Histone désacétylase et cancer du pancréas

Pancreatic cancer and histone deacetylase

M Ouaïssi [1, 2, 3] R Silvestre [3, 4, 5], S Cabral [5], T Johana [5], I Sielezneff [1, 2], B Sastre [1, 2], JS Lafontaine [6], MJ Payan [7], C da Silva A [5], E Mas [3], D Lombardo [3], A Ouaissi [4, 5, 6]

1. Aix-Marseille Univ, CRO2, Marseille, France.
2. APHM, Hôpital Timone, Service de chirurgie digestive et oncologique, pôle d'oncologie et spécialité médico-chirurgicales, Marseille, France.
3. IRD, UR008, Montpellier, France.
4. INSERM, UMR 554, Montpellier, France.
5. IBMC, Universidade do Porto, Porto, Portugal.
6. CRLC, Hôpital Val d'Aurel, service d'anathomopathologie, Montpellier, France.
7. Assistance Pubique-Hôpitaux de Marseille, Hôpital Timone, service d'anathomopathologie, pôle d'oncologie et spécialité médico-chirurgicales, Marseille, France.

Mots clés

- Adénocarcinome pancréas
- HDAC
- HDAC7

Résumé

L'implication des histones désacétylases (HDAC) est bien admise dans la carcinogénèse. L'objectif du travail de notre équipe a été d'étudier l'implication des HDAC dans la carcinogénèse pancréatique.
La première partie du travail avait pour objectif d'évaluer le niveau d'expression des histones désacétylases dans quatre lignées cellulaires de cancer du pancréas et de déterminer leur niveau de sensibilité à différents inhibiteurs d'histones désacétylases (HDIs). Les niveaux d'expression des gènes HDACs et le niveau de synthèse des protéines HDACs étaient comparables entre les lignées. Les inhibiteurs des HDACs exercent une activité antiproliférative en induisant une mort cellulaire par apoptose. Nos résultats suggèrent que la sensibilité des cellules aux inhibiteurs n'est pas en relation avec le niveau d'expression des HDACs.
La deuxième partie du travail a porté sur l'évaluation du niveau d'expression des gènes codant pour des membres de différentes classes de HDAC dans les tissus pancréatiques prélevés sur des pièces opératoires. L'extraction d'ARN a été réalisée sur 11 adénocarcinomes du pancréas (AP) de différents stades et un pancréas normal obtenu lors d'un prélèvement d'organe. L'analyse par Western blot de la réactivité montre une forte immunoréactivité des anticorps anti-HDAC7 dans près de 81 % des adénocarcinomes comparativement aux tumeurs bénignes (CS, TIPMP, PC) et pancréas normal. Cette forte synthèse d'HDAC7 est corroborée par les résultats de la PCR quantitative et l'étude immunohistochimique.
Conclusion. Ces observations sont en faveur de l'expression différentielle du gène HDAC7 dans le cancer du pancréas et suggèrent que HDAC7 pourrait constituer un marqueur potentiel.

Keywords

- Pancreatic tumors
- HDAC
- HDAC7

Abstract

Given the structural differences among members of the family of enzymes histone deacetylase, development of specific inhibitors will not only allow selective therapeutic intervention, but may also provide a powerful tool for functional study of these enzymes.
In the first step, attempts were made for the first time to explore the level of expression of members of histone deacetylase encoding genes (HDACs) in four pancreatic tumor cell lines: Panc-1, BxPC-3, SOJ-6 and MiaPaCa-2; and two non-related tumor cells: Jurkat and HeLa. The possible relationship between the levels of HDACs expression and the sensitivity/resistance to HDAC inhibitors (TSA, Nicotinamide and Sirtinol) was further analyzed. Although a slight variation in the profiles of gene expression among cell lines could be evidenced, HDACs protein synthesis seems to be similar. Furthermore, the cells were equally sensitive to inhibition by Sirtinol whereas some variation in the IC50 could be seen in the case of TSA. We also demonstrate that the drugs had the capacity to induce the death of cells by apoptosis. Taken together, our data support the notion that the level of cell sensitivity to the HDIs might be related to the level of expression of genes such as those encoding proteins playing a role in cell cycle checkpoints control but not HDAC per se.

Correspondance :
APHM, Hôpital Timone, Service de chirurgie digestive et oncologique, pôle d'oncologie et spécialité médico-chirurgicales, Marseille, France.
E-mail : ouaissi_mehdi@hotmail.com

Disponible en ligne sur www.bium.univ-paris5.fr/acad-chirurgie
1634-0647 - © 2011 Académie nationale de chirurgie. Tous droits réservés.

Keywords
- Pancreatic tumors
- HDAC
- HDAC7

In the second part of work, we have evaluated the expression levels of members of class I, II and III in a set of surgically resected pancreatic tissues. Total RNA was isolated from 11 pancreatic adenocarcinomas (PA): Stage 0 (n=1), IB (n=1), IIB (n=6), III (n=1), IV (n=2), one serous cystadenoma (SC), one intraductal papillary mucinous tumor of the pancreas (IMPN), one complicating chronic pancreatitis (CP) and normal pancreatic biopsy (NP) obtained during donor liver transplantation. In addition, four samples of control tissues taken from the surgical specimens from different patients with PA, and two samples from patients with adenocarcinomas of biliary duct (BD) were also included in this study. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was conducted and gene expression was quantified by qPCR. Protein expression levels were analyzed by Western blot and their localization by immunohistochemistry analyses of cancer tissues sections. The expression of class I and II members of HDACs showed that all the samples from PA, CP, SC and IMPN had decreased levels of HDAC 1, -2, -3 and -4 transcripts. Remarkably, 9 of the 11 PA (≅ 81%) showed significant increase of HDAC7 mRNA levels. The Western blot analysis showed increased expression of HDAC7 protein in 9 out of 11 PA samples in agreement with the qPCR data. Most of the PA tissue sections examined showed intense labeling in the cytoplasm when reacted against antibodies to HDAC7. The data showed alteration of HDACs gene expression in pancreatic cancer. Therefore, increased expression of HDAC7 discriminates PA from other pancreatic tumors.

Le cancer du pancréas est un problème majeur de santé publique de par le monde. Selon l'étendue de la tumeur au moment du diagnostic, le pronostic est souvent de moindre qualité avec une période de 5 ans de survie de moins (1). Les standards de traitement pour cette affection comprennent la radiothérapie et/ou la chimiothérapie. Cependant, la radiothérapie est souvent toxique et la chimiothérapie, qui fait appel à des drogues comme le 5-fluorouracile (5-FU) et la gemcitabine (GEM), sont soit inefficaces ou efficaces pour une courte durée, bien qu'il ait été rapporté que GEM peut améliorer la qualité de vie (2). Par ailleurs, la chimiorésistance de certaines tumeurs peut également jouer un rôle dans le manque d'efficacité des thérapies (3).
De multiples altérations moléculaires ont été rapportées dans le cas de cellules cancéreuses pancréatiques : un taux élevé de mutations du gène p53, K-ras, p16, DPC4 et FHIT, une surexpression de p21WAF1/CP1 (5-9). Ces modifications semblent jouer un rôle dans la progression du cancer du pancréas. L'élucidation des mécanismes d'activation/répression de la transcription dans les cellules eucaryotes a mis en lumière le rôle important des processus d'acétylation/désacétylation des histones (et des facteurs de transcription) dont les acteurs sont les histones acétyltransferases (HATS) et des histones déacetylases (HDACs) (figure 1). Ces mécanismes semblent également jouer un rôle important dans la cancérogénèse. Ainsi, l'inactivation ou la surexpression des HDACs peuvent conduire à des aberrations dans le profil d'expression de gènes, et par conséquent à une prolifération des cellules tumorales (10). La recherche de moyens d'interférer avec la prolifération des cellules tumorales a permis l'identification d'un grand nombre de substances naturelles et molécules synthétiques qui peuvent induire la réversion de la morphologie de cellules cancéreuses en phénotype normal. Certaines de ces molécules induisent l'arrêt du cycle cellulaire et agissent comme des inhibiteurs des HDACs (iHDAC), ce qui suggère l'existence d'une relation entre leur activité anti-HDAC et l'effet anti-tumoral. Le mécanisme d'action des iHDAC n'est pas encore entièrement élucidé. Il est vraisemblable que les iHDAC en libérant la répression transcriptionnelle peuvent favoriser l'expression de gènes spécifiques qui, en fonction du type cellulaire considéré, peut conduire à l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation, et/ou de l'apoptose. Nous avons réalisé un travail de recherche bibliographique sur les HDAC (11).
Cette analyse nous a amenés à émettre l'hypothèse d'une implication des HDAC dans le mécanisme de carcinogénèse du pancréas (11).

Évaluation du niveau d'expression des histones désacétylases dans quatre lignées cellulaires de cancer du pancréas

La première partie de notre travail a consisté à utiliser plusieurs lignées de cellules d'adénocarcinome pancréatique (Panc-1, BxPC-3, SOJ-6, MiaPaCa-2) et deux lignées cellulaires tumorales humaines non-pancréatiques : une lignée cellulaire T leucémique du sang périphérique (Jurkat) et une lignée d'adénocarcinome du col de l'utérus (HeLa) pour aborder pour la première fois l'expression de gènes HDAC des mem-

Figure 1. Représentation schématique de l'action des acétylations et désacétylations des histones (11).

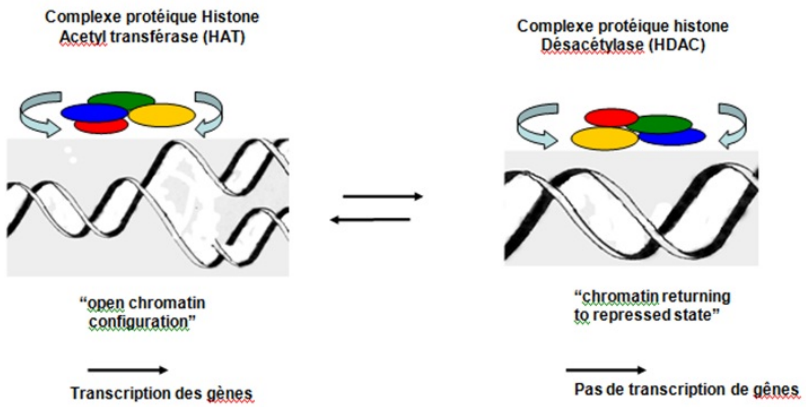
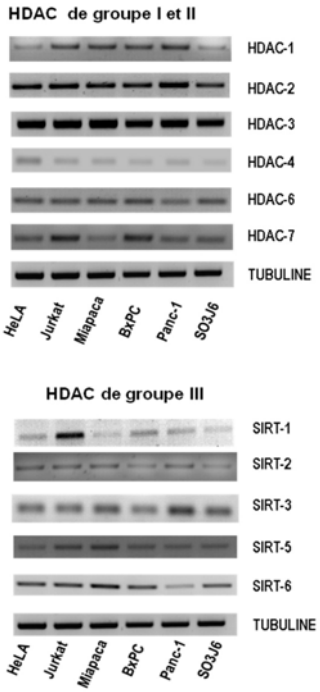


Figure 2. PCR de ADNc des différentes lignées cellulaires obtenues après extraction d'ARN et « reverse transcription » (Hela (1), jurkat (2), Miapaca (3), Dx-Pc3 (4), Pakc-1(5), SOJ6(6)).



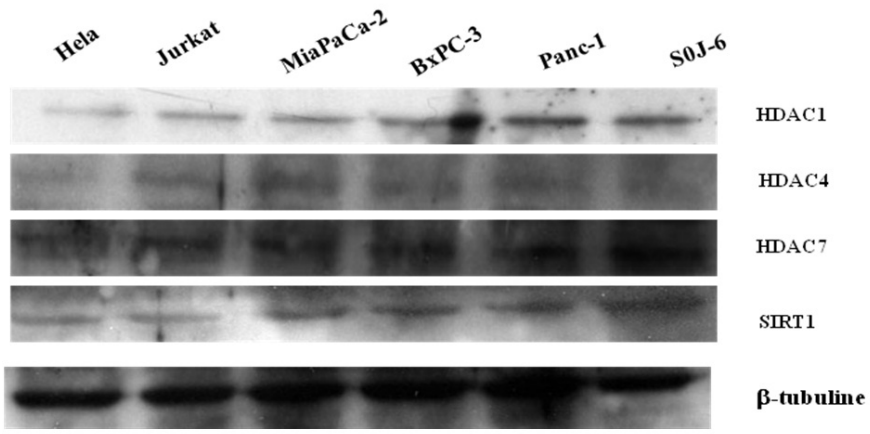


Figure 3. Immuno-empreinte des extraits protéiques des différentes lignées (Hela (1), jurkat (2), Miapaca (3), Bx-Pc3 (4), Panc-1 (5), SOJ6 (6)) en utilisant des anticorps spécifiques anti-HDAC.

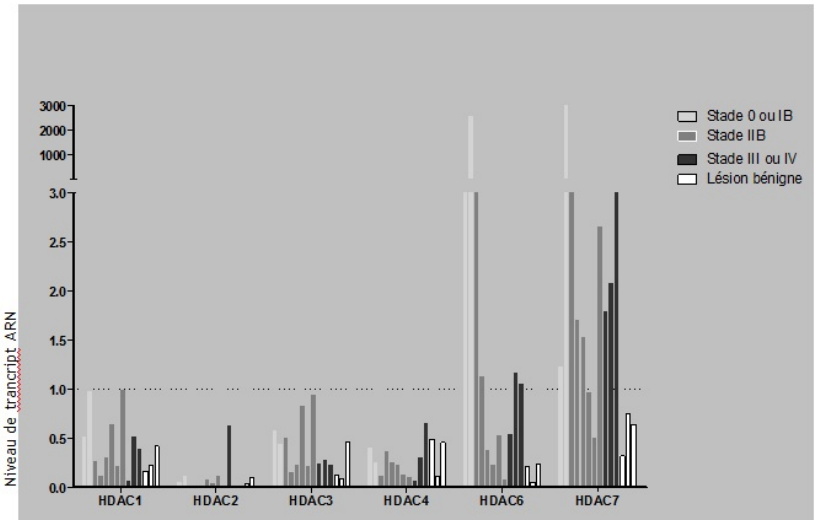


Figure 4. Expression des gènes HDAC en fonction du type et du stade des tumeurs comparés au pancréas normal (niveau de trancript = 1)

bres de la classe I, II et III. Nous avons cherché à mettre en relation le niveau d'expression de ces gènes et le degré de sensibilité/résistance de ces lignées cellulaires aux iHDACs, notamment les iHDAC des membres de la classe III en particulier le sirtinol et le nicotinamide. En effet, la majeure partie des études qui ont été réalisées jusqu'à présent ont surtout utilisé les inhibiteurs de HDAC de classe I et II, en particulier la trichostatine (TSA). En dépit de signaux relativement faibles dans le cas de certains gènes de la famille des HDAC de classe III, dans la plupart des lignées cellulaires, d'importants niveaux de transcription de gènes des membres de la classe I (HDAC1, 2, 3) et la classe II (HDAC6, 7) ont été observés (figure 2) (12). Cependant, la PCR quantitative en temps réel indique que la plupart des gènes HDACs ciblés étaient moins exprimés que le gène de ménage (ß-tubuline) (figure 2). Paradoxalement, à l'exception de la synthèse de SIRT1 dans les cellules Panc-1 où la bande immunoréactive était à peine visible, aucun changement majeur dans l'expression des protéines HDAC1, 4-7 et SIRT1 n'a été observé (12) (figure 3).

Alors que l'effet des iHDAC de classe I et II tels que le SAHA (suberoylanilide hydroxamid) et la TSA a été largement étudié dans le cas des cellules tumorales pancréatiques, l'efficacité des iHDAC de la classe III n'a pas encore été examinée en détail. En dépit du niveau de synthèse des HDAC qui est similaire, il nous a semblé intéressant d'évaluer le degré de sensibilité/résistance des cellules tumorales pancréatiques aux iHDAC notamment de classe III tels que le Nicotinamide et le Sirtinol. Les résultats obtenus montrent que la croissance des lignées cellulaires est altérée par le Nicotinamide et le Sirtinol à un niveau comparable entre les lignées alors qu'un certain degré de variation est observé avec la TSA, un inhibiteur des HDAC de classe I et II (12). Des études complémentaires conduites en utilisant le Sirtinol en comparaison à la TSA montrent, qu'à des degrés divers, les deux molécules induisent l'arrêt du cycle cellulaire et la mort des cellules par apoptose évaluée par divers critères morphologiques et biochimiques (12).

Nos résultats sont en accord avec les observations rapportées dans la littérature qui montrent que dans le cas de lignées cellulaires d'adénocarcinome pancréatique humain (IMIM-PC-1, IMIM et PC2-GTR-1), la TSA et le SAHA induisent une mort massive des cellules par apoptose qui est caspase-indépendante (13). D'autres ont montré que la TSA a une activité synergique de la gemcitabine (14) ou de PS-34126, un inhibiteur du protéasome (15), pour induire l'apoptose des cellules tumorales pancréatiques humaines. Nos résultats ajoutent une nouvelle notion que les iHDAC de classe III, par exemple Sirtinol, ont la capacité d'induire la mort des lignées tumorales pancréatiques par apoptose. Il semble donc qu'en fonction du type cellulaire considéré et de l'inhibiteur utilisé, les profils d'expression des gènes HDAC soient variables et que l'action des inhibiteurs des HDAC ne soit pas à mettre en relation avec le niveau d'expression des HDAC.

Évaluation du niveau d'expression des gènes codant pour des membres de différentes classes de HDAC dans les tissus pancréatiques

Peu d'informations étaient disponibles concernant l'état des HDACs dans le cancer du pancréas. Nous avons donc essayé, pour la première fois, d'évaluer le niveau d'expression des gènes HDACs dans une série de pièces opératoires de tumeurs pancréatiques. Notre étude a révélé que la plupart des tumeurs analysées (10/11, 90 %) [11 adénocarcinomes du pancréas (AP) de différents stades : 0 (n = 1), IB (n = 1), IIB (n = 6), III (n = 1), IV (n = 2)] ainsi que les PC, CS et TIPMP [un cystadénome séreux (CS), une tumeur intracanalaire mucineuse pancréatique (TIPMP), une pancréatite chronique (PC)] ont montré une augmentation de l'expression du gène SIRT5. Diverses pièces opératoires témoins ont été utilisées en parallèle : quatre tumeurs bénignes et un pancréas normal obtenus lors d'un prélèvement d'organe. Le fait marquant est que 9 des 11 adénocarcinomes du pancréas (81 %) indiquaient une augmentation de l'expression du gène HDAC7 par rapport aux PC, CS et TIPMP qui montraient une faible expression du transcrit HDAC7 (4) (figure 4). Ces observations ont été corro-

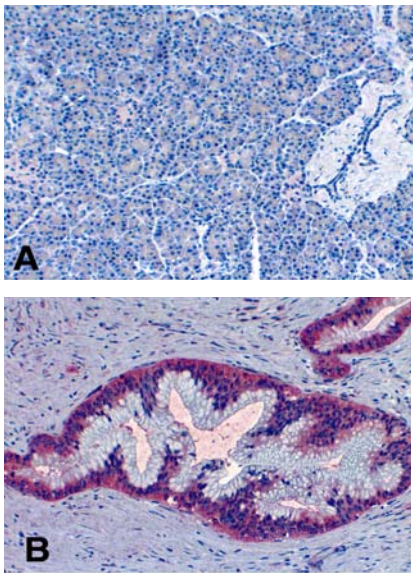


Figure 5. Etude immunohistochimique montrant une très faible voir une absence d'immunoréactivité des anticorps anti-HDAC7 vis-à-vis du pancréas normal (A), alors qu'une forte immunoréactivité est observée dans le cas de l'adénocarcinome (B). Grossissement x250

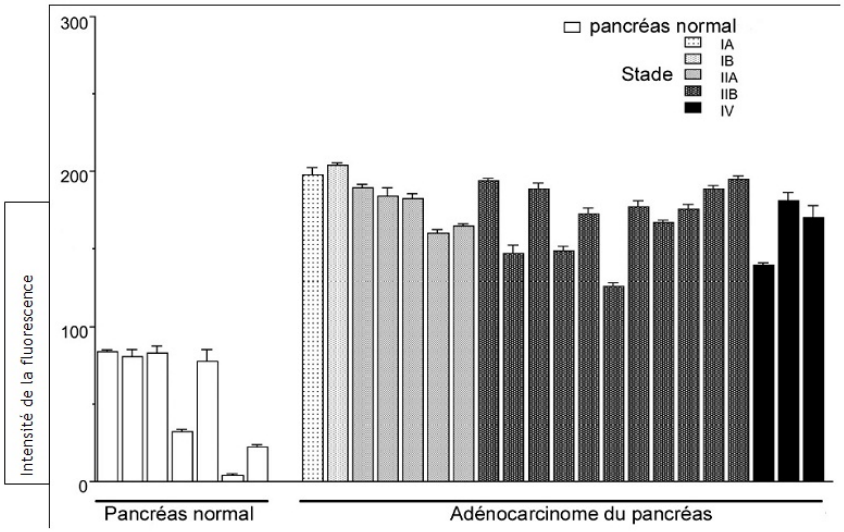


Figure 6. Histogramme montrant les niveaux d'immunofluorescence (moyenne et écart type pour chaque coupe histologique. Les comparaisons par les tests Anova et Fischer montrent qu'il y a une différence significative entre l'intensité du marquage de l'adénocarcinome pancréatique et celle du pancréas normal ($p < 0,05$).

borées, d'une part, par les résultats du *Western blot* où l'immunoréactivité des extraits tumoraux est fortement augmentée pour HDAC 7 dans les 9 échantillons d'adénocarcinomes du pancréas (4), d'autre part, par les observations en immunohistochimie qui montrent clairement une forte immunoréactivité des coupes de tissus des 9 adénocarcinomes du pancréas comparativement aux autres spécimens (figure 5). La majorité des adénocarcinomes du pancréas montrent des mutations ponctuelles du gène K-ras (> 90 % dans la plupart des études), et un grand nombre de tumeurs présentent également des modifications dans les gènes contrôlant la transition G1/S du cycle cellulaire tels que le p16INK4a (16). D'autres modifications d'expression de certains facteurs ont été observées dans le cancer du pancréas notamment des facteurs de croissance et/ou leurs récepteurs (17, 18). Nos travaux montrent pour la première fois que la transcription de HDAC7 est préférentiellement augmentée dans le cas des adénocarcinomes du pancréas.

Nos observations et les travaux récents qui montrent que le vorinostat cible spécifiquement HDAC7, nous a incités à poursuivre la collecte de pièces opératoires afin de valider nos résultats sur une large série d'adénocarcinomes de différents stades. Nous avons élargi notre approche par une étude immunohistochimique et par immunoflurescence à de nouvelles pièces d'adénocarcinome du pancréas. Ce travail a permis de confirmer nos résultats préliminaires, mais aussi de définir une approche diagnostique reproductible en routine par n'importe quel service d'anatomopathologie, sur coupe paraffine (figure 6).

L'ensemble de ces observations démontre que les protéines HDACs et SIRTs ainsi que les gènes correspondant peuvent représenter des marqueurs potentiels pour le diagnostic et/ou le pronostic du cancer chez l'homme. Des progrès substantiels ont été accomplis pour mettre en évidence l'importance des HDACs/SIRTs comme régulateurs de la croissance, la différenciation et la mort cellulaire. La dérégulation fonctionnelle des HDAC peut conduire à des altérations des mécanismes qui participent à la régulation de l'équilibre répression/activation de la transcription, ce qui peut conduire à la tumorigenèse.

Un travail récemment publié a montré que le vorinostat, le premier iHDAC approuvé pour l'utilisation clinique dans le traitement du cancer cutané de lymphome T, réprime l'expression sélective de HDAC7 (19). Par ailleurs, en utilisant de petits ARN interférences, il a été démontré que HDAC7 est un modulateur clé de la migration des cellules endothéliales et de l'angiogenèse, au moins en partie, par la régulation de l'expression du gène PDGF-Bb/PDGFR- (20). Étant donné que l'angiogenèse est nécessaire pour la progression tumorale, ces données renforcent l'idée que les molécules capables d'interférer avec HDAC7 peuvent être bénéfiques en thérapeutique anti-cancéreuse.

Conclusion

Le défi pour le cancer du pancréas est la détection des premières lésions à un stade précoce asymptomatique qui permet une résection curative et probablement une grande chance de guérison. Dans la présente étude, nous avons montré que la surexpression de HDAC7 est associée à l'adénocarcinome du pancréas. Cependant, il n'est pas évident de savoir à l'heure actuelle si cette augmentation est une cause ou une conséquence de la progression tumorale. Ces observations sont en faveur de l'expression différentielle du gène HDAC7 dans le cancer du pancréas et suggèrent que HDAC7 pourrait constituer un marqueur potentiel et/ou une cible thérapeutique potentielle.

Références

1. Levy P, Ruszniewski P, Sauvannet A. Traité de pancréatologie. Médecine-science Flammarion. Paris-France 2005. p. 152-215.
2. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. J Clin Oncol 1997 ; 15 : 2403-13.
3. Bai J, Sui J, Demirjian A, Vollmer CM, Jr., Marasco W, Callery MP. Predominant Bcl-XL knockdown disables antiapoptotic mechanisms: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-based triple chemotherapy overcomes chemoresistance in pancreatic cancer cells in vitro. Cancer Res 2005 ; 65 : 2344-52.
4. Ouaissi M, Sielezneff I, Silvestre R, Sastre B, Bernard JP, Lafontaine JS, et al. High histone deacetylase 7 (HDAC7) expression is

significantly associated with adenocarcinomas of the pancreas. Ann Surg Oncol 2008 ; 15 : 2318-28.
5. Cascallo M, Calbo J, Capella G, Fillat C, Pastor-Anglada M, Mazo A. Enhancement of gemcitabine-induced apoptosis by restoration of p53 function in human pancreatic tumors. Oncology 2005 ; 68 : 179-89.
6. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. Cancer Res 1997 ; 57 : 1731-4.
7. Moore PS, Orlandini S, Zamboni G, Capelli P, Rigaud G, Falconi M, et al. Pancreatic tumours: molecular pathways implicated in ductal cancer are involved in ampullary but not in exocrine nonductal or endocrine tumorigenesis. Br J Cancer 2001 ; 84 : 253-62.
8. Sorio C, Baron A, Orlandini S, Zamboni G, Pederzoli P, Huebner K, et al. The FHIT gene is expressed in pancreatic ductular cells and is altered in pancreatic cancers. Cancer Res 1999 ; 59 : 1308-14.
9. Biankin AV, Kench JG, Morey AL, Lee CS, Biankin SA, Head DR, et al. Overexpression of p21(WAF1/CIP1) is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia. Cancer Res 2001 ; 61 : 8830-7.
10. Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. Curr Opin Genet Dev 1999 ; 9 : 40-8.
11. Ouaissi M, Ouaissi A. Histone deacetylase enzymes as potential drug targets in cancer and parasitic diseases. J Biomed Biotechnol 2006 ; 2006 : 13474.
12. Ouaissi M, Cabral S, Tavares J, da Silva AC, Mathieu Daude F, Mas E, et al. Histone deacetylase (HDAC) encoding gene expression in pancreatic cancer cell lines and cell sensitivity to HDAC inhibitors. Cancer Biol Ther 2008 ; 7 : 523-31.
13. Garcia-Morales P, Gomez-Martinez A, Carrato A, Martinez-Lacaci I, Barbera VM, Soto JL, et al. Histone deacetylase inhibitors induced caspase-independent apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma cell lines. Mol Cancer Ther 2005 ; 4 : 1222-30.
14. Donadelli M, Costanzo C, Faggioli L, Scupoli MT, Moore PS, Bassi C, et al. Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, strongly suppresses growth of pancreatic adenocarcinoma cells. Mol Carcinog 2003 ; 38 : 59-69.
15. Bai J, Demirjian A, Sui J, Marasco W, Callery MP. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A and proteasome inhibitor PS-341 synergistically induce apoptosis in pancreatic cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2006 ; 348 : 1245-53.
16. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. Clin Cancer Res 2000 ; 6 : 2969-72.
17. Ebert M, Yokoyama M, Friess H, Kobrin MS, Buchler MW, Korc M. Induction of platelet-derived growth factor A and B chains and over-expression of their receptors in human pancreatic cancer. Int J Cancer 1995 ; 62 : 529-35.
18. Friess H, Yamanaka Y, Buchler M, Berger HG, Kobrin MS, Baldwin RL, et al. Enhanced expression of the type II transforming growth factor beta receptor in human pancreatic cancer cells without alteration of type III receptor expression. Cancer Res 1993 ; 53 : 2704-7.
19. Dokmanovic M, Perez G, Xu W, Ngo L, Clarke C, Parmigiani RB, et al. Histone deacetylase inhibitors selectively suppress expression of HDAC7. Mol Cancer Ther 2007 ; 6 : 2525-34.
20. Mottet N, Castagnola C, Rischmann P, Deixonne M, Guyot M, Coloby P, et al. [Quality of life after cystectomy: French national survey conducted by the Association francaise d'urologie (AFU), the Federation des stomises de France (FSF) and the Association francaise des enterostomatherapeutes (AFET) in patients with ileal conduit urinary diversion or orthotopic neobladder]. Prog Urol 2008 ; 18 : 292-8.