer's instructions (38185-1KT, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium). Absorbance developed proportionally to the content of GSH or GSSG and was measured at 405/415 nm using a microplate reader (GloMax, Promega, Leiden, The Netherlands).

2.9. Measurement of Myeloperoxidase Activity (MPO)

MPO activity was measured according to the manufacturer's instructions (ab150136, Abcam, Cambridge, UK). Pancreata were homogenized in MPO assay buffer and supernatant was collected after centrifugation (13,000 rpm, 10 min, 4 °C). Then, supernatant was added to a clear-bottom 96-well plate in presence of the MPO substrate and incubated at 25 °C for 30 min. Reaction was then stopped and absorbance measured at 412 nm using a microplate reader (GloMax, Promega, Leiden, The Netherlands).

2.10. Determination of TNF-α, Amylase, Aspartate Transaminase (AST) and Alanine Transaminase (ALT) Levels

Cultures of dissociated mouse pancreata, which mimic pancreatitis-induced metaplasia, were isolated as mentioned above. After isolation, acinar cells were treated with PBS (vehicle) or NAC (5 mM) for 3 days from the onset of the culture. After treatment, culture medium was collected for TNF-α ELISA measurements according to manufacturer's instructions (430907, Biolegend, San Diego, CA, USA) [22]. TNF-α levels were also measured by ELISA in pancreas lysates from cerulein-treated *Ela-Kras*^{G12D} mice supplemented with PBS or NAC. Absorbance was proportional to the content of TNF-α and was measured at 450 nm using a microplate reader (GloMax, Promega, Leiden, The Netherlands). Amylase, AST and ALT levels were measured in the plasma of cerulein-treated *wild-type* and *Ela-Kras*^{G12D} mice, supplemented with PBS or NAC, using DRI-CHEM machine (NX500i, Fujifilm, Tokyo, Japan). To obtain plasma, blood was collected using EDTA-coated material

and centrifugated at 1500× *g* for 10 min at 4 °C. The supernatant corresponding to the plasma fraction was then transferred to a new tube and used for measurements.

2.11. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS), RNA Extraction and Quantitative PCR

Pancreata of *Ela*$^{YFP/YFP}$ and *Ela-Kras*$^{G12D;\ YFP/YFP}$ mice were digested using collagenase P (11213865001, Merck Life Science, Overijse, Belgium) (0.6 mg/mL), as previously described [23]. Briefly, an EGTA-buffered solution was injected in the main duct for optimization of pancreas dissociation. Pancreata were digested in calcium (Ca^{2+}) buffer for 15–20 min, at 37 °C. After washing, the cells were filtered through a 35-µm cell strainer and sorted by FACS (FACSAria^{TM} III cell sorter, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). RNA extraction was performed using a column-based protocol (AM1912, Thermo Fisher, Merelbeke, Belgium) on YFP-positive acinar cells sorted from *Ela*$^{YFP/YFP}$ and *Ela-Kras*$^{G12D;\ YFP/YFP}$ pancreata treated or not with cerulein for 3 days. Reverse transcription reaction was performed on 150–250 ng of total RNA using the M-MLV reverse transcriptase (M1705, Promega, Leiden, The Netherlands). Quantitative PCR was carried out in a final volume of 10 µL (1 µL neosynthetized cDNA, 2 µL primers 10 µM, 5 µL Sybergreen KAPA mix 2X (KK4601, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium), and 2 µL nuclease-free water) using the CFX96 Real-Time System thermocycler (C1000, Biorad, Temse, Belgium). The expression of target genes was normalized to the *ribosomal protein L4* (*Rpl4*) and *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*Gapdh*) housekeeping genes. Relative expression was calculated using the ΔΔCt method. Primers used in the study are listed in Table 2.

Table 2. PCR primers used in the present study.

Gene	Accession Number	Forward (5′-3′)	Reverse (5′-3′)	Species
Glutathione peroxidase 1 (Gpx1)	14775	AGTCCACCGTGTATGCCTTC	GTGTCCGAACTGATTGCACG	*Mus musculus*
Superoxide dismutase 1 (Sod1)	20655	GGAACCATCCACTTCGAGCA	CTGCACTGGTACAGCCTTGT	*Mus musculus*
Catalase (Cat)	12359	CTCGCAGAGACCTGATGTCC	TGTGGAGAATCGAACGGCAA	*Mus musculus*
Thioredoxin 1 (Txn1)	22166	AAGCTTGTCGTGGTGGACTT	AACTCCCCCACCTTTTGACC	*Mus musculus*
Thioredoxin-interacting protein (Txnip)	56338	CCTAGTGATTGGCAGCAGGT	GAGAGTCGTCCACATCGTCC	*Mus musculus*
Thioredoxin reductase 1 (Txnrd1)	50493	AGAGCTGGTGGTTTCACCTTC	TTTTTGTTCGGCTTCAGGGCT	*Mus musculus*
Sulfiredoxin (Srxn1)	76650	GTACCAATCGCCGTGCTCAT	CTCACGAGCTTGGCAGGAAT	*Mus musculus*
Tumor necrosis factor-α (TNF-α)	21926	GTGACAAGCCTGTAGCCCAC	ACAAGGTACAACCCATCGGC	*Mus musculus*
Interleukine 6 (IL6)	16193	TGTTCTCTGGGAAATCGTGGA	AGCATTGGAAATTGGGGTAGGA	*Mus musculus*
Interleukine 1-α (IL1-α)	16175	CGCTTGAGTCGGCAAAGAAA	CTGATACTGTCACCCGGCTC	*Mus musculus*
Interleukine 1-β (IL1-β)	16176	GCCACCTTTTGACAGTGATGAG	AAGGTCCACGGGAAAGACAC	*Mus musculus*
Nitric oxide synthase 2 (Nos2)	18126	TGAAACTTCTCAGCCACCTTGG	AGAGAAACTTCCAGGGGCAAG	*Mus musculus*
C-C motif chemokine ligand 2 (Ccl2)	20296	CTGTGCTGACCCCAAGAAGG	AAGACCTTAGGGCAGATGCAG	*Mus musculus*
Amylase (Amy2a5)	109959	GTGGTCAATGGTCAGCCTTT	TTGCCATCGACCTTATCTCC	*Mus musculus*
Chymotrypsin (Ctrc)	76701	GGATGACACTTGGAGGCACA	CGATGTCGTTCCACAGCAGA	*Mus musculus*
Ribosomal protein L4 (Rpl4)	67891	CGCAACATCCCTGGTATTACT	TGTGCATGGGCAGGTTATAGT	*Mus musculus*
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)	14433	GGTCCTCAGTGTAGCCCAAG	AATGTGTCCGTCGTGGATCT	*Mus musculus*

2.12. Bulk RNA-Sequencing and Bioinformatics

The RNA Integrity Number (RIN) of total extracted RNA was measured using Agilent 2100 Bio-analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Samples with a RIN $\geq$ 7 were selected for RNA-SEQ experiments, which were performed by the Novogene Company. Sequencing libraries were generated using the rRNA-depleted RNA by NEBNext®UltraTM Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (E7420L, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) following manufacturer's recommendations. Briefly, fragmentation was carried out using divalent cations under elevated temperature in NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer (E7525L, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). First strand cDNA was synthesized using random hexamer primer and M-MuLV Reverse Transcriptase (M0253L, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Second strand cDNA synthesis was subsequently performed using DNA polymerase I and RNase H. In the reaction buffer, dNTP with dUTP replacing dTTP were used. Then, NEBNext adaptors (E7335L, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) with hairpin loop structure were ligated to the adenylated 3′ ends of DNA fragments. The cDNA fragments of preferentially 150~200 bp in length were purified using AMPure XP system (Beckman Coulter, Brea, CA,

USA). Library preparations were sequenced on an Illumina Hiseq platform and paired-end reads were generated.

For data analysis, clean data (clean reads) were obtained by removing reads containing adapter, reads containing poly-N, and low-quality reads from the raw data. All the downstream analyses were based on clean data of high quality. Reference genome and gene model annotation files were directly downloaded from the genome website. Index of the reference genome was built using Bowtie v2.0.6 [24,25] and paired-end clean reads were aligned to the reference genome using TopHat v2.0.9 [26]. Then, Cuffdiff (v2.1.1) was used to calculate fragments per kilo-base of exon per million fragments mapped (FPKMs) of coding genes in each sample [27]. KOBAS software was used to test the statistical enrichment of differentially expressed genes in KEGG pathways [28]. RNA-SEQ data can be downloaded using the following accession numbers: GSE163254 and GSE163263 [29].

2.13. Histology and Immunohistochemistry

Dissected pancreata were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA; HT501128-4L, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) for 4 h at 4 °C, before paraffin embedding. Sections of 6 µm were deparaffinized and antigen retrieval was performed using citrate (pH 6.0) or Tris-EDTA (pH 9.0) buffer in Lab Vision PT Module (Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium). After permeabilization with PBS/0.3% Triton-100X (3051.4, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for 5 min, sections were blocked with solution 1 (3% low-fat milk, 5% BSA, 0.3% Triton-100X in PBS) for 45 min, at RT. Primary antibodies (Table 1) diluted in solution 1 were added and incubated overnight, at 4 °C. The next day, slides were washed with PBS/0.1% Triton-100X and incubated with secondary antibodies diluted in solution 2 (10% BSA, 0.3% Triton-100X) at 37 °C, for 1 h, before DAB staining (ab64238, Abcam, UK, Cambridge). Pictures were selected after scanning on Pannoramic P250 Flash III (3DHistech, Budapest, Hungary). Edematous areas were measured on hematoxylin and eosin (H&E)-stained sections (measurements were performed on the whole pancreas area) using the CaseViewer software (3DHistech, Budapest, Hungary). The quantification of CD45, NF-κB(p65) and P-ERK$^{T202/Y204}$ staining was performed on whole pancreas using the HALO software (Indica Labs, Albuquerque, NM, USA).

2.14. Statistical Analysis

Data were presented as means ± standard error of the mean (SEM). Normality and equal variance were checked by applying a combination of four tests: Anderson–Darling test, D'Agostino–Pearson omnibus normality test, Shapiro–Wilk normality test and Kolmogorov–Smirnov normality test. Comparisons between two groups were performed using an unpaired Student's t-test. Comparisons between three or more groups was performed using one-way analysis of variance (ANOVA). Significant effects or interactions were further analyzed by post hoc method. For all statistical analysis, the level of significance was set at $p < 0.05$. A statistical tendency was considered when *P*-values were $0.05 < p < 0.1$. Analyses were performed using SigmaStat (version 3.1, Systat Software inc., San Jose, CA, USA) and GraphPad Prism (version 8, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). For RNA-SEQ data, DESeq2 R package (Bioconductor), was used to determine significant differential gene expression using a model based on the negative binomial distribution. *P* values were corrected using the Benjamini and Hochberg's approach for controlling the false discovery rate (FDR). Genes with a corrected p value < 0.05 were assigned as differentially expressed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3. Results and Discussion

3.1. Pancreatitis Induces a Greater Pro-Oxidant Response in Mice Bearing Oncogenic Kras^{G12D}

To investigate the main pancreatitis-driven redox changes occurring in the presence of either wild-type *Kras* or mutated *Kras^{G12D}* alleles, *WT* and *Ela-Kras^{G12D}* mice were challenged with cerulein for 5 days to induce pancreatitis (inflammation of the pancreas). We first measured the oxidative damage marker 4-HNE. Interestingly, in total pancreas

lysates, we found increased 4-HNE levels only in cerulein-treated *Ela-Kras*^{G12D}, but not cerulein-treated *WT* mice (Figure 1A); this increase was also observed in the plasma of cerulein-treated *Ela-Kras*^{G12D} mice compared to their untreated siblings (Figure S1A), indicating that pancreatitis induces both local and systemic oxidative damages, selectively in *Ela-Kras*^{G12D} mice. It is well-known that pancreatitis induces redox unbalance in *WT* rodents [9–11]. The absence of a significant increase in 4-HNE in our cerulein-treated *WT* mouse model is not synonymous with the absence of redox alterations; it probably means that a longer period and/or higher doses of cerulein treatment are needed to induce significant oxidative damage level. However, our data undoubtedly show that the oncogenic *Kras*^{G12D} increases the extent of oxidative damages and accelerates the establishment of a pro-oxidant state in the pancreas. Since acinar cells are mainly affected by pancreatitis, we wanted to confirm that the redox changes observed in the total pancreas are also occurring in acinar cells. To do so, we used an ex vivo culture system that mimics the effect of pancreatitis on acinar cells. On day 3 (metaplastic acini), ROS levels were increased three-fold compared to day 1 (non-metaplastic acini) in acinar cultures from *Ela-Kras*^{G12D} pancreata (Figure S1B), indicating the presence of a pro-oxidant response in the whole pancreas and in acinar cells during pancreatic transformation.

In addition, the expression of major redox-sensitive antioxidant and pro-oxidant enzymes was modulated by pancreatitis (Figure 1B and Figure S1C). For example, the expression of peroxiredoxin-I (PRX-I), a major mammalian peroxidase, was similarly increased in cerulein-treated *Ela-Kras*^{G12D} and *WT* mice compared to their untreated controls, respectively (Figure 1B); however, the expression of sulfiredoxin (SRX) and catalase (CAT) was selectively increased in cerulein-treated *Ela-Kras*^{G12D} animals (Figure 1B). These data suggest enhanced antioxidant defense to buffer the pro-oxidant response induced by pancreatitis in the pancreas. We observed in FACS-sorted acinar cells, from *Ela-Kras*^{G12D} pancreata, an increased expression of numerous antioxidant genes (Figure S2), including *Sulfiredoxin-1* (*Srxn1*), *thioredoxin-1* (*Txn1*) and *thioredoxin reductase 1* (*Txnrd1*), thus confirming that similar antioxidant defense is also taking place in acinar cells from cerulein-treated pancreata. Altogether, our data show that although pancreatitis promoted subtle redox alterations in *WT* mice, its combination with *Kras*^{G12D} mutation induced the greatest level of pro-oxidant response and oxidative damages in the pancreas.

3.2. Pancreatitis Modulates the Expression of Glutathione-Regulating Enzymes in Acinar Cells

After mapping the overall redox changes, we aimed to identify the most relevant redox mechanisms occurring in acinar cells during pancreatitis-driven tumorigenesis. We first analyzed the transcriptional landscape of FACS-sorted acinar cells from cerulein-treated and untreated *Ela-Kras*^{G12D} mice and identified an upregulation in the "glutathione metabolism" pathway in response to pancreatitis (Figure 2A). This pathway was also upregulated, but to a lesser extent, in metaplastic acinar cells from cerulein-treated *WT* mice (Figure 2A). Interestingly, inflammation, cytokine production and pancreatic cancer pathways were all upregulated in the *Ela-Kras*^{G12D} compared to the *WT* group (data not shown), suggesting that the inflammatory and pro-oxidant responses of pancreatitis are more severe in the former.

Antioxidants **2021**, *10*, 1107

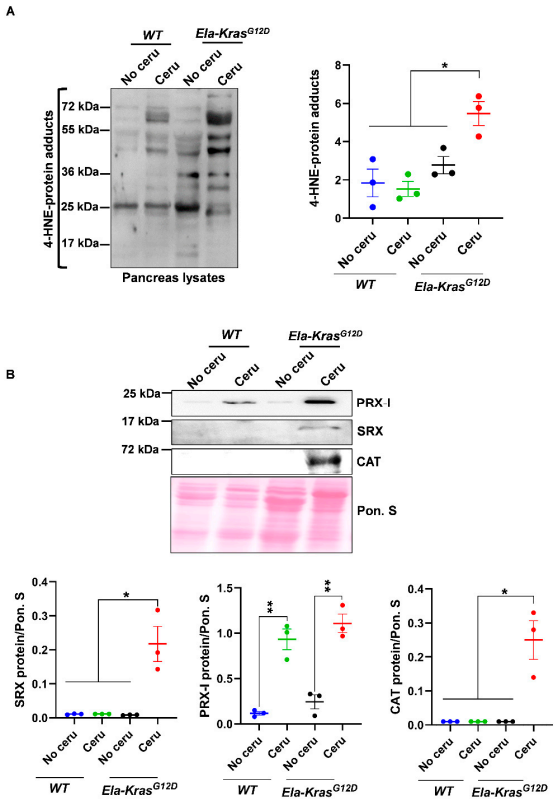


Figure 1. Pancreatitis induces an important pro-oxidant response particularly in *Ela-Kras*^{G12D} mice. (**A**) Western blot for the oxidative damage marker, 4-HNE, on pancreas lysates of *wild-type* (*WT*) and *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 5 days (n = 3 for both *WT* and *Ela-Kras*^{G12D}) or untreated (n = 3 for both *WT* and *Ela-Kras*^{G12D}). The corresponding densitometry analysis is also available as a bar graph. (**B**) Western blot on pancreas lysates of *wild-type* (*WT*) and *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 5 days (n = 3 for both *WT* and *Ela-Kras*^{G12D}) or untreated (n = 3 for both *WT* and *Ela-Kras*^{G12D}). The analyzed enzymes are Peroxiredoxin-I (PRX-I), Sulfiredoxin (SRX) and Catalase (CAT). The corresponding densitometry analysis normalized to Ponceau S staining (Pon. S) is also available as a bar graph. Data are mean ± SEM. Statistical significance for all panels in this figure was tested by one-way ANOVA test and further interactions were analyzed by post hoc test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). All quantifications in this figure show biological replicates.

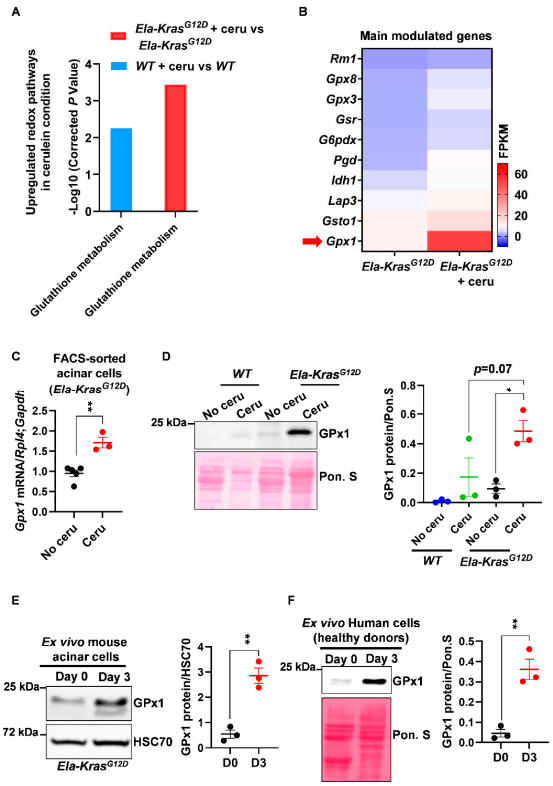


Figure 2. Pancreatitis modulates the expression of glutathione-regulating enzymes in mouse and human pancreatic cells. (**A**) Upregulated glutathione pathway identified by KEGG analysis in FACS-sorted acinar cells from *wild-type* (*WT*) and *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 3 days (n = 3 for both *WT* and *Ela-Kras*^{G12D}) or untreated (n = 3 for both *WT* and *Ela-Kras*^{G12D}). "Glutathione metabolism" is the official term used in the KEGG database; it means that the expression of a set of genes involved in glutathione oxidation and/or reduction is being changed. The corrected *P*-values were presented as "-Log10" so that when the differential expression is higher, the *P*-value on graph follows the same tendency. (**B**) Heatmap for the main genes modulated in the glutathione metabolism pathway in *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 3 days (n = 3) or untreated (n = 3). Red arrow shows one of the most expressed genes, *GPx1*. (**C**) Quantitative PCR for *glutathione peroxidase 1* (*Gpx1*) on FACS-sorted acinar cells from *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 3 days (n = 3) or untreated (n = 5). *Ribosomal protein L4* (*Rpl4*) and *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*Gapdh*) were used as housekeeping genes. (**D**) Western blot for GPx1 on pancreas lysates of *wild-type* (*WT*) and *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 5 days (n = 3 for both *WT* and *Ela-Kras*^{G12D}) or untreated

($n = 3$ for both *WT* and *Ela-Kras*^{G12D}). The corresponding densitometry analysis normalized to Ponceau S (Pon. S) is also available as a bar graph. (**E**) Western blot for GPx1 in ex vivo cultured acinar cells on day 0 (normal) and 3 (metaplasia); these cells were isolated from *Ela-Kras*^{G12D} pancreata and cultured under conditions mimicking inflammation ($n = 3$). The corresponding densitometry analysis normalized to HSC70 is also available as a bar graph. Three independent cultures from three different mice were tested. (**F**) Western blot for GPx1 in ex vivo cultured human acinar cells on day 0 (normal) and 3 (metaplasia); these cells were obtained from healthy heart-beating cadaveric donors and cultured under conditions mimicking inflammation ($n = 3$). Three independent cultures from three different donors were tested. Due to the scarcity of human material, we only assessed the expression of GPx1, which is the most relevant redox enzyme for this study. The corresponding densitometry analysis normalized to Ponceau S (Pon. S) is also available as a bar graph. Data are mean ± SEM. *P*-values for panel **A** were calculated using a Student's t-test and corrected by the Benjamini and Hochberg method. Statistical significance for Panels **C**, **E** and **F** was tested by Student's t-test (** $p < 0.01$). Statistical significance for panel **D** was tested by one-way ANOVA test and further interactions were analyzed by post hoc test (* $p < 0.05$). A statistical tendency was considered when *p*-values were $0.05 < p < 0.1$. All quantifications in this figure show biological replicates.

Among other genes, we observed that the expression of *glutathione peroxidase* (*Gpx1*) was mostly increased at the mRNA level in FACS-sorted acinar cells from cerulein-treated *Ela-Kras*^{G12D} mice compared to untreated counterparts (Figure 2B,C); glutathione peroxidase (GPx1) plays a critical role in the consumption of intracellular glutathione to buffer pro-oxidative responses. This result was also reproduced at the protein level in total pancreas lysates from cerulein-treated *Ela-Kras*^{G12D} mice and in specific acinar cultures from the same genetic background (Figure 2D,E). Interestingly, the expression of GPx1 was higher in *Ela-Kras*^{G12D} mice compared to their *WT* counterparts (Figure 2D), thus confirming the higher extent of redox changes occurring in the presence of *Kras*^{G12D} mutation. We also observed an increased protein expression of GPx1 in primary human pancreatic cells cultured ex vivo under conditions mimicking inflammation (Figure 2F). As a proof of glutathione metabolism activation, we observed that short-term pancreatitis (1 day of treatment) decreased reduced glutathione (GSH) levels and increased the production of glutathione disulfide (GSSG) in the pancreas of cerulein-treated mice compared to healthy siblings (No cerulein) (Figure S3), highlighting the use of reduced glutathione (GSH) by GPx1 to buffer the pro-oxidant environment induced by pancreatitis [30]. These experiments validate the increase in GPx1 expression at the mRNA and protein levels and suggest that changes in glutathione utilization rates occur during pancreatitis. These experiments also reveal that a similar mechanism may also operate in inflamed human pancreata.

3.3. N-Acetylcysteine Reduces the Severity of Pancreatitis in Wild-Type and Ela-Kras^{G12D} *Mice*

As glutathione is depleted during pancreatitis, we questioned the usefulness of the thiol-containing compound, NAC, on pancreatic redox homeostasis and inflammation severity. Early studies have reported a positive antioxidant effect of NAC during pancreatitis in *WT* mice and human cells from patients with redox disorders [31–36]. However, the exact impact of NAC on pancreatic inflammation in a *Kras*^{G12D} background is still not clearly elucidated. To induce acute pancreatitis, *WT* and *Ela-Kras*^{G12D} mice received a 5-day cerulein regimen and were treated with NAC by intraperitoneal injection, as depicted in Figure 3. Acute pancreatitis increased GSSG levels and decreased GSH levels in *WT* and *Ela-Kras*^{G12D} mice compared to untreated counterparts (no cerulein; Figures 4A and 5A); these effects were more pronounced in *Ela-Kras*^{G12D} animals, which is consistent with the higher level of oxidative damages observed in this background (Figure 1). NAC treatment increased the content of GSH and concomitantly decreased GSSG rates in the pancreata of cerulein-treated *WT* and *Ela-Kras*^{G12D} mice (Figures 4A and 5A); this is probably due to the direct scavenging of ROS by NAC, thereby sparing the intra-pancreatic GSH pool and/or to the ability of NAC to directly provide cysteine for GSH synthesis [37]. In both *WT* and *Ela-Kras*^{G12D} groups, the total pancreas weight of NAC-treated mice was significantly

reduced compared to that of cerulein-treated mice (Figures 4B and 5B). Circulating amylase levels, as well as AST and ALT rates, increase during pancreatitis due to pancreas and liver damage, respectively [9]. NAC treatment significantly reduced the circulating levels of amylase, AST and ALT only in cerulein-treated *Ela-Kras*^{G12D}, but not in *WT* mice; for the latter, a protective tendency was observed for circulating amylase levels without reaching a statistical significance (Figures 4C and 5C). These measurements suggest that NAC reduces zymogen activation in acinar cells and relieves pancreatitis-related liver damage, especially in the *Ela-Kras*^{G12D} background.

Histological analysis showed a better pancreas architecture in NAC-treated groups (Figures S4 and S5). Whole-tissue quantification of H&E-stained sections revealed that NAC treatment decreased edema by two folds in both cerulein-treated *WT* and *Ela-Kras*^{G12D} mice (Figure 4D,E and Figure 5D,E). Similarly, collagen deposit, stained by Sirius Red, was also reduced by 1.1- and 1.4-fold in response to NAC treatment in cerulein-treated *WT* and *Ela-Kras*^{G12D} mice, respectively (Figure 4D,E and Figure 5D,E). CD45 is a transmembrane receptor expressed on the majority of immune cells and used as a marker to measure tissular immune cell infiltration. Although NAC did not impact CD45-positive immune cell infiltration (Figure S6A), it significantly reduced oxidative damage markers at the pancreatic (i.e., protein carbonyls) and systemic (i.e., 4-HNE) levels in both *WT* and *Ela-Kras*^{G12D} backgrounds (Figure 4F, Figure 5F and Figure S6B). Since immune cells are a major source of ROS production during inflammation [38], our results suggest that NAC is correcting redox imbalance by directly scavenging ROS generated by immune cells rather than affecting their infiltration in the pancreas. Accordingly, the activity of myeloperoxidase (MPO), a pro-oxidant enzyme majorly expressed by immune cells, was decreased particularly in *Ela-Kras*^{G12D} pancreata suffering from pancreatitis (Figures 4G and 5G). Our data indicate that NAC alleviates the hallmarks of pancreatitis and related oxidative damages, especially in the *Ela-Kras*^{G12D} genotype.

3.4. N-Acetylcysteine Improves Pancreatitis-Related Inflammation in Ela-Kras^{G12D} *Mice*

Since *Ela-Kras*^{G12D} mice exhibited a higher responsiveness to NAC treatment, we focused on this genetic background to better understand the impact of NAC on pancreatic inflammation during pancreatitis. We returned to the transcriptomic data of FACS-sorted acinar cells from cerulein-treated and untreated *Ela-Kras*^{G12D} mice and found an important upregulation of TNF signaling in response to pancreatitis (Figure 6A). Since TNF-α plays a key role in the formation of edema in the lungs [39–41], we assume that it can exert similar functions in the pancreas. To test our hypothesis, using ELISA, we measured the TNF-α content in pancreas lysates from cerulein-treated *Ela-Kras*^{G12D} mice supplemented with PBS or NAC. Interestingly, in the pancreas, edema levels correlated positively with TNF-α levels (Pearson, $r = 0.93$, $p < 0.05$) and NAC treatment reduced TNF-α rates in the pancreata of *Ela-Kras*^{G12D} mice compared to vehicle-treated counterparts (Figure 6B). Acinar cells actively produce pro-inflammatory cytokines during pancreatitis and pancreas tumorigenesis [21,42]. To check the impact of NAC on acinar-specific TNF-α release, we isolated acinar cells from *Ela-Kras*^{G12D} pancreata and cultured them ex vivo under conditions mimicking inflammation. Strikingly, NAC-treated acinar cells released two-fold less TNF-α in culture media compared to vehicle-treated ones (Figure 6C). Accordingly, the nuclear translocation of NF-κB(p65), a transcription factor involved in the regulation of cytokines expression [43], was also decreased by two-fold in acinar cells from NAC-treated *Ela-Kras*^{G12D} pancreata (Figure 6D,E). In favor of a transcriptional control for TNF-α expression and release, we found that NAC treatment significantly reduced *TNF-α* mRNA expression in ex vivo cultured acinar cells from *Ela-Kras*^{G12D} pancreata (Figure S7); the expression of other pro-oxidant and inflammatory genes, including *IL6*, *Ccl2* and *Nos2*, was downregulated in NAC-treated acinar cells compared to vehicle-treated cultures (Figure S7). Finally, the activation of ERK-MAPK, a critical pathway for pancreas carcinogenesis and inflammation, tended to decrease in acinar cells following NAC administration into *Ela-Kras*^{G12D} mice (Figure 6D,E). However, we cannot rule out that NAC may also reduce the

production of TNF-α from immune cells infiltrating the pancreas. Our results indicate that NAC reduces the severity of inflammation during the initiation of pancreas tumorigenesis, at least partly, by decreasing the production of TNF-α from acinar cells.

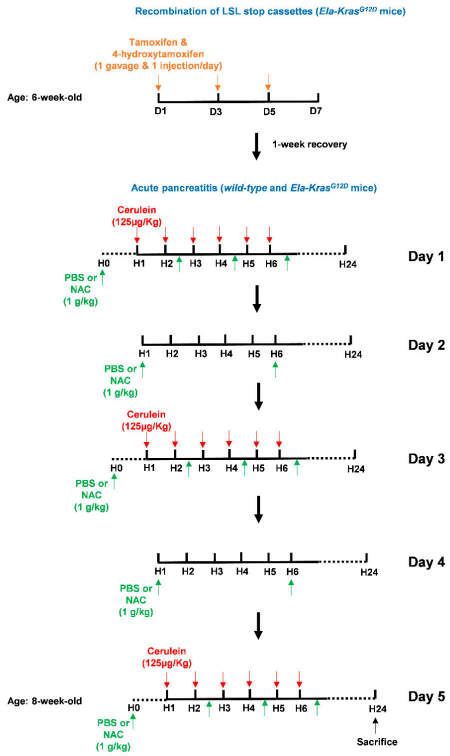


Figure 3. Illustration of the tamoxifen and cerulein regimens as well as NAC treatments. To initiate pancreas tumorigenesis, 6-week-old *Ela-Kras*^{G12D} mice were first treated once a day with tamoxifen (gavage) and 4-hydroxytamoxifen (subcutaneous injection), on day (D) 1, 3 and 5 (orange arrows), to induce recombination of the LSL stop cassette and allow the expression of *Kras*^{G12D} from its endogenous locus. After tamoxifen injections, mice recovered for 1 week. To induce acute pancreatitis, *wild-type* (*WT*) or tamoxifen-treated *Ela-Kras*^{G12D} mice started a 5-day acute pancreatitis regimen. On day (D) 1, 3 and 5, mice received 6-daily intraperitoneal cerulein injections (red arrows) at a frequency of 1 injection/h (H). Cerulein diluted in a PBS volume of 100-150 µL was injected at a concentration of 125 µg/kg/injection. On day (D) 1, 3 and 5, mice received 4 intraperitoneal injections of NAC as indicated (green arrows). On day (D) 2 and 4, mice received 2 intraperitoneal injections of NAC as indicated (green arrows). Each NAC dose was 1 g/kg in a volume of 100–150 µL diluted in PBS. For vehicle-treated mice, intraperitoneal injections of 100–150 µL PBS were given instead of NAC. Mice were then sacrificed by cervical dislocation after 24 h.

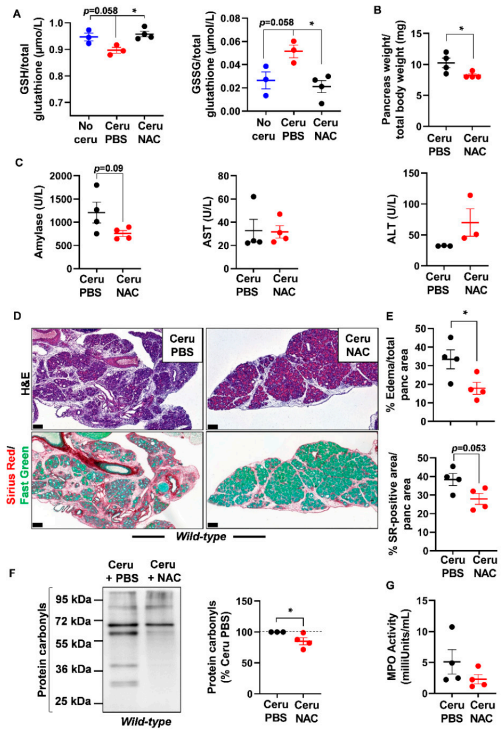


Figure 4. N-acetylcysteine treatment improves acute pancreatitis hallmarks in *wild-type* mice. (**A**) Reduced glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) measurements in pancreas lysates of *wild-type* (*WT*) mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 3$), cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$) or untreated (No ceru; $n = 3$). (**B**) Pancreas weight normalized to total body weight in *wild-type* (*WT*) mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$). (**C**) Measurement of plasma amylase, aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels in *wild-type* (*WT*) mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 3$–4) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 3$–4). (**D**) Hematoxylin and eosin (H&E) staining and Sirius Red (SR) staining on the pancreata of *wild-type* (*WT*) mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$), or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$). Bars: 100 µm. (**E**) Whole-tissue quantifications for edema and SR-positive areas from panel **D**. (**F**) Western blot for the oxidative damage marker, protein carbonyls, on pancreas lysates of *wild-type* (*WT*) mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 3$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$). (**G**) Myeloperoxidase (MPO) activity on pancreas lysates of *wild-type* (*WT*) mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$). Data are mean ± SEM. Statistical significance for Panel **A** was tested by one-way ANOVA test and further interactions were analyzed by post hoc test (* $p < 0.05$). Statistical significance for panels

B–G was tested by Student's *t*-test (* $p < 0.05$). Dixon's Q test was applied to remove outlier samples, before conducting statistical analysis. A statistical tendency was considered when *p*-values were $0.05 < p < 0.1$. All quantifications in this figure show biological replicates.

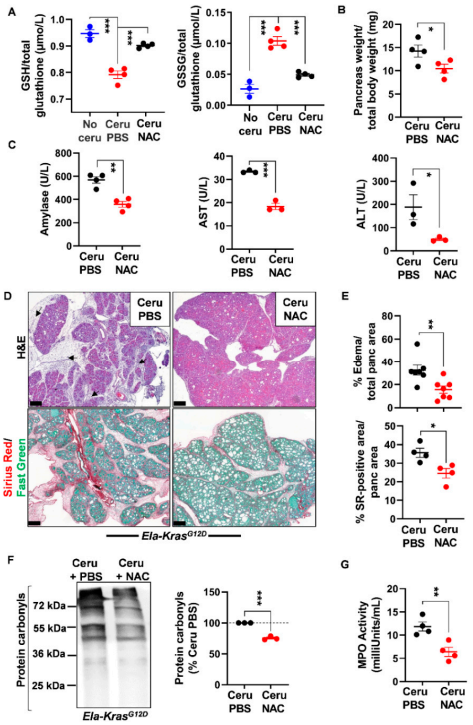


Figure 5. N-acetylcysteine treatment improves acute pancreatitis hallmarks in *Ela-Kras*^{G12D} mice. (**A**) Reduced glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) measurements in pancreas lysates of *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$), cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$) or untreated (No ceru; $n = 3$). (**B**) Pancreas weight normalized to total body weight in *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$). (**C**) Measurement of plasma amylase, aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels in *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 3$–4) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 3$–4). (**D**) Hematoxylin and eosin (H&E) staining and Sirius Red (SR) staining on the pancreata of *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$–7) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$–7). Bars: 200 µm. Black arrows show edematous area. (**E**) Whole-tissue quantifications for edema- and SR-positive areas from panel **D**. (**F**) Western blot for the oxidative damage marker, protein carbonyls,

on pancreas lysates of *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 3$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 3$). (**G**) Myeloperoxidase (MPO) activity on pancreas lysates of *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$). Data are mean ± SEM. Statistical significance for Panel **A** was tested by one-way ANOVA test and further interactions were analyzed by post hoc test (*** $p < 0.001$). Statistical significance for panels **B**–**G** was tested by Student's *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Dixon's Q test was applied to remove outlier samples, before conducting statistical analysis. All quantifications in this figure show biological replicates.

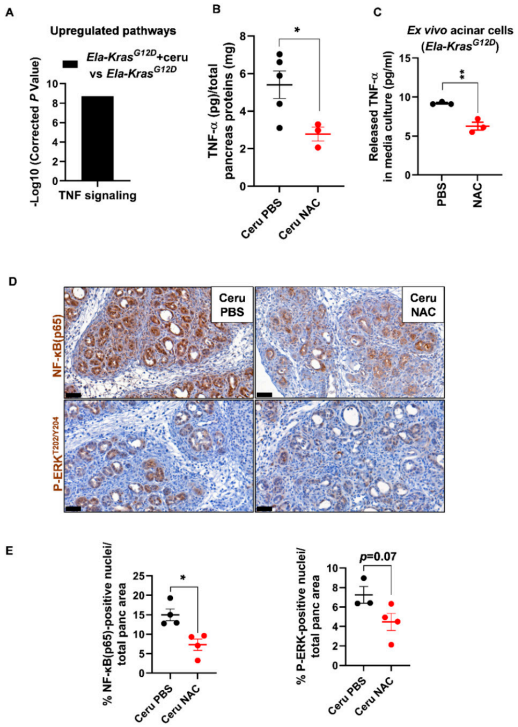


Figure 6. N-acetylcysteine reduces TNF-α production from acinar cells in *Ela-Kras*^{G12D} mice. (**A**) TNF signaling identified as a major upregulated pathway by KEGG analysis in FACS-sorted acinar cells from *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 3 days ($n = 3$). (**B**) TNF-α protein measurements by ELISA, in pancreas lysates from *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 5$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 3$). Total pancreas protein concentration was determined by a Bradford assay and used for normalization of TNF-α protein levels. (**C**) TNF-α protein measurements by ELISA in the culture media of acinar cells isolated from *Ela-Kras*^{G12D} mice

and cultured under conditions mimicking inflammation. Acinar cells were treated with PBS or NAC (5 mM) from the onset of the culture until 3 days later (n = 3). Three independent cultures from three different mice were tested. (**D**) Immunohistochemistry for NF-κB(p65) and P-ERK$^{T202/Y204}$ on the pancreata of *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; n = 3–4) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; n = 4). Bars: 50 µm. (**E**) Whole-tissue quantifications for NF-κB(p65) and P-ERK$^{T202/Y204}$ from panel **D**. Data are mean ± SEM. Statistical significance for all panels was tested by Student's t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Dixon's Q test was applied to remove outlier samples, before conducting statistical analysis. A statistical tendency was considered when p-values were $0.05 < p < 0.1$. All quantifications in this figure show biological replicates.

This is the first study comparing the impact of NAC on pancreatitis in mice bearing either *wild-type* or mutated *Kras*^{G12D} alleles. Mutated *Kras*^{G12D} is an essential driver of pancreatic carcinogenesis [4,5]. NAC reproducibly reduced the severity of pancreatitis in both *wild-type* and *Kras*^{G12D}-bearing mice, with a higher efficiency in the later; this better responsiveness is probably due to the higher extent of inflammation and oxidative damages induced by *Kras*^{G12D}, which renders the protective effects of NAC more pronounced and visible. The use of NAC is already approved in the clinics and its prescription to patients suffering from pancreatitis should be safe, with few side-effects. Interestingly, our data suggest that NAC could also be effective in reducing the severity of inflammation during the early tumorigenesis process. However, one limitation of the study is that the main molecular mechanism through which NAC mediates its protective effect is still not clearly elucidated, because NAC impacts a multitude of pathways that renders this identification extremely challenging. Additionally, although thiol-containing compounds were shown to exert anticancer effects on cultured pancreatic cancer cells [44,45], NAC failed to reduce the development of acinar-to-ductal metaplasia and neoplastic lesions in our model of mice bearing *Kras*^{G12D} mutation (data not shown), indicating that it could be used as an adjuvant treatment to relieve inflammation, but not as a therapy for pancreatic cancer.

4. Conclusions

In this paper, we demonstrate that acute pancreatitis induced systemic and pancreatic oxidative damages leading to the activation of an antioxidant defense mechanism in acinar cells, by modulating the expression of redox enzymes. A relevant defense mechanism mobilized by acinar cells was the use of intracellular GSH by GPx1 to neutralize ROS and reduce the oxidative stress response. Providing an extracellular source of thiols by administrating NAC to mice increased intracellular GSH pool in the pancreas. NAC also reduced oxidative damages, inflammation hallmarks and pancreatic edema; this was evident especially when pancreatitis and *Kras*^{G12D} mutation were combined. Importantly, the resorption of pancreatic edema is clinically associated with better health outcomes [46]. Edema is a protein-rich fluid that may form plugs and calcify in pancreatic ducts, leading to pressure, duct damages and chronic pain. We therefore consider the use of an edema-eliminating compound such as NAC to be clinically relevant. In addition, NAC treatment seems to be safe without any significant side-effects. It is already prescribed to relieve pulmonary mucus in patients [47] and our study reveals that it could be used similarly to reduce pancreatic edema. However, we do not consider NAC as a complete treatment for pancreatitis or pancreatic cancer, but rather as an adjuvant therapy to alleviate the symptoms of patients suffering from severe pancreatitis or pancreas malignancies. Our study encourages future testing of treatments combining NAC with anti-inflammatory and anticancer drugs in the context of pancreatitis and pancreatic cancer, respectively.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox10071107/s1, Figure S1. Pancreatitis induces a pro-oxidant response in *Ela-Kras*^{G12D} pancreata. Figure S2. Pancreatitis provokes significant redox changes in pancreatic acinar cells. Figure S3. Pancreatitis induces glutathione oxidation in the pancreas. Figure S4. N-acetylcysteine treatment reduces pancreatic edema in *wild-type* pancreata during pancreatitis. Figure S5. N-acetylcysteine treatment reduces pancreatic edema in *Ela-Kras*^{G12D} pancreata during pancreatitis. Figure S6. N-

acetylcysteine treatment reduces systemic oxidative damage in *wild-type* and *Ela-Kras^{G12D}* pancreata during pancreatitis. Figure S7. N-acetylcysteine treatment reduces the expression of pro-oxidant and pro-inflammatory genes in primary acinar cells from *Ela-Kras^{G12D}* pancreata.

Author Contributions: Conceptualization, P.J. and M.A.; methodology, M.-A.M., M.L., H.D. and M.A.; software, M.-A.M. and M.A.; validation, P.J. and M.A.; formal analysis, M.-A.M., P.J. and M.A.; investigation, M.-A.M., M.L., H.D. and M.A.; data curation, M.-A.M. and M.A.; writing—original draft preparation, M.A.; writing—review and editing, M.-A.M., P.J. and M.A.; visualization, M.-A.M., P.J. and M.A.; supervision, P.J. and M.A.; project administration, P.J. and M.A.; funding acquisition, P.J. and M.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Belgian National Fund for Scientific Research. Grant (n°1. B.017.19F) was given to M.A. and grants from the Foundation for Cancer Research (#2018-076) and Télévie (#7.8515.18) were given to P.J. The article processing charges (APC) was funded by the de Duve Institute.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by animal welfare committee of the University of Louvain Medical School (ethic number: 2017/UCL/MD/020). For human material, the medical ethical committee of the Vrije Universiteit Brussel Hospital approved the use of donor pancreata (ethic approval number: B.U.N. 143201732606).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: RNA-SEQ data can be downloaded from the gene expression omnibus (GEO database using the following accession numbers: GSE163254 and GSE163263.

Acknowledgments: The authors thank Jean-Nicolas Lodewyckx for technical assistance, Margaux Wulleman for genotyping and providing *Ela-Kras^{G12D}* mice, and Luc Bouwens for providing human pancreas material. M.A.-M. holds a PhD fellowship from Télévie (#7.6509.20). P.J. is senior research associate at the National Fund for Scientific Research, Belgium. M.A. is a research scholar at the National Fund for Scientific Research, Belgium.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Habtezion, A.; Gukovskaya, A.S.; Pandol, S.J. Acute Pancreatitis: A Multifaceted Set of Organelle and Cellular Interactions. *Gastroenterology* **2019**, *156*, 1941–1950. [CrossRef]
2. Garg, P.K.; Singh, V.P. Organ Failure Due to Systemic Injury in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* **2019**, *156*, 2008–2023. [CrossRef]
3. Saluja, A.; Maitra, A. Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **2019**, *156*, 1937–1940. [CrossRef]
4. Tuveson, D.A.; Shaw, A.T.; Willis, N.A.; Silver, D.P.; Jackson, E.L.; Chang, S.; Mercer, K.L.; Grochow, R.; Hock, H.; Crowley, D.; et al. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* **2004**, *5*, 375–387. [CrossRef]
5. Hingorani, S.R.; Petricoin, E.F.; Maitra, A.; Rajapakse, V.; King, C.; Jacobetz, M.A.; Ross, S.; Conrads, T.P.; Veenstra, T.D.; Hitt, B.A.; et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **2003**, *4*, 437–450. [CrossRef]
6. Guerra, C.; Schuhmacher, A.J.; Canamero, M.; Grippo, P.J.; Verdaguer, L.; Perez-Gallego, L.; Dubus, P.; Sandgren, E.P.; Barbacid, M. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 291–302. [CrossRef] [PubMed]
7. Chio, I.I.C.; Jafarnejad, S.M.; Ponz-Sarvise, M.; Park, Y.; Rivera, K.; Palm, W.; Wilson, J.; Sangar, V.; Hao, Y.; Ohlund, D.; et al. NRF2 Promotes Tumor Maintenance by Modulating mRNA Translation in Pancreatic Cancer. *Cell* **2016**, *166*, 963–976. [CrossRef]
8. Cheung, E.C.; DeNicola, G.M.; Nixon, C.; Blyth, K.; Labuschagne, C.F.; Tuveson, D.A.; Vousden, K.H. Dynamic ROS Control by TIGAR Regulates the Initiation and Progression of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **2020**, *37*, 168–182.e4. [CrossRef] [PubMed]
9. Bansod, S.; Chilvery, S.; Saifi, M.A.; Das, T.J.; Tag, H.; Godugu, C. Borneol protects against cerulein-induced oxidative stress and inflammation in acute pancreatitis mice model. *Environ. Toxicol.* **2021**, *36*, 530–539. [CrossRef]
10. Hagar, H.H.; Almubrik, S.A.; Attia, N.M.; Aljasser, S.N. Mesna Alleviates Cerulein-Induced Acute Pancreatitis by Inhibiting the Inflammatory Response and Oxidative Stress in Experimental Rats. *Dig. Dis. Sci.* **2020**, *65*, 3583–3591. [CrossRef]
11. Mathan Kumar, M.; Tamizhselvi, R. Protective effect of diallyl disulfide against cerulein-induced acute pancreatitis and associated lung injury in mice. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *80*, 106136. [CrossRef]

12. Chen, W.; Yuan, C.; Lu, Y.; Zhu, Q.; Ma, X.; Xiao, W.; Gong, W.; Huang, W.; Xia, Q.; Lu, G.; et al. Tanshinone IIA Protects against Acute Pancreatitis in Mice by Inhibiting Oxidative Stress via the Nrf2/ROS Pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 5390482. [CrossRef]
13. Huang, C.F.; Yang, C.Y.; Tsai, J.R.; Wu, C.T.; Liu, S.H.; Lan, K.C. Low-dose tributyltin exposure induces an oxidative stress-triggered JNK-related pancreatic beta-cell apoptosis and a reversible hypoinsulinemic hyperglycemia in mice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5734. [CrossRef] [PubMed]
14. Urbano, F.; Bugliani, M.; Filippello, A.; Scamporrino, A.; Di Mauro, S.; Di Pino, A.; Scicali, R.; Noto, D.; Rabuazzo, A.M.; Averna, M.; et al. Atorvastatin but Not Pravastatin Impairs Mitochondrial Function in Human Pancreatic Islets and Rat beta-Cells. Direct Effect of Oxidative Stress. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11863. [CrossRef]
15. Cappelli, A.P.G.; Zoppi, C.C.; Silveira, L.R.; Batista, T.M.; Paula, F.M.; da Silva, P.M.R.; Rafacho, A.; Barbosa-Sampaio, H.C.; Boschero, A.C.; Carneiro, E.M. Reduced glucose-induced insulin secretion in low-protein-fed rats is associated with altered pancreatic islets redox status. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 486–496. [CrossRef]
16. Lee, J.; Lim, J.W.; Kim, H. Lycopene Inhibits Oxidative Stress-Mediated Inflammatory Responses in Ethanol/Palmitoleic Acid-Stimulated Pancreatic Acinar AR42J Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2101. [CrossRef]
17. Houbracken, I.; de Waele, E.; Lardon, J.; Ling, Z.; Heimberg, H.; Rooman, I.; Bouwens, L. Lineage tracing evidence for transdifferentiation of acinar to duct cells and plasticity of human pancreas. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 731–741.e4. [CrossRef] [PubMed]
18. Desai, B.M.; Oliver-Krasinski, J.; De Leon, D.D.; Farzad, C.; Hong, N.; Leach, S.D.; Stoffers, D.A. Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet beta cell, regeneration. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 971–977. [CrossRef]
19. Qu, C.; Konieczny, S.F. Pancreatic Acinar Cell 3-Dimensional Culture. *Bio-Protocol* **2013**, *3*. [CrossRef] [PubMed]
20. Assi, M.; Derbre, F.; Lefeuvre-Orfila, L.; Saligaut, D.; Stock, N.; Ropars, M.; Rebillard, A. Maintaining a regular physical activity aggravates intramuscular tumor growth in an orthotopic liposarcoma model. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 1037–1053.
21. Buckens, H.; Pirenne, S.; Achouri, Y.; Baldan, J.; Dahou, H.; Bouwens, L.; Lemaigre, F.P.; Jacquemin, P.; Assi, M. Peroxiredoxin-I sustains inflammation during pancreatitis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**. [CrossRef]
22. Assi, M.; Kenawi, M.; Ropars, M.; Rebillard, A. Interleukin-6, C/EBP-beta and PPAR-gamma expression correlates with intramuscular liposarcoma growth in mice: The impact of voluntary physical activity levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *490*, 1026–1032. [CrossRef] [PubMed]
23. Assi, M.; Dauguet, N.; Jacquemin, P. DIE-RNA: A Reproducible Strategy for the Digestion of Normal and Injured Pancreas, Isolation of Pancreatic Cells from Genetically Engineered Mouse Models and Extraction of High Quality RNA. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 129. [CrossRef] [PubMed]
24. Langmead, B.; Nellore, A. Cloud computing for genomic data analysis and collaboration. *Nat. Rev. Genet.* **2018**, *19*, 325. [CrossRef] [PubMed]
25. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 357–359. [CrossRef] [PubMed]
26. Kim, D.; Pertea, G.; Trapnell, C.; Pimentel, H.; Kelley, R.; Salzberg, S.L. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **2013**, *14*, R36. [CrossRef]
27. Trapnell, C.; Williams, B.A.; Pertea, G.; Mortazavi, A.; Kwan, G.; van Baren, M.J.; Salzberg, S.L.; Wold, B.J.; Pachter, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 511–515. [CrossRef] [PubMed]
28. Xie, C.; Mao, X.; Huang, J.; Ding, Y.; Wu, J.; Dong, S.; Kong, L.; Gao, G.; Li, C.Y.; Wei, L. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, W316–W322. [CrossRef]
29. Assi, M.; Achouri, Y.; Loriot, A.; Dauguet, N.; Dahou, H.; Baldan, J.; Libert, M.; Fain, J.S.; Guerra, C.; Bouwens, L.; et al. Dynamic regulation of expression of KRAS and its effectors determines the ability to initiate tumorigenesis in pancreatic acinar cells. *Cancer Res.* **2021**. [CrossRef]
30. Lubos, E.; Loscalzo, J.; Handy, D.E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 1957–1997. [CrossRef]
31. Sevillano, S.; de Dios, I.; de la Mano, A.M.; Manso, M.A. N-acetylcysteine induces beneficial changes in the acinar cell cycle progression in the course of acute pancreatitis. *Cell Prolif.* **2003**, *36*, 279–289. [CrossRef] [PubMed]
32. Sevillano, S.; De la Mano, A.M.; De Dios, I.; Ramudo, L.; Manso, M.A. Major pathological mechanisms of acute pancreatitis are prevented by N-acetylcysteine. *Digestion* **2003**, *68*, 34–40. [CrossRef] [PubMed]
33. Sevillano, S.; de la Mano, A.M.; Manso, M.A.; Orfao, A.; De Dios, I. N-acetylcysteine prevents intra-acinar oxygen free radical production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1639*, 177–184. [CrossRef]
34. Demols, A.; Van Laethem, J.L.; Quertinmont, E.; Legros, F.; Louis, H.; Le Moine, O.; Deviere, J. N-acetylcysteine decreases severity of acute pancreatitis in mice. *Pancreas* **2000**, *20*, 161–169. [CrossRef]
35. Esrefoglu, M.; Gul, M.; Ates, B.; Batcioglu, K.; Selimoglu, M.A. Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. *World J. Gastroenterol.* **2006**, *12*, 259–264. [CrossRef]
36. Douiev, L.; Soiferman, D.; Alban, C.; Saada, A. The Effects of Ascorbate, N-Acetylcysteine, and Resveratrol on Fibroblasts from Patients with Mitochondrial Disorders. *J. Clin. Med.* **2016**, *6*. [CrossRef]

37. Whillier, S.; Raftos, J.E.; Chapman, B.; Kuchel, P.W. Role of N-acetylcysteine and cystine in glutathione synthesis in human erythrocytes. *Redox Rep.* **2009**, *14*, 115–124. [CrossRef]
38. Yang, Y.; Bazhin, A.V.; Werner, J.; Karakhanova, S. Reactive oxygen species in the immune system. *Int. Rev. Immunol.* **2013**, *32*, 249–270. [CrossRef]
39. Dagenais, A.; Frechette, R.; Yamagata, Y.; Yamagata, T.; Carmel, J.F.; Clermont, M.E.; Brochiero, E.; Masse, C.; Berthiaume, Y. Downregulation of ENaC activity and expression by TNF-alpha in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2004**, *286*, L301–L311. [CrossRef]
40. Petrache, I.; Birukova, A.; Ramirez, S.I.; Garcia, J.G.; Verin, A.D. The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2003**, *28*, 574–581. [CrossRef] [PubMed]
41. Yang, G.; Hamacher, J.; Gorshkov, B.; White, R.; Sridhar, S.; Verin, A.; Chakraborty, T.; Lucas, R. The Dual Role of TNF in Pulmonary Edema. *J. Cardiovasc. Dis. Res.* **2010**, *1*, 29–36. [CrossRef] [PubMed]
42. Cobo, I.; Martinelli, P.; Flandez, M.; Bakiri, L.; Zhang, M.; Carrillo-de-Santa-Pau, E.; Jia, J.; Sanchez-Arevalo Lobo, V.J.; Megias, D.; Felipe, I.; et al. Transcriptional regulation by NR5A2 links differentiation and inflammation in the pancreas. *Nature* **2018**, *554*, 533–537. [CrossRef] [PubMed]
43. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.C. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*. [CrossRef] [PubMed]
44. Luo, J.; Xiang, Y.; Xu, X.; Fang, D.; Li, D.; Ni, F.; Zhu, X.; Chen, B.; Zhou, M. High Glucose-Induced ROS Production Stimulates Proliferation of Pancreatic Cancer via Inactivating the JNK Pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 6917206. [CrossRef]
45. Karelia, D.N.; Kim, S.; K Pandey, M.; Plano, D.; Amin, S.; Lu, J.; Sharma, A.K. Novel Seleno-Aspirinyl Compound AS-10 Induces Apoptosis, G1 Arrest of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells, Inhibits Their NF-kappaB Signaling, and Synergizes with Gemcitabine Cytotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*. [CrossRef]
46. Yi, S.Y.; Tae, J.H. Pancreatic abscess following scrub typhus associated with multiorgan failure. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 3523–3525. [CrossRef]
47. Qi, Q.; Ailiyaer, Y.; Liu, R.; Zhang, Y.; Li, C.; Liu, M.; Wang, X.; Jing, L.; Li, Y. Effect of N-acetylcysteine on exacerbations of bronchiectasis (BENE): A randomized controlled trial. *Respir. Res.* **2019**, *20*, 73. [CrossRef]

3. L'inactivation génétique de la péroxirédoxine-I entrave la croissance des cellules cancéreuses pancréatiques humaines

Dans l'article intitulé "*Genetic inactivation of peroxiredoxin-I impairs the growth of human pancreatic cancer cells*", j'ai contribué à générer les échantillons de tumeurs des souris *Elastase-CreER ; Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$ *; TP53*$^{LSL\text{-}R172H}$ utilisés pour mettre en évidence la présence de la péroxirédoxine I dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique (Figure 1). J'ai également contribué aux expériences de révision.

antioxidants

MDPI

Article

Genetic Inactivation of Peroxiredoxin-I Impairs the Growth of Human Pancreatic Cancer Cells

Hajar Dahou, Marie-Albane Minati, Patrick Jacquemin * and Mohamad Assi *

De Duve Institute, Université Catholique de Louvain, 1200 Brussels, Belgium; hajar.dahou@uclouvain.be (H.D.); marie-albane.minati@uclouvain.be (M.-A.M.)

* Correspondence: patrick.jacquemin@uclouvain.be (P.J.); m.assi@uclouvain.be (M.A.); Tel.: +32-2764-75-31 (P.J. & M.A.)

Abstract: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an aggressive disease with few therapeutic options. The identification of new promising targets is, therefore, an urgent need. Using available transcriptomic datasets, we first found that *Peroxiredoxin-1* gene (*PRDX1*) expression was significantly increased in human pancreatic tumors, but not in the other gastrointestinal cancers; its high expression correlated with shortened patient survival. We confirmed by immunostaining on mouse pancreata the increased Peroxiredoxin-I protein (PRX-I) expression in pancreatic neoplastic lesions and PDAC. To question the role of PRX-I in pancreatic cancer, we genetically inactivated its expression in multiple human PDAC cell lines, using siRNA and CRISPR/Cas9. In both strategies, PRX-I ablation led to reduced survival of PDAC cells. This was mainly due to an increase in the production of reactive oxygen species (ROS), accumulation of oxidative DNA damage (i.e., 8-oxoguanine), and cell cycle blockade at G2/M. Finally, we found that PRX-I ablation disrupts the autophagic flux in PDAC cells, which is essential for their survival. This proof-of-concept study supports a pro-oncogenic role for PRX-I in PDAC.

Keywords: antioxidants; autophagy; cell cycle; pancreatic cancer; ROS

check for updates

Citation: Dahou, H.; Minati, M.-A.; Jacquemin, P.; Assi, M. Genetic Inactivation of Peroxiredoxin-I Impairs the Growth of Human Pancreatic Cancer Cells. *Antioxidants* **2021**, *10*, 570. https://doi.org/10.3390/antiox10040570

Academic Editor: Hyun-Shik Lee

Received: 10 March 2021
Accepted: 6 April 2021
Published: 8 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) remains one of the deadliest cancers in the world, with few, if any, efficient treatments. The 5-year survival rate for PDAC is 6–9%, and its incidence (+77%) and mortality (+79%) are continuously increasing [1], highlighting the unmet need for new therapeutic strategies. During the past decade, genetically engineered mouse models (GEMM), phenocopying human malignancies, unveiled mechanisms underlying PDAC development [2,3]. In the presence of *Kirsten rat sarcoma* (*Kras)* mutations and pancreatitis (inflammation of the pancreas), pancreatic acinar cells undergo acinar-to-ductal metaplasia (ADM), eventually leading to the formation of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and PDAC [4,5]. Cholecystokinin plays a key role in driving PDAC by promoting pancreas inflammation [6,7]; cerulein, a cholecystokinin analog, is frequently used to induce experimental pancreatitis and accelerate PDAC development [4]. In addition, cholecystokinin and other hormones such as secretin shape pancreas function by regulating endocrine and nervous pathways [8].

At the molecular level, emerging research revealed the presence of redox-sensitive mechanisms essential for the maintenance of PDAC growth [9,10]. These include the modulation of reactive oxygen species (ROS) levels, and the control of the expression and activity of the redox master regulator, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), as well as other important antioxidant enzymes [9,10]. On this basis, Peroxiredoxins (PRXs) constitute an important checkpoint for tumor development and growth [11], as they regulate the intracellular levels of various ROS (i.e., hydrogen peroxide) and influence the activation of pro-oncogenic signaling cascades, such as Extracellular signal-regulated kinases/mitogen-

activated protein kinases (ERK/MAPK) and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK/STAT3) [12].

Typical 2-cysteines (2-Cys) PRX-I, -II, -III, and -IV are homodimeric enzymes that possess a high catalytic efficiency (10^7 M^{-1} s^{-1}) at the peroxidatic cysteine site [13]; their implication in the pathophysiology of cancer has been previously reported [12]. Yet, the role of PRX-I in cancer development is still a subject of debate. Cell culture and rodent models have shown that PRX-I promotes the development of lung cancer in the presence of the oncogenic protein Kirsten rat sarcoma ($KRAS^{G12D}$) [14], whereas it represses Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog ($HRAS^{G12V}$)-driven liver tumor growth [15]. Therefore, the role of PRX-I appears to be organ- and context-specific. In the pancreas, the role of PRX-I is not clearly elucidated. However, our results and that of others suggest a pro-oncogenic role for PRX-I in PDAC [16,17]. In support of these previous results, we found that *Peroxiredoxin-1* mRNA was significantly upregulated in human pancreatic tumors and that its high expression correlated with shortened patient survival (Figure 1A,B). To study the functional role of PRX-I, we used molecular and redox biology techniques on human PDAC cell lines. Our present results support a pro-oncogenic role for PRX-I in PDAC.

2. Materials and Methods

2.1. Mice and Ethical Approval

All procedures described were approved by the animal welfare committee of the University of Louvain Medical School (ethic number: 2017/UCL/MD/020). Three *ElastaseCreER-LSL$Kras^{G12D}$-$p53^{R172H}$* (*KPE*) male mice of 30 to 35 g (total body weight) were maintained in a CD1-enriched background. *ElaCreER*, *LSL-$Kras^{G12D}$*, and *$p53^{R172H}$* mice have been described previously [3,18,19]; these mice were bred in our animal facility to obtain a *KPE* background. Adult *KPE* mice (6-weeks-old) were first treated with tamoxifen (30 mg/mL in corn oil) by oral gavage (T5648-1G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) and 4-hydroxytamoxifen (0.3 mg/mL in corn oil) by subcutaneous injection (H7904-25 mg, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) to recombine the LSL stop cassettes and allow the expression of *$Kras^{G12D}$* and *$p53^{R172H}$* from their respective endogenous locus. Next, mice received intraperitoneal injections of cerulein (100–150 µL in phosphate-buffered saline, PBS) (125 µg/Kg; 24252, Eurogentec, Seraing, Belgium) for 6 weeks to induce pancreas inflammation, and were then kept for 14 weeks to allow tumor development. Detailed information regarding the used tamoxifen and cerulein regimens can be found in Figure S1. Mice were sacrificed at 28-weeks-old by cervical dislocation, and pancreata were collected to analyze PRX-I expression by immunohistochemistry. Three untreated age- and sex-matched *wild-type* mice (without cerulein treatment) were used as controls to assess the basal expression of PRX-I in the normal pancreas.

2.2. Cell Lines, Small Interfering RNA (siRNA) Transfections and Pharmacological Treatments

PANC-1 cells (CRL-1469, ATCC, Manassas, VA, USA) were maintained in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (61965026, Life Technologies, Merelbeke, Belgium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (F9665-500ML, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium), 1% penicillin-streptomycin (15070063, Life Technologies, Merelbeke, Belgium) and 1% sodium pyruvate (11360070, Life Technologies, Merelbeke, Belgium). MIAPaca-2 cells (CRL-1420, ATCC, Manassas, VA, USA) were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, and 2% horse serum (16050130, Life Technologies, Merelbeke, Belgium). HPAF-II cells (CRL-1997, ATCC, Manassas, VA, USA) were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, and 1% penicillin-streptomycin. All cell lines were cultured at 37 °C and 5% CO_2. For siRNA transfection experiments, 7×10^4 cells were plated overnight in a 6-well plate. Cells were transfected with 100 nM of scramble siRNA (D-001810-10-05, Dharmacon, Waterbeach, UK) or a pool of 4 different siRNA targeting *Peroxiredoxin-1* gene (*PRDX1*) (L-010338-00-0005, Dharmacon, Waterbeach, UK), or *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* gene (*NRF2*) (L-003755-00-0005, Dharmacon, Waterbeach, UK), using the jetPRIME® transfection reagent (114-15, VWR,

Leuven, Belgium). One day later, the transfection medium was removed, and cells were incubated for two additional days with fresh media. After 3 days of transfection, cells were re-transfected a second time with the same abovementioned settings and kept in culture for 3 additional days (total of 6 days). Cells were then collected to assess survival or for protein extraction. In select experiments, 3×10^4 cells were plated per well in a 24-well plate and let grow for 2 days. Then, cells were treated with Stattic (2798/10, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) or chloroquine (C6628-25G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) for 24 h.

To generate a stable PANC-1 cell line, we used clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) technology as described previously [20]. Briefly, two specific single-guide RNA (sgRNA) (IDT, Coralville, IA, USA) were used to knockout *PRDX1* (sgRNA1: Forward: 5′-CACCGTCAGGTATTCCTAATGCA CC-3′; Reverse: 5′-AAACGGTGCATTAGGAATACCTGAC-3′) and (sgRNA2: Forward: 5′-CACCGATCTAGCATGGTAAATCTCT-3′; Reverse: 5′-AAACAGAGATTTACCATGCTAG ATC-3′). The sgRNA was cloned into a GFP-expressing plasmid (48138, Addgene, Watertown, MA, USA) and then transfected into PANC-1 cells. After 24 h, GFP-positive cells were sorted by FACSAria III (BD Bioscience, Erembodegem, Belgium), and individual single cells were placed in wells of a 96-well plate (Fluorescence-activated cell sorting (FACS)-sorting settings were as described previously [21]). After three weeks of culture, clones were genotyped, and PRX-I protein ablation was confirmed by Western blot.

2.3. Cell Counting and Crystal Violet Staining

Cell growth-rate was measured by crystal violet (C6158, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium). This method allows the assessment of cellular cytotoxicity following a genetic or pharmacological treatment. After treatment, living cells remain adherent to the well and can be stained with crystal violet who binds ribose molecules on DNA. The number of cells stained positively with crystal violet is proportional to the number of living cells. First, cells were fixed with a solution of 10% methanol (20847.307, VWR, Leuven, Belgium) and 10% acetic acid (84874.290, VWR, Leuven, Belgium) for 15 min at room temperature (RT). Then, the plate was dried and stained with 0.5% crystal violet solution for 15 min at RT. Finally, the plate was washed three times with tap water and let dry. The next day, absorbance was measured at 595 nm by adding 10% acetic acid solution into each well. In select experiments, cells were dissociated with trypsin (25050-014, Life Technologies, Merelbeke, Belgium), and the number of cells was estimated using the automated counter TC20™ (Bio-Rad, Temse, Belgium).

2.4. Cell Cycle Analysis

Cell cycle analysis can be performed using DNA-binding dyes like propidium iodide. The dye binds in proportion to the amount of DNA present in the cell. For example, cells in the S and G2 phases, which have more DNA, take up more dye and fluoresce more brightly than cells in the G1 phase. Therefore, dye's fluorescence intensity allows the separation of cells depending on their cell cycle phase (mild fluorescence: G0/G1, moderate fluorescence: S, and high fluorescence: G2/M). To assess the cell cycle, cells were plated at 1×10^5 cells/well in a 6-well plate. After 2 days, cells were dissociated with trypsin and pelleted by centrifugation at 1200 rpm for 5 min. After washing in PBS (14190094, Life Technologies, Merelbeke, Belgium), cells were fixed with 70% cold ethanol (1.00983.1000, VWR, Leuven, Belgium). After centrifugation, ethanol-fixed cells were resuspended with staining buffer (0.1% Triton X-100 (3051.3, Carl Roth, Karlsruhe, Germany), 0.2 mg/mL RNAse (19101, Qiagen, Venlo, The Netherlands), 10 µg/mL propidium iodide (PI) (556463, BD Bioscience, Erembodegem, Belgium), and 1 mM EDTA (04800683, MP Biomedical, Illkirch-Graffenstaden, France), diluted in PBS) for 30 min, at RT. The PI signal was then analyzed by FACSVerse (BD Bioscience, Erembodegem, Belgium) to assess the cell cycle. The percentage of cells in the different cell cycle phases was calculated using the Watson method.

Antioxidants **2021**, *10*, 570

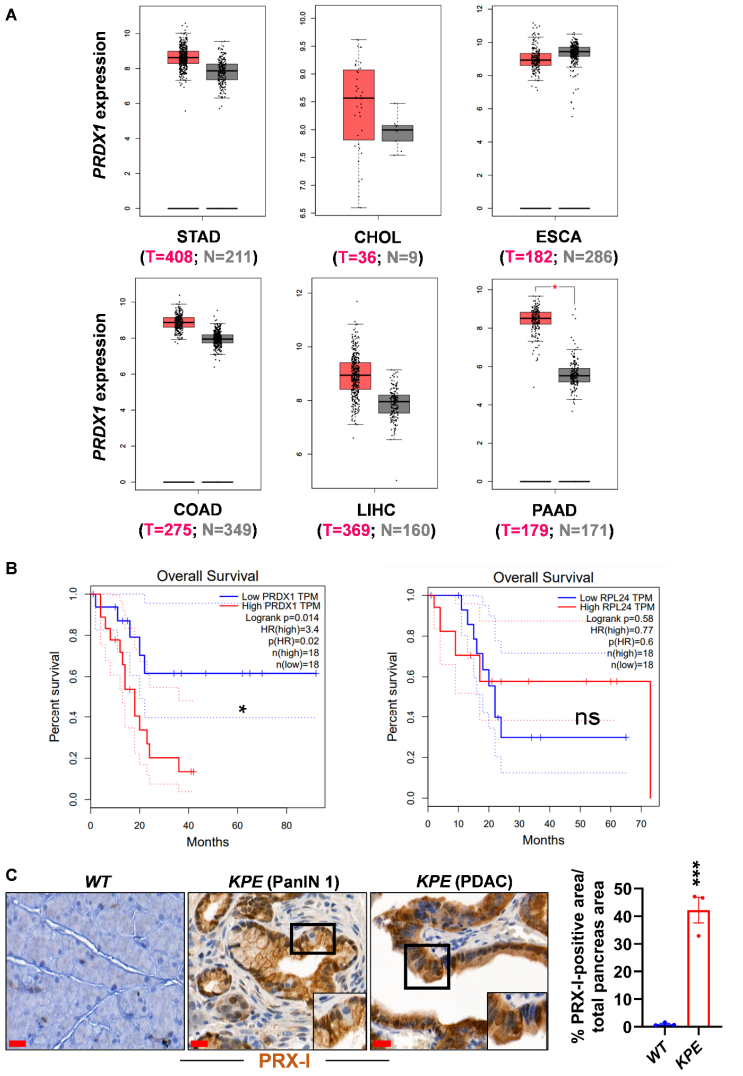


Figure 1. Peroxiredoxin-I (PRX-I) expression is upregulated in pancreatic tumors. (**A**) *Peroxiredoxin-1* gene (*PRDX1*)

expression in the indicated gastrointestinal tumors (pink) and their corresponding normal tissues (grey) available from the GEPIA database. Red asterisk indicates statistical significance. Ordinate scale: Log_2 (TPM + 1) (**B**) Survival curve for *PRDX1*-Low (blue) and *PRDX1*-High (Red) pancreatic cancer cohort from the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) database. Black asterisk indicates statistical significance. ns: not significant. (**C**) Representative images of Peroxiredoxin-I immunostaining on pancreas from *wild-type* (*WT*) mice untreated with cerulein (left panel) and *ElastaseCreER-LSLKras*^{G12D}-*p53*^{R172H} (*KPE*) mice treated with cerulein for six weeks, followed by 14 weeks of recovery to allow tumor formation (middle and right panels). Pancreas sections from *KPE* mice contain pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Bars: 20µm. Whole-tissue quantification of Peroxiredoxin-I protein expression from *WT* (n = 3) and *KPE* (n = 3) mice is presented in the bar graph. Data are mean ± SEM. Statistical significance was tested by Student's t-test (* p<0.05; *** p < 0.001). STAD, stomach adenocarcinoma; CHOL, cholangiocarcinoma; ESCA, esophageal carcinoma; COAD, colon adenocarcinoma; LIHC, liver hepatocellular carcinoma; PAAD, pancreatic adenocarcinoma.

2.5. Reactive Oxygen Species (ROS) Measurements

ROS measurement is usually done using the 2′,7′–dichlorofluorescin diacetate (DCFDA) fluorogenic probe. DCFDA can diffuse to the cells and become deacetylated by cellular esterase to a non-fluorescent compound, which is later oxidized by intracellular ROS into a highly fluorescent compound called 2′,7′–dichlorofluorescin (DCF). To measure ROS, first, cells were plated at 5.5 × 10^4 cells/well in a 6-well plate. After 3 days, cells were washed with PBS and incubated for 45 min with 10 µM DCFDA probe at 37 °C (ab113851, Abcam, Cambridge, UK); similar results were obtained when cells were incubated for 25 min with 5 µM DCFDA probe at 37 °C. Then, cells were washed once with PBS, dissociated with trypsin, and pelleted by centrifugation (1200 rpm, 5 min). Finally, the pellet was resuspended in 1 mL PBS, and DCFDA fluorescence was measured by FACS.

2.6. Western Blot

Cells were lysed in 50 mM Tris-base-HCl (04819638-5kg, MP Biomedical, Illkirch-Graffenstaden, France), 150 mM NaCl (0219484801, MP Biomedical, Illkirch-Graffenstaden, France), and 1% NP40 (I8896-50ML, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) buffer by vortexing and repetitive pipetting. Protease (11836153001, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) and phosphatase (4906837001, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) inhibitors were added just before lysis. Samples were maintained on ice during the procedure. Cell debris were pelleted by centrifugation (14,000× g, 10 min, at 4 °C). Proteins were quantified using a Bradford assay (23200, Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium). Samples containing 15 to 30 µg of total proteins were electrophoresed on 7.5% to 12.5% SDS polyacrylamide gels. Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (ISEQ00010, Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium) were blocked with a solution of 5% low-fat milk diluted in Tris-buffered saline (TBS)/0.1% Tween-20 (P2287-500 mL, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium). Membranes were incubated overnight with primary antibodies at 4 °C. The used antibodies are listed in Table 1. The next day, the membranes were washed with TBS/0.1% Tween-20 and incubated with the secondary antibodies for 1 h, at RT. After incubation, membranes were washed again and revealed using chemiluminescence (kits 34577 and 34094, Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium). Pictures were taken with a Fusion Solo S machine (Vilber, Collégien, France). Densitometric analysis was performed using the Image Studio Lite Ver 5.2 software (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

Table 1. Antibodies used in Western blot experiments. SCB: Santa Cruz Biotechnology, CST: Cell Signaling Technology, SA: Sigma Aldrich, BSA: bovine serum albumin.

Antibody	Reference	Dilution	Conditions
PRX-I	NBP1-82558, BioTechne Minneapolis, MN, USA	1/1000	5% Milk, overnight, 4 °C
PRX-II	Sc-515428, SCB, Heidelberg, Germany	1/500	5% Milk, overnight, 4 °C
P-STAT3^{Y705}	9145S, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	5% BSA, overnight, 4 °C
STAT3	12640S, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	5% BSA, overnight, 4 °C
P-CHK2^{T68}	2197S, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	5% BSA, overnight, 4 °C
CHK2	2662S, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	5% BSA, overnight, 4 °C
P-Cdc25C^{S216}	4901S, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	5% BSA, overnight, 4 °C
p27^{Kip1}	3686S, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	5% BSA, overnight, 4 °C
LC3	12741S, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	5% BSA, overnight, 4 °C
ATG5-ATG12	4180T, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	5% BSA, overnight, 4 °C
ATG7	8558T, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	5% BSA, overnight, 4 °C
ATG16L1	8089T, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	5% BSA, overnight, 4 °C
p62	Sc-28359, SCB, Heidelberg, Germany	1/500	5% Milk, overnight, 4 °C
HSC70	Sc-7298, SCB, Heidelberg, Germany	1/5000	5% Milk, overnight, 4 °C
β-Actin	A5441-100UL, SA, Overijse, Belgium	1/5000	5% Milk, overnight, 4 °C

2.7. Immunofluorescence and Immunohistochemistry

Pancreata were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) (HT501128-4L, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) overnight at 4 °C, with gentle rotation, before paraffin embedding. Six-µm tissue sections were deparaffinized, and antigen retrieval was performed in a microwave using citrate buffer (C1909-500G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) (pH 6.0). Sections were washed with PBS once and then permeabilized with PBS/0.3% Triton-100X for 5 min at RT. Sections were blocked with solution 1 (3% low-fat milk, 5% bovine serum albumin (A906-100G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium), 0.3% Triton-100× in PBS) for 45 min at RT. PRX-I antibody (1/200; NBP1-82558, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) was diluted in solution 1 and incubated overnight at 4 °C. The next day, slides were washed with PBS/0.1% Triton-100X and incubated with secondary antibodies diluted in solution 2 (10% bovine serum albumin, 0.3% Triton-100X) at 37 °C, for 1 h. Slides were scanned using the Oyster Pannoramic 250 Flash III scanner (3DHISTECH, Budapest, Hungary). Images were selected directly from the scans. Whole-tissue quantification for PRX-I staining was performed using the HALO software (Indica Labs, Albuquerque, NM, USA). For cell labeling, cells cultured on coverslips were washed once with PBS and then fixed with 4% PFA for 30 min at RT, as described previously [22]. Then cells were permeabilized, blocked with solution 1, and labeled with Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain (LC3) (1/100; 12741S, Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands) and Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) antibodies (1/100; 1D4B, DSHB, Iowa, IA, USA) at 4 °C overnight. Pictures were taken directly from mounted coverslips using the Axiovert 200 microscope (Zeiss, Zaventem, Belgium) or the cell observer spinning disk confocal microscope (Zeiss, Zaventem, Belgium).

2.8. Detection of 8-Oxoguanine (8-oxoG) Adducts

8-oxoG is the most prevalent oxidative DNA damage induced by ROS that modifies the nucleic acid base guanine. To assess 8-oxoG levels using a specific antibody, cells cultured on coverslips were fixed with cold methanol for 10 min, at RT. Next, cells were treated with RNase solution (5 mg/mL in 10 mM Tris–HCl pH 7.5, 15 mM NaCl) for 1 h, at 37 °C. To denature nuclear DNA, cells were rinsed with distilled water and then dipped successively into solutions of HCl (2 N) (124630010, Life Technologies, Merelbeke, Belgium) and 10 mM Tris–HCl (pH 7.5), 15 mM NaCl, for 10 min each, at RT. Finally, cells were washed twice in PBS, prior to incubation with the primary antibody diluted in solution 1 (1/100; MAB3560, Merck, Overijse, Belgium) overnight at 4 °C. The next day, cells were incubated with a secondary antibody diluted in solution 2, and pictures were taken using a

cell observer spinning disk confocal microscope (Zeiss, Zaventem, Belgium) directly from mounted coverslips.

2.9. Statistical Analysis

Data were presented as means ± standard error of the mean (SEM). Normality and equal variance were checked before performing the statistical analysis. Then, comparisons between the two groups were performed using an unpaired Student's *t*-test. For all statistical analyses, the level of significance was set at $p < 0.05$. Analyses were performed using SigmaStat (version 3.1, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) and GraphPad Prism software (version 8, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3. Results and Discussion

3.1. PRX-I Expression Is Induced during Pancreatic Carcinogenesis

To assess the expression of PRX-I in tumor tissues, we first used human transcriptomic data available at the GEPIA database (Gene Expression Profiling Interactive Analysis; http://gepia.cancer-pku.cn; accessed on 15 January 2021) to compare *PRDX1* mRNA expression in six different gastrointestinal cancers with their respective normal tissues. Among cancers related to the esophagus, stomach, liver, colon, and pancreas, the expression of *PRDX1* was only significantly increased in the latter (Figure 1A); we noted that the number of patients available in the cholangiocarcinoma cohort is limited and that a bigger number of patients is needed to confirm that *PRDX1* expression is unchanged between tumoral and normal tissues. We then focused on the pancreatic cancer cohort and separated patients into two groups based on the levels of intratumor *PRDX1* expression: *PRDX1*-High and *PRDX1*-Low (cut-off High 90% and cut-off Low 10%). The *PRDX1*-Low group exhibited a significantly better overall survival compared to the *PRDX1*-High group (Figure 1B). We found no changes in overall survival when we applied the same cut-off settings to another ubiquitously expressed gene, *ribosomal protein L24* (*RPL24*), thus highlighting the specific effect of *PRDX1* expression on patient survival (Figure 1B).

We confirmed the selective increase in PRX-I protein expression by immunohistochemistry in mouse PanIN and PDAC compared to normal pancreatic cells (Figure 1C). Whole-tissue quantification revealed that only 0.96% ± 0.33% of normal pancreas area was stained positively for PRX-I in *WT* mice, compared to 42% ± 4.67% of PRX-I-positive pancreas area in *KPE* mice (Figure 1C), indicating that almost all normal pancreatic cells do not express PRX-I and that its expression is selectively increased in pancreatic cells undergoing tumorigenesis (neoplastic or tumoral stage). Our observations are in line with a clinical report showing increased PRX-I expression in human PDAC samples [23]. Our data indicate that among different gastrointestinal cancers, PRX-I is particularly upregulated in mouse and human pancreas undergoing tumorigenesis.

3.2. Genetic Ablation of PRX-I Induces a Prooxidant Response Leading to Cell Cycle Blockade and Reduced Growth of Human PDAC Cells

Few functional studies have assessed the role of PRX-I in PDAC. Although a previous study found that PRX-I promotes the invasiveness of PDAC cells [17], the impact of PRX-I on their redox biology and cell growth remains unknown. To determine the role of PRX-I, we knocked-down its expression in various human PDAC cell lines using a pool of four different siRNA. A reduction of around 80% in PRX-I expression was observed in the different cell lines (Figure 2A and Figure S2A). Crystal violet experiments revealed that PRX-I knockdown significantly reduced cell growth in PANC-1 (−35% ± 5.8%), MIAPaca-2 (−25% ± 3.2%), and HPAFII (−12% ± 1.8%) cells (Figure 2B,C). Among essential signaling pathways, including ERK/MAPK and JAK/STAT3, the knockdown of PRX-I only hampered the activation of STAT3, as evidenced by the reduced levels of phospho-STAT3^{Y705} (Figure 2D). Treatment of PDAC cells with Stattic, a STAT3 inhibitor, also reduced PDAC cell growth in a dose-dependent manner (Figure 2E). A recent study showed that the

Antioxidants **2021**, *10*, 570

induction of intracellular ROS reduces STAT3 activation and promotes cytotoxic effects in PDAC cells [24]. In an independent study, we have also found that PRX-I expression correlates with STAT3 activity in the injured mouse pancreas [16]. These studies suggest that the presence of an antioxidant system, buffering ROS levels, maintains an optimal STAT3 activity.

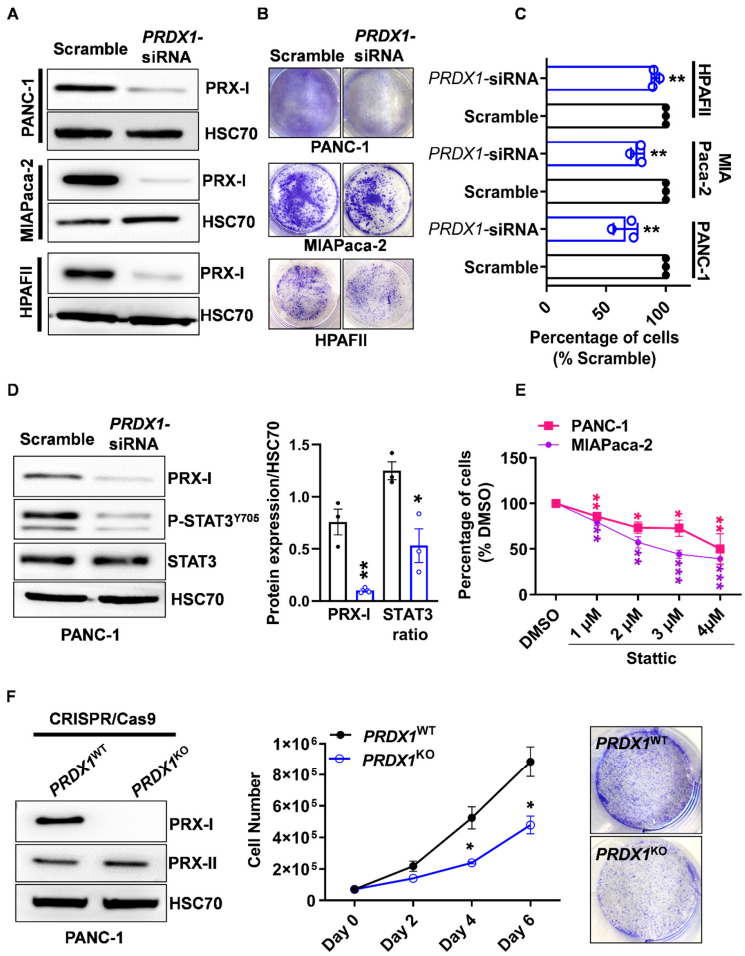


Figure 2. Peroxiredoxin-I (PRX-I) ablation reduces the growth of human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells.

(**A**) Representative Western blot results for PRX-I on multiple human PDAC cell lines transfected for six days with scramble or specific *Peroxiredoxin-1* gene (*PRDX1*)-siRNA. Heat-shock cognate 70 (HSC70) was used as a loading control. On each cell line, siRNA transfection was performed on three independent culture passages (n = 3) (**B**) Representative crystal violet staining for PDAC cell lines after six days of transfection with scramble or specific *PRDX1*-siRNA. (**C**) Determination of cell percentages from experiments shown in panel B (n = 3). The percentage in the scramble conditions was considered to be 100%. (**D**) Western blot on PANC-1 cells after transfection with scramble or specific *PRDX1*-siRNA; Western blots were performed on three independent culture passages (n = 3). The corresponding densitometric quantification for blots in Panel D is also available (right panel) (n = 3). The signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) ratio is Phospho-STAT3^{Y705}/STAT3 normalized to HSC70. (**E**) Determination of cell percentages in PANC-1 and MIAPaca-2 cell lines, by crystal violet staining, after 24 h of DMSO (0.04%, considered 100%) or Stattic treatment; Pharmacological treatment was performed on four independent culture passages (n = 4). (**F**) Western blot on stable PANC-1 cell lines expressing (*PRDX1*^{WT}) or completely lacking (*PRDX1*^{KO}) PRX-I expression; experiments were performed on at least three independent culture passages (n = 3). Quantification of *PRDX1*^{WT} and *PRDX1*^{KO} cells was determined at different time points using an automated cell counter; counting was performed on three independent culture passages (n = 3). Representative pictures of crystal violet staining showing a lower number of cells after six days of culture in the *PRDX1*^{KO} line. Data are mean ± SEM. Statistical significance was tested by Student t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Our present data support the previous findings and strongly suggest that the antioxidant enzyme PRX-I promotes cell growth, at least partly, via the activation of STAT3 pathway. We then focused on the PANC-1 cell line, which has the advantage of being widely used in PDAC research. In line with previous reports [25], we first found that PRX-I expression was controlled by the transcription factor NRF2, as the knockdown of the latter resulted in reduced PRX-I protein expression (Figure S3). We then used CRISPR/Cas9 technology to generate a stable PANC1 cell line that completely lacks PRX-I protein expression (*PRDX1*^{KO}) but not PRX-II (Figure 2F and Figure S2B). We confirmed that PRX-I deficiency caused a 50% reduction in cell growth after six days of culture (Figure 2F).

To test if PRX-I ablation reduced cell growth by affecting cell cycle progression, we performed FACS analysis and found that 36.0% ± 0.8% of *PRDX1*^{KO} cells were in the G2/M phase compared to 15.5% ± 1.5% in *PRDX1*^{WT} cells (Figure 3A). In addition, a decrease in the percentage of mitotic cells positive for phospho-histone 3 (pH3) was observed in the *PRDX1*^{KO} background (Figure 3B). G2/M blockade is associated with increased levels of phospho-checkpoint kinase 2 (P-CHK-2), phospho- M-phase inducer phosphatase 3 (P-Cdc25c; a target of CHK-2), and p27^{Kip1}, and can reflect the presence of excessive DNA damage [26]; all abovementioned markers were significantly upregulated in *PRDX1*^{KO} compared to *PRDX1*^{WT} cells (Figure 3C). Our data indicate that inhibition of PRX-I leads to G2/M blockade in PDAC cells.

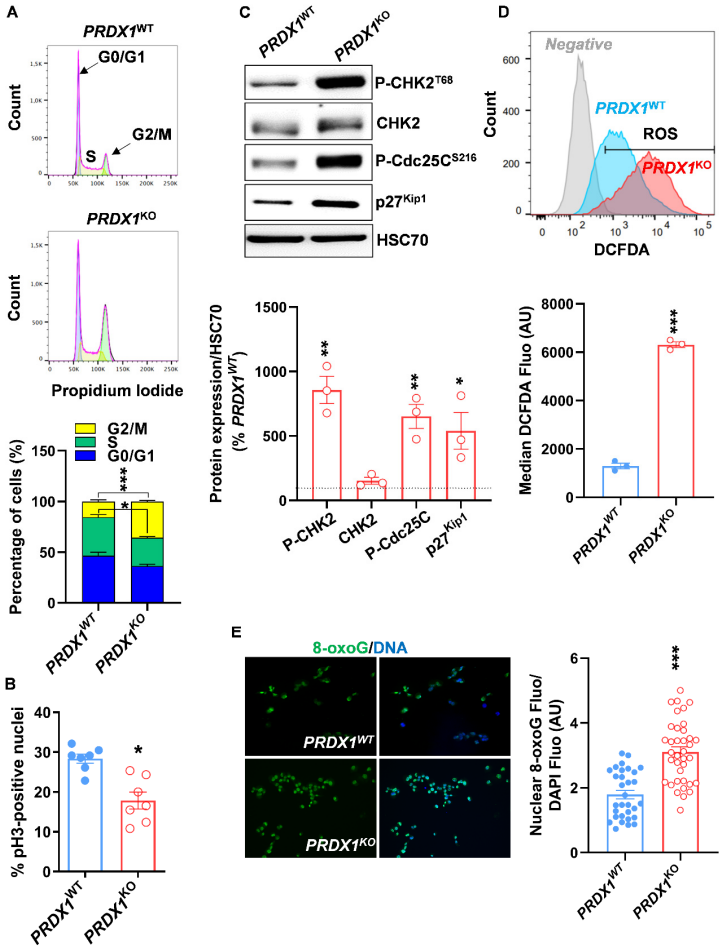


Figure 3. Peroxiredoxin-I (PRX-I) ablation causes oxidative DNA damages and cell cycle blockade in human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells. (**A**) Typical plots from fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of cell cycle in *PRDX1*^{WT} and *PRDX1*^{KO} cells and the corresponding quantification; cell cycle analysis was performed on four independent culture passages (n = 4). (**B**) Percentage of phospho-histone 3 (pH3)-positive nuclei quantified on immunolabeled *PRDX1*^{WT} and *PRDX1*^{KO} cells; immunolabeling was performed on three independent culture passages (n = 3), and seven fields were randomly selected from the three experiments for pH 3 quantification. (**C**) Western blot for DNA damage markers and their

corresponding densitometric quantification. Heat-shock cognate 70 (HSC70) was used as a loading control; blots were performed on three independent culture passages (n = 3). The dashed line, set at 100%, represents the expression level in $PRDX1^{WT}$ cells. (**D**) Typical plot for FACS analysis of DCFDA fluorescence (Reactive Oxygen Species, ROS levels) in $PRDX1^{WT}$ and $PRDX1^{KO}$ cells and the corresponding quantification. AU: Arbitrary Units. Measurements were performed on three independent culture passages using 10 µM of DCFDA (n = 3) or 5µM DCFDA (n = 3). Both DCFDA doses (5 and 10 µM) gave similar results. (**E**) Representative images of 8-oxoguanine (8-oxoG) nuclear immunolabeling in $PRDX1^{WT}$ and $PRDX1^{KO}$ cells; experiments were performed on two independent culture passages (n = 2), and nuclear 8-oxoG fluorescence intensity was quantified in 31-to-37 nuclei selected randomly. Specific nuclear 8-oxoG fluorescence was normalized to DAPI fluorescence. Data are mean ± SEM. Statistical significance was tested by Student's t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Since oxidative DNA damages can lead to G2/M blockade [27], we first measured the intracellular levels of ROS by FACS. We observed a five-fold increase in intracellular ROS production in $PRDX1^{KO}$ compared to $PRDX1^{WT}$ cells (Figure 3D), which is in line with previous research [14]. Then we measured the oxidative DNA damage marker 8-oxoguanine (8-OxoG). As expected, we found significantly higher levels of 8-OxoG in $PRDX1^{KO}$ compared to $PRDX1^{WT}$ cells (Figure 3E). Interestingly, the treatment with different doses of N-Acetylcysteine (NAC) did affect the percentage of cells in the S and G2/M phases in both $PRDX1^{WT}$ and $PRDX1^{KO}$ cells, indicating that the damages caused by PRX-I loss are not reversible by generic antioxidant treatment (Figure S4A,B). However, we observed a reduction in the percentage of cells in the G0/G1 phase, only in the NAC-treated $PRDX1^{KO}$ background (Figure S4A,B), suggesting a slight increase in cell cycle progression following NAC treatment [28]. Treatment of $PRDX1^{KO}$ cells with NAC resulted in a significant decrease in ROS levels, thus confirming that NAC was acting as an antioxidant compound in the used experimental conditions (Figure S4C). Altogether, our results indicate that PRX-I ablation causes irreversible oxidative DNA damage, leading to disrupted cell cycle progression and reduced growth of PDAC cells.

3.3. Genetic Ablation of PRX-I Alters the Autophagic Flux in PDAC Cells

Cell cycle blockade and DNA damage could result in reduced cell survival [29]. Autophagy has been shown to promote the survival of PDAC cells, and its inhibition suppressed their growth [30]. We hypothesized that autophagy could be perturbated in cells lacking PRX-I, which may explain their reduced growth. To test this hypothesis, we measured the protein expression of essential autophagy markers.

We found that autophagy-related gene (ATG)7 expression, which is involved in LC3 lipidation (LC3-I → LC3-II), was increased in $PRDX1^{KO}$ cells; in parallel, the expression of ATG5-ATG12 and ATG16L1 involved in autophagosome elongation was decreased (Figure 4A). This first results highlight the presence of changes in basal autophagic activity. To confirm autophagy disruption, we assessed the levels of LC3 and p62 proteins; the latter is degraded when autophagy is active [31], and the accumulation of both markers reflects the presence of defective autophagy. As expected, we found an increase in LC3-II and p62 content in $PRDX1^{KO}$ cells (Figure 4A). In addition, LC3 immunofluorescence revealed that some of the cells lacking PRX-I exhibited two-fold larger LC3 dotes compared to $PRDX1^{WT}$ cells (Figure 4B–D; white arrows); these larger LC3 dots, which are indicative of defective autophagy [31], did not colocalize with LAMP1, a marker of lysosomal membranes, emphasizing a reduced formation of autophagolysosomes. Treatment of $PRDX1^{WT}$ cells with chloroquine reduced their survival in a dose-dependent manner (Figure 4E), thus confirming that autophagy is essential to maintain the survival of PDAC cells. However, the combination of PRX-I ablation and chloroquine resulted in an additive rather than the synergetic response in $PRDX1^{KO}$ cells (Figure 4E). Our data indicate that the removal of PRX-I disrupts the basal autophagic flux present in pancreatic cancer cells. Signaling pathways responsible for autophagy perturbation in PRX-I-deficient cells are complex and multiple. Since we demonstrated that PRX-I promotes STAT3 activation, we wondered if STAT3 is responsible for disrupted autophagy observed in cells lacking PRX-I. Although pharmacological inhibition of STAT3 by Stattic induced a significant increase

in ROS levels (Figure S5A), it did not alter the autophagic flux in PDAC cells. Namely, there was no change in the diameter of LC3 dots and in LC3 total protein content between Stattic-treated and untreated PANC-1 cells (Figure S5B,C). These experiments indicate that PRX-I loss alters autophagy in PDAC cells independently on the STAT3 pathway. Besides STAT3, AMP-activated protein kinase (AMPK) has been described as an activator of autophagy [32,33]; we have found that the phosphorylation of Acetyl-CoA carboxylase (ACC), a direct substrate of AMPK [34], was significantly decreased in $PRDX1^{KO}$ compared with $PRDX1^{WT}$ cells (data not shown), highlighting a reduction in AMPK downstream activity. Therefore, it seems that loss of PRX-I can impact autophagy, at least partly, through a modulation in AMPK activity. However, a complete elucidation of the underpinning mechanisms warrants further investigation.

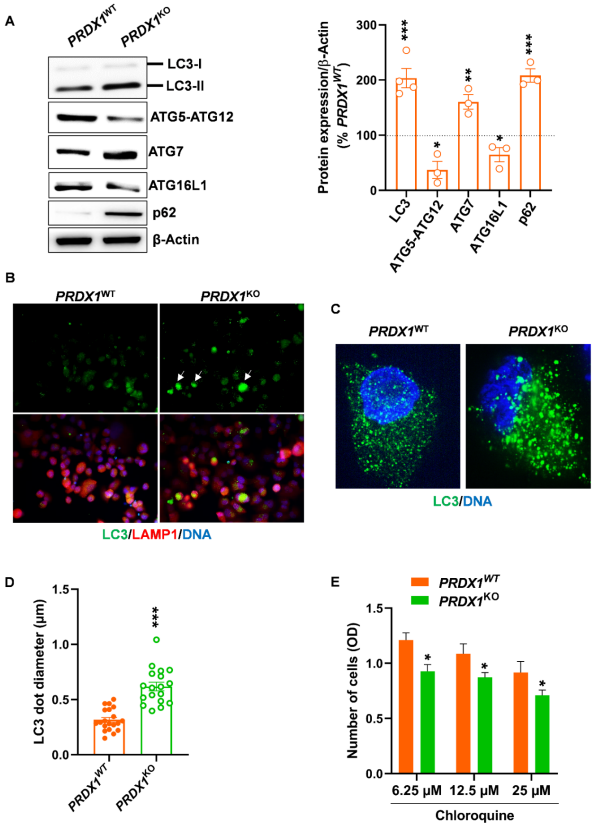


Figure 4. Peroxiredoxin-I (PRX-I) ablation disrupts basal autophagic flux in human pancreatic ductal adenocarcinoma

(PDAC) cells. (**A**) Western blot for autophagy markers and their corresponding densitometric quantification. β-Actin was used as a loading control; Western blots were performed on three-to-four independent culture passages (n = 3–4). The dashed line, set at 100%, represents the expression level in $PRDX1^{WT}$ cells. (**B**) Representative pictures of Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain (LC3) and Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) immunolabeling on $PRDX1^{WT}$ and $PRDX1^{KO}$ cells; immunolabeling was performed on three independent culture passages (n = 3). White arrows show autophagy-defective cells with large LC3 dots. (**C**) Representative confocal pictures of LC3 immunolabeling in one $PRDX1^{WT}$ cell and one $PRDX1^{KO}$ cell. (**D**) LC3 dot diameter measured from confocal pictures, as shown in panel C; LC3 immunolabeling was performed on three independent cultures (n = 3), and 18-to-20 cells were randomly selected from confocal images to quantify LC3 dot diameter. (**E**) Cell number measured after 24 h of chloroquine treatment of $PRDX1^{WT}$ and $PRDX1^{KO}$ cells; pharmacological treatment was performed on three independent culture passages (n = 3). Data are mean ± SEM. Statistical significance was tested by Student's t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

In summary, we found that PRX-I is increased during pancreas tumorigenesis and that its ablation in human PDAC cells compromises their growth. Mechanistically, the ablation of PRX-I led to increased intracellular ROS generation and oxidative DNA damage, probably leading to cell cycle blockade. Additionally, the lack of PRX-I affected important biological pathways essential for PDAC cell survival, including STAT3 and autophagy. Specific inhibitors for PRX-I have been developed recently [35,36], their validation in the context of PDAC will deserve future in vitro and in vivo investigations.

4. Conclusions

In this paper, we report for the first time a pro-oncogenic role for PRX-I in PDAC. Using molecular and redox biology approaches, we provide evidence that PRX-I impacts a multitude of pathways related to cell cycle progression, autophagy, and survival, through buffering the intracellular levels of ROS and the resulting oxidative DNA damages. It is important to emphasize the selective expression of PRX-I in PDAC cells as compared to normal pancreatic cells, making PRX-I a druggable oncogenic target with few expected side effects on normal tissues. This selectivity has been partly confirmed in a recent study on mice [16]; specifically, in a model of experimental acute pancreatitis, ablation of PRX-I in the pancreas with mild inflammation and low PRX-I expression showed no impact on pancreatic cells, whereas PRX-I inactivation in the pancreas with severe inflammation and high PRX-I expression exhibited protective effects on pancreatic cells [16]. Therefore, PRX-I could be considered as a specific target in tumors or injured cells (e.g., exposed to inflammatory stimuli and/or oncogenic mutations). Our previous findings [16] and those described in the present work encourage the implementation of prospective studies to test specific pharmacological inhibitors for PRX-I in mice models of pancreas tumorigenesis.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox10040570/s1, Figure S1. Illustration of the used tamoxifen and cerulein regimens in *ElastaseCreER-LSLKras^{G12D}-p53^{R172H}* (*KPE*) mice. Figure S2. Peroxiredoxin-I (PRX-I) expression in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells following genetic inactivation of *Peroxiredoxin-1* (*PRDX1*) gene by small interfering RNA (siRNA) or clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9). Figure S3. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) regulates the expression of Peroxiredoxin-I (PRX-I) in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Figure S4. N-Acetylcysteine (NAC) treatment does not reverse cell cycle blockade at G2/M in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Figure S5. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) induces reactive oxygen species (ROS) production without impacting the autophagic flux in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells.

Author Contributions: Conceptualization, P.J. and M.A.; methodology, H.D., M.-A.M., and M.A.; software, M.A.; validation, P.J. and M.A.; formal analysis, M.A.; investigation, M.A.; resources, M.-A.M.; data curation, H.D. and M.A.; writing—original draft preparation, M.A.; writing—review and editing, P.J. and M.A.; visualization, H.D., P.J., and M.A.; supervision, P.J. and M.A.; project

administration, P.J. and M.A.; funding acquisition, P.J. and M.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Belgian National Fund for Scientific Research, grant number (n° 1. B.017.19F) was given to M.A. and grants from the Foundation for Cancer Research (#2018–076), Télévie (#7.8515.18) and the Fonds Joseph Maisin were given to P.J. The article processing charges (APC) was funded by the de Duve institute.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the animal welfare committee of the University of Louvain Medical School (ethic number: 2017/UCL/MD/020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank Nicolas Dauguet for his help in FACS experiments and Christopher Lang and Chim Kei Chan for critical discussions. M.A. is a research assistant at the National Fund for Scientific Research (FNRS, Belgium). M-A.M has a PhD fellowship from Télévie (#7.6509.20). P.J. is a senior research associate at the FNRS. Requests related to this paper can be addressed to Patrick Jacquemin and Mohamad Assi.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

8-oxoG	8-oxoguanine
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
AMPK	AMP-activated protein kinase
ATG	Autophagy-related gene
Cdc25C	M-phase inducer phosphatase 3
CHK2	Checkpoint kinase 2
ERK/MAPK	Extracellular signal-regulated kinases/mitogen-activated protein kinases
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog protein
HSC70	Heat-shock cognate 70
JAK/STAT3	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3
Kras	*Kirsten rat sarcoma* gene
KRAS	Kirsten rat sarcoma protein
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain
NRF2	*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* gene
NRF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protein
pH3	Phospho-histone 3
PRDX1	Human *Peroxiredoxin-1* gene
PRX-I	Peroxiredoxin-I protein
PRX-II	Peroxiredoxin-II protein
ROS	Reactive oxygen species

References

1. Rawla, P.; Sunkara, T.; Gaduputi, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J. Oncol.* **2019**, *10*, 10–27. [CrossRef] [PubMed]
2. Tuveson, D.A.; Shaw, A.T.; Willis, N.A.; Silver, D.P.; Jackson, E.L.; Chang, S.; Mercer, K.L.; Grochow, R.; Hock, H.; Crowley, D.; et al. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* **2004**, *5*, 375–387. [CrossRef]
3. Hingorani, S.R.; Petricoin, E.F.; Maitra, A.; Rajapakse, V.; King, C.; Jacobetz, M.A.; Ross, S.; Conrads, T.P.; Veenstra, T.D.; Hitt, B.A.; et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **2003**, *4*, 437–450. [CrossRef]
4. Guerra, C.; Schuhmacher, A.J.; Canamero, M.; Grippo, P.J.; Verdaguer, L.; Perez-Gallego, L.; Dubus, P.; Sandgren, E.P.; Barbacid, M. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 291–302. [CrossRef] [PubMed]

5. Assi, M.; Achouri, Y.; Loriot, A.; Dauguet, N.; Dahou, H.; Baldan, J.; Libert, M.; Fain, J.S.; Guerra, C.; Bouwens, L.; et al. Dynamic regulation of expression of KRAS and its effectors determines the ability to initiate tumorigenesis in pancreatic acinar cells. *Cancer Res.* **2021**. [CrossRef]
6. Smith, J.P.; Solomon, T.E. Cholecystokinin and pancreatic cancer: The chicken or the egg? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2014**, *306*, G91–G101. [CrossRef]
7. Lamers, C.B.; Jansen, J.B.; Woutersen, R.A. Cholecystokinin and gastrointestinal cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1990**, *37*, 1069–1072. [CrossRef]
8. Ceranowicz, P.; Warzecha, Z.; Dembinski, A. Peptidyl hormones of endocrine cells origin in the gut–their discovery and physiological relevance. *J. Physiol. Pharmacol.* **2015**, *66*, 11–27. [PubMed]
9. Chio, I.I.C.; Jafarnejad, S.M.; Ponz-Sarvise, M.; Park, Y.; Rivera, K.; Palm, W.; Wilson, J.; Sangar, V.; Hao, Y.; Ohlund, D.; et al. NRF2 Promotes Tumor Maintenance by Modulating mRNA Translation in Pancreatic Cancer. *Cell* **2016**, *166*, 963–976. [CrossRef]
10. Cheung, E.C.; DeNicola, G.M.; Nixon, C.; Blyth, K.; Labuschagne, C.F.; Tuveson, D.A.; Vousden, K.H. Dynamic ROS Control by TIGAR Regulates the Initiation and Progression of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **2020**, *37*, 168–182.e4. [CrossRef]
11. Neumann, C.A.; Krause, D.S.; Carman, C.V.; Das, S.; Dubey, D.P.; Abraham, J.L.; Bronson, R.T.; Fujiwara, Y.; Orkin, S.H.; Van Etten, R.A. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* **2003**, *424*, 561–565. [CrossRef]
12. Hampton, M.B.; Vick, K.A.; Skoko, J.J.; Neumann, C.A. Peroxiredoxin Involvement in the Initiation and Progression of Human Cancer. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *28*, 591–608. [CrossRef] [PubMed]
13. Ogusucu, R.; Rettori, D.; Munhoz, D.C.; Netto, L.E.; Augusto, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 326–334. [CrossRef]
14. Park, Y.H.; Kim, S.U.; Lee, B.K.; Kim, H.S.; Song, I.S.; Shin, H.J.; Han, Y.H.; Chang, K.T.; Kim, J.M.; Lee, D.S.; et al. Prx I suppresses K-ras-driven lung tumorigenesis by opposing redox-sensitive ERK/cyclin D1 pathway. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 482–496. [CrossRef]
15. Han, B.; Shin, H.J.; Bak, I.S.; Bak, Y.; Jeong, Y.L.; Kwon, T.; Park, Y.H.; Sun, H.N.; Kim, C.H.; Yu, D.Y. Peroxiredoxin I is important for cancer-cell survival in Ras-induced hepatic tumorigenesis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 68044–68056. [CrossRef] [PubMed]
16. Buckens, H.; Pirenne, S.; Achouri, Y.; Baldan, J.; Dahou, H.; Bouwens, L.; Lemaigre, F.P.; Jacquemin, P.; Assi, M. Peroxiredoxin-I sustains inflammation during pancreatitis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**. [CrossRef]
17. Taniuchi, K.; Furihata, M.; Hanazaki, K.; Iwasaki, S.; Tanaka, K.; Shimizu, T.; Saito, M.; Saibara, T. Peroxiredoxin 1 promotes pancreatic cancer cell invasion by modulating p38 MAPK activity. *Pancreas* **2015**, *44*, 331–340. [CrossRef] [PubMed]
18. Desai, B.M.; Oliver-Krasinski, J.; De Leon, D.D.; Farzad, C.; Hong, N.; Leach, S.D.; Stoffers, D.A. Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet beta cell, regeneration. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 971–977. [CrossRef] [PubMed]
19. Lee, A.Y.L.; Dubois, C.L.; Sarai, K.; Zarei, S.; Schaeffer, D.F.; Sander, M.; Kopp, J.L. Cell of origin affects tumour development and phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* **2019**, *68*, 487–498. [CrossRef]
20. Ran, F.A.; Hsu, P.D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, D.A.; Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 2281–2308. [CrossRef]
21. Assi, M.; Dauguet, N.; Jacquemin, P. DIE-RNA: A Reproducible Strategy for the Digestion of Normal and Injured Pancreas, Isolation of Pancreatic Cells from Genetically Engineered Mouse Models and Extraction of High Quality RNA. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 129. [CrossRef] [PubMed]
22. Assi, M.; Pirlot, B.; Stroobant, V.; Thissen, J.P.; Jacquemin, P. A Novel KRAS Antibody Highlights a Regulation Mechanism of Post-Translational Modifications of KRAS during Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6361. [CrossRef] [PubMed]
23. Cai, C.Y.; Zhai, L.L.; Wu, Y.; Tang, Z.G. Expression and clinical value of peroxiredoxin-1 in patients with pancreatic cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2015**, *41*, 228–235. [CrossRef] [PubMed]
24. Froeling, F.E.M.; Swamynathan, M.M.; Deschenes, A.; Chio, I.I.C.; Brosnan, E.; Yao, M.A.; Alagesan, P.; Lucito, M.; Li, J.; Chang, A.Y.; et al. Bioactivation of Napabucasin Triggers Reactive Oxygen Species-Mediated Cancer Cell Death. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 7162–7174. [CrossRef]
25. Kim, Y.J.; Ahn, J.Y.; Liang, P.; Ip, C.; Zhang, Y.; Park, Y.M. Human prx1 gene is a target of Nrf2 and is up-regulated by hypoxia/reoxygenation: Implication to tumor biology. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 546–554. [CrossRef] [PubMed]
26. Wang, H.; Zhang, T.; Sun, W.; Wang, Z.; Zuo, D.; Zhou, Z.; Li, S.; Xu, J.; Yin, F.; Hua, Y.; et al. Erianin induces G2/M-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2247. [CrossRef]
27. Salehi, F.; Behboudi, H.; Kavoosi, G.; Ardestani, S.K. Oxidative DNA damage induced by ROS-modulating agents with the ability to target DNA: A comparison of the biological characteristics of citrus pectin and apple pectin. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13902. [CrossRef]
28. Lemoine, F.J.; Marriott, S.J. Accelerated G(1) phase progression induced by the human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) Tax oncoprotein. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31851–31857. [CrossRef]
29. Arima, Y.; Nitta, M.; Kuninaka, S.; Zhang, D.; Fujiwara, T.; Taya, Y.; Nakao, M.; Saya, H. Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 19166–19176. [CrossRef] [PubMed]
30. Yang, S.; Wang, X.; Contino, G.; Liesa, M.; Sahin, E.; Ying, H.; Bause, A.; Li, Y.; Stommel, J.M.; Dell'antonio, G.; et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 717–729. [CrossRef] [PubMed]

31. Runwal, G.; Stamatakou, E.; Siddiqi, F.H.; Puri, C.; Zhu, Y.; Rubinsztein, D.C. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10147. [CrossRef] [PubMed]
32. Hardie, D.G. AMPK and autophagy get connected. *EMBO J.* **2011**, *30*, 634–635. [CrossRef]
33. Jia, J.; Abudu, Y.P.; Claude-Taupin, A.; Gu, Y.; Kumar, S.; Choi, S.W.; Peters, R.; Mudd, M.H.; Allers, L.; Salemi, M.; et al. Galectins control MTOR and AMPK in response to lysosomal damage to induce autophagy. *Autophagy* **2019**, *15*, 169–171. [CrossRef] [PubMed]
34. Sim, A.T.; Hardie, D.G. The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* **1988**, *233*, 294–298. [CrossRef]
35. Wei, W.; Ma, C.; Cao, Y.; Yang, L.; Huang, Z.; Qin, D.; Chen, Y.; Liu, C.; Xia, L.; Wang, T.; et al. Identification of H7 as a novel peroxiredoxin I inhibitor to induce differentiation of leukemia cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 3873–3883. [CrossRef] [PubMed]
36. Ye, Q.; Zhang, Y.; Cao, Y.; Wang, X.; Guo, Y.; Chen, J.; Horn, J.; Ponomareva, L.V.; Chaiswing, L.; Shaaban, K.A.; et al. Frenolicin B Targets Peroxiredoxin 1 and Glutaredoxin 3 to Trigger ROS/4E-BP1-Mediated Antitumor Effects. *Cell Chem. Biol.* **2019**, *26*, 366–377. [CrossRef] [PubMed]