

Effet de l'Exenatide sur la prolifération et le profil d'expression des mucines dans une lignée de cellules canalaire pancréatiques humaines

Kanza Benomar ^{1,5}, Lucie Coppin ^{1,3}, Nathalie Jouy ², Evelyne Crème ³, Isabelle Van Seuning ¹, Emmanuelle Leteurtre ^{1,4}, Marie-Christine Vantghem ⁵, Julie Kerr Conte ⁶ & Pascal Pigny ^{1,3}

¹ UMR 837 Inserm – Centre de recherche Jean-Pierre Aubert, équipe 5 « Mucines, différenciation et cancérogenèse épithéliale », Lille, France; ² Université Nord de France Institut Fédératif de Recherche 114, LILLE; ³ Laboratoire de biochimie et hormonologie CHRU Lille; ⁴ Service anatomie pathologie CHRU Lille; ⁵ Service Endocrinologie, Diabétologie et Maladies métaboliques CHRU Lille; ⁶ Biothérapies des Diabètes Inserm U859 Université Lille 2.

Introduction

L'existence d'un lien entre l'utilisation d'analogues de l'hormone *Glucagon-like peptide 1* (GLP-1) chez les patients diabétiques de type 2 et la survenue d'adénocarcinomes pancréatiques canalaire (PDAC) est un sujet actuellement débattu. En 2011, un rapport de la *Food and Drug Administration* (FDA) a alerté sur un risque de développement de PDAC multiplié par 3 dans cette population dont le risque de cancérogenèse est augmenté. Une étude a également montré que le traitement de souris porteuses d'une mutation de *K-Ras* par l'analogue du GLP-1, l'Exenatide, pendant 12 semaines conduit à la prolifération du contingent épithélial pancréatique. Cette prolifération s'accompagne d'une réaction mucineuse suggérant une augmentation de l'expression de mucines impliquées dans ce cancer. Les mucines membranaires MUC1, MUC4 et MUC16 sont des protéines membranaires O-glycosylées de masse moléculaire élevée, exprimées au pôle apical des cellules épithéliales saines. Elles sont constituées d'une sous-unité extracellulaire comportant des séquences d'acides aminés répétées en tandem et une sous-unité transmembranaire interagissant avec les récepteurs tyrosine kinase de la famille HER. MUC1, MUC16 et MUC4 sont respectivement sur- et néoexprimées dès les stades précoces du PDAC. La transformation maligne s'accompagne d'une délocalisation de ces mucines, leur expression devenant circonférentielle et cytoplasmique à l'origine de signaux oncogéniques.

L'objectif de ce travail est de déterminer l'effet de l'Exenatide sur les cellules canalaire pancréatiques humaines, *in vitro* (lignée HPDE), en nous focalisant sur sa capacité à induire la prolifération et à modifier le profil d'expression des mucines MUC1, MUC4 et MUC16.

L'Exenatide stimule la prolifération de la lignée HPDE

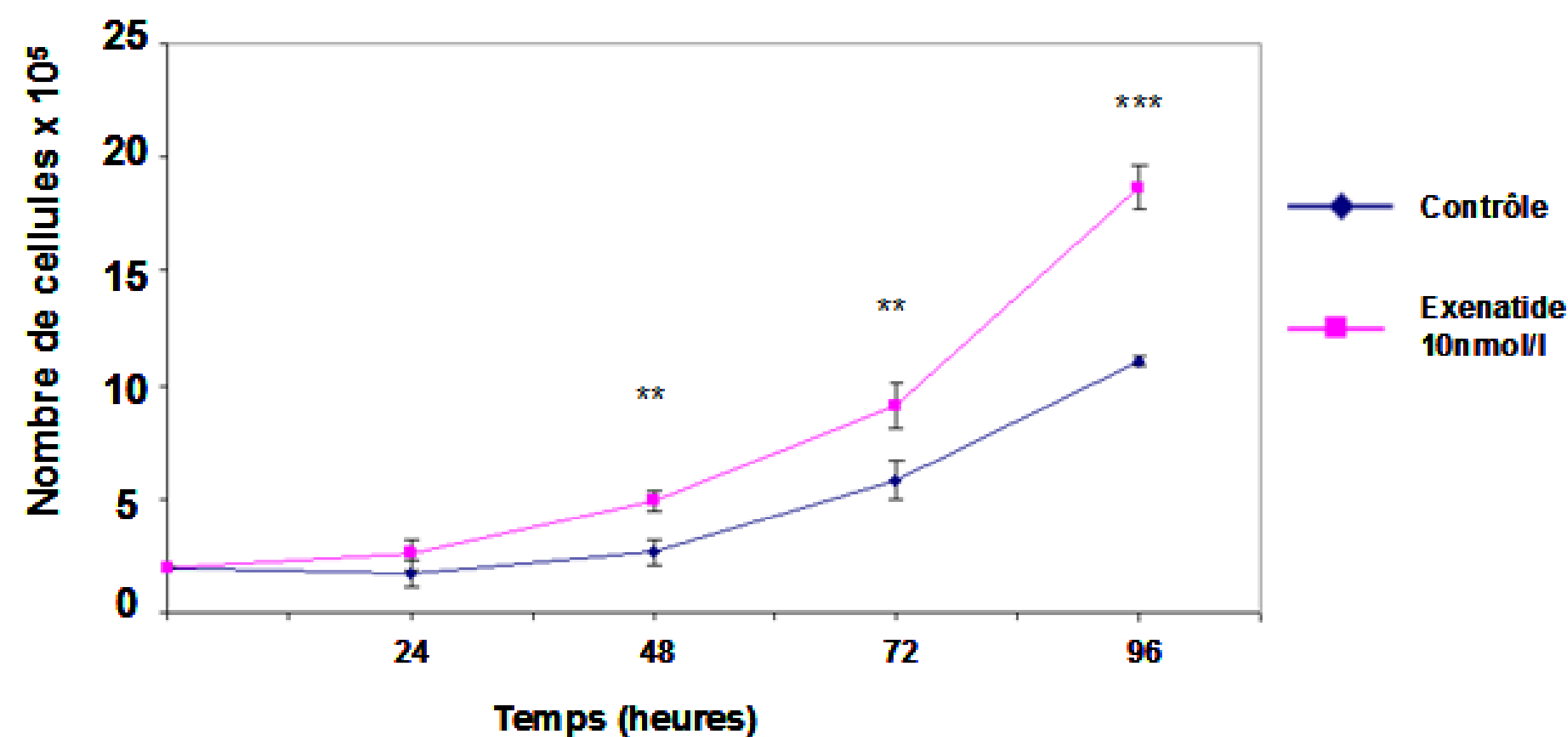


Figure 1. Etude de la prolifération de la lignée HPDE. Le traitement par Exenatide à la concentration de 10 nmol/L réalisé sur une période de 24 à 96 h est représenté en rose, le traitement par le véhicule (Eau stérile) est représenté en bleu. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne du nombre de cellules pour chaque condition \pm l'écart type à partir de trois expériences indépendantes réalisées en triplicate et de deux comptages par puits (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

L'Exenatide à la concentration de 10 nmol/L augmente la croissance cellulaire de la lignée HPDE.

La répression de MUC4 par siARN annule l'effet prolifératif de l'Exenatide

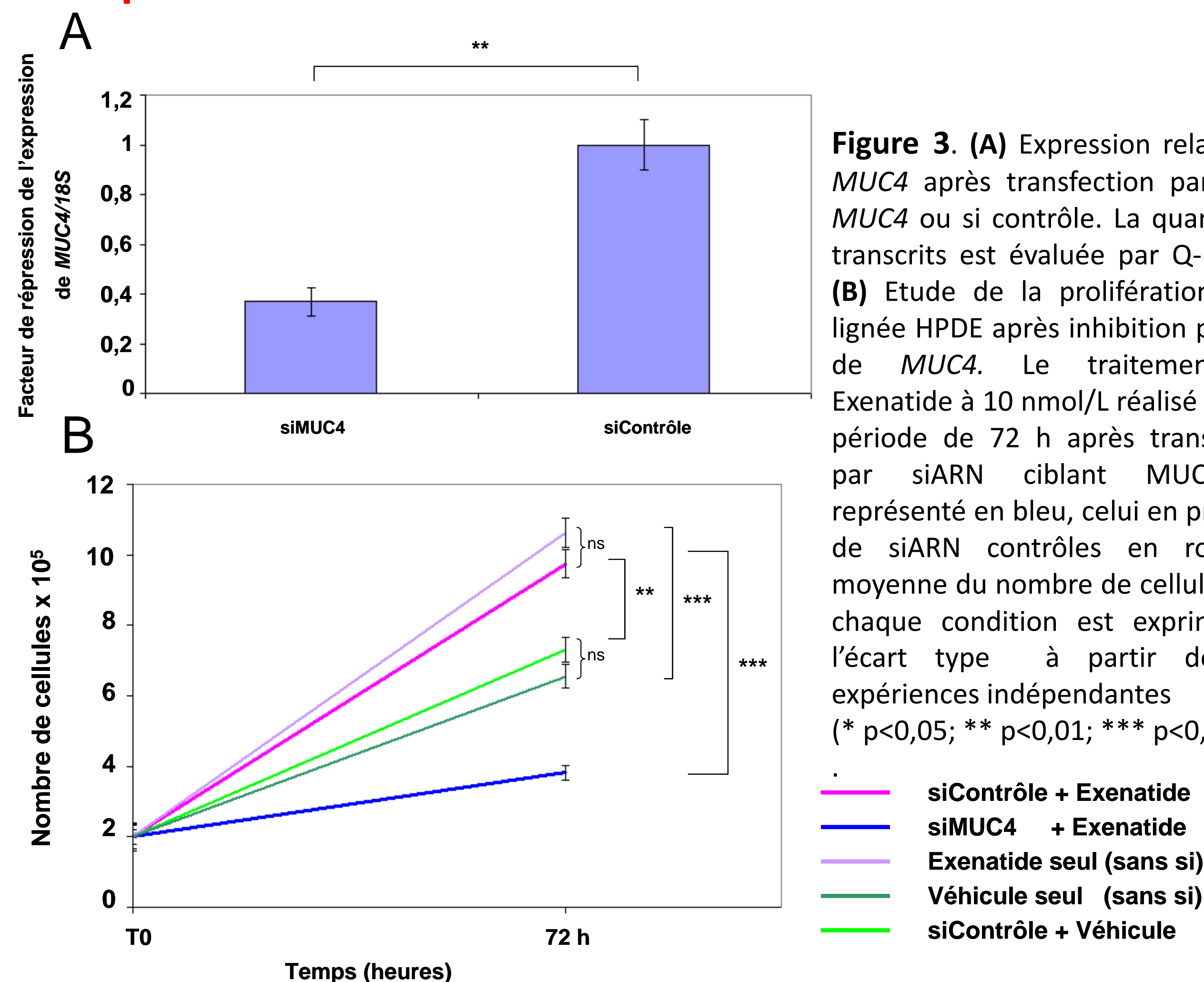


Figure 3. (A) Expression relative de *MUC4* après transfection par siARN *MUC4* ou si contrôle. La quantité de transcrits est évaluée par Q-RT-PCR. (B) Etude de la prolifération de la lignée HPDE après inhibition partielle de *MUC4*. Le traitement par Exenatide à 10 nmol/L réalisé sur une période de 72 h après transfection par siARN ciblant *MUC4* est représenté en bleu, celui en présence de siARN contrôles en rose. La moyenne du nombre de cellules pour chaque condition est exprimée \pm l'écart type à partir de trois expériences indépendantes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La diminution de l'expression relative de *MUC4* annule l'effet prolifératif de l'Exenatide dans la lignée HPDE

L'Exenatide augmente l'expression ARNm et protéique de MUC4

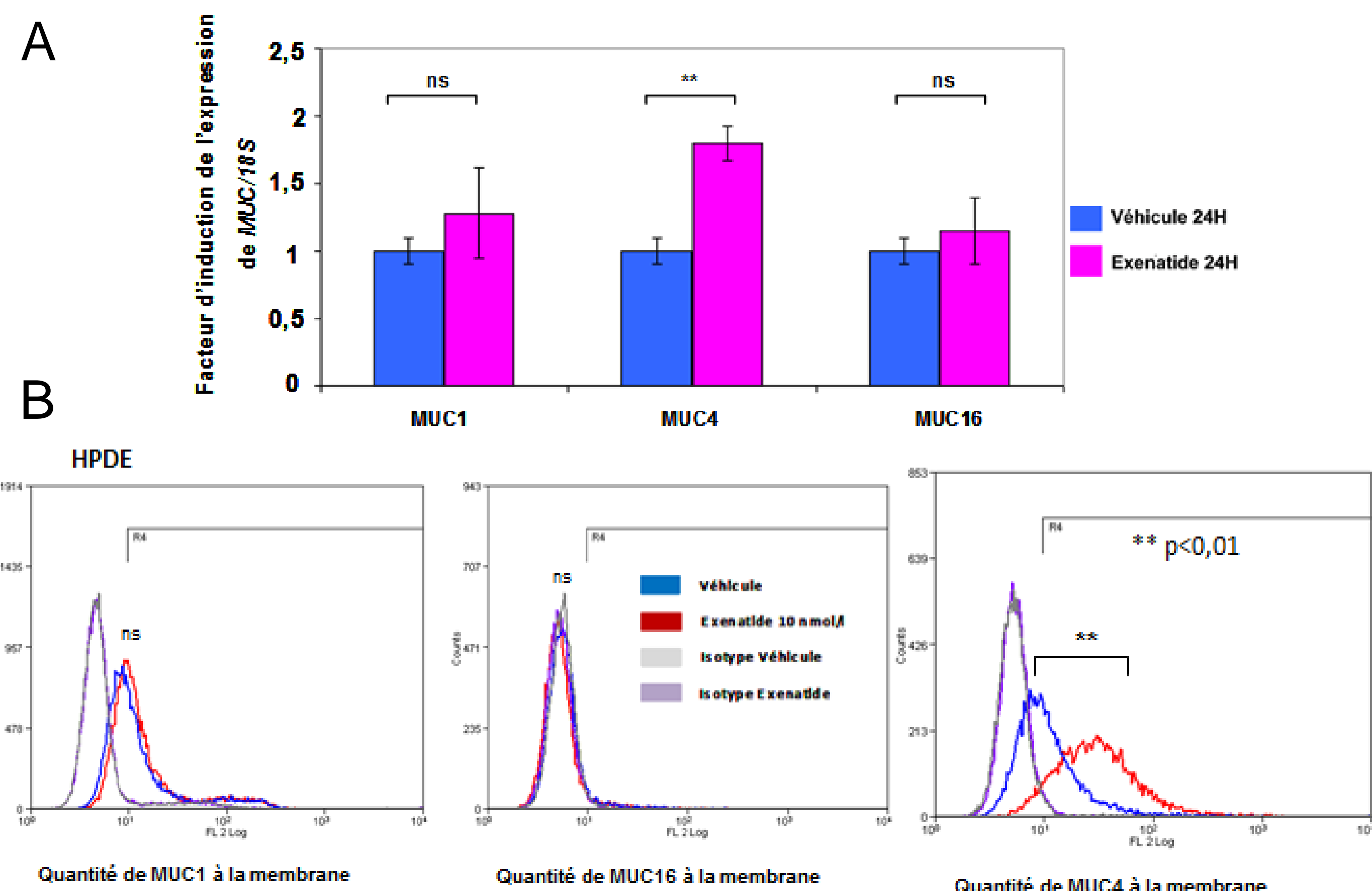


Figure 2. (A) Expression relative de *MUC1*, *MUC4* et *MUC16* dans la lignée HPDE traitée ou non par Exenatide (10 nmol/L à 24h). Les quantités de transcrits ont été évaluées par Q-RT-PCR (Taqman). Le graphique représente la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. La quantité de transcrit en présence du véhicule a été arbitrairement posée à 100 %. (B) Expression protéique de *MUC1*, *MUC4* et *MUC16* dans la lignée HPDE traitée ou non par Exenatide (10 nmol/L à 24h), évaluée par cytométrie en flux. Le graphique représente une expérience type. Les statistiques ont été effectuées sur les moyennes de trois expériences indépendantes (** $p < 0,01$).

L'Exenatide à la concentration de 10 nmol/L augmente la quantité de transcrits de *MUC4* (180 %) et induit l'expression protéique de *MUC4* à la membrane de la lignée HPDE.

Conclusion

Nos résultats démontrent que l'Exenatide (10 nmol/L) stimule la prolifération des cellules canalaire pancréatiques *in vitro* et induit l'expression membranaire de la mucine *MUC4*. De plus, l'inhibition de l'expression de *MUC4* annule l'effet prolifératif de l'Exenatide suggérant que *MUC4* est impliquée dans l'effet pro-prolifératif et par extension dans l'induction potentielle des lésions précancéreuses par les analogues du GLP-1 dans ce modèle. En effet, *MUC4* est néo-exprimée dès les stades précoces de la cancérogenèse pancréatique. Nous envisageons d'étudier les voies de signalisation impliquées dans cette prolifération induite par l'Exenatide *in vitro* et d'étudier son effet *ex vivo* sur des xénogreffes de cellules canalaire pancréatiques humaines afin de mieux documenter la sécurité de cette molécule.

Références

- Gier B, Butler PC, Lai CK et al, Chronic GLP-1 receptor activation by exendin-4 induces expansion of pancreatic duct glands in rats and accelerates formation of dysplastic lesions and chronic pancreatitis in the *KrasG12D* mouse model. *Diabetes* 2012; 61:1250-62.
- Jonckheere N and Van Seuning I, The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies. *Crit Rev Oncog* 2008; 14:177-96.
- Nachnani JS, Bulchandani DG, Nookala A et al. Biochemical and histological effects of exendin-4 on the rat pancreas. *Diabetologia* 2010; 53: 153-9.