

Caractérisation d'un nouvel oncogène du cancer du pancréas

Isolation of a new oncogene in pancreatic cancer

B Beluchon, M Dufresne, L Buscail

Inserm UMR1037, CHU Toulouse

Mots clés

- ◆ Adénocarcinome pancréatique
- ◆ Trip12
- ◆ P48
- ◆ PaniN
- ◆ Oncogène

Résumé

Introduction. L'adénocarcinome canalaire du pancréas est un cancer de mauvais pronostic du fait du diagnostic souvent tardif et à un stade déjà avancé, de plus il n'existe que peu de traitements. La chirurgie qui est le seul traitement curatif est accessible à seulement 15 % des patients avec un pronostic à moyen terme qui reste mauvais pour ceux-ci. Il paraît donc indispensable de découvrir pour ce cancer de nouvelles cibles thérapeutiques ou de nouveaux marqueurs tumoraux.

Le facteur de transcription PTF1-P48 est connu pour intervenir dans la différenciation pancréatique, le maintien du phénotype acinaire ainsi que pour son rôle antiprolifératif. La disparition de l'expression de P48 serait donc un des facteurs qui pourrait jouer un rôle important au cours de carcinogénèse des tumeurs pancréatiques.

Nous avons cherché à mettre en évidence un nouveau partenaire de PTF1-P48 qui interviendrait dans sa dégradation et jouerait donc un rôle oncogénique, ce partenaire est la protéine TRIP12. TRIP12 est une protéine qui appartient à la famille des E3 ubiquitine ligase dont le rôle est de cibler des protéines pour induire leur dégradation par le protéasome. Les travaux préliminaires de l'équipe ont déjà permis de montrer une interaction *in vitro* des deux protéines, ainsi que P48 est dégradé par le protéasome.

Objectif. L'objectif de mon travail était donc de montrer l'action de TRIP12 sur la dégradation de P48, son effet sur la prolifération des cellules tumorales, et de caractériser son expression dans des tissus pré-néoplasiques de pancréas.

Résultats. Pour atteindre cet objectif, j'ai tout d'abord confirmé l'effet antiprolifératif de P48 grâce à un premier modèle cellulaire. Puis j'ai essayé de créer un deuxième modèle cellulaire surexprimant TRIP12 et P48 de façon conjointe pour bien mettre en évidence leur interaction. J'ai ensuite caractérisé l'expression de TRIP12 dans les différentes lignées cellulaires étudiées dans le cancer du pancréas. Et enfin j'ai mis en évidence grâce à une analyse histologique l'expression très précoce de TRIP12 au cours de la carcinogénèse pancréatique.

Conclusion. TRIP12 semble bien jouer un rôle pro-oncogénique de par son interaction avec P48 facteur anti-oncogénique, il pourrait donc constituer une cible thérapeutique ou un marqueur diagnostique intéressant, cependant pour pouvoir affirmer ce rôle il faut poursuivre les travaux que j'ai entamés afin de montrer ce rôle tout d'abord *in-vitro* par la création d'un modèle cellulaire puis démontrer cette interaction *in-vivo*.

Keywords

- ◆ Pancreatic adenocarcinoma
- ◆ Trip12
- ◆ P48
- ◆ PaniN
- ◆ Oncogene

Abstract

The pancreatic ductal adenocarcinoma is already known as being a poor prognostic disease. The only curative treatment is the surgical resection which is only accessible for 15% of the patients and with a bad 5-years survival rate. This tumor entity is associated with a high degree of drug resistance. These facts show the importance to find new therapeutic targets.

PTF1-P48 is well known as being a transcription factor during pancreatic differentiation, maintain of acinar phenotype and as playing an antiproliferative role. Therefore, the loss of expression of P48 could play an important role during pancreatic oncogenesis.

We identified the protein TRIP12 as being a new partner of P48. TRIP12 belong to the family of the E3 ubiquitin ligase, the role of this family of protein is to target different proteins to induce their degradations by the proteasome. The preliminary works of the team have already demonstrated an interaction of the two proteins *in vitro*, and that P48 is degraded by the proteasome.

The purpose of this work was to show the action of TRIP12 on the degradation of P48, its effect on the proliferation of tumoral cells, and to characterize its expression in pancreatic pre-neoplastic tissues.

To achieve this goal, I have confirmed the antiproliferative effect of P48 with a first cell model. Then I tried to create a second cell model overexpressing P48 and TRIP12 jointly to properly highlight their interaction. Then I characterized the expression of TRIP12 in various cell lines used in pancreatic cancer research. And finally I highlighted with a histological analysis the early expression of TRIP12 during pancreatic carcinogenesis.

To conclude, TRIP12 seems to play a pro-oncogenic role by its interaction with P48 anti-oncogenic factor, it could be a new therapeutic target or diagnostic marker. However, in order to claim this role, we must continue the work to show this role *in vitro* with a new cellular model then *in-vivo*.

Correspondance :

Dr Benoît Beluchon

Service de chirurgie digestive, Hôpital Purpan, place du Dr Baylac, TSA 40031, 31059 Toulouse cedex 9

E-mail : b.beluchon@voila.fr

Disponible en ligne sur www.academie-chirurgie.fr

1634-0647 - © 2013 Académie nationale de chirurgie. Tous droits réservés.

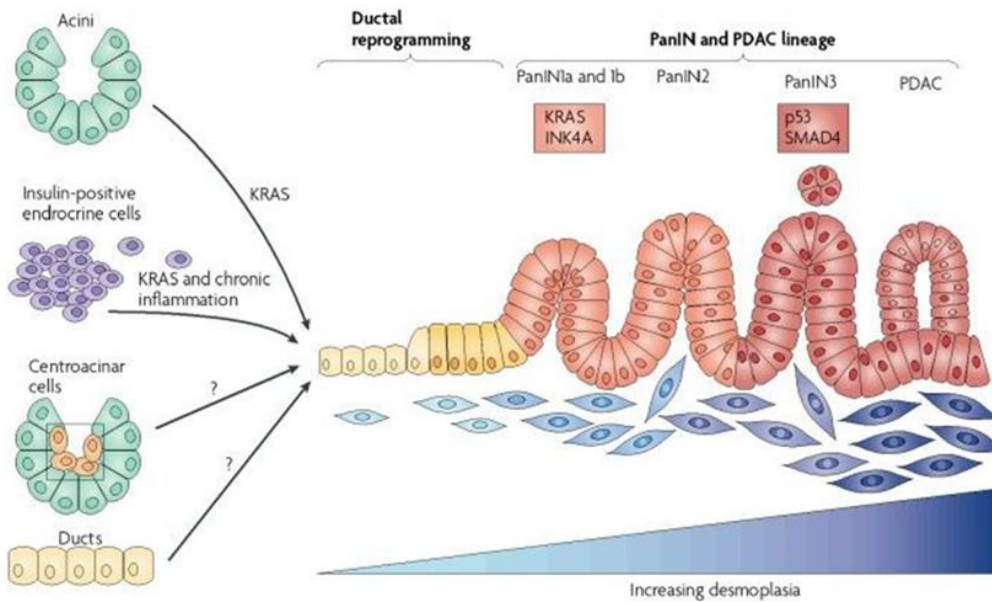


Figure 1. Processus d'initiation et de progression des lésions pré-neoplasiques d'après Morris (1,2). Les lésions d'adénocarcinome canalaire seraient issues de cellules acinaires, centro-acinaires, canalaire, au travers d'un processus de dédifférenciation ou de transdifférenciation acino-canalaire. Les gènes intervenant en tant qu'oncogène ou gène suppresseur de tumeur sont Kras, INK4A, P53 et SMAD

Le cancer du pancréas est un cancer peu fréquent avec une incidence de 8 000 nouveaux cas par an en France. Cependant son incidence en cours d'augmentation, et son pronostic sévère en font la quatrième cause de mortalité par cancer avec un taux de survie à cinq ans tous stades confondus de 5 % (1-3).

Cette mortalité importante est liée au fait que le plus souvent le diagnostic est fait à un stade tardif. En effet faire le diagnostic de ce cancer de façon précoce est difficile pour plusieurs raisons :

- Tout d'abord du fait de la localisation anatomique profonde du pancréas il n'y a que peu de symptômes initialement.
- Il n'existe à l'heure actuelle aucun moyen de dépistage tant biologique que morphologique qui soit suffisamment sensible et simple à mettre en place pour détecter les lésions avant l'apparition de symptômes.
- De plus, cette mortalité importante est aussi liée au fait que les moyens thérapeutiques sont à ce jour assez limités. En effet, le seul traitement curatif actuellement existant est la chirurgie, mais celle-ci n'est accessible qu'à des patients très sélectionnés qui présentent une tumeur sans dissémination à distance et avec un envahissement local limité, ce qui ne représente que 15 % des patients au moment du diagnostic, et même dans cette population sélectionnée le pronostic reste mauvais avec un taux de survie à cinq ans qui varie de 10 à 30 % selon les séries (4). Les autres thérapeutiques actuellement existantes n'ont donné à ce jour que des résultats décevants.
- Il est donc important de mieux comprendre les différentes étapes de la carcinogénèse pancréatique afin d'une part de trouver des marqueurs plus précoces de ce cancer et d'autre part de déterminer de nouvelles cibles thérapeu-

tiques.

Le pancréas est une glande à la fois exocrine et endocrine qui participe entre autres à la sécrétion des fluides digestifs par sa part exocrine et à la sécrétion d'insuline et de glucagon par sa part endocrine. Le phénotype le plus fréquent de cancer pancréatique et qui est celui étudié dans ce travail est l'adénocarcinome canalaire. L'adénocarcinome canalaire est développé à partir du tissu exocrine. Classiquement on pensait que les cellules canalaire étaient à l'origine de la carcinogénèse, cependant depuis plusieurs années de nombreux arguments semblent être en faveur d'une origine acinaire, en particulier l'étude de modèles murins présentant une mutation de l'oncogène K-ras et reproduisant ainsi spécifiquement la carcinogénèse pancréatique (5,6). L'origine acinaire de l'adénocarcinome canalaire a ainsi été mise en évidence au travers d'un processus qui pourrait être soit une transdifférenciation soit une dédifférenciation acino-canalaire (7-9).

Ce phénomène est visible d'un point de vue histologique sur les lésions de métaplasie acino-canalaire. En effet dans ces lésions les cellules acinaires perdraient leur phénotype acinaire au profit d'un phénotype canalaire (1,10). L'étude histologique a de plus permis d'identifier plusieurs types de lésions pré-neoplasiques qui ont été classées selon leur grade de sévérité dans l'évolution vers une lésion néoplasique, ce sont les lésions de PanIN (Pancreatic Intra épithélial Neoplasia) (11,12), (Fig.1).

Depuis plusieurs années une protéine a été suspectée comme pouvant être un élément important de ce processus, il s'agit de PTF1 ou P48 (Pancreatic Transcription Factor 1). Cette protéine de 48 kDa, membre de la famille des protéines bHLH (13), est un facteur de transcription important pour le développement et le maintien du phénotype acinaire des cellules du pancréas exocrine (14-16). Au cours de l'embryogénèse on sait notamment qu'il se produit une agénésie du pancréas si le gène de P48 est invalidé. Dans le pancréas adulte normal, l'expression de P48 est limitée aux cellules acinaires où elle est localisée principalement dans le compartiment nucléaire des cellules, elle y dirige la transcription de gènes intervenant dans la sécrétion d'enzymes digestives.

Dans les lésions pré-neoplasiques et néoplasiques, on constate la disparition de l'expression de P48 au fur et à mesure que

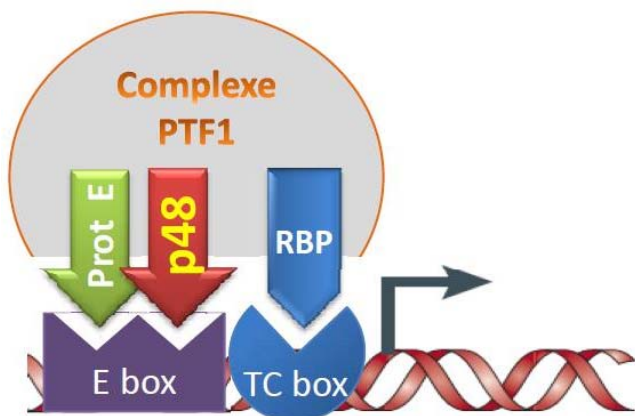


Figure 2. Complexe PTF1.

La protéine P48 est un facteur de transcription de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix), elle s'associe au sein du complexe PTF1 (Pancreatic Transcription Factor 1) avec la protéine RBP et la protéine E qui est responsable de la translocation nucléaire du complexe. Le complexe ainsi formé se lie aux séquences cibles d'ADN et permet la transcription des séquences cibles qui interviennent entre autres dans le maintien du phénotype acinaire.

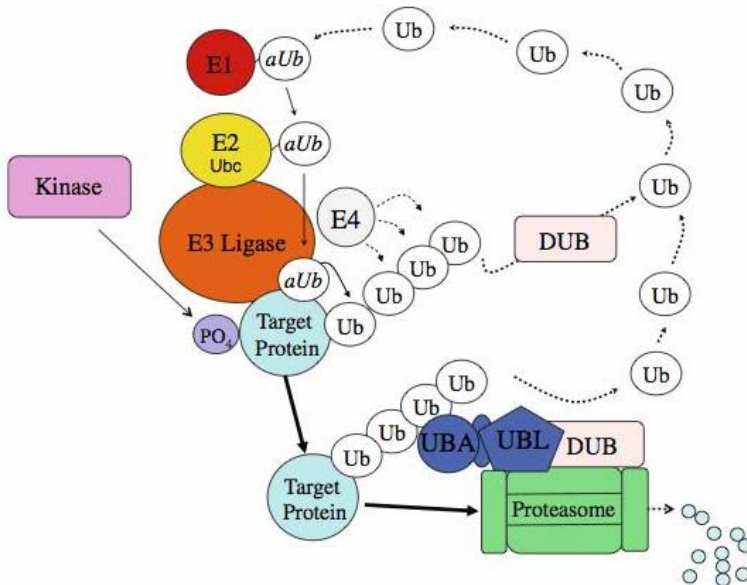


Figure 3. Processus d'ubiquitination. L'enzyme E1 d'activation de l'ubiquitine va activer l'ubiquitine en présence d'ATP puis la transférer ainsi activée sur l'enzyme de conjugaison E2, celle-ci va alors modifier une fois de plus l'ubiquitine et avec l'E3 ligase, lier l'ubiquitine à la protéine cible. C'est l'E3 Ligase qui joue le rôle de la reconnaissance spécifique entre l'ubiquitine et les différentes protéines cibles. Les protéines ainsi ubiquitinées sont reconnues puis dégradées par le protéasome.

morales acinaires (AR4-2J et 266.6), ou dans des lignées HEK293T transfectées. Ils ont aussi montré que P48 est ubiquitinée et dégradée par le protéasome et que TRIP12 est impliquée dans la dégradation de P48 par celui-ci. Cet effet n'existe plus quand l'activité d'ubiquitine ligase de TRIP12 est inhibée après mutation du site catalytique. L'objectif de ce travail est de confirmer l'action de P48, de TRIP12 et de leur interaction sur la prolifération des cellules néoplasiques tout d'abord par la création d'un modèle cellulaire qui confirme et ensuite en réalisant une étude histologique.

les lésions évoluent vers le stade de cancer (17,18) et il a de plus été montré que P48 est un facteur antiprolifératif (14). Mais finalement les mécanismes exacts régulant la distribution cellulaire de Ptf1-p48 ne sont pas bien compris et doivent être mieux définis car ils participent probablement à l'initiation de la transformation néoplasique des cellules acinaires au travers du processus de métaplasie acino-canalaire (Fig. 2). Dans ce travail nous avons donc cherché à étudier une des protéines qui interagissent avec P48, et qui interviendrait dans sa régulation. Les travaux préliminaires de l'équipe ont permis d'identifier par criblage double hybride une protéine qui pourrait intervenir dans la dégradation de P48 et donc dans l'induction de la carcinogénèse pancréatique, il s'agit de la protéine TRIP12 (Thyroid Receptor Interacting Protein 12). TRIP12 est une protéine de 1992 acides aminés qui de par la présence d'un domaine HECT (Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus) (19) possède une activité E3 ubiquitine-ligase qui lui permet donc de réaliser de façon spécifique la polyubiquitination de protéines cibles qui seront dégradées par le protéasome (20,21) (Fig. 3). Un des rôles actuellement connus de TRIP12 dans la cellule normale est de réguler la voie p53/Arf via la dégradation du suppresseur de tumeur Arf (22). Son rôle en pathologie est pour le moment inconnu. D'autres travaux préliminaires ont donc été réalisés dans l'équipe. Ils ont permis de montrer l'interaction des deux protéines présentes de façon endogène dans des lignées tu-

Matériel et méthodes

Biologie moléculaire

Il avait déjà été réalisé une mutagenèse dirigée du gène de TRIP 12 par PCR permettant la substitution d'une cystéine en position 1959 par une alanine entraînant une désactivation du site catalytique de la protéine. Les séquences codantes de TRIP 12 et TRIP 12 muté ont été intégrées dans différents plasmides afin d'obtenir sa surexpression :

- dans un vecteur pcDNA 6.2[™] (InvitroGen) permettant d'obtenir la séquence de TRIP 12 en fusion avec la GFP (Fig. 4) ;
- dans un vecteur pLenti4/TO/V5-DEST (Invitrogen) permettant de réaliser des transductions de TRIP 12 ou TRIP12 muté avec une sélection par la Zéocine (Fig. 5).

Les constructions de plasmides ont été produites par transformation de bactéries compétentes Shot[®] TOP10 chemically

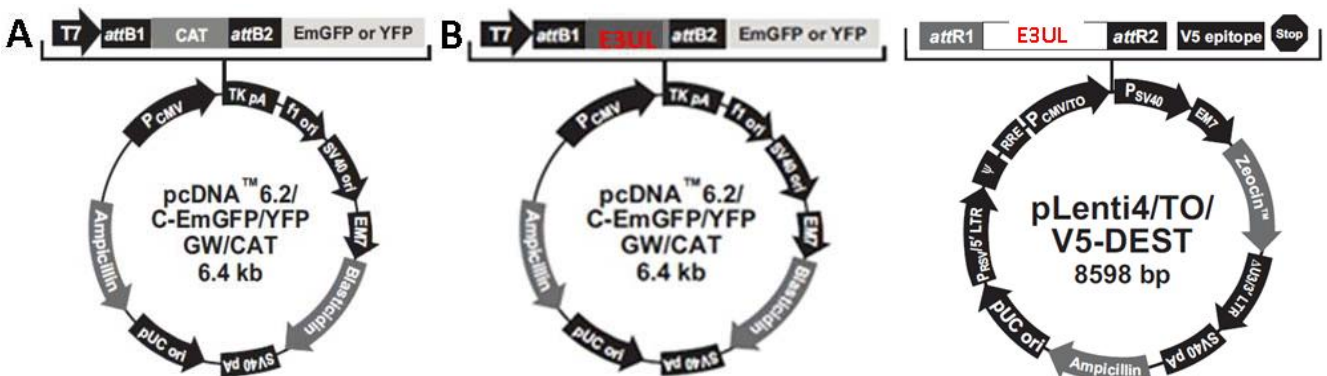
Figure 4. Le vecteur pcDNA 6.2.

Il est utilisé, A. en l'état (p6.2 pCAT) il code seulement pour la GFP ce qui permet d'avoir un témoin de transfection, B. la séquence codant pour Trip 12 ou Trip 12 muté a été clonée dans ce vecteur pour obtenir une protéine en fusion avec la GFP de façon à pouvoir contrôler les transfections plus simplement, la blasticidine a été utilisée comme agent de sélection.

Figure 5. Clonage de la séquence de TRIP 12 ou TRIP 12 muté dans le vecteur lentiviral pLenti/TO/V5-DEST.

Figure 6. Système permettant l'expression de P-48 par induction à la doxycycline.

Une double transfection des cellules MiaPaca 2 a été réalisée, tout d'abord avec le plasmide pTet-On (A) qui va permettre une expression par les cellules de la protéine Tet-On. Les cellules sont sélectionnées à l'aide de la géneticine puis clonées. La séquence codant pour P-48 a été clonée dans le vecteur pTRE (B), et les cellules exprimant Tet-on sont transfectées avec ce plasmide, sélectionnées à l'aide de l'hygromicine puis clonées. Les cellules ainsi transfectées vont donc produire la protéine Tet-On (sous contrôle du promoteur du CMV) qui en présence de doxycycline va venir interagir avec le promoteur TRE et induire la transcription du gène d'intérêt, ici P48 (C).



competent *E. coli* (Invitrogen). Celles-ci ont été sélectionnées et cultivées dans du milieu contenant de l'ampicilline (50µg/ml) et enfin l'ADN plasmidique a été isolé par Mini-préparation sur colonnes à l'aide du kit NucleoSpin[®] plasmid (Macherey-Nagel) ou par Maxi-préparation sur colonnes avec le Kit NucleoBond[®] Xtra (Macherey-Nagel). Les différentes constructions de plasmides ont été contrôlées par digestion par des endonucléases de restriction puis migration à voltage constant de 150 V sur gel d'agarose 0.8 % ainsi que par séquençage.

Culture cellulaire

Les différentes lignées qui ont été mises en culture

Les cellules HEK 293 T utilisées pour les transfections transitoires. Elles sont issues d'une lignée de cellule rénales humaines immortalisées et sont connues pour leur capacité à exprimer un transgène. Elles sont cultivées en milieu DMEM Glutamax[™] 4.5g/l de glucose (Gibco) associé à 10 % de Sérum de veau fœtal, 1 % d'un mélange d'antibiotiques et d'antifongiques (pénicilline, streptomycine et fungizone) et à de la plasmocine (25mg/ml). Les cellules sont incubées à 37°C sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂. Les cellules issues de lignées pancréatiques immortalisées :

- Les cellules MiaPaca 2 et Panc 1 sont des cellules humaines dérivées de cancers pancréatiques. De même elles sont cultivées en milieu DMEM Glutamax[™] 4.5g/l de glucose (Gibco) associé à 10 % de Sérum de veau fœtal, 1 % d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine et fungizone) et à de la plasmocine (25mg/ml). Les cellules sont incubées à 37°C sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂.
- Les cellules Capan 1, Capan 2 et Bxpc-3 sont elles aussi des cellules humaines dérivées de cancer pancréatique. Elles sont cultivées en milieu RPMI 1640 1x[™](Gibco) associé à 10 % de sérum de veau fœtal, 1 % d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine et fungizone) et à de la plasmocine (25mg/ml). Elles sont incubées à 37°C sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂.
- Les cellules HPNE sont elles aussi des cellules immortalisées issues de cellules pancréatiques humaines. Elles sont cultivées en milieu M3 base-A[™] (Incell) 25 % associé à du milieu DMEM Glutamax[™] 4.5g/l de glucose (Gibco) contenant de l'EGF 10mg/ml, de la gentamycine 50mg/ml, et 5 % de sérum de veau fœtal. Elles sont incubées à 37°C sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂.
- Les cellules MiaPaca 2 exprimant P48 de façon inducible à la doxycycline ont été obtenues après double transfection par le système pTet-on[®] (Clontech) (Fig. 6). Elles sont cultivées avec le milieu complet des cellules MiaPaca 2 auquel sont ajoutés l'hygromicine et la généticine comme agents

de sélection.

Induction des clones MiaPaca2 - P48 par la doxycycline

Un million de cellules sont ensemencées dans une boîte de diamètre 10 cm avec 10 ml de milieu complet. Les cellules sont incubées 24h puis de la doxycycline à des concentrations de 1 à 1 000 ng/ml est ajoutée au milieu, les cellules sont mises à incuber en étuve à 37°C pendant 48h puis l'extraction des protéines est réalisée.

Prolifération cellulaire

Les tests de prolifération ont été réalisés par ensemencement de 25 000 cellules par puits de 3 cm en triplet par jour de comptage, par lignée cellulaire à tester, avec 2 ml de milieu de culture complet. Chaque jour de comptage, les trois puits ensemencés sont donc trypsinés et comptés à l'aide du Coulter Counter (Beckmann). Les résultats sont ensuite analysés à l'aide du logiciel Microsoft Excel avec calcul des intervalles de confiance.

L'induction de la sécrétion de P48 lors des tests de prolifération a été réalisée par adjonction de doxycycline au milieu de culture pour obtenir une concentration finale de 1 µg/ml. Cette dose de doxycycline a été renouvelée tous les jours du test étant donné la demi-vie courte de la doxycycline et sa photosensibilité.

Transfert de gènes

Transfection cellulaire

Un million de cellules est ensemencé dans des boîtes de 10 cm de diamètre avec 10 ml du milieu approprié pendant 24h. Les transfections sont réalisées au PEI (Polyéthylèneimine à 1mg/ml) à un rapport PEI/ADN de 3 pour 1 dans du DMEM 4.5 g/l de glucose. Les plasmides qui ont été utilisés pour les transfections sont : *p6.2 p CAT*, *p6.2 Trip 12*, *p6.2 Trip 12 muté*, *plenti4 Trip12*, *plenti4 Trip 12 muté*. Dans le cas d'une transfection transitoire les cellules sont trypsinées et récupérées pour analyse 48h après transfection. Dans le cas d'une transfection stable, le milieu des cellules est remplacé par du milieu complet le lendemain et l'agent de sélection est ajouté au 2^{ème} jour, les cellules qui ont résisté à la sélection sont cultivées en milieu complet avec l'agent de sélection.

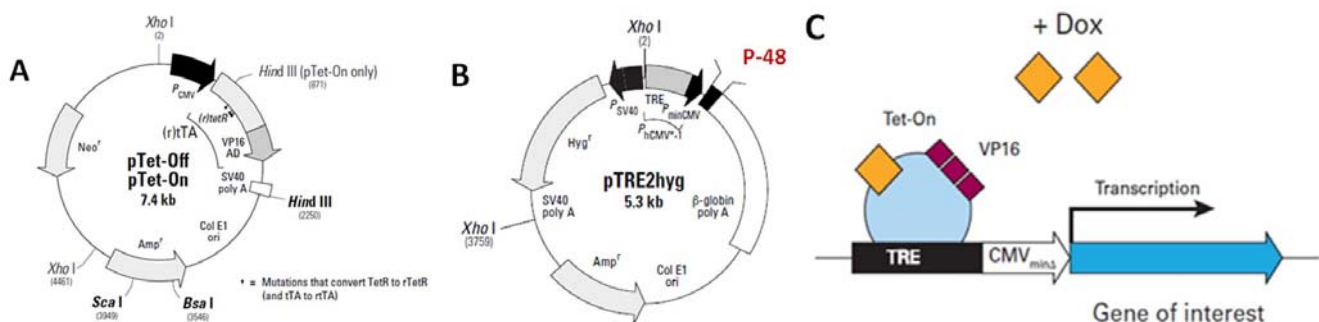
Transduction cellulaire

Quatre lentivecteurs ont été utilisés :

- un lentivecteur codant pour la G-luciférase qui permet de suivre la prolifération cellulaire par dosage de l'activité luciférase du surnageant de culture ;
- le lentivecteur P Lenti 4 Trip12 qui code pour Trip12 associé

Figure 6. Système permettant l'expression de P-48 par induction à la doxycycline.

Une double transfection des cellules MiaPaca 2 a été réalisée, tout d'abord avec le plasmide pTet-On (A) qui va permettre une expression par les cellules de la protéine Tet-On. Les cellules sont sélectionnées à l'aide de la généticine puis clonées. La séquence codant pour P-48 a été clonée dans le vecteur pTRE (B), et les cellules exprimant Tet-on sont transfectées avec ce plasmide, sélectionnées à l'aide de l'hygromicine puis clonées. Les cellules ainsi transfectées vont donc produire la protéine Tet-On (sous contrôle du promoteur du CMV) qui en présence de doxycycline va venir interagir avec le promoteur TRE et induire la transcription du gène d'intérêt, ici P48 (C)



- à un gène de sélection par la zéocine ;
- le lentivecteur P Lenti 4 Trip12 muté qui code pour Trip12 associé à un gène de sélection par la zéocine ;
- un lentivecteur codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein) associé à un gène de sélection par la zéocine afin d'avoir un témoin positif de transduction.

Les cellules sontensemencées à une densité de 25 000 cellules par puits de 1 cm et cultivées 24h dans une boîte de 48 puits puis elles sont lavées à l'aide de PBS, le milieu est remplacé par du milieu OptiMEM (Gibco), le lentivecteur est alors déposé dans chaque puits avec de la protamine. Le milieu est remplacé le lendemain par le milieu de culture complet des lignées, la sélection par antibiotique est commencée au 5^{ème} jour.

Les contrôles de transfections et de transduction ont été réalisés par cytométrie de flux ou par immuno-cyto-fluorescence lorsque le gène d'intérêt est lié à la GFP, ainsi que par Western Blot, Rt-PCR et PCR.

Mesure de l'activité luciférase

Une quantité de 50 µl de surnageant de culture est prélevée chaque jour lors des tests de prolifération. Chaque échantillon est dilué de la même façon dans du PBS et incubé 30 minutes avec de la coelenterazine, la luminescence de chaque échantillon est ensuite mesurée (Luminoscan Thermo®).

Extraction protéique

Extraction des protéines totales : Les cellules sont d'abord rincées au PBS puis lysées soit en boîte de 10 cm soit directement sur un culot sec. Le tampon de lyse utilisé est constitué d'*Hepes pH 7.5 à 50mM, NaCl 150 mM, Glycérol 10 %, Triton X-100 1 %, EGTA 1 mM, MgCl2 1mM* auquel sont ajoutés : des inhibiteurs de protéase 0.1 %, le STI et du Na3Vo4 1mM. Après incubation à 4°C les extraits sont centrifugés puis le surnageant contenant les protéines est récupéré et la concentration en protéine est mesurée par dosage colorimétrique de Bradford® (BioRad).

Extraction séparée des protéines cytoplasmiques et nucléaires : Les cellules sont d'abord rincées au PBS puis un culot cellulaire est récupéré après grattage et centrifugation. Ce culot est ensuite traité par le tampon de lyse cytoplasmique (*10 mM HEPES pH7.9, 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM EGTA*) auquel sont ajoutés : des inhibiteurs de protéase 0.1 %, le STI et du Na3Vo4 1mM. Après incubation à 4°C il est ajouté du NP40 10 % et les extraits sont centrifugés, le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est isolé. Le tampon de lyse des noyaux est ensuite appliqué sur les culots (*20 mM HEPES pH7.9, Glycérol 25 %, 400mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA*) auquel est ajouté : des inhibiteurs de protéase 0.1 %, le STI et du Na3Vo4 1mM. Après incubation à 4°C les extraits sont centrifugés et le surnageant contenant les protéines nucléaires est isolé. Les protéines cytoplasmiques et nucléaires sont dosées selon un dosage colorimétrique à l'aide de la solution de Bradford® (Biorad).

Western Blot

Les migrations ont été réalisées sur des gels à 6 % d'acrylamide pour révéler Trip12 (225 KDa), sur des gels SDS-PAGE à 8 % d'acrylamide pour révéler P48 (48 KDa). La migration est réalisée en tampon *25mM Tris pH 8.8, 192 mM Glycine, SDS 0.1 %* en appliquant un courant à voltage constant de 150 V. Un transfert sur membrane de nitrocellulose est ensuite réalisé en tampon *25mM Tris pH 8.8 ; 192 mM Glycine ; 20 % EtOH 70°* en appliquant un courant à ampérage constant de 500 mA. Il est ensuite réalisé une saturation par un bain de TBS-Tween 0.1 %, 5 % lait écrémé. L'anticorps primaire est incubé pendant la nuit dilué dans du TBS-Tween 0.1 %, 5 % lait écrémé. L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase

est incubé pendant 1h à température ambiante dilué dans du TBS-Tween 0.1 %, 5 % lait écrémé, après lavage de la membrane dans du TBS-Tween 0.1 %. La révélation est réalisée sur film à l'aide du kit de chimioluminescence supersignal® (Thermo-scientific) contenant le substrat chimioluminescent de la peroxydase.

Rt-PCR, PCR

L'extraction de l'ADN cellulaire a été réalisée selon le protocole Wizard Genomic® DNA purification Kit (Promega) par lyse cellulaire puis précipitation. L'extraction de l'ARN cellulaire a été réalisée selon le protocole TRIzol Reagent (Invitrogen) par lyse cellulaire, séparation de phase après centrifugation et précipitation.

Les séquences codantes pour Trip12 et pour Trip 12 lié à la GFP ont pu être amplifiées par PCR (Polymerase Chain Reaction) grâce à la polymérase AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems) soit à partir d'extraits d'ADN issues des différentes lignées cellulaires soit à partir d'ADN complémentaires obtenues à partir d'extraits d'ARN des différentes lignées cellulaires grâce à la transcriptase inverse SuperScript3® (Invitrogen). Les séquences amplifiées ont ensuite été contrôlées par migration sur un gel d'agarose à 1.5 %.

Immuno-Cyto-Fluorescence

Chaque lignée cellulaire étudiée estensemencée sur lame quatre puits Labtek®. Après 48h les puits sont lavés avec du PBS puis les cellules sont fixées et perméabilisées à l'aide du kit Dako Intrastain®. Un blocage des sites non spécifiques est réalisé grâce à la solution Protein Block (Dako) et les lames sont incubées pendant la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire. Le lendemain après lavage au PBS, les lames sont incubées avec l'anticorps secondaire fluorescent puis avec du DAPI qui permet d'obtenir une fluorescence bleue des noyaux. Les lames sont ensuite montées et analysées au microscope à l'aide d'une lampe à fluorescence.

Immuno-Histo-Chimie

Les coupes histologiques étudiées ont été obtenues à partir de deux types d'échantillons :

- Modèle murin Kras muté :
 - Des souris LSL-Kras G12D /+ et Pdx1-Cre +/- ont été croisées pour obtenir des souris LSL-Kras G12D /+ / Pdx1-Cre+/- . Ces souris Kras mutées développent des lésions pré-néoplasiques et des tumeurs pancréatiques.
 - Prélèvement humains :
 - Des coupes de pancréas humain présentant des lésions pré-néoplasiques ont été obtenues auprès du service d'anatomopathologie du CHU de Toulouse.

Les coupes de pancréas sont incluses en paraffine, elles sont tout d'abord déparaffinées par incubation en étuve à 65°C pendant la nuit puis par bains successifs de xylène, les coupes sont ensuite réhydratées par des bains successifs d'éthanol de concentration décroissante. Un démasquage des sites antigéniques est réalisé dans un bain de citrate de sodium (pH 6) à ébullition. Un blocage des sites non spécifiques est ensuite réalisé à l'aide du réactif Protein Block (Dako). Les coupes sont ensuite incubées pendant la nuit à 4°C après lavage dans du TBS Tween 0.05 % soit avec l'anticorps anti Trip12 soit avec une solution contenant l'anticorps bloqué par le peptide immunogène de manière à obtenir un marquage témoin négatif.

Un lavage des lames est ensuite réalisé dans du TBS Tween 0.05 % puis celles-ci sont incubées dans un bain de méthanol-H2O2 afin de bloquer la peroxydase endogène. Après lavage dans du TBS Tween 0.05 % BSA 1 %, les lames sont incubées 1h avec l'anticorps secondaire puis l'anticorps tertiaire couplés à

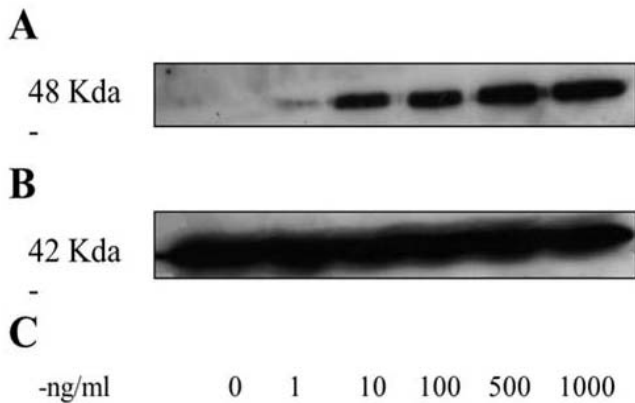


Figure 7. Induction de l'expression de P48. L'induction est réalisée avec des concentrations croissantes de doxycycline dans le milieu de culture (C), puis 60µg d'extrait protéique total de ces cellules est déposé et migré sur SDS-PAGE puis les membranes obtenues après transfert sont hybridées avec un Ac anti P48 (A) et un anticorps anti β -Actine (B).

la peroxydase. La révélation est ensuite réalisée par incubation avec de l'AEC ou de la DAB (Dako) qui sont des substrats chromogènes de la peroxydase. Les lames sont lavées à l'eau courante puis une contre-coloration par un bain dans de l'hématoxyline est effectuée. Enfin les lames sont montées sur lamelles après lavage à l'eau courante. Les coupes sont ensuite observées au microscope Nikon E400.

Anticorps utilisés pour les méthodes d'immunohisto-chimie, de western Blot, et d'immuno-cyto-fluorescence

L'anticorps qui cible la GFP est un anticorps monoclonal de souris (Santa Cruz). Il est utilisé au 1/200 pour les Western Blot et l'immuno-cyto-fluorescence.

L'anticorps qui cible P48 est un anticorps polyclonal de lapin produit par l'équipe. Il est utilisé au 1/2000 pour les Western Blot.

L'anticorps qui cible TRIP12 est un anticorps polyclonal de lapin (Bethyl). Il est utilisé au 1/5000 pour les Western blot.

Résultats

Validation du modèle cellulaire MiaPaca2 P48

Nous avons en culture, du fait des travaux préliminaires de l'équipe, des cellules MiaPaca 2 qui peuvent exprimer la protéine P48 de façon inductible par la doxycycline, nous avons donc cherché à valider ce modèle cellulaire et tester l'effet de l'induction de P48 sur la prolifération cellulaire.

Dans un premier temps, il a donc été réalisé une induction à des doses croissantes de doxycycline de ces clones cellulaires, l'expression de P48 a ensuite été mesurée par western blot après dépôt et migration d'extraits protéiques totaux sur un gel d'acrylamide. Nous avons ainsi pu confirmer que dans ce modèle cellulaire l'expression de P48 est bien induite de façon dose dépendante par la doxycycline (Fig. 7).

Dans un second temps nous avons réalisé un test de prolifération de ce modèle cellulaire en induisant ou non l'expression de P48 qui nous a permis de mesurer une inhibition de 33 % de la prolifération des cellules qui ont été stimulées (Fig. 8).

Transduction de la G-luciférase et test de prolifération

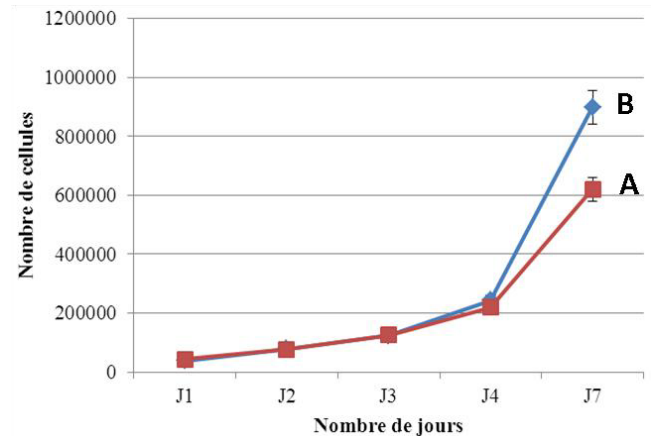


Figure 8. Prolifération des cellules MiaPaca 2 en induisant (A) ou non (B) l'expression de P48 à l'aide de doxycycline, la concentration finale de doxycycline utilisée dans le milieu était de 1µg/ml, l'intervalle de confiance à 95% est représenté sur la courbe.

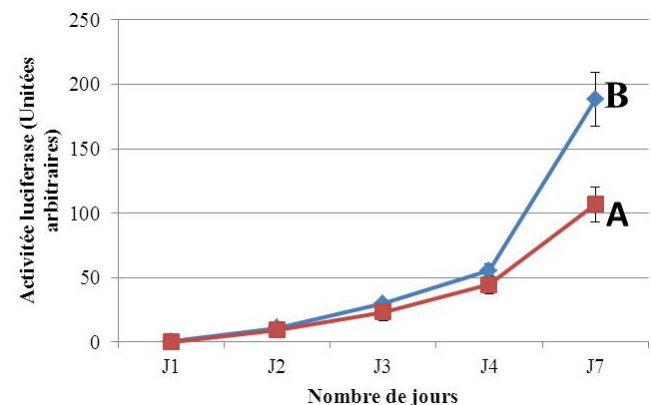
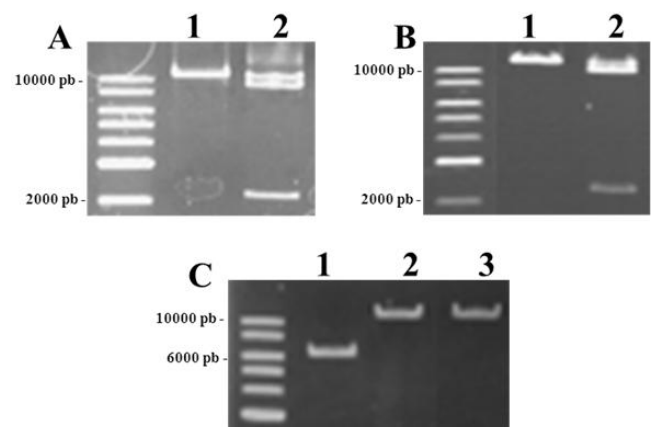
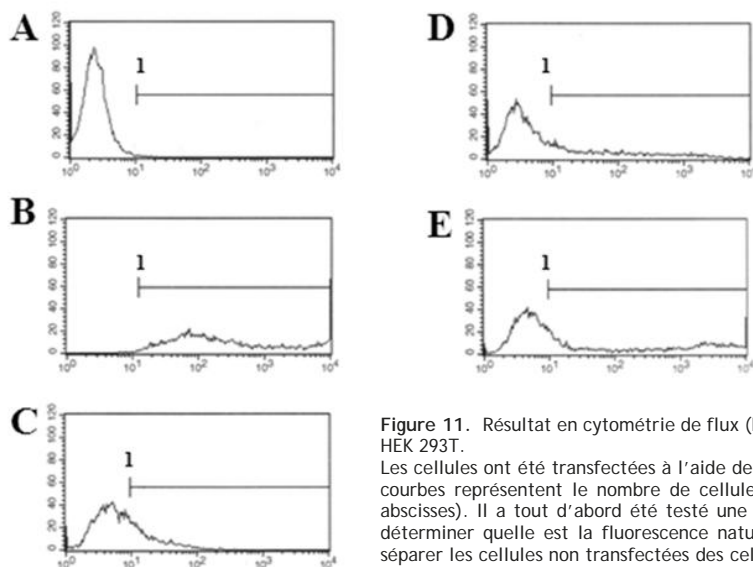


Figure 9. Mesure de l'activité luciférase des cellules MiaPaca 2-P48 transduites par la G-luciférase en induisant (A) ou non (B) l'expression de P48 à l'aide de doxycycline, la concentration finale de doxycycline utilisée dans le milieu était de 1µg/ml, l'intervalle de confiance à 95 % est représenté sur la courbe

Figure 10. Les plasmides p6.2 Trip 12, p6.2 Trip 12 muté et p6.2 pCAT ont été produits et sont contrôlés par digestion enzymatique et migration sur gel d'agarose à 0.8%.

A. Digestion du plasmide p6.2 Trip 12 par EcoR1 (1) et Xho I (2) qui permet de retrouver comme attendu respectivement le plasmide linéarisé et le plasmide en deux fragments de 9588 et 2250 pb. B. Digestion du plasmide p6.2 Trip 12 muté par Mlu1 (1) et Xho I (2) qui permet de retrouver comme attendu respectivement le plasmide linéarisé et le plasmide en deux fragments de 9588 et 2250 pb. C. Digestion des trois plasmides p6.2 pcat (1) (3557 pb), p6.2 Trip 12 (2) (11838 pb) et p6.2 Trip 12 muté (3) (11838 pb) par Mlu 1 qui permet d'obtenir la linéarisation des plasmides sans atteindre de séquence codante.





Lignée cellulaire	Pourcentage de
A. HEK 293T non transfectées	0.38%
B. HEK 293T GFP	99.39%
C. HEK 293T p6.2-	45.63%
D. HEK 293T P6.2	32.35%
E. HEK 293T p6.2 Trip 12 muté	29.09%

Figure 11. Résultat en cytométrie de flux (FACS) des transfections transitoires réalisées sur les cellules HEK 293T.

Les cellules ont été transfectées à l'aide de PEI, le comptage des cellules est réalisé en cytométrie de flux, les courbes représentent le nombre de cellules détectées (en ordonnées) par rapport à leur fluorescence (en abscisses). Il a tout d'abord été testé une lignée non transfectée (A) afin d'obtenir un témoin négatif et de déterminer quelle est la fluorescence naturelle des cellules, ce qui permet dans les comptages suivants de séparer les cellules non transfectées des cellules transfectées en plaçant une borne (1) à la limite de leur fluorescence naturelle. Quatre autres transfections ont donc été réalisées : Transfection à l'aide d'un plasmide codant seulement pour la GFP (B), transfection à l'aide du plasmide témoin p6.2pCAT (C), transfection avec le plasmide p6.2 Trip 12 (D) et enfin transfection avec le plasmide p6.2 Trip 12 muté (E). Les taux de transfection ont été reportés sur un tableau (F).

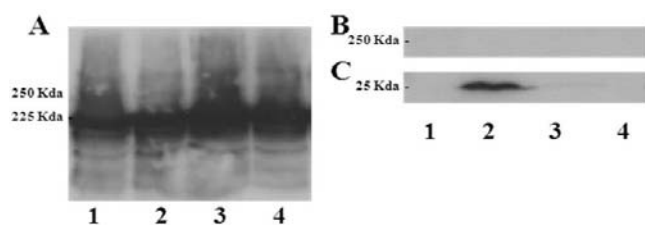


Figure 12. Les cellules MiaPaca2-p48 ont été transfectées de façon stable et des extraits protéiques totaux ont été réalisés à partir de celles-ci. Différentes transfections ont été réalisées : par le plasmide témoin p6.2 pCAT (2), par le plasmide p6.2 Trip 12 (3), par le plasmide p6.2 Trip 12 muté (4), de plus un extrait protéique a été réalisé à partir d'une lignée non transfectée (1), 160 µg de ces extraits ont été déposés sur un gel de SDS-PAGE à 6%. Après migration, transfert des protéines sur une membrane, l'incubation de la membrane avec un Ac anti-Trip 12 (A) permet de voir l'expression endogène de Trip 12 (225 KDa) et aurait dû permettre de voir la protéine de fusion de Trip12-GFP (250 KDa). Cette membrane a de plus été incubée avec un anticorps ciblant la GFP (B) qui ne permet pas non plus de retrouver de marquage des protéines de fusion. Ces mêmes extraits ont été déposés sur un gel de SDS-PAGE à 12% et les protéines révélées après incubation de la membrane avec un anticorps ciblant la GFP (C) ce qui permet de visualiser la GFP seule (25 KDa) dans la lignée transfectée avec le vecteur p6.2 pCAT.

Nous avons réalisé une transduction des cellules MiaPaca 2-P48 avec un lentivecteur codant pour la G-luciférase qui permet de suivre la croissance cellulaire en dosant l'activité luciférase par une réaction de chimioluminescence sur un prélèvement de milieu, donc de façon plus simple que le comptage des cellules.

Ce dosage nous permettra aussi de suivre la croissance tumorale dans un éventuel modèle in-vivo par de simples prélèvements sanguins.

Un dosage de l'activité luciférase réalisé au cours de la cinétique d'induction de l'expression de P48 permet de retrouver les mêmes résultats d'inhibition de croissance qu'en réalisant un comptage cellulaire (Fig. 9).

Création d'un modèle cellulaire MiaPaca 2 P48 Trip12

Nous avons tout d'abord contrôlé les plasmides p6.2 Trip12, et p6.2 Trip12 muté, ainsi que le témoin p6.2 pCAT par digestion enzymatique puis par migration sur gel d'agarose. De plus

nous avons réalisé une linéarisation de ces plasmides par digestion enzymatique afin d'obtenir une meilleure efficacité au moment de la transfection (Fig. 10).

Ensuite, afin de tester la bonne efficacité de transfection de ces plasmides et l'expression des transgènes, nous avons les avons utilisés pour réaliser une transfection transitoire de cellules HEK 293T conjointement avec un plasmide codant seulement pour la GFP comme témoin de transfection. Les transfections ont tout d'abord été contrôlées à l'aide d'un microscope à fluorescence qui n'a malheureusement pas permis de retrouver de fluorescence mise à part pour les cellules transfectées avec le témoin positif GFP. Nous avons donc réalisé un comptage en cytométrie de flux en recherchant le taux de cellules fluorescentes et donc exprimant la GFP seule ou liée à Trip12 ou à Trip12 muté, nous avons ainsi retrouvé un taux de transfection et d'expression de protéines fluorescentes variant de 27 à 45 % selon les plasmides utilisés (Fig. 11).

Dans un second temps, étant donné l'efficacité des transfections transitoires, nous avons réalisé des transfections stables des cellules MiaPaca 2-P48, en utilisant les plasmides p6.2pCAT, p6.2 Trip12, et p6.2 Trip12 muté. La sélection des cellules ayant intégré le plasmide dans leur génome a été réalisée en ajoutant de la blasticidine au milieu (10µg/ml). La sélection a entraîné la perte de nombreuses cellules, mais après trois semaines de culture nous avons pu obtenir quatre lignées cellulaires résistantes à la blasticidine et donc supposées exprimer les protéines codées par les différents plasmides p6.2.

Nous avons donc tout d'abord cherché à mettre en évidence l'expression des protéines en fusion avec la GFP par immunocyto-fluorescence en utilisant un anticorps ciblant la GFP, mais nous n'avons retrouvé aucune fluorescence.

Nous avons alors cherché, afin de confirmer ou d'infirmer ce résultat, à mettre en évidence la surexpression et l'expression des protéines Trip12 et Trip12 muté en fusion avec la GFP par migration d'extraits protéiques totaux obtenus après lyse cellulaire sur un gel de SDS-PAGE. Ces western blot n'ont permis de ne retrouver que l'expression de la GFP dans la lignée transfectée avec le plasmide témoin p6.2 pCAT ainsi que l'expression endogène de Trip12 (Fig.12).

Au total ce western blot montre l'absence d'expression des transgènes malgré l'acquisition des gènes de résistance à la blasticidine par les cellules.

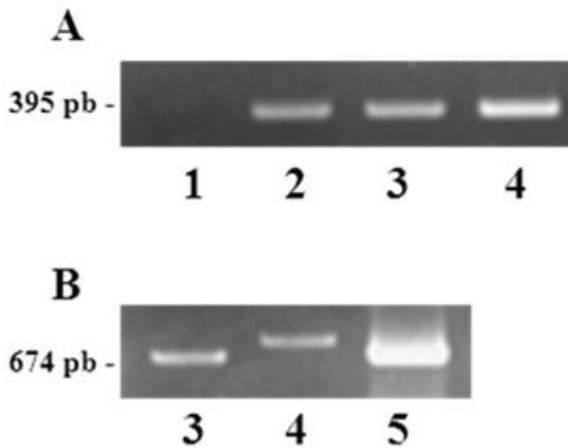


Figure 13. PCR sur les extraits d'ADN issus des lignées transfectées.

L'ADN extrait des lignées non transfectées (1), transfecté avec le plasmide p6.2 pCAT (2), transfecté avec le plasmide p6.2 Trip12 (3), transfecté avec le plasmide p6.2 Trip12 muté (4) ainsi que le plasmide pur p6.2 Trip12 (5) sont amplifiés par un couple d'amorces situé sur la région (395 pb) de la GFP (A) et un couple d'amorces situé sur une région (674 pb) recouvrant la fin de la séquence de la GFP et le début de la séquence de Trip12 (B).

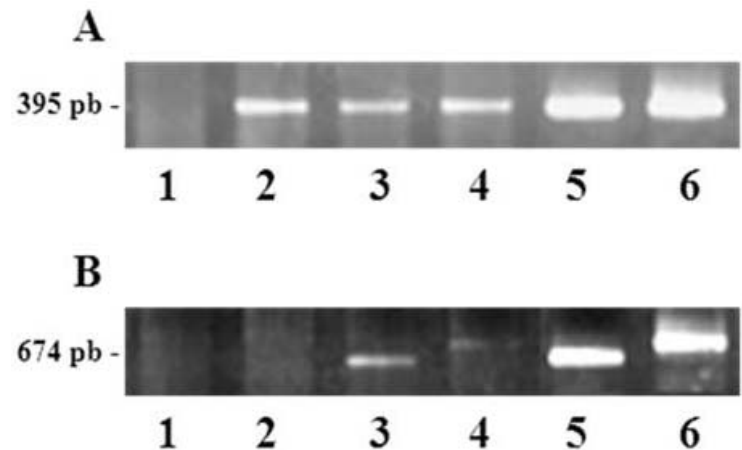


Figure 14. Rt-PCR sur les extraits d'ADN issus des lignées transfectées.

L'ADN extrait des lignées non transfectées (1), transfecté avec le plasmide p6.2 pCAT (2), transfecté avec le plasmide p6.2 Trip12 (3), transfecté avec le plasmide p6.2 Trip12 muté (4) ainsi que les plasmides purs p6.2 Trip12 (5) et p6.2 Trip12 muté (6) sont amplifiés par un couple d'amorces situé sur la région (395 pb) de la GFP (A) et un couple d'amorce situé sur une région (674 pb) recouvrant la fin de la séquence de la GFP et le début de la séquence de Trip12 (B).

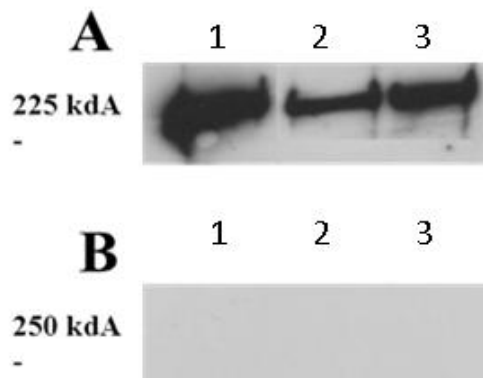
Nous avons donc émis l'hypothèse que la transfection avait bien fonctionné mais qu'un facteur empêchait l'expression des transgènes. Afin de déterminer à quel stade cette expression est inhibée nous avons décidé tout d'abord de mettre en évidence que l'ADN transfecté s'était bien intégré dans le génome des cellules cibles.

Nous avons donc réalisé une PCR ciblant les transgènes sur des extraits d'ADN cellulaire (Fig. 13). Ensuite nous avons cherché à mettre en évidence la transcription de cet ADN par RT-PCR (Fig. 14).

Nous avons pu tirer plusieurs conclusions de ces résultats : Les séquences plasmidiques sont bien présentes dans le génome des différentes lignées, et ceux-ci sont bien transcrits puisqu'on retrouve les fragments amplifiés en RT-PCR. Il semblerait donc que soit la traduction des ARNm n'est pas effectuée soit les protéines traduites sont immédiatement dégradées.

De plus on remarque qu'il existe une différence de taille entre les fragments amplifiés de la séquence de Trip12 et la séquence amplifiée de Trip12 muté qui indique une anomalie de la séquence du plasmide p6.2-Trip12 muté puisque la mutation ponctuelle ne concerne qu'un nucléotide.

Figure 15. Test d'inhibition du protéasome au MG132. Les cellules MiaPaca-P48-TRIP12 sont incubées 48h avec 0µg/ml (1), 10µg/ml (2), 25µg/ml (3) de MG132, puis les protéines sont extraites, et 10µg de protéines sont déposés sur un gel SDS-PAGE à 6%. La membrane obtenue après migration et transfert est incubée avec un anticorps anti-TRIP12 (A) ou un anticorps anti-GFP (B).

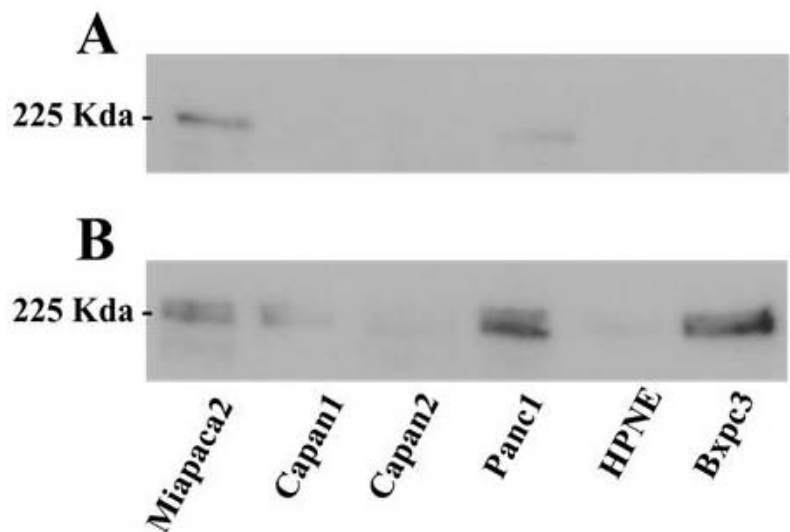


Nous avons donc réalisé un séquençage du plasmide p6.2 Trip12 muté qui montre que la séquence correspondant au primer de mutagenèse s'est répétée et a formé des concaténaires. La mutagenèse dirigée du plasmide p6.2 Trip12 a donc dû être réalisée de nouveau.

Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que dans les lignées transfectées la protéine Trip12 en fusion avec la GFP pouvait être dégradée par le protéasome, nous avons donc décidé d'utiliser le MG132 qui est un inhibiteur reconnu du protéasome sur les lignées transfectées afin de rechercher à nouveau à l'aide d'un Western blot une expression des transgènes (Fig. 15).

Ce Western-blot montre que ni la dégradation de TRIP12 endogène ni la dégradation de la protéine de fusion Trip12-GFP ne sont liées à l'activité du protéasome. L'hypothèse que nous avons émise précédemment est donc infirmée.

Figure 16. Comparaison de l'expression de Trip12 dans différentes lignées. Les lignées cellulaires MiaPaca2, Capan1, Capan2, Panc1, HPNE et Bxpc3 sont mises en culture et une extraction des protéines cytoplasmiques (A) et nucléaires (B) est réalisée puis 25 µg d'extraits protéiques sont mis à migrer sur un gel de SDS-PAGE à 6%. Les membranes obtenues sont incubées avec un anticorps anti Trip12.



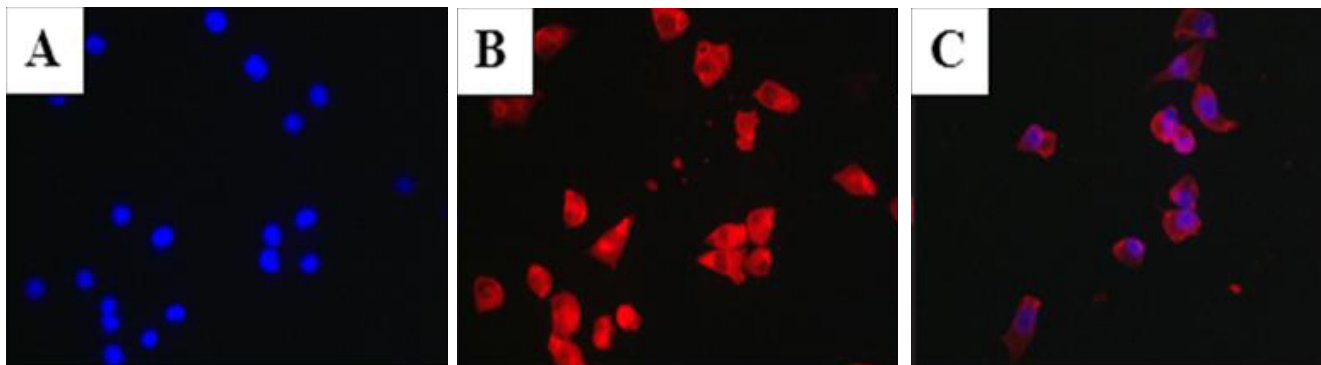


Figure 17. Immuno-cyto-fluorescence. Les cellules MiaPaca2-P48 ont été mises en culture sur des lames Labtek et incubées avec un anticorps anti TRIP12, puis avec un anticorps secondaire porteur d'un fluorochrome rouge et enfin avec du DAPI qui colore les noyaux en bleu, celles-ci ont ensuite été observées au microscope à fluorescence en faisant ressortir soit la fluorescence bleue (A) soit la fluorescence rouge (B) et une fusion des deux images a été réalisée (C). Grossissement X20

Étude de l'expression de Trip12 dans différentes lignées de cancer pancréatique

Vu l'échec des transfections de la séquence codante de Trip12 dans les cellules MiaPaca2-P48, nous avons décidé de comparer l'expression de Trip12 endogène dans différentes lignées cellulaires issues de cancer pancréatique afin de savoir quelle est la lignée exprimant le moins TRIP12 et donc dans laquelle il pourrait être le plus simple de surexprimer la protéine (Fig. 16).

On peut grâce à ce Western blot déterminer que les lignées MiaPaca2, Panc1 et Bxpc3 sont celles qui expriment le plus Trip12. De plus la protéine Trip12 a une concentration nucléaire plus importante que la concentration cytoplasmique dans toutes les lignées.

Immuno-cyto-fluorescence

L'analyse en immuno-cyto-fluorescence des cellules MiaPaca2-p48 transfectées avec les différentes constructions de plasmides p6.2 n'a permis de retrouver aucun marquage des protéines de fusion. Cependant nous avons réalisé un marquage fluorescent ciblant l'expression de TRIP12 endogène en utilisant l'anticorps anti TRIP12, qui permet de visualiser un marquage essentiellement cytoplasmique de TRIP12 et qui montre bien la présence de cette protéine de façon endogène dans les cellules MiaPaca2 (Fig. 17)

Transduction des cellules HPNE

Etant donné que les cellules HPNE font partie des lignées qui expriment le moins TRIP12 de façon endogène, nous avons décidé d'essayer de surexprimer la protéine dans ces lignées.

Figure 18. Etude Immuno-histo-chimique de l'expression de TRIP12 sur des coupes pancréatiques humaines.

Différentes coupes ont été incubées avec un anticorps ciblant TRIP12 et analysées, tout d'abord l'anticorps a été déposé sur une coupe de pancréas sain (A) ensuite sur des coupes de pancréas présentant des lésions pré-neoplasiques. Nous avons pu individualiser différentes lésions sur ces coupes : Métaplasie acino-canalaire (B), PanIN 1a (C), PanIN 1b (D), PanIN 2 (E), PanIN 3 (F). Grossissement 20X.

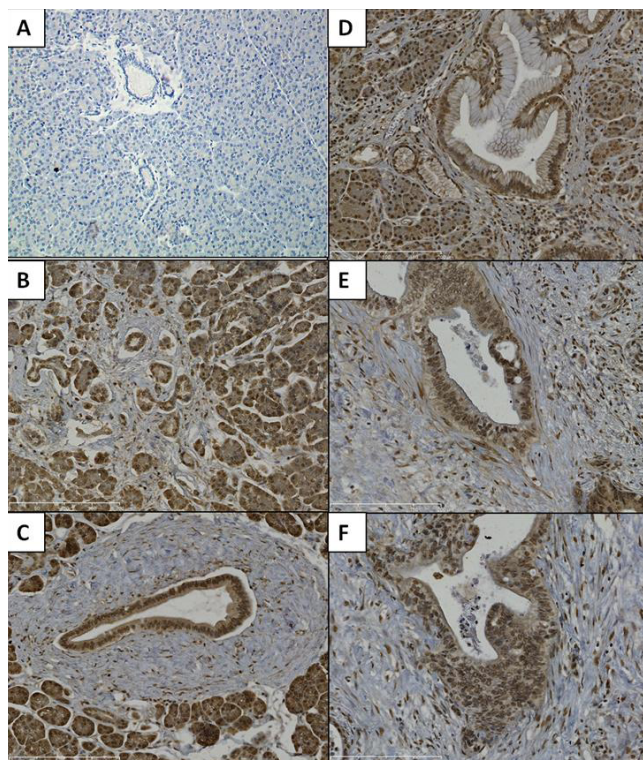
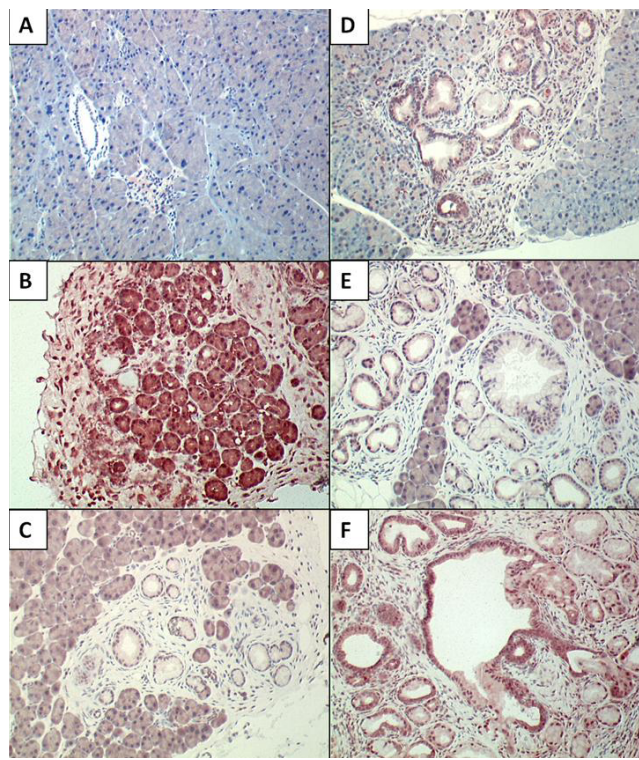


Figure 19. Etude Immuno-histo-chimique de l'expression de TRIP12 sur des coupes de pancréas de souris Kras muté.

Différentes coupes ont été incubées avec un anticorps ciblant TRIP12 et analysées, tout d'abord l'anticorps a été déposé sur une coupe de pancréas sain (A) ensuite sur des coupes de pancréas présentant des lésions pré-neoplasiques. Nous avons pu individualiser différentes lésions sur ces coupes : Métaplasie acino-canalaire (B), PanIN 1a (C), PanIN 1b (D), PanIN 2 (E), PanIN 2-3 (F). Grossissement 20X.



Dans ce but vu les problèmes rencontrés avec les transfections en utilisant le vecteur plasmidique p6.2, nous avons utilisés les vecteurs rétroviraux P-Lenti 4 TRIP12, P-Lenti 4 TRIP12 muté, et P-Lenti 4 GFP. La transduction a été réalisée et quelques clones cellulaires résistants à la sélection par la zéocine sont en cours de culture.

Etude Immuno-histo-chimique

Nous avons étudié la répartition de l'expression de TRIP12 dans différentes coupes histologiques. Celles-ci ont été obtenues à partir de coupes de pancréas humain présentant des lésions de PanIN (Fig. 18), mais aussi à partir de souris Kras muté (Fig. 19)

Il ressort de cette analyse histologique que tant chez l'homme que chez la souris, il n'y a que peu d'expression de TRIP12 à l'état normal, que ce soit au niveau des acini ou des canaux pancréatiques. En observant les lésions de métaplasie acino-canalair nous avons pu mettre en évidence l'apparition d'un marquage cytoplasmique mais aussi et surtout d'un marquage prédominant au niveau des noyaux. Ce marquage est observable autant chez la souris que chez l'homme.

De même à l'examen des lésions de PanIN on retrouve un marquage de TRIP12 très important dans toutes les lésions pré-néoplasique sans que l'on retrouve une différence d'intensité de marquage selon le grade des lésions. Ce marquage prédomine toujours au niveau du noyau mais existe aussi au niveau du cytoplasme, ces constatations sont valables sur les coupes humaines et murines. De plus on remarque au niveau de ces coupes de pancréas malades l'apparition d'un marquage cytoplasmique et nucléaire au niveau des acini pancréatiques et ce même si ceux-ci paraissent morphologiquement sains.

Ces résultats sont donc en faveur d'un rôle de TRIP12 dans la carcinogénèse pancréatique et ceci dès les stades les plus précoces.

Discussion

Le facteur de transcription PTF1a-P48 est déjà connu comme intervenant dans la stabilisation du phénotype acinaire. La perte de ce phénotype au profit d'une métaplasie acino-canalair puis de lésions de PanIN est un des mécanismes actuellement reconnus d'initiation de la carcinogénèse pancréatique, de plus on sait déjà que P48 est un des facteurs réprimé au décours de ce processus. Cependant, les mécanismes et les partenaires intervenant dans la disparition et la régulation de l'expression de P48 ne sont pas encore tous connus. Identifier un facteur qui intervient dans la dégradation de P48 permettrait donc de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la carcinogénèse pancréatique.

C'est dans ce cadre que nous avons pu précédemment identifier la protéine TRIP12 par criblage double hybride comme étant un des partenaires de P48. Or il est connu que TRIP12 appartient à la famille des E3 ubiquitine ligase qui permet la reconnaissance et la dégradation de protéines cibles par le complexe que forme le protéasome. Les E3 ubiquitine ligases sont une famille de protéines très étudiée en ce moment car un nombre de plus en plus important de résultats suggère que leur dérégulation contribue au développement du cancer et associe leur surexpression à un mauvais pronostic (23,24).

On sait que l'inhibition du protéasome peut être une stratégie thérapeutique efficace comme le montre l'exemple du bortezomid® dans le traitement du myélome multiple (25), mais du fait de la spécificité d'interaction forte des différentes ubiquitine ligases avec leur protéine cible, il paraît intéressant de développer des inhibiteurs spécifiques de ces enzymes afin de limiter les effets collatéraux et d'augmenter l'efficacité de ces éventuelles molécules (26). TRIP12 pourrait avoir un rôle oncogénique important dans la cascade d'événements qui mène une cellule acinaire à se transformer en cellule néoplasique et pourrait donc à terme représenter un cible théra-

peutique intéressante, mais ce rôle reste cependant à démontrer.

Dans ce travail, nous avons tout d'abord validé un modèle cellulaire permettant d'exprimer de façon inductible la protéine P48, et nous avons ainsi pu confirmer In Vitro le rôle antiprolifératif de P48 sur les cellules Miapaca2 qui sont une lignée de cellules néoplasiques reconnue dans l'étude du cancer du pancréas. Plusieurs données de la littérature soutiennent ces résultats (14). Dans un second temps nous avons cherché à modifier encore ce modèle cellulaire afin de lui faire surexprimer, de façon non inductible cette fois, soit la protéine TRIP12 soit une protéine TRIP12 ayant subi une mutation inactivant sa fonction. Le but de la création de ce modèle cellulaire est de déterminer les conséquences de l'interaction de TRIP12 avec P48 sur la prolifération cellulaire.

Cependant nous avons été confrontés à plusieurs difficultés dans la création de ce modèle :

- Tout d'abord malgré plusieurs transfections stables qui ont été efficaces, puisque les séquences d'acides nucléiques tant d'ADN que d'ARN de TRIP12 en fusion avec la GFP ont été retrouvées dans le modèle créé et puisque les gènes de sélection étaient bien exprimés, nous n'avons à aucun moment pu surexprimer TRIP12 dans la lignée cellulaire Miapaca2. La recherche d'une voie éventuelle de dégradation de la protéine nous a cependant permis d'éliminer la voie du protéasome comme étant une voie de dégradation de TRIP12.
- Ensuite vu l'échec de la surexpression de TRIP12 dans la lignée Miapaca2 nous avons comparé les taux d'expression de TRIP12 dans les lignées cellulaires couramment utilisées pour l'étude du cancer du pancréas. C'est ainsi que nous avons décidé de réorienter notre stratégie étant donné le fait que les cellules Miapaca2 sont déjà une des lignées qui expriment le plus TRIP12 de façon endogène.
- Nous avons donc d'une part choisi de surexprimer TRIP12 dans une lignée HPNE qui exprime très faiblement de façon endogène la protéine. Mais nous avons aussi décidé de changer de vecteur afin d'utiliser un lentivecteur connu comme permettant un meilleur transfert de gènes. Les cellules HPNE sont des cellules assez intéressantes puisqu'elles ne sont pas issues de cellules cancéreuses pancréatiques mais de cellules pancréatiques qui ont été immortalisées de façon artificielle (27). Cependant nous ne pouvons pas encore apporter les résultats de cette transduction, les cellules étant à l'heure de ce mémoire encore en phase de sélection.
- Nous avons pu ensuite mener une étude histologique de la répartition de l'expression de TRIP12 selon le stade néoplasique des tissus pancréatiques. Cette étude nous a permis de montrer l'apparition de l'expression de TRIP12 dès les stades précoces de la carcinogénèse que sont la métaplasie acino-canalair et les lésions de PanIN. Nous avons pu mettre en évidence cette surexpression dans un modèle murin mais aussi sur des lames humaines présentant des lésions pré-néoplasiques. Ces résultats sont à mettre en rapport avec le fait que l'expression de P48 est connue pour diminuer puis disparaître à ces mêmes stades pré-néoplasiques (14) ce qui est en faveur d'une action de TRIP12 sur la dégradation de P48.

En conclusion nous avons créé un modèle cellulaire exprimant P48 et confirmé son effet antiprolifératif sur les lignées cellulaires Miapaca2. Nous avons montré la différence d'expression de TRIP12 dans les différentes lignées cellulaires de cancer pancréatique et nous avons montré l'expression précoce de TRIP12 dans les lésions pré-néoplasiques de l'adénocarcinome canalair pancréatique.

Perspectives

Ce travail s'est heurté à de nombreuses difficultés et nous n'avons pas pu créer le modèle cellulaire que nous comptons

étudier, cependant il nous reste plusieurs possibilités à explorer afin de mettre en place ce modèle :

- Tout d'abord nous sommes dans l'attente d'avoir des cellules HPNE sur-exprimant TRIP12, nous pourrions étudier l'effet de la surexpression de la protéine sur leur prolifération.
- Ensuite nous avons pour projet d'inhiber l'expression de TRIP12 dans les lignées qui l'expriment déjà de façon importante en utilisant un shRNA ou un siRNA (28), ce système pourrait notamment être étudié dans notre modèle Miapaca2-P48.

Après avoir validé *in vitro* un modèle cellulaire par des tests de prolifération cellulaire et en comparant par Western blot l'expression de P48 selon la présence ou non de TRIP12 le but serait de confirmer ces résultats *in vivo* :

Nous pourrions réaliser des xénogreffes orthotopiques de la lignée cellulaire créée chez des souris immunodéprimées. Ce modèle serait d'autant plus aisé à étudier *in vivo* que nous disposons de cellules Miapaca2-P48 qui exprime la luciférase et pour lesquelles nous avons montré que l'activité est proportionnelle à la prolifération cellulaire, celle-ci étant très facilement mesurable par l'intermédiaire de prélèvements sanguins chez les souris greffées.

Bien évidemment un autre axe de recherche serait la recherche et l'étude d'un inhibiteur spécifique de l'interaction de TRIP12 avec P48 par criblage de banque de molécules pharmacologiques par exemple.

Un autre axe de recherche pourrait être le développement d'un modèle animal surexprimant le gène de TRIP12 et l'étude dans ce modèle du développement de lésions néoplasiques et pré-néoplasiques par immuno-histo-chimie. Ce modèle serait de plus le moyen idéal de tester un inhibiteur *in vivo*.

Discussion en séance

Question de J Baulieux

Vous évoquez seulement les cancers pancréatiques d'origine acinaires. Quelles sont les voies futures pour les cancers extra pancréatiques ? Ces marqueurs pourraient-ils aussi être proposés ?

Réponse

La voie que nous avons décrite dans ce travail concerne l'adénocarcinome canalaire infiltrant après un processus de trans-différenciation acino-canalaire qui est actuellement le processus d'oncogenèse admis pour le cancer du pancréas. Nous n'avons pas pour ce travail étudié l'effet oncogène de Trip12 pour d'autres cancers, mais cette protéine étant synthétisée dans de nombreux tissus dont entre autre la thyroïde ou le système nerveux ce serait en effet une voie intéressante à étudier, cependant l'utilisation de Trip12 comme marqueur serait à tempérer en fonction de son expression sérique que nous ne connaissons pas encore suffisamment.

Question de B Lobel

Pouvez-vous nous donner quelques éléments sur l'ubiquitine qui a valu un Prix Nobel à Mr Aaron Ciechanover il y a quatre ans.

Réponse

C'est en effet l'étude de la dégradation des protéines dans la cellule et la découverte de la voie de l'ubiquitine et du protéasome qui a valu à Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose le prix Nobel de chimie en 2004, cette voie est impliqué dans la régulation du taux intracellulaire de nombreuses autres protéines et participe ainsi à la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que le cycle cellulaire, la différenciation cellulaire, la régulation des protéines membranaires, la prolifération cellulaire, de fait cette voie a aussi été identifiée comme intervenant dans de nombreuses pathologies telles que les pathologies neurodégénérative ou les pathologies néoplasiques avec l'exemple du myélome multiple

qui peut maintenant être traité par un inhibiteur du protéasome qu'est le Bortezomib.

Références

1. Morris, JP 4th, Wang SC, Hebrok M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer* 2010 ; 10 : 683-95.
2. Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2010 ; 362 : 1605-17.
3. INVS. Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2011. Rapport technique. Juin 2011 : <http://www.invs.sante.fr/surveillance/cancers>.
4. Delpero JR, Bachellier Ph, Boher JM. ed. Cancer du Pancréas. Rapport présenté au 112^e Congrès français de chirurgie. Monographies de l'Association Française de Chirurgie. ed. W.K. France. 2010 : Paris.
5. Hingorani, SR, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, 2003 ; 4 : 437-50.
6. Habbe N et al. Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 18913-8.
7. De La OJ et al. Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 18907-12.
8. ooman I, Real FX, Pancreatic ductal adenocarcinoma and acinar cells: a matter of differentiation and development? *Gut* 2012 ; 61 : 449-58.
9. Houbracken I et al. Lineage tracing evidence for trans differentiation of acinar to duct cells and plasticity of human pancreas. *Gastroenterology* 2011 ; 141 : 731-741.
10. Zhu L et al. Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 2007 ; 171 : 263-73.
11. Hruban RH et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001 ; 25 : 579-86.
12. Hruban, RH et al. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2004 ; 28 : 977-87.
13. Krapp A et al. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* 1998 ; 12 : 3752-63.
14. Rodolosse A et al. PTF1alpha/p48 transcription factor couples proliferation and differentiation in the exocrine pancreas (corrected). *Gastroenterology* 2004 ; 127 : 937-49.
15. Adell T et al. Role of the basic helix-loop-helix transcription factor p48 in the differentiation phenotype of exocrine pancreas cancer cells. *Cell Growth Differ* 2000 ; 11 : 137-47.
16. Kawaguchi Y et al. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 2002 ; 32 : 128-34.
17. Bierkamp C et al. Expression of cholecystokinin-2/gastrin receptor in the murine pancreas modulates cell adhesion and cell differentiation *in vivo*. *Am J Pathol* 2004 ; 165 : 2135-45.
18. Duffresne M et al. Id3 modulates cellular localization of bHLH Ptf1-p48 protein. *Int J Cancer*, 2011 ; 129 : 295-306.
19. Park Y, Yoon SK, Yoon JB. The HECT domain of TRIP12 ubiquitinates substrates of the ubiquitin fusion degradation pathway. *J Biol Chem* 2009 ; 284 : 1540-9.
20. Rotin, D. and S. Kumar. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009 ; 10 : 398-409.
21. Lee, JW et al. Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 1995 ; 9 : 243-54.
22. Chen, D et al. Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses. *Nature* 2010 ; 464 : 624-7.
23. Bernassola F et al. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell* 2008 ; 14 : 10-21.
24. Hansen TM et al. Itch inhibition regulates chemosensitivity *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 ; 361 : 33-6.
25. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 2001 ; 8 : 739-58.
26. Goldenberg SJ et al. Strategies for the identification of ubiquitin ligase inhibitors. *Biochem Soc Trans*, 2010 ; 38 : 132-6.
27. Lee, KM et al. Immortalization with telomerase of the Nestin-positive cells of the human pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ; 301 : 1038-44.