



ECOLE DOCTORALE **SSBCV**



**Année 2017-2018 - Demande d'allocation doctorale
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

1. Informations administratives :

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : **Mehdi OUAISSI (PU-PH)**

Unité : **Inserm UMR1069, Nutrition, Croissance et Cancer**

Equipe (*si unité multi-équipes*): unité mono-équipe

Filière de rattachement : A (Physiopathologie humaine et animale)

Email de l'encadrant : mehdi.ouaissi@univ-tours.fr

Co-encadrant éventuel (NB : limité à 1 seul co-encadrant(e)) : **Sébastien ROGER (MCU-HDR IUF), sebastien.roger@univ-tours.fr**

2. Titre de la thèse :

Histone Désacétylases (HDAC) dans le cancer du côlon : rôles dans l'invasivité des cellules cancéreuses et la progression métastatique

3. Résumé :

La présence de métastases issues du cancer du côlon, principalement au foie et au péritoine, limite l'efficacité des traitements et représente un stade terminal de la maladie. Particulièrement, la carcinose péritonéale laisse peu de possibilités thérapeutiques et est de très mauvais pronostic. Les Histones Désacétylases (HDAC, 4 classes, 18 membres) sont des enzymes qui, conjointement avec les Histone Acétyl Transférases (HAT), sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes en contrôlant l'acétylation des histones. L'activité des HDAC entraîne généralement une répression de l'expression des gènes en augmentant le degré de compaction de la chromatine¹. Par ailleurs, les HDAC, en contrôlant le niveau d'acétylation de nombreuses protéines autres que les histones, modulent leur état fonctionnel. C'est le cas de certains facteurs nucléaires (Runx, p53, NF- κ B) ou de protéines cytosoliques (tubuline, cortactine, HSP90)².

Les HDAC sont anormalement exprimées dans les cancers, et semblent impliquées dans le processus de carcinogenèse et de progression tumorale, via le contrôle épigénétique d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur, mais également en contrôlant l'activité de nombreuses protéines et voies de signalisation qui participent à la transition épithélio-mésenchymateuse, à l'invasivité cancéreuse et au développement métastatique³. Les inhibiteurs de HDAC (iHDAC) sont par conséquent des outils d'intérêt pour le traitement des cancers³⁻⁵ et quatre molécules sont actuellement approuvées par la FDA, principalement dans le cadre du traitement des leucémies. Les efforts actuels sont portés sur le développement de molécules plus sélectives des HDAC⁶. En effet, les isoformes de HDAC ont des distributions subcellulaires, des cibles et des effets biologiques différents, et leurs implications dans la carcinogenèse et la progression cancéreuse ne sont pas complètement caractérisées.

Nous avons montré que HDAC7 est surexprimée dans le cancer du pancréas^{7,8}. Une forte expression de HDAC7 est associée à un risque accru de récidives, ainsi qu'à la mortalité des patients⁷. HDAC7 est également surexprimée dans le cancer du côlon⁹. Dans les cancers du sein¹⁰, du pancréas⁷ et du colon⁹, HDAC2 est surexprimée et son niveau d'expression est associé à l'expression de marqueurs cliniques de progression tumorale, ainsi qu'à l'acquisition de résistance à certaines chimiothérapies¹¹⁻¹³. HDAC6 est associée à la transformation maligne et à l'invasivité cancéreuse. Son activité cytosolique stimule la formation des invadopodes, structures invasives des cellules cancéreuses, et l'adressage de MT1-MMP des endosomes à la membrane plasmique, permettant ainsi son activité de dégradation de la matrice extracellulaire^{14,15}.

Nous avons montré que l'expression des canaux sodiques (Nav) est dérégulée dans les cancers¹⁶. Dans le cancer du sein, le canal Na_v1.5 (gène *SCN5A*) est surexprimé et son activité (courant sodique) est associée à l'invasivité des cellules cancéreuses, en promouvant la formation des invadopodes et la dégradation de la matrice extracellulaire^{17,18}. Ce même canal ionique est exprimé de façon aberrante dans le cancer colorectal et également impliqué dans l'invasivité des cellules cancéreuses du côlon^{19,20}. De façon intéressante, il a été montré que le canal Na_v1.5 est acétylé sur plusieurs résidus lysine et que l'inhibition des HDAC réduit son niveau d'activité²¹. Ces résultats suggèrent que la surexpression des HDAC pourrait conduire à augmenter l'activité du canal Na_v1.5.

Récemment, nous avons montré que le gène *SCN4B*, codant pour la protéine Navβ4, initialement caractérisée de protéine auxiliaire des Na_v, est fortement exprimé dans les tissus épithéliaux mammaires, de côlon et de rectum sains. En revanche son expression est réduite dans les tissus cancéreux, et particulièrement dans les tumeurs invasives, pour être presque absente dans les tumeurs de haut grade et dans les métastases, suggérant un rôle de suppresseur de tumeur. Au niveau cellulaire, la perte d'expression de *SCN4B* dans les cellules cancéreuses stimule leur invasivité en augmentant l'activité de la GTPase RhoA et en induisant l'acquisition d'un phénotype cancéreux très agressif de type hybride mésenchymateux-amiboïde²². Cependant, les raisons de cette perte d'expression dans les cellules et tissus agressifs ne sont pas connues.

Les objectifs de ce projet de thèse sont par conséquent de :

- 1) Déterminer les profils d'expression des HDAC dans les biopsies cancéreuses de côlon, chez des patients présentant ou non des métastases péritonéales, en comparaison avec les tissus non tumoraux associés.
- 2) Corréler le profil d'expression des HDAC avec l'expression des facteurs impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Zeb, Twist, Snai, Slug, E-Cadhérine, N-Cadhérine, vimentine) ainsi qu'avec l'expression des canaux sodiques Na_v. Une attention particulière sera portée sur les HDAC2, HDAC6 et HDAC7 en corrélation avec les Na_v1.5 et Na_vβ4.
- 3) Etudier les effets des iHDAC et de l'inhibition transcriptionnelle (ARN interférents) des HDAC sur les marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse, sur la migration et l'invasivité cellulaire, sur l'expression et l'activité des canaux sodiques Na_v dans des lignées de cellules cancéreuses humaines de côlon (HT29, HT-116, SW480, SW620)
- 4) Etudier le rôle des iHDAC et de l'inhibition transcriptionnelle des HDAC, sur la croissance tumorale et le développement métastatique, dans des modèles murins de cancer du côlon et de carcinose péritonéale.
- 5)

Principales techniques associées au projet de thèse :

- Culture cellulaire de lignées de cellules cancéreuses du colon, et de cellules issues de biopsies
- Techniques d'évaluation de la migration (inserts, wound-healing, microscopie time-lapse pour évaluation de la migration individuelle ou collective) et de l'invasivité cellulaire en 2 (inserts), ou 3 dimensions (sphéroïdes)
- Biologie moléculaire et cellulaire (siARN, CRISPER/CAS9, extraction ARNm, RT-qPCR, extraction de protéines, western blotting, co-immunoprécipitation, pull-down)
- Electrophysiologie cellulaire (patch clamp)
- Microscopie d'épifluorescence (immuno-cytofluorescence, microscopie time-lapse)
- Marquages immunohistochimiques
- Expérimentation animale (modèles murins de cancer colorectal et de carcinose péritonéale)

Bibliographie

- 1 Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45, doi:10.1038/47412 (2000).
- 2 Glozak, M. A. & Seto, E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* **26**, 5420-5432, doi:10.1038/sj.onc.1210610 (2007).
- 3 Li, Y. & Seto, E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **6**, doi:10.1101/cshperspect.a026831 (2016).
- 4 Ouaiissi, M. *et al.* Rationale for possible targeting of histone deacetylase signaling in cancer diseases with a special reference to pancreatic cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**, 315939, doi:10.1155/2011/315939 (2011).
- 5 Ouaiissi, M. & Ouaiissi, A. Histone deacetylase enzymes as potential drug targets in cancer and parasitic diseases. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2006**, 13474, doi:10.1155/JBB/2006/13474 (2006).
- 6 Roche, J. & Bertrand, P. Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem* **121**, 451-483, doi:10.1016/j.ejmech.2016.05.047 (2016).
- 7 Ouaiissi, M. *et al.* Further characterization of HDAC and SIRT gene expression patterns in pancreatic cancer and their relation to disease outcome. *PLoS One* **9**, e108520, doi:10.1371/journal.pone.0108520 (2014).
- 8 Ouaiissi, M. *et al.* High histone deacetylase 7 (HDAC7) expression is significantly associated with adenocarcinomas of the pancreas. *Ann Surg Oncol* **15**, 2318-2328, doi:10.1245/s10434-008-9940-z (2008).
- 9 Stypula-Cyrus, Y. *et al.* HDAC up-regulation in early colon field carcinogenesis is involved in cell tumorigenicity through regulation of chromatin structure. *PLoS One* **8**, e64600, doi:10.1371/journal.pone.0064600 (2013).
- 10 Muller, B. M. *et al.* Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer--overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer* **13**, 215, doi:10.1186/1471-2407-13-215 (2013).
- 11 Benard, A. *et al.* Nuclear expression of histone deacetylases and their histone modifications predicts clinical outcome in colorectal cancer. *Histopathology* **66**, 270-282, doi:10.1111/his.12534 (2015).
- 12 Zhu, P. *et al.* Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* **5**, 455-463 (2004).
- 13 Fazzone, W., Wilson, P. M., Labonte, M. J., Lenz, H. J. & Ladner, R. D. Histone deacetylase inhibitors suppress thymidylate synthase gene expression and synergize with the fluoropyrimidines in colon cancer cells. *Int J Cancer* **125**, 463-473, doi:10.1002/ijc.24403 (2009).
- 14 Castro-Castro, A., Janke, C., Montagnac, G., Paul-Gilloteaux, P. & Chavrier, P. ATAT1/MEC-17 acetyltransferase and HDAC6 deacetylase control a balance of acetylation of alpha-tubulin and cortactin and regulate MT1-MMP trafficking and breast tumor cell invasion. *Eur J Cell Biol* **91**, 950-960, doi:10.1016/j.ejcb.2012.07.001 (2012).
- 15 Rey, M., Irondelle, M., Waharte, F., Lizarraga, F. & Chavrier, P. HDAC6 is required for invadopodia activity and invasion by breast tumor cells. *Eur J Cell Biol* **90**, 128-135, doi:10.1016/j.ejcb.2010.09.004 (2011).
- 16 Roger, S., Gillet, L., Le Guennec, J. Y. & Besson, P. Voltage-gated sodium channels and cancer: is excitability their primary role? *Front Pharmacol* **6**, 152, doi:10.3389/fphar.2015.00152 (2015).
- 17 Brisson, L. *et al.* Nav1.5 Na⁺ channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. *J Cell Sci* **126**, 4835-4842 (2013).
- 18 Brisson, L. *et al.* Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. *Oncogene* **30**, 2070-2076 (2011).
- 19 House, C. D. *et al.* Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res* **70**, 6957-6967 (2010).
- 20 House, C. D. *et al.* Voltage-gated Na⁺ Channel Activity Increases Colon Cancer Transcriptional Activity and Invasion Via Persistent MAPK Signaling. *Scientific reports* **5**, 11541, doi:10.1038/srep11541 (2015).
- 21 Xu, Q., Patel, D., Zhang, X. & Veenstra, R. D. Changes in cardiac Nav1.5 expression, function, and acetylation by pan-histone deacetylase inhibitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **311**, H1139-H1149, doi:10.1152/ajpheart.00156.2016 (2016).

4. Résumé en anglais :

Histone Deacetylases (HDAC) in colon cancer: roles in cancer cells invasiveness and metastatic progression

The development of metastases from colon cancer, mainly in the liver and in the peritoneum, dramatically counteracts the efficacy of anticancer treatments and represents a terminal stage of the disease. Histone deacetylases (HDAC, 4 classes, 18 members), along with Histone Acetyl Transferases (HAT), control the expression of genes through the acetylation status of histones. HDAC are distributed both in the nucleus and in the cytosol, and also modulate the functional status of non-histone proteins by removing their acetyl groups. This is the case for nuclear factors (Runx, p53, NF- κ B) or cytosolic proteins (tubulin, cortactin, HSP90). HDAC have been shown to be abnormally expressed in cancers, associated with carcinogenesis and tumour progression, through the induction of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), the gain in invasive properties and the development of metastases. In this context, and while the specific targets of individual HDAC are not yet identified and their involvement in several signaling pathways not completely elucidated, pharmacological inhibitors of HDAC (iHDAC) represent promising targets for the treatment of cancers.

Voltage-gated sodium channels (Na_v) are aberrantly expressed in different cancers, such as in colon cancer, and their activity promotes cancer cell invasiveness and metastatic progression. Na_v channels have recently been demonstrated to be acetylated on intracellular lysine residues, and the use of iHDAC reduce their activity, suggesting that HDAC overexpression in cancers leads to increased Na_v activity.

Objectives of this PhD project will be to:

- 1) Determine HDAC expression levels in colon cancer biopsies, compared to non-cancer tissues, correlatively to the expression of EMT markers and to Na_v pore-forming and auxiliary subunit genes.
- 2) Assess the effect of iHDAC, and siRNA targeting specific HDAC, on the expression of EMT markers, on the expression and activity of Na_v , on the migration and invasive capacities of human colon cancer cells
- 3) Study the consequences of inhibiting the activity, or expression of HDAC, in animal models of colon cancer and, on tumour growth and metastases development.