



**HAL**  
open science

# Ciblage pharmacologique du microenvironnement de l'adénocarcinome canalaire pancréatique

Rémi Samain

► **To cite this version:**

Rémi Samain. Ciblage pharmacologique du microenvironnement de l'adénocarcinome canalaire pancréatique. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30326 . tel-02475960

**HAL Id: tel-02475960**

**<https://theses.hal.science/tel-02475960>**

Submitted on 12 Feb 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

## En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Rémi SAMAIN**

Le 16 novembre 2018

**Ciblage pharmacologique du microenvironnement de  
l'adénocarcinome canalaire pancréatique.**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :

**CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse**

Thèse dirigée par  
**Corinne BOUSQUET**

Jury

**M. Thomas WALTER**, Rapporteur  
**Mme Danijela VIGNJEVIC**, Rapporteur  
**M. Jérôme CROS**, Examineur  
**Mme Ainhoa MIELGO**, Examineur  
**Mme Corinne BOUSQUET**, Directeur de thèse  
**Mme Maha AYYOUB**, Président



# Remerciements

Je souhaiterais en premier lieu remercier les membres de mon jury de thèse, d'avoir accepté d'évaluer l'ensemble de mon travail, et d'avoir participé à ma soutenance :

Pr. Maha Ayyoub

Dr Danijela Vignjevic

Dr Ainhoa Mielgo

Dr Thomas Walter

Dr Jérôme Cros

Ce fut un honneur et un plaisir d'échanger avec vous, vos critiques et remarques ont été constructives et plus qu'utiles. Je vous prie de croire en ma gratitude et ma grande considération.

Corinne, merci de m'avoir accueilli dans l'équipe, malgré mon manque d'expérience. J'ai vraiment énormément appris au cours de ces 5 années passées au labo, merci de toujours m'avoir laissé travailler de manière autonome, tout en restant très accessible et à l'écoute pour la moindre question ou remarque, pour me conseiller et m'encourager. Je pense qu'on a réussi à faire avancer le projet ensemble, en apportant chacun notre contribution, et j'ai beaucoup aimé travailler avec toi. Merci pour la confiance que tu m'as accordé, et merci aussi d'avoir été aussi compréhensive et à l'écoute dans les moments plus durs.

Stéphane, je te remercie aussi pour ton accueil dans l'équipe, pour ton soutien, tes conseils, tes remarques ultra-pertinentes à chaque présentation. Et merci pour les moments extra-labos qu'on a pu passer avec l'équipe, dans la bonne humeur à chaque fois.

Après plus de 5 années passées dans cette équipe, il me faut évidemment remercier les membres de cette équipe qui ont rendu cette thèse si agréable...

Merci d'abord à tous les anciens de l'équipe, qui sont partis les uns après les autres, mais qui ont été là à mon arrivée, qui m'ont accueilli royalement, et m'ont formé à la paillasse. Mounira, Camille, Emeline, Julie, Célia, Romain, qui sont également devenus des amis, et qui ont chacun leur tour laissé un grand vide en partant. Evidemment, mon copain David, toujours là pour m'aider, m'expliquer, me soutenir, et qui est devenu un vrai ami, au labo et en dehors. Ta bonne humeur, ton humour si particulier, nos passions communes ont contribué à notre amitié, qui dure encore aujourd'hui. Au passage, félicitations pour le bébé qui devrait arriver d'un jour à l'autre.

Merci à tous les cadres du labo, Cathy, Marjorie, Emilie, Amandine, Julia, Yvan ! Merci pour votre bonne humeur quotidienne, d'être toujours là pour aider, discuter, conseiller, rassurer, encourager, et rire aussi. C'est vraiment un plaisir de vous cotoyer tous les jours et j'espère vraiment retrouver dans mes futures équipes des personnes comme vous.

Merci à Steph, ma binôme de souris, avec qui j'ai eu la chance de passer beaucoup de temps, à travailler, à discuter, à découvrir des musiques, qui m'a appris beaucoup et qui m'a toujours soutenu. On a souvent galéré, mais s'est bien amusé quand même. Prend soin de toi, et encore merci pour tout.

Merci enfin à tous les nouveaux de l'équipe, qui ont pris la relève, Sauyen, Alexia, Christophe, Sonia, c'est vous les prochains, bon courage! Je vous fais confiance pour garder la même bonne humeur, le même esprit d'entraide et de soutien entre étudiants, tellement important dans une équipe.

Merci aussi aux autres équipes du centre que j'ai fréquentées, et dans lesquelles j'ai aussi eu la chance de trouver des amis, en particulier l'équipe 2. Coucou Marina et Guillaume. Et Lilas... Evidemment, je ne peux pas oublier l'équipe 10, qui m'a accueilli avec le sourire quasiment quotidiennement, merci Marlène, Pierre et Jérôme, et merci à toute l'équipe pour votre gentillesse. Dorian, je pense qu'on a aussi construit une belle amitié, qui j'espère durera encore quelques années, merci d'avoir été là pour moi, je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à Chris pour ton amitié, au labo et en dehors, pour ton aide et tous les conseils que tu m'as donné. Je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

Merci à tous mes amis, de Toulouse et de Grenoble, d'être toujours là dans les bons et les mauvais moments. Vous comptez beaucoup.

Enfin, merci à ma famille, Papa, Maman, Antoine, Sophie, et tous les autres pour votre soutien permanent. Merci d'avoir été là pour partager les pires moments, et surtout pour vivre les meilleurs.

*Une pensée pour Alix, merci d'avoir été là et pour tout ce que tu m'as apporté. Avec l'espoir que ce qui t'es arrivé n'arrive bientôt plus, parce que ça ne devrait jamais arriver...*





# Résumé

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) est un cancer au pronostic sombre, en raison de son diagnostic souvent trop tardif, de son agressivité, et de sa propension à métastaser rapidement. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires rapidement pour améliorer ce pronostic.

Une de ces stratégies consiste à cibler le microenvironnement de PDAC, très dense et actif, représentant une part importante de la masse tumorale. Il est composé d'une matrice extracellulaire, de cellules endothéliales, de cellules immunitaires et de fibroblastes associés au cancer (CAFs). Par l'intermédiaire de relations physiques et chimiques, le microenvironnement, et particulièrement les CAFs et leurs sécrétions, favorise la progression tumorale au niveau de la tumeur primaire et sur les sites métastatiques. Notre équipe a mis en évidence un effet antitumoral d'un analogue de somatostatine, le pasiréotide ou SOM230. La somatostatine est une hormone qui entraîne une inhibition de nombreuses fonctions biologiques, notamment les sécrétions endocrines et exocrines et la prolifération cellulaire, et dont l'effet anti-tumoral est démontré dans différents types de cancer. Via le récepteur sst1 exprimé par les CAFs, le pasiréotide est capable de bloquer les sécrétions des CAFs, et ainsi de restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses pancréatiques à la chimiothérapie et de ralentir la croissance tumorale.

Mes travaux de thèse consistaient à démontrer l'efficacité de l'association de gemcitabine, la chimiothérapie de référence dans le PDAC, et de l'analogue de somatostatine SOM230 dans des modèles murins mimant fidèlement la physiopathologie du PDAC humain. Mes résultats montrent un effet majeur de la combinaison des traitements sur le développement de métastases, à la fois sur les modèles de co-greffes orthotopique et sur le modèle génétique KPC. Cet effet est associé à une réduction du recrutement de populations immunitaires pro-tumorales, particulièrement les macrophages associés aux tumeurs et les MDSCs. Nous avons identifié le facteur de croissance des macrophages CSF-1 comme une protéine clé dans l'effet immunomodulateur des CAFs, et dont la sécrétion est réduite par le traitement au SOM230.

En considérant les récents échecs de traitements visant à supprimer les CAFs, il semble que le ciblage de leurs sécrétions soit une stratégie plus prometteuse dans le traitement du PDAC.



# Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) correlate with a poor prognosis, because of its late diagnosis, its aggressiveness, and its propensity to metastasize quickly. New therapeutic strategies are urgently needed to improve this prognosis.

One of these strategies is to target PDAC microenvironment, which is very dense and active and represents a large part of the tumor mass. It is composed of an extracellular matrix, endothelial cells, immune cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs). Through physical and chemical relations, the microenvironment, and particularly CAFs and their secretions, promotes tumor progression at in the primary tumor and at metastatic sites. Our team has demonstrated an antitumor effect of a somatostatin analog, pasireotide or SOM230. Somatostatin is a hormone that inhibits many biological functions, including endocrine and exocrine secretions and cell proliferation, and with an anti-tumor effect demonstrated in different types of cancer. Via the receptor sst1 expressed by CAFs, pasireotide is able to block CAFs secretions, and thus restore pancreatic cancer cells sensitivity to chemotherapy and slow down tumor growth.

The aim of my PhD consisted in demonstrating the efficacy of the combination of gemcitabine, the reference chemotherapy in PDAC, and the somatostatin analog SOM230 in mouse models faithfully mimicking the physiopathology of human PDAC. My results show a major effect of the combination of treatments on the development of metastases, both on orthotopic co-graft models and on the KPC genetic model. This effect is associated with a reduction in the recruitment of pro-tumor immune populations, particularly tumor-associated macrophages and MDSCs. We identified the macrophage growth factor CSF-1 as a key protein implicated in the immunomodulatory effect of CAFs, and its secretion is strongly reduced by the SOM230 treatment.

Considering recent failures with treatment that aimed to suppress CAFs, target their secretions seems to be a more promising strategy in the treatment of PDAC.





# SOMMAIRE

Résumé.....	7
Abstract .....	8
SOMMAIRE .....	11
Liste des figures.....	15
Liste des abréviations.....	17
INTRODUCTION .....	19
I) Biologie et pathologies du pancréas .....	21
1) Anatomie et physiologie du pancréas .....	21
a) Anatomie .....	21
b) Physiologie.....	22
2) Adénocarcinome canalaire pancréatique .....	23
a) Epidémiologie et facteurs de risques .....	23
b) Biologie du PDAC.....	25
c) Modèles expérimentaux d'étude du PDAC.....	27
II) Microenvironnement du PDAC .....	41
1) Généralités.....	41
2) CAFs .....	42
a) Origines.....	42
b) Rôle dans la progression tumorale et la résistance aux traitements.....	44
c) Rôle immunomodulateur .....	45
d) Rôle ambigu et hétérogénéité des CAFs .....	47
3) Matrice extracellulaire.....	50
a) Collagènes .....	50
b) Glycosaminoglycanes et protéoglycanes .....	51
c) Glycoprotéines .....	52
d) Protéases .....	53
e) Rigidité et propriétés mécaniques de la matrice .....	53
4) Immunité .....	55
a) Populations anti-tumorales.....	56
b) Macrophages associés aux tumeurs .....	58

c)	Neutrophiles associés aux tumeurs .....	60
d)	Cellules myéloïdes suppressives MDSC.....	61
e)	Lymphocytes T régulateurs .....	63
III)	Biologie de la métastase.....	67
1)	Processus métastatique.....	68
a)	Invasion locale .....	68
b)	Intravasation .....	71
c)	Survie dans la circulation sanguine .....	73
d)	Arrêt à distance et extravasation .....	74
e)	Micrométastase.....	77
f)	Colonisation.....	79
2)	Bases moléculaires de la métastase .....	82
a)	RAS/RAF/MEK/ERK .....	82
b)	PI3K/Akt/mTOR .....	84
c)	HGF/c-MET .....	86
d)	Wnt/B-Caténine .....	88
e)	JAK/STAT.....	90
3)	Rôle pro-métastatique du microenvironnement tumoral .....	93
a)	Interactions sur le site primaire .....	93
b)	Microenvironnement au site métastatique .....	96
4)	Métastases et PDAC.....	100
a)	Altérations génétiques .....	101
b)	Sous-types tumoraux .....	104
c)	Dérégulations de miARNs.....	107
d)	Cellules souches cancéreuses .....	108
e)	Exosomes.....	109
IV)	Stratégies thérapeutiques innovantes dans le PDAC .....	111
1)	Thérapies actuelles .....	111
a)	Tumeurs résécables d'emblée .....	111
b)	Tumeurs localement avancée .....	113
c)	Formes métastatiques.....	113
2)	Diagnostic précoce .....	114
a)	Généralités .....	114

b) Signature génétique et épigénétique.....	116
c) ARN non codants .....	117
d) Biopsies liquides .....	118
3) Thérapies ciblées .....	120
a) Ciblage moléculaire .....	120
b) Ciblage de la matrice .....	121
c) Immunothérapie .....	125
4) Ciblage des CAFs .....	129
a) Reprogrammer les CAFs .....	129
b) Somatostatine et Analogues de Somatostatine.....	132
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	141
I) Potentiel anti-métastatique du SOM230 : ciblage pharmacologique indirect des fibroblastes associés au cancer .....	143
II) Le ciblage pharmacologique du dialogue entre CAFs et macrophages M2 empêche le développement de métastases dans le PDAC.....	159
III) DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES.....	203
Modèles de PDAC.....	204
Implications des CAFs, des macrophages et de leurs sécrétions dans le développement de métastases .....	206
Effets du SOM230 sur d'autres types cellulaires .....	211
Conclusion générale.....	214
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	215
ANNEXES.....	249



# Liste des figures

Figure 1 : Anatomie du pancréas (D'après Habal F. Le pancréas)

Figure 2: Composition cellulaire du pancréas (rouge : cellules  $\beta$  ; vert : cellules  $\alpha$ ) (Données personnelles et adaptation de Scharfmann et al. 2008)

Figure 3: Lésions précurseurs et modifications génétiques impliquées dans le PDAC (Kleeff et al, 2007)

Figure 4 : Analyse en composante principale des profils d'expression géniques de différents échantillons pancréatiques (Gadaleta et al. 2011)

Figure 5 : Essai clinique sur PDXs : sensibilité des PDX dérivés de 6 cancers à 62 associations thérapeutiques (CR : réponse complète ; PD : maladie en progression ; PR : réponse partielle ; SD : maladie stable) (Gao et al. 2015)

Figure 6 : Stratégie de médecine personnalisée par utilisation de PDX (Hidalgo et al. 2014)

Figure 7 : Schéma descriptif de la stratégie de mutation dans modèle KPC (A) et des différentes lésions observables depuis le tissu sain jusqu'au stade PDAC et métastatique (B–G) (Gopinathan et al. 2015)

Figure 8 : Génération et applications d'organoïdes (Moreira et al. 2018).

Figure 9 : Caractéristiques des principaux modèles d'études précliniques du PDAC (Adapté de Hingorani et Potter 2012)

Figure 10 : Hétérogénéité du microenvironnement tumoral (BM : Membrane basale ; EC : cellules endothéliales ; EMT : transition épithélio-mésenchymateuse ; MDSC : cellules myéloïdes immunosuppressives ; NK : natural killer) (Kalluri et al. 2016)

Figure 11 : Recrutement de CAFs dans le PDAC murin et humain (Provenzano et al. 2012)

Figure 12 : Recrutement, activation et rôles des CAFs dans le PDAC (Ohlund et al. 2014)

Figure 13 : Classification potentielle des sous-types de CAFs (Kalluri et al. 2016)

Figure 14 : Transmission de signaux pro-tumoraux de la matrice aux cellules cancéreuses

Figure 15 : Les 3 phases de l'« immunoediting » (Schreiber et al. 2011)

Figure 16 : Différents acteurs de l'immunité anti-tumorale (<https://www.creative-diagnostics.com/Tumor-Immunity.htm>)

Figure 17 : Implications des TAMs dans la progression tumorale (Rogers et Holen 2011)

Figure 18 : Implications des MDSCs dans la progression tumorale (Millrud et al. 2017)



Figure 19 : Rôles immunosuppresseurs des LTs régulateurs (Plitas et Rudensky 2016)

Figure 20 : Diversité des mécanismes d'invasions tumorales (Friedl et Wolf 2013)

Figure 21 : Mécanismes d'arrêt à distance et d'extravasation des cellules tumorales circulantes : molécules d'adhésion et de signalisation impliquées (Reymond et al. 2013)

Figure 22 : Signalisation de la voie MAPK (Adapté de Smalley et Smalley 2018)

Figure 23 : Signalisation de la voie PI3K et ses principaux effecteurs (Yu et Cui. 2016)

Figure 24 : Signalisation de la voie HGF/MET et ses effecteurs (Garajová et al. 2015)

Figure 25 : Signalisation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine avec ou sans de ligand (Ota et al. 2016)

Figure 26 : Signalisation de la voie JAK/STAT et ses effecteurs (Harrison 2012)

Figure 27 : Induction et mise en place de la niche pré-métastatique (Liu et Cao 2016)

Figure 28 : Représentation schématique de l'évolution génétique dans le PDAC

Figure 29 : Signature génétique et valeur pronostic des sous-types de PDA proposés par Collisson (Collisson et al. 2011)

Figure 30 : Classifications des sous-types génétiques de PDAC (Adapté de Bailey et al. 2016)

Figure 31 : Algorithme décisionnel de prise en charge du PDAC (Adapté de Neuzillet et al. 2018)

Figure 32 : Stratégies d'immunothérapies dans la prise en charge du PDAC (Martinez-Bosch et al. 2018)

Figure 33 : Voies de signalisation régulées par les sous-types de récepteurs à la somatostatine (Theodoropoulou et Stalla 2013)

Figure 34 : Affinité de la somatostatine endogènes et des principaux analogues pour les cinq récepteurs de somatostatine. Valeurs d'IC50 exprimées en nmol/L (Bruns et al. 2002)

Figure 35 : Effets anti-tumoraux directs et indirects des analogues de somatostatine (Adapté de Chalabi et al. 2014)

Figure 36 : Changement de morphologie des PSCs après isolement

Figure 37 : Cinétique de recrutement immunitaire dans le modèle de greffes cellules cancéreuses-PSC

Figure 38 : Interactions entre CAFs macrophages et cellules tumorales, et impact thérapeutique du SOM230

Figure 39 : Protocole d'étude du développement de métastases avec résection de la tumeur primaire, et effets du traitement au SOM230

Figure 40 : Effets du SOM230 sur le compartiment exocrine pancréatique

Figure 41 : Profil d'expression des récepteurs de somatostatine par les macrophages

# Liste des abréviations

ACE	Antigène carcino-embryonnaire
BMDC	Cellules dérivées de la moelle osseuse
CA19-9	Antigène carbohydate 19-9
CAF	Fibroblastes associés au cancer
CAR	Récepteur antigénique chimérique
CK-19	Cytokératine-19
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSF-1	"Colony stimulating factor-1"
CTC	Cellules tumorales circulantes
CTLA-4	"Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4"
CXCL	C-X-C motif ligand
DPC	Duodéno-pancréatectomie céphalique
DTC	Cellules tumorales disséminées
ECM	Matrice extracellulaire
EGF	Facteur de croissance épithélial
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EUS-FNA	Ponction endoscopique à l'aiguille fine guidée par ultrasons
FAK	Kinase d'adhésion focale
FGF	Facteur de croissance de fibroblaste
GEMM	"Genetically engineered mouse models "
GM-CSF	"Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor"
HIF-1	"Hypoxia inductible factor-1"
IFN $\gamma$	Interféron gamma
IGF-1	"Insuline-like growth factor-1"
IL	Interleukine
KRAS	"Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog"
LOX	Lysyl-oxydase
MCP-1	"Monocyte chemoattractant protein 1"

MDSC	"Myeloid-derived suppressor cell"
MIC	Cellules initiateuses de métastases
MLC	Chaîne légère de myosine
MMP	Métalloprotéases matricielles
mTOR	"Mammalian target of rapamycin"
NFκB	"Nuclear factor-kappa B"
NK	"Natural killer"
PanIN	Néoplasie intraépithéliale du pancréas
PD-1	"Programmed cell death 1"
PDAC	Adénocarcinome canalaire pancréatique
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDO	Organoïde dérivé de patient
PDX	Xénogreffe dérivée de patient
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
SDF-1	"Stromal cell-derived factor 1"
TAM	Macrophages associés aux tumeurs
TEM	Migration trans-endothéliale
TGFβ	Facteur de Croissance Transformant β
TIMP-1	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases-1
u-PA	Activateur du plaminogène de type urokinase
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
α-SMA	Actine musculaire lisse alpha

# INTRODUCTION

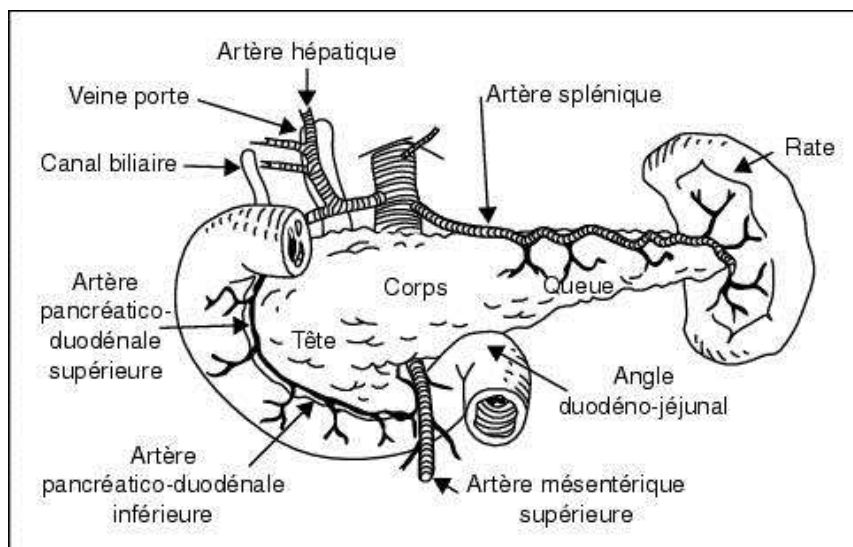


## I) Biologie et pathologies du pancréas

### 1) Anatomie et physiologie du pancréas

#### a) Anatomie

Le pancréas est une glande digestive accessoire, située dans l'espace rétro péritonéal, dans la partie supérieure de l'abdomen, en arrière de l'estomac, et s'étend entre le duodénum et la rate. Il a une forme allongée, et mesure environ 15 cm pour un poids de 70 g. Il présente trois parties : la tête qui correspond à la plus large partie, encadrée par le duodénum, et qui est traversée par la voie biliaire principale ou canal cholédoque ; le corps, la partie horizontale qui s'étend en avant du rein gauche et de la glande surrénale ; la queue qui correspond à la partie terminale la plus effilée et qui est dirigée vers la gauche, à proximité immédiate de la rate et de ses vaisseaux (Figure 1).



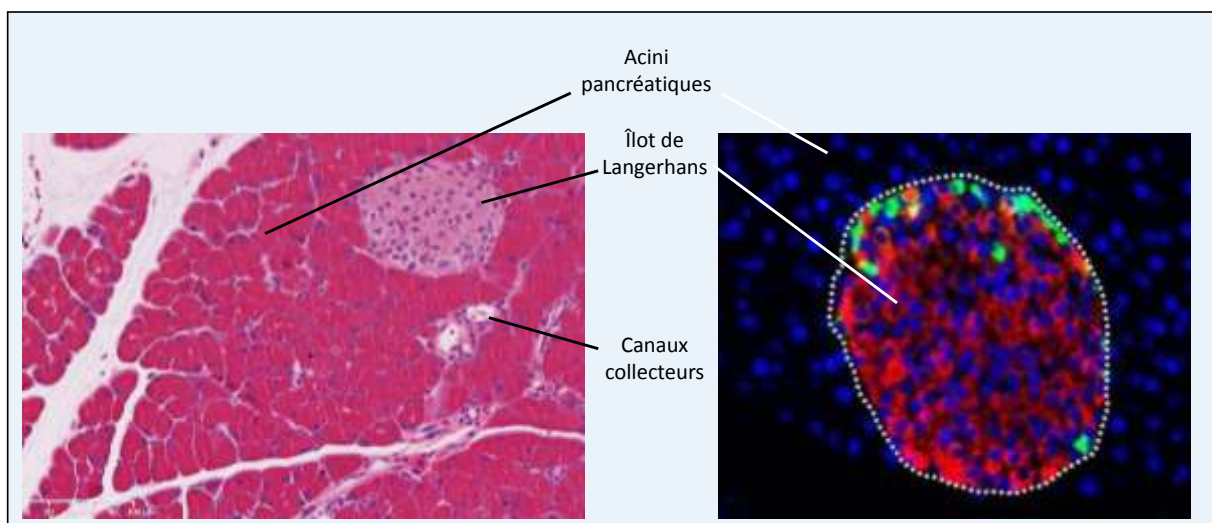
**Figure 1 : Anatomie du pancréas (D'après Habal F. Le pancréas)**

Le pancréas est traversé dans toute sa longueur par le canal pancréatique principal : le canal de Wirsung, qui collecte les sucs digestifs pour les déverser dans le duodénum. Dans un pancréas sain, le tissu est fragile, mou, et le canal de Wirsung a un diamètre de 1,5 à 2 mm. Le pancréas est une glande amphicrine, c'est-à-dire que le tissu pancréatique comprend une partie endocrine et exocrine. La partie exocrine correspond à plus de 80% de la masse du

pancréas ; elle est composée des cellules acineuses qui tapissent les canaux collecteurs du suc pancréatique et qui sécrètent des électrolytes, particulièrement le bicarbonate rendant le pH du suc pancréatique alcalin.

## b) Physiologie

Le pancréas endocrine est impliqué dans la synthèse d'hormones. Cette synthèse se fait par les îlots de Langerhans, des amas cellulaires de 200 à 300  $\mu\text{m}$  qui présentent une vascularisation très riche, ainsi qu'une forte innervation sympathique et parasympathique. Ces îlots sont composés de quatre types cellulaires : les cellules alpha pour environ 20-30%, elles sont plutôt localisées en périphérie des îlots et sécrètent le glucagon (hormone hyperglycémiant) ; les cellules bêta, environ 60-70%, qui sont localisées au centre des îlots et sécrètent principalement l'insuline ; les cellules delta et les cellules F, 10% des îlots, en périphérie des îlots, sécrètent respectivement la somatostatine et le polypeptide pancréatique (Figure 2).



La partie exocrine représente 90% de la masse parenchymateuse et est majoritairement composée des cellules acineuses (80%). Elles sécrètent d'abord des protéases, dont la majorité sous forme inactive ou zymogène ; ces enzymes s'activent ensuite dans la lumière de l'intestin sous l'influence de l'entérokinase. Cette enzyme va catalyser

l'activation du trypsinogène en trypsine, une peptidase qui va elle-même activer plusieurs peptidases pancréatiques pour digérer les protéines, carbohydrates et graisses ingérés. Cette sécrétion d'enzymes sous forme inactive forme un mécanisme protecteur empêchant la production de protéines de digestion dans la glande pancréatique. Les autres peptidases sont la chymotrypsine qui agit sur les acides aminés aromatiques, l'élastase qui agit sur les protéines du tissu conjonctif, la kallikréine, et les carboxypeptidases qui sont des exopeptidases. Des enzymes glycolytiques, comme l'amylase, sont également libérées par les acinis. Elle catalyse l'hydrolyse de liaisons glucosidiques. Des enzymes lipolytiques (lipase, cholestérol hydrolase et phospholipase A2) sont également sécrétées et permettent la dégradation des triglycérides, du cholestérol et des phospholipides alimentaires. Enfin, des nucléases sont produites par le pancréas et dégradent les acides nucléiques. Le produit de sécrétion est déversé dans des canaux excréteurs dont le principal est celui de Wirsung, qui rejoint le duodénum par l'ampoule de Vater. Les cellules canalaire sont quant à elles majoritairement responsables de la sécrétion hydroélectrolytique. Les sécrétions pancréatiques acineuses et canalaire sont régularées par des stimuli neuronaux et endocrines. Ces sécrétions sont stimulées principalement par la cholécystokinine et la sécrétine pour les acinis et les cellules canalaire respectivement. D'autres hormones, comme la somatostatine et le polypeptide pancréatique, inhibent les sécrétions.

## 2) Adénocarcinome canalaire pancréatique

### a) Epidémiologie et facteurs de risques

En 2013 en France, le cancer du pancréas a touché 6039 femmes et plus de 6300 hommes (augmentation de plus de 6% par rapport à 2008), et environ 338000 personnes dans le monde, particulièrement dans les pays industrialisés. Il est le 7ème cancer le plus fréquent chez la femme et le 8ème chez l'homme (Rapport technique de l'INCa, 2017). Son incidence est toujours croissante (Bouvier et al. 2017), contrairement à la plupart des cancers, et si les tendances des dernières années se poursuivent, plus de 14000 patients seront diagnostiqués en 2018. Du fait du pronostic dramatique de ce cancer, la mortalité est virtuellement très proche. En effet, la survie moyenne à 5 ans reste inférieure à 7%, et la plupart des patients



décèdent dans les 6 mois suivant le diagnostic. Cette mortalité élevée en fait le quatrième cancer le plus mortel en France. En l'absence d'avancée thérapeutique significative, il pourrait devenir le deuxième d'ici à 2030.

Le cancer du pancréas survient habituellement entre 60 et 80 ans (plus de 80% des cas), et reste rare avant 50 ans (10% des cas). Il est légèrement plus fréquent chez l'homme que chez la femme (ratio 1,3 : 1). Il n'a pas de cause précise connue, mais de nombreux facteurs de risques ont été identifiés :

- le principal est le tabac, impliqué dans près d'un quart des cancers du pancréas, il multiplie par trois le risque de survenue ;

- l'alimentation joue un rôle qui est discuté : une alimentation riche en graisses et en protéines, ainsi qu'une consommation excessive d'alcool augmenterait modérément le risque, tandis qu'une consommation importante de fruits et de légumes aurait un léger effet préventif ;

- le diabète peut favoriser légèrement l'apparition d'un cancer, mais le risque de développer un cancer pour un patient diabétique est inférieur à 3% (contre environ 0,01% en moyenne) ;

- enfin, certaines maladies pancréatiques rares comme les pancréatites peuvent favoriser l'apparition du cancer. Les formes familiales génétiques sont rares et représentent moins de 10% des cancers du pancréas, mais la probabilité de développer un cancer dans ces familles est extrêmement augmentée (multipliée par 69).

Les signes d'appel sont souvent aspécifiques, comme la douleur dorsale, les troubles dyspeptiques et les troubles du transit, et ressemblent beaucoup à d'autres désordres digestifs (pancréatite, hépatite, hernie hiatale) ; d'autres sont plus révélateurs comme l'ictère et la pancréatite. Une poussée initiale de pancréatite aiguë est retrouvée dans 15% des cas. Les tableaux cliniques constitués associent à des degrés différents trois signes principaux : l'ictère, la douleur, l'altération de l'état général (amaigrissement surtout). L'ictère est le signe le plus évocateur et devient de plus en plus foncé, il résulte d'une compression par la tumeur du canal biliaire avec une rétention biliaire consécutive. La douleur est présente 9 fois sur 10 et constitue le premier symptôme chez plus de deux tiers des patients. Elle varie selon la situation de la tumeur avec une origine épigastrique ou dorsale, irradiant en ceinture ou vers l'épaule. Elle peut être d'intensité variable, et devient progressivement permanente et

inexorable. L'altération de l'état général est quasi constante dans les tumeurs malignes. L'amaigrissement et l'asthénie sont précoces, mal expliqués et sans relation évidente avec le volume tumoral. Des troubles de la glycorégulation sont également fréquents, et une intolérance au glucose est présente chez près de 80% des malades.

Ce manque de symptôme spécifique entraîne un diagnostic très tardif. Les symptômes deviennent plus prononcés avec la progression de la maladie, et le diagnostic repose surtout sur l'association d'une altération de l'état général avec troubles digestifs et l'imagerie médicale (échographie, radiographie, IRM, échoendoscopie, ...). A l'heure actuelle et même si de nombreuses recherches sont en cours, aucun marqueur tumoral ne permet un diagnostic précoce du cancer du pancréas ; certains sont utilisés dans la surveillance d'un cancer traité (l'antigène carcino-embryonnaire ACE et le CA 19-9 principalement). L'élévation de ces marqueurs, si elle ne permet pas le diagnostic, est souvent corrélée avec le volume tumoral et joue plutôt un rôle pronostic.

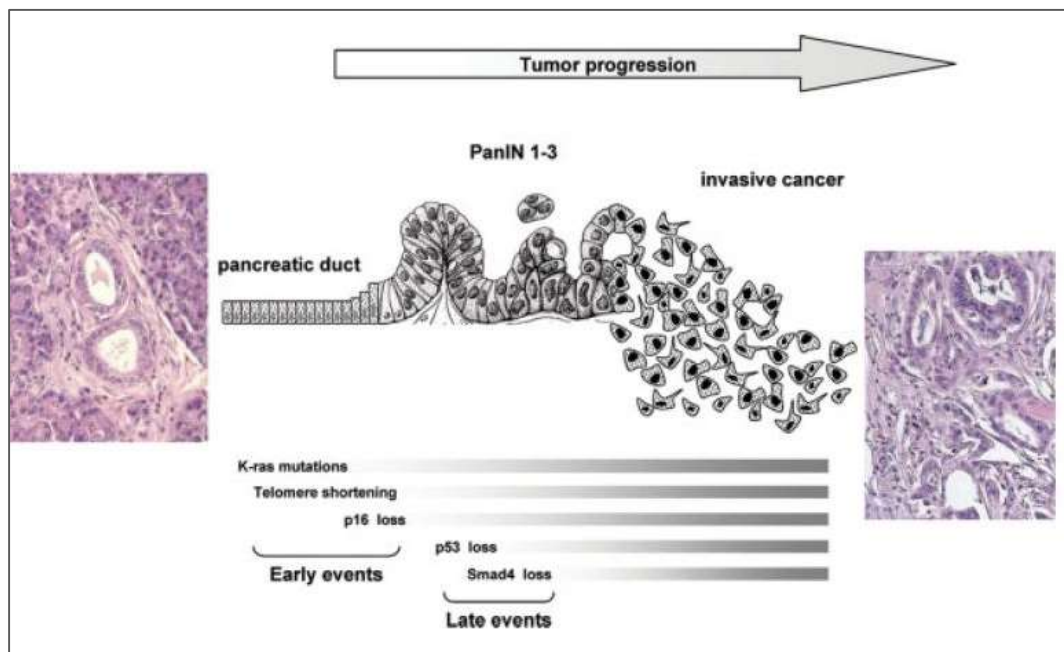
Dans 95 % des cas, la tumeur se développe aux dépens des cellules exocrines : on parle d'adénocarcinome du pancréas. Les autres tumeurs potentiellement malignes du pancréas sont les tumeurs neuroendocrines qui se développent au dépend des cellules des îlots de Langerhans. Elles sont beaucoup plus rares et leur prise en charge diffère totalement.

## b) Biologie du PDAC

Sur 12000 nouveaux cas de cancer du pancréas diagnostiqués chaque année (InCA), plus de 11000 sont des adénocarcinomes (PDAC). Il représente plus de 90% des cancers de pancréas, et se caractérise par une destruction des cellules acineuses exocrines et l'apparition de cellules cancéreuses ayant un phénotype canalaire. Les cellules cancéreuses de PDAC présentent une ressemblance avec les cellules canalaire pancréatiques au niveau histologique, avec une forme cubique, l'expression d'antigène canalaire (Cytokératine-19 CK19), et la croissance dans des structures tubulaires, mais n'ont pas toutes des origines canalaire. L'agressivité de ce cancer s'explique en partie par sa forte propension à disséminer rapidement, associée à sa résistance aux traitements conventionnels et aux thérapies ciblées. Le PDAC touche souvent la tête du pancréas (70%), ainsi que le corps dans 15% des cas et la queue dans 10%. Une infiltration dans les tissus environnants est souvent retrouvée, notamment dans les vaisseaux lymphatiques, la rate, la cavité péritonéale, et avec l'apparition

rapide de métastases hépatiques et pulmonaires. Ce cancer se caractérise aussi par la présence d'un stroma dense et réactif, qui sera décrit dans la deuxième partie de ce travail. Le cancer se développe après trois principales lésions précurseurs, les PanINs, ou « Pancreatic intraepithelial neoplasia », les néoplasies mucineuses kystiques et les néoplasies mucineuses papillaires intracanalaires. La plus connue et la plus étudiée est la lésion PanIN, qui apparaît avec l'âge. Les PanINs sont des lésions intracanalaires non-invasives classées par sévérité croissante du niveau 1 au niveau 3. Les niveaux 1 et 2 correspondent à des lésions précancéreuses, et le niveau 3 à un carcinome *in situ* évoluant vers le PDAC (Figure 3). Les lésions PanIN1 et PanIN2 peuvent être retrouvées dans les pancréas non cancéreux de sujets âgés (retrouvées chez 30% des sujets âgés autopsiés) (Maitra et al. 2005 ; Hezel et al. 2006).

Le développement de ces lésions est associé à l'apparition d'altérations génétiques précoces et tardives (Moskaluk et al. 1997). L'activation de l'oncogène KRAS est un des événements génétiques les plus précoces, qui induit la modification de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation et la survie via l'activation de nombreuses voies de signalisation, comme la voie RAF-mitogen-activated-kinase (MAPK), la voie phosphoinositide-3-kinase (PI3K). Cette mutation est retrouvée dans environ 30% des néoplasies précoces du pancréas, et dans presque 100% des PDAC avancés.



**Figure 3: Lésions précurseurs et modifications génétiques impliquées dans le PDAC (Kleeff et al, 2007)**

La mutation du gène p16/INK4a est précoce, retrouvée dans 80% des PDAC, et empêche l'effet de blocage du cycle cellulaire par inhibition de CDK 4/6, ce qui conduit à une augmentation de la prolifération cellulaire. La mutation du gène suppresseur de tumeur p53 est un évènement génétique plus tardif, retrouvé dans plus de 50% des PDAC. Le gène p53 est le gène « gardien du génome » ; il permet, lorsqu'une mutation survient, de faciliter l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Si la réparation est impossible, il permet l'apoptose et l'élimination des cellules mutées. La perte des fonctions de p53 entraîne l'accumulation de lésions génétiques, avec l'augmentation de la croissance et de la survie des cellules portant des aberrations chromosomiques pro-carcinogènes. Enfin, l'inactivation du gène Smad4/DPC4 est tardive, retrouvée dans 50% des PDAC, et conduit à la perte de fonction de ce facteur de transcription essentiel pour l'effet inhibiteur du TGF $\beta$  sur la prolifération des cellules cancéreuses.

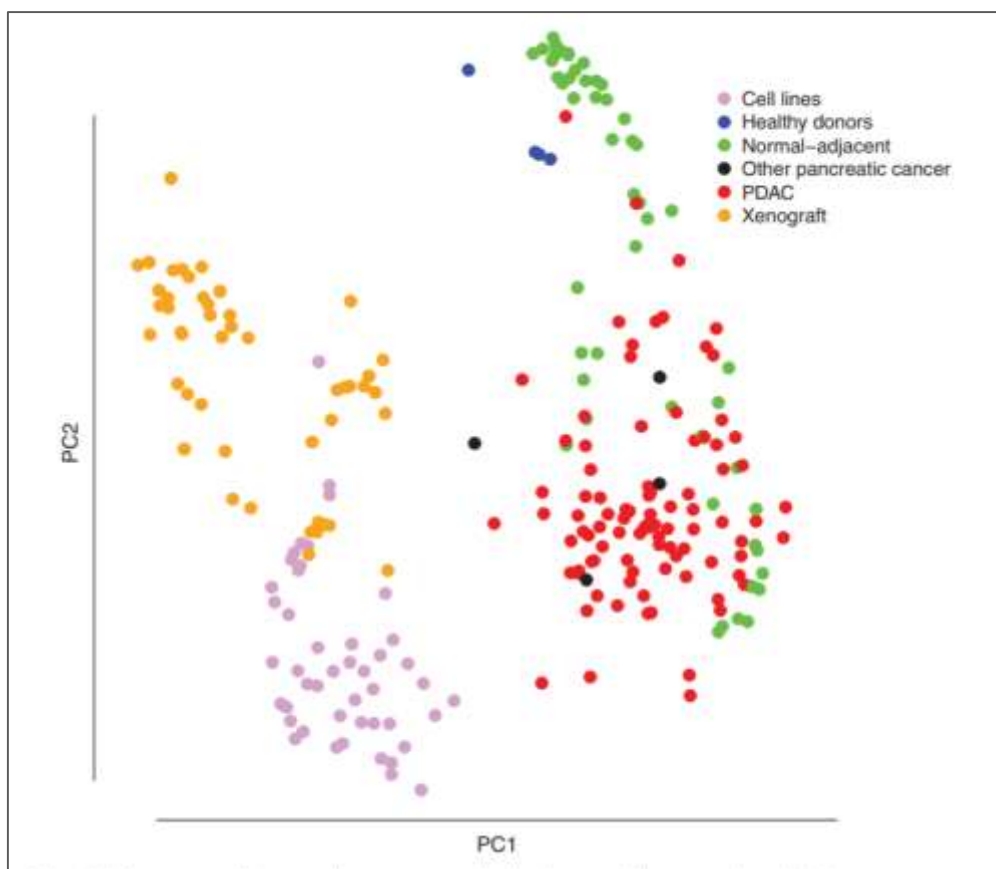
### c) Modèles expérimentaux d'étude du PDAC

#### i) Modèles cellulaires

La première lignée humaine de cancer du pancréas, la lignée CaPa a été isolée en 1963 par Dobrynin (Dobrynin, 1963). Depuis, de nombreuses autres ont été établies, décrites au niveau mutationnel et phénotypique, et une quinzaine d'entre elles sont classiquement utilisées en recherche préclinique (MiaPaCa-2, PANC-1, AsPC-1, BxPC-3, Capan-1/2, notamment) (Deer et al. 2010). Ces lignées sont particulièrement utiles dans le développement de nouvelles thérapies, et sont le plus souvent la première étape dans le criblage pharmacologique des molécules isolées et produites chimiquement. Leurs principaux avantages sont le coût réduit des manipulations (en comparaison aux études sur l'animal), l'homogénéité des cellules, la rapidité et la facilité à les amplifier. Ce sont également de très bons outils pour des modifications génétiques (transfections, ARN interférents, gain ou perte d'expression d'un gène cible par exemple). L'étude des spectres d'expression génique dans différentes lignées issues de patients peut également être utile pour corrélérer des variations d'un gène donné à un bon ou mauvais pronostic, ou à des réponses à des traitements, et ainsi contribuer à la découverte de cibles en validant fonctionnellement des résultats obtenus sur tumeurs de patients (Collisson et al. 2011).

Cependant, et malgré leur utilité indiscutable, les lignées cellulaires isolées présentent aussi de nombreuses failles et défauts. Il est d'abord important de remarquer que la grande

majorité des recherches précliniques est réalisée sur une dizaine de lignée de PDAC différentes. Ces lignées ne représentent absolument pas toutes les différences observables dans les cancers du pancréas, qui se caractérisent par une importante hétérogénéité inter-patients (Cros et al. 2017). Le deuxième défaut majeur est lié à la culture cellulaire elle-même. Au sein d'une tumeur, les cellules sont polarisées et organisées en structure en trois dimensions, alors qu'elles poussent en couches uniques au laboratoire, sans organisation et sans différenciation fonctionnelle. De plus, et de manière particulièrement importante dans la cadre du PDAC, un biais des lignées cancéreuses est l'absence de microenvironnement. En effet, il est maintenant clairement admis que celui-ci n'est pas neutre au sein et de la tumeur, et qu'il joue au contraire un rôle majeur dans la capacité de prolifération, d'invasion, de chimiorésistance des cellules cancéreuses. Les travaux de Gadaleta et ses collaborateurs ont mis en évidence des différences de profils d'expression géniques entre des tissus provenant de patients, des tissus de xénogreffes et des lignées cellulaires, suggérant un rôle important du microenvironnement tumoral (Figure 4) (Gadaleta et al. 2011).



**Figure 4 : Analyse en composante principale des profils d'expression géniques de différents échantillons pancréatiques (Gadaleta et al. 2011)**

Enfin, il faut prendre en compte la probable sélection ou dérive génétique de clones sur les lignées isolées de tumeurs. Cette sélection peut se faire au cours de l'établissement de la lignée, avec une survie préférentielle de clones plus résistants ou plus prolifératifs, mais également au fur et à mesure des passages et du maintien de la lignée, avec l'apparition de nouvelles mutations qui ne reflètent pas celles présentes dans la tumeur primaire. Les traitements efficaces sur ces clones ne seront donc à priori pas efficaces sur l'ensemble des clones présents dans la tumeur, et encore moins sur les clones métastatiques. Même si les lignées constituent des modèles incontournables pour la recherche et le développement de cibles, d'autres modèles d'étude sont donc indispensables pour appréhender la complexité de la biologie du PDAC.

## ii) Greffes

Les greffes de cellules cancéreuses sont utilisées comme un équivalent *in vivo* des lignées cellulaires, pour confirmer les résultats obtenus *in vitro*. Elles consistent en l'injection de cellules en culture, ce qui permet d'obtenir rapidement des résultats sur l'animal et de produire des cohortes homogènes et importantes. L'injection qui peut être orthotopique, c'est-à-dire dans le tissu d'origine des cellules (dans le pancréas dans le cas du PDAC), ou ectopique (dans un tissu différent), classiquement en sous-cutané. L'avantage des greffes orthotopiques est qu'elles impliquent le recrutement d'un microenvironnement au niveau de l'organe d'origine, qui sera théoriquement plus proche du microenvironnement de la tumeur humaine que dans le cas d'une injection sous-cutanée, avec donc une meilleure cohérence par rapport aux résultats cliniques. Il faut aussi distinguer les xéno greffes, où le donneur est d'une espèce biologique différente du receveur, comme c'est le cas lors des injections de cellules cancéreuses humaines dans des modèles murins immunodéficients, et les allogreffes, injections de cellules isolées de tumeurs murines dans des souris. Lorsque les souris « donneuses » et « receveuses » sont d'un fond génétique identique, on parle de greffes syngéniques, qui peuvent être réalisées sur des souris immunocompétentes. La composante immunitaire du microenvironnement est alors présente et peut être étudiée, ce qui améliore aussi la pertinence biologique par rapport au cancer humain.

Malheureusement, les observations faites sur ces modèles sont assez peu prédictives des résultats sur l'humain, et on estime que seulement environ un tiers (37%) des résultats précliniques sont avérés ensuite en clinique (Hackam et Redelmeier 2006). Les réponses

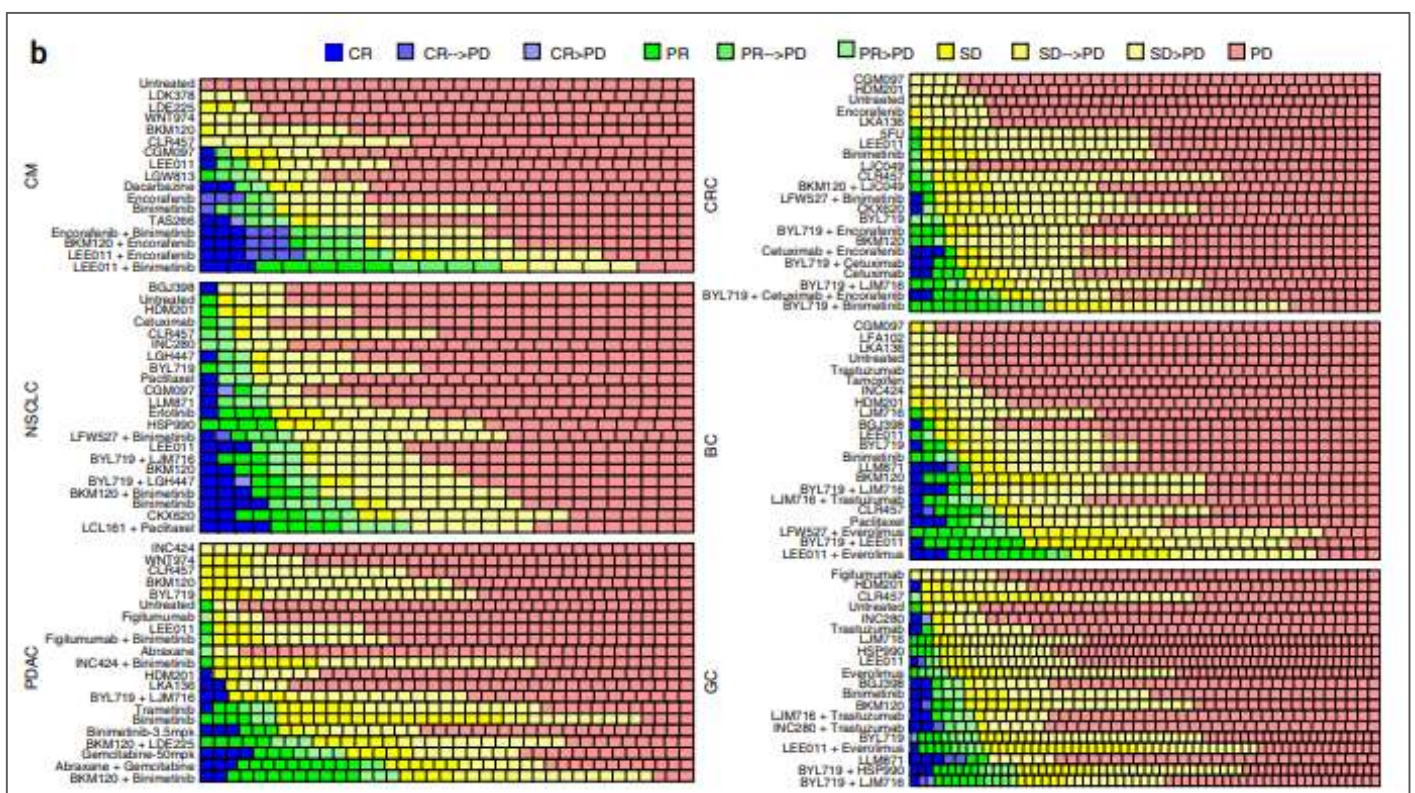
thérapeutiques sont également assez variables entre les modèles de greffes et la clinique. Par exemple, l'équipe de Radinsky a montré en 2000 un effet drastique de l'association de la gemcitabine et d'un anticorps bloquant le récepteur à l'EGF sur une lignée L3.6pl de PDAC, avec une réduction du volume tumoral et des métastases (Bruns et al. 2000). Dix ans plus tard, une étude de phase III comparant la gemcitabine seule ou en association avec le cetuximab, un anticorps anti-EGFR, échouait à montrer un bénéfice de l'association (Philip et al. 2010). Ces résultats peu prédictifs s'expliquent par différents facteurs, dont certains comparables aux défauts des lignées cellulaires. En effet, les lignées isolées et amplifiées ont favorisé certains clones tumoraux au détriment d'autres, et ont certainement acquis de nouvelles mutations : la tumeur formée à partir de ce clone sera donc fondamentalement différente d'une tumeur naturelle. Il faut ajouter que les tumeurs formées à partir d'une lignée prennent la forme de masses cellulaires homogènes, même si un microenvironnement est recruté, l'infiltration de la tumeur par celui-ci est limitée. Dans le cas du PDAC, ce phénomène est problématique quand on sait que les tumeurs sont composées en majorité de cellules du microenvironnement et de matrice acellulaire. Une alternative peut être d'injecter simultanément aux cellules cancéreuses des cellules du microenvironnement, comme des macrophages ou des fibroblastes, pour se rapprocher d'avantage des tumeurs humaines. Il y a enfin un certain nombre de paramètres inhérents à l'expérience qui peuvent considérablement influencer les résultats : par exemple le site d'injection, la vitesse de croissance tumorale, le volume tumoral au moment de l'initiation du traitement, ou encore la dose, la voie d'administration et la formulation de la molécule testée. D'autres modèles plus évolués et pertinents sont donc indispensables pour améliorer l'efficacité de la phase préclinique.

### iii) PDX

C'est pour combler une partie des failles des greffes de cellules que les xénogreffes dérivées de patients (PDX) ont été développées. Ces PDX consistent en l'implantation en orthotopique ou en ectopique de fragments de tumeurs provenant d'une résection tumorale ou de biopsies provenant d'écho-endoscopie. L'apport majeur de ces greffes est que les cellules transplantées maintiennent les caractéristiques histologiques et génétiques de la tumeur d'origine, et restent stables au cours des passages d'une souris à l'autre (Jung et al. 2016). Un autre avantage est que les fragments contiennent toujours le microenvironnement

de la tumeur humaine. Au fur et à mesure des passages, le stroma humain ne se maintient pas et est remplacé par le stroma murin, qui va contribuer à la prise tumorale (Delitto et al. 2015). Les PDX sont également des relativement bons reflets des tumeurs initiales, notamment au niveau de la réponse aux thérapies puisque une étude a montré que les sensibilités des tissus dérivés de PDX à la gemcitabine à l'irinotecan était cohérentes par rapport aux réponses cliniques des patients desquels dérivait les PDX (Roife et al. 2016).

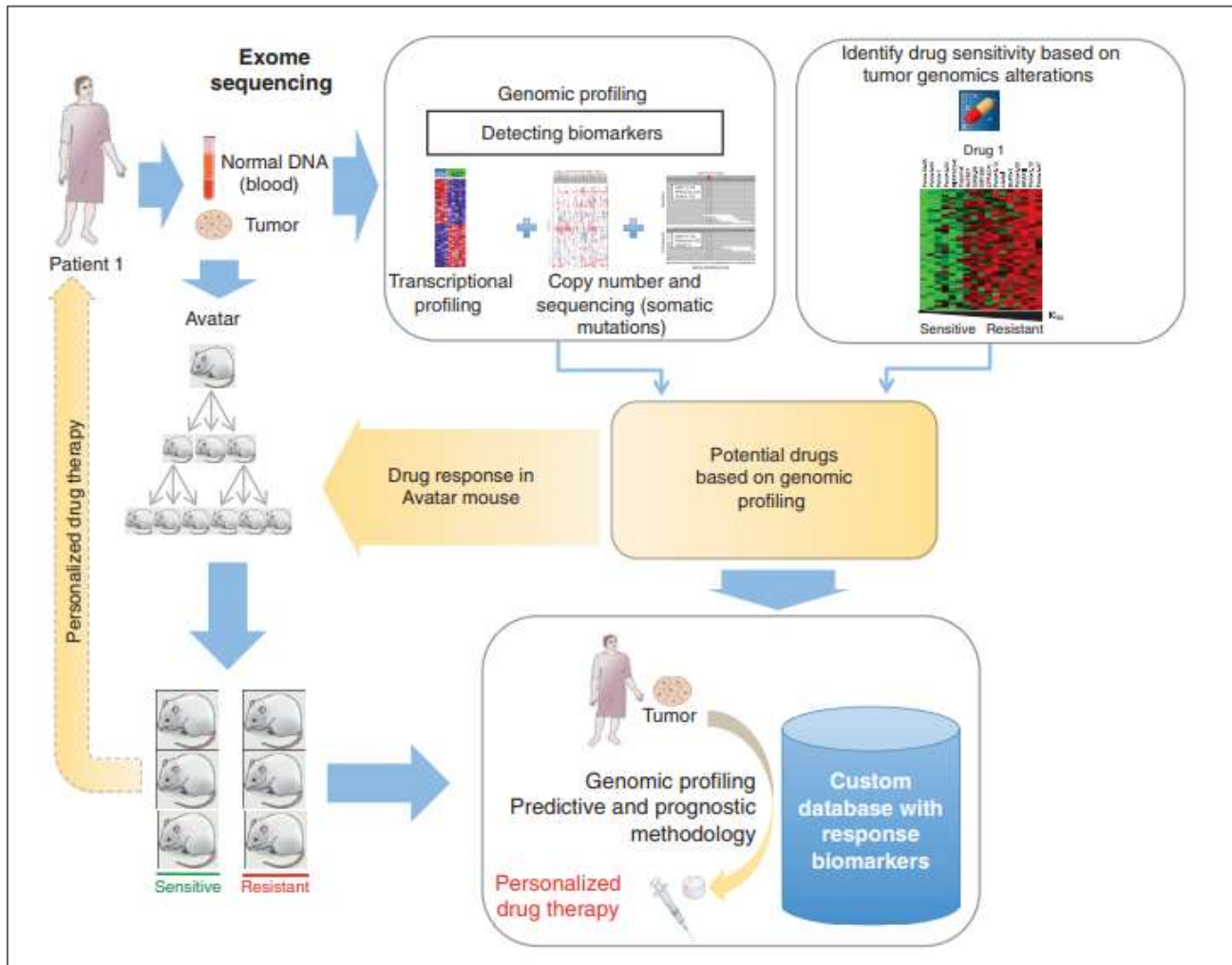
Ces propriétés (maintien des caractéristiques histologiques, génétiques, réponse aux traitements) font des PDX de bons candidats pour les tests de molécules, la recherche de biomarqueurs, mais aussi pour le développement de traitements personnalisés. Dans une étude de 2015, Gao et ses collaborateurs ont utilisé environ 1000 PDX de six types de cancers solides, dont des PDAC, pour tester 62 traitements différents. Ils montrent une reproductibilité et une cohérence avec les résultats cliniques en identifiant des associations entre des génotypes particuliers et des réponses thérapeutiques (Figure 5) (Gao et al. 2015).



**Figure 5 : Essai clinique sur PDX : sensibilité des PDX dérivés de 6 cancers à 62 associations thérapeutiques (CR : réponse complète ; PD : maladie en progression ; PR : réponse partielle ; SD : maladie stable) (Gao et al. 2015)**



Une stratégie de médecine personnalisée utilisant les PDX est détaillée dans la figure 6 : en parallèle de la constitution de cohortes de PDX, l'analyse génétique des échantillons provenant directement du patient permet d'identifier des stratégies thérapeutiques. Les molécules sont ensuite testées sur la colonie de PDX afin de mettre en évidence le traitement le plus efficace.



**Figure 6 : Stratégie de médecine personnalisée par utilisation de PDX (Hidalgo et al. 2014)**

Malheureusement, il y a également plusieurs inconvénients majeurs avec les PDX, particulièrement dans le cas du PDAC. D'abord, les transplantations ne réussissent pas toujours, et il est nécessaire de parvenir à un taux de succès d'au moins 60%, pour la médecine personnalisée, mais aussi pour que les collections de PDX soient représentatives de l'hétérogénéité inter-patient car il a été montré que les tumeurs plus agressives étaient plus facilement transplantables (Hidalgo et al. 2014). Un autre facteur problématique est le taux

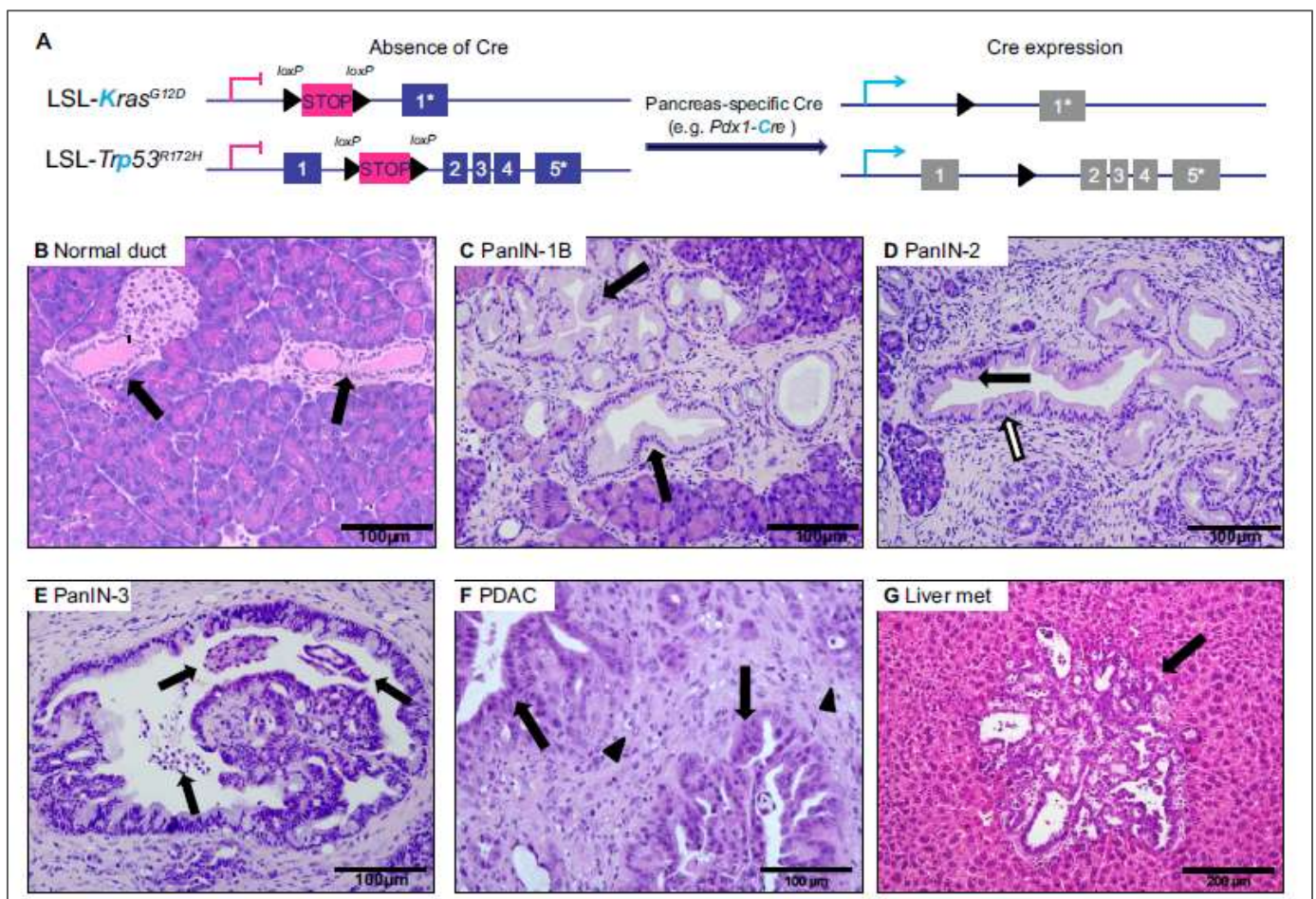
de résection des tumeurs pancréatiques autour de 15%, ce qui implique que l'utilisation de PDX pour la mise au point de traitements personnalisés ne bénéficiera qu'à une faible proportion de patients. Il faudrait améliorer les techniques de transplantation pour permettre de générer les PDX à partir de petites quantités de tissu tumoral, par exemple avec des prélèvements d'endoscopie, ce qu'a réussi à réaliser l'équipe de Iovanna avec un taux de réussite toutefois moindre qu'avec les pièces d'exérèse chirurgicale (Nicolle et al. 2017). Il faut également prendre en compte le fait que la création de PDX, au-delà du coût important, peut prendre plus de 6 mois. Cette durée est simplement trop longue dans le cas du PDAC, quand on sait que la médiane de survie après le diagnostic est autour de 6 mois.

#### iv) Modèles transgéniques

Les modèles murins génétiquement modifiés (GEMMs) sont générés en introduisant des mutations d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le cancer à étudier, dans notre cas le PDAC. Les premiers modèles présentaient une mutation activatrice de *Kras* spécifiquement dans le pancréas, qui induisait le développement de PanINs, des lésions précancéreuses pouvant évoluer en adénocarcinome invasif (Hingorani et al, Cancer Cell 2003). Ces modèles peuvent être conditionnels, où l'expression du transgène est conditionnée dans un type cellulaire spécifique par l'expression d'une protéine exogène (par exemple la recombinaise Cre dans le modèle Cre-loxP). Ils peuvent également être inductibles, avec une expression du transgène réversible dépendante d'une molécule comme par exemple le système Tet-off/Tet-on où l'expression du gène d'intérêt est induite par la présence ou l'absence de tétracycline (ou d'un de ses dérivés). Récemment, l'équipe de Dieter Saur a aussi développé un système inductible à double recombinaise qui associe le système flippase-FRT et Cre-loxP. Ce modèle permet une manipulation génétique temporelle dans plusieurs types cellulaires, par exemple dans les cellules cancéreuses et du microenvironnement, et ce de manière indépendante (Schönhuber et al. 2014). De nombreux modèles GEMMs ont été générés, avec l'introduction entre autres de mutations typiques du cancer du pancréas (*P16INK4A*, *TP53*, *SMAD4*) (Gopinathan et al. 2015), mais le plus utilisé dans les études précliniques de PDAC est le modèle KPC.

Les souris KPC contiennent des mutations conditionnelles de *Kras* (G12D) et de *Trp53* (R172H), sous la régulation d'une recombinaise Cre exclusivement pancréatique. En l'absence de la recombinaise, des codons STOP flanqués de sites LoxP (LSL) bloquent l'expression des

mutants. En présence du promoteur Pdx-1, c'est-à-dire dans les cellules pancréatiques, le recombinaise Cre va s'exprimer, et cliver les sites LoxP, la cassette STOP est excisée et les mutants peuvent s'exprimer (Figure 7). Les souris KPC développent rapidement (médiane de survie d'environ 5 mois) des tumeurs pancréatiques différenciées, desmoplastiques, très proches de la pathologie humaine. Ces tumeurs sont également métastatiques, avec des lésions au niveau du foie, des poumons et du diaphragme (Hingorani et al. 2005).



**Figure 7 : Schéma descriptif de la stratégie de mutation dans modèle KPC (A) et des différentes lésions observables depuis le tissu sain jusqu'au stade PDAC et métastatique (B-G) (Gopinathan et al. 2015)**

Les GEMMs, et particulièrement le modèle KPC, sont le modèle de référence dans les études précliniques dans le PDAC (Erkan et al. 2009; Jacobetz et al. 2012; Koong et al. 2000; Olive et al. 2009; Provenzano et al. 2012). L'hypovascularisation due à la densité du microenvironnement au sein de la tumeur réduit la distribution des chimiothérapies, de la même manière que chez l'Homme, ce qui contribue à expliquer la faible efficacité des

traitements (Olive et al. 2007). Les GEMMs sont également très utilisés pour étudier les effets d'une mutation sur le développement du PDAC, et ont permis d'identifier de nombreuses cibles thérapeutiques potentielles (voies MEK, PI3K, Hedgehog, Notch, ...). Ces modèles permettent également de mettre en évidence des facteurs aggravants, comme l'obésité, les régimes gras, la pancréatite, qui accélèrent l'apparition des lésions cancéreuses dans les modèles spontanés de PDAC. Les GEMMs sont largement utilisés pour étudier le microenvironnement du PDAC, et particulièrement pour décrypter l'équilibre entre stroma pro- et anti-tumoral (Rhim et al. 2014 ; Ozdemir et al. 2014 ; Ohlund et al. 2016). Ils ont aussi l'avantage de présenter un système immunitaire intact, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude des réponses immunitaires, et des immuno-thérapies. Enfin, en raison des similitudes entre le modèle KPC et les PDAC humains (mise en place à partir de lésions précancéreuses, microenvironnement dense et actif, immunité intacte), les KPC sont également très prometteurs pour identifier des biomarqueurs précoces. De nombreuses études protéomiques ont été réalisées, avec la mise en évidence de nombreux candidats qui doivent être validés avant une utilisation clinique. Récemment, les exosomes exprimant le glypican-1 ont été identifiées à la fois dans des lignées et dans des GEMMs, comme un biomarqueur avec une sensibilité et une spécificité remarquable à des stades précoces de la maladie (Melo et al. 2015).

Malgré toutes ces qualités, plusieurs défauts majeurs des GEMMs sont à noter. Ces modèles sont d'abord extrêmement longs et coûteux à mettre en place. La génération de modèles triple-transgéniques implique aussi une grande perte d'animaux nouveau-nés avec un phénotype non désiré. De plus, l'hétérogénéité de délai d'apparition de tumeurs entre les souris nécessite l'utilisation de techniques d'imagerie pas toujours disponibles. Enfin, malgré leur ressemblance avec les PDAC humain, il reste encore d'importantes différences entre les tumeurs issues de GEMM et les tumeurs humaines, qui peuvent expliquer les échecs cliniques de traitements testés sur les GEMMs et finalement pas efficaces sur l'Homme. D'autres modèles précliniques permettant une prédiction fiable de la réponse thérapeutique sont toujours nécessaires.

#### v) Organoïdes

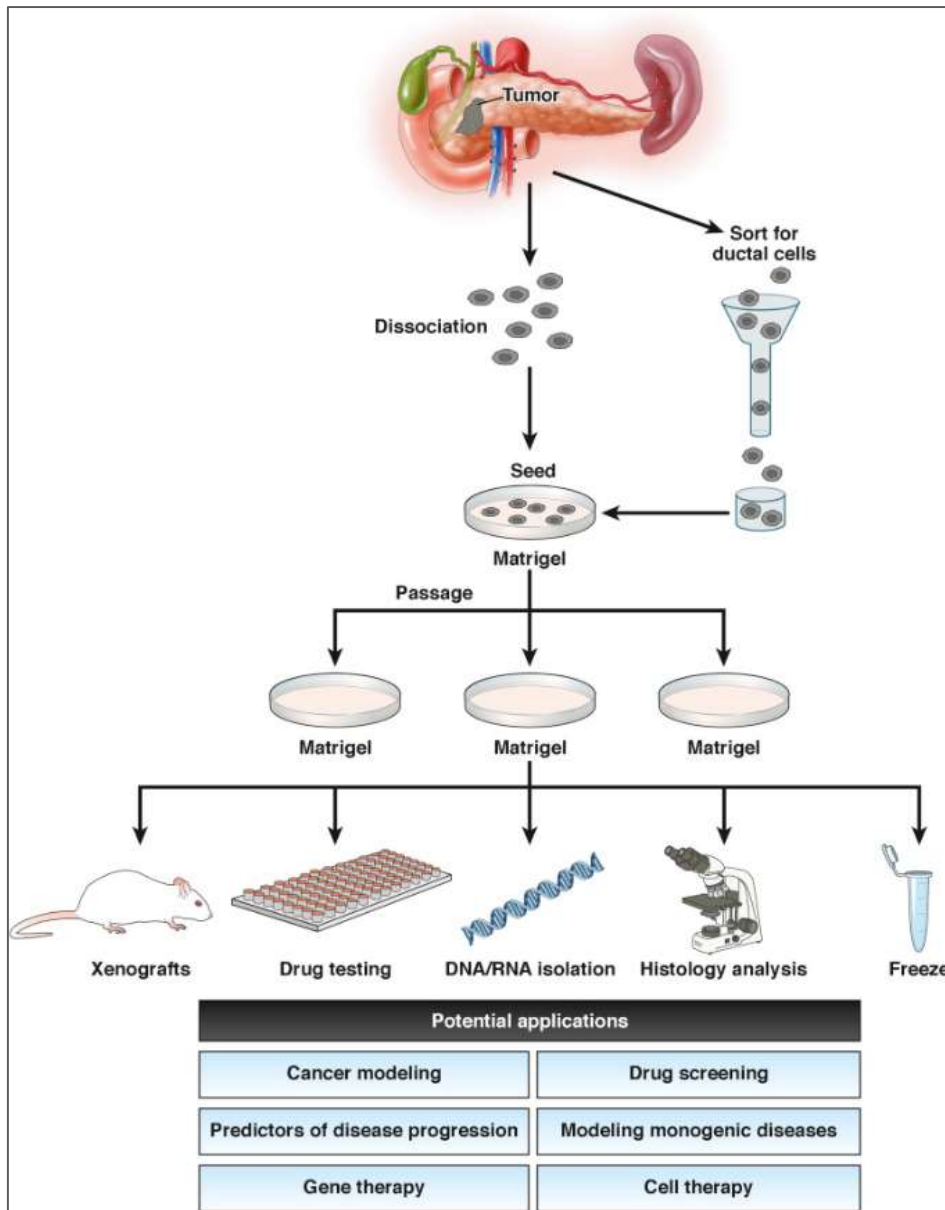
Les organoïdes sont un modèle tridimensionnel de culture, qui consiste à inclure des tissus des matrices sous des conditions particulières, dans lesquelles les cellules vont

s'organiser et reformer des structures similaires à leur tissu d'origine. Le protocole a été développé en 2009, par l'équipe de Hans Clevers, en isolant des cellules souches de cryptes intestinales, et en reproduisant *in vitro* l'environnement du tissu normal, ces cellules souches étaient capables de reformer ces cryptes (Sato et al. 2009). La même équipe a optimisé la technique pour cultiver sous forme d'organoïdes des cellules de colon normal et cancéreux, humain et murin (Sato et al. 2011).

Plus récemment, en 2015, les groupes de Muthuswamy et Tuveson ont mis au point la culture d'organoïdes d'épithélium pancréatique en utilisant des cellules normales et cancéreuses provenant de tissu humain et murin (Boj et al. 2015 ; Huang et al. 2015). Les cellules sont incluses dans du Matrigel qui contient les composants principaux de la membrane basale, et supplémentées avec des facteurs de croissance. Ces facteurs sont notamment l'EGF (inducteur de division cellulaire), de la R-spondine-1 (activateur de la voie Wnt), la Noggin (inhibiteur de la voie des Bone morphogenetic protein BMP) et la protéine Wnt3a.

Un des avantages de la culture d'organoïdes est la possibilité de cultiver des cellules normales, non-cancéreuses pour les comparer aux cellules cancéreuses, car ces cellules saines sont très difficiles à maintenir en culture en deux dimensions du fait de leur durée de vie limitée et de leur faible taux de prolifération. Les organoïdes permettent donc d'étudier les stades précoces de la transformation. Le taux de succès de génération d'organoïdes est également très bon, meilleur que la génération de cultures en 2D. Les organoïdes sont développés à partir de petites quantités de tissu tumoral, avec également la possibilité de cultiver du tissu pancréatique sain associé au tissu cancéreux du patient si la pièce opératoire en contient, ce qui en fait un outil de choix pour comparer les caractéristiques des deux types cellulaires.

Les cultures d'organoïdes de PDAC permettent une large variété d'études cellulaires et moléculaires. Les extractions d'ADN et d'ARN et donc les études de spectres de mutations et de transcriptomiques sont facilitées, avec des comparaisons possibles de banques d'organoïdes composés de tissu épithélial pancréatique sain et cancéreux, et l'identification de sous-types fonctionnels (Boj et al 2015 ; Seino et al. 2018). Les organoïdes sont également génétiquement modifiables par transfection et infection, ce qui permet l'étude de gènes mutés et l'évaluation de modifications ciblées (Seino et al, 2018).



**Figure 8 : Génération et applications d'organoïdes (Moreira et al. 2018).**

Enfin, un aspect prometteur de la culture d'organoïdes serait le développement de nouvelles molécules thérapeutiques, ainsi que la thérapie personnalisée. Les organoïdes dérivés de tumeurs sont proches phénotypiquement et génétiquement des tumeurs d'origine, et pourraient être supérieurs aux autres modèles, y compris les GEMMs, pour valider de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour être bénéfique à la plupart des patients atteints de PDAC, les organoïdes doivent pouvoir être générés rapidement et à partir de petites biopsies, et pas de pièces opératoires car seule une faible partie des patients est susceptible d'être résectionnée. Il est maintenant possible de générer des organoïdes en quelques semaines à partir

de ponction-biopsie à l'aiguille fine sous écho-endoscopie (EUS-FNA), ce qui donne l'espoir que ces modèles puissent être disponibles dans un délai permettant des tests thérapeutiques pour la plupart des patients. Des résultats récents très encourageants montrent que les organoïdes dérivés de patients peuvent récapituler les réponses cliniques des patients atteints de cancers colorectal et gastro-œsophagien et pourraient être mis en œuvre dans des programmes de médecine personnalisés (Vlachogiannis et al. 2018). Enfin, le groupe de Tuveson a constitué une bibliothèque de 114 PDOs (organoïdes dérivés de patients) à partir de 159 échantillons humains de tumeur primaire ou de métastases (résections ou biopsies à l'aiguille fine). Ils ont montré par des analyses de séquençage à haut débit que dans près de 80% des cas, les PDOs présentaient les mêmes altérations génétiques que les tumeurs d'origine. Ils ont ensuite identifié des signatures géniques associées à une sensibilité ou une non-sensibilité des organoïdes à différentes drogues utilisées en clinique dans le traitement du PDAC (gemcitabine, paclitaxel, 5-fluorouracile, oxaliplatine et irinotecan). Ces signatures étaient prédictives de la survie des patients, notamment dans la réponse au protocole FOLFIRINOX. De manière très intéressante, dans les sous-groupes identifiés comme non-sensibles à l'oxaliplatine, certains patients présentent un enrichissement pour d'autres signatures chimiosensibles, suggérant ainsi qu'une stratégie thérapeutique pourrait bénéficier à ces patients. De plus, sur les PDOs ne montrant pas de sensibilité aux cinq molécules principales testées, plus de la moitié (52%) montraient une sensibilité à d'autres agents thérapeutiques testés (inhibiteurs de tyrosine kinase, inhibiteur de mTOR, inhibiteurs de PARP) (Tiriac et al. 2018). Enfin, malgré la fenêtre réduite de la médecine personnalisée dans le PDAC due à la médiane de survie courte, il est envisageable de penser que le « pharmacotypage » d'organoïdes dérivés de patients permettra d'ici peu d'orienter les recommandations cliniques.

vi) Bilan

Modèle	Lignées cellulaires	Greffes hétérotopiques	Greffes orthotopiques	PDX	GEMM	Organoïdes
Description	Lignées établies de tumeurs humaines ou murines	Cellules cancéreuses injectées dans un hôte immuno-déficient (possibilité de receveur immunocompétent avec les lignées murines syngéniques)		Fragments tumoraux de patients transplantés dans un hôte immunodéficient	Modèles transgéniques spontanés pré-invasifs et invasifs de PDAC	Cultures en 3 dimensions de tumeurs pancréatiques
Processus reproduits	Prolifération, survie, invasion, migration de cellules cancéreuses	Croissance tumorale, invasion/métastases			Initiation, progression, physiopathologie du cancer	Initiation, progression, physiopathologie du cancer
Coût	€	€€		€€€	€€€	€€€
Microenvironnement	Absent	Limité, pas d'origine pancréatique	Présent mais limité, d'origine pancréatique	Transplantation du stroma humain, remplacé au fur et à mesure par le stroma murin	Présent, proche du PDAC humain	Maintien du microenvironnement tissulaire
Système immunitaire	Absent	Absent (sauf greffes murines syngéniques)		Absent	Normal	Présent
Avantages	Rapide, reproductible, cellules humaines	Rapide et simple, cellules humaines, pratique pour le test de molécules	Croissance dans le pancréas, Rapide et simple, cellules humaines, pratique pour le test de molécules	Mime la réponse du patient aux chimiothérapies, tests de traitements personnalisés dans des avatars murins, maintien du potentiel métastatique	Possibilité d'étudier l'effet de mutations, recherche de biomarqueurs précoces, proche de la pathologie humaine	Peu de tissu nécessaire, maintien de l'hétérogénéité du tissu, possibilité de transplanter,
Limites	Peu pertinent par rapport à la physiologie du cancer humain, sélection donale, absence d'hétérogénéité	Sélection de clones, assez éloigné des tumeurs humaines, prédictivité limitée des tests thérapeutiques		Trop long et coûteux pour une mise en place pour le PDAC, succès limité des transplantations	Cancer murin, études compliquées à mettre en place	Modèle récent, caractérisation nécessaire (prédictivité des tests thérapeutiques?)

**Figure 9 : Caractéristiques des principaux modèles d'études précliniques du PDAC (Adapté de Hingorani et Potter 2012)**

En conclusion, il n'y a pas de modèle parfait, chacun a ses avantages et ses inconvénients, et ils doivent être associés pour obtenir les résultats les plus pertinents et les plus prédictifs de ce qui se produit dans le PDAC humain. Dans la mesure du possible, les conclusions doivent donc être faites après la validation sur plusieurs modèles. Les organoïdes sont une avancée majeure ces dernières années, et les travaux en cours donnent l'espoir d'un grand potentiel dans la découverte de nouvelles molécules et la médecine personnalisée.

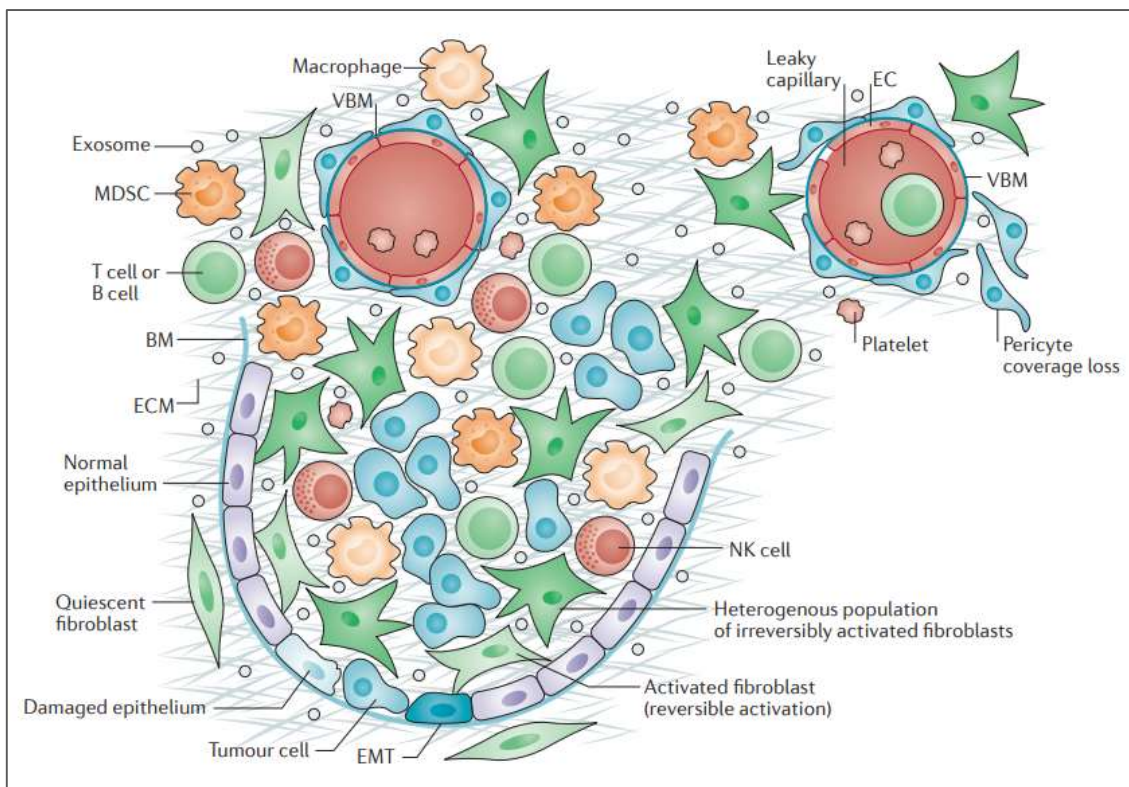




## II) Microenvironnement du PDAC

### 1) Généralités

Le microenvironnement tumoral, ou stroma, est une structure complexe et dynamique caractérisée par une matrice extracellulaire dense et par une composante cellulaire, comprenant des cellules endothéliales, des cellules immunitaires, et des fibroblastes modifiés associés au cancer (ou CAFs) (Figure 10). Dans l'adénocarcinome du pancréas, ce stroma peut représenter jusqu'à 80% du volume tumoral. Il se développe parallèlement au cancer, et est présent en petite quantité dans les lésions PanINs de niveau I. En revanche, les PanINs de niveau III, équivalentes au carcinome *in situ*, sont associées à une forte augmentation du stroma. Ce stroma activé est aussi appelé réaction desmoplastique, définie par une forte production de tissu fibreux et une activation des composantes cellulaires du microenvironnement. Ce stroma est activé par les cellules épithéliales mutées qui deviennent cancéreuses, et qui sécrètent différentes molécules pour modifier son environnement et le rendre plus propice à sa propre survie et croissance.



**Figure 10 : Hétérogénéité du microenvironnement tumoral (BM : Membrane basale ; EC : cellules endothéliales ; EMT : transition épithélio-mésenchymateuse ; MDSC : cellules myéloïdes immunosuppressives ; NK : natural killer) (Kalluri et al. 2016)**

En retour, les composants du microenvironnement, par des actions mécaniques et biologiques complexes, induisent sur les cellules cancéreuses une augmentation de la prolifération, de la résistance à l'apoptose, permettent un échappement immunitaire, une modulation de l'angiogenèse, favorisent l'apparition de métastases et la résistance aux chimiothérapies.

Cette partie se propose de réaliser une revue des composants de ce microenvironnement, particulièrement des rôles des CAFs, de la matrice extracellulaire et des différentes sous populations immunitaires, ainsi que du dialogue entre ces composants.

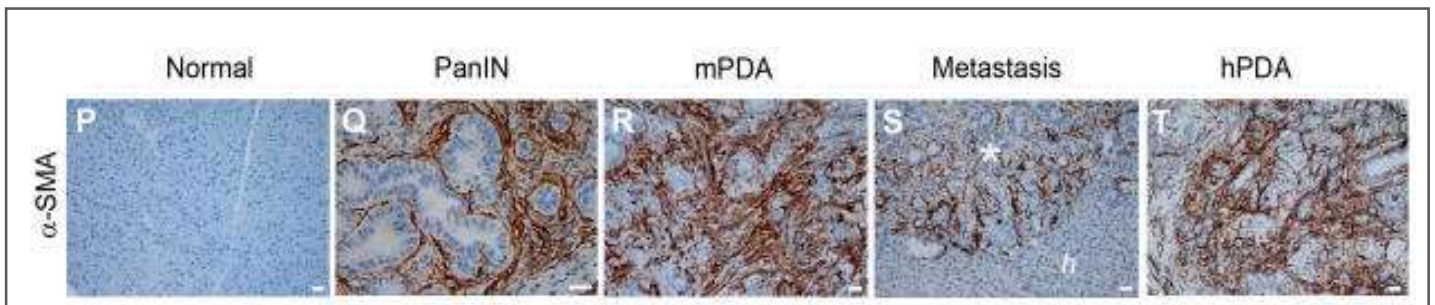
## 2) CAFs

### a) Origines

Les fibroblastes associés au cancer, ou CAFs, sont un composant majeur du stroma tumoral. Les CAFs résultent la plupart du temps de l'activation de cellules pancréatiques étoilées (quiescentes dans le pancréas sain) suite à la libération de différents facteurs. Les CAFs peuvent aussi avoir pour origine le recrutement de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse qui seraient mobilisées en cas de lésions, ou encore provenir de la dédifférenciation de cellules épithéliales (transition épithélio-mésenchymateuse) ou endothéliales. En utilisant différents modèles de souris génétiquement modifiées développant de la fibrose rénale, l'équipe de Kalluri a estimé que 50% des fibroblastes activés recrutés provenaient des fibroblastes résidents, 35% de cellules de la moelle osseuse, et respectivement 10% et 5% de la transition endothélio et épithélio-mésenchymateuse (Lebleu et al. 2013)

Différentes molécules sont libérées en réponse à un stress, par les cellules épithéliales pancréatiques principalement, mais également par les cellules immunitaires et endothéliales, notamment lors de l'apparition de lésions cancéreuses, au cours d'inflammation chronique pancréatique (pancréatite) ou en cas de fibrose et vont activer les cellules quiescentes. D'autres stimuli comme les espèces réactives de l'oxygène peuvent aussi activer les cellules étoilées. Ces molécules sont en particulier des cytokines, comme les interleukines 1, 6 et 8, et des facteurs de croissance, notamment le « Transforming growth factor  $\beta$  » (TGF $\beta$ ), le « fibroblast growth factor 2 » (FGF-2) et le « platelet derived growth factor » (PDGF), qui vont

provoquer un changement de la morphologie, des capacités fonctionnelles, du taux de prolifération et de la sensibilité aux facteurs mitogènes des cellules étoilées. En situation non cancéreuse d'inflammation ou de cicatrisation, l'activation est réversible. En revanche, les fibroblastes sont perpétuellement activés dans les cancers. L'équipe de Gaggioli a montré récemment que la cytokine pro-inflammatoire « Leukemia inhibitory factor » (LIF) induisait un switch épigénétique responsable d'une activation constitutive de la voie JAK1/STAT3 et par suite de l'activation irréversible des CAFs (Albregues et al. 2015). Les CAFs sont phénotypiquement et fonctionnellement différents des fibroblastes classiques. Dans le cas particulier du pancréas, ils perdent les gouttelettes lipidiques normalement présentes dans les cellules étoilées pancréatiques et expriment entre autres le marqueur d'activation  $\alpha$ -SMA (actine musculaire lisse) (Figure 11) et le récepteur au PDGF $\alpha$  (Apte et al, 2011).



**Figure 11 : Recrutement de CAFs dans le PDAC murin et humain (Provenzano et al. 2012)**

Morphologiquement, ce sont des grandes cellules en fuseau, avec un noyau dentelé, un réticulum endoplasmique rugueux et un appareil de Golgi proéminent. Ils présentent un taux de prolifération plus important que les cellules étoilées. Ils sécrètent massivement des facteurs solubles et insolubles : des protéines, telles que facteurs solubles de croissance, angiogéniques, cytokines / chimiokines, et des composants de la matrice extracellulaire qui se voit remodelée (Erez et al. 2010). Il a également été montré, dans le cancer de l'ovaire, que les CAFs présentent également une dérégulation de microRNAs par rapport aux fibroblastes normaux. Cette dérégulation des miRNAs miR-31, miR-214 et miR-155 est associée à une augmentation de la production de chimiokines, et particulièrement du « C-C motif ligand 5 » (CCL5), impliqué dans la progression tumorale (Mittra et al. 2012).

## b) Rôle dans la progression tumorale et la résistance aux traitements

Il a depuis longtemps été démontré que les CAFs influençaient largement la prise tumorale, ainsi que le développement de métastases. Cet effet a d'abord été démontré en utilisant des modèles de co-cultures et de co-xénogreffes de cellules cancéreuses et de fibroblastes isolés (Orimo et al. 2005 ; Gaggioli et al. 2007; Vonlaufen et al. 2008 ; Xu et al. 2010 ; Hwang et al 2008). Par l'intermédiaire de leurs sécrétions, notamment de cytokines (IL-1b, IL6), de facteurs de croissance comme le HGF, « hepatocyte growth factor », l'IGF, « insulin-like growth factor », le NGF, « nerve growth factor », l'EGF, « epithelial growth factor », et le FGF-2, les CAFs vont favoriser la croissance tumorale en activant différentes voies de signalisation (MAPK, PI3K/Akt) dans les cellules cancéreuses. Ils vont ainsi favoriser leur prolifération, migration, invasion, et inhiber leur apoptose face notamment à des thérapies, favorisant ainsi la résistance des tumeurs aux chimiothérapies et aux thérapies ciblées (Duluc et al. 2015 ; Moatassim-Billah et al. 2016 ; Djurec et al. 2018 ; Straussman et al. 2012). Su et ses collaborateurs ont également récemment montré que certaines sous-populations de CAFs étaient capables de favoriser la chimiorésistance en formant une niche protectrice pour les cellules souches cancéreuses (Su et al. 2018).

Parallèlement, ils vont également agir sur les différents composants du microenvironnement, cellulaire ou non, et jouer un rôle crucial sur leur développement. Les fibroblastes activés sécrètent des protéases qui vont dégrader la matrice extracellulaire, comme les métalloprotéases matricielles MMP2, MMP3, et MMP9 qui dégradent le collagène de type 4 qui compose la membrane basale, facilitant ainsi son renouvellement lors d'épisodes réversibles de pancréatite, mais aussi la modification de composition et dégradation lors de cancer invasif. Ces protéases sont associées à l'inflammation, la fibrose, l'angiogenèse et l'invasion tumorale. Les CAFs vont aussi sécréter en quantité excessive des protéines qui vont composer la matrice, particulièrement le collagène fibrillaire de type 1 et 3, la fibronectine, une glycoprotéine jouant un rôle dans l'adhésion cellule-matrice, et la laminine, protéine de la lame basale épithéliale (Bachem et al. 2005).

Les CAFs, *via* leur dialogue avec la tumeur, induisent également des modifications du métabolisme des cellules cancéreuses. Les CAFs autophagiques et sénescents stimulent le métabolisme mitochondrial dans les cellules cancéreuses adjacentes, notamment par la production de grandes quantités de carburants très énergétiques comme les corps

cétoniques, et favorisent ainsi la croissance tumorale et le développement de métastases (Capparelli et al. 2012). Une autre étude récente montre que l'interaction avec les CAFs entraîne la glycogénolyse dans les cellules cancéreuses. Le glucose produit est reinjecté dans la glycolyse, ce qui favorise la prolifération, l'invasion et les métastases des cellules cancéreuses (Curtis et al. 2018).

Au niveau de la vascularisation, les CAFs vont également avoir un impact *via* différents mécanismes. Ils sécrètent des facteurs angiogéniques, comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), l'angiopoïétine-1 ou l' « insulin-like growth factor-1 » (IGF-1). De plus, l'hypoxie retrouvée dans les PDAC stimule la production de « hypoxia-inducible factor-1 » (HIF-1), par les CAFs, un facteur de transcription provoquant dans les tissus hypoxiques des réponses pro-angiogéniques. Enfin, leurs sécrétions (TGF- $\beta$ , FGF, PDGF, SDF-1, CXCL14 entre autres) vont aussi avoir une action autocrine, et stimuler ainsi le maintien de leur activation et leur prolifération (Omary et al. 2007 ; Augsten et al. 2009 ; Kojima et al. 2010).

### c) Rôle immunomodulateur

Les CAFs ont aussi un important rôle de modulation de la réponse immunitaire, avec la sécrétion de cytokines comme les interleukines 1, 6, 10, le « tumor necrosis factor » (TNF $\alpha$ ), de chimiokines, comme le « monocyte chemotactic protein 1 » (MCP1), ou les ligands CXCL1 et le CXCL2 (Erez et al. 2010 ; Djurec et al. 2018). Il a depuis longtemps été démontré que les CAFs, *via* leurs sécrétions, étaient capable de recruter des macrophages (Erez et al. 2010), et que les cellules « Fibroblast activation protein » (FAP)-positives, un marqueur de CAFs, étaient immunosuppressives (Kraman et al. 2010). Les CAFs sont capables de polariser les macrophages vers un phénotype M2 pro-tumoral, notamment *via* la sécrétion de « Colony stimulating factor 1 » (CSF-1) (Takahashi et al. 2016 ; Zhang et al. 2017).

Des études ont aussi montré que les CAFs pouvaient participer à la mise en place de l'échappement immunitaire, en séquestrant les lymphocytes cytotoxiques CD8 pour réduire leur infiltration au sein de la tumeur, et en diminuant ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale (Ene-Obong et al. 2013). Ils sont aussi capables d'induire la mort des CD8 *via* des interactions directes antigène-spécifiques entre les checkpoints immunitaires membranaires FAS et « Programmed cell death 1 » (PD-1) des lymphocytes T et les ligands FAS-L et PD-L2 des

CAFs (Lakins et al. 2018). Ils modifient aussi les fonctions de cellules immunitaires, en induisant la différenciation des cellules myéloïdes dérivées de la moelle osseuse en cellules myéloïdes suppressives, ou MDSC (« myeloid-derived suppressor cells »), et ce par l'activation du facteur de transcription STAT3 fibroblastique et par la sécrétion de cytokines (CCL2 notamment) (Yang et al. 2016). Les CAFs sont enfin largement impliqués dans le processus métastatique ; leur rôle sera détaillé dans la 3<sup>ème</sup> partie de ce travail.

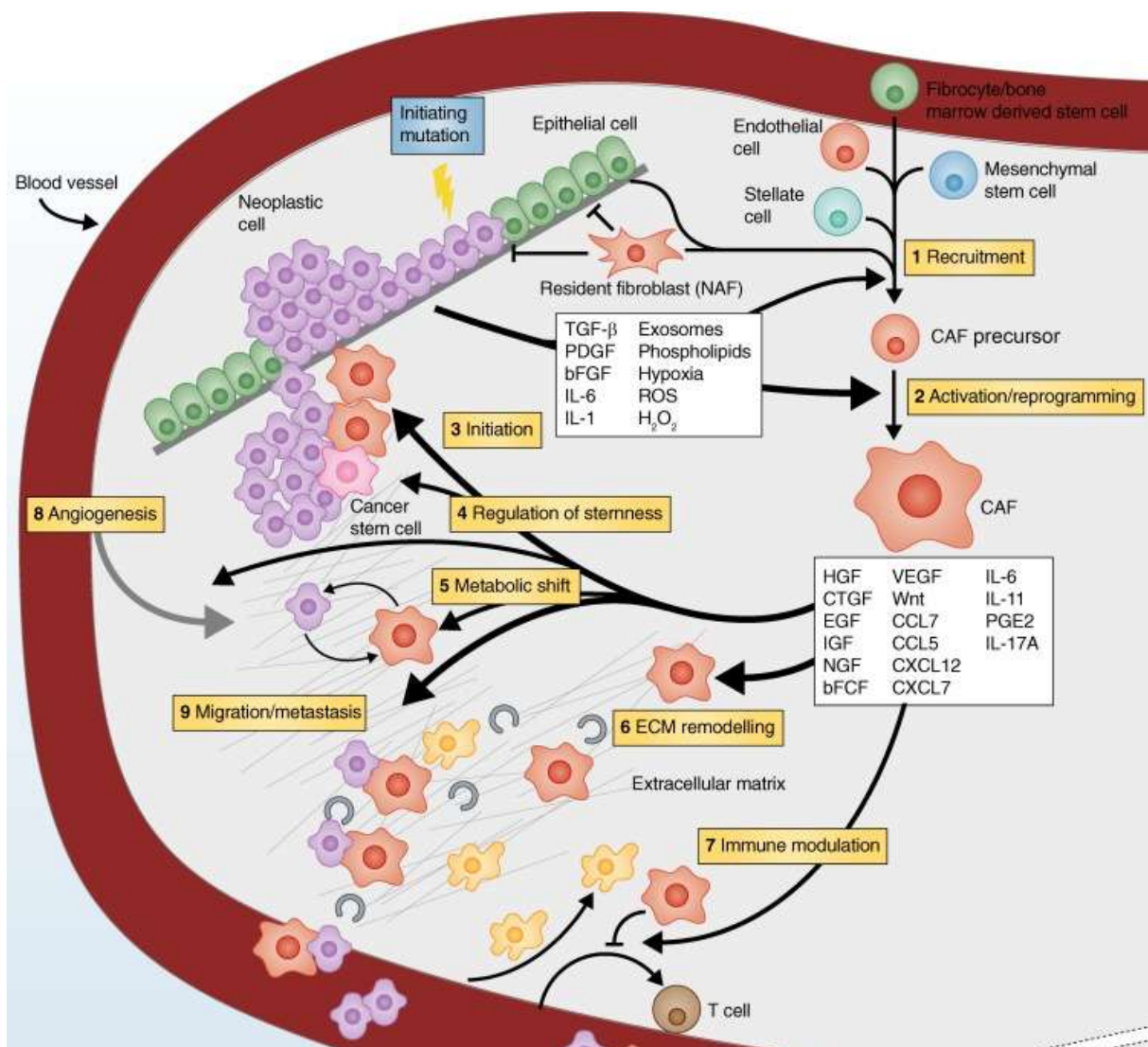


Figure 12 : Recrutement, activation et rôles des CAFs dans le PDAC (Ohlund et al. 2014)

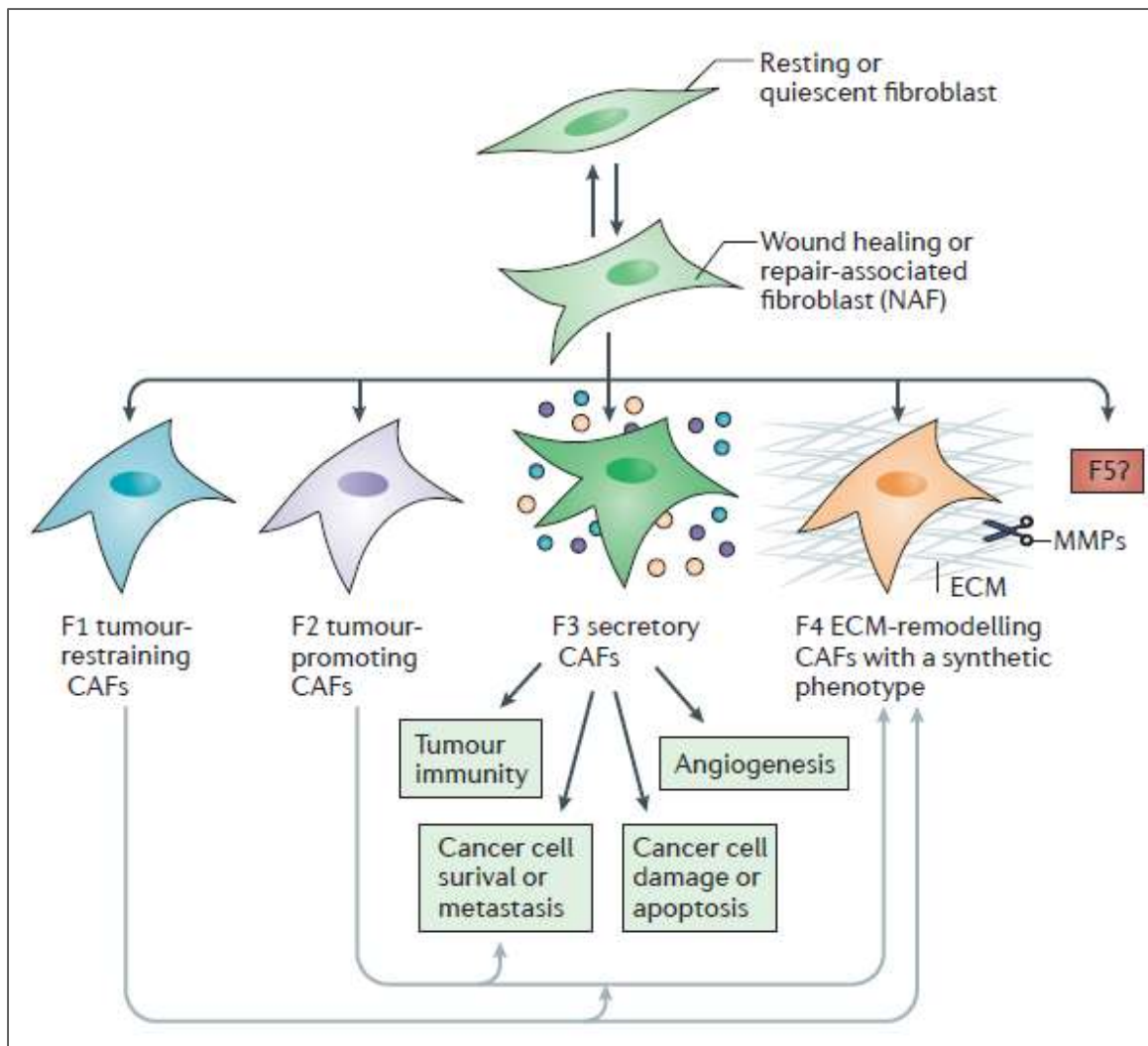
#### d) Rôle ambigu et hétérogénéité des CAFs

Au cours des dernières années, plusieurs études importantes ont suggéré la présence de différentes sous-populations de CAFs, et modifié le paradigme du rôle exclusivement protumoral des CAFs. Plusieurs études précliniques ciblant les CAFs avaient mis en évidence un bénéfice thérapeutique de la réduction du compartiment stromal. Notamment, Olive et ses collaborateurs ont utilisé un inhibiteur du ligand Sonic hedgehog Shh sécrété par les cellules cancéreuses et qui se fixe au récepteur « Patched 1 » des CAFs et entraîne l'activation des facteurs de transcription Gli qui favorisent la réaction desmoplastique (Olive et al. 2009). Les essais cliniques qui s'en étaient suivis avaient été décevants (Amakye et al. 2013). L'hypothèse en découlant suggérait un ciblage plus difficile qu'initialement prévu du microenvironnement et des CAFs, et un rôle potentiellement anti-tumoral de certaines populations de CAFs. Ainsi, le groupe d'Olive a montré que le modèle murin KPC également délété pour le gène codant pour le ligand Sonic hedgehog Shh de la voie Hedgehog, présente comme attendu un compartiment stromal réduit, mais développe des tumeurs d'agressivité augmentée en comparaison avec les souris KPC contrôles, suggérant ainsi que le microenvironnement, et plus spécifiquement les CAFs, pouvait peut être également "contenir" la croissance tumorale (Rhim et al. 2014). Özdemir et ses collaborateurs, en utilisant un modèle transgénique murin de PDAC différent du modèle KPC mais développant également un stroma fibreux, dans lequel les cellules  $\alpha$ -SMA-positives prolifératives ont été supprimées, ont montré que l'absence de ces cellules favorisent le développement de tumeurs indifférenciées plus invasives et hypoxiques, associé à une survie diminuée des animaux (Özdemir et al. 2014). Même si des limites importantes peuvent compromettre les résultats de cette étude (le marqueur  $\alpha$ -SMA n'est pas spécifique des CAFs mais également exprimé par les cellules musculaires lisses des vaisseaux, et tous les CAFs ne l'expriment pas non plus), elle a eu le mérite de souligner la complexité non anticipée du rôle des CAFs au sein des tumeurs.

Ces résultats suggèrent en effet que plusieurs sous-populations de CAFs, pouvant être potentiellement définies par plusieurs marqueurs, remplissent des fonctions particulières et différentes. L'isolement de ces sous-populations, grâce à l'identification de marqueurs de surface cellulaire spécifiques de chaque sous-population, permettrait des études fonctionnelles pour étudier leurs rôles spécialisées. Une première étape dans cette



caractérisation a été obtenue par le groupe de Tuveson qui a décrit deux populations distinctes de CAFs de cancer du pancréas. La première, appelée "myofibroblastes", se caractérise par une expression élevée de l' $\alpha$ -SMA, une sécrétion de protéines matricielles, une activation de la voie du TGF $\beta$ , et une localisation spatiale tumorale proche des cellules cancéreuses. L'autre, nommée "CAF's inflammatoires", se localise plutôt à distance des lésions épithéliales et présente un phénotype sécrétoire de médiateurs inflammatoires comme l'IL6, l'IL11 et le LIF, et l'activation de voies de signalisation stimulées par les cytokines et chimiokines (Öhlund et al. 2017). Kalluri a proposé en 2016 une classification, comprenant des sous-types qui restreignent la croissance tumorale (F1) ou au contraire que la favorise (F2). Les CAFs pro-tumoraux pourraient également comprendre des sous-populations, avec des CAFs spécialisées à haute capacité de sécrétion, impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire, l'angiogenèse et la prolifération cellulaire (F3), et des CAFs responsable de la production et du remodelage de la matrice extracellulaire (F4) (Figure 13).



**Figure 13 : Classification potentielle des sous-types de CAFs (Kalluri et al. 2016)**

Enfin, Ana Costa et ses collaborateurs ont réussi en utilisant des associations de marqueurs de surface déjà connus (FAP,  $\alpha$ -SMA, S100A4/FSP1, PDGFR $\beta$ , CD29 et CAV1) à identifier quatre sous-populations de CAFs, qui se répartissent différemment dans le tissu sain et les différents sous-types de cancers du sein. Ainsi, de manière très intéressante, l'analyse histologique des différentes sous-populations de CAFs sur 60 tissus tumoraux en a permis de stratifier ces tumeurs en sous-types dits "triples négatifs" ou "luminaux". Les auteurs ont également mis en évidence qu'une des sous-populations de CAFs (CAF-S1) était associée à un environnement immunosuppresseur, marqué par une accumulation dans les tumeurs de lymphocytes T Foxp3-positifs. Ces résultats impliquent qu'il est possible de classer les différents sous-types de cancers du sein en fonction de leur enrichissement en sous-populations de CAFs particulières, et pas seulement selon les caractéristiques des cellules tumorales (Costa et al. 2018). Il est raisonnable de penser que de telles classifications seront

réalisables dans le PDAC dans un futur proche, avec des implications sur les stratégies thérapeutiques à adopter. Pour cela, l'utilisation d'approches de caractérisation phénotypique et moléculaire à l'échelle de la cellule unique sera certainement indispensable.

### 3) Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est composée d'environ 300 protéines, sécrétées localement et assemblées en un réseau organisé qui structure la plupart des tissus (Naba et al. 2012). Elle régule l'homéostasie tissulaire, le développement des organes, l'inflammation, la cicatrisation, joue un rôle dans différentes pathologies (fibrose, arthrose, ...) et a initialement été considérée comme une barrière contre l'invasion tumorale. Il est ensuite devenu évident qu'elle pouvait en fait modifier, et même induire la cancérogenèse. La matrice influence la croissance, la différenciation, la survie et la mobilité des cellules cancéreuses, à la fois en apportant une structure physique et en étant un réservoir pour différents facteurs solubles qui seront libérés lors de la dégradation de la matrice (Pickup et al. 2014). La matrice extracellulaire est composée de plusieurs protéines qui jouent des rôles différents dans le développement du cancer. Dans cette partie, nous nous intéresserons aux protéines principalement dérégulées dans le cancer du pancréas, de manière non exhaustive.

#### a) Collagènes

Les collagènes sont un composant principal de la matrice extracellulaire, dont le rôle protumoral a depuis longtemps été démontré. Les molécules de collagène sont formées de trois chaînes polypeptidiques  $\alpha$  assemblées en une triple hélice. On distingue les collagènes fibrillaires (assemblage de molécules de collagène, liaisons covalentes entre les résidus lysine et hydroxylysine voisins, sous l'action de la lysyl-oxydase) qui sont les plus abondants avec notamment les collagènes I, II et III, les collagènes associés aux fibrilles reliant les collagènes entre eux et aux autres composants de la matrice (IX et XII), et les collagènes formant un réseau comme le collagène IV au niveau de la lame basale.

La réticulation, c'est-à-dire l'organisation en réseaux tridimensionnels du collagène, la augmente la dureté de la matrice, favorise les adhésions focales et l'activation de voies de signalisation, et donc l'invasion tumorale (Levental et al. 2009). La surexpression du collagène de type I, majoritaire dans la réaction desmoplasique du cancer du pancréas, facilite l'invasion des cellules cancéreuses (Liu et al. 1995) ainsi que leur résistance à la chimiothérapie. Il a été montré que la culture de cellules cancéreuses traitées par 5-fluorouracile (5-FU) augmentaient leur survie, en augmentant leur prolifération en présence de collagène de type I (incorporation de thymidine radioactive supérieure pour la culture sur collagène par rapport à la culture sur plastique) (Armstrong et al. 2004). Son action sur le phénotype malin des cellules cancéreuses passe par l'activation de l'intégrine  $\alpha2\beta1$  (Grzesiak et al. 2006), qui peut accélérer la prolifération et la migration des cellules cancéreuses. Il a aussi été montré que dans des lignées cancéreuses pancréatiques, ce collagène de type I pouvait réguler positivement l'expression de la N-cadhérine, une glycoprotéine transmembranaire exprimée plutôt dans les cellules de phénotypes mésenchymateux et donc migratoires ou métastatiques (Shintani et al. 2006). Le collagène de type IV est également très présent dans le stroma du PDAC, à proximité des cellules cancéreuses, et il a été montré qu'il produisait de nombreux signaux pro-tumoraux, pour maintenir un phénotype migratoire et de survie face à des signaux apoptotiques (Ohlund et al. 2013). Plus récemment, l'équipe de Greenspan a montré que les chaînes  $\alpha3$  du collagène de type V produites par les cellules tumorales favorisaient la croissance tumorale dans un modèle de cancer du sein. Ainsi, dans des souris génétiquement invalidées pour le gène *COL5A3*, l'activation de la voie MAPK et la prolifération cellulaire sont diminuées. Le glypican-1, un protéoglycane membranaire, se lie aux chaînes  $\alpha3$ , et ces chaînes modulent la capacité du glypican-1 à stimuler la prolifération en réponse au FGF2 (Huang et al. 2017). Enfin, Olivares et ses collaborateurs ont également mis en évidence un rôle métabolique du collagène. Ils ont montré que dans des conditions où les apports en nutriments sont limités, les cellules cancéreuses de PDAC pouvaient assimiler des fragments de collagène pour les utiliser comme un réservoir de proline (Olivares et al. 2017).

## b) Glycosaminoglycanes et protéoglycanes

Les glycosaminoglycanes sont des chaînes polysaccharidiques, le plus souvent fixées de façon covalente à des protéines pour former des protéoglycanes. Les protéoglycanes

comme le versicane, le biglycane, la décorine, entre autres, sont présents abondamment dans les tissus cancéreux (Wight et al. 2002) et peuvent réguler l'adhésion, la survie, la prolifération et la migration des cellules cancéreuses pancréatiques en modulant des effets paracrines de facteurs de croissance (Weber et al. 2001 ; Königer et al. 2004). L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane, très abondant dans la matrice des cancers pancréatiques, qui se lie au récepteur CD44 et augmente la survie cellulaire en affectant des voies de signalisation comme PI3K/Akt. Il limite aussi la perfusion vasculaire en augmentant drastiquement la pression interstitielles au sein de la tumeur, et limite l'accès des médicaments à la tumeur ; nous verrons que le ciblage de l'acide hyaluronique est un concept thérapeutique émergent ayant déjà donné des résultats encourageants (Provenzano et al. 2012).

### c) Glycoprotéines

De nombreuses glycoprotéines non collagéniques jouent un rôle important dans l'organisation de la MEC, et dans les interactions cellules-matrice. La fibronectine est composée de deux sous-unités glycoprotéiques unies par deux ponts disulfures. Chaque sous-unité est composée de différents domaines spécialisés dans les liaisons à différents composants de la matrice (collagène, héparines, fibrines) et aux cellules, par l'intermédiaire d'intégrines. Elle est particulièrement impliquée dans la migration et l'adhésion cellulaire, ainsi que la survie cellulaire et la chimiorésistance, notamment *via* une activation de la voie PI3K dépendante de FAK en aval des intégrines (Topalovski et Brekken 2016).

La laminine est composée de trois longues chaînes polypeptidiques ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) associées par des ponts disulfures. Ces chaînes contiennent des domaines de liaison au collagène, aux héparane sulfates, et aux intégrines. Il a été montré que la laminine induisait *via* la phosphorylation de FAK une augmentation de la chimiorésistance à la gemcitabine (Huanwen et al. 2009), et que la liaison de la laminine-1 à une intégrine stimulerait l'expression de CXCR4 et de l'IL-8, protéines inflammatoires, dans les cellules cancéreuses pancréatiques (Grzesiak et al. 2007).

La périostine, sécrétée par les CAFs, augmente la migration des cellules cancéreuses et est corrélée à l'invasion, à des métastases et à un mauvais pronostic (Liu et al. 2017). Elle favorise également l'angiogénèse *via* la signalisation Erk/VEGF (Liu et al. 2016).

Enfin, la thrombospondine-2, sécrétée par les CAFs, peut augmenter l'expression de l'activateur du plasminogène de type urokinase, impliqués dans des cascades de protéolyses et dans la dégradation de la matrice, et promouvoir l'invasion et la migration tumorale (Farrow et al. 2009).

#### d) Protéases

Les métalloprotéases sont des protéinases zinc-dépendantes ou calcium-dépendantes qui jouent un rôle important dans la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, participant ainsi à l'invasion tumorale et l'apparition de métastases. L'utilisation d'un ARN interférent bloquer la MMP-2 inhibe l'invasion et l'adhésion des cellules cancéreuses pancréatiques (Zhi et al. 2009). Elles sont sécrétées à la fois par les CAFs et les cellules cancéreuses et sont corrélées à un mauvais pronostic et une courte durée de survie dans le PDAC, ainsi qu'à la présence de métastases (Schneiderhan et al 2007). Les sérine-protéases, comme la plasmine, présentent un résidu sérine dans leur site actif. La plasmine est activée par clivage protéolytique du plasminogène sous l'action d'un activateur : l'u-PA (activateur du plasminogène de type urokinase), et le t-PA (activateur du plasminogène de type tissulaire). La plasmine est capable de dégrader de nombreuses glycoprotéines, la fibronectine et la laminine, les protéoglycanes, ou encore le collagène de type IVb (Díaz et al. 2002). Comme nous le verrons, elle est impliquée dans le processus d'invasion et de métastase.

#### e) Rigidité et propriétés mécaniques de la matrice

L'accumulation de ces différents composants de la matrice extracellulaire modifie l'architecture du tissu pancréatique autour de la tumeur. La rigidité de la matrice peut avoir comme conséquence l'activation de voies de signalisation et ainsi réguler le comportement de la cellule cancéreuse. Lorsque l'accumulation de matrice extracellulaire entraîne une augmentation de la tension au sein de la tumeur, les cellules tumorales répondent en générant des forces de traction *via* des contractions du cytosquelette (Samuel et al. 2011). Les changements de rigidité sont ressentis et des signaux sont transmis au domaine intracellulaire par l'intermédiaire de récepteurs mécano-senseurs de type facteurs de croissance et surtout d'intégrines (Levental et al. 2009 ; Friedland et al. 2009). Les intégrines sont des hétérodimères

$\alpha\beta$  associés de façon non covalente, exprimés à la surface des cellules, et qui possèdent un large domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. Ces mécano-senseurs recrutent des molécules d'adhésion focales, comme la kinase d'adhésion focale (FAK), les protéines des familles Src et Rac, la paxilline, pour déclencher des cascades de signalisation et la réorganisation du cytosquelette (Figure 14) (Ross et al. 2013 ; Shi et al. 2003). En conséquence, ces cascades régulent l'expression de gènes qui vont favoriser la survie, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Kalli et Stylianopoulos 2018). Récemment, Laklai et ses collaborateurs ont montré que dans les tumeurs de PDAC humains où la voie du TGF $\beta$  est altérée (inactivation fonctionnelle de Smad4/DPC4), la matrice extracellulaire est rigide, ce qui est associé à une plus grande tension intra-tumorale et à l'activation consécutive de la voie STAT3, en corrélation avec un mauvais pronostic. Dans des modèles murins de cancers du pancréas mimant l'hyperactivation de la voie TGF $\beta$  et l'augmentation de tension intra-tumorale, le blocage de la voie JAK/STAT3 dans les cellules cancéreuses ralentit la progression en réduisant la rigidité de la matrice et les forces de contraction dans les cellules cancéreuses (Laklai et al. 2016).

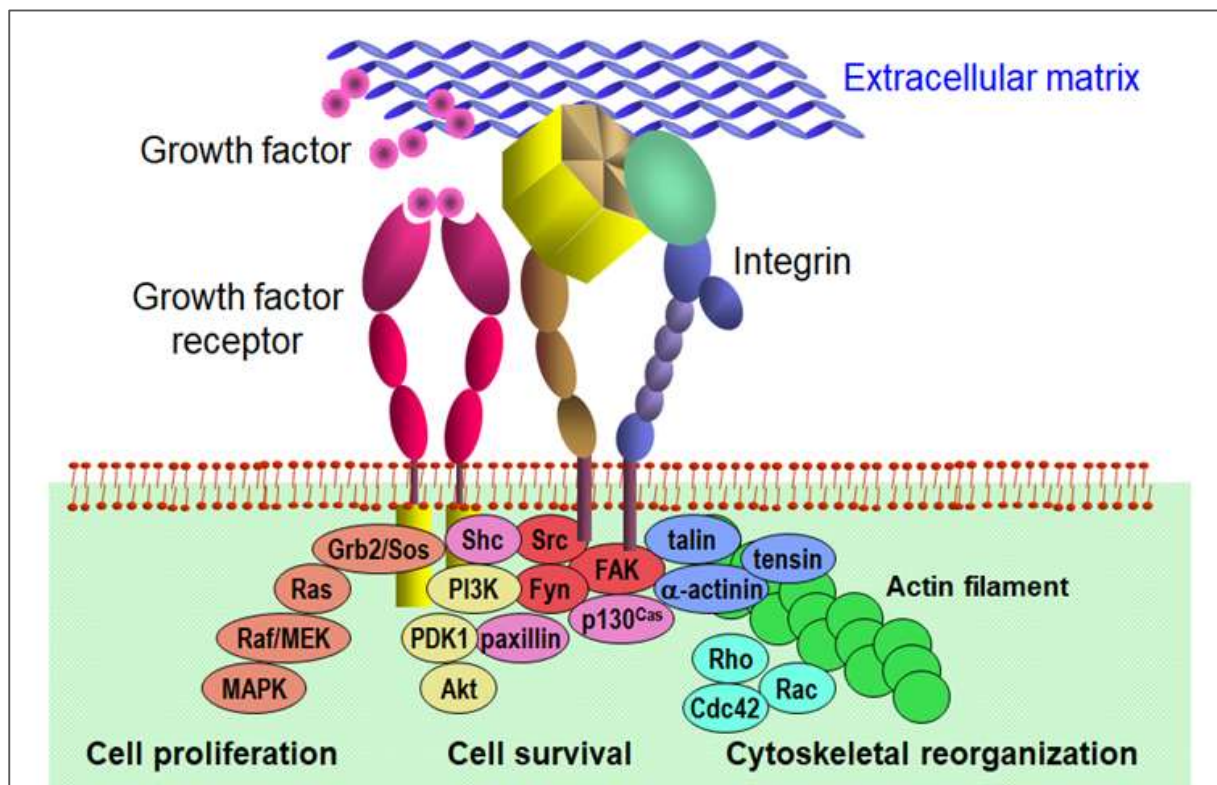


Figure 14 : Transmission de signaux pro-tumoraux de la matrice aux cellules cancéreuses (<http://www.matrixome.co.jp/en/about/background>)

## 4) Immunité

Les relations entre cellules immunitaires et tumeurs ont été précisées récemment. Il apparaît que dans certains cancers, l'inflammation est un constituant important du microenvironnement tumoral. En 2011, Robert Schreiber a développé le concept d' « immunoediting » pour décrire les trois phases de la réponse immunitaire tumorale qui conduisent aux modifications de l'immunogénicité des cellules tumorales (Figure 15). La première phase est la phase d'*élimination*, où le système immunitaire reconnaît les cellules cancéreuses et est capable de les détruire. S'ensuit alors une phase dite d'*équilibre*, dans laquelle des clones tumoraux peu immunogènes qui ont survécu à la phase d'*élimination* sont maintenus dans un état de dormance par le système immunitaire, potentiellement pendant de longues durées.

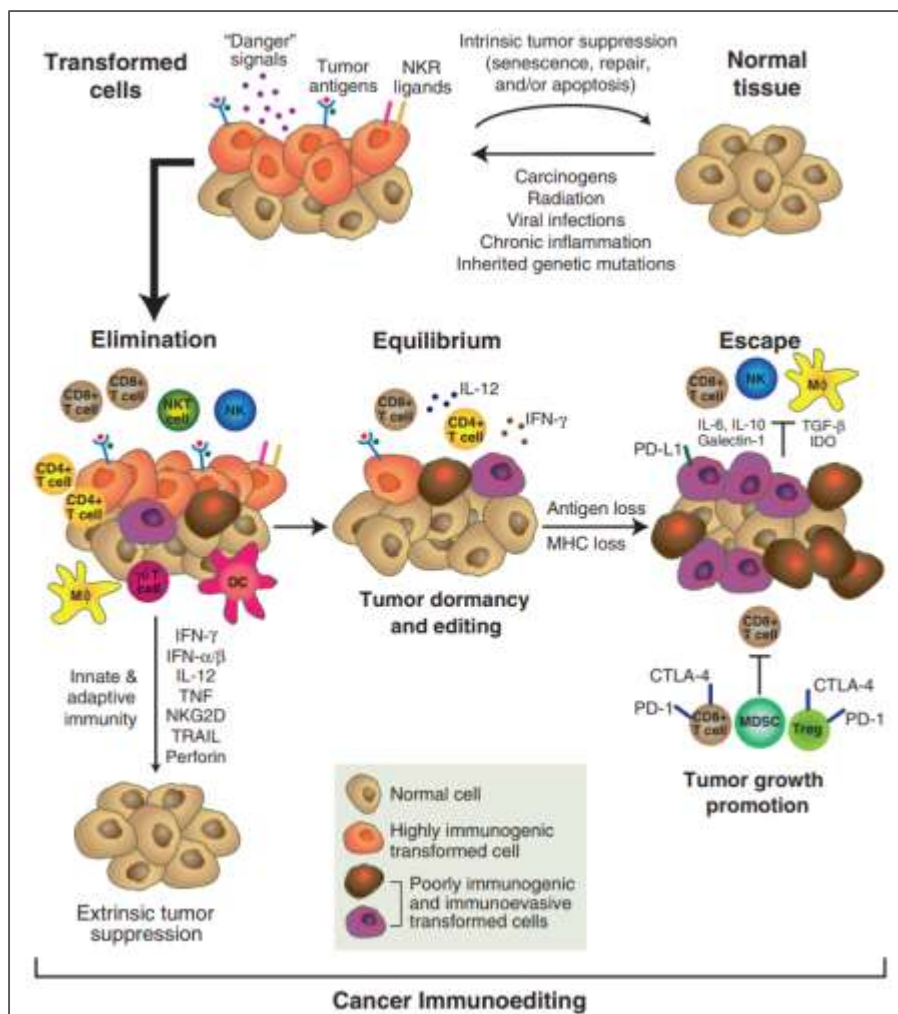


Figure 15 : Les 3 phases de l' « immunoediting » (Schreiber et al. 2011)



Enfin, après une adaptation, les cellules tumorales acquièrent la capacité à contourner la réponse immunitaire par différents mécanismes, et la phase d'*échappement* immunitaire survient (Schreiber et al. 2011). La réponse inflammatoire favorise alors la cancérogenèse, la prolifération, l'angiogenèse, les métastases et la chimiorésistance.

Dans le cas du PDAC, la réponse immunitaire, initialement anti-tumorale, évolue clairement pour devenir pro-tumorale et favoriser le développement du cancer. Cette réponse est principalement constituée par les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-8, l'IL-10, le MCP-1 et le TGF $\beta$  produites par les cellules cancéreuses, les CAFs et par les cellules immunitaires du microenvironnement. Les cellules cancéreuses parviennent à échapper au système immunitaire, soit en évitant d'être détectées, soit en y devenant résistantes (Sideras et al. 2014). Ce chapitre décrira rapidement les principales populations immunitaires anti-tumorales, puis de manière plus détaillée les populations pro-tumorales du microenvironnement.

#### a) Populations anti-tumorales

##### i) Réponse innée

Les cellules tueuses naturelles, ou NK, sont capables de lyser sans activation préalable les cellules étrangères ainsi que les cellules altérées comme les cellules tumorales. Elles produisent des cytokines, dont l'IFN $\gamma$ , et utilisent le système perforine/Granzyme B et les ligands de récepteurs de mort (FasL et TRAIL).

Les macrophages sont issus de la différenciation de monocytes attirés au sein des tissus par des sécrétions de cytokines, chimiokines, ou autres signaux cellulaires. Ils ont pour rôle de phagocyter les débris cellulaires et les agents pathogènes, sécrètent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), et activent les lymphocytes T en présentant des antigènes tumoraux (Martinez et al. 2014).

Les cellules dendritiques (DCs) font le lien entre immunité innée et adaptative, en jouant un rôle de sentinelle du système immunitaire. Elles expriment à leur surface des glycoprotéines membranaires du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) dont la fonction va être de présenter des antigènes aux lymphocytes T et B dans les organes lymphoïdes. Les DCs reconnaissent, capturent et dégradent les antigènes étrangers, et les appréhendent sur les molécules de CMH, devenant ainsi des DCs matures (Wörmann et al. 2014).

## ii) Réponse adaptative

Les lymphocytes T et B composent la réponse immunitaire adaptative, et sont classifiés en différentes classes selon leurs marqueurs de surface qui déterminent leur fonction biologique. Les lymphocytes T CD8 sont dits cytotoxiques, ils reconnaissent les peptides présentés par le CMH-I des cellules tumorales et sont capables de les éliminer *via* le TNF $\alpha$  ou par l'activation de macrophages. Ils sont associés à un meilleur pronostic dans de nombreux cancers, notamment le cancer colorectal (Galon et al. 2006), ovarien (Sato et al. 2005), du poumon (Kawai et al. 2008) et du pancréas (Fukunaga et al. 2004). Malheureusement, au cours de la progression tumorale et donc de l'échappement immunitaire, la proportion de LTs CD8+ diminue et ces cellules perdent également leurs marqueurs d'activation biologique (Yu et al. 2012). Nous avons vu que cette immunosuppression pouvait impliquer les CAFs, mais nous verrons que d'autres sous-populations immunitaires peuvent bloquer les effets cytotoxiques des CD8.

Les lymphocytes « helper » CD4 soutiennent l'activation des LTs CD8+, des lymphocytes B et des macrophages *via* la sécrétion de cytokines comme l'IL2. On distingue plusieurs sous-populations de LTs « helper », avec des rôles plutôt ambigus dans le contexte tumoral. Néanmoins, on considère plutôt que les T<sub>h</sub>1 sont anti-tumoraux, ils produisent de l'IFN $\gamma$ , activent les CD8 cytotoxiques ainsi que les macrophages. Les T<sub>h</sub>2 sont quant à eux plutôt associés à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers dont celui du pancréas, mais ils peuvent également exercer des fonctions anti-tumorales (De Monte et al. 2011).

Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale, puisqu'ils produisent, après différenciation au contact d'un antigène des anticorps dirigés contre cet antigène pour le neutraliser. Plusieurs sous-populations de lymphocytes B ont été identifiées, avec des effets pouvant être protumoraux. Certains lymphocytes B sécrètent des cytokines capables d'induire le recrutement de lymphocytes T régulateurs, et d'inhiber la réponse T CD8 (IL-4, IL-10, TGF $\beta$ ) (Fremd et al. 2013). Plus récemment, Lee et ses collaborateurs ont mis en évidence que la délétion du « hypoxia inductible factor 1 $\alpha$  » (HIF1 $\alpha$ ) accélérât le développement de lésions cancéreuses dans un modèle murin Kras-muté, et que cet effet était associé à une forte accumulation de lymphocytes B au sein du pancréas. La déplétion de ces lymphocytes par un anticorps anti-CD20 inhibait le développement de lésions cancéreuses dans ce modèle (Lee et al. 2016).

Au cours de l'immuno-échappement, de nombreux mécanismes comme l'absence de reconnaissance des antigènes tumoraux, ou l'immunosuppression par d'autres cellules immunitaires empêchent les lymphocytes de jouer leur rôle anti-tumoral. Il a également été montré récemment que la tumeur imposait des restrictions métaboliques qui restreignaient la réponse des cellules T (Chang et al. 2015).

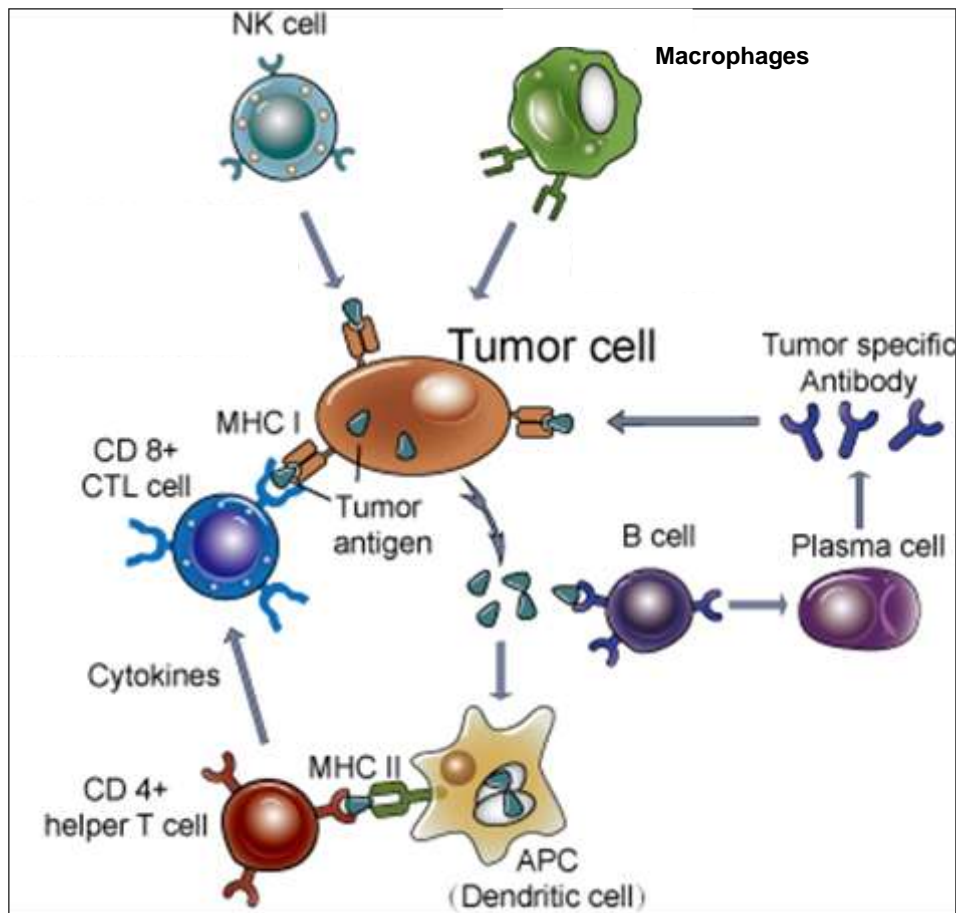


Figure 16 : Différents acteurs de l'immunité anti-tumorale (<https://www.creative-diagnostics.com/Tumor-Immunity.htm>)

## b) Macrophages associés aux tumeurs

Au niveau de la réponse innée, les macrophages associés aux tumeurs ou TAMs sont les composants les plus importants. Les macrophages sont recrutés et passent d'un phénotype M1 (pro-inflammatoire) à un phénotype M2 (anti-inflammatoire) sous l'action de cytokines du microenvironnement comme l'interleukine-10, le TGF- $\beta$ , le SDF-1, la thrombospondine et

le CSF-1 (« colony stimulating factor-1 »). Les macrophages présentent des origines diverses, et l'équipe de DeNardo a identifié dans des modèles murins de PDAC deux origines associées à des fonctions biologiques particulières. En effet, si les macrophages provenant de l'activation de monocytes circulants avaient plutôt un rôle de cellule présentatrice d'antigène, les macrophages activés au sein du tissu pendant la progression tumorale étaient associés à des profils transcriptomiques fibrotique, avec un rôle dans la production de protéines et le remodelage de la matrice extracellulaire (Zhu et al. 2017). D'autre part, à des stades précoces de la carcinogenèse pancréatique, les macrophages infiltrant le pancréas sont impliqués dans le processus de transdifférentiation des acini. En sécrétant des cytokines pro-inflammatoires comme la chimiokine RANTES et le TNF $\alpha$ , les macrophages induisent la métaplasie acino-canalaire par l'activation de la voie NF $\kappa$ B (Liou et al. 2013).

Des travaux récents de l'équipe de Varner ont mis en évidence un rôle majeur de l'isoforme p110 $\gamma$  de la sous-unité catalytique des PI3K de la classe 1B. Ils ont montré que, dans le PDAC, l'activité de cette lipide kinase dans les macrophages était responsable de la suppression de la réponse T cytotoxique, de la réaction fibrotique et du rôle pro-métastatique (Kaneda et al. 2016). De manière plus générale, ils ont démontré que la PI3K $\gamma$  était à l'origine d'un switch entre immuno-stimulation et suppression par les macrophages dans le cancer. La voie PI3K $\gamma$  inhibe l'activation de la voie NF $\kappa$ B, et active le facteur de transcription C/EBP $\beta$ , à l'origine de modifications transcriptionnelles qui favorisent l'immunosuppression et la croissance tumorale (Kanda et al. 2016).

Très récemment, Candido et ses collaborateurs ont montré que les macrophages étaient une sous-population leucocytaire majeure au sein du PDAC, et qu'ils contribuaient de manière importante au génotype squameux de l'étude de Bailey (mauvais pronostic, plus métastatique) (Bailey et al. 2016). Le ciblage des macrophages CSF1R-positifs induit une augmentation de l'apoptose des cellules cancéreuses, associée à une restauration de l'activité des cellules T (Candido et al. 2018). Les macrophages sont en effet capables d'inhiber la réponse des lymphocytes T *via* plusieurs mécanismes comme la production d'espèces réactives de l'oxygène ou la production de cytokines immunosuppressives comme l'interleukine-10 et le TGF- $\beta$ . Ils sont également capables d'induire l'apoptose des LTs *via* le TNF et le monoxyde d'azote (NO) (Saio et al. 2001), et ils produisent également de l'arginase-1, une enzyme qui métabolise l'arginine nécessaire à la prolifération des LTs au sein du microenvironnement (Rodriguez et al. 2004). Ils jouent aussi un rôle important dans l'invasion

en influençant le remodelage de la matrice extracellulaire (Afik et al. 2016) et en produisant des stimuli chimiotactiques comme l'EGF et l'interleukine-1b. Les TAMs sont aussi largement impliquées dans la cascade d'invasion/métastase, cet aspect sera traité en détail dans la troisième partie de ce travail (Figure 17).

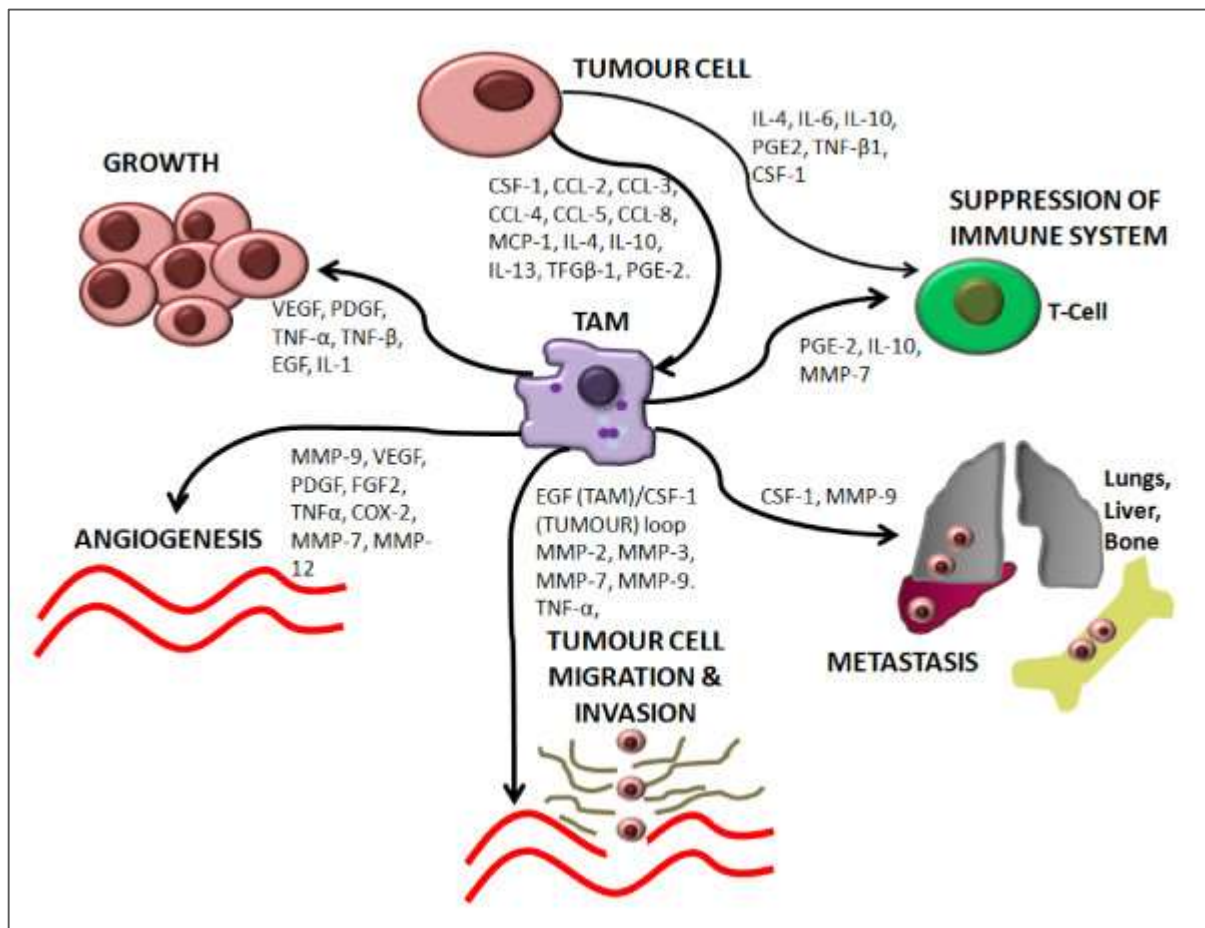


Figure 17 : Implications des TAMs dans la progression tumorale (Rogers et Holen 2011)

### c) Neutrophiles associés aux tumeurs

En 2009, une étude de l'équipe d'Albelda a montré que, au même titre que plusieurs phénotypes de macrophages avaient été mis en évidence, les neutrophiles associés aux tumeurs pouvaient également avoir plusieurs états d'activation et de différenciation et étaient classifiables en TAN « N1 », anti-tumoraux, et TAN « N2 » protumoraux (Fridlender et al. 2009). En effet, dans un contexte tumoral et sous l'effet du TGFβ notamment, les neutrophiles passent du phénotype N1, avec l'expression de cytokines et chimiokines, de bas niveaux d'arginase, et la capacité de tuer les cellules cancéreuses *in vitro*, au phénotype N2. Les TANs

N2 ont une signature moléculaire proche de celle des macrophages M2, ils favorisent la croissance tumorale en produisant des facteurs angiogéniques et des MMPs, répriment la réponse immunitaire anti-tumorale, et sont largement impliqués dans l'apparition de métastases (Shaul et Fridlender 2018).

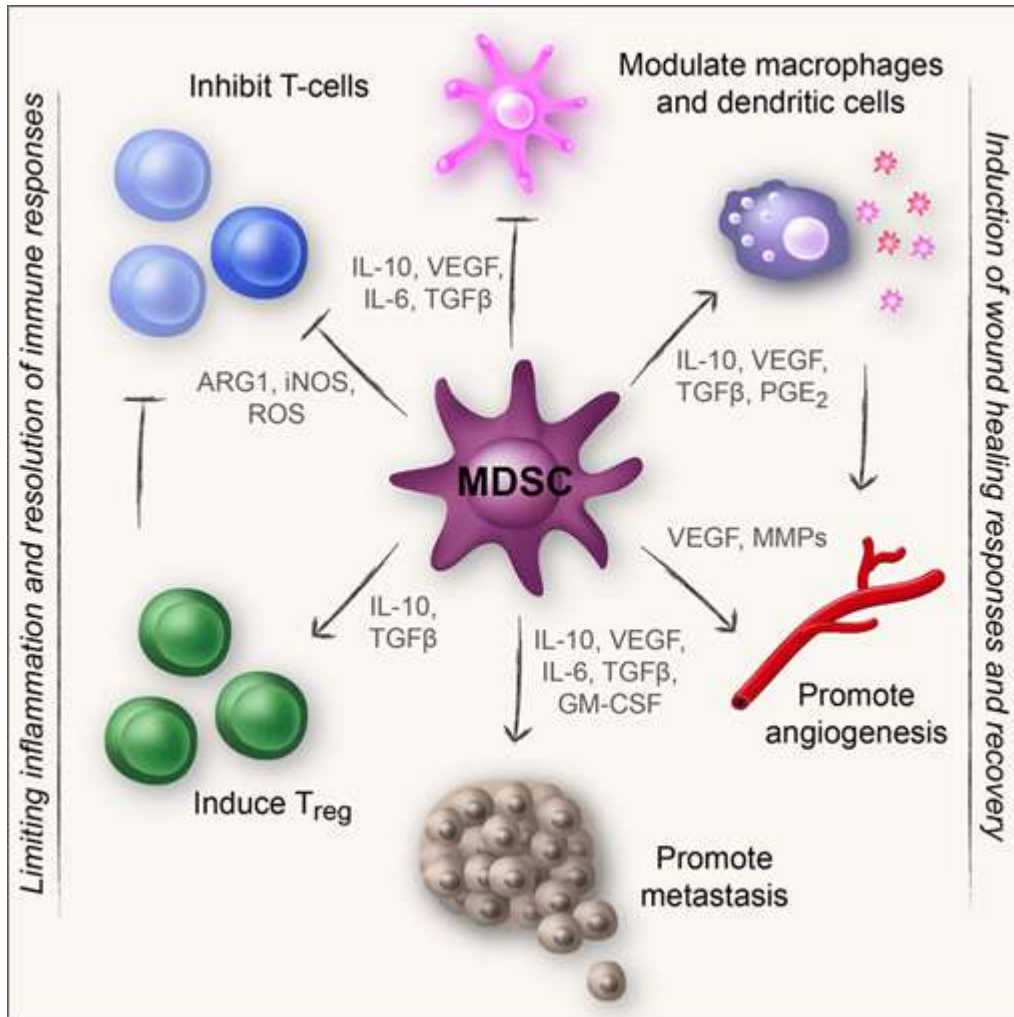
#### d) Cellules myéloïdes suppressives MDSC

Les cellules myéloïdes suppressives, ou MDSCs sont des cellules immunitaires immatures, d'origine myéloïde, et à propriétés immunosuppressives. Dans des souris développant un PDAC, elles sont retrouvées en grandes quantités dans la rate et dans les tumeurs pancréatiques (Bayne et al. 2012). Ce sont des cellules immatures capables de se différencier en cellules dendritiques, en macrophages ou en granulocytes, qui affectent à la fois la réponse innée et adaptative. Elles proviennent de précurseurs souches hématopoïétiques, notamment sous l'action du GM-CSF ou de l'IL-1 $\beta$  produits par les cellules cancéreuses pancréatiques (Bayne et al. 2012 ; Tu et al. 2008). Dans des modèles de cancer du sein, Walte et ses collaborateurs montrent que l'activation de la voie mTOR dans les cellules cancéreuses, en favorisant la sécrétion de G-CSF, stimule aussi l'accumulation de MDSCs (Welte et al. 2016). L'expression du facteur de transcription Snail (inducteur de l'EMT) dans les cellules cancéreuses ovariennes induit une augmentation de sécrétion de CXCL1 et CXCL2, des ligands de CXCR2, et va favoriser la migration des MDSCs au site tumoral (Taki et al. 2018). Enfin, il a été montré récemment que l'hypoxie au sein des tumeurs, *via* le facteur de transcription HIF-1, favorise également le recrutement de MDSC. Dans un modèle de cancer du foie, les auteurs ont démontré que HIF-1 induit l'expression d'une enzyme (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2) qui convertie l'ATP en AMP, maintenant les MDSCs dans un état indifférencié et empêchant ainsi leur différenciation en cellules dendritiques (Chiu et al. 2017).

Morphologiquement, les MDSCs ressemblent à un mélange de monocytes et granulocytes, et deux sous-types majeurs de MDSCs ont été décrits : les MDSCs granulocytiques (G-MDSC) et monocytiques (M-MDSC) (Movahedi et al. 2008). Les G-MDSC utilisent plutôt les espèces réactives de l'oxygène pour l'immunosuppression avec des contacts directs avec les cellules T, tandis que les M-MDSC utilisent l'iNOS, l'arginase et la

sécrétion de cytokines, et ne nécessitent pas de contact cellule-cellule (Youn et al. 2012). Une étude récente de l'équipe de Korkaya met aussi en évidence une infiltration spatio-temporelle différente des sous-types de MDSCs, avec plutôt une infiltration de la tumeur primaire par les M-MDSC et des sites métastatiques par les G-MDSC (Ouzounova et al. 2017).

Leur action immunosuppressive passe par plusieurs facteurs (Figure 18), dont la séquestration de cystéine, un acide aminé essentiel à l'activation des lymphocytes T ; par l'expression de hauts niveaux d'arginase, ce qui conduit à un manque de L-arginine nécessaire à la synthèse de protéines par les lymphocytes T ; par la production d'espèces réactives de l'oxygène ou de TGF- $\beta$ . Ces différents facteurs inhibent les fonctions des lymphocytes T et des cellules NK (Bayne et al. 2012 ; Pergamo et Miller 2017). La déplétion de MDSC dans des GEMM de PDAC entraîne une accumulation de LT CD8+ activé au sein de la tumeur, et augmente l'apoptose des cellules cancéreuses (Stromnes et al. 2014). L'autophagie a également été démontrée comme une voie importante de l'immunosuppression par les MDSCs. Chez des patients et des souris atteints de mélanome, les MDSCs présentent des hauts niveaux d'autophagie, et la suppression de l'autophagie dans les cellules myéloïdes entraîne un ralentissement de la croissance tumorale associé à un défaut de la dégradation lysosomale et à une réponse immunitaire anti-tumorale (Alissafi et al. 2018). De plus, *via* la sécrétion de TGF $\beta$  et d'IL-10, les MDSCs peuvent induire la polarisation des macrophages associés aux tumeurs ainsi que le développement de lymphocytes T régulateurs immunosuppresseurs (Pergamo et Miller 2017).



**Figure 18 : Implications des MDSCs dans la progression tumorale (Millrud et al. 2017)**

e) Lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs appartiennent à la réponse inflammatoire adaptative. Ils expriment la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (CD25) et le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box P3) (Fontenot et al. 2003). Physiologiquement, ils sont impliqués dans la régulation des réponses des lymphocytes T effecteurs, et sont essentiels pour la tolérance aux antigènes du soi et aux antigènes non dangereux. Dans un contexte tumoral, ils vont être recrutés et exercer des fonctions immunosuppressives qui seront cette fois délétères (Figure 19). L'accumulation de lymphocytes T régulateurs ou LTreg chez les patients est corrélée à une diminution de l'infiltration des LTs CD8+ et à un mauvais pronostic dans différents cancers dont celui du pancréas (Curiel et al. 2004 ; Hiraoka et al. 2006). Plusieurs publications



importantes ont été réalisées récemment, avec l'identification de mécanismes et de nombreuses cibles thérapeutiques potentielles dans les LTreg.

L'inhibition de la réponse immunitaire passe par l'expression de CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), une protéine qui régule négativement la réponse immunitaire en interagissant avec les molécules de co-stimulation CD80/CD86 à la surface des cellules dendritiques, inhibant ainsi le signal dans les lymphocytes T (Wing et al. 2008). Ils expriment aussi le PDL1, qui va lier PD1 (Programmed cell death 1), une molécule de co-stimulation négative à la surface des lymphocytes activés. Les LTreg produisent aussi l'IL-10 et le TGF- $\beta$  qui bloquent les réponses T antigène-spécifiques, ainsi que l'enzyme IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase) qui catabolise le tryptophane, un acide aminé essentiel aux lymphocytes T effecteurs. Enfin, le récepteur à l'IL-2 à la surface des LTreg va capter l'IL-2 et induire une carence qui va limiter l'activation des LTs CD8+ (Chinen et al. 2016). Il a aussi été montré très récemment que les LTreg induisaient des dommages à l'ADN aux lymphocytes T effecteurs *via* une compétition métabolique (d'avantage de transporteurs de glucose dans les LTreg en comparaison aux LTs effecteurs), et par suite la sénescence des LTs. Cette sénescence passe par les voies STAT et MAPK, et peut être prévenue en inhibant la signalisation STAT dans les lymphocytes (Liu et al. 2018). L'équipe de Zou a également mis en évidence que sous des conditions de stress oxydatif, les LTreg pouvaient entrer en apoptose, et que ces LTreg apoptotiques convertissaient de grandes quantités d'ATP en adénosine *via* CD39 et CD73, entraînant ainsi une immunosuppression médiée par le récepteur A2A à l'adénosine (Maj et al. 2017). L'équipe de Vignali a aussi démontré que l'interaction entre la sémaphorine-4a, un ligand exprimé par les cellules immunitaires (lymphocytes T, cellules myéloïdes), et le récepteur neuropiline-1 (Nrp1) des LTreg jouait un rôle important dans la survie des LTreg *via* la voie Akt/mTOR, et était nécessaire à leurs fonctions immunosuppressives (Delgoffe et al. 2013). Un pourcentage important de LTreg Nrp1-positifs corrèle avec un mauvais pronostic, notamment dans le mélanome. Au sein d'une même tumeur, les LTreg Nrp1-déficient produisent de l'IFN $\gamma$ , qui fragilise les LTreg NRp1-positifs, en améliorant ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale et l'élimination des cellules cancéreuses (Overacre-Delgoffe et al. 2017).

La voie NF- $\kappa$ B est aussi très impliquée dans les fonctions des LTreg. Particulièrement, le proto-oncogène c-Rel de la famille des NF- $\kappa$ B est nécessaire à l'apparition et au maintien des LTreg. Dans des modèles de mélanomes, l'inhibition chimique ou génétique de NF- $\kappa$ B c-

Rel, la croissance tumorale est drastiquement réduite, et l'efficacité des immunothérapies anti-PD-1 est restaurée (Oh et al. 2017 ; Grinberg-Bleyer et al. 2017). L'équipe de Pan a également mis en évidence que la protéine YAP (Yes-associated protein), un co-activateur transcriptionnel de la voie Hippo, est fortement exprimée dans les LTreg et renforce l'expression de Foxp3 et les fonctions immunosuppressives des LTreg. Cet effet passe par une stimulation par YAP de la voie de l'activine, qui amplifie les voies SMAD et TGFβ dans les LTreg (Ni et al. 2018).

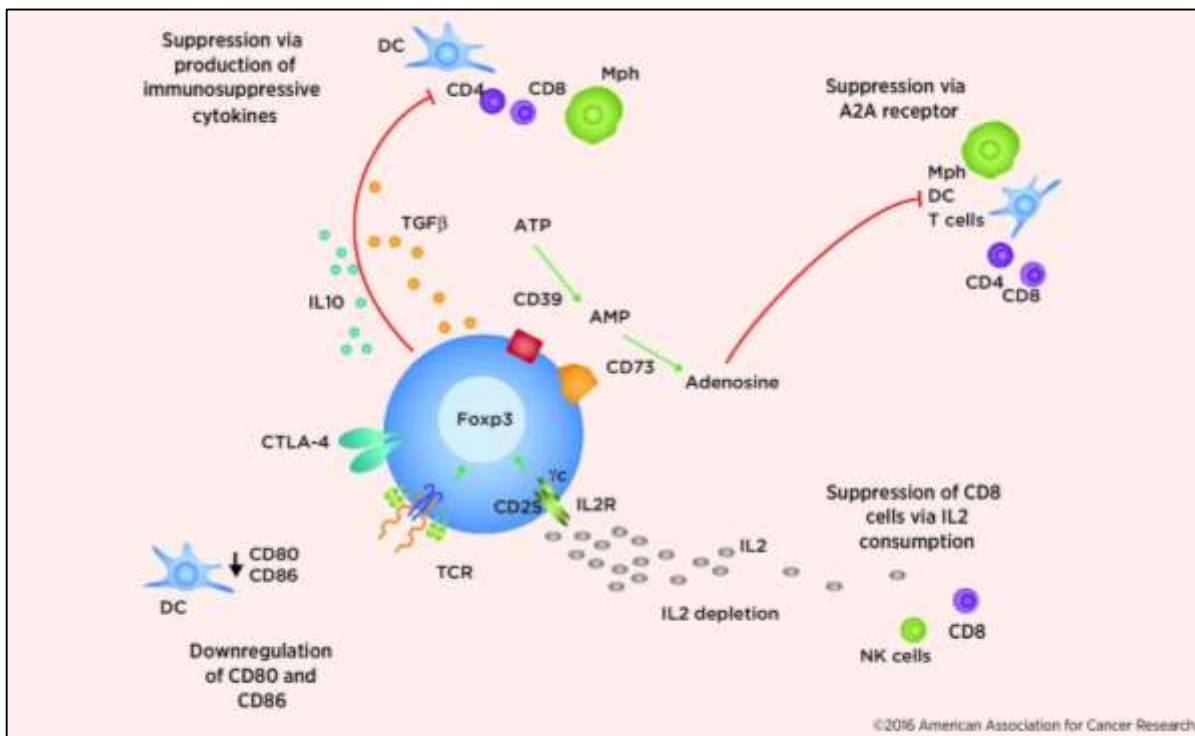


Figure 19 : Rôles immunosupresseurs des LTs régulateurs (Plitas et Rudensky 2016)



### III) Biologie de la métastase

En 1889, le chirurgien anglais Stephen Paget a développé la théorie révolutionnaire de « graine et sol » -« seed and soil »- pour illustrer l'idée que le développement de métastases dépend à la fois des caractéristiques de cellules tumorales, mais aussi des caractéristiques des organes cibles. D'après ses analyses d'autopsie où il a observé des différences entre l'apport sanguin et la fréquence de métastases dans différents organes cibles, il a conclu que les cellules tumorales, les « graines » de la métaphore, ne pouvaient se développer que dans un environnement propice particulier, le « sol », qui leur correspond le mieux.

De nos jours, les métastases sont comprises comme un processus complexe dans lequel sont impliqués de nombreux acteurs. Le concept de «graine » a été remplacé par un système hétérogène et organisé, avec différents sous-types de cellules cancéreuses. De plus, l'idée d'une évolution du cancer par séquence, à partir de la tumeur primaire puis avec une propagation ultérieure vers des sites distants, a été remplacée par un modèle progressif, avec une évolution parallèle et simultanée de la tumeur primaire et des métastases.

Si aujourd'hui certaines tumeurs bien localisées peuvent être traitées par la chirurgie et des thérapies adjuvantes, le stade métastatique reste le plus souvent incurable, à cause de son caractère systémique et de la résistance des cellules circulantes et disséminées aux traitements actuels. Plus de 90% de la mortalité des cancers est due aux métastases, et non à la tumeur primaire (Valastyan et Weinberg 2011). La compréhension des mécanismes mis en place lors du processus de métastase peut permettre d'identifier des cibles pour réduire voire bloquer l'apparition de métastases, ou éliminer des métastases déjà formées, et ainsi améliorer le pronostic de ces cancers.

Dans cette partie, nous nous intéresserons d'abord aux principes biologiques du processus métastatique, et aux différents types cellulaires impliqués. Puis nous considérerons les bases moléculaires et les voies de signalisation impliquées dans les métastases. Enfin, nous étudierons le rôle du microenvironnement tumoral dans le développement des métastases, et les particularités des métastases dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique.

## 1) Processus métastatique

L'approche la plus acceptée pour décrire les bases moléculaires et biologiques de la métastase est le concept de cascade d'invasion-métastases, développé par Isaiah Fidler en 2003, et complété par Scott Valastyan et Robert Weinberg en 2011. Ils décrivent un processus de six étapes depuis la tumeur primaire jusqu'au développement de lésions métastatiques macroscopiques et cliniquement observables.

### a) Invasion locale

L'invasion locale consiste en la propagation d'une tumeur primaire confinée dans le stroma environnant et par suite dans le tissu adjacent normal. Afin d'envahir le stroma, les cellules doivent d'abord traverser la lame basale, une couche de matrice extracellulaire sécrétée par les cellules épithéliales qui joue un rôle vital dans l'organisation des tissus épithéliaux, en agissant comme un point d'attache pour les cellules. Elles doivent ensuite traverser la lamina propria, un tissu conjonctif lâche constitué de cellules (fibroblastes, cellules immunitaires) et de matrice. Au niveau morphologique, les cellules passent d'un grade hautement différencié à indifférencié. Les cellules normales d'un épithélium entrent en apoptose en perdant le contact avec la matrice extracellulaire située à leur pôle basal (lame basale) (processus appelé anoïkis), mais les cellules cancéreuses invasives sont capables de se détacher de la tumeur primaire par différents mécanismes. Les cellules capables d'invasion et de migration vont subir la transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) et perdre l'expression de l'E-cadhérine, une protéine clé dans les interactions cellule-cellule (jonctions adhérentes), de par l'expression de facteurs de transcription comme Slug, Snail, Twist, Zeb1. Cette transition semble se faire de manière précoce dans le cas du PDAC, puisque Rhim et ses collaborateurs ont montré chez la souris que le facteur de transcription Zeb1 était exprimé par les cellules cancéreuses pancréatiques au stade PanIN, et qu'il était induit par l'inflammation (Rhim et al. 2012). Une autre étude récente a utilisé une délétion conditionnelle de Zeb1 dans les cellules tumorales dans un modèle spontané de PDAC murin, et a montré un impact important sur la formation de lésions précancéreuses, l'invasion et les métastases, avec notamment une diminution d'expression de gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire et inflammatoires (Krebs et al. 2017). Cependant,

l'équipe de Kalluri a mis en évidence sur des modèles murins génétiquement modifiés (délétion de Twist et Snail dans le pancréas) que l'EMT n'était pas indispensable au développement d'un PDAC invasif et métastatique, mais que l'inhibition de l'EMT augmentait la sensibilité des cellules cancéreuses à la gemcitabine, et prolongeait la survie des souris (Zheng et al. 2015).

Les cellules tumorales vont répondre aux stimuli de migration et acquérir des protrusions, des extensions du cytosquelette notamment d'actine. Elles vont perdre leur polarité et être capables de se fixer à la matrice extracellulaire *via* des fibres de stress et des adhésions focales et de s'en servir pour se tracter. Une fois le tissu conjonctif atteint, les cellules cancéreuses peuvent envahir en dégradant la matrice extracellulaire en sécrétant notamment des métalloprotéases, et par l'activation du système protéolytique activateur du plasminogène de type urokinase (uPA). La dégradation de la matrice permet aussi de libérer les facteurs de croissance qu'elle retient, ce qui favorise encore la prolifération (Kessenbrock et al. 2010). Récemment, l'équipe de Hodgson a également démontré que la GTPase Rac3 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3) permettait l'adhésion d'invadopodes, les protrusions d'actines, à la matrice extracellulaire, ainsi que le relargage de MMPs (Donnelly et al. 2017).

Au niveau cellulaire, les cellules invasives peuvent se comporter de différentes manières et s'adapter aux conditions, en modifiant leur programme de migration. Dans la plupart des tumeurs, on retrouve simultanément des mécanismes d'invasion collective ou individuelle. Dans les invasions dites collectives, les cellules cancéreuses forment des unités multicellulaires cohésives, soit sous forme de feuillets ou brins comme c'est le cas dans certains carcinomes, soit sous forme de grappes, dans la plupart des cancers épithéliaux (Friedl et Wolf 2013) (Figure 20).

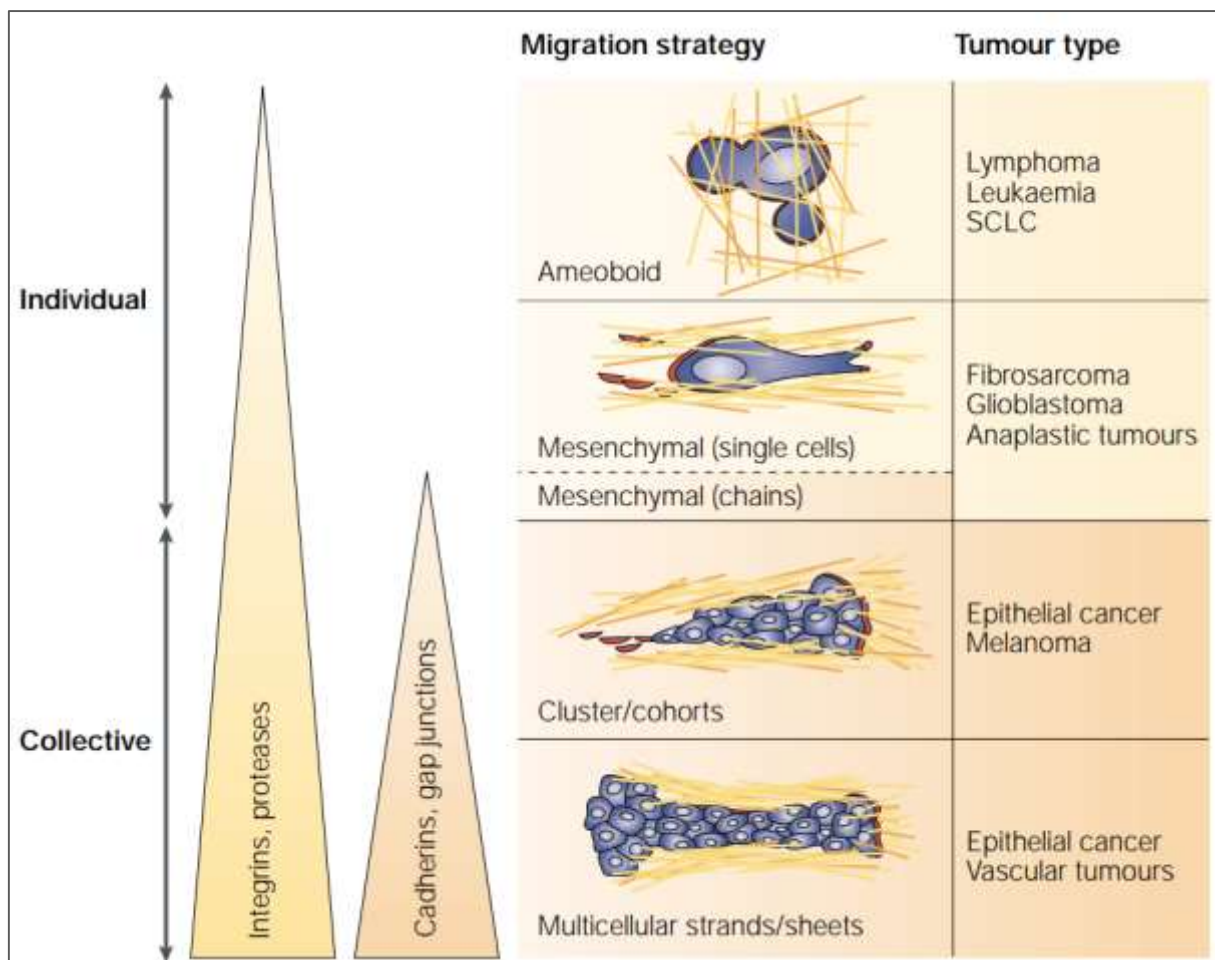


Figure 20 : Diversité des mécanismes d'invasions tumorales (Friedl et Wolf 2013)

Les invasions collectives prédominent dans les tumeurs très différenciées, comme le cancer du sein lobulaire, le cancer de la prostate ou le cancer du poumon à larges cellules. L'avantage de la migration collective est que l'amas de cellule peut produire des facteurs pro-migration et des protéases en concentrations élevées, et être plus résistant aux attaques du système immunitaire. Les amas de cellules sont composés de différents sous-types de clones qui peuvent agir en synergie, comme des sous-types plus migratoires ou plus résistants à l'apoptose.

Dans les mécanismes individuels où les cellules perdent les interactions cellule-cellule, on distingue les invasions mésenchymateuses, plutôt retrouvées dans les tumeurs du tissu conjonctif comme les fibrosarcomes, ou les cancers épithéliaux après une dédifférenciation progressive. Ces cellules progressent grâce à des protéases, prennent une forme fibroblastique, due aux adhésions d'intégrines et aux forces de tractions au niveau des deux pôles de la cellule. L'autre mécanisme d'invasion individuel est la migration amiboïde,

indépendante des intégrines et des protéases, les cellules s'adaptent par une transition mésoenchymo-amiboïde. Les cellules en migration amiboïdes peuvent aussi provenir de cellules en migration collective qui s'adaptent. En fait, les cellules peuvent alterner entre ces différentes stratégies en réponse aux changements dans leur microenvironnement, mais aussi face aux traitements qu'elles subiraient.

## b) Intravasation

L'intravasation consiste en l'entrée de cellules cancéreuses invasives dans la lumière des vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Cette entrée se fait *via* des mécanismes similaires à ceux de l'invasion locale, avec la sécrétion de protéases et l'activation du système uPA. De nombreux facteurs peuvent contribuer à faciliter l'intravasation des cellules cancéreuses, particulièrement la composition du microenvironnement, les protéases en présence, les molécules agissant sur les voies de signalisation, ou encore la vascularisation. Si l'intravasation est le plus souvent considérée comme consécutive à l'invasion locale, des travaux suggèrent cependant qu'elle peut être initiée précocement dans le développement tumoral et s'effectuer en parallèle à l'invasion locale, au sein même de la masse tumorale et *via* la vascularisation intra-tumorale (Deryugina et Kiosses 2017). Enfin, La voie d'intravasation dépend de nombreux facteurs, notamment la proportion de vaisseaux sanguins ou lymphatiques au sein de la tumeur.

L'intravasation sanguine ou hémotogène peut être active ou passive, selon le type de tumeur, la structure des vaisseaux, ou les conditions au sein du microenvironnement. Les cellules cancéreuses elles-mêmes sont modifiées, avec des changements de leur cytosquelette et une augmentation des molécules d'adhésion comme des intégrines pour faciliter leur attachement aux cellules endothéliales. L'accès des cellules cancéreuses aux vaisseaux sanguins est aussi un paramètre évident pour la capacité de ces cellules à atteindre la circulation, et les tumeurs plus vascularisées sont supposées avoir un taux plus élevé d'intravasation. La sécrétion de facteurs comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) permet la stimulation de l'angiogenèse, avec l'apparition d'un réseau de néo-vaisseaux, permet des apports en nutriments et en oxygène augmentés, facilite la croissance tumorale et l'intravasation. En effet, l'expression du VEGF est corrélée à la présence de métastases hépatiques dans différents cancers, et son inhibition par un anticorps



bloquant conduit à la réduction de la densité des microvaisseaux et à la réduction de l'intravasation (Kou et al. 2010). De plus, les caractéristiques de ces vaisseaux influent aussi sur la capacité des cellules cancéreuses à entrer dans la circulation. Enfin, les néo-vaisseaux formés au sein des tumeurs sont plus tortueux, leur structure est modifiée continuellement. Les interactions entre cellules endothéliales adjacentes sont plus faibles, la couverture péricytaire est moins forte, ce qui facilite l'intravasation. Les travaux de Cantelmo ont également mis en évidence un métabolisme hyper-glycolytique des cellules endothéliales tumorales, médié par l'activateur de la glycolyse PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3). L'inhibition de PFKFB3 normalise les vaisseaux sanguins tumoraux en resserrant la barrière endothéliale. Elle va limiter l'endocytose des VE-cadhérines et rendre les péricytes plus adhésifs *via* l'augmentation de l'expression de la N-cadhérine (Cantelmo et al. 2016). L'IL-6 et la MMP-9 favorisent aussi les métastases en augmentant l'angiogenèse et en accélérant la dégradation de la matrice (Bergers et al. 2000 ; Wang et al. 2013). Un autre facteur, régulé par l'hypoxie au sein de la tumeur est la sécrétion de la protéine angiopoietine-2, qui perturbe les jonctions entre cellules endothéliales et facilite ainsi l'intravasation des cellules cancéreuses (Hakanpaa et al. 2015). Egalement, l'équipe de Fischer a démontré que l'activation de la voie Notch dans les cellules endothéliales facilitait l'intravasation et le développement de métastases en induisant un endothélium sénescant et pro-inflammatoire, et que le blocage de cette voie présentait un intérêt thérapeutique fort, notamment dans le cancer de l'ovaire (Wieland et al. 2017).

L'intravasation lymphatique est une autre voie d'accès à la circulation sanguine pour les cellules. On retrouve également la synthèse de néo-vaisseaux lymphatiques au sein de la tumeur, c'est la lymphangiogenèse. Après avoir rejoint le conduit thoracique qui draine la majorité de la lymphe du corps, les vaisseaux lymphatiques peuvent s'écouler dans le sang. Les cellules cancéreuses rencontrent également différents ganglions lymphatiques, souvent les premiers sites de métastases dans plusieurs cancers comme celui du sein : ils sont prélevés et biopsiés comme outil diagnostique. Les différences de structure entre vaisseaux lymphatiques qui n'ont pas de jonctions endothéliales serrées et sanguins conduisent à des différences de mécanisme d'intravasation. Les cellules tumorales pénètrent plus facilement dans les vaisseaux lymphatiques *via* le tissu conjonctif, et survivent plus facilement car le débit dans ces vaisseaux est largement moindre que dans les vaisseaux sanguins.

### c) Survie dans la circulation sanguine

Une fois la circulation sanguine atteinte, les cellules cancéreuses doivent résister à une large variété de stress jusqu'à atteindre un site secondaire distant et s'y réimplanter. Les contraintes de cisaillement du débit sanguin sont suffisamment fortes pour détruire la plupart des cellules tumorales, et les cellules doivent aussi résister à l'absence d'adhésion aux composants de la matrice, normalement essentielle à la survie. De plus, ces cellules doivent être capables de se protéger contre le système immunitaire, particulièrement les cellules NK (« natural killer »). Le réseau sanguin est un environnement très hostile pour les cellules tumorales circulantes (CTC), et on estime que moins d'1% des CTC peut y survivre et produire des métastases.

Les cellules circulantes se protègent des contraintes physiques et immunitaires en sécrétant des molécules comme la thrombine, la cathepsine B, les MMP-2 et 14, ou la podoplanine. Ces molécules vont activer différents récepteurs et voies de signalisation qui provoquent des désordres de la coagulation et l'agrégation de plaquettes autour d'elles. Ce mécanisme de détournement de la coagulation normale s'appelle l'agrégation plaquettaire induite par les cellules tumorales. De plus, cet agrégat permet aussi de faciliter l'arrêt à distance et l'extravasation des CTC (Jurasz et al. 2004). De même, des travaux récents ont montré que les cellules cancéreuses exprimant des hauts niveaux de Mucine-4, une glycoprotéine de surface, s'associaient plus facilement avec les plaquettes et les leucocytes dans la circulation, ce qui favorise la survie et le développement de métastases (Rowson-Hodel et al. 2018). Une autre étude récente a montré que l'apoptose des cellules cancéreuses due aux contraintes de cisaillement dans la circulation était médiée par une augmentation de la production d'anion superoxyde par les mitochondries. Les cellules cancéreuses qui expriment des hauts niveaux de manganèse superoxyde dismutase (MnSOD) sont plus résistantes à ces forces de cisaillement et métastases plus facilement (Fu et al. 2016).

Le développement de techniques d'isolement a permis d'étudier plus précisément ces CTC, au niveau moléculaire et fonctionnel. Les séquençages d'ADN de nouvelle génération permettent l'étude du spectre de mutations de ces CTC, et Heitzer et ses collaborateurs ont comparé les mutations retrouvées dans la tumeur primaire, dans les métastases et dans les CTC. Ils ont montré que les CTC présentaient les mutations initiales retrouvées dans la tumeur primaire, mais également des mutations CTC-spécifiques, qui étaient également présentes à

un niveau sous-clonal dans la tumeur primaire et dans les métastases (Heitzer et al. 2013). L'arrivée du séquençage sur cellule unique permet également de mettre en évidence l'hétérogénéité des CTC (Miyamoto et al. 2015). Au niveau clinique, la présence de CTC corrèle négativement avec la survie sans progression et la survie globale dans des cancers du poumon, gastrique, du pancréas et des mélanomes (Ilie et al. 2014 ; Mimori et al. 2008 ; Reid et al. 2013 ; Rhim et al. 2014). Les CTC peuvent également être utiles pour prévoir l'atteinte métastatique. En effet, les patients avec un nombre élevé de CTC sont plus susceptibles de développer des métastases hépatiques dans l'adénocarcinome pancréatique (Tien et al. 2016). Ainsi, la définition de valeurs seuil et de techniques fiables de mesure de CTC pourrait être particulièrement utiles pour suivre la progression, les rechutes ou encore les mécanismes de résistance et amener un bénéfice clinique fort dans les prochaines années (Dasgupta et al. 2017).

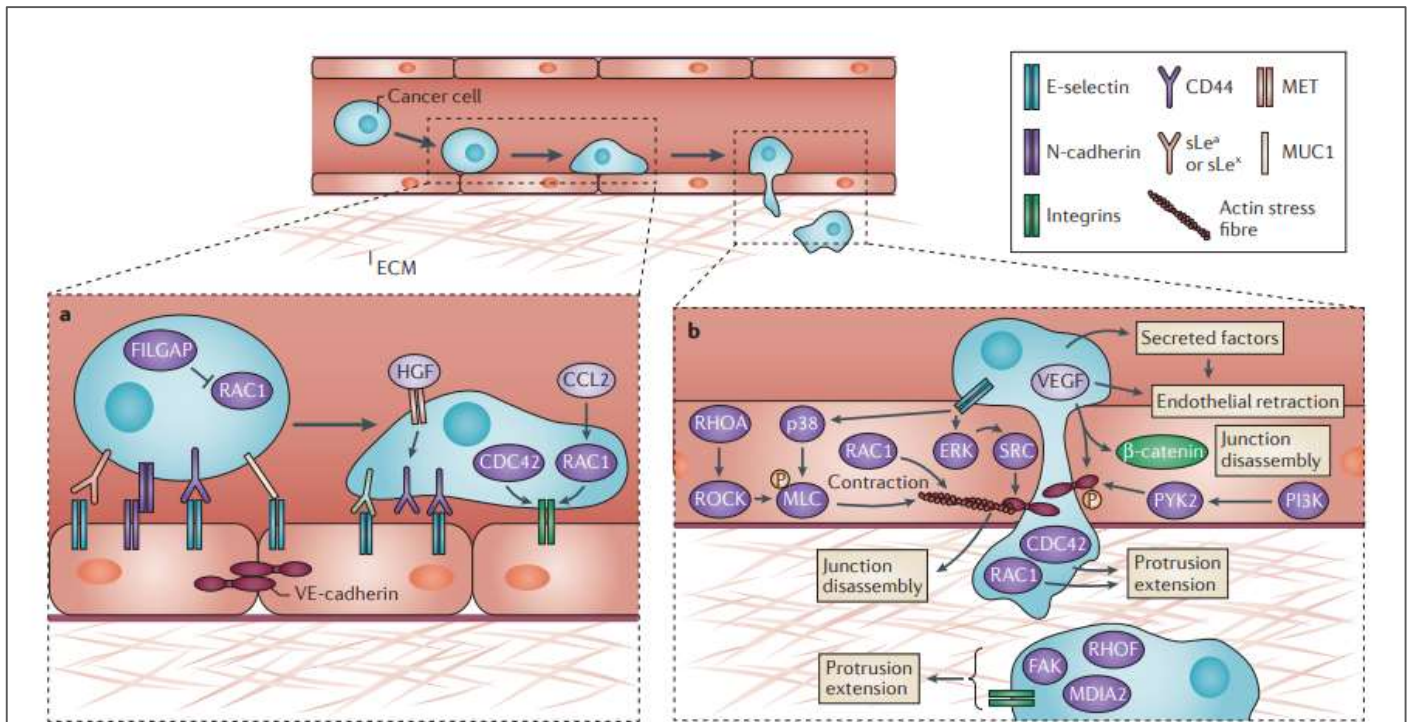
#### d) Arrêt à distance et extravasation

En utilisant la circulation sanguine pour atteindre différents sites à distance, les cellules circulantes vont ensuite quitter la circulation sanguine par un processus appelé extravasation. Elles doivent d'abord parvenir à ralentir et à adhérer aux cellules endothéliales. L'attachement des cellules cancéreuses est la première étape du processus d'extravasation, et intervient plutôt dans les petits capillaires, où les embolus de CTC et plaquettes sont d'abord ralentis physiquement par le diamètre des vaisseaux. Des adhérences sont ensuite créées, *via* l'expression d'un large spectre de ligands et de récepteurs par les EC et les cellules cancéreuses.

Les CTC miment le mécanisme d'adhésion-extravasation utilisé par les leucocytes pour ralentir et entrer dans un organe précis en cas d'inflammation, avec d'abord des adhésions faibles qui sont suivies d'interactions plus fortes. La sélectine endothéliale (E-sélectine) exprimées à la surface des cellules endothéliales est un important récepteur pour les adhésions de leucocytes, et est également impliquée dans les adhésions des cellules tumorales. Les cellules endothéliales quiescentes n'expriment pas l'E-sélectine, mais son expression est induite par des cytokines inflammatoires secrétées par les cellules cancéreuses elles-mêmes ou par les leucocytes qui leur sont associés. Un des ligands des sélectines est le tétrasaccharide sialyl Lewis<sup>x</sup> ou sLE<sup>x</sup>, attaché aux glycoprotéines à la surface des cellules.

D'ailleurs, des niveaux élevés de sLE<sup>x</sup> dans les tumeurs sont généralement associés à un mauvais pronostic (Nakamori et al. 1993 ; Zwenger et al. 2014). D'autres ligands sont exprimés par les cellules cancéreuses, dont le CD44, le CD24, la mucine 1 (MUC1), et la protéine de liaison à la galectine-3 (LGALS3BP). L'équipe de Vignjevic a également montré récemment que sur des souris développant des tumeurs primaires, la lumière des vaisseaux sanguins hépatiques présente des dépôts de fibronectine. Les cellules cancéreuses circulantes sont capables de se fixer à cette fibronectine *via* la taline-1, un composant important des adhésions focales, en facilitant ainsi la migration transendothéliale (Barbazán et al. 2017). La cadhérine neuronale (N-cadhérine) est un autre récepteur important pour l'attachement des CTC aux cellules endothéliales. Elle est exprimée à la fois par les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales, et il a été montré que des modèles murins transgéniques qui expriment la N-cadhérine sur l'épithélium mammaire développent d'avantage de métastases pulmonaires (Hulit et al. 2007), et que l'expression exogène de N-cadhérine sur des cellules de cancer du sein induit le développement de métastases (Hazan et al. 2000) (Figure 21).

Enfin, il est important de noter que les cellules cancéreuses de chaque origine présentent une affinité particulière pour certains organes, appelée tropisme. Un des mécanismes de ce tropisme est le relargage de chimiokines particulières associé à l'expression de récepteurs à ces chimiokines par les cellules tumorales, qui va permettre le ciblage d'un organe cible. Un des exemples de ce mécanisme est l'expression du récepteur CXCR4 par les cellules de cancer du sein, qui vont migrer préférentiellement vers les organes exprimant des niveaux importants du ligand CXCL12, comme le poumon, le foie ou le cerveau.



**Figure 21 : Mécanismes d'arrêt à distance et d'extravasation des cellules tumorales circulantes : molécules d'adhésion et de signalisation impliquées (Reymond et al. 2013)**

Une fois que les cellules cancéreuses ont adhéré à la paroi endothéliale, elles vont devoir la traverser pour atteindre le tissu cible ; c'est l'extravasation par un processus appelé migration trans-endothéliale (TEM). Pour parvenir à traverser les barrières physiques à l'extravasation, les tumeurs primaires sont capables de sécréter des facteurs qui vont modifier la perméabilité vasculaire et le microenvironnement à distance. Parmi eux, la protéine angiopoïétine-like 4 (Angptl4), l'angiopoïétine 2, les MMP1 et 2, la cyclooxygénase-2 (COX2), ou encore le VEGF, vont modifier la paroi endothéliale et faciliter l'extravasation. De plus, le recrutement de monocytes qui vont sécréter du VEGF au niveau métastatique va aussi permettre d'améliorer la traversée des cellules cancéreuses. Il a également été montré récemment que l'activation de la voie FAK au niveau endothéliale favorise la migration trans-endothéliale, et que l'inhibition pharmacologique de cette voie permettait de limiter les métastases en restaurant le rôle de barrière de la paroi endothéliale (Jean et al. 2014)

Deux voies de migration trans-endothéliales ont été décrites : la TEM paracellulaire et la TEM transcellulaire. La TEM paracellulaire se définit par une migration entre les jonctions des cellules endothéliales, ce qui implique une modification de ces jonctions, alors que la TEM

transcellulaire consiste en une migration directement au travers des corps cellulaires endothéliaux (Miles et al. 2008).

Pour la TEM paracellulaire, l'extravasation est permise par différents couples ligand-récepteur et voies de signalisation. Les interactions se font avec les cellules endothéliales, à la fois par les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires recrutées. Les cellules cancéreuses circulantes expriment le ligand CCL2 et le récepteur CXCR4, qui vont se fixer aux récepteurs CCR2 et au ligand CXCL12 des cellules endothéliales. Ces liaisons vont induire une augmentation des capacités de migration de la cellule cancéreuse, et faciliter l'ouverture des jonctions dans la paroi endothéliale. En parallèle, l'interaction entre la protéine précurseur amyloïde APP et le récepteur de mort 6 (DR6) des EC va provoquer la nécroptose de la cellule endothéliale et faciliter l'extravasation (Strilic et al. 2016). Les cellules immunitaires recrutées, macrophages et neutrophiles, vont également sécréter des facteurs solubles (VEGF, TGF $\beta$ , MMPs) et contribuer aux défauts de la barrière endothéliale. Le rôle des composants cellulaires du microenvironnement sera plus largement abordé plus tard dans ce chapitre. La TEM transcellulaire est largement moins utilisée par les cellules cancéreuses, même s'il a été montré qu'elle intervenait dans le cas du cancer colorectal et du sein (Chiang et al. 2016). Une étude montre que la phosphorylation de la protéine MLC (« Myosin-light chain ») par la kinase MLC endothéliale entraînait la contraction des chaînes de myosine et facilitait le TEM transcellulaire (Khuon et al. 2010).

#### e) Micrométastase

Après extravasation, les cellules cancéreuses atteignent un tissu cible très différent du tissu de leur tissu d'origine en terme de microenvironnement, de cytokines et facteurs de croissance disponibles, et vont devoir créer un environnement favorable. Il a été montré que dans la tumeur primaire libère des facteurs solubles dans la circulation sanguine qui vont induire le recrutement de cellules et une augmentation du VEGF, TGF $\beta$  et de protéines inflammatoires comme les chimiokines S100 dans les futures niches métastatiques (Hiratsuka et al. 2006). Ces protéines vont permettre le recrutement de cellules immunitaires (dont les progéniteurs hématopoïétiques expriment le récepteur VEGFR1) pro-tumorales et le dépôt de matrice extracellulaire par les fibroblastes activés avant même l'arrivée de cellules

cancéreuses, constituant ainsi un terrain favorable à l'invasion et la prolifération de celles-ci (Kaplan et al 2005 ; Psaila et Lyden 2009).

Les progéniteurs hématopoïétiques présentent à leur surface l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ , qui va être activée par la fibronectine déposée dans la pré-niche métastatique. Une fois le futur site de métastase atteint, ces cellules hématopoïétiques vont modifier à leur tour l'environnement *via* la sécrétion de MMP9 (Hiratsuka et al. 2002). L'activation de protéases au sein de la matrice extracellulaire en place va induire le relargage de nouvelles molécules séquestrées dans la matrice, comme le ligand soluble kit, un facteur de croissance de cellules souches (López-Otín et al. 2007). Enfin des fibroblastes résidents sont activés et vont également modifier la matrice extracellulaire en sécrétant différentes protéines, fibronectine ou lysyl oxydase (LOX) (Erler et al. 2009). Plus récemment, Grünwald et ses collaborateurs ont mis en évidence que dès les stades précancéreux, les cellules tumorales sécrètent l'inhibiteur tissulaire de metalloprotéases 1 (TIMP-1). La signalisation du TIMP-1 passe par la protéine membranaire CD63, et conduit à l'activation des cellules étoilées hépatique en fibroblastes, toujours pour constituer un environnement favorable au développement de métastases (Grünwald et al. 2016). Il a également été montré que les cellules cancéreuses étaient capables de reprogrammer à distance le métabolisme des cellules de la pré-niche pour faciliter le développement de métastases. En sécrétant des vésicules contenant un micro ARN, le miR-122, qui diminue l'expression de la pyruvate kinase dans les cellules de la pré-niche, elles vont réduire la consommation de glucose par les cellules non cancéreuses et donc favoriser les apports pour les cellules cancéreuses qui atteignent la pré-niche (Fong et al. 2015).

Les cellules qui pénètrent un tissu à distance sont décrites comme des cellules tumorales disséminées (DTC), et peuvent se comporter de différentes manières. Il est maintenant admis que la dissémination des cellules cancéreuses se produit tout au long de la progression tumorale, parfois de manière très précoce. Lorsque la tumeur primaire a déjà induit un remodelage et l'instauration d'une pré-niche métastatique, la dynamique de la métastase est accélérée. Cependant, chez de nombreux patients, des DTC sont déjà retrouvées au moment du diagnostic. Ces cellules qui disséminent précocement atteignent un environnement peu favorable, et peuvent se maintenir dans des états de dormance pouvant durer de nombreuses années, avec un phénotype proche du phénotype de cellules souches (Shiozawa et al. 2016).

Les DTC précoces évoluent différemment des cellules composant la tumeur primaire. Par exemple, les DTC retrouvées dans la moelle osseuse dans des cas de cancer du sein présentaient moins d'anormalités génétiques que les cellules de la tumeur primaire (Schardt et al. 2005). De plus, l'analyse génétique des DTC montre des réarrangements chromosomiques très différents entre les cellules de la tumeur primaire et les DTC, mais également entre les DTC de différentes localisations secondaires (Stoecklein et al. 2008). Ce résultat suggère une évolution parallèle sous des pressions de sélection différentes, dépendante de l'environnement. Cette variation implique d'abord que les thérapies basées sur les propriétés de la tumeur primaire, comme des thérapies qui ciblent la surexpression d'un récepteur particulier, ne sera pas efficace sur tous les sous-types de clones tumoraux, et que le développement de lignées de DTC dans un microenvironnement donné entrainera à priori des modifications du comportement de ces cellules au niveau biologique. Cette hétérogénéité, en plus du statut prolifératif des DTC dormante, peut expliquer les résistances des DTC aux traitements. Par exemple, une étude a montré que le statut de la mutation EGFR entre des paires de tumeurs primaires et de métastases n'était pas corrélé dans plus 75% des cas dans une cohorte de NSCLC (Goss et al. 2010 ; Gow et al. 2009). Enfin, il faut souligner que malgré le mauvais pronostic associé à la présence de DTC, une partie des patients présentant des DTC ne développe pas de métastases (Braun et al. 2005), ce qui indique que la dissémination n'est pas suffisante pour initier le développement de métastases, et que d'autres facteurs sont nécessaires au « réveil » des DTC (stress, inflammation, ...).

#### f) Colonisation

Une fois l'organe distant atteint, l'étape finale de la cascade d'invasion-métastases consiste en la prolifération des cellules composant la micrométastase pour former des lésions macroscopiques cliniquement observables. La durée de cette étape varie considérablement selon les tumeurs, de quelques semaines à plusieurs années. Les cellules disséminées dans les organes peuvent se maintenir dans un état quiescent, on parle de latence métastatique, et seuls environ 50% des patients développeront des métastases détectables.

En effet, l'implantation de cellules cancéreuses dans un organe à distance n'induit pas automatiquement la prolifération et la colonisation de cet organe. Au contraire, la large majorité des cellules tumorales disséminées vont disparaître au cours du temps ou se



maintenir sous forme de petites colonies stables en nombre (Chambers et al. 2002). Ces colonies peuvent rester quiescentes, si l'environnement du site métastatique est incompatible avec son développement, en accord avec la théorie de la « graine et du sol ». Elles peuvent au contraire réussir à se développer, avec des taux de prolifération importants, dans des environnements tissulaires qui leurs sont favorables. Un argument majeur pour le fait que les environnements des tissus imposent des contraintes pour le développement de métastases est qu'entre les gènes identifiés comme médiateurs de la colonisation des cellules cancéreuses du sein dans l'os, le poumon, le cerveau ou le foie (Kang et al. 2003 ; Minn et al. 2005 ; Bos et al. 2009 ; Tabaries et al. 2011), le chevauchement est très faible. Ces gènes contrôlent des modifications organe-spécifiques qui permettent de compenser les incompatibilités entre les capacités de croissance tumorales des cellules cancéreuses disséminées et les contraintes imposées par le microenvironnement de l'organe cible. Cette notion implique que les mécanismes moléculaires qui régissent cette étape de colonisation métastatique sont variés, et que chacun d'entre eux est déterminé à la fois par le tissu d'origine des cellules cancéreuses et l'organe dans lequel la colonisation va se produire. Par exemple, les cellules de cancer du sein vont sécréter le ligand Jagged1 de la voie Notch, qui va agir sur les ostéoclastes en augmentant leur capacité à sécréter de l'interleukine 6, et leur activité ostéolytique. L'ostéolyse ainsi que la libération de facteurs de croissance retenus dans la matrice osseuse va ainsi favoriser le développement de métastases osseuses (Sethi et al. 2011). Dans le PDAC, une étude récente a montré que la signalisation du TGF $\beta$  dans les cellules cancéreuses était largement impliquée dans le développement de métastases par voie hématogène, majoritairement au niveau du foie. Cette voie de signalisation entraîne la sécrétion de différents facteurs prométastatique comme le collagène VI et la lipocaline-2 au niveau de la tumeur primaire mais pas dans les sites métastatiques, suggérant que la capacité à atteindre un site particulier à distance se développe plutôt au niveau de la tumeur primaire (Zhong et al. 2017).

Enfin, la réussite de la colonisation repose une propriété majeure d'une sous-population de cellules cancéreuses disséminées, les « cellules initiatrices de métastases » (MIC). Cette sous population présente un phénotype qu'on peut qualifier de phénotype souche. Les MIC sont des cellules à forte capacité d'auto-renouvellement et sont capables de se différencier et produire les autres sous-types hétérogènes de cellules composant la métastase. Ainsi, ces MIC peuvent être définies expérimentalement par leur capacité à

générer une métastase, et possèdent de nombreux avantages qui lui permettent de résister à l'important taux de mort cellulaire des cellules qui atteignent un tissu à distance. Notamment, elles présentent une importante plasticité cellulaire, sont capables de reprogrammer leur métabolisme, d'entrer et de sortir d'un état de quiescence, de résister à l'apoptose et d'échapper au système immunitaire. De plus, ces cellules développent des résistances aux thérapies, notamment par leur phénotype plus mésenchymateux, moins prolifératif, et par leurs modifications génétiques (d'avantage d'expression de pompes à efflux, ou d'enzymes de détoxification). Ces avantages, génétiques ou épigénétiques, sont acquis dès la tumeur primaire, mais aussi au fur et à mesure de la cascade d'invasion-métastase. Un des marqueurs exprimé par ces cellules est le CD36, une glycoprotéine membranaire transporteur d'acides gras, et les MIC peuvent être enrichies par tri des cellules CD36-positives. Il a été montré que l'injection de ces cellules était suffisante pour former des métastases au niveau des ganglions lymphatiques dans un modèle de cancer oral (OSCC), alors que des souris injectées avec les cellules CD36-négatives n'en développaient pas (Pascual et al. 2017).

Pour conclure cette partie sur le processus biologique de la métastase, il est important d'insister sur le caractère hautement inefficace de ce processus. Chaque étape, depuis l'invasion locale jusqu'à la colonisation métastatique, est extraordinairement compliquée à franchir pour les cellules cancéreuses et on estime que moins de 0,01% des cellules qui entrent dans la circulation sanguine finira par produire des métastases macroscopiques. En particulier, des études sur des modèles expérimentaux suggèrent que l'étape la plus limitante du processus serait la colonisation du tissu à distance. En effet, la plupart –plus de 80%– des cellules injectées dans la circulation parviennent à extravaser, mais un taux très important de mort cellulaire était observé dans le tissu cible. Au niveau clinique, des métastases observables peuvent apparaître plusieurs décennies après la résection complète de la tumeur primaire. En revanche, ces délais peuvent être considérablement raccourcis dans d'autres types de tumeurs, comme dans l'adénocarcinome pancréatique, où l'extravasation dans un organe à distance progresse rapidement en lésion macroscopique. Ces observations suggèrent que les cellules qui métastasent depuis ce type de tumeurs primaires sont déjà très compatibles avec le tissu à distance (Valastyan et Weinberg 2011).

## 2) Bases moléculaires de la métastase

De nombreuses voies de signalisation et mutations sont impliquées dans le développement du cancer, et notamment dans le processus de métastases. Cette partie se propose d'apporter une vue d'ensemble des voies majeures impliquées.

### a) RAS/RAF/MEK/ERK

La voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK est particulièrement importante dans les adénocarcinomes du poumon, du colon ou du pancréas dans lesquels la mutation KRAS, activatrice de RAS, est prédominante (plus de 90% des PDAC). RAS peut aussi être activé par la fixation de ligands comme l'EGF (« epithelial growth factor »), l'IGF (« insulin growth factor ») ou le FGF (« fibroblast growth factor ») sur des récepteurs tyrosine kinase (TK), comme l'EGFR, l'IGFR et le FGFR, respectivement. On peut également retrouver des mutations activatrices ou des surexpressions de ces récepteurs sur les cellules cancéreuses, qui conduisent à une sur-activation de la voie RAS/RAF/MEK/ERK, mais aussi de la voie PI3K/Akt/mTOR ou de la voie STAT (« signal transducer and activator of transcription »). La cascade de signalisation provoquée par la fixation d'un ligand aux récepteurs TK ou les activations constitutives de RAS va entraîner la transduction d'un signal de la membrane jusqu'au noyau, avec au départ l'activation de RAS (« small GTPase rat sarcoma oncogene homolog »), qui se lie et active RAF (« rapidly accelerated fibrosarcoma kinase »). RAS phosphoryle ensuite la kinase MEK qui active les MAPKs (« mitogen-activated protein kinases ») donc les kinases ERK1 et ERK2 (« extracellular signal-regulated kinases »). Ces kinases sont les effecteurs principaux de cette voie, et entraînent la transcription de gènes avec un effet majeur sur de nombreux processus cellulaires majeurs, comme la prolifération, la survie, et l'invasion (Figure 22). Des modifications aberrantes de cette voie entraînent l'initiation tumorale et sa progression.

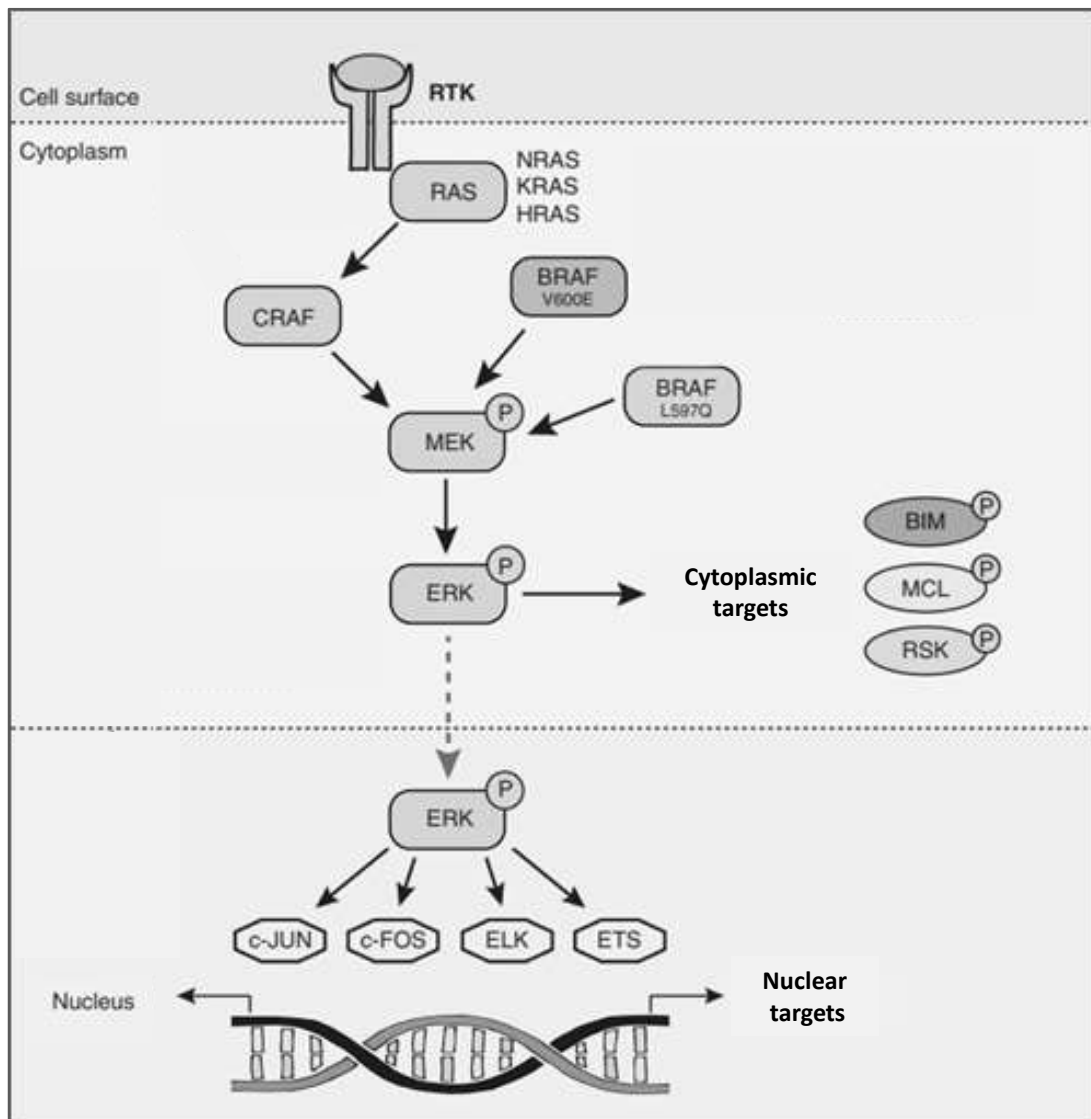


Figure 22 : Signalisation de la voie MAPK (Adapté de Smalley et Smalley 2018)

La voie RAS/RAF/MEK/ERK est particulièrement impliquée dans l'étape d'invasion locale de la cascade d'invasion-métastase. En effet, en activant différents facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B, elle induit l'expression de protéases qui vont remodeler la matrice comme les MMPs 1, 2, 3 et 9 ou le système uPa (Tang et Tsai 2012). De même, il a récemment été montré que l'intégrine  $\alpha\beta 6$  pouvait activer la voie des MAPK et stimuler l'invasion de cellules de cancer du poumon *via* en stimulant l'expression des MMPs 2 et 9 et de l'IL-8 (Yan et al. 2018). ERK active également la MLCK (« myosin light-chain kinase ») qui va phosphoryler en retour la MLC et ainsi augmenter la contraction cellulaire et donc la motilité. De même, ERK va permettre le recrutement de protéines d'adhésion comme la kinase

d'adhésion focale (FAK), et favoriser ainsi la migration des cellules cancéreuses (Zheng et al. 2009).

#### b) PI3K/Akt/mTOR

La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR est impliquée à la fois dans le développement des tumeurs primaires et des métastases. Ces kinases sont recrutées par la fixation de ligands extracellulaires sur des récepteurs tyrosines kinases, ou sur des récepteurs couplés aux protéines G. Une fois activées, elles vont phosphoryler le phosphoinositol biphosphate (PIP2) en phosphoinositol triphosphate (PIP3). Ce PIP3 va ensuite activer les kinases serine/thréonine phosphoinositide dépendantes (PDK1) et Akt (protéine kinase B), qui est ensuite relocalisé dans le cytoplasme, où il va phosphoryler ses substrats et activer les nombreuses voies de signalisation en aval. Notamment, Akt va phosphoryler le complexe TSC2 (tuberous sclerosis complex-2) qui va se dissocier de TSC1, et permettre le passage de RHEB (RAS homolog enriched in brain) sous forme active. L'activation de RHEB va finalement induire l'activation de la kinase mTORC1 (mammalian target of rapamycin), protéine majeure de la croissance cellulaire (Figure 23).

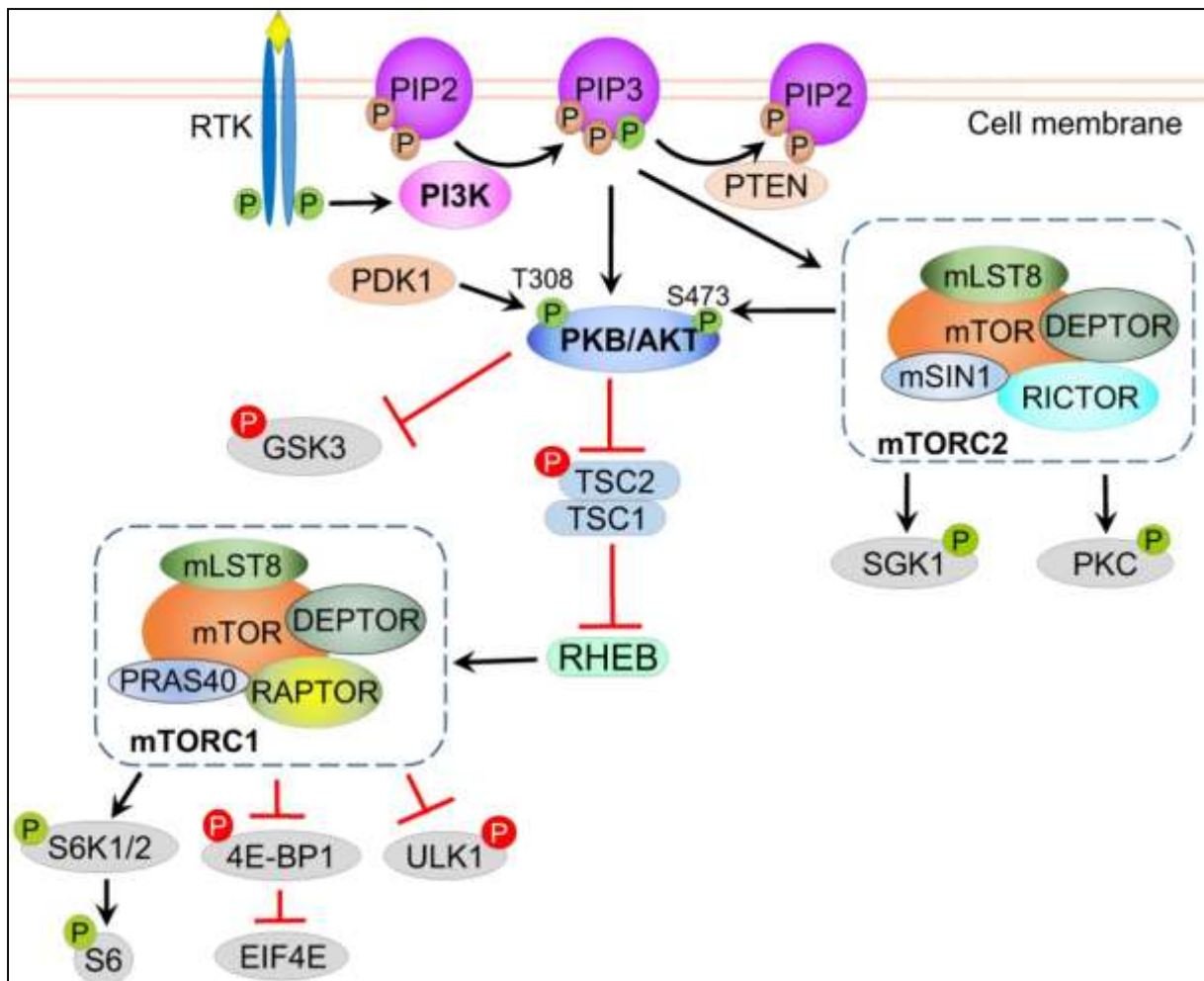


Figure 23 : Signalisation de la voie PI3K et ses principaux effecteurs (Yu et Cui. 2016)

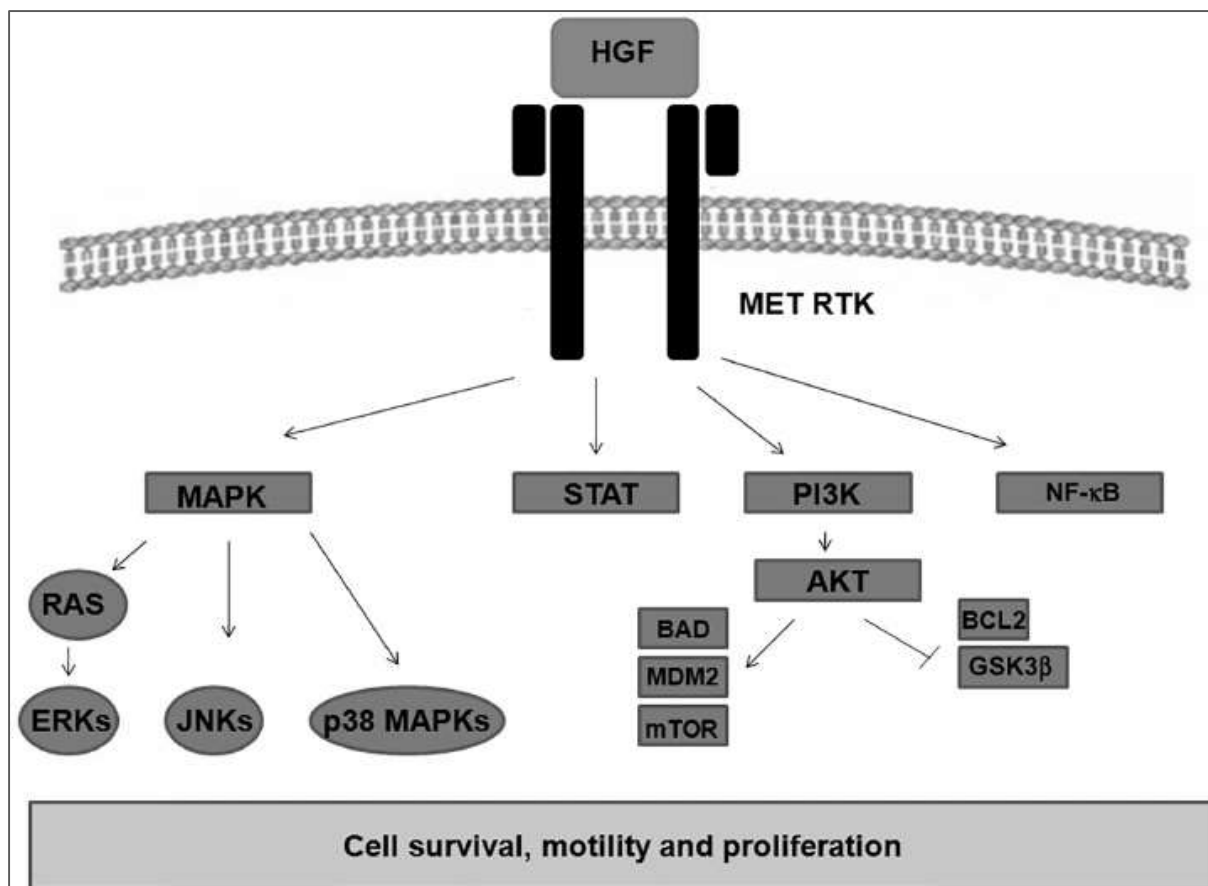
Au niveau pro-métastatique, la voie PI3K/Akt/mTOR est impliquée dans la motilité et l'invasion, la survie, la prolifération et l'angiogénèse. La kinase mTORC1 va phosphoryler à la fois la kinase S6 en la rendant active, avec un effet sur la survie, et la protéine 4E-BP1, qui va se décomplexer de la protéine EIF4E et permettre l'initiation de la traduction des ARNm. Ainsi, l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR augmente la synthèse de protéines qui remodelent la matrice comme les MMPs et l'uPA, mais également l'HIF-1 $\alpha$  (« hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  ») et ainsi l'expression de VEGF et donc l'angiogénèse, paramètre majeur de l'intravasation des cellules cancéreuses invasives. mTORC2 régule quant à elle le cytosquelette d'actine et la motilité cellulaire en activant des protéines d'adhésion comme FAK. Récemment, l'équipe de Kutateladze a montré que l'inhibition concomitante de BRD4 (« Bromodomain-containing protein 4 ») et de la voie PI3K, deux effecteurs de l'oncogène MYC, permettait une réduction drastique de la croissance tumorale et des métastases (Andrews et al. 2017). Enfin, Li Chew et ses collaborateurs ont étudié la phosphatase INPP4B (Inositol polyphosphate-4-phosphatase),

une protéine antagoniste de la voie PI3K/Akt qui catalyse la transformation du PIP2 en PIP3. Ils ont montré que la perte de INPP4B dans un modèle génétique murin provoquait l'apparition de métastases par augmentation de l'activation d'Akt (Chew et al. 2015).

### c) HGF/c-MET

Dans des conditions physiologiques normales, le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) se lie au récepteur tyrosine kinase c-MET (« mesenchymal epithelial transition »), ce qui active en retour de multiples voies de signalisation qui contrôlent l'embryogenèse, la cicatrisation et la régénération tissulaire. Dans un contexte tumoral, une activation exacerbée de cette voie favorise la croissance et la migration des cellules cancéreuse, le maintien de sous populations de cellules souches cancéreuses, ainsi que l'angiogénèse.

La fixation du ligand HGF au récepteur entraîne la dimérisation stable de deux molécules de c-MET, et une activation de son domaine intracellulaire *via* une trans-phosphorylation de deux résidus tyrosine. Ces deux tyrosines forment un point de fixation essentiel à la signalisation c-MET en permettant sa liaison à de multiples substrats. Ces liaisons entraînent une activation de multiples voies de signalisation (PI3K/Akt, MAPK, STAT3) et protéines (NF-κB, FAK), responsables de l'effet de la voie HGF/c-MET (Garajová et al. 2015) (Figure 24). La suractivation de la voie c-MET peut être due à une augmentation de l'expression de HGF ou de c-MET, mais également à des mutations de c-MET, voire à d'autres voies de phosphorylation de c-MET. EN 2016, Fan et ses collaborateurs ont mis en évidence un mécanisme ligand indépendant d'activation de c-MET, par le « nonreceptor tyrosine kinase feline sarcoma-related » (FER), capable de phosphoryler MET sur la tyrosine 1349 et d'activer l'axe RAC1/PAK1 et la voie de signalisation ERK, en favorisant le développement de métastases dans le cancer de l'ovaire (Fan et al. 2016).



**Figure 24 : Signalisation de la voie HGF/MET et ses effecteurs (Garajová et al. 2015)**

Les travaux de Lorenzato et ses collaborateurs ont montré que les mutations de c-MET étaient rares dans les tumeurs primaires, mais souvent retrouvées au niveau des sites métastatiques, ce qui suggère que son rôle est d'avantage de permettre la progression et l'invasion des cellules cancéreuses plutôt que d'initier la tumorigenèse (Lorenzato et al. 2002). L'effet pro-métastatique de l'activation de c-MET et des voies en aval passe par l'activation de la voie PI3K et de FAK, qui favorise l'EMT, la prolifération et donc l'invasion locale. L'intravasation est également améliorée par l'augmentation de la néoangiogénèse par l'activation des voies STAT3, PI3K et RAS, et également par la régulation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  régulée par MET dans les tissus hypoxiques. Dans le PDAC, l'équipe de Apte a mis en évidence une approche thérapeutique consistant en l'inhibition de l'HGF sécrété par les CAFs par un anticorps neutralisant. Cette inhibition induisait une réduction marquée de l'angiogénèse et de l'apparition de métastases dans des modèles de co-greffes orthotopiques (Pothula et al. 2016).



#### d) Wnt/B-Caténine

La voie Wnt joue un rôle important dans la régulation de la prolifération et de la polarité cellulaire. En l'absence du ligand Wnt, les niveaux intracellulaires de  $\beta$ -caténine sont régulés par un complexe multiprotéique. Ce complexe se compose de la protéine de structure Axin, de la protéine suppresseur de tumeur APC (adenomatous polyposis coli), de la GSK3 $\beta$  (« glycogen synthase kinase-3 $\beta$  ») et de la CK-1 (« casein kinase-1 »). En liant et en phosphorylant la  $\beta$ -caténine cytoplasmique, le complexe entraîne sa dégradation par la protéasome, et empêche la translocation de la  $\beta$ -caténine au noyau où elle joue son rôle de co-activateur transcriptionnel. Sans  $\beta$ -caténine, les facteurs de transcription TCF/LEF (« DNA-bound T-cell factor/Lymphoid enhancer factor ») répriment l'expression des gènes cibles de la voie Wnt.

En revanche, lorsque les ligands Wnt se lient au récepteur « Frizzled » et à son co-récepteur LRP5/6 (« low-density Lipoprotein receptor related protein »), le complexe de destruction est inhibé, ce qui entraîne une accumulation cytoplasmique de  $\beta$ -caténine. Elle peut ainsi pénétrer dans le compartiment nucléaire, se lier aux protéines TCF/LEF et permet ainsi l'expression des gènes cibles de Wnt (Figure 25).

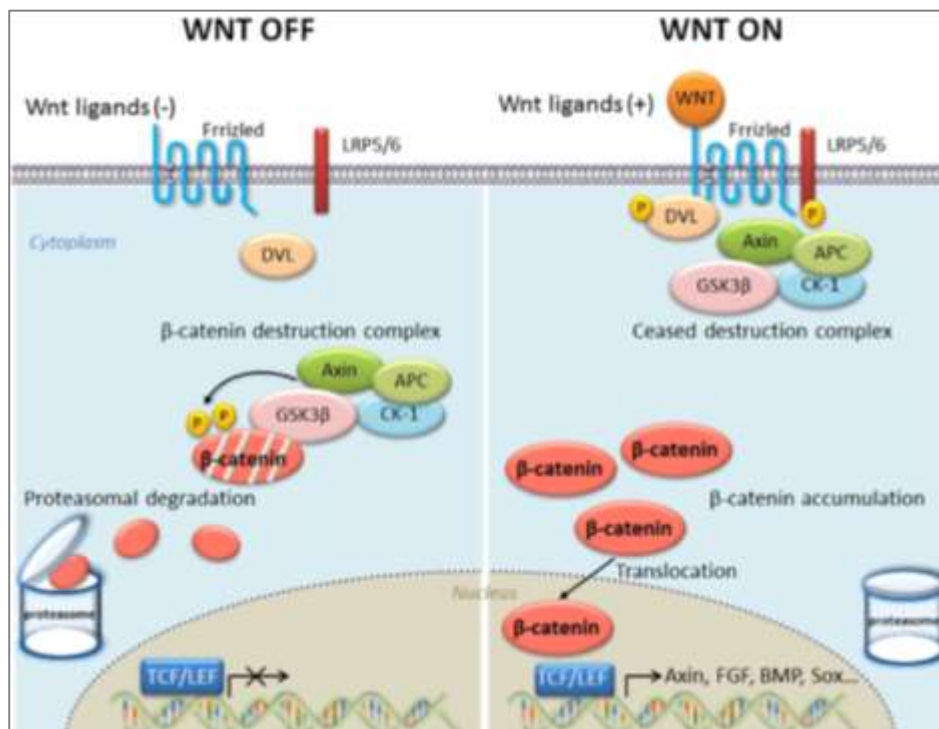


Figure 25 : Signalisation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine avec ou sans de ligand (Ota et al. 2016)

Une étude de 2012 a utilisé le séquençage ARN des cellules tumorales circulantes pour mettre en évidence une implication de la voie Wnt dans le développement de métastases. Ils ont montré que l'expression de WNT2 dans les CTC supprime l'anoïkis, et favorise la formation de sphère et la capacité métastatique. Cet effet était corrélé à une augmentation de la fibronectine (Yu et al. 2012). L'activation de la voie Wnt favorise aussi le développement de métastases en induisant l'EMT *via* la surexpression de l'Axin2, protéine du complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine. Cette surexpression entraîne la stabilisation du facteur de transcription Snail, capable de réprimer l'expression de l'E-cadhérine. De plus, la protéine Slug est un gène cible de la voie Wnt, qui inhibe également la transcription de l'E-cadhérine. Cette diminution de l'E-cadhérine induit l'expression d'autres facteurs de transcription comme Twist et Zeb1 par la cellule cancéreuse, ce qui favorise la métastase en augmentant le phénotype mésenchymateux des cellules cancéreuses, et donc leur capacité d'invasion (Yook et al. 2006). Les protéines cycline-D1 et c-myc sont surexprimées après activation de la voie Wnt à la fois dans les cellules cancéreuses et endothéliales, et stimulent leur prolifération (Li et al. 2005). En 2015, l'équipe de Nam montre que l'inhibition de la voie Wnt en utilisant des shARN supprime les métastases dans un modèle de cancer du sein, et que cette suppression passe par une réduction du phénotype souche des cellules cancéreuses (Jang et al. 2015). Plus récemment, Niu et ses collaborateurs ont étudié la pyrophosphatase inorganique (PPA1), importante dans la régulation des niveaux de pyrophosphate cellulaire et surexprimée dans plusieurs cancers solides. L'extinction de PPA1 a inhibé dephosphorylation et la translocation de la  $\beta$ -caténine, et ainsi l'EMT et le développement de métastases à la fois *in vitro* et *in vivo* (Niu et al. 2017). De la même manière, Cai et ses collaborateurs ont montré que le microARN-128-3p, présent à haut niveau dans les cellules chimiorésistantes, induit des propriétés mésenchymale et souche dans des cellules de cancer du poumon, en réduisant l'expression de plusieurs inhibiteurs de la voie Wnt (Cai et al. 2017).

Enfin, la protéine S100A4 est également une cible transcriptionnelle de la voie Wnt, et des niveaux élevés de S100A4 sont corrélés avec une mauvaise survie, des tumeurs agressives et la formation de métastases. Au niveau extracellulaire, elle est capable d'interagir avec les protéoglycanes de la matrice et favoriser l'invasion. De plus, elle induit l'expression de la protéine sérum amyloïde A (SAA), qui induit elle-même l'expression de RANTES, G-CSF et de MMPs. L'expression de S100A4 est également associée à une angiogenèse exacerbée et donc une plus grande densité vasculaire dans les tumeurs. Orre et ses collaborateurs ont montré

que la protéine S100A4 interagissait avec le suppresseur de tumeur p53 et induisait sa dégradation (Orre et al. 2013). Cette protéine apparaît donc comme une cible thérapeutique intéressante.

#### e) JAK/STAT

La voie « Janus kinase/signal transducers and activators of transcription » est capable de transduire une multitude de signaux nécessaires au développement et à l'homéostasie, par une cascade depuis un signal extracellulaire jusqu'à une réponse transcriptionnelle. Chez les mammifères, elle est le principal mécanisme de signalisation pour de nombreuses cytokines et facteurs de croissance, et permet la stimulation de la prolifération de la différenciation, de la migration cellulaire. Les dérèglements de cette voie, réduction ou exacerbation, sont responsables d'un large spectre de pathologies. Dans un contexte de cancer, l'activation de STAT3 est maintenue par la stimulation excessive par des cytokines et des facteurs de croissance, produits à la fois par les cellules cancéreuses elles-mêmes (stimulation autocrine) et par les cellules du microenvironnement (stimulation paracrine). De plus, la voie va s'auto-entretenir en stimulant la transcription d'ARNm codant pour des cytokines activatrices de la voie (IL-6, IL-10, EGF). L'équipe de Braithwaite a également montré que l'isoforme  $\Delta 133p53$  de p53, induit dans un contexte cancéreux, provoquait une augmentation de l'expression de l'IL-6, qui en se liant à son récepteur activait la voie JAK/STAT et provoquait des modifications du cytosquelette et des capacités d'invasion et de migration de cellules de cancer colorectal (Campbell et al. 2018).

Au niveau mécanistique, la liaison d'un ligand va induire la multimérisation de sous-unités de récepteurs. Selon le ligand, ces sous-unités peuvent être des homo- (erythropoïétine, hormone de croissance, ...) ou des hétéro-dimères (interférons, interleukines). Après la fixation du ligand, les domaines cytoplasmiques des sous-unités vont s'associer, et la proximité de deux tyrosines kinases JAK (une à activité régulatrice et une à activité tyrosine kinase) va entraîner leur activation par transphosphorylation. Cette activation va induire la phosphorylation de nombreuses cibles, dont les protéines STATs, leur substrat majeur. Ces STATs sont des facteurs de transcription latents au niveau cytoplasmique, qui vont être activés par les JAKs qui phosphorylent une tyrosine à leur extrémité C-terminale. Cette tyrosine

phosphorylée va induire la dimérisation de deux protéines STAT et leur entrée dans le compartiment nucléaire, *via* un mécanisme dépendant de l'importine  $\alpha 5$  et de la voie d'import nucléaire Ran. Une fois au noyau, les dimères de STATs lient des séquences spécifiques pour activer ou réprimer la transcription de gènes cibles (Figure 26).

Les effets biologiques de l'activation de la voie JAK/STAT sont également dus aux interactions avec plusieurs autres voies de signalisation. Particulièrement, la relation avec la voie RAS/MAPK est très complexe, avec des interactions à différents niveaux. Les JAKs activées peuvent phosphoryler des tyrosines sur leurs récepteurs associés, et ces tyrosines vont servir de point d'ancrage pour les domaines SH2 provenant d'autres voies de signalisation. Une de celles-ci peut être la protéine SHP-2 (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11) qui va recruter GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) et stimuler la voie RAS. De même, la phosphorylation par JAK de l'IRS (insulin receptor substrate) et de p85, sous unité régulatrice de la PI3K, va activer la cette voie PI3K/Akt. De manière réciproque, la fixation de ligands sur des récepteurs tyrosine kinase, comme l'EGFR ou le PDGFR va provoquer une phosphorylation de STAT indépendante de JAK, par l'intermédiaire de la kinase Src. Les MAPK sont également capables de phosphoryler spécifiquement une sérine proche du domaine C-terminal des STATs, ce qui va largement augmenter l'activation transcriptionnelle.

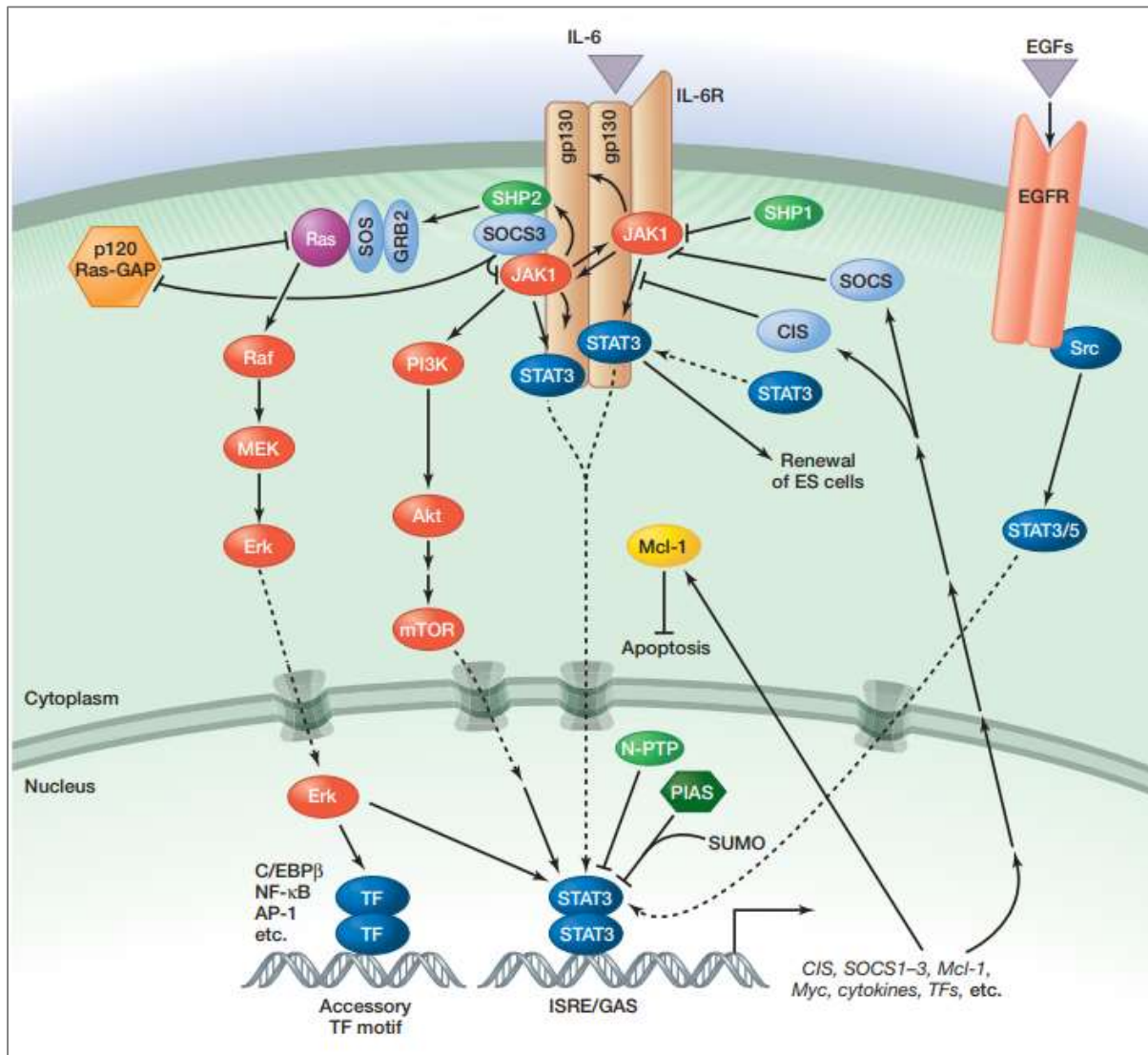


Figure 26 : Signalisation de la voie JAK/STAT et ses effecteurs (Harrison 2012)

Au niveau métastatique, la voie JAK/STAT régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la cascade d'invasion-métastases. Particulièrement, elle stimule l'expression de métalloprotéases (MMP2, MMP9) et du facteur de transcription Twist, impliqués dans l'étape d'invasion locale (Xie et al. 2006 ; Banerjee et Resat 2016). L'activation de STAT3 stimule aussi l'angiogenèse avec l'expression de VEGF et du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ , et favorise ainsi la synthèse de néo-vaisseaux et donc l'intravasation (Niu et al. 2002). Enfin, elle favorise l'évasion immunitaire en orientant la réponse immunitaire vers une réponse pro-tumorale, particulièrement *via* un dialogue réciproque avec les cellules myéloïdes immunosuppressives et les macrophages (Rébé et al. 2013).

Le processus de métastases est très complexe, et implique une grande variété de protéines et de voies de signalisation. Nous avons ici essayé de décrire les voies les plus importantes de cette cascade, largement étudiées, et qu'il est indispensable de décrypter pour mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cependant, de nombreux autres régulateurs et acteurs de la cascade d'invasion-métastases sont connus, notamment les différents composants du microenvironnement tumoral. Dans la partie suivante, nous étudierons le rôle de ce microenvironnement dans le processus métastatique.

### 3) Rôle pro-métastatique du microenvironnement tumoral

Le rôle majeur du microenvironnement tumoral dans la progression tumorale est aujourd'hui largement reconnu. Ce microenvironnement est impliqué dans chaque étape de la cascade d'invasion-métastases. Selon sa composition, le microenvironnement peut jouer un rôle de pression de sélection, ou promouvoir la progression tumorale en protégeant les cellules cancéreuses contre les défenses immunitaires ou les contraintes physiques. Le développement de la maladie métastatique est donc lié à la coévolution des cellules cancéreuses et du microenvironnement.

#### a) Interactions sur le site primaire

La modification des cellules cancéreuses susceptibles de métastaser se fait au niveau de la tumeur primaire, probablement au niveau des fronts d'invasion, à l'interface entre cellules tumorales et stroma. Là, les cellules sont le plus exposées à la sélection induite par le microenvironnement, car ce front est enrichi en différents types cellulaires du stroma, comme les CAFs ou les cellules immunitaires pro-tumorales. Les signaux émis par ces cellules facilitent l'invasion tumorale et peuvent aider à la sélection des sous-populations de cellules cancéreuses à plus haute capacité métastatiques. Une étude a montré que des cellules cancéreuses isolées des fronts d'invasion de tumeurs pancréatiques contiennent une sous-population exprimant les marqueurs CD133 et CXCR4. Ces cellules présentent des fortes

capacités de migration et sont capables de former des métastases après injection dans un modèle murin (Hermann et al. 2007).

Au sein de la tumeur primaire, les CAFs et les composants de la matrice extracellulaire sont largement impliqués dans l'invasion locale. Dès 2007, Gaggioli et ses collaborateurs ont montré sur des modèles d'invasion de co-cultures de fibroblastes et de cellules cancéreuses que les fibroblastes généraient des rails d'invasion au sein de la matrice, et que les cellules cancéreuses suivaient ces rails. Le remodelage de la matrice par les CAFs est dépendant des intégrines  $\alpha 3$  et  $\alpha 5$ , et de la régulation de chaîne légère de la myosine (MLC) par la protéine Rho (Gaggioli et al. 2007). Grasset et ses collaborateurs ont montré récemment que la matrice activait mécaniquement la voie de l'EGF dans les cellules cancéreuses (Grasset et al. 2018). Récemment, deux études ont mis en évidence que les CAFs sont capables de produire de la fibronectine, et d'aligner les fibres de fibronectine pour orienter la migration des cellules cancéreuses. Cet alignement se fait en augmentant les forces de tractions et de contractions par l'intermédiaire de la myosine non musculaire II et du PDGFR $\alpha$ , et en transmettant ces forces à la fibronectine *via* les intégrines  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 3$ . En l'absence de fibronectine, les CAFs sont toujours capables de contracter la matrice, mais plus d'induire l'invasion des cellules cancéreuses (Erdogan et al. 2017 ; Attieh et al. 2017).

L'augmentation des capacités d'invasion et de migration des cellules cancéreuses se fait principalement par l'EMT, et cette transition est induite par le microenvironnement, *via* la sécrétion de différents facteurs. Notamment, les MDCs ont été montrées comme promotrices de l'EMT par l'activation des voies de signalisation TGF $\beta$ , EGF, et HGF (Toh et al. 2011). Les TAMs induisent également l'EMT *via* la production de TGF $\beta$ , et l'induction de la voie Wnt (Linde et al. 2018). Les TAMs facilitent aussi l'invasion locale en sécrétant des MMPs et par l'activation du système protéolytique activateur du plasminogène de type urokinase (uPA). Enfin, les CAFs ont largement été décrits comme inducteurs de l'EMT dans différents cancers, *via* la sécrétion de nombreux facteurs solubles (Giannoni et al. 2010) ou l'IL-6 (Moatassim-Billah et al. 2016 ; Wu et al. 2017). De plus, il a été montré que l'EMT, en plus de faciliter l'invasion et la migration des cellules cancéreuses, leur permettait d'acquérir des propriétés de cellules souches (Mani et al. 2008). Ce phénomène est souligné par le fait que de nombreuses CTC expriment à la fois des marqueurs de l'EMT et des marqueurs de cellules souches (Aktas et al. 2009). Ainsi, les TAMs sont également capables d'induire le phénotype souche des cellules cancéreuses au niveau des fronts d'invasion, *via* l'EMT induite par la

sécrétion de TGF $\beta$  (Fan et al. 2014), mais aussi en activant la voie JAK/STAT dans les cellules cancéreuses (Mitchem et al. 2013). Il a récemment été montré dans un modèle ex-vivo que les CAFs facilitent l'invasion des cellules cancéreuses du côlon d'une manière MMPs-indépendante, probablement en exerçant des contraintes physiques pour étirer la membrane basale et former des espaces par lesquels les cellules cancéreuses peuvent passer (Glentis et al. 2017).

Les TAMs sont également des cellules clés dans le contrôle de l'angiogenèse au sein de la tumeur, particulièrement *via* la sécrétion de VEGF-A. En effet, le niveau de VEGF-A est corrélé à la densité des TAMs dans différents types de cancer (Valkovic et al. 2002). En plus d'être sécrété par les TAMs, le VEGF-A peut être retenu dans la matrice extracellulaire, et sa forme soluble peut être relâchée lors de la dégradation de la matrice. Les TAMs et les CAFs peuvent largement contribuer à ce processus, car ils sont les sources majoritaires de MMPs. Particulièrement, l'équipe de Nakamura a montré que des cultures d'organoïdes co-cultivés avec des CAFs envahissaient d'avantage la matrice de collagène environnante que les organoïdes seuls. Des contacts directs ont été identifiés entre les cellules des organoïdes et les CAFs, et la destruction de la membrane basale impliquait la MMP2 qui se lie à la MT1MMP (membrane type-1 MMP) (Koikawa et al. 2018). Enfin, les travaux de l'équipe de Ganju ont montré récemment que le CXCL12 sécrété par les CAFs augmentait la perméabilité des vaisseaux en recrutant des précurseurs endothéliaux et en diminuant les adhérences et les jonctions serrées endothéliales (Ahirwar et al. 2018). La rigidité de la matrice au sein de la tumeur primaire induit aussi l'expression de la protéine CCN1 par les cellules endothéliales, et que cette protéine favorise la translocation nucléaire et la signalisation de la  $\beta$ -caténine. Cette voie augmente les niveaux de N-cadhérine à la surface des cellules endothéliales, favorisant ainsi les interactions entre endothélium et cellules cancéreuses invasives (Reid et al. 2017). En favorisant ainsi l'angiogenèse au sein de la tumeur primaire, les cellules du microenvironnement facilitent l'intravasation des cellules cancéreuses invasives.

Au niveau de la tumeur primaire, les cellules stromales peuvent également jouer un rôle dans la sélection de clones « éduqués » pour un organe à distance. En effet, les signaux émis par le microenvironnement au sein de la tumeur primaire peuvent être proche de ceux retrouvés dans l'organe cible, et peuvent ainsi sélectionner les sous-populations de cellules cancéreuses les plus adaptées à cet environnement. Par exemple, les CAFs des tumeurs primaires de cancers du sein secrètent du CXCL12 et de l'IGF-1, cytokines fortement exprimées



dans le stroma osseux. Cette pré-sélection favorise les cellules cancéreuses qui répondent à ces signaux de survie, notamment avec une forte activité des récepteurs Src, et ainsi la survie des cellules cancéreuses dans le microenvironnement osseux (Zhang et al. 2013).

## b) Microenvironnement au site métastatique

Le microenvironnement mis en place au niveau des sites distants, s'il est moins décrit que celui de la tumeur primaire, joue également un rôle majeur sur le développement des lésions métastatiques, en favorisant l'arrêt à distance, l'extravasation, et la colonisation des cellules cancéreuses invasives.

### i) Formation de la niche pré-métastatique

Avant même l'arrivée des cellules cancéreuses dans un organe secondaire, le stroma de ces organes peut être modifié par des signaux provenant de la tumeur primaire. Ce microenvironnement modifié est décrit comme une pré-niche métastatique, concept développé par Psaila et Lyden en 2009 (Figure 27). Des facteurs solubles provenant de la tumeur, comme le VEGF-A et le PlGF, vont favoriser le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC) et leur accumulation dans l'organe cible. Ce recrutement est associé à un remodelage important de la matrice extracellulaire, avec une surexpression de la fibronectine et l'induction de MMP9. Par exemple, la LOXL2 sécrétée au niveau de la tumeur primaire, va circuler jusqu'à la pré-niche où elle va favoriser la production de fibronectine, l'expression de MMP9 et de CXCL12 et le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC) (Wu et al. 2018). Au niveau hépatique, l'équipe de Schmid a récemment montré que des macrophages étaient recrutés précocement, et qu'ils étaient capables d'activer les cellules étoilées hépatiques (HSCs) en myofibroblastes, notamment *via* la granuline. Ces HSCs activées vont en retour sécréter des protéines matricielles comme la périostine, et ainsi mettre en place un environnement fibrotique propice au développement métastatique (Nielsen et al. 2016)

Les protéines inflammatoires S100A8/9 sont également surexprimées, et stimulent l'expression de la sérum amyloïde A3 (SAA3), qui va à son tour recruter des cellules myéloïdes

CD11b-positives et des protéines du remodelage matriciel (Hiratsuka et al. 2008). Des travaux récents ont également montré que les cellules de cancer colorectal sécrètent le VEGF-A, qui va stimuler la production de CXCL1 par les macrophages au niveau de la tumeur primaire. L'élévation du niveau de CXCL1 au niveau hépatique va induire le recrutement de MDSC CXCR2-positives dans la pré-niche (Wang et al. 2017).

Récemment, l'équipe de Karin de Visser a également montré l'implication de neutrophiles polarisés particuliers dans les tumeurs mammaires. Dans ces tumeurs, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  produisent de l'IL-17, qui va induire l'expansion des neutrophiles et leur polarisation vers un phénotype immunosuppresseur (inhibition de la réponse T CD8 cytotoxique). Ces neutrophiles sont aussi capables d'aider à la mise en place de la pré-niche métastatique en sécrétant des molécules inflammatoires comme les S100A8 et S100A9 (Coffelt et al. 2015). Une autre étude de 2015 a mis en évidence le rôle majeur des neutrophiles dans le développement du microenvironnement pré-métastatique pulmonaire dans des modèles de cancers du sein. Ils démontrent que les neutrophiles sont largement impliqués dans l'initiation des métastases, notamment *via* la production de leucotriènes, des lipides impliqués entre autres dans le recrutement par chimiotactisme de différentes sous-populations immunitaires sur les sites d'inflammation. L'inhibition génétique ou pharmacologique de la protéine Alox5 (« leukotriene-generating enzyme arachidonate 5-lipoxygenase ») supprime l'activité des neutrophiles et réduit l'apparition de métastases (Wculek et Malanchi 2015).

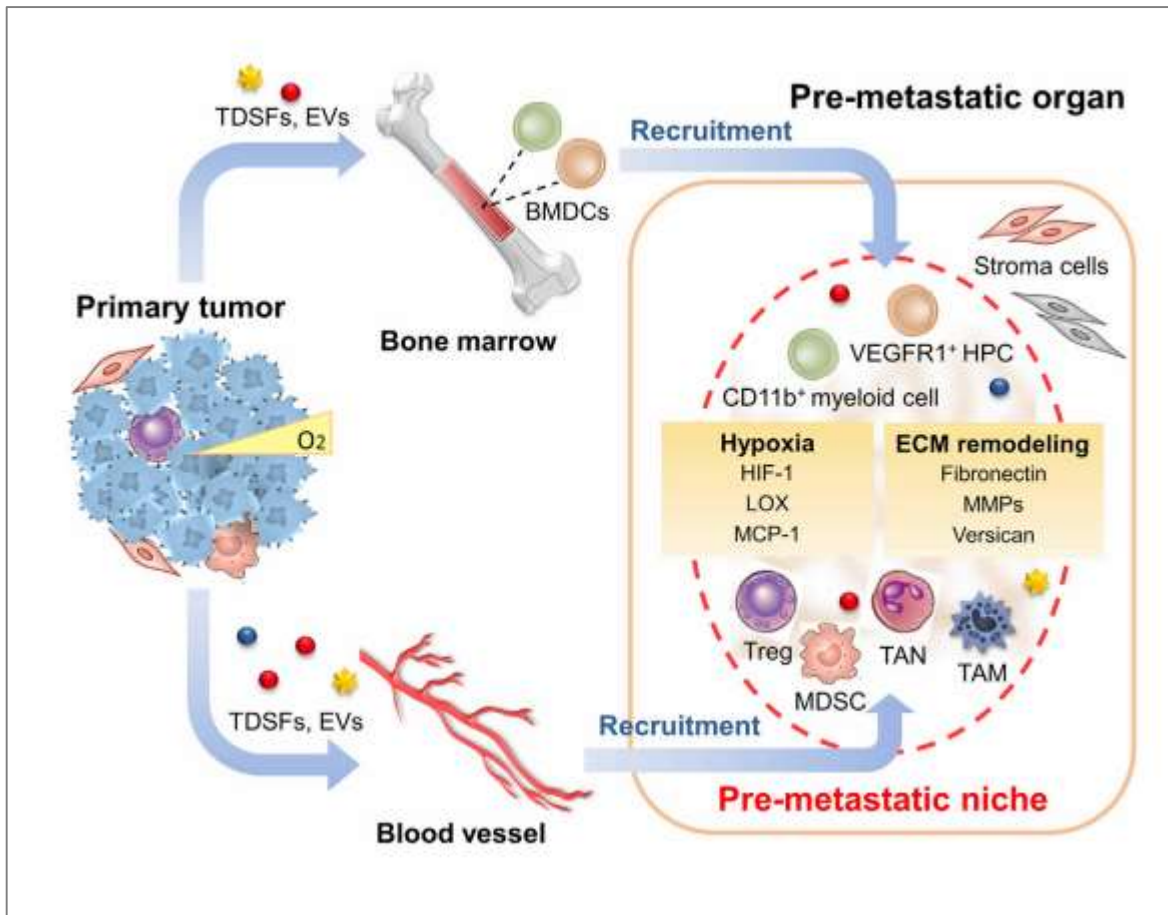


Figure 27 : Induction et mise en place de la niche pré-métastatique (Liu et Cao 2016)

Les exosomes sont également impliqués dans le développement de la pré-niche, notamment en délivrant les récepteurs c-Met aux BMDC de la pré-niche (Peinado et al. 2012). De même, les cellules de cancer de l'estomac produisent des exosomes contenant de l'EGFR, qui va être délivré au niveau du foie et intégré à la membrane des cellules stromales hépatiques. Cet EGFR va ensuite activer la sécrétion de HGF, qui va pouvoir se fixer de manière paracrine aux récepteurs c-Met des cellules cancéreuses (Zhang et al. 2017). Les exosomes produits par les cellules de PDAC contiennent des hauts niveaux de MIF (« macrophages migration inhibitory factor ») et vont stimuler le recrutement de macrophages. De plus, ils vont stimuler la sécrétion de TGF $\beta$  par les macrophages résidents du foie, et induire la production de fibronectine par les cellules étoilées hépatiques (Costa-Silva et al. 2015). Une autre étude publiée par le même groupe montre que les exosomes provenant des cellules tumorales sont captés par des cellules particulières des tissus cibles de métastases (fibroblastes dans le poumon, cellules de Kupffer dans le foie, cellules endothéliales dans le cerveau) et préparent la pré-niche métastatique. L'analyse protéomique de ces exosomes

montre des signatures distinctes d'intégrines, avec par exemple les intégrines exosomales  $\alpha 6\beta 4$  et  $\alpha 6\beta 1$  associées à des métastases pulmonaires, et les intégrines  $\alpha v\beta 5$  à des métastases hépatiques. L'internalisation de l'intégrine de l'exosome entraîne la phosphorylation de Src et l'expression du gène S100 pro-inflammatoire (Hoshino et al. 2015)

ii) Environnement inflammatoire et immunosuppresseur

Les cellules cancéreuses disséminées sont capables de recruter différents types de cellules immunitaires sur le site métastatique, notamment les MDSC et les TAMs. Ces cellules vont établir des boucles paracrine et stimuler la prolifération et la survie des cellules invasives. Par exemple, les DTC de cancer du sein qui surexpriment CXCL1 vont attirer les MDSC, qui vont favoriser le développement des métastases en sécrétant les protéines S100 A8 et 9 (Acharyya et al. 2012). Les MDSC sont également capables de bloquer la réponse immunitaire anti-tumorale ; elles répriment la réponse des lymphocytes CD4 et CD8 *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène (ROS et NOS). Les TAMs qui expriment le récepteur CCR2 sont recrutés dans les sites métastatiques *via* la sécrétion du ligand CCL2 par le stroma et les cellules cancéreuses. Ils vont modifier l'environnement en sécrétant du VEGF, qui va favoriser la néo-vascularisation, et des protéases qui permettent le remodelage de la matrice (Qian et al. 2011). Les macrophages recrutés au niveau métastatique vont aussi contribuer à l'exclusion des LTs CD8+, notamment *via* la sécrétion de granuline en réponse au CSF-1 et à la mise en place d'une réaction fibrotique, mais aussi en rendant les cellules tumorales insensibles aux bloqueurs de checkpoints immunitaires (Quaranta et al. 2018).

iii) Recrutement de CAFs et altérations de la matrice extracellulaire

L'activation de fibroblastes quiescents en CAFs est cruciale pour le développement de métastases, de par leur considérable capacité de sécrétions. Comme dans la tumeur primaire, les cellules cancéreuses stimulent l'activation des fibroblastes en CAFs, notamment *via* la sécrétion de TGF $\beta$  et de facteurs de croissance (FGF, PDGF). Entre autres, ces CAFs vont sécréter de l'IL-11 qui déclenche l'activation de la voie STAT3, qui va favoriser la survie et la prolifération des cellules cancéreuses invasives (Calon et al. 2012). Ils sécrètent aussi de nombreux facteurs de croissance, qui vont stimuler l'angiogenèse (VEGF), le recrutement de population immunitaire pro-tumorale (IL-6, CSF-1, SDF-1, CCL2), et la croissance tumorale

(EGF, HGF, CXCL12) (Orimo et al. 2005). Les CAFs sécrètent également différentes protéines de la matrice extracellulaire nécessaires au remodelage protumoral et à la colonisation métastatique. La matrice se compose d'une grande densité de collagènes, fibronectine, hyaluronane, et de protéines matricellulaires (periostine, tenascine, SPARC). Les protéines matricellulaires comme la périostine sont capables d'activer différentes voies de signalisation (Akt/mTOR, Wnt) et favoriser la colonisation métastatique et l'angiogenèse (Bao et al. 2004).

#### iv) Remodelage vasculaire

La vascularisation doit être suffisante pour permettre la croissance des lésions métastatiques, et les cellules tumorales doivent donc activer les cellules endothéliales pour stimuler la formation de néo-vaisseaux. Les autres cellules du microenvironnement métastatique (macrophages, CAFs), stimulent également l'angiogenèse et la lymphangiogenèse, entre autre *via* la production de VEGF (Mielgo et Schmid 2013).

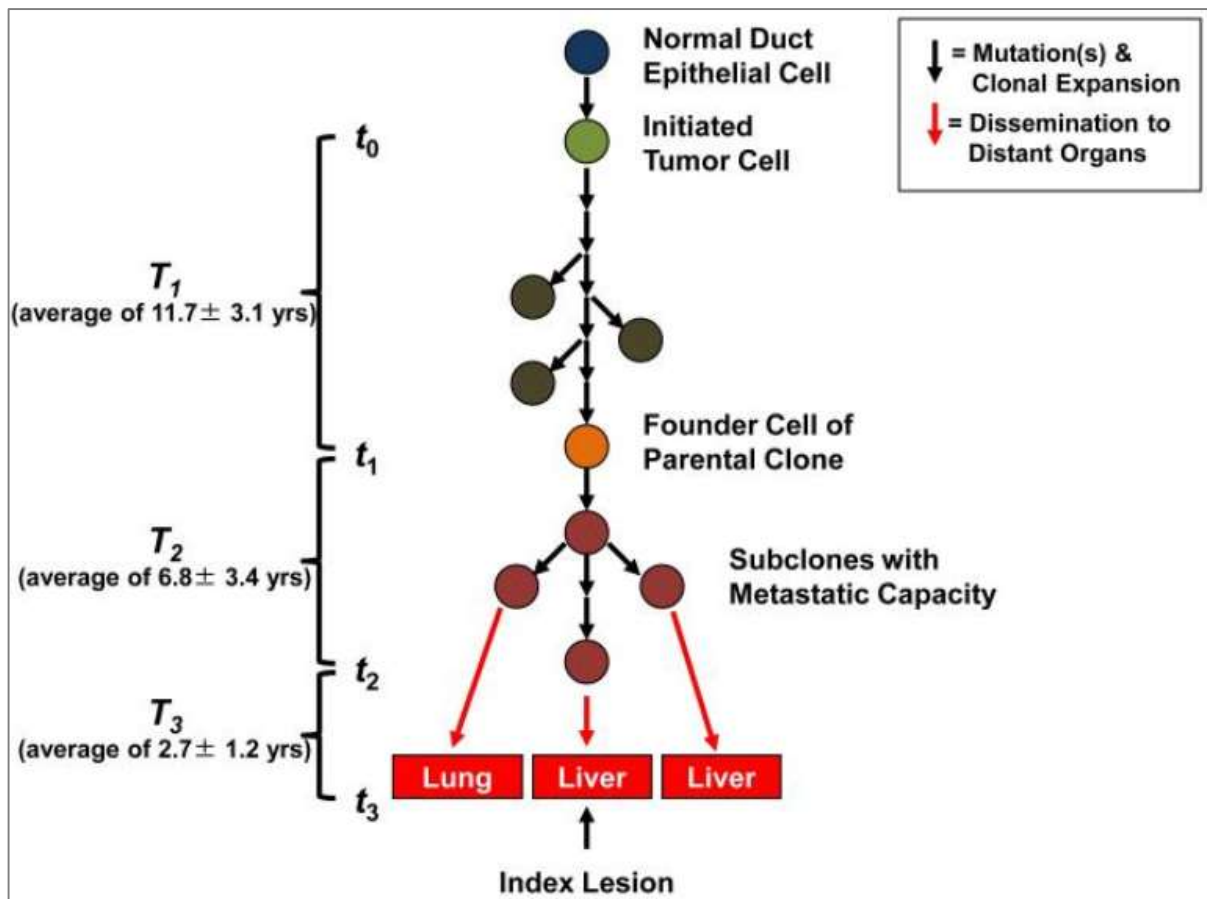
## 4) Métastases et PDAC

Le pronostic dramatique du PDAC est principalement dû au fait que des métastases sont fréquemment détectées au moment du diagnostic, la présence de ces métastases excluant la mise en place d'un traitement chirurgical d'exérèse de la tumeur primaire. Plus de 80% des patients sont en effet diagnostiqués à un stade avancé de la maladie, caractérisé par une infiltration des ganglions lymphatiques ainsi que la présence de métastases dans deux ou trois organes à distance, principalement le foie, le poumon et le péritoine. La compréhension de la biologie des métastases est donc cruciale pour le développement de thérapies efficaces. Une des questions primordiales à laquelle il faut répondre dans le cas du PDAC est de savoir si le caractère très agressif et récurrent de la maladie métastatique est dû au diagnostic très tardif, et donc à une longue préparation du développement des métastases, ou plutôt si les cellules cancéreuses pancréatiques sont capables de métastaser à des stades très précoces de la maladie ?

## a) Altérations génétiques

Le spectre de mutations du PDAC a largement été caractérisé pendant les dernières années, et les quatre mutations majeures (*KRAS*, *P16INK4A*, *TP53* et *SMAD4*) sont parfaitement décrites. Dans les dernières années, les techniques de séquençage de nouvelle-génération à haut débit ont permis d'identifier de nombreux autres gènes moins fréquemment mutés, mais pouvant être impliqués dans la tumorigenèse et la développement de métastases pancréatiques.

Dans ce contexte, les travaux de Yachida et ses collaborateurs publiés en 2010, ont permis de comparer la relation entre le statut mutationnel dans les tumeurs primaires et les métastases associées chez des patients atteints de PDAC. Ils ont mis en évidence que les clones qui produisent des métastases sont des clones évolués de ceux présents dans les tumeurs primaires, ayant acquis des mutations complémentaires. En effet, ils ont identifié deux catégories de mutations : les mutations « fondatrices », en moyenne 64%, qui sont retrouvées dans tous les échantillons d'un patient donné, et les mutations « progressives », présentes dans au moins un des échantillons provenant de métastases du patient, mais absentes du clone parental. Ces résultats suggèrent que la majorité des mutations somatiques des PDAC se produisent avant le développement de métastases. Il ressortait également de cette étude que les PDAC les plus métastatiques de leur cohorte était ceux présentant les mutations *TP53* ou *SMAD4*. Ils ont également mis en évidence que les sous-clones présents dans la tumeur primaire représentaient des regroupements de plusieurs dizaines de millions de cellules, qui étaient spécifiquement capables de donner naissance à des métastases péritonéales, ou à distance (foie, poumon), selon leurs propriétés génétiques. Cependant, ils n'ont pas réussi à extraire une signature « métastatique » des sous-clones, mais ils ont identifié quelques gènes mutés dans les lésions métastatiques et non dans les tumeurs primaires. Certains de ces gènes codent pour des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire (*CNTN5*), la motilité (*DOCK2*), ou la phosphorylation de tyrosine (*LMTK2*) (Figure 28) (Yachida et al. 2010).



**Figure 28 : Représentation schématique de l'évolution génétique dans le PDAC**  
(Yachida et al. 2010)

De la même manière, Campbell et ses collaborateurs avaient montré que des mutations se produisaient précocement dans le développement du cancer, mais que l'instabilité génomique persiste au cours de la dissémination métastatique, avec l'apparition dans les lésions à distance de mutations nécessaires à cette dissémination et non retrouvées dans les tumeurs primaires. Les résultats indiquaient aussi une hétérogénéité entre les cellules initiatrices de métastases, et également que les arbres phylogénétiques des métastases étaient spécifiques de l'organe cible, suggérant une sélection et une adaptation des clones à un environnement particulier (Campbell et al. 2010). En 2015, les travaux de Maddipati et Stanger ont élégamment confirmé ces résultats en utilisant un modèle murin de PDAC développant spontanément des tumeurs, et dans lequel les mutations de *Kras* et de *TP53* sous le contrôle d'une recombinaison *Cre* étaient associées à l'expression aléatoire d'une couleur parmi quatre possibles (système d'étiquetage « confetti »). Les résultats montraient d'abord

que structurellement, les tumeurs étaient des agglomérats de plusieurs lésions provenant de différentes mutations initiales, et donc que les tumeurs primaires étaient bien polyclonales. Ils démontraient que les métastases provenaient de différents sous-clones de la tumeur primaire (peut-être des clones avec des propriétés différentes, capables d'agir en synergie pour favoriser le processus de métastases), mais aussi que la clonalité dans les métastases dépendaient de l'organe à distance, avec plutôt des métastases qui devenaient monoclonales dans le foie et le poumon, et qui se maintenaient dans un état poly-clonal dans le péritoine et le diaphragme. Ces résultats suggèrent également que des facteurs intrinsèques à l'organe envahi exercent une sélection sur les cellules (Maddipati et Stanger 2015).

Très récemment, l'équipe de Nowak a étudié l'hétérogénéité des métastases en séquençant 76 métastases provenant de 20 patients, incluant des PDAC. Il apparaît que sur un même patient, la large majorité des mutations « fondatrices » sont communes à toutes les métastases et que les mutations qui ne sont pas partagées entre les métastases n'ont pas ou peu de conséquences fonctionnelles. En utilisant un modèle mathématique prenant en compte les taux de croissance, la fréquence de mutation et de dissémination, les auteurs ont calculé que le clone initial de la tumeur primaire est statistiquement celui qui est le plus susceptible d'être à l'origine des métastases. Ce modèle indique aussi la probabilité d'observer une hétérogénéité entre les métastases d'un même patient augmente quand les tumeurs primaires grossissent lentement. Au contraire, des tumeurs qui métastasent plus rapidement sont moins susceptibles de conduire à une hétérogénéité inter-métastatique (Reiter et al. 2018).

Plus récemment, Reichert et ses collaborateurs ont mis en évidence que le tropisme de tumeurs primaires pour les organes à distance dépendait de l'identité épithéliale des cellules cancéreuses, et particulièrement de la caténine p120 (*p120ctn*), un régulateur de la stabilité des cadhérines. En effet, la perte d'un allèle de la *p120ctn* est suffisante pour maintenir les adhésions cellulaires médiées par l'E-cadhérine, et entraîne le développement de métastases hépatiques. En revanche, la perte des deux allèles de la *p120ctn* implique un tropisme des cellules cancéreuses pour le poumon. Il semblerait donc que pour se développer dans le foie, les cellules cancéreuses aient besoin de maintenir un phénotype plus épithélial (Reichert et al. 2018).

La compréhension de l'évolution parallèle des sous-clones au sein de la tumeur primaire de leur capacité à métastaser, ainsi que les relations phylogénétiques entre plusieurs

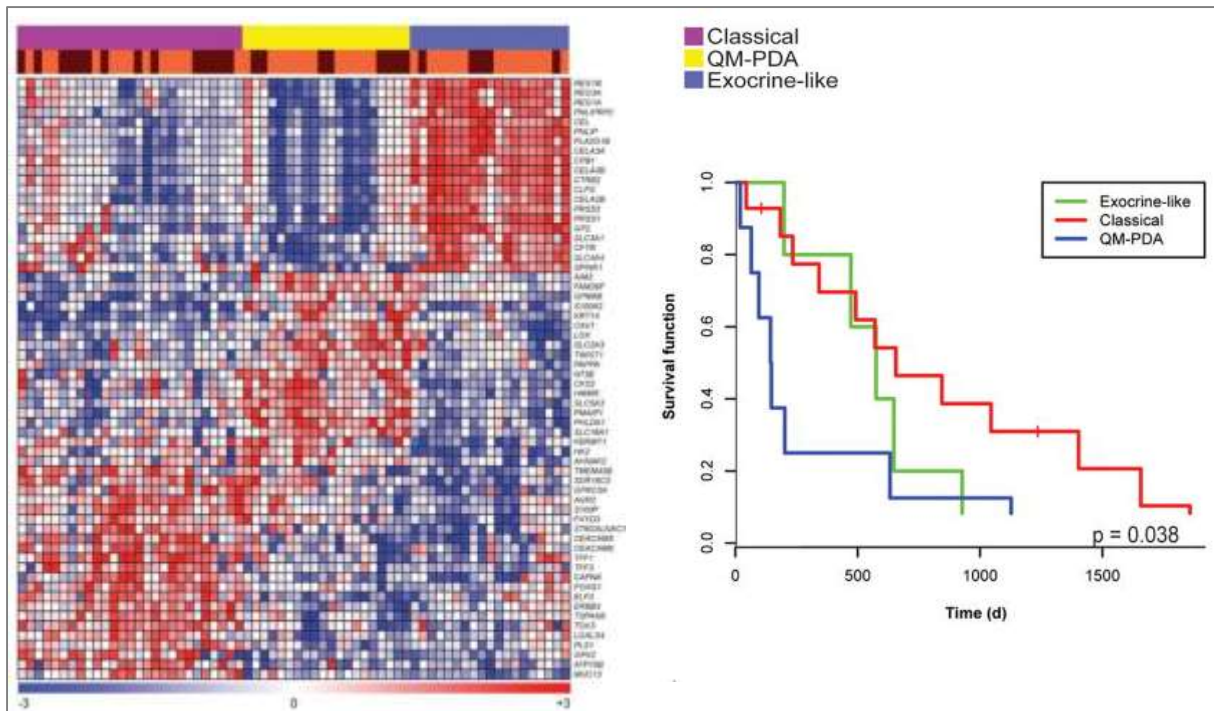


métastases sont primordiales pour le développement de stratégies thérapeutiques ciblant les métastases. En particulier, la comparaison des altérations génétiques entre une tumeur primaire et ses métastases associées apportent des informations fondamentales sur les mutations pouvant jouer un rôle dans le processus métastatique. Malheureusement, aucune mutation métastase-spécifique n'a été identifiée, mais l'ensemble des données de génomique montre que les capacités à métastaser sont acquises pendant l'expansion clonale, lorsque les mutations majeures (*KRAS*, *P16INK4A*, *TP53* et *SMAD4*) sont déjà apparues. Il semblerait donc que les caractéristiques génétiques de la tumeur primaire déterminent en grande partie la capacité des cellules cancéreuses à envahir et à survivre dans un organe à distance (Makohon-Moore et Iacobuzio-Donahue 2016).

#### b) Sous-types tumoraux

Les classifications de sous-types de PDAC provenant d'analyses transcriptomiques à grande échelle donnent également d'importantes informations sur l'hétérogénéité inter et intra-patient des différentes populations tumorales, impliquant des agressivités et des pronostics variables.

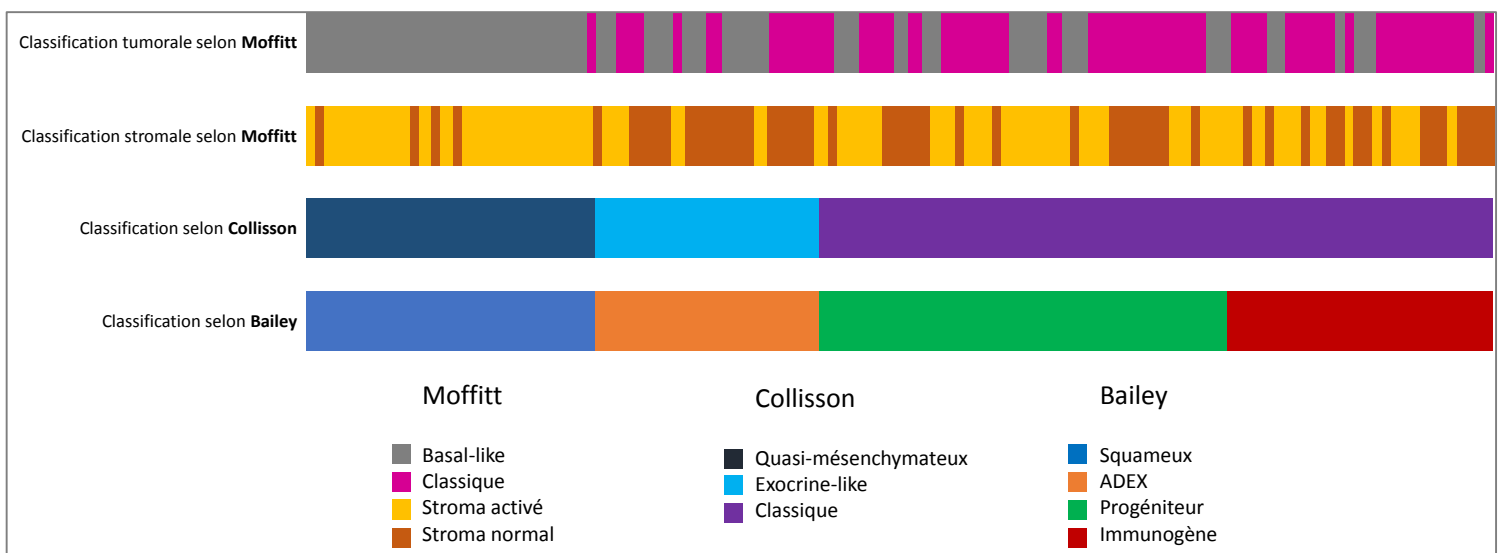
En 2011, Collisson et ses collaborateurs réalisent une analyse globale de l'expression génique sur un mélange de deux cohortes, et proposent trois sous-catégories distinctes : « classique », « exocrine-like », et « quasi-mésenchymateux ». Cette dernière est corrélée à un plus mauvais pronostic, et comme son nom le laisse supposer, se distingue par une signature à haute expression de gènes mésenchymateux (*TWIST*, *LOX*, entre autres) et donc une plus forte propension à l'EMT et à métastaser (Figure 29) (Collisson et al. 2011).



**Figure 29 : Signature génétique et valeur pronostic des sous-types de PDA proposés par Collisson (Collisson et al. 2011)**

Plus récemment, les travaux de Moffitt ont également établi une classification moléculaire des PDAC, en prenant également en compte la composante stromale en utilisant la NMF (non-negative matrix factorisation), une approche mathématique qui permet de distinguer les origines tissulaires des gènes. Les auteurs définissent ainsi trois sous-type de stroma, absent, normal et activé, le stroma activé dans les tumeurs primaires (marqué par l'expression de différents gènes codant pour des protéines matricielles comme les collagènes, la périostine, des MMPs ou encore la fibronectine) est corrélé à un moins bon pronostic. Il est intéressant de noter que le stroma des métastases présente plutôt un sous-type « absent », ce qui suggère un rôle prépondérant du stroma au niveau de la tumeur primaire. Les auteurs stratifient également ces tumeurs primaires en deux sous-types, « basal-like » et classique. Comme attendu, les métastases sont en majorité associées au sous type « basal-like », corrélé au mauvais pronostic. Il apparaît enfin que des regroupements de gènes sont retrouvés dans les métastases, et ce de manière différentielle selon l'organe cible de la métastase, notamment entre le foie et le poumon. Les échantillons de tumeurs primaires et de métastases se regroupent principalement par organe plutôt que par patient, ce qui indique un impact fort de l'environnement sur l'évolution des clones tumoraux (Moffitt et al. 2015).

Enfin, l'étude de Bailey et ses collaborateurs publiée en 2016 inclue le séquençage de 456 tumeurs pancréatique et propose une stratification en quatre sous-types : squameux, progéniteur pancréatique, immunogène et ADEX (différentiation aberrante exocrine-endocrine). Les résultats sont comparés aux classifications de Moffitt et de Collisson, avec une correspondance entre le sous-type squameux corrélé au phénotype le plus métastatique, le sous-type « basal-like » avec stroma activé de Moffitt et le sous-type quasi-mésenchymateux de Collisson (Figure 27). Les sous-types sont également différenciables sur la base de processus biologiques, avec pour le sous-type squameux, une exacerbation des protéines de la matrice, de l'EMT, de la voie TGF $\beta$ , Wnt et EGF, de l'inflammation, de l'hypoxie et de la prolifération, processus largement impliqués dans la cascade d'invasion-métastase (Bailey et al. 2016).



**Figure 30 : Classifications des sous-types génétiques de PDAC (Adapté de Bailey et al. 2016)**

La cohérence entre ces différentes études permet de valider l'approche technique (Figure 30), et il est raisonnable de penser que ces classifications pourront être utilisées dans un futur proche pour orienter le schéma thérapeutique.

### c) Dérégulations de miARNs

Les micro-ARN, ou miARNs sont des petits ARN simple brin non-codants, impliqués dans la régulation de l'expression génique *via* le blocage de la traduction ou la dégradation d'ARN messagers, et qui régulent de nombreux processus biologiques comme la différenciation et la prolifération cellulaire. Plusieurs études ont montré des modifications d'expression dans différents cancers, notamment le PDAC (Zhang et al. 2011). Certains miARNs, appelés «oncomirs», fonctionnent comme des oncogènes et inhibent l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, favorisant ainsi le développement du PDAC, tandis que d'autres miARNs agissent comme suppresseurs de tumeurs et sont au contraire capables d'inhiber l'expression d'oncogènes. Ils sont également impliqués dans la cascade d'invasion/métastase. Ces miARNs sont capables de cibler simultanément plusieurs gènes d'une même voie de signalisation ainsi que dans différentes voies de signalisation, et la régulation des miARNs peut influencer le comportement métastatique des cellules invasives en ciblant à la fois plusieurs gènes liés aux métastases en même temps. De plus, les mêmes miARNs pourraient être impliqués à la fois dans la capacité des cellules cancéreuses à produire des métastases et dans le maintien du phénotype souche, avec une influence sur le stade initial et final de la tumorigenèse (Nicoloso et al. 2009). Des dizaines de miARNs impliqués dans le PDAC ont été décrits dans les dernières années, le paragraphe suivant se propose d'en relever quelques-uns, de manière absolument non exhaustive.

Par exemple, le miR-10b a été parmi les premiers miARNs décrits comme pro-métastatiques dans différents types de cancers solides (Ma et al. 2007) dont le PDAC. Dans le PDAC, il a été montré que le miR-10b était capable en réduisant l'expression de la « Tat-interacting protein 30 » (TIP30) d'induire une invasion *via* l'EGF, de phosphoryler le récepteur EGFR et d'activer la voie ERK dans des cellules de PDAC, ce qui avait pour effet d'augmenter l'expression de gènes de l'EMT, et de diminuer l'expression de différents gènes suppresseurs de métastases (Ouyang et al. 2014). Très récemment, l'équipe de Qiu a montré que le miR-301 était surexprimé dans les cellules hypoxiques de PDAC ainsi que dans les exosomes dérivés de ces cellules. Le niveau de miR-301 exosomal circulant est associé à l'invasion, aux métastases ganglionnaires et à un mauvais pronostic, et qu'il induisait la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 en activant la voie PTEN/PI3K $\gamma$  (Wang et al. 2018). En 2015, Zou et ses collaborateurs ont montré que le miR-29c était au contraire associé à un bon

pronostic, et que sa surexpression induisait la suppression des métastases hépatiques dans un modèle de greffe orthotopiques de PDAC, notamment en ciblant la MMP2, métalloprotéases impliqués dans le remodelage de la matrice et l'invasion (Zou et al. 2015). Avec des analyses de pyroséquençage, Wang et ses collaborateurs ont également découvert que les miR-124 étaient des suppresseurs de tumeurs hautement méthylés dans les tissus de PDAC comparés à des tissus sains, et que cette hyperméthylation induisait la perte d'activité des miR-124. Des études fonctionnelles ont mis en évidence un rôle inhibiteur de ces miARNs sur la prolifération, l'invasion et la métastase, notamment en ciblant la protéine Rac1 promotrice de tumeur. Le ciblage de Rac1 par les miR-124 conduit à une inactivation de la voie JNK/c-Jun (Wang et al. 2014).

De nombreuses d'études récentes mettent en évidence le rôle promoteur ou suppresseur de tumeurs de miARNs, à la fois dans le cancer du pancréas mais également dans différentes autres tumeurs solides. Ces protéines sont des cibles thérapeutiques particulièrement intéressantes, et ont également un avenir dans un rôle diagnostique car les miARNs circulants peuvent également être utiles en tant que biomarqueurs, comme nous le verrons dans une sous-partie de ce manuscrit.

#### d) Cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses (CSCs) sont définies comme une sous-population de cellules cancéreuses possédant la capacité à s'auto-renouveler, ainsi qu'à se différencier en tous les sous-types de cellules cancéreuses formant la tumeur. Ces cellules ont un rôle majeur dans l'initiation du cancer, mais de nombreuses études mettent maintenant en évidence leur implication dans le processus d'invasion-métastase des cancers, notamment dans le PDAC (Abel et Simeone 2013).

Plusieurs marqueurs ont été identifiés pour décrire les CSCs pancréatiques, notamment le CD24, le CD44, le CD133, l'antigène spécifique épithélial ESA, le récepteur CXCR4 et le récepteur c-MET. Les cellules exprimant ces marqueurs ont été décrites comme beaucoup plus tumorigènes que les cellules négatives. Par exemple, une étude a montré que 100 cellules CD24+/CD44+/ESA+ étaient capables de former des tumeurs dans la moitié des souris injectées, alors que l'injection de 10000 cellules triplement négatives avaient entraîné l'apparition d'une tumeur sur 12 souris (Hermann et al. 2007). Il a également été démontré

que les CSC présentaient une haute activité de l'aldéhyde déshydrogénase ALDH1 (Kim et al. 2011). Ces cellules sont également plus résistantes aux chimiothérapies (Duong et al. 2012). Plus récemment, il a été montré que la métadhérine était également fortement exprimées dans les cellules cancéreuses pancréatiques dans lesquelles elle induisait un phénotype souche, et qu'elle favorisait ainsi l'apparition de métastases en favorisant la transition d'un phénotype mésenchymal vers un phénotype épithélial dans les sites métastatiques (Suzuki et al. 2017).

Plusieurs voies de signalisation sont suractivées dans les CSCs, particulièrement les voies Wnt, Hedgehog, Notch, NF- $\kappa$ B (Yu et al. 2012 ; Onishi et Katano 2014 ; Abel et al. 2014). Récemment, les travaux d'Alice Nomura et de ses collaborateurs ont mis en évidence que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules CD133 positives était provoquée par la sécrétion de l'IL-1 à la fois par les cellules tumorales, de manière autocrine, mais aussi par les macrophages associés aux tumeurs (Nomura et al. 2018).

Il est donc clair que le ciblage des CSCs, et particulièrement des cellules initiateuses de métastases (MIC) aux propriétés très proches des cellules souches, est une stratégie particulièrement pertinente dans la prévention de la maladie métastatique. Nous verrons également qu'elles peuvent être utilisées pour leur rôle diagnostique.

#### e) Exosomes

Les exosomes sont des vésicules composées d'une double membrane lipidique, de 30 à 150nm de diamètre, potentiellement secrétées dans leur environnement par tous les types cellulaires. Ils sont une importante voie de communication entre les cellules car ils permettent le transfert de biomolécules (acides nucléiques, protéines). Ils sont également capables de circuler dans la circulation sanguine, en exerçant ainsi une action à distance de leur site de sécrétion, et ce phénomène est particulièrement important dans le processus métastatique.

Dans l'étude des exosomes du cancer du pancréas, l'étude récente la plus notable est probablement celle de Bruno Costa-Silva, publiée dans *Nature* en 2015. Ils montrent que les exosomes secrétés au niveau de la tumeur primaire pancréatique vont modifier l'environnement au niveau du foie, initier une réponse inflammatoire locale et favoriser l'implantation des cellules invasives au niveau hépatique. Les exosomes, qui contiennent une grande quantité de la protéine MIF (« macrophage migration inhibitory factor ») sont

préférentiellement incorporés par les cellules de Kupffer, les macrophages hépatiques, et vont augmenter la sécrétion de TGF $\beta$  par ces macrophages. Le TGF $\beta$  va en retour activer les fibroblastes résidents, accentuer leur production de fibronectine et mettre en place un microenvironnement fibrotique où les cellules immunitaires dérivées de la moelle osseuse vont plus facilement s'accumuler en instaurant ainsi une pré-niche métastatique (Costa-Silva et al. 2015).

Une autre étude a mis en évidence que des exosomes activent les cellules endothéliales quiescentes, en augmentant l'expression d'E-sélectine et en induisant un phénotype pro-inflammatoire avec la sécrétion d'IL-8 *via* le clivage de PAR (« protease-activated receptor »). Cette modification des cellules endothéliales vers un phénotype activé pourrait favoriser le développement de métastases (Che et al. 2017). Une publication récente décrit le rôle de l'ARN long non codant lncARN-Sox2ot exosomal produit par les cellules de PDAC très invasives. Ce lncARN est corrélé à un mauvais pronostic, et l'étude montre qu'il favorise l'EMT et le phénotype souche en régulant l'expression de SOX2, favorisant ainsi l'apparition de métastases (Li et al. 2018). Enfin, une étude intéressante de Richards et ses collaborateurs a étudié l'effet de la chimiothérapie sur les CAFs, et a mis en évidence que la gemcitabine augmentait la libération d'exosomes par ces CAFs. L'incorporation des exosomes induisait une augmentation d'expression de Snail, une protéine impliquée dans l'EMT, dans les cellules cancéreuses, en favorisant leur survie et leur capacité à proliférer. L'utilisation d'un inhibiteur de la signalisation des exosomes permettait de restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses à la gemcitabine (Richards et al. 2017).

Les exosomes du cancer du pancréas, produits à la fois par les cellules cancéreuses et les cellules du microenvironnement, sont de plus en plus étudiés. Il est raisonnable de penser que des avancées majeures peuvent être faites dans les prochaines années, de par leur utilisation dans la détection précoce d'une part, mais aussi le ciblage de leur rôle protumoral et pro-métastatique.

## IV) Stratégies thérapeutiques innovantes dans le PDAC

### 1) Thérapies actuelles

Différentes possibilités thérapeutiques sont à envisager au moment du diagnostic d'un adénocarcinome du pancréas. Le choix et l'ordre des traitements dépendent beaucoup de l'étendue du cancer, mais aussi de l'âge du patient. L'évaluation du stade du cancer prend en compte la localisation de la tumeur, sa taille et l'étendue de la tumeur vers d'autres organes ou vaisseaux sanguins, l'atteinte des ganglions lymphatiques par les cellules cancéreuses, et la présence de métastases. Selon cette évaluation, un traitement adapté sera réalisé (Figure 31).

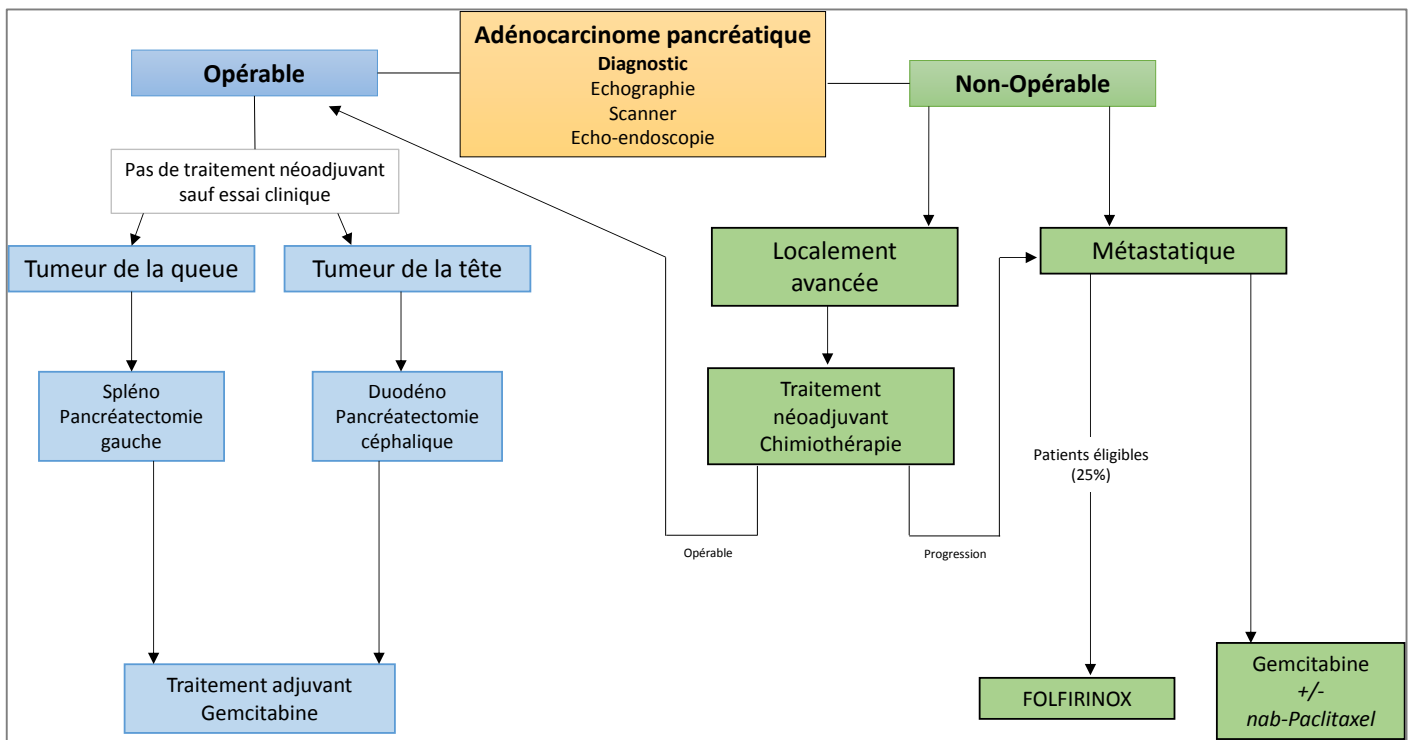


Figure 31 : Algorithme décisionnel de prise en charge du PDAC (Adapté de Neuzillet et al. 2018)

#### a) Tumeurs résécables d'emblée

La chirurgie consiste en la résection d'une partie ou de la totalité du pancréas. On parle de duodéno-pancréatectomie céphalique (DPC) pour une résection de la tête du pancréas et



de l'intestin grêle, ainsi que d'une partie de l'estomac et de la vésicule biliaire. Le rétablissement de la voie biliaire vers l'intestin (anastomose bilio-digestive), du pancréas restant vers l'intestin ou l'estomac (anastomose pancréatico-jéjunale ou pancréatico-gastrique), et de l'estomac vers l'intestin (anastomose gastro-jéjunale) sont ensuite nécessaires pour assurer des fonctions digestives normales. Cette technique est le plus souvent proposée pour les tumeurs de la tête, de la voie biliaire, de l'ampoule de Vater et du duodénum, et présente l'avantage de préserver suffisamment de tissus dans la queue pour produire les différentes hormones et enzymes pancréatiques. Une complication post-opératoire apparaît dans 20 à 50% des cas, avec par ordre de fréquence la gastroparésie (absence de reprise d'une alimentation normale après une semaine, 10 à 50%), les infections (1,3 à 13%), les fistules (0,5 à 25%) et l'hémorragie (complication la plus grave, qui apparaît dans 1 à 8% des cas et est responsable de 11 à 38% de la mortalité). La mortalité après intervention est maintenant d'environ 5% dans les centres à grands volumes opératoires. La spléno-pancréatectomie gauche est une intervention plus simple, pour les tumeurs du corps ou de la queue du pancréas (la rate est également retirée pour éviter le développement de métastases si des cellules y étaient disséminées), mais plus rarement réalisée, car c'est la tête du pancréas qui est la localisation la plus fréquente du PDAC.

Après chirurgie, un traitement dit "adjuvant" (à base de gemcitabine, un antimétabolite pyrimidique analogue de la désoxycytidine, le plus souvent) de 6 mois est systématiquement réalisé pour réduire le risque de récurrence. Environ 80% des patients opérés développeront en effet une récurrence locale ou métastatique. En 2013, l'étude LAP07 a évalué l'utilisation de la radiothérapie associée à la chimiothérapie par gemcitabine par rapport à la gemcitabine seule et n'a pas démontré d'efficacité supérieure concluante (15,2 contre 16,4 mois) (Hammel et al. 2016). Les traitements dits "néo-adjuvants", c'est à dire donnés aux patients avant la chirurgie, sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques. L'objectif de ces traitements serait de réduire la masse tumorale avant la chirurgie d'exérèse afin d'améliorer les chances de résection complète (dite R0, avec pronostic amélioré), et/ou de traiter une maladie précoce métastatique non détectée (Neuzillet et al. 2018).

Malheureusement, les adénocarcinomes du pancréas sont souvent diagnostiqués à un stade avancé, où moins de 20% des patients peuvent être éligibles pour une résection curative. La chirurgie offre la seule chance de guérison pour le cancer du pancréas, mais les taux de survie restent faibles même pour cette catégorie de patients opérés, avec une

médiane de survie de 26 mois et 30% de survie à 5 ans (Neoptolemos et al. 2018). La chirurgie n'est utile que dans les seules situations où la tumeur est limitée au pancréas. Il existe de nombreux critères d'irrésécabilité, dont la présence de métastases, d'adénopathies malignes en dehors des marges de résection, ou d'invasion de l'estomac, du colon, ou la présence de gros vaisseaux sanguins risquant de provoquer une hémorragie importante. De plus, l'âge du patient joue un rôle important, avec une mortalité consécutive à l'opération plus importante chez les sujets âgés, en mauvais état général.

#### b) Tumeurs localement avancée

Pour les tumeurs localement avancées et non-résécables d'emblée, on parle de chimiothérapies d'induction, qui sont destinées à réduire le volume et l'extension de la tumeur, et ainsi éventuellement permettre une résection. Dans ce cas, la chimiothérapie a montré un intérêt important, avec 50% des tumeurs initialement non-opérables qui le deviennent après la chimiothérapie, avec une survie comparable aux patients opérables d'emblée (Nitsche et al. 2016). Dans ce contexte, le traitement de référence est la gemcitabine seule, qui peut être associée à la radiothérapie dans les cancers contrôlés.

#### c) Formes métastatiques

Dans le cas des cancers du pancréas avancés, avec métastases, les traitements à visée curative ne sont pas une option et les traitements utilisés visent à soulager les symptômes de la maladie. La chimiothérapie peut permettre de réduire la taille du cancer, de soulager les symptômes, d'améliorer la qualité de vie et les capacités fonctionnelles du patient et de permettre au patient de vivre plus longtemps. Les patients doivent être suivis pour les effets secondaires et l'évaluation de la réponse à la chimiothérapie.

La gemcitabine est un analogue de la désoxycytidine. Elle est depuis 1997 la chimiothérapie standard pour les patients atteints d'un cancer du pancréas métastatique (Burriss et al. 1997). De nombreuses combinaisons de gemcitabine et d'autres médicaments ont déjà été essayées, mais aucune n'a jusqu'à présent montré d'avantages évidents quant à l'allongement de l'espérance de vie des patients. Récemment, la combinaison de gemcitabine et de *nab*-paclitaxel (paclitaxel lié à l'albumine, qui permet une amélioration de la

pharmacocinétique) s'est montrée supérieure au traitement par gemcitabine seule (8,5 mois contre 6,7 mois de survie), mais avec une toxicité supérieure. Par conséquent, cette combinaison peut maintenant être recommandée pour les patients atteints d'un cancer du pancréas métastatique en Europe et aux USA (Von Hoff et al. 2013). Toutefois, les pouvoirs publics français n'ont pas accepté le remboursement de cette nouvelle association chimiothérapeutique, en raison d'un bénéfice thérapeutique insuffisant par rapport à la gemcitabine seule. Enfin, l'étude de phase III PRODIGE-4/ACCORD-11 a montré des résultats intéressants sur l'utilisation du FOLFIRINOX sur la prolongation de la survie (11,1 mois contre 6,8 mois avec la gemcitabine) et le retardement de la détérioration de la qualité de vie (31,6% contre 66% de patients avec une dégradation définitive de la qualité de vie à 6 mois) (Conroy et al. 2011). Le protocole FOLFIRINOX associe le 5-fluorouracile (ou 5-FU, également un anti-métabolite analogue d'une base de l'ARN, l'uracile), l'acide folinique (modulateur de l'activité du 5-FU), l'irinotecan (un agent antinéoplasique dérivé de la camptothécine qui agit comme inhibiteur de topoisomérase) et l'oxaliplatine (un sel de platine complexé avec un diaminocyclohexane et un groupe oxalate, qui va interagir avec l'ADN en formant des ponts intra et inter-brins entraînant une interruption de la synthèse de l'ADN). Grâce à l'amélioration des résultats du traitement, ce protocole peut être considéré comme une option thérapeutique pour les patients de 75 ans ou moins, qui sont en bon état général et ont une fonction hépatique adéquate, car les effets indésirables sont lourds et difficiles à supporter. On estime que 25% des patients sont éligibles pour le protocole FOLFIRINOX, contre 45% pour l'association gemcitabine/*nab*-paclitaxel.

## 2) Diagnostic précoce

### a) Généralités

Le pronostic dramatique du PDAC, est largement dû aux difficultés à diagnostiquer la maladie à un stade précoce, où la chirurgie est toujours possible. En effet, la survie à 5 ans des patients varie de 2% pour un diagnostic au stade métastatique à 30% lorsque la maladie est diagnostiquée à un niveau localisé. La survie à 5 ans atteint même 80,4% lorsque la tumeur présente un diamètre inférieur à 10mm, et jusqu'à 85,8% pour le stade de carcinome *in situ*

(Zhou et al. 2017). De même, les patients diagnostiqués accidentellement lors d'un examen d'imagerie présentent une survie supérieure à celle des patients présentant des symptômes de PDAC (30 mois contre 21 en médiane) (Poruk et al. 2013). Ces données donnent un rationnel fort pour la détection précoce comme stratégie thérapeutique dans le PDAC. De plus, les travaux de Yachida et ses collaborateurs sur l'évolution génétique du cancer du pancréas ont mis en évidence que le délai entre la mutation initiatrice du cancer et l'apparition de métastases était de plus de 20 ans (Yachida et al. 2010). La fenêtre pour la détection de ce cancer est donc particulièrement large. Malheureusement, en raison de la faible prévalence du PDAC dans la population générale, le dépistage systématique n'est pas envisageable. En effet, le manque de population à très haut risque et le manque de marqueurs précoces de la maladie rendent ce dépistage impossible. Par exemple, même avec un biomarqueur très sensible (99%) et spécifique (99% également), le dépistage de 100000 personnes dans la population générale permettrait de diagnostiquer quasiment tous les PDAC (10,9 cas pour 100000 chez les hommes contre 7,9 chez la femme), mais entraînerait un faux diagnostic de cancer du pancréas pour 1000 personnes, ce qui n'est pas acceptable. Il est donc nécessaire de trouver, en plus de biomarqueurs de qualité, des filtres pour enrichir les patients à très haut risque pour un dépistage efficace.

Les cibles du dépistage précoce sont donc plutôt les patients identifiés comme à haut risque (risque augmenté de plus de 10 fois), qui représentent environ 10% des patients. Ces cohortes sont essentiellement les patients présentant des prédispositions génétiques, avec des antécédents familiaux de PDAC ou des pancréatites héréditaires, ou encore les patients atteints du syndrome Peutz-Jeghers (maladie gastrointestinale héréditaire caractérisée par le développement de polypes au niveau du tube digestif, et qui induit un risque élevé de développement de cancers digestifs). Les tumeurs de patients présentant des cancers du pancréas héréditaires présentent tout de même une importante hétérogénéité génétique, ce qui complique le diagnostic (Roberts et al. 2016). Il n'existe en plus pas de test de dépistage efficace pour les patients asymptomatiques, ni au niveau moléculaire ni par une technique d'imagerie, et la localisation anatomique profonde du pancréas rend la détection de petites tumeurs compliquée et improbable lors d'un examen abdominal de routine. Les techniques d'imagerie classique, scanner et IRM abdominal, sont peu efficace pour des diagnostics précoces, car elles ne permettent pas la détection de tumeurs inférieures à 1 cm de diamètre. Et les techniques plus sensibles comme les échographies endoscopiques sont

quant à elles trop invasives, coûteuses et risquées pour être utilisées pour le diagnostic de patients asymptomatiques.

Le biomarqueur standard du cancer du pancréas est actuellement l'antigène carbohydrate sialyl Lewis associé aux mucines 19-9, ou CA19-9. Il est plutôt utilisé pour le suivi de l'efficacité d'un traitement ou de la récurrence, car il ne peut pas être utilisé comme marqueur diagnostique. En effet, les dosages montrent une efficacité très modeste, avec une sensibilité moyenne de 79% (70-90%) et une spécificité de 82% (68-91%). Le taux de CA19-9 peut être fréquemment élevé dans des contextes non cancéreux, comme des pancréatites, des pathologies hépatiques (cirrhose, hépatites), et il est de plus habituellement peu élevé à des stades précoces de PDAC. De plus, on estime qu'entre 10 et 20% de la population portent un génotype négatif pour l'antigène et développent des tumeurs qui n'exprimeront donc pas de CA19-9. De nombreuses études récentes ont permis d'identifier des molécules circulantes surexprimées, ou des mutations particulières dans les contextes de cancer, et ces variations pourront peut-être à terme être utilisées comme des marqueurs précoces de PDAC.

#### b) Signature génétique et épigénétique

Il a été clairement montré que le développement du PDAC fait suite à une accumulation de mutations, à la fois d'oncogènes (KRAS) et de gènes suppresseurs de tumeurs (CDKN2A, TP53, et SMAD4 notamment). Les nouvelles technologies de séquençage haut-débit ont permis de confirmer ces concepts, mais aussi de mettre en évidence de nombreuses nouvelles mutations, des variations d'expressions géniques, des altérations épigénétiques, et des réarrangements chromosomiques (Witkiewicz et al. 2015). Ces modifications génétiques identifiées, impliquant entre autre la voie du TGF $\beta$ , la voie Wnt, la voie Hedgehog, le remodelage de la chromatine, sont moins communes, mais elles peuvent avoir un rôle majeur lorsqu'elles sont combinées. Si chaque cancer du pancréas présente en moyenne 63 mutations différentes (Jones et al. 2008), des panels de mutations pourraient être utilisés comme biomarqueurs. L'étude de Bhasin et ses collaborateurs a identifié un panel de 5 mutations (TMPRSS4, AHNK2, POSTN, ECT2, SERPINB5) permettant de distinguer sur des prélèvements de biopsies à l'aiguille fine les tissus cancéreux dès les stades précoces et normaux (sensibilité = 94%, spécificité = 89.6%), dans des modèles humains et murins (Bhasin et al. 2016). Les études génomiques permettent aussi de mettre en évidence des régions

chromosomiques impliquées dans la susceptibilité à développer un PDAC. Deux études récentes ont identifié plusieurs loci significativement associés aux cancers du pancréas (Wolpin et al. 2014 ; Childs et al. 2015).

Au niveau épigénétique, les analyses haut-débit ont permis de caractériser des modèles de méthylations des génomes de PDAC, et plusieurs d'entre eux peuvent présenter un intérêt en tant que biomarqueur, ou dans un rôle de prédiction de réponse aux traitements (Yi et al. 2013 ; Zhao et al. 2014 ; Gailhouste et al. 2018).

### c) ARN non codants

De nombreuses études ont mis en évidence des variations de profils de microARNs spécifiques chez les patients présentant un PDAC, qui en plus d'être de potentielles cibles thérapeutiques, pourront être utilisés comme marqueurs diagnostics. Les microARNs peuvent en effet être retrouvés dans le tissu pancréatique, mais aussi dans le sang, le plasma, la salive ou dans la bile des patients, ce qui simplifierait les prélèvements pour un test diagnostique (Aleamar et al. 2015 ; Li et al. 2018). A partir d'échantillons de sera de 197 patients présentant un PDAC et de 158 patients sans cancers (pancréatite chronique ou sains), Liu et ses collaborateurs ont développé un panel de 7 microARNs avec une sensibilité et une spécificité de 89 et 100%, respectivement (Liu et al. 2012). L'équipe de Korc a également montré que la surexpression des miRNA-10b, -155, and -106b dans le plasma permettait de diagnostiquer précisément les PDAC. En effet, ils parvenaient avec ce panel à différencier les cancers du pancréas et les pancréatites chroniques (et autres lésions bénignes du pancréas) avec sensibilité et une spécificité de 100% dans la cohorte de validation (n=120) (Cote et al. 2014). Enfin, la même équipe a récemment montré que les microARNs contenus dans les exosomes pouvaient différencier les patients atteints de pancréatites chroniques, de PDAC, et les patients sains, avec une expression élevée des miR-10b, miR-21, miR-30c, et miR-181a et basse du miR-let7a dans les exosomes (Lai et al. 2017). Cependant, les méthodes de détection des microARNs plasmatiques sont encore longues et peu sensibles, car ils sont présents en petites quantités dans le sang en comparaison aux tissus. De nouvelles techniques sont nécessaires pour permettre une quantification rapide et précise (Zhou et al. 2017).

De la même manière, certains ARNS longs non codants (lncARNs) peuvent être dérégulés dans les tumeurs, notamment celles du pancréas (Wang et al. 2015). Xie et ses collaborateurs ont montré que les lncARNs HOTAIR et PVT1 étaient statistiquement plus élevés dans la salive des patients avec un PDAC par rapport aux patients avec des lésions précancéreuses et sains (Xie et al. 2016). Les sensibilités et spécificités sont moyennes, mais des panels de plusieurs lncARNs dérégulés pourraient avoir un rôle intéressant dans les années à venir.

#### d) Biopsies liquides

Avec des prélèvements sanguins, les ADN libres circulants, les cellules cancéreuses circulantes et les exosomes pourraient remplir un rôle de diagnostic et de suivi de réponse thérapeutique.

Les ADN libres circulants sont dérivés de différents organes, comme la moelle osseuse et le foie chez les patients sains, et sont éliminés par le foie et les reins en quelques heures. Les cellules tumorales libèrent également des fragments d'ADN, appelés ctDNA, qui représentent une fraction variable des ADN circulants (entre 0,01 et 50%) (Diehl et al. 2008). La présence de mutations dans les cellules cancéreuses (KRAS dans le PDAC) permet la distinction entre ctDNA et les ADN circulants normaux. Il a de plus été montré que les niveaux de ctDNA pouvaient être corrélés au stade tumoral. Dans une cohorte de 155 PDAC, les auteurs retrouvaient des ctDNA chez environ 50% des patients avec un cancer localisé, et chez plus de 80% des patients métastatiques (Bettegowda et al. 2014). De la même manière, Sausen et ses collaborateurs ont détecté des ctDNA chez 43% des patients porteurs de PDAC localisés au moment du diagnostic. La détection de ces ctDNA après la résection était prédictive d'une rechute et d'un mauvais pronostic (Sausen et al. 2015). La sensibilité et la spécificité pour différencier pancréatite chronique et PDAC est cependant assez faible, une étude a notamment montré une sensibilité de 47% pour la recherche de la mutation KRAS dans le sérum (Maire et al. 2002). Cependant, des travaux récents ont combiné la détection de mutation de KRAS avec des dosages protéiques, sur deux cohortes de 221 patients avec PDAC résécables et 182 personnes sans cancer diagnostiqué. La mutation de KRAS était détectée chez 30% des patients, avec 100% de concordance avec les mutations retrouvées

dans les tumeurs primaires. L'association de la détection de KRAS avec le dosage de quatre protéines (CA19-9, CEA, et ostéopontine) permettait d'augmenter la sensibilité à 64%, avec une spécificité de 99,5% (Cohen et al. 2017). Enfin, une équipe a récemment mis au point un test sanguin unique, nommé CancerSEEK, capable de détecter huit cancers fréquents à des stades non-métastatiques et qui combine la recherche de seize altérations génétiques et le dosage de huit protéines (CA-125, CEA, CA19-9, prolactine, HGF, ostéopontine, myéloperoxydase et TIMP-1). Sur une cohorte de 1005 patients, les tests étaient positifs avec une médiane de 73%, et 43% aux stades les plus précoces des cancers. Pour les cancers dans lesquelles aucun dépistage n'est possible (ovaire, foie, estomac, pancréas et œsophage), la sensibilité variait de 69 à 98% (plus de 70% pour le PDAC), avec une spécificité supérieure à 99%. Le test a également été capable de localiser la tumeur chez 83% de ces patients (81% des cancers du pancréas) (Cohen et al. 2018).

Les cellules cancéreuses circulantes sont quant à elles plus difficilement utilisables dans un objectif de diagnostic précoce, même si leur rôle pronostic et leur implication dans le processus métastatique a été largement étudié. En effet, l'hétérogénéité de ces cellules, leur instabilité et leur rareté (entre 1 et 100 pour plusieurs milliards de cellules circulantes) rend leur détection très compliquée. Plusieurs techniques d'enrichissement selon leurs propriétés physiques ou biologique sont en développement, avec des résultats variés, et d'importants progrès seront nécessaires pour faciliter la détection, l'isolement, l'enrichissement et la caractérisation des CTC (Yadav et al. 2018).

Enfin, les exosomes transportent différents fragments d'acides nucléiques et des protéines jouant un rôle important dans la progression du PDAC et potentiellement utilisables pour la détection précoce. Particulièrement, les travaux de Melo et ses collaborateurs ont identifié le Glypican-1, un protéoglycane spécifiquement enrichi dans les exosomes de cancer du pancréas. Dans le sérum de patients (n=190) et de souris développant des PDAC, le glypican-1 exosomal permettait de différencier les sujets sains et cancéreux, de même que les patients porteurs de lésions pancréatiques précoces, avec une sensibilité et une spécificité de 100%. La quantité de ces exosomes est également corrélée au volume tumoral chez les souris, et au pronostic chez les patients (Melo et al. 2015 ; Frampton et al. 2018). Cependant, les techniques d'isolation d'exosomes dérivés de cellules cancéreuses doivent être simplifiées pour envisager une utilisation en clinique.



### 3) Thérapies ciblées

#### a) Ciblage moléculaire

Les thérapies ciblées sont des médicaments qui ciblent spécifiquement une protéine ou un mécanisme (par exemple, une interaction entre partenaires protéiques, ADN-protéine, etc.) impliqué dans le développement de la tumeur. Ce ciblage réduit ainsi les effets indésirables consécutifs à l'action des drogues sur les cellules saines, comme observé dans les chimiothérapies classiques. Entre 2014 et 2016, plus de 60% des essais cliniques ont associé des thérapies ciblées aux chimiothérapies classiques, avec des résultats le plus souvent décevants (Sheahan et al. 2018).

Le récepteur au facteur de croissance épithélial (EGFR), exprimé à la surface des cellules cancéreuses pancréatiques, est la cible la plus utilisée (25% des essais). Seule l'association gemcitabine-erlotinib, un inhibiteur de l'EGFR, a pour l'instant été autorisée en Europe, avec des résultats peu concluants, et un coût très largement supérieur. En effet, pour les tumeurs localement avancées, l'essai clinique LAP07 a démontré en 2013, à posteriori, l'absence d'efficacité de l'association gemcitabine-erlotinib. Les patients traités par gemcitabine seule ont montré une survie moyenne de 13,6 mois contre 11,9 mois pour l'association à l'erlotinib (Hammel et al. 2016). Une étude clinique récente de phase II a testé chez des patients atteints de PDAC localement avancés ou métastatiques l'association de la gemcitabine et du Nimotuzumab, un anticorps monoclonal humanisé qui cible l'EGFR. Les résultats suggèrent que si l'association améliorerait la survie chez tous les patients, le Nimotuzumab serait particulièrement bénéfique pour les patients ne présentant pas de mutation de KRAS (11,6 mois versus 5,6 pour les patients KRAS-mutés) (Schultheis et al. 2017).

Les inhibiteurs du VEGF et du PDGF ont également été testés dans plusieurs études, en association, avec des résultats moyens et sont encore à l'étude. L'association de bevacizumab (inhibiteur du VEGF) et du cetuximab (inhibiteur de l'EGFR) a montré une amélioration de la survie globale de patients atteints de PDAC localement avancés ou métastatiques par rapport aux chimiothérapies classiques (13 contre 7 mois), avec une efficacité supérieure chez les patients âgés de moins de 60 ans (Tai et al. 2016). D'autres inhibiteurs de tyrosine kinase (RTK) comme le sorafenib, qui inhibe le VEGFR, le PDGFR et Raf ont été utilisés, avec une survie globale de 12,6 mois dans une étude de phase 1 sur des patients atteints de PDAC inopérables

(Chiorean et al. 2014). L'association de gemcitabine et du tramétinib, un inhibiteur de MEK, a augmenté la survie globale de presque deux mois par rapport à la gemcitabine seule sur des patients métastatiques (Infante et al. 2014).

D'autres voies de signalisation activées et cibles moléculaires comme la voie PI3K/Akt/mTOR sont susceptibles d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. L'everolimus, un inhibiteur de mTOR, en association avec la chimiothérapie capecitabine, a montré une survie globale de 8,9 mois chez des patients atteints de PDAC métastatiques, avec une toxicité acceptable (Kordes et al. 2015). Cependant, une étude a montré dans le PDAC une forte réduction de l'expression de 4E-BP1, une protéine de régulation négative de la traduction eucaryote impliquée dans la voie mTOR. Cette extinction accélère donc la synthèse de protéines et facilite la prolifération par résistance à la régulation par la voie mTOR (Martineau et al. 2014). Ce phénomène pourrait expliquer le manque d'efficacité des traitements ciblant la voie mTOR dans le PDAC. L'analogue de somatostatine pasiréotide associé à la gemcitabine a atteint une survie globale de 6,9 mois pour des cancers pancréatiques localement avancés ou métastatiques, et le traitement était bien toléré par les patient (Suleiman et al. 2015). Cette molécule sera étudiée plus en détail à la fin de cette partie.

Notre compréhension de la pathogenèse moléculaire de l'adénocarcinome du pancréas continue à se développer ; avec l'identification des différentes voies moléculaires de la tumorigenèse du cancer du pancréas, des cibles potentielles pour le développement de médicaments ont été isolées et pourraient permettre l'utilisation d'anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de petites molécules. Il serait probablement judicieux d'utiliser ces thérapies ciblées dans des sous-groupes de patients définis, selon les caractéristiques de chaque tumeur pour améliorer leur efficacité. Jusqu'à la généralisation de la médecine personnalisée, la difficulté à prédire les réponses des patients rend leur utilisation limitée.

## b) Ciblage de la matrice

Plusieurs stratégies existent pour réduire la densité des composants de l'ECM, et limiter le dialogue entre matrice et cellules cancéreuses et les signalisations intracellulaires. La voie de signalisation Hedgehog est fortement activée dans les cellules stromales, notamment dans les CAFs, et conduit à l'augmentation du développement de la réaction

fibreuse desmoplasique (Lee et al. 2014). Elle favorise aussi le développement de métastases via la stimulation de l'expression de la protéine Snail (Heiden et al. 2014). La gemcitabine seule n'est pas efficace sur les souris triple transgéniques KPC présentant un PDAC avec une forte réaction stromale, majoritairement à cause de la mauvaise perfusion et de l'hypovascularisation des tumeurs. L'utilisation d'inhibiteur de Smo, une protéine transmembranaire responsable de l'activation de la voie Hedgehog, a montré *in vitro* et *in vivo* des résultats très intéressants dans le traitement du PDAC. Le Saridegib ou IPI-926 a montré en association avec la gemcitabine une augmentation significative de la survie moyenne (de 11 à 25 jours) des souris KPC. Cet effet thérapeutique important passe par une forte augmentation de la vascularisation et de la concentration en gemcitabine au sein de la tumeur, grâce à une destruction du stroma (Olive et al. 2007). Une autre étude avec le Vismodegib ou GDC-O449, un autre inhibiteur de Smo, a montré *in vitro* une forte diminution de la viabilité des cellules souches cancéreuses en inhibant la voie Hedgehog (Singh et al. 2011). Une dernière étude utilisant le AZD8542, un nouvel inhibiteur de la voie Hedgehog, a montré une forte réduction (79%) du volume tumoral dans un modèle de greffes orthotopiques de manière dose-dépendante et une diminution des métastases via une action sur les CAFs (Hwang et al. 2012). Cependant, un essai clinique de phase 2 associant la gemcitabine et l'inhibiteur de Smo IPI-926 a été suspendu à cause d'une meilleure survie dans le bras traité à la gemcitabine seule.

La lysyl oxidase LOX est surexprimée dans les PDAC, notamment sous conditions hypoxiques, avec un impact majeur sur la mise en place d'un niche pré-métastatique et le développement de métastases (Erlor et al. 2006 ; Erlor et al. 2009). L'inhibition de la LOX par un anticorps bloquant a montré un fort effet anti-métastatique, associé à une augmentation importante de la survie de souris KPC en association avec la gemcitabine. Cet effet passait par une réduction du dépôt de collagène fibrillaire et une augmentation de l'infiltration leucocytaire au sein de la tumeur (Miller et al. 2015). De même, l'acide hyaluronique ou hyaluronane est un composant de la matrice extracellulaire qui joue un rôle majeur dans la forte réduction de la perfusion tumorale, conduisant à l'inefficacité des chimiothérapies. Plusieurs études ont montré que l'utilisation d'une hyaluronidase, le PEGPH20 (« PEGylated human recombinant PH20 hyaluronidase ») provoquait une rapide réduction de l'acide hyaluronique, de même que du collagène et des CAFs. Cette diminution induit une rapide expansion vasculaire au sein de la tumeur et augmente donc la distribution des médicaments.

L'association PEGPH20-gemcitabine a montré une augmentation significative de la survie sur des souris (survie après le début du traitement de 28,5 jours contre 15 jours avec la gemcitabine seule, et 10,5 jours sans traitement) (Provenzano et al. 2012 ; Jacobetz et al. 2013). Une augmentation de l'apoptose, une diminution de la prolifération et une diminution du développement de métastases ont également été retrouvées. Plusieurs essais cliniques comparant l'association de PEGPH20 avec d'autres chimiothérapies ou thérapies ciblées sont en cours (NCT02910882, NCT03481920, ...).

La « Focal adhésion kinase » ou FAK est largement activée dans le PDAC, et est impliquée dans la prolifération et la migration des cellules cancéreuses et des cellules stromales (Jiang et al. 2016). L'utilisation d'un inhibiteur de FAK, le PF-562271 a montré une diminution significative de la quantité de collagène de type I, des macrophages, des CAFs *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'une diminution du volume tumoral (Stockes et al. 2011). Plus récemment, les inhibiteurs de FAK ont montré une forte réduction de la fibrose et de la croissance tumorale dans le modèle KPC, associée à une diminution du phénotype souche et des métastases (Jiang et al. 2016). Les inhibiteurs de FAK pourraient contribuer à l'amélioration de l'efficacité des chimiothérapies, par diminution du recrutement et/ou de la prolifération des cellules du microenvironnement, et des essais cliniques ont débuté (NCT02546531, NCT02758587).

Une forme modifiée du paclitaxel, le nab-paclitaxel pour « albumin-bound paclitaxel » (Abraxane®) est utilisée depuis peu en clinique. Cette nouvelle formulation du paclitaxel, un dérivé des taxanes, permet un meilleur profil pharmacocinétique grâce entre autres à une meilleure utilisation du transport par l'albumine et une meilleure migration au travers des cellules endothéliales. Cette formulation implique un apport dans la tumeur en paclitaxel amélioré, et donc une concentration active plus importante au niveau des cellules cancéreuses avec une réduction des doses et des effets indésirables (Yardley et al. 2013). En 2011, un essai clinique sur 861 patients a comparé l'association de la gemcitabine au nab-paclitaxel sur des patients avec cancer du pancréas métastatique. La survie moyenne était de 8,5 mois avec l'association, contre 6,7 mois avec la gemcitabine seule. Après un an, 35% des patients traités par l'association étaient toujours en vie, contre 22% avec la gemcitabine seule. La toxicité du traitement était supérieure pour l'association, mais les effets indésirables (myélosuppression, neuropathies périphériques) sont réversibles à l'arrêt du traitement (Von Hoff et al. 2013). Une autre étude a montré que les tumeurs de patients traités par nab-

paclitaxel montraient une plus faible proportion de CAFs et un réseau de collagène désorganisé. Cet effet a été retrouvé sur des modèles transgéniques murins, avec une diminution de la croissance tumorale, une augmentation de l'apoptose des cellules cancéreuses, une diminution de la matrice de collagène et une forte diminution de la quantité de CAFs (Alvarez et al. 2013). Enfin, il a été montré *in vivo* qu'en association avec le nab-paclitaxel, la gemcitabine avait une activité potentialisée par diminution de la cytidine desaminase (une enzyme impliquée dans la métabolisation de la gemcitabine) et était retrouvée à des plus hautes concentrations au sein de la tumeur. La survie des souris était augmentée et l'incidence des métastases diminuée (76 contre 88% avec la gemcitabine seule) (Frese et al. 2012).

Il a aussi été montré que le facteur de croissance du tissu conjonctif CTGF était exprimé à la fois par les cellules stromales et néoplasiques dans le PDAC et qu'il participait à de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la production de fibrose par les CAFs (Neesse et al. 2013). L'utilisation d'un anticorps monoclonal ciblant le CTGF, le FG-3019, permettait de réduire la réaction desmoplastique sur des souris transgéniques KPC. L'association du FG-3019 à la gemcitabine montre une réduction du volume tumoral, une augmentation de l'apoptose au sein de la tumeur, et une augmentation de la survie des souris traitées par l'association (62 jours) par rapport à la gemcitabine seule (45 jours) (Neesse et al. 2013). Une étude clinique de phase 1/2 est en cours et évalue la tolérance et l'activité du FG-3019 en association avec la gemcitabine dans les cancers avancés et métastatiques du pancréas (NCT02210559).

Enfin, Vennin et ses collaborateurs ont récemment montré que dans le PDAC, l'inhibition de la kinase Rho par le Fasudil (HA-1077) permettait de perturber l'intégrité de la matrice extracellulaire, de réduire la tension et d'augmenter la vascularisation au sein des tumeurs primaires, et ainsi d'améliorer les réponses au traitement gemcitabine/Abbraxane. L'activité de la chimiothérapie est aussi améliorée au niveau des sites secondaires, et le développement de métastases est réduit (Vennin et al. 2017).

### c) Immunothérapie

Le ciblage de la réponse immunitaire représente un axe prometteur de développement. Deux possibilités sont envisageables : le renforcement de la réponse anti-tumorale ou la suppression de la réponse pro-tumorale (Figure 32).

L'activation du CD40, un récepteur de la famille des récepteur TNF, peut permettre de réduire l'immunosuppression et conduire à une réponse antitumorale lymphocytaire ou par macrophages. L'efficacité d'une association entre un anticorps monoclonal agoniste de CD40, le CP-870893, et la gemcitabine a été testée dans un essai clinique de phase I sur une cohorte de 21 patients. Ce traitement a été bien supporté, et a montré une médiane de survie de 7,4 mois, contre 5,7 pour la gemcitabine seule, et une réduction importante du volume tumoral pancréatique et métastatique. Sur le modèle murin transgénique KPC, l'association de l'anticorps agoniste CD40 FGK45 avec la gemcitabine a montré une régression tumorale de 30%. L'anticorps seul a donné des taux de régression comparables, alors que la gemcitabine seule n'a pas donné de réponse. Cette réponse a été associée in vivo à une augmentation de la capacité de sécrétion de cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-17 notamment) par les cellules CD4+ et CD8+. Un effet sur les TAMs a aussi été retrouvé après traitement par l'agoniste CD40, avec une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  (Beatty et al. 2011). L'association de l'activation du CD40 et le blocage du CSF1-R (récepteur du « colony stimulating factor 1 ») a également amené à d'importantes modifications des infiltrats immunitaires intra-tumoraux, avec une diminution ds TAMs et des LTs régulateurs Foxp3+. Cette diminution est associée à une augmentation de la différenciation et de la maturation des macrophages pro-inflammatoires et des cellules dendritiques, avec une réponse T effectrice améliorée (Wiehagen et al. 2017).

En outre, le ciblage des TAMs en inhibant le CSF1-R ou le CCR2 par des inhibiteurs spécifiques (GW2580 et PF-04136309) améliore l'efficacité de la chimiothérapie, bloque l'apparition de métastases, et accroît la réponse T anti-tumorale (Mitchem et al. 2013 ; Zhu et al. 2014 ; Candido et al. 2018). D'autres essais cliniques associant des inhibiteurs du récepteur au CSF1 sont en cours (NCT02713529, NCT02526017).

L'inhibition du CCR2 des TAMs en combinaison avec le FOLFIRINOX a fait l'objet d'une étude de phase 1, avec des résultats intéressants, avec un contrôle de la progression tumorale chez 97% des patients (Nywening et al. 2016). Une étude récente indique cependant que

l'inhibition du CCR2 entraîne une compensation et le recrutement de TANs CXCR2+, corrélés à un mauvais pronostic. Le ciblage concomitant des TAMs CCR2+ et des TANs CXCR2+ semble une stratégie prometteuse (Nywening et al. 2018).

Les cellules myéloïdes suppressives ou MDSC ont un rôle très important dans la réduction de la réponse immunitaire pro-tumorale, *via* leur effet inhibiteur sur l'activation des cellules T au sein du microenvironnement tumoral. Une étude a récemment montré que l'interleukine-12 pouvait non seulement promouvoir la réponse immunitaire anti-tumorale, mais également altérer l'activité des MDSC en les modifiant fondamentalement. Les MDSC traitées par l'IL-12 montrent des marqueurs de surface indiquant une différenciation en cellules matures, ainsi que la baisse de l'ARNm de NOS (« Nitric oxyde synthase ») et d'IFN- $\gamma$ . Parallèlement, l'IL-12 provoque une diminution du pourcentage de MDSC dans le microenvironnement, et une augmentation du pourcentage de cellules CD8+ actives. Enfin, le traitement par IL-12 provoque une augmentation de la survie moyenne associée à une forte diminution des métastases (Stedeing et al. 2011). De Henau et ses collaborateurs ont également mis en évidence que le ciblage de l'isoforme  $\gamma$  de la PI3K par un inhibiteur sélectif pouvait modifier le microenvironnement immunitaire et promouvoir la réponse T cytotoxique, et restaurer la sensibilité aux inhibiteurs de checkpoints immunitaires comme les anti-CTLA4 (De Henau et al. 2016).

L'immunoglobine « Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 » ou CTLA-4 est un récepteur impliqué dans la régulation négative du système immunitaire. Il est retrouvé à la surface des cellules T, et sa stimulation provoque l'inactivation de la cellule. L'utilisation d'antagonistes du CTLA-4 peut donc permettre d'augmenter la réponse immunitaire dans certains cancers. L'ipilimumab est un anticorps monoclonal humain, antagoniste du CTLA-4, autorisé depuis 2011 dans le traitement du mélanome métastatique. Il n'a pas encore montré d'efficacité seul dans le traitement du PDAC, mais des résultats intéressants ont été obtenus en association avec le GVAX, un vaccin à base de cellules tumorales transfectées pour sécréter la cytokine immunostimulante GM-CSF (« Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor »), et irradiées pour éviter la multiplication des cellules injectées. La survie moyenne était de 5,7 mois pour l'association ipilimumab-GVAX, contre 3,6 mois pour l'ipilimumab seul (Le et al. 2013). Plusieurs études cliniques sont actuellement en cours pour coétudier l'efficacité de l'ipilimumab associé ou non au GVAX et à différentes chimiothérapies. Les anti-PD1 sont une autre génération d'inhibiteurs de checkpoints immunitaires ; ils bloquent l'interaction entre

la protéine PD-1 (« programmed cell death protein 1 ») sur les LTs et son ligand PD-L1 à la surface des cellules cancéreuses. Une étude clinique de phase 1 a récemment montré la bonne tolérance du pembrolizumab sur 49 patients (Weiss et al. 2017), et une dizaine d'essais sont actuellement en cours dans le PDAC (Martinez-Bosch et al. 2018). Récemment, Brooks et ses collaborateurs ont montré sur des modèles murins de PDAC résecable que l'association néo-adjuvante de gemcitabine et d'un anti-PD-1 permettait de diminuer les rechutes après opération, de réduire l'apparition de métastases et d'augmenter largement la survie. Cet effet bénéfique passe par une activation de la réponse T cytotoxique et des cellules NK. De plus, en bloquant le récepteur CD96, inhibiteur des cellules NK, les auteurs réduisent encore les rechutes et obtiennent des animaux avec une survie à long terme (Brooks et al. 2017).

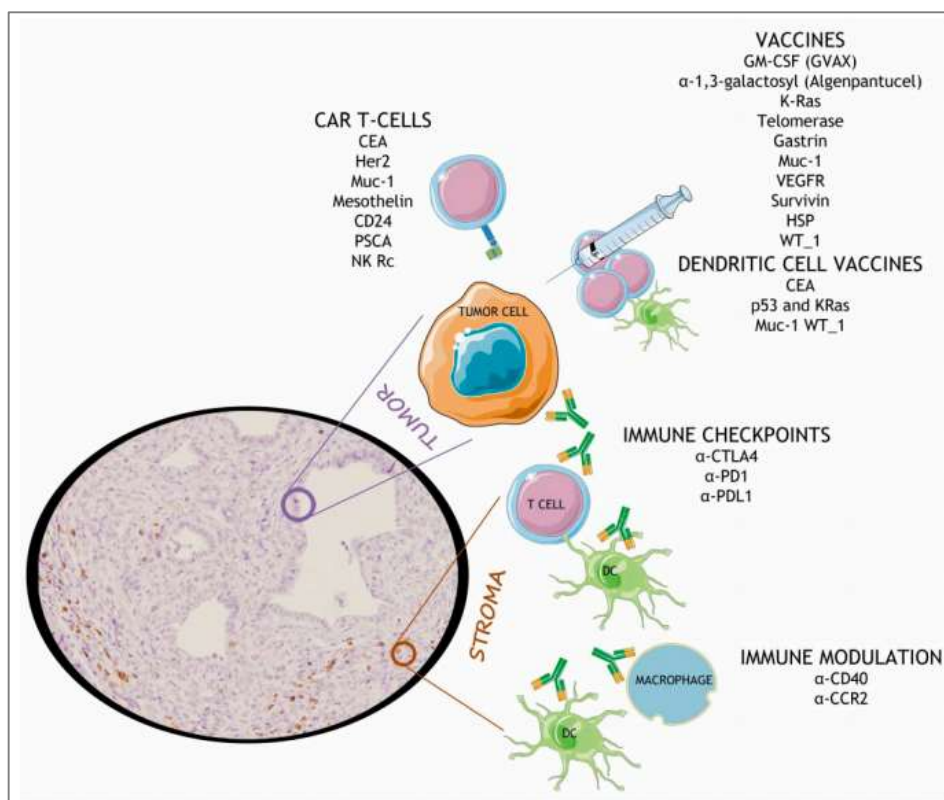
Les cellules dendritiques sont des importants déclencheurs de la réponse immunitaire adaptative. Sur des souris ayant reçu une greffe de cellules cancéreuses pancréatiques, l'association gemcitabine et injection de cellules dendritiques a montré une diminution de plus de 50% du volume tumoral et une forte augmentation de la survie (40 jours avec la gemcitabine seule contre presque 200 pour l'association avec les cellules dendritiques). Cette augmentation de survie était associée à une forte augmentation des cellules T CD8+, de la concentration en IFN- $\gamma$  (Ghansah et al. 2013). Plusieurs essais cliniques à venir permettront de confirmer ces résultats encourageants.

Enfin, une stratégie récente qui pourrait révolutionner l'immunothérapie est le transfert adoptif de cellules T, dans lequel des lymphocytes T cytotoxiques autologues ou allogéniques spécifiques de tumeurs sont perfusés chez des patients cancéreux dans le but de reconnaître, cibler et détruire les cellules tumorales. L'approche la plus prometteuse consiste à utiliser des cellules T génétiquement modifiées pour exprimer des récepteurs antigéniques chimériques (CAR-T) spécifiques d'antigènes tumoraux (tels que CEA, EGFR, Her2, MUC1, mésothéline, CD24 et PSCA). Cette stratégie a relativement bien fonctionné dans les études précliniques sur le cancer du pancréas, avec des CAR-T ciblant l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) (Chmielewski et al. 2012) ou la mésothéline (Stromnes et al. 2015), et des résultats impressionnants ont été obtenus avec des CAR-T ciblant l'antigène Her2/neu et la mucine membranaire MUC1 dans un modèle de xéno greffes (Maliar et al. 2012 ; Posey et al. 2016). Très récemment, l'équipe de Heeschen a utilisé des cellules CAR-T associées à des molécules « interrupteur » reconnaissant le Her2, permettant de moduler la réponse T en fonction du niveau d'expression du Her2 et limitant ainsi les effets « off-target »



dus à l'expression de Her2 dans différents tissus. Ces molécules font le lien entre les antigènes tumoraux et les cellules CAR-T, et limitent l'immunogénicité souvent problématiques de ces cellules CAR-T. Dans des modèles de PDXs très agressifs et métastatiques, ce système a permis d'induire des remissions complètes (Raj et al. 2018).

De nombreux efforts ont été réalisés pour appliquer les immunothérapies, ayant montrées une efficacité impressionnante dans d'autres cancers comme le mélanome, au PDAC. Les résultats n'ont pas pour l'instant été à la hauteur des espérances. Le microenvironnement immunosuppresseif du PDAC donne un rationnel au développement de traitements qui le ciblent, mais il rend les stratégies compliquées. Des associations plus sophistiquées seront nécessaires, ainsi qu'une classification personnalisée des patients pour espérer de meilleurs résultats.



**Figure 32 : Stratégies d'immunothérapies dans la prise en charge du PDAC**

**(Martinez-Bosch et al. 2018)**

## 4) Ciblage des CAFs

### a) Reprogrammer les CAFs

Nous avons vu dans la deuxième partie de ce travail qu'il était maintenant admis que plusieurs sous-populations de CAFs coexistaient au sein d'une même tumeur primaire, avec des fonctions biologiques différentes (Ohlund et al. 2017 ; Costa et al. 2018). Il a également été démontré que ces CAFs n'avaient pas un rôle exclusivement protumoral, et que leur élimination, plutôt que de ralentir la progression tumorale, induisait au contraire une immunosuppression, une vascularisation plus développée et un PDAC plus agressif (Ozdemir et al. 2014 ; Rhim et al. 2014). Ces données mènent à l'hypothèse que la reprogrammation des CAFs vers un phénotype moins activé en ciblant des gènes ou des voies de signalisation dérégulées serait une alternative thérapeutique plus efficace que leur déplétion.

Les angiotensines I et II sont des peptides impliqués dans la régulation de la pression artérielle. Au niveau du microenvironnement, l'angiotensine II favorise l'activation des cellules étoilées pancréatiques en CAFs en stimulant l'expression de  $\alpha$ -SMA et de TGF $\beta$ . L'utilisation de bloqueurs du récepteur de l'angiotensine et d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine en association avec la gemcitabine affecte significativement la survie moyenne des patients avec un cancer du pancréas (15,1 mois contre 8,9 avec la gemcitabine seule) (Nakai et al. 2010). L'utilisation d'olmesartan, un antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II (ARAI) a montré une inhibition de la croissance tumorale sur des modèles murins avec co-xénogreffe CAFs-cellules cancéreuses, mais pas dans les injections de cellules cancéreuses seules, suggérant un effet sur les CAFs. Cette inhibition était corrélée à une diminution de l'expression du marqueur  $\alpha$ -SMA et de la production de collagène par les CAFs (Masamune et al. 2013). Il a également été montré que le traitement par losartan, un autre ARAII, favorisait l'arrivée de 5-FU au sein de la tumeur en augmentant fortement la vascularisation et la perfusion par une forte diminution du collagène et de l'acide hyaluronique et en réduisant l'expression de signaux pro-stroma (notamment le TGF $\beta$ ). Ils ont également montré que les CAFs exprimaient des hauts niveaux de récepteurs à l'angiotensine I et II et donc que les CAFs étaient des importants médiateurs de cet effet thérapeutique (Chauhan et al. 2013). Actuellement, deux essais cliniques de phase II qui associent le losartan à des chimiothérapies et des immunothérapies sont en cours (NCT03563248, NCT01821729)

Le ciblage de la voie SDF-1-CXCR4 est un axe thérapeutique intéressant. Le récepteur de chimiokine CXCR4 est surexprimé dans l'adénocarcinome du pancréas et est corrélé à un mauvais pronostic. Le ligand SDF-1 ou CXCL12 est exprimé par les CAFs, et l'activation du récepteur CXCR4 influence fortement la prolifération, l'invasion, la chimiorésistance des cellules cancéreuses, ainsi que le développement de métastases. Feig et ses collaborateurs ont montré que la déplétion des CAFs FAP-positifs, potentiellement un sous-type de CAFs sécrétant des hauts niveaux de CXCL12, induisait le contrôle de la croissance tumorale par les cellules immunitaires, et restaurait l'efficacité d'inhibiteurs de checkpoints immunitaires. De plus, l'utilisation d'un antagoniste de CXCR4, permettait une accumulation de LTs au sein de la tumeur, avec une synergie avec les anti-PDL1, et une réduction drastique du volume tumoral (Feig et al. 2013). Deux essais cliniques précoces (phase I) sont en cours pour tester la tolérance des patients au plérixafort, un antagoniste du CXCR4.

Une autre étude publiée en 2014 a démontré que les CAFs exprimaient le récepteur à la vitamine D (VDR), et que le traitement avec le calcipotriol, un ligand du VDR, permettait de moduler l'activation des PSCs et de reprogrammer les CAFs, *in vitro* et *in vivo*. Le traitement restaure un phénotype de PSCs quiescentes, avec la présence de gouttelettes lipidiques, et une diminution de nombreux gènes impliqués dans la tumorigenèse pancréatiques (ligands de la voie Wnt, protéines de matrice, interleukines, chimiokines). Sur le modèle KPC, le calcipotriol en association avec la gemcitabine permet une réduction importante du volume tumoral associée à une diminution de la fibrose et une augmentation de la concentration intra-tumorale en gemcitabine triphosphate, et un doublement de la survie (Sherman et al. 2014). Le paricalcitol, un analogue de la vitamine D, est testé en association avec des immunothérapies et des chimiothérapies.

L'acide rétinoïque, une petite molécule dérivée de la vitamine A, a récemment montré sur des co-cultures de CAFs et de cellules tumorales un effet inhibiteur sur la migration des cellules cancéreuses pancréatiques et sur la transition épithélio-mésenchymateuse (diminution d'expression de N-cadhérine, vimentine et Snail). Cet effet passe par une diminution des composants et des sécrétions caractéristiques des CAFs ( $\alpha$ -SMA, FAP, IL-6), et de la production de matrice extracellulaire (fibronectine et laminine), ainsi que par une diminution de l'activation des cellules étoilées en CAFs (Froeling et al. 2011 ; Guan et al. 2014). Sur le modèle KPC, l'ATRA (« all-trans retinoic acid ») induit une inhibition de la voie Wnt, avec une diminution de la  $\beta$ -caténine nucléaire, associée à une réduction de l'index prolifératif et

de la fibrose (Froeling et al. 2011). Une autre étude plus récente confirme que l'ATRA est bien capable de reprogrammer les CAFs, et de restaurer la quiescence *via* un mécanisme impliquant une réduction de la contractilité de la MLC2. L'ATRA supprime aussi le remodelage de la matrice et inhibe ainsi l'invasion locale (Chronopoulos et al. 2016). Un essai clinique de phase I est actuellement en cours pour évaluer la toxicité et la dose efficace de l'ATRA, en association avec la gemcitabine et le *nab*-paclitaxel (NCT03307148).

Les travaux de l'équipe de Apte utilisent quant à eux l'inhibition de voies impliquées dans les échanges CAFs-cellules cancéreuses. Ils montrent que les CAFs sécrètent du HGF, et que le récepteur c-Met est exprimé par les cellules cancéreuses pancréatiques. En associant la chimiothérapie et l'inhibition de HGF et de c-Met, ils montrent une réduction drastique de la croissance tumorale et du développement de métastases, associée à une réduction des marqueurs de cellules souches dans un modèle de greffes orthotopiques (Pothula et al. 2016 ; Pothula et al. 2017). Un essai de phase I recrute actuellement des patients pour tester les doses maximales tolérées de ficlatuzumab, un inhibiteur du HGF, en association avec la gemcitabine et le *nab*-paclitaxel (NCT03316599).

D'autres études récentes du groupe de Saluja montrent que le minnelide, une drogue dérivée du triptolide, molécule d'origine naturelle dont le mécanisme d'action est à l'étude (inhibiteur d'ARN polymérase, inhibiteur de « heat shock proteins ») dans de nombreux cancers, était capable de reprogrammer les CAFs vers un état quiescent, non-prolifératif. Le triptolide réduit l'activation de la voie du TGF $\beta$  dans les CAFs, ainsi que la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire. Dans un modèle de co-greffes orthotopique, le minnelide réduit le volume tumoral et l'apparition de métastases (Banerjee et al. 2016 ; Dauer et al. 2018).

Enfin, une dernière stratégie consiste en l'utilisation d'analogues de somatostatine pour cibler les sécrétions des CAFs, et ainsi agir sur leurs différents effets protumoraux. La dernière partie de ce travail s'intéresse à cette approche, et a fait l'objet de mes travaux de thèse.

## b) Somatostatine et Analogues de Somatostatine

### i- Fonctions biologiques

La somatostatine est une hormone endogène isolée en 1973 (Brazeau et al. 1973). A l'origine découverte pour son rôle inhibiteur de l'hormone de croissance, il est maintenant connu que la somatostatine a un large spectre de fonctions biologiques (Guillemin et al. 2008). Elle est sécrétée au niveau du système nerveux central et périphérique, du tractus gastro-intestinal, par les cellules  $\delta$  des îlots de Langerhans du pancréas, et également de manière moins abondante par la thyroïde, les glandes surrénales et la rétine (Kumar et al. 2010). Deux formes endogènes actives sont retrouvées, la somatostatine-14 et -28 (composées de 14 et 28 acides aminés), qui sont des produits d'une dégradation enzymatique tissu-spécifique d'une longue molécule précurseur de 116 acides aminés dite pré-prosomatostatine (Schally et al. 1980).

Son rôle est un rôle inhibiteur de nombreuses fonctions biologiques. Elle régule les fonctions cognitives, locomotrices et sensorielles au niveau du système nerveux en inhibant la sécrétion de dopamine, de norépinephrine, de l'hormone de croissance ou encore de l'hormone adrénocorticotrophine (ACTH). Dans le système digestif, la somatostatine inhibe les sécrétions endocrines de glucagon et d'insuline notamment, régulant ainsi l'équilibre glycémique, mais également les sécrétions exocrines (amylase, acide gastrique, bile) et la motilité intestinale. Elle inhibe également la libération de nombreux facteurs de croissance comme l'EGF, l'IGF-1, le PDGF, ainsi que de cytokines comme l'IL-6 et l'IFN- $\gamma$ , et participe ainsi à la régulation des réponses immunitaires (Rai et al 2015).

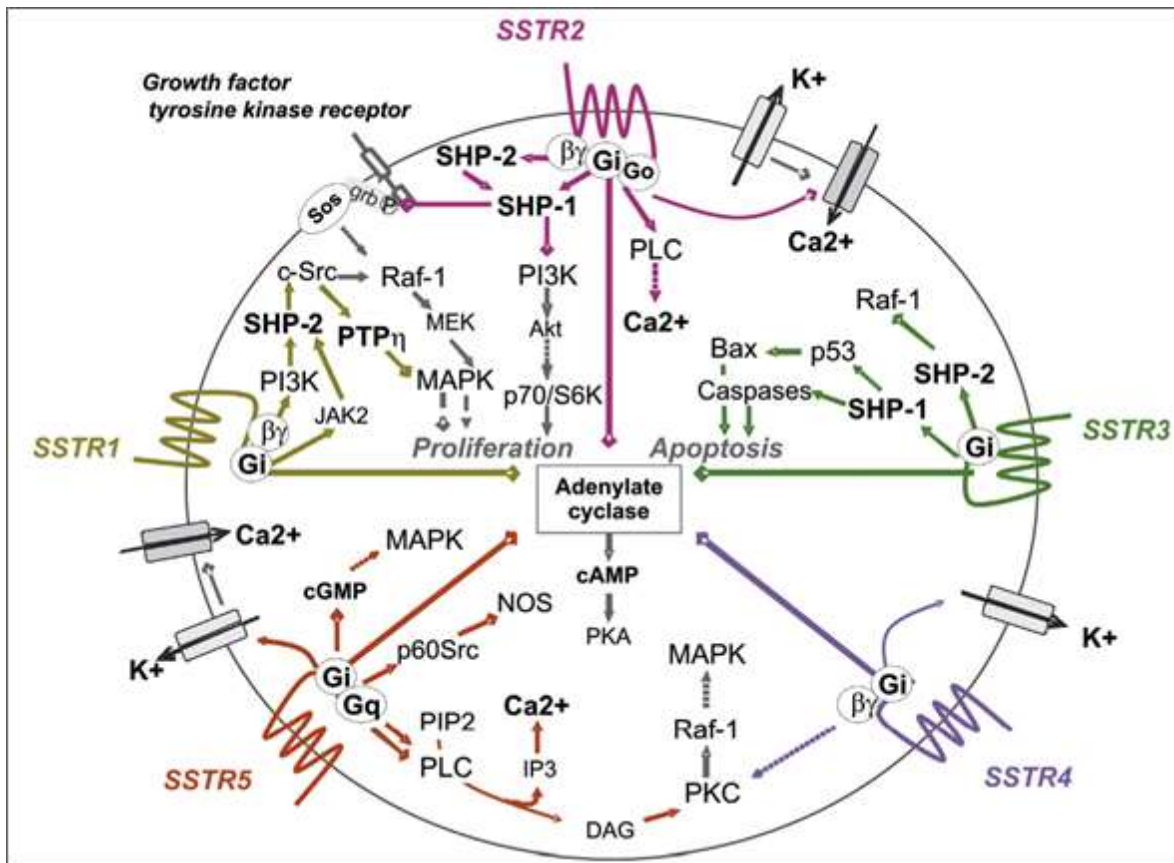
### ii- Récepteurs de somatostatine

La somatostatine exerce ses effets *via* cinq récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G, les récepteurs sst1 à sst5. Ces récepteurs présentent entre eux des homologies de séquence et de structure, mais leur expression est variable selon les types cellulaires, ainsi que leur nature tumorale ou non. Ils possèdent en plus des affinités différentes pour leurs ligands (somatostatine-14 et -28, cortistatine, analogues synthétiques).

Dans un organisme sain, les récepteurs sont largement distribués, mais majoritairement retrouvés au niveau du cerveau, du pancréas, de l'estomac et des reins. Il a

également été montré que différentes sous-populations de cellules immunitaires, lymphocytes et monocytes, présentaient à leur surface des récepteurs de somatostatine (Elliott et al. 1999 ; Dalm et al. 2003 ; Armani et al. 2007). Au niveau tumoral, leur expression est aussi variable selon le type tumoral. Elle a été particulièrement décrite dans les tumeurs neuroendocrines, hypophysaires et gastro-entéro-pancréatiques dans lesquelles les récepteurs sst2 et sst5 sont le plus souvent exprimés, et même utilisables en thérapeutique de par l'utilisation d'analogues de somatostatine les ciblant, et en diagnostic (Octréoscan® : analogue de somatostatine associé à un isotope radioactif détectable au scanner lorsqu'il se fixe sur les cellules tumorales exprimant des récepteurs). Au contraire, les cellules cancéreuses d'adénocarcinome pancréatique expriment peu de récepteurs à la somatostatine. Les travaux de Buscail en 1996 ont mis en évidence une perte d'expression du récepteur sst2 au cours de la cancérogénèse pancréatique. Plus tard, le rôle suppresseur de tumeur du récepteur sst2 a été démontré à l'aide du modèle transgénique murin où l'oncogène muté  $Kras^{G12D}$  est spécifiquement exprimé dans les cellules pancréatiques ; dans ce modèle, la délétion hétérozygote du gène SSTR2 conduit à une accélération de la cancérogénèse pancréatique initiée par l'activation constitutive de Kras (Chalabi-Dchar et al. 2015).

La fixation du ligand somatostatine à son récepteur entraîne la transduction de différents signaux intracellulaires, dépendant d'un complexe protéique membranaire incluant des protéines G, des protéines de structure et des enzymes, entraînant ainsi l'activation ou l'inhibition de différentes voies de transduction spécifique à chaque sous-type de récepteur et au type cellulaire sur lequel il est exprimé. Les voies de signalisation régulées par chaque sous-type de récepteurs de somatostatine sont décrites dans la figure 33.

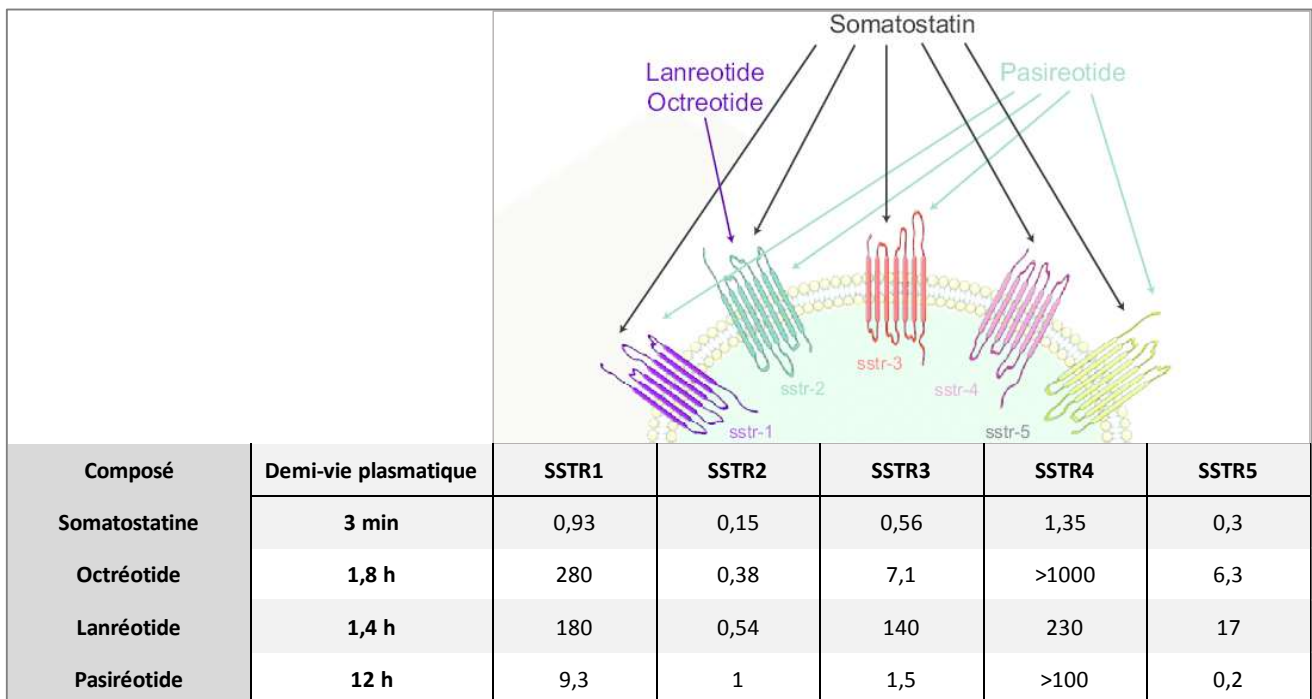


**Figure 33 : Voies de signalisation régulées par les sous-types de récepteurs à la somatostatine (Theodoropoulou et Stalla 2013)**

Les effets anti-sécrétoires de la somatostatine résultent de sa capacité à inhiber les exocytoses cellulaires, et passent par les récepteurs sst1, sst2 et sst5. Cette propriété résulte de l'inhibition de canaux calcium voltage-dépendant et de la stimulation de canaux potassiques, qui diminuent la concentration de calcium intracellulaire et inhibent l'adénylate cyclase, responsable de la diminution de l'AMP cyclique intracellulaire. Ces effets anti-sécrétoires justifient l'utilisation d'analogues de somatostatine pour le traitement de tumeurs neuroendocrines, dans lesquelles les symptômes cliniques sont inhérents à une hypersécrétion hormonale. L'activation des récepteurs de somatostatine à la surface des cellules tumorales transduit également une diminution de prolifération ou de la survie cellulaire, principalement par arrêt du cycle cellulaire *via* une modulation de la voie MAPK ou PI3K dépendante de l'activation de phosphotyrosine phosphatase (PTP) *via* sst1, sst2 ou sst5, alors que sst3 promeut plutôt une apoptose aussi dépendante de l'activité PTP, associée à une activation de p53 et à la protéine pro-apoptotique Bax (Theodoropoulou et Stalla 2013).

### iii- Analogues de somatostatine

La dégradation rapide de la somatostatine endogène (demi-vie plasmatique inférieure à 3 minutes) est incompatible avec une utilisation clinique et a conduit au développement d'analogues de somatostatine synthétiques plus stables, ciblant un ou plusieurs récepteurs avec différentes affinités. Si le lanréotide et l'octréotide ciblent essentiellement le récepteur sst2, le pasiréotide cible tous les récepteurs à l'exception du sst4 (Figure 34).



**Figure 34 : Affinité de la somatostatine endogènes et des principaux analogues pour les cinq récepteurs de somatostatine. Valeurs d'IC50 exprimées en nmol/L (Adapté de Bruns et al. 2002)**

L'octréotide a été la première molécule approuvée par la FDA en 1989. La formulation a été optimisée en 1998 pour permettre une libération progressive du principe actif grâce à un système de microsphères polymériques (octréotide-LAR, « Long Acting Release »). Son utilisation a été approuvée pour l'acromégalie, pathologie caractérisée par une hypersécrétion d'hormone de croissance par l'hypophyse, et pour les tumeurs neuroendocrines pancréatiques. Le dernier analogue synthétisé et approuvé est le pasiréotide, ou SOM230. Sa formulation commerciale permet également une libération prolongée, et il est utilisé dans la prise en charge de l'acromégalie (patients résistants à



l'octréotide), et du syndrome de Cushing (hypersécrétion d'ACTH par les cellules cancéreuses hypophysaires).

#### iv- Effets anti-tumoraux de la somatostatine

Si les analogues de somatostatine sont actuellement utilisés essentiellement pour la prise en charge de tumeurs neuroendocrines, il existe un rationnel fort pour envisager leur utilisation dans d'autres types de tumeurs. La somatostatine présente en effet une fonctionnalité anti-tumorale en limitant la croissance tumorale et la propagation métastatique, de manière directe et indirecte (Figure 35). Plusieurs cellules cancéreuses d'origines différentes expriment des récepteurs de somatostatine, ainsi que les cellules non-cancéreuses composant la tumeur.

- Effet direct sur les cellules tumorales

Les cinq récepteurs de somatostatine, une fois activés, sont capables d'induire un arrêt de la prolifération cellulaire en agissant sur des inhibiteurs du cycle comme p27 et p21 (« cyclin-dépendant kinase inhibitors »). Ces récepteurs activent des protéines tyrosine phosphatases qui vont cibler les résidus tyrosine phosphorylés par les récepteurs aux facteurs de croissance impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses. Ils sont ainsi capables d'inhiber des voies majeures de la carcinogénèse, comme la voie MAPK, la voie PI3K et le voie NO/GMPc (Pyronnet et al. 2008). Par exemple, la Src homology phosphatase-1 (SHP-1), une tyrosine phosphatase activée par le sst2, déphosphoryle la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K, et par suite la kinase Akt, largement impliquée dans la prolifération cellulaire (Bousquet et al. 2006). La voie MAPK Erk1/2 est également inhibée par tous les récepteurs, excepté sst4, et passe par l'activation de kinase JAK2 et Src, puis de la phosphatase SHP-2 et de la phosphatase PTP $\eta$  qui déphosphoryle Erk1/2 (Barbieri et al. 2008).

Les récepteurs de somatostatine sont également capables d'induire l'apoptose *via* deux principales voies, la voie extrinsèque par l'intermédiaire de récepteurs de ligands (TNF $\alpha$ , Fas-L et TRAIL) et la voie intrinsèque, dite mitochondriale (Guillermet et al. 2003). Les analogues de somatostatine peuvent induire l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax en aval de l'activation de sst3, ou inhiber la production de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 *via* sst2 (Sharma et al. 1996 ; Guillermet et al. 2003). ). Il a été

montré que la restauration de l'expression de sst2 dans des cellules cancéreuses pancréatiques induit une augmentation de production de la thrombospondine-1, une protéine anti-angiogénique (Laklai et al. 2009). La somatostatine diminue aussi la production par les cellules cancéreuses de différentes molécules pro-angiogéniques telles que le VEGF (Pyronnet et al. 2008).

L'inactivation des protéines G Rac et Rho par la somatostatine empêche la formation de lamellipodes et de fibres de stress par les cellules cancéreuses (Buchan et al. 2002), et l'activation de la SHP-1 restaure les fonctions de l'E-cadhérine, ces deux propriétés entraînent une inhibition des capacités invasives de ces cellules (Benali et al. 2000).

Enfin, l'inhibition de la sécrétion par la cellule tumorale de facteurs de croissance et d'hormones exerçant par voie paracrine ou autocrine des effets mitogènes, anti-apoptotiques et pro-invasifs au sein des tumeurs contribue également largement à l'effet anti-tumoral de la somatostatine et de ses analogues (Mentlein et al. 2001).

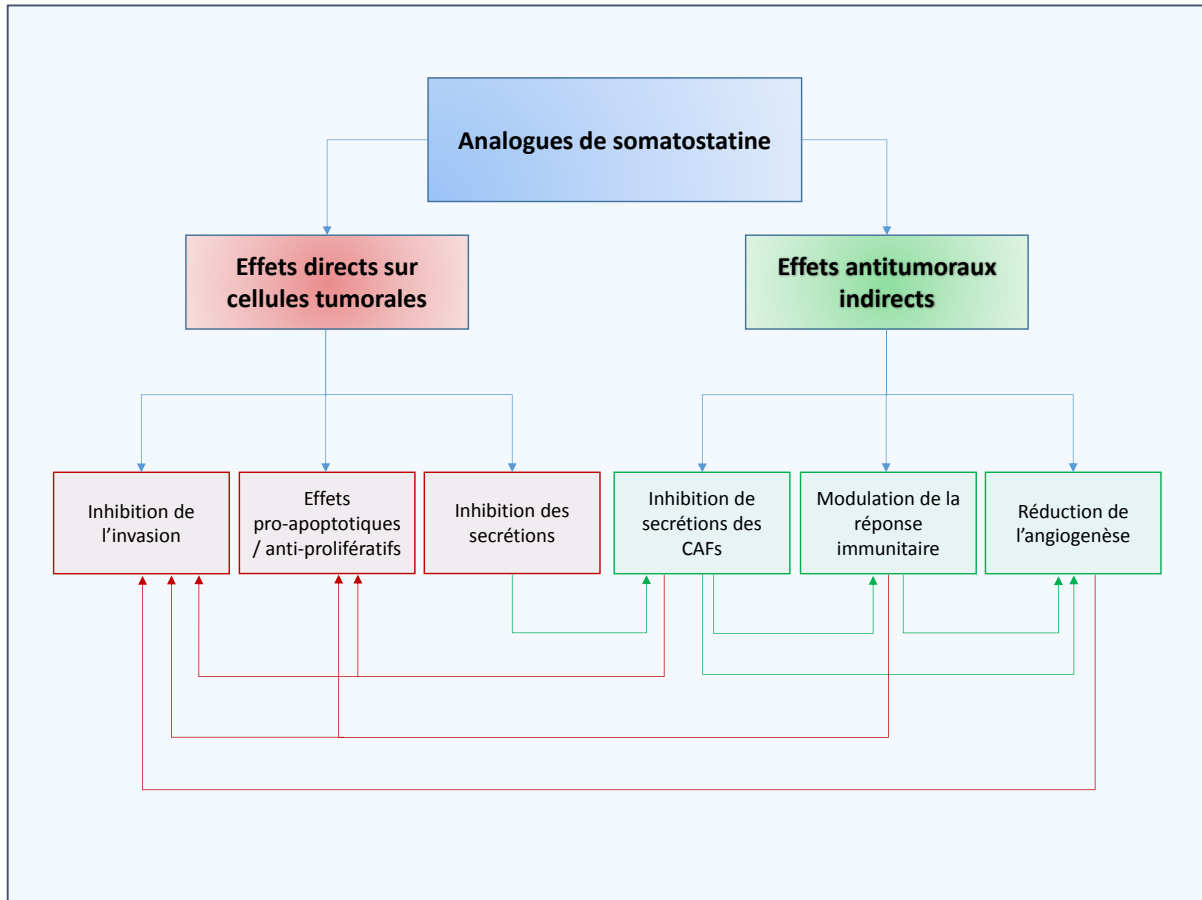
- Effets anti-tumoraux indirects

Grâce à un effet anti-angiogénique, les analogues de somatostatine peuvent ralentir la croissance tumorale et le développement de métastases. Il a été montré que les cellules endothéliales tumorales prolifératives exprimaient des récepteurs de somatostatine, et que l'angiogenèse était inhibée *in vitro* et *in vivo* après traitements par des analogues (Watson et al. 2001 ; Adams et al. 2005). De plus, la somatostatine cible aussi les autres cellules sécrétrices du microenvironnement, monocytes et fibroblastes, impliqués également dans la simulation de l'angiogenèse (Albini et al. 1999).

Il a également été montré, en conditions non-tumorales, que les cellules immunitaires, lymphocytes T et B, monocytes, macrophages, pouvaient présenter des récepteurs de somatostatine (Lichtenauer-Kaligis et al. 2004 ; Armani et al. 2007 ; van Hagen et al. 2008). Il semblerait que la somatostatine soit capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T (Ferone et al. 2002), ainsi que la production de cytokines. Elle inhibe aussi la sécrétion d'immunoglobuline par les lymphocytes B, et induit un effet plutôt suppresseur sur les fonctions effectrices des monocytes et des macrophages.

Enfin, des travaux ont mis en évidence un rôle des analogues de somatostatine sur les cellules étoilées pancréatiques (PSCs), hépatiques (HSCs) et le développement de fibrose.

En 2002, Andoh et ses collaborateurs ont montré dans des modèles de pancréatite que les fibroblastes péri-acinaires pancréatiques exprimaient les récepteurs sst1 et sst2, et que la somatostatine inhibait la sécrétion d'IL6 dans ces cellules (Andoh et al. 2002). Le groupe de Geerts a démontré que la somatostatine réduisait la synthèse du collagène I et III, l'expression de l' $\alpha$ -SMA, ainsi que la contraction des cellules hépatiques étoilées de rat, et que la somatostatine pouvait être utilisée pour réduire l'hypertension du système porte hépatique (Reynaert et al. 2001 ; Reynaert et al. 2005). Plus récemment, une étude a montré que l'octréotide ralentissait la prolifération de cellules étoilées pancréatiques, mais aussi qu'il inhibait les expressions de l' $\alpha$ -SMA, du collagène I et du TGF $\beta$  *in vitro* et *in vivo* et réduisait la fibrose consécutive à une greffe chez le rat (Long et al. 2012). Enfin, les travaux de Duluc ont mis en évidence le rôle anti-tumoral de l'analogue SOM230, ou pasiréotide. Ils ont mis en évidence que le milieu conditionné de CAFs, contenant leurs sécrétions, étaient capables d'induire une résistance à la chimiothérapie des cellules cancéreuses pancréatiques. *Via* le récepteur sst1 à la surface des CAFs, le SOM230 bloque la synthèse protéique, notamment de l'IL6, en inhibant la voie mTOR/4EBP1, restaurant ainsi la chimiosensibilité de cellules cancéreuses pancréatiques, *in vitro* et sur des modèles de greffes sur souris immunodéficientes (Duluc et al. 2015). L'association pasiréotide-gemcitabine a récemment fait l'objet d'une étude clinique de phase 1 sur des patients atteints de PDAC localement avancés et métastatiques. Cette étude a montré une bonne tolérance des traitements, avec une survie médiane de 6.9 mois. Le dosage plasmatique de l'IGF-1 était utilisé comme marqueur de réponse au traitement et le niveau d'IGF-1 était plus bas chez les patients avec une maladie stabilisée (Suleiman et al. 2015).



**Figure 35 : Effets anti-tumoraux directs et indirects des analogues de somatostatine (Adapté de Chalabi et al. 2014)**

Ces résultats sont à l'origine de mes travaux de thèse, qui avait pour objectif d'étudier les effets de l'association de l'analogue SOM230 seul ou en association avec la chimiothérapie dans des modèles murins, d'abord immunodéficient de greffes orthotopique de cellules cancéreuses pancréatiques humaines en présence de CAFs (1ère partie de mes résultats expérimentaux), puis immunocompétents d'adénocarcinome pancréatique spontané ou de greffe orthotopique syngénique de cellules tumorales murines avec ou sans PSC (2ème partie de mes résultats expérimentaux).



# **RESULTATS EXPERIMENTAUX**



## I) Potentiel anti-métastatique du SOM230 : ciblage pharmacologique indirect des fibroblastes associés au cancer

La première partie de mes travaux de thèse a consisté à la finalisation d'un premier article, publié en 2016 dans la revue *Oncotarget* (co-premier auteur). Ces travaux font suite à l'article publié par notre équipe en 2015, qui avait mis en évidence un effet inhibiteur du SOM230 sur les sécrétions des CAFs. Les cellules cancéreuses exposées aux sécrétions de CAFs devenaient résistantes à la gemcitabine, mais le blocage de la synthèse protéique, et notamment de l'interleukine-6 (IL-6), dans les CAFs par le SOM230 permettait de restaurer la sensibilité à la gemcitabine de cellules cancéreuses.

Dans cette nouvelle étude, toujours en utilisant des primo-cultures de CAFs isolées de pièces opératoires de patients et des lignées de cellules cancéreuses pancréatiques humaines, nous avons mis en évidence un effet stimulant majeur des sécrétions de CAFs sur les capacités de prolifération, d'invasion et de migration des cellules cancéreuses. Cet effet passe par la sécrétion d'IL-6 par les CAFs et l'activation de la voie PI3K dans les cellules cancéreuses. Le ciblage du récepteur sst1 des CAFs avec l'analogue de somatostatine SOM230 permet de le limiter. Enfin, sur un modèle de co-xénogreffes orthotopiques de cellules cancéreuses pancréatiques et de CAFs, le SOM230 présente un effet anti-métastatique en bloquant l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse par les CAFs.



## Anti-metastatic potential of somatostatin analog SOM230: Indirect pharmacological targeting of pancreatic cancer-associated fibroblasts

Siham Moatassim-Billah<sup>1,2,\*</sup>, Camille Duluc<sup>1,\*</sup>, Rémi Samain<sup>1,\*</sup>, Christine Jean<sup>1</sup>, Aurélie Perraud<sup>3</sup>, Emilie Decaup<sup>1</sup>, Stéphanie Cassant-Sourdy<sup>1</sup>, Youssef Bakri<sup>2</sup>, Janick Selves<sup>4</sup>, Herbert Schmid<sup>5</sup>, Yvan Martineau<sup>1</sup>, Muriel Mathonnet<sup>3</sup>, Stéphane Pyronnet<sup>1</sup>, Corinne Bousquet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), INSERM UMR 1037-University Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

<sup>2</sup>Biochemistry-Immunology Laboratory, Faculty of Sciences Rabat, University Mohammed V - Agdal, Morocco

<sup>3</sup>Limoges University, EA 3842 Laboratory, Medicine and Pharmacy Faculties, Limoges, France

<sup>4</sup>Pathology Department, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, Toulouse, France

<sup>5</sup>Oncology Global Development, Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland

\*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Corinne Bousquet, e-mail: corinne.bousquet@inserm.fr

Keywords: pancreatic cancer, tumor microenvironment, cancer-associated fibroblasts, metastasis, somatostatin analog SOM230

Received: July 16, 2015

Accepted: March 31, 2016

Published: May 12, 2016

### ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) shows a rich stroma where cancer-associated fibroblasts (CAFs) represent the major cell type. CAFs are master secretors of proteins with pro-tumor features. CAF targeting remains a promising challenge for PDA, a devastating disease where treatments focusing on cancer cells have failed. We previously introduced a novel pharmacological CAF-targeting approach using the somatostatin analog SOM230 (pasireotide) that inhibits protein synthesis in CAFs, and subsequent chemoprotective features of CAF secretome. Using primary cultures of CAF isolated from human PDA resections, we here report that CAF secretome stimulates *in vitro* cancer cell survival, migration and invasive features, that are abolished when CAFs are treated with SOM230. Mechanistically, SOM230 inhibitory effect on CAFs depends on the somatostatin receptor subtype sst1 expressed in CAFs but not in non-activated pancreatic fibroblasts, and on protein synthesis shutdown through eIF4E-Binding Protein-1 (4E-BP1) expression decrease. We identify interleukin-6 as a SOM230-inhibited CAF-secreted effector, which stimulates cancer cell features through phosphoinositide 3-kinase activation. *In vivo*, mice orthotopically co-xenografted with the human pancreatic cancer MiaPaCa-2 cells and CAFs develop pancreatic tumors, on which SOM230 treatment does not inhibit growth but abrogates metastasis. Consistently, CAF secretome stimulates epithelial-to-mesenchymal transition in cancer cells, which is reversed upon CAF treatment with SOM230. Our results highlight a novel promising anti-metastatic potential for SOM230 indirectly targeting pancreatic cancer cell invasion through pharmacological inhibition of stromal CAFs.

### INTRODUCTION

Although tumorigenesis has classically been viewed as a largely cell-autonomous process involving genetically transformed cancer cells, the importance of stromal cell types populating the neoplastic microenvironment is now

well accepted and needs to be taken into account for future therapeutic strategies [1, 2]. A critical stromal component for tumorigenesis is cancer-associated fibroblasts (CAFs). CAFs are phenotypically and functionally distinguishable from their normal counterparts in their differential expression and secretion of extracellular matrix (ECM)

components and growth factors [3]. Several studies have demonstrated that normal fibroblasts have a role in maintaining epithelial homeostasis by suppressing proliferation and oncogenic potential of adjacent epithelia [4, 5]. However, following neoplastic transformation of epithelia, CAFs have been shown to promote tumor growth by inducing angiogenesis, inflammation, recruiting bone marrow-derived immunosuppressive cells, and remodeling the ECM [6, 7]. Interestingly, CAFs can even contribute to the resistance to antiangiogenic or chemotherapeutic therapy [8-10]. In cancers that present an extensive stroma reaction (also called desmoplasia), including pancreatic, breast, prostate or skin cancer, CAFs represent the major stromal cell population. By secreting pro-inflammatory factors as soon as the initiating hyperplastic phase of neoplasia, CAFs dialogue with epithelial cells to promote tumorigenesis [11]. This suggests that the therapeutic targeting of this cell population represents a promising strategy.

Somatostatin is a ubiquitous neuropeptide that inhibits many biological functions—including endocrine and exocrine secretion, gastric and intestinal motility, gallbladder contraction, angiogenesis, and cell proliferation—and induces apoptotic cell death. Its effects are mediated through five receptors that belong to the G-protein-coupled receptor family, sst1 to sst5 receptors, which bind natural somatostatin with high affinity. The short plasma half-life of natural somatostatin (~1.5 minutes) led to the development of analogs with higher stability, such as octreotide (Sandostatin; Novartis) (half-life of ~2 hours), that are used to treat pituitary and neuroendocrine tumors (NET). These analogs have high affinity for sst2 and sst5 receptors, lower affinity for sst3 receptor, and do not bind to sst1 or sst4 receptors. Pasireotide (SOM230) is a new, more stable analog with a plasma half-life of 12 hours [12]. It is considered a universal somatostatin analog because it binds to sst1, sst2, sst3, and sst5 with high affinity. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors express high number of somatostatin receptors, which make somatostatin analogs ideal for diagnostic and therapeutic purposes. By contrast, our team has demonstrated the absence of expression of somatostatin receptors in pancreatic cancer cells [13]. Sst2 expression is lost during pancreatic acinar cell transformation upon acquisition of Kras oncogenic mutation [14], which may explain the inefficacy of somatostatin analogs that target sst2 to inhibit their survival [13].

Beside its inhibitory effects on tumor cells, somatostatin could affect tumor progression by impacting on the stromal compartment. Interestingly, sst1 and sst2 are expressed in pancreatic and liver fibroblasts during pancreatitis and hepatitis, where they have been described to transduce somatostatin inhibitory action on inflammation and fibrosis, by inhibiting the secretion of pro-inflammatory cytokines and the production of

extracellular matrix [15, 16]. Our working hypothesis was that such fibro-inhibitory role of somatostatin may alter the pro-tumor activity of CAFs present in cancers where a desmoplastic reaction is prominent, including pancreatic cancer. Our results show that the pro-tumor effects of CAFs can be pharmacologically targeted using the SOM230 analog which presents a high affinity for sst1 that we previously found expressed in CAFs [17]. Strikingly, SOM230 demonstrates a potent anti-metastatic activity *in vivo* in an orthotopic co-xenografted (pancreatic cancer cells + CAFs) mouse model of desmoplastic pancreatic cancer.

## RESULTS

### High protein synthesis in CAFs is responsible for the secretion of growth-promoting factors – phenotype reversion with the somatostatin analog SOM230

PDA stroma is rich in CAFs that reside both inside the tumor and at the boundaries between the invasive cancer and the host pancreatic tissue. Secretion of growth factors and cytokines / chemokines by CAFs is critical for their pro-tumor functions. However underlying signaling mechanisms are unknown. To address this question, primary cultures of CAFs have been obtained from fifteen fresh human surgery-resected PDA tumors, of different stages and origin (Table 1), and that are positive for  $\alpha$ SMA (Figure 1A). CAFs have been isolated by the outgrowth method: After a few days, cells migrate out of the tumor tissue piece by outgrowth (Figure 1B). Isolated cells show a fibroblast-like phenotype as confirmed by the expression of vimentin, and have an “activated” phenotype since nearly 100 % of them also express the marker  $\alpha$ SMA (Figure 1C). Such phenotype is maintained throughout the passage of our primary cultures, until passage-10 where senescence occurs. Consistent with the literature, conditioned media (CM) isolated from those CAF primary cultures stimulate survival, migration and invasion of pancreatic cancer cells including Panc-1 and BxPC-3 (Figure 1D-I), confirming their pro-tumor properties. By contrast, immortalization of a CAF primary culture through overexpression of hTERT reverted its growth-promoting effect on cancer cells, in correlation with the loss of expression of  $\alpha$ SMA (Supplementary Figure 1A and 1B), confirming the StellaTUM recommendation to work with primary cultures of CAF only [18].

Importantly, we previously observed in our primary culture of CAFs a high intrinsic activation of the PI3K-mTORC1 pathway, as revealed by the phosphorylation of Akt, S6, and of the translation inhibitor 4E-BP1, resulting in high protein synthesis rates [17]. We have therefore questioned whether impacting on this pathway in CAFs may attenuate their pro-tumor features by affecting the synthesis and secretion of growth factors.

**Table 1: List of PDAC human tumors, with the corresponding histopathological grading, used for CAF isolation**

Tumors	Degree of differentiation of cancer cells	Stage
T1	well-differentiated	IIB
T2	moderately differentiated	IIB
T3	moderately differentiated	III
T4	moderately differentiated	III
T5	well-differentiated	IIA
T6	well-differentiated	IB
T7	poorly differentiated	IIB
T8	moderately differentiated	III
T9	poorly differentiated	III
T10	well-differentiated	III
T11	well-differentiated	III
T12	moderately differentiated	IIB
T13	well-differentiated	IB
T14	moderately differentiated	IIB
T15	well-differentiated	IB

We have previously demonstrated that somatostatin, a natural peptide physiologically secreted by  $\delta$ -pancreatic islet cells is able to inhibit the PI3K-Akt pathway in different cells where this pathway is activated [19-22]. Strikingly, CAF treatment with a novel pan-somatostatin analog SOM230 (Pasireotide® Novartis) does not directly affect their survival (Supplementary Figure 2), nor the survival of pancreatic cancer cells whether or not they are also exposed to CAF CM (Figure 1D, 1G, bars 4 & 5). However, when CAF are previously treated with SOM230, their CM fail to stimulate Panc-1 and BxPC-3 cell survival, migration and invasion (Figure 1D-1I, bar 3). These results demonstrate that CAF treatment with SOM230 reverses the pro-tumoral features of their CM. SOM230 inhibitory effect on cancer cells is indirect, acting solely on CAFs by regulating the composition in soluble growth-promoting factors of their secretome.

We then addressed how SOM230 regulates the expression of soluble growth factors in CAF CM, hypothesizing that it may rely on SOM230 inhibitory action on protein synthesis, as we previously reported [17]. We abrogated the expression of the inhibitor of mRNA translation 4E-BP1 by RNA interference (Figure 2A). Promoting effects of CAF CM on survival, migration and invasion of Panc-1 and BxPC-3 cells are maintained upon 4E-BP1 expression knock-down (Figure 2B-2G, compare bars 2 & 4). SOM230 inhibitory effect on these CAF features is not affected in the siRNA-CTR condition, but is reversed upon 4E-BP1 invalidation (Figure 2B-2G, compare bars 3 & 5). These results demonstrate that

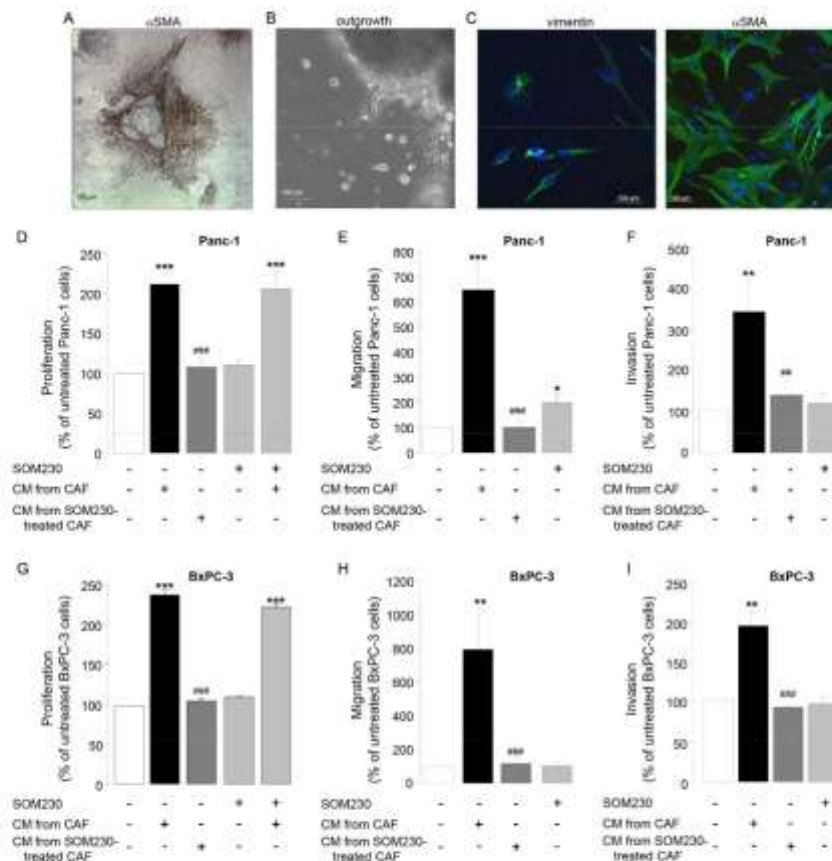
inhibition by SOM230 of the pro-tumor features of CAF CM is 4E-BP1-dependent.

#### **SOM230 reverses the pro-tumor properties of CAF secretions by activating the somatostatin receptor sst1**

To address how SOM230 affects CAF features, we investigated expression levels of somatostatin family receptors (sst1 to sst5) in CAFs. Quantitative RT-PCR analyses (Figure 3A), confirmed by Western-blot (Figure 3B), indicate that sst1 is expressed in isolated CAFs from PDA, but not in human pancreatic cancer cell lines, and in a level similar as in human neuroendocrine pancreatic tumor BON cells known to express high levels of sst1 and sst2 [23]. In contrast, sst2 is poorly expressed, and sst3, sst4 and sst5 are not expressed (Figure 3A & not shown). Immunohistochemistry analysis on serial PDA sections ( $n=10$ ) confirm *in situ* that the same stromal cells positive for  $\alpha$ SMA are also expressing sst1 (Figure 3C, arrows). In contrast, vimentin-positive fibroblasts present in healthy pancreas are  $\alpha$ SMA-negative and do not also express sst1 (Figure 3D, arrows). We then investigated whether sst1 transduces the inhibitory effect of SOM230 on the pro-tumor properties of CAF secretome. CM obtained from CAFs treated with octreotide, another somatostatin analog presenting a high binding-affinity for sst2 but unable to activate sst1, keep their stimulatory effect on pancreatic cancer cell survival (Supplementary Figure 3A and 3B), suggesting that sst1 but not sst2

mediates SOM230 action. To fully address *ss1* function in CAFs, *ss1* expression has been knock-down using RNA interference. Among the three siRNA targeting *ss1*, only siRNA-*ss1a* abrogates *ss1* expression, as shown by western blot and immunohistochemistry (Supplementary Figure 4A and 4B). Consistently, siRNA-*ss1a*, but not siRNA-*ss1b*, reverses SOM230 inhibitory effects on the growth-promoting activities of CAF secretome (Supplementary Figure 4C), confirming specificity of siRNA and antibodies. One of the three siRNA targeting *ss1* (siRNA-*ss1a*) that fully abrogates *ss1* expression

has been used for further functional studies on pancreatic cancer cells. As expected, CM obtained from CAFs transfected with a control siRNA (siRNA-CTR) stimulate survival, migration and invasion of pancreatic Panc-1 and BxPC-3 cells, whereas CAF treatment with SOM230 reverses the pro-tumor features of their secretome (Figure 4A-4F, bars 1-3). By contrast, upon *ss1* expression knockdown, CAFs are refractory to this inhibitory effect of SOM230, since their secretions keep their properties to stimulate pancreatic cancer cell survival, migration and invasion (Figure 4A-4F, compare 3 & 5). *Ss1* expression



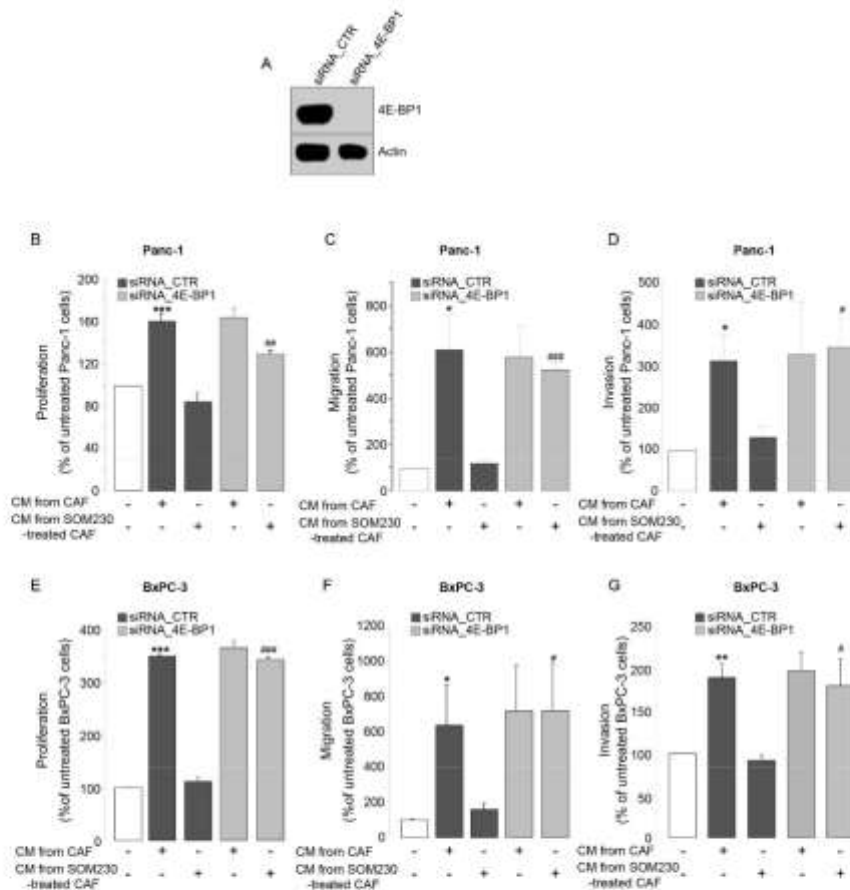
**Figure 1:** A. Immunohistochemistry using anti- $\alpha$ SMA antibody on a paraffin-embedded human pancreatic tumor section. B. CAF isolation by outgrowth from a human pancreatic tumor resection and *in vitro* primo-culture. C. Isolated CAF characterization *in vitro* by immunofluorescence using anti-vimentin (left panel) or - $\alpha$ SMA (right panel) antibody. D-L CAFs were treated or not with SOM230 ( $10^{-6}$ M) for 48 h. Conditioned media (CM) were collected. Pancreatic cancer cells (Panc-1, D-F, or BxPC-3, G-I), were incubated with the indicated CM, and cell viability was assessed by MTT D, G., and cell migration E, H, and invasion F, I, using modified Boyden chambers. Results are presented for each treatment as a percentage of untreated cells ( $\sim 100\%$ ) (n=3). \*: effect of treatment vs. untreated cells; #: effect of incubation with CM from CAF vs. with CM from SOM230-treated CAFs.

knockdown does not affect basal pro-tumor effect of CAF secretome (Figure 4A-4F, compare bars 2 & 4). These results demonstrate that SOM230 inhibitory effect on CAF secretome is entirely dependent on sst1.

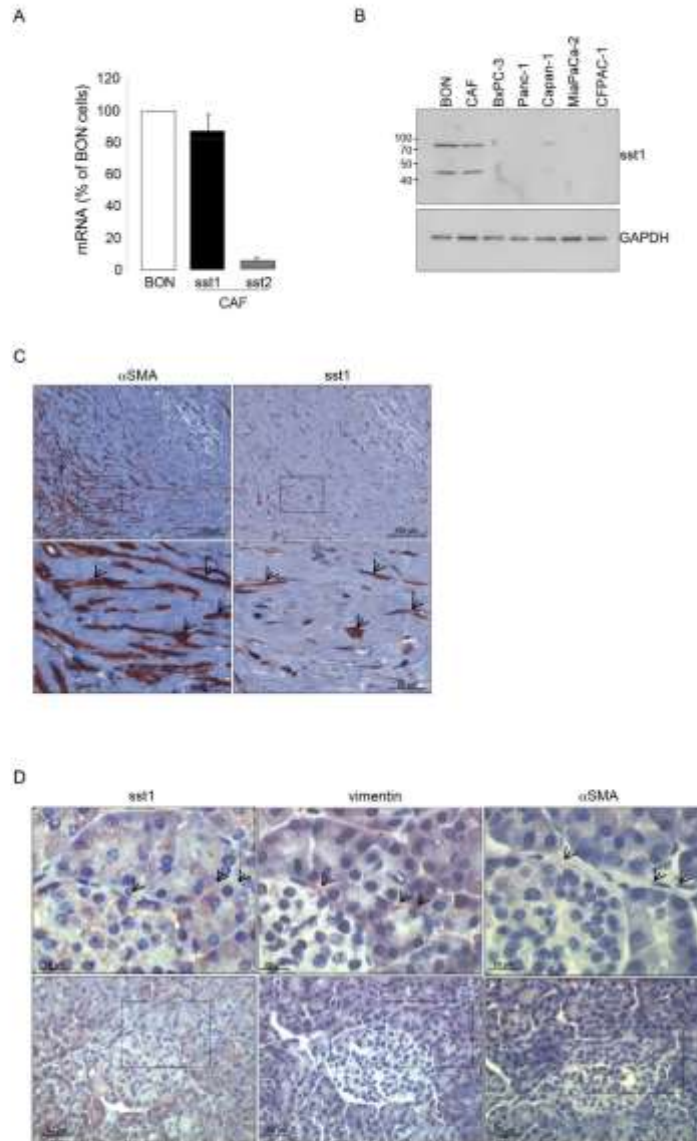
**IL-6 is a critical soluble factor responsible for the pro-tumor activities of CAF secretions which is druggable by SOM230**

We have already identified interleukin-6 as a soluble factor highly secreted by CAFs (> 1 ng secreted

per 10<sup>6</sup> CAFs, Supplementary Figure 5A), but not by pancreatic cancer cells, and whose translation / secretion is inhibited by CAF treatment with SOM230 [17]. Sst1 role on SOM230-mediated inhibition of IL-6 secretion by CAFs was here shown in siRNA\_sst1a-transfected CAFs which demonstrate partial rescue of IL-6 production upon SOM230 treatment, whereas, as expected, IL-6 secretion was not affected by sst1 knockdown in untreated CAFs (Supplementary Figure 5B). The importance and functionality of IL-6 secreted by CAFs was tested on pancreatic cancer cell survival, migration and invasion:



**Figure 2:** A. Immunoblotting using an anti-4E-BP1 or -actin (loading control) antibody of protein extracts from siRNA\_CTR or siRNA\_4E-BP1-transfected CAFs (representative of n=3). B-G. Panc-1 B-D, and BxPC-3 E-G, cell viability B, E, was assessed by MTT, and cell migration C, F, or invasion D, G, using modified Boyden chambers. Cells were incubated in the presence of CM from untreated or SOM230-treated CAFs transfected with the siRNA\_CTR or siRNA\_4E-BP1. Results are presented as a percentage of the survival, migration or invasion observed in the condition where cancer cells were not exposed to CAF CM (=100%) (n=3). \*: effect of treatment vs. untreated cells; #: siRNA\_CTR vs. siRNA\_4E-BP1.



**Figure 3:** A. Expression of the somatostatin receptor subtype 1 (sst1) and subtype 2 (sst2) analyzed by RT-qPCR in the human pancreatic endocrine cell line BON and in CAFs isolated from 10 different patients. B. Immunoblotting of protein extracts from BON, CAFs, and human pancreatic cancer cell lines (BxPC-3, Panc-1, Capan-1, MiaPaCa-2, CFPAC-1) using anti-sst1 or GAPDH (loading control) antibody (representative of  $n=3$ ). C. Immunohistochemistry analyses using an anti- $\alpha$ SMA or -sst1 antibody in paraffin-embedded pancreatic cancer serial sections (one representative field of 10 different PDA samples). D. Immunohistochemistry using an anti-sst1, vimentin, or  $\alpha$ SMA antibody in serial sections of paraffin-embedded normal human pancreas (one representative field of 10 different normal pancreas, adjacent to tumors). Arrows point to vimentin-positive but  $\alpha$ SMA-negative fibroblasts also presenting no stain for sst1.

1 ng of recombinant IL-6 (rIL-6) stimulated the survival, migration and invasion of Panc-1 and BxPC-3 cells, although less efficiently than CAF secretions. Conversely, blocking IL-6 activity in CAF secretions partially but significantly reversed the stimulatory effects of CAF secretions (Figure 5A-5F). Taken together, these results demonstrate the role of IL-6 as a critical CAF-secreted factor responsible for CAF pro-tumor actions on pancreatic cancer cells.

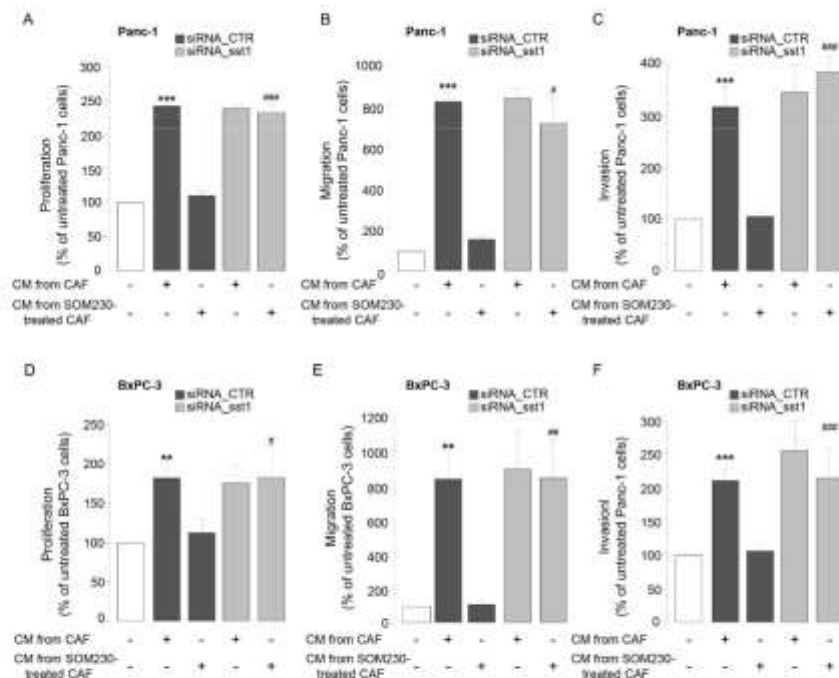
#### Activation of the PI3K pathway in pancreatic cancer cells is important for CAF pro-tumor effects

We then investigated which signaling pathway(s) is (are) stimulated in pancreatic cancer cells upon exposure to CAF secretions, but indirectly inhibited by SOM230 through its action on CAFs. Our results indicated that one major signaling pathway potentially induced by CAF secretions in pancreatic cancer cells is the PI3K-Akt pathway, as demonstrated using phosphorylation of Akt

as a readout (Figure 6A-6B); Akt phosphorylation is also observed upon treatment of pancreatic cancer cells with rIL-6 (Figure 6C), but not with the secretions of CAFs previously treated with SOM230 (Figure 6A-6C). SOM230 has no effect by itself on Akt phosphorylation in pancreatic cancer cells (Figure 6A-6B). Blocking IL-6 activity (using a blocking antibody) in CAF secretions partially reversed phosphorylation of Akt stimulated with CAF secretions (Figure 6D), consistent with an activation at least dependent on IL-6. Inhibition of PI3K activity using LY294002, a specific PI3K inhibitor, potently inhibited pancreatic cancer cell survival, migration and invasion induced by CAF secretions or by rIL-6 (Figure 6E-6J), demonstrating the importance of PI3K activation in the pro-tumor effects of CAF secretions.

#### SOM230 is antimetastatic *in vivo*

To ascertain our proof of concept that SOM230 is able to inhibit the pro-tumor properties of CAFs, SOM230 efficacy has been tested *in vivo*, in athymic mice that



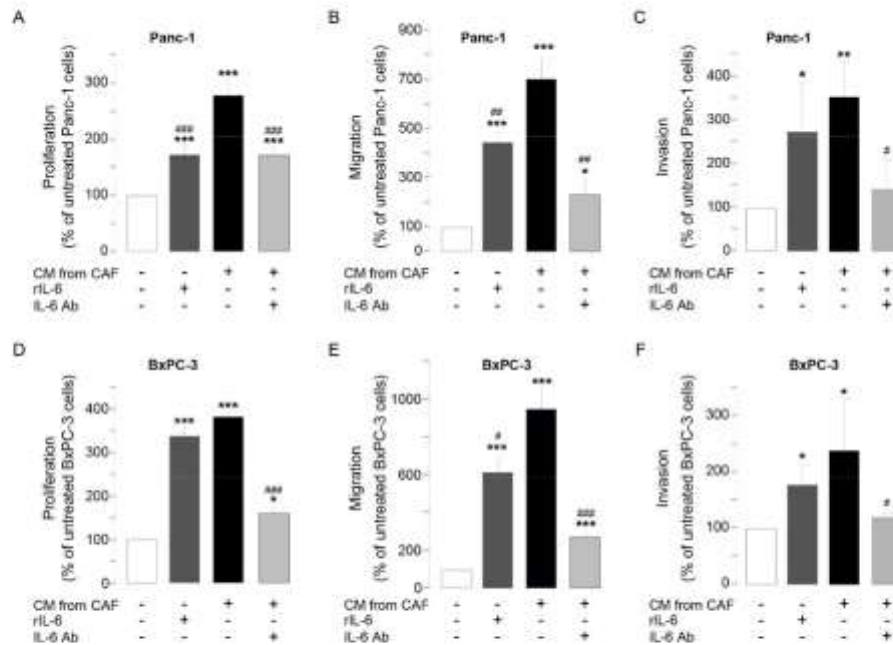
**Figure 4:** A-F, Panc-1 A-C, and BxPC-3 D-F, cell viability A, D, was assessed by MTT, and cell migration B, E, or invasion C, F, using modified Boyden chambers. Cells were incubated in the presence of CM from untreated or SOM230-treated CAFs transfected with the siRNA\_CTR or siRNA\_sst1. Results are presented as a percentage of the survival, migration or invasion observed in the condition where cancer cells were not exposed to CAF CM (=100%) (n=3). \*: effect of treatment vs. untreated cells; #: siRNA\_CTR vs. siRNA\_sst1.

have been subcutaneously or orthotopically (pancreas) xenografted with the human pancreatic cancer MiaPaCa-2 cells together with CAFs. Mice have been treated or not every 28 days with 80 mg/kg of SOM230-LAR, a long acting releasing form of SOM230. We previously showed in both models that the exponential growth of combined cancer cells + CAFs tumors was not slowed down in mice treated with SOM230, as compared to untreated mice [17]. In contrast, we here show that liver metastases observed in 50 % of mice orthotopically co-xenografted with cancer cells and CAFs after 3 weeks of engraftment (Figure 7A, Table 1) were not observed in any of the mice treated with SOM230. As surrogate *in vivo* marker in CAFs of the SOM230 inhibitory effect on protein synthesis, we observed a decreased phosphorylation of 4E-BP1 in the SOM230-treated, but not untreated, tumors (Figure 7B). We then hypothesized that SOM230, by affecting protein synthesis in CAFs, and subsequently the composition of their CM (including IL-6 concentration), indirectly inhibits epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in cancer cells, a critical process for cancer cell migration and invasion [24]. Expression of EMT markers in

pancreatic cancer cells *in vitro* incubated with CM from CAFs treated or not with SOM230 was checked. Whereas expression in cancer cells of N-cadherin, Twist, Slug and Snail was upregulated, and expression of E-cadherin was downregulated, by CAF CM, CM from SOM230-treated CAFs was inefficient to promote EMT (Figure 7C). SOM230 did not have any direct effect by itself on cancer cell EMT markers. Our data were confirmed *in vivo* where SOM230-treated tumors demonstrated drastic decreased in Snail expression, and modest for Twist, as compared to untreated-tumors (Figure 7D). Altogether, these results demonstrate the efficacy of SOM230 to target CAF *in vivo* and prove its putative therapeutic interest to slow-down CAF-stimulated pro-invasive features.

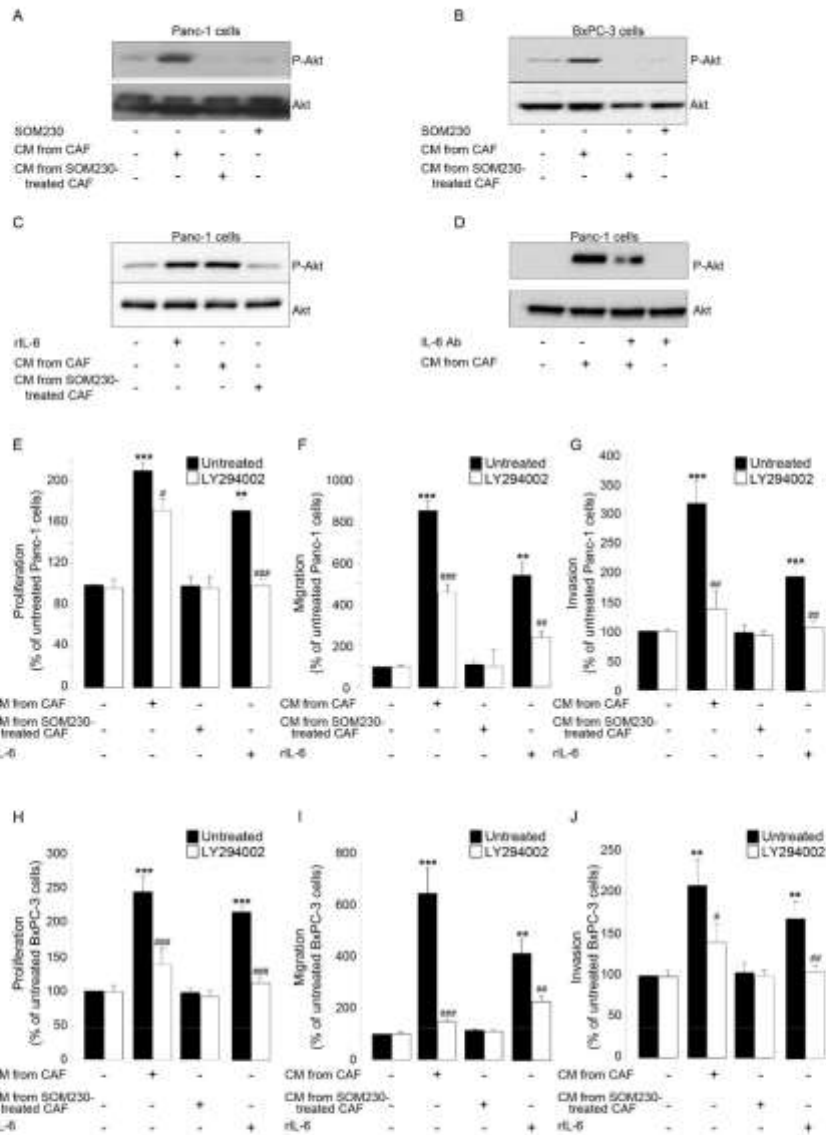
## DISCUSSION

As CAFs are closely related to cancer survival, metastasis or drug resistance features, these cells represent a promising therapeutic target. Our present data provide a pharmacological strategy for targeting CAF prometastatic features with SOM230, the only clinically approved



**Figure 5:** A-F, Panc-1 A-C, and BxPC-3 D-F, cell viability A, D, was assessed by MTT, and cell migration B, E, or invasion C, F, using modified Boyden chambers. Cells were incubated in the presence of recombinant IL-6 (rIL-6), or CM from untreated or SOM230-treated CAFs in the presence or not of the IL-6 neutralizing antibody (IL-6 Ab). Results are presented as a percentage of the survival, migration or invasion observed in the condition where cancer cells were not exposed to rIL-6 or CAF CM (-100%) (n=3). \*: effect of treatment vs. untreated cells; #: effect of IL-6 Ab.

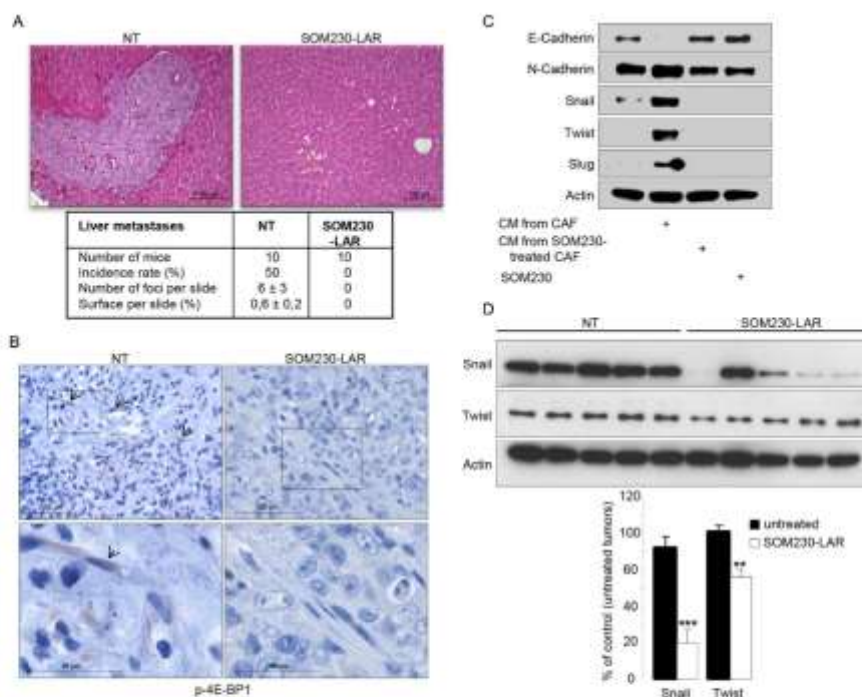




**Figure 6:** A-D. Immunoblotting using an anti-P-Akt, or Akt (loading control) antibody of protein extracts from Panc-1 cells A, C-D, or BxPC-3 cells B, treated or not for 15 min with SOM230 ( $10^{-6}$ M), or with recombinant IL-6 (rIL-6), or with IL-6 Ab, or with CM from untreated or SOM230-treated CAFs in the presence or not of the IL-6 neutralizing antibody (IL-6 Ab) (representative of n=3). E-J. Panc-1 E-G, and BxPC-3 H-J, cell viability E, H, was assessed by MTT, and cell migration F, I, or invasion G, J, using modified Boyden chambers. Cells were pre-treated or not for 30 min with LY294002, and then incubated in the presence of recombinant IL-6 (rIL-6), or CM from untreated or SOM230-treated CAFs. Results are presented as a percentage of the survival, migration or invasion observed in the condition where cancer cells were not exposed to rIL-6 or CAF CM (=100%) (n=3). \*: effect of treatment vs. untreated cells; #: effect of LY294002.

(European Union and United States) somatostatin analog that activates the somatostatin receptor sst1 with high affinity ( $IC_{50} = 9.3 \text{ nmol / L}$ ). We recently published that SOM230 represents a novel anti-stromal targeted therapy with promising potential in chemosensitization for PDA patients. Indeed, we demonstrated that, by activating the sst1 receptor expressed in CAFs, SOM230 inhibits protein synthesis thereby decreasing the concentration of CAF secreted factors with chemoprotective features for pancreatic cancer cells [17]. Analyses on serial sections of human PDA and healthy pancreatic tissue here confirms that  $\alpha$ SMA-expressing cells also express sst1 in PDA, and shows that the vimentin-positive but  $\alpha$ SMA-negative cells, which represent the population of pancreatic stellate cells (PSCs, quiescent cells) in healthy pancreas, do not express sst1. Mechanisms for sst1 expression upregulation during

PSC activation into CAFs is currently under investigation. It was reported that HSCs (hepatic stellate cells) express sst1, and also the sst2 and sst3 receptor subtypes, but only when they are activated into myofibroblasts (not in their quiescent state) [16]. Immunohistochemical staining of PDA tissues show that CAFs do not express other somatostatin receptors (not shown), in accordance with the *in vitro* RT-qPCR results detecting only very small amount of sst2 mRNA (as compared to level observed in the human BON neuroendocrine cell line known to express sst2) [25]. This may explain the failure of sst2-selective somatostatin analogs such as octreotide to treat and detect PDA (octreoscan) in patients, since sst2 is not expressed in the two PDA major cell types, i.e. pancreatic cancer cells and CAFs [14, 19]. Consistently, in contrast to SOM230, octreotide is inefficient to inhibit CAF pro-tumor features,



**Figure 7:** A, B. Mice orthotopically co-xenografted with pancreatic cancer cells and CAFs, and treated or not with SOM230-LAR. A. Hemalum-eosin coloration of the liver: On the left panel (untreated condition, NT) a liver metastasis is visible. Below, a table indicating, per treatment group, the number of mice, the metastasis incidence rates (%), the number of metastasis foci per slide, and the metastasis surface per slide (%). B. Immunohistochemistry analyses using an anti-p-4E-BP1 antibody in paraffin-embedded pancreatic tumor serial sections. (one representative field of 10 different tumors). C. Immunoblotting using an anti-E-cadherin, or N-cadherin, or Snail, or Twist, or Slug, or actin (loading control) antibody of protein extracts from MiaPaCa-2 cells treated or not with SOM230 ( $10^{-7}$ M), or with CM from untreated or SOM230-treated CAFs (representative of  $n=3$ ). D. Immunoblotting using an anti-Snail or Twist, or actin (loading control) antibody of protein extracts from MiaPaCa-2 cell + CAF xenografted tumors in five mice treated or not with SOM230-LAR (upper panel), and quantification of the bands using the Image J software (lower panel).

Sst1 expression knockdown in CAFs abrogates SOM230 inhibitory effect on CAF pro-tumor features, confirming the critical role of sst1, the only somatostatin receptor expressed in these cells, to transduce SOM230 action.

We here show that SOM230 has no effect on CAF proliferation or survival. This result may seem surprising given the known inhibitory effects of somatostatin analogs on cell growth [13], but could be explained by the very low proliferation rate of these cells [17]. On another hand, it appears that SOM230 negatively regulates the pro-tumor features of CAF secretions, i.e. their ability to stimulate the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells. Although CAFs are known mainly for their high capacity of protein secretion, nothing was known on protein synthesis and its regulation in these cells. We recently demonstrated that the protein synthesis mTOR/4E-BP1 regulatory pathway is highly activated in CAFs isolated from human PDA resections, resulting in elevated synthesis of secreted proteins including IL-6. By inhibiting the mTOR/4E-BP1 pathway, SOM230 abolished chemoresistance induced by CAF secretome [17]. Similarly, we here demonstrate that SOM230 inhibitory effect on the pro-tumor features of CAF secretions depends on 4E-BP1 regulation. Indeed, 4E-BP1 expression knockdown abrogates those SOM230 inhibitory benefits. Interestingly, strategy aimed at targeting 4E-BP1 in pancreatic cancer cells is doomed to failure according to 4E-BP1 loss of expression in these cells [26]. Our results suggest that such a therapeutic strategy might be promising in CAFs. An analysis of factors differentially secreted by CAFs treated or not with SOM230 revealed that IL-6 is one major factor whose mRNA translation is dramatically inhibited by SOM230 [17]. Mechanisms previously known for IL-6 expression regulation in CAFs include transcriptional activation of IL-6 promoter through a sonic hedgehog – GLI1 pathway [27]. Negative regulation by SOM230 of IL-6 protein synthesis (and subsequent secretion) by CAFs is translational and depends on the inhibition of the mTOR/4E-BP1 pathway [17]. In addition to its role in the regulation of inflammation and immune response in PDA [27, 28], we here show that IL-6 has a significant stimulatory effect on the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells. Moreover, neutralization of IL-6 partially reverses CAF secretome's pro-proliferative, pro-migratory and pro-invasive properties on cancer cells. Our results are consistent with the recent data demonstrating that IL-6 is required for pancreatic cancer progression and emerges as a potential therapeutic target [28, 29]. Interestingly, we previously demonstrated that *in vivo* PDAC mouse model treatment with SOM230 decreases IL-6 production by CAFs and IL-6 plasma concentrations [17].

Several signaling pathways in pancreatic cancer cells may be affected by CAF secretome, including canonical pathways leading to cell proliferation / survival

/ migration and invasion. Our investigation was oriented towards the PI3K pathway, which is highly active in 50% of cases of PDA despite the absence of obvious mutations in this pathway detected in PDA patient tumors [30]. The PI3K pathway is critically involved in pancreatic carcinogenesis as recently demonstrated using genetically-engineered mouse models [31]. Intracrine signaling loops downstream of oncogene activation and tumor suppressor inactivation sustains intrinsic PI3K activation in pancreatic cancer cells [14, 31]. Paracrine loops involving the microenvironment may be involved. Our results here show that CAF secretome activates the PI3K pathway, which plays a key role in the response of pancreatic cancer cells to pro-proliferative, pro-migratory and pro-invasive of CAF-derived stimuli including IL-6.

Sub-cutaneous or intra-pancreatic co-xenografting of human pancreatic cancer cells together with CAFs in athymic mice followed by mouse treatment with SOM230 show that SOM230 does not control tumor growth. Nevertheless, liver metastasis which occurs in 50 % of mice orthotopically engrafted with MiaPaCa-2 cells is abolished upon SOM230 treatment. No metastases (liver or lung) are observed in the subcutaneous engrafted model. Expression of EMT proteins is upregulated in pancreatic cancer cells upon *in vitro* exposure to CAF secretome. Conversely, expression of those EMT proteins is not induced in cancer cells exposed to SOM230-treated CAF secretome, providing a putative mechanism for SOM230 antimetastatic potential.

SOM230, also known as Pasireotide or Signifor®, is of particular interest since it has already received a marketing authorization (for Cushing's disease [32]). SOM230 also presents the advantage to specifically target activated sst1-expressing, but not quiescent, fibroblasts enhancing its therapeutic interest. From these results and our recent published data [17], we conclude that pharmacological targeting of CAFs with SOM230 represents a promising antimetastatic and chemosensitization strategy for PDA patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Human cancer associated fibroblasts isolation and cell culture

Human pancreatic tumor tissues were obtained from the Pathology Department of Toulouse and Limoges Hospitals, France, from patients undergoing resections for pancreatic adenocarcinoma. This study was approved by the ethic committee of the Institutions. Patient samples were obtained after informed consent in accordance with the declaration of Helsinki and stored at the « CRB cancer des Hôpitaux de Toulouse » collection. According to the french law, CRB cancer collection has been declared to

the ministry of higher education and research (DC 2009-989; DC-2011-1388) and obtained a transfer agreement (AC-2008-820; AC-2011-130) after approbation by ethical committees. Clinical and biological annotations of the samples have been declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés). Pancreatic tumor tissue was collected in Dulbecco's Modified Eagle's medium F12 (DMEM/F12 Lonza) containing 20% Foetal Calf de-complemented serum (FCS, Life Technologies). The culture medium was changed after the cells had attached. Cells were isolated from these samples using the outgrowth method described by Bachem et al. [33]. Ductal pancreatic adenocarcinoma cell lines, Panc-1, BxPC-3 and MiaPaCa-2, are grown in RPMI and DMEM (4,5 g/L glucose, Lonza), respectively, containing 10% FCS. Cells were cultured at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in a humid atmosphere. All media were supplemented with antibiotics (5 IU / mL penicillin and streptomycin, 2.5 mg / mL of fungizon and 2, 5 µL / mL plasmocin) and L-glutamine (2 mM) (Life Technologies). For *in vivo* subcutaneous or pancreatic xenografting, Panc-1 or MiaPaCa-2-GLuc cells expressing the secreted Gaussia Luciferase were used, respectively, as previously described [17].

### Reagents

Antibodies used are as follow: Anti- $\alpha$ SMA (Epitomics), anti-Vimentin, anti-IL-6 (Abcam), sst1 (generated in Novartis Pharma laboratory (Basel, Switzerland) [25, 34], anti-GAPDH (Santa Cruz), anti- $\beta$ -Actin (Sigma-Aldrich), anti-p-Akt, anti-Akt, anti-4E-BP1 (Cell signaling). Drugs used are as follow: SOM230 (10<sup>-7</sup>M, Novartis Pharma, Basel, Switzerland); recombinant human IL-6 (1 ng/mL, PreproTech).

### Immunohistochemistry

Serial sections of formalin-fixed, paraffin-embedded human tumor samples were incubated with anti-sst1, anti-vimentin or anti- $\alpha$ SMA antibody. Reactions were amplified with ImmPRESS Peroxidase Polymer Detection Reagents (VECTOR Laboratories). A solution 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) or 3,3-Diaminobenzidine (DAB) were used as chromogen and sections were counterstained with hematoxylin. Images were captured using an Eclipse E400 microscope (Nikon) and Explora Nova Morpho Expert/Mosaic Software.

### CAF CM

CAF CM were made at a concentration of 10<sup>6</sup> cells / 5 ml of DMEM/F12 (0% FCS) treated or not with 10<sup>-7</sup>M of SOM230. 48 hours later, CM were collected, centrifuged (2 000 rpm, 5 min) and filtered (0.2 µm) prior to incubation with cancer cells. When indicated, CM from untreated CAF were pre-treated for thirty min with 1 ng/

mL of human IL-6 neutralizing IgA monoclonal antibody (Abcam) prior to incubation with cancer cells.

### MTT assay

Tumor cells were seeded in 96-well plates (20 000 cells/well). After adhesion, cells were washed and starved. The following day, cells were treated with gemcitabine and stimulated or not with CAF CM as indicated. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Life Technologies) was added to each well at 0,5 mg/mL for 2 hours. Hundred µl of DMSO (dimethyl sulfoxide) were added for 1 h to each well. Viability was estimated by measuring absorbance at 570 nm on MRX plate reader (Dyex Technologies).

### Migration and invasion assays

Migration and invasion assays were performed using transwell inserts (8,0 µm pore size, BD Falcon), coated with matrigel (BD Biosciences) for invasion. Cells were seeded on the upper chamber. Chemoattractant was added (serum) to the lower chamber. Panc-1 and BxPC-3 cells were allowed to migrate for 20 h. Cells that migrated to the lower side of the membrane were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with crystal violet (0.2 %) in 20 % methanol. Quantification of the membrane surface area covered by migrated / invaded cells was performed with Morpho Expert software, Explora Nova.

### Western blot

Cells were lysed in lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF and a cocktail of protease inhibitors, Roche). Protein extract concentration was measured using Protein Assay reagent (Bio-Rad), and equal amount of proteins were resolved by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in 5% powdered milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) for 1 h followed by incubation with primary antibodies overnight at 4°C. Membranes were then washed with TBST three times and incubated with horseradish peroxidase-coupled secondary antibody for 1 h at room temperature, washed again, and treated with enhanced chemiluminescence prior to detection on x-ray film.

### Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted with RNeasy kit (Qiagen) and equal amount of RNAs were reverse-transcribed using Superscript One Step RT-PCR kit (Invitrogen®) and resulting cDNAs were used in qRT-PCR using SYBR green (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Primer sequences (Invitrogen)

were as follow: SSTR1 sense 5'-CAC ATT TCT CAT GGG CTT CCT-3', reverse 5'-ACAAAC ACC ATC ACC ACC ATC 3'; SSTR2 sense 5'-GGC ATG TTT GAC TTT GTG GTG-3', reverse 5'-GTC TCA TTC AGC CGG GAT TT-3'; SSTR3 sense 5'-TGC CTT CTT TGG GCT CTA CTT-3', reverse 5'-ATC CTC CTC CTC AGT CTT CTC C-3'; SSTR4 sense 5'-CGT GGT CGT CTT TGT GCT CT-3', reverse 5'-AAG GAT CGG CGG AAG TTG T-3'; SSTR5 sense 5'-CTG GTG TTT GCG GGA TGT T-3', reverse 5'-GAA GCT CTG GCG GAA GTT GT-3'; and IL6 sense 5'-CTG ACC CAA CCA CAA ATG CC-3', reverse 5'-GGT TCT GTG CCT GCA GCT TC 3'. Target gene expression was normalized by using HPRT expression as an internal control.

#### RNA interference

hCAFs were transfected with siRNA targeting (25 nM) SSTR1 (four individual siRNA-d, Dharmacon.) or (50 nM) 4E-BP1 (Applied Biosystems, forward 50-CAAGAACGAACCCUCCUU-3' and reverse using respectively DharmaFECT1 reagent (Dharmacon) and siPort NeoFx transfection reagent (Applied Biosystems), respectively, according to the manufacturer's instructions.

#### Tumor growth (co-xenografts in nude mice)

##### Pancreatic cancer cells and CAF co-xenografting

Pancreatic cancer cells and CAFs were trypsinized, washed and resuspended in sterile PBS. A 1:3 mix of pancreatic cancer cells (10<sup>6</sup>) and CAFs (3.10<sup>6</sup>) were subcutaneously (Panc-1 cells) or orthotopically (intra-pancreatic) (MiaPaCa-2-Gluc cells) injected in 100  $\mu$ L or 50  $\mu$ L PBS, respectively, of 4-week-old female nude mice (NMR1-nu; Janvier) (n=10 mice per condition) [35]. Mice were anesthetized by inhalation of isoflurane. Treatments started one week after grafting when mice have been randomized in the two group treatments (untreated and SOM230-LAR treated, n=10 mice per group), as previously described [17].

##### Treatments

Mice have been treated s.c. with SOM-LAR (80 mg/kg) once every 28-days.

Tumor volumes of subcutaneous tumors were calculated as  $0,523 \times l^2 \times L$ . All experiments were done in accordance with the principles and guidelines established by INSERM Anexplo UMS006 and were approved by the institutional and regional animal care and use committees.

##### Metastasis analyses

Formalin-fixed paraffin-embedded livers were cut in whole (4  $\mu$ m -thick sections), and 1 slide out of 25 (every 100  $\mu$ m) has been Hemalun-eosin-colored and examined for the presence and quantification of metastasis foci (mean number per section, and mean surface as a %

of total liver surface), using the NanoZoomer Digital Pathology Virtual Slide Viewer (Hamamatsu).

#### Statistical analyses

Statistical analyses were performed by comparing two by two independent conditions (with homogeneous variances) using an unpaired parametric T-test. All values are mean  $\pm$  SEM. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$  (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

#### ACKNOWLEDGMENTS AND GRANT SUPPORT

This work was supported by LNCC (Ligue Nationale Contre le Cancer RAB09006BBA), the Cancerpole Grand Sud-Ouest (RMA04002BPA), the ANR (Agence Nationale pour la Recherche, project n<sup>o</sup>R06423BS), the Labex TOUCAN, The Fondation de France (2014 00047506), and the French National Institute of Cancer (INCa, PLBIO13-134). S.M.B. was recipient of a fellowship from Egide Volubilis (contract Hubert Curien MA/10/240) and from Coopération INSERM - CNRS. C.D. was recipient of a fellowship from the French Ministry of Research and Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC). R.S. was recipient of a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). C.J. was recipient of a fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC). E.D. salary was funded by Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

#### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

#### REFERENCES

1. Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; 18: 27-34.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100: 57-70.
3. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 392-401.
4. Begley LA, Kasim S, MacDonald J, Macoska JA. The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. *Cytokine.* 2008; 43: 194-199.
5. Mathew E, Collins MA, Fernandez-Barrera MG, Holtz AM, Yan W, Hogan JO, Tata Z, Allen BL, Fernandez-Zapico ME, di Magliano MP. The transcription factor GLI1

- modulates the inflammatory response during pancreatic tissue remodeling. *J Biol Chem*. 2014; 289: 27727-27743.
6. Mace TA, Ameen Z, Collins A, Wojcik S, Mair M, Young GS, Fuchs JR, Eubank TD, Frankel WL, Bekaii-Saab T, Bloomston M, Lesinski GB. Pancreatic cancer-associated stellate cells promote differentiation of myeloid-derived suppressor cells in a STAT3-dependent manner. *Cancer Res*. 2013; 73: 3007-3018.
  7. Servais C, Erez N. From sentinel cells to inflammatory culprits: cancer-associated fibroblasts in tumour-related inflammation. *J Pathol*. 2013; 229: 198-207.
  8. Crawford Y, Kasman I, Yu L, Zhong C, Wu X, Modrusan Z, Kaminker J, Ferrara N. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell*. 2009; 15: 21-34.
  9. Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res*. 2008; 68: 918-926.
  10. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, Davis A, Mongare MM, Gould J, Frederick DT, Cooper ZA, Chapman PB, Solit DB, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*. 2012; 487: 500-504.
  11. Erez N, Tnait M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*. 2010; 17: 135-147.
  12. Schmid HA. Somatostatin (SOM230): development, mechanism of action and potential applications. *Mol Cell Endocrinol*. 2008; 286: 69-74.
  13. Pyronnet S, Bousquet C, Najib S, Azar R, Laklai H, Susini C. Antitumor effects of somatostatin. *Mol Cell Endocrinol*. 2008; 286: 230-237.
  14. Chalabi-Dehar M, Cassant-Sourdy S, Duluc C, Fanjul M, Lulka H, Samain R, Roche C, Breibach F, Delisle MB, Poupot M, Dufresne M, Shimaoka T, Yonehara S, et al. Loss of Somatostatin Receptor Subtype 2 Promotes Growth of KRAS-Induced Pancreatic Tumors in Mice by Activating PI3K Signaling and Overexpression of CXCL16. *Gastroenterology*. 2015; 148: 1452-1465.
  15. Andoh A, Hata K, Shimada M, Fujino S, Tasaki K, Bamba S, Araki Y, Fujiyama Y, Bamba T. Inhibitory effects of somatostatin on tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Int J Mol Med*. 2002; 10: 89-93.
  16. Reynaert H, Rombouts K, Jia Y, Urbain D, Chatterjee N, Uyama N, Geerts A. Somatostatin at nanomolar concentration reduces collagen I and III synthesis by, but not proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol*. 2005; 146: 77-88.
  17. Duluc C, Moutassim-Billah S, Chalabi-Dehar M, Perraud A, Samain R, Breibach F, Gayral M, Cordelier P, Delisle MB, Bousquet-Dubouch MP, Tomasini R, Schmid H, Mathonnet M, et al. Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance. *EMBO Mol Med*. 2015; 7: 735-753.
  18. Erkan M, Adler G, Apte MV, Bachem MG, Buchholz M, Detlefsen S, Esposito I, Friess H, Gress TM, Habisch HJ, Hwang RF, Jaster R, Kleeff J, et al. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut*. 2012; 61: 172-178.
  19. Bousquet C, Guillermet-Guibert J, Saint-Laurent N, Archer-Lahlou E, Lopez F, Fanjul M, Ferrand A, Fourny D, Pichereaux C, Monsarrat B, Pradayrol L, Esteve JP, Susini C. Direct binding of p85 to sst2 somatostatin receptor reveals a novel mechanism for inhibiting PI3K pathway. *EMBO J*. 2006; 25: 3943-3954.
  20. Laval S, Laklai H, Fanjul M, Pucelle M, Laurell H, Billon-Gales A, Le Guellec S, Delisle MB, Sonnenberg A, Susini C, Pyronnet S, Bousquet C. Dual roles of hemidesmosomal proteins in the pancreatic epithelium: the phosphoinositide 3-kinase decides. *Oncogene*. 2014; 33: 1934-1944.
  21. Azar R, Najib S, Lahlou H, Susini C, Pyronnet S. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent transcriptional silencing of the translational repressor 4E-BP1. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65: 3110-3117.
  22. Najib S, Saint-Laurent N, Esteve JP, Schulz S, Boutet-Robinet E, Fourny D, Lutjig J, Mollereau C, Pyronnet S, Susini C, Bousquet C. A switch of G protein-coupled receptor binding preference from phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-p85 to flamin A negatively controls the PI3K pathway. *Mol Cell Biol*. 2012; 32: 1004-1016.
  23. Xiao Y, Jaskula-Sztul R, Javad A, Xu W, Eide J, Dammalapati A, Kunnimalaiyaan M, Chen H, Gong S. Co-delivery of doxorubicin and siRNA using ocreotide-conjugated gold nanorods for targeted neuroendocrine cancer therapy. *Nanoscale*. 2012; 4: 7185-7193.
  24. Barriere G, Fici P, Gallerani G, Fabbri F, Rigaud M. Epithelial Mesenchymal Transition: a double-edged sword. *Clin Transl Med*. 2015; 4: 14.
  25. Lambertini C, Barzaghi-Rinaudo P, D'Amato L, Schulz S, Nociforo P, Schmid HA. Evaluation of somatostatin receptor subtype expression in human neuroendocrine tumors using two sets of new monoclonal antibodies. *Regul Pept*. 2013; 187: 35-41.
  26. Martineau Y, Azar R, Muller D, Lasfargues C, El Khawand S, Anesia R, Pelletier J, Bousquet C, Pyronnet S. Pancreatic tumours escape from translational control through 4E-BP1 loss. *Oncogene*. 2014; 33: 1367-1374.
  27. Mills LD, Zhang Y, Marler RJ, Herreros-Villanueva M, Zhang L, Almada LL, Couch F, Wetmore C, Pasca di Magliano M, Fernandez-Zapico ME. Loss of the

- transcription factor GLI1 identifies a signaling network in the tumor microenvironment mediating KRAS oncogene-induced transformation. *J Biol Chem*. 2013; 288: 11786-11794.
28. Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, Rose-John S, Treiber M, Kloppel G, Yoshimura A, Reindl W, Sipos B, Akira S, Schmid RM, Algul H. Stat3/Soes3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell*. 2011; 19: 456-469.
29. Lesina M, Wormann SM, Neuhofer P, Song L, Algul H. Interleukin-6 in inflammatory and malignant diseases of the pancreas. *Semin Immunol*. 2014; 26: 80-87.
30. Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras MC, Mathuswahny LB, Johns AL, Miller DK, Wilson PJ, Patch AM, Wu J, Chang DK, Cowley MJ, Gardiner BB, et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*. 2012; 491: 399-405.
31. Eser S, Reiff N, Messer M, Seidler B, Gottschalk K, Dobler M, Hieber M, Arbeiter A, Klein S, Kong B, Michalski CW, Schlitter AM, Esposito I, et al. Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer Cell*. 2013; 23: 406-420.
32. Lau D, Rutledge C, Aghi MK. Cushing's disease: current medical therapies and molecular insights guiding future therapies. *Neurosurg Focus*. 2015; 38: E11.
33. Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grunert A, Adler G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*. 1998; 115: 421-432.
34. Schmid HA, Lambertini C, van Vugt HH, Barzaghi-Rinaudo P, Schafer J, Hillenbrand R, Sailer AW, Kaufmann M, Nuciforo P. Monoclonal antibodies against the human somatostatin receptor subtypes 1-5: development and immunohistochemical application in neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*. 2012; 95: 232-247.
35. Sicard F, Gayral M, Lulka H, Buscuil L, Cordelier P. Targeting miR-21 for the therapy of pancreatic cancer. *Mol Ther*. 2013; 21: 986-994.

## II) Le ciblage pharmacologique du dialogue entre CAFs et macrophages M2 empêche le développement de métastases dans le PDAC

Nous avons récemment pu démontrer le rôle promoteur des CAFs sur le comportement des cellules cancéreuses, particulièrement la chimiorésistance et les capacités invasives. L'activité exacerbée de synthèse protéique dans les CAFs, mise en évidence par l'activation anormale de la voie PI3K/Akt, entraîne la sécrétion de nombreux facteurs de croissance et cytokines, impliquées dans de nombreux mécanismes.

Nous avons réalisé une analyse protéomique sur les surnageants de cultures primaires de CAFs isolées de résections pancréatiques humaines, pour obtenir une liste des protéines sécrétées par les CAFs. Plus particulièrement, nous avons détaillé de manière exhaustive les effets du traitement au SOM230 sur ces sécrétions.

Les CAFs sont capables d'influencer la réaction immunitaire au sein des tumeurs, et favorise plutôt une réponse pro-tumorale, caractérisée par le recrutement de macrophages M2, de MDSCs, et l'inhibition de la réponse T cytotoxique. Ce travail avait pour objectif de caractériser les effets des CAFs sur l'immunité, en utilisant des modèles murins immunocompétents de PDAC. Nous avons ensuite cherché à savoir si le traitement de ces souris au SOM230 impactait l'immunité tumorale. Enfin, nous voulions confirmer le rôle anti-tumoral du SOM230 en association avec la gemcitabine sur des modèles précliniques plus proches de la pathologie humaine.

Les résultats obtenus sont présentés ici sous la forme d'un article, prochainement soumis.



**Reversing pancreatic cancer metastasis through pharmacological targeting of cancer-associated fibroblast's dialog with M2 macrophages**

R. Samain<sup>1</sup>, J. Rochotte<sup>1</sup>, S. Cassant-Sourdy<sup>1</sup>, A. Brunel<sup>1</sup>, T. Douché<sup>1</sup>, A.P. Perraud<sup>2</sup>, M. Mathonnet<sup>2</sup>, H. Schmid<sup>3</sup>, M.P. Bousquet<sup>4</sup>, Y. Martineau<sup>1</sup>, S. Pyronnet<sup>1</sup>, C. Jean<sup>1</sup>, C. Bousquet<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR-1037, Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer and Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer (TOUCAN), Université de Toulouse, Toulouse, France.;

<sup>2</sup>EA 3842 Laboratory, Medicine and Pharmacy Faculties, Limoges University, Limoges, France;

<sup>3</sup>Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland;

<sup>4</sup>CNRS UMR-5089, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, Toulouse, France.

\*To whom correspondance should be adressed: Dr Corinne Bousquet, 2 avenue Hubert Curien, CS53717, 31037 Toulouse cedex1, France, corinne.bousquet@inserm.fr.

## Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) presents an exuberant stroma. Stromal cancer associated fibroblasts (CAF) secrete soluble and extracellular matrix (ECM) proteins that promote cancer cell aggressiveness.

We explored whether a therapeutic benefit is observed in immunocompetent PDAC models through pharmacological targeting of protein synthesis and secretion in CAF using the somatostatin analog SOM230 (Pasireotide), that we previously showed to inhibit the PI3K-mTOR pathway through activation of the somatostatin receptor sst1.

Longitudinal monitoring of tumor volumes by ultrasound, as well as histopathology and flow cytometry analyses, were performed on pancreatic tumors in the transgenic KPC mouse model (*Pdx-1-Cre* ; *LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>* ; *LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>*), treated or not with the chemotherapy gemcitabine, in association or not with SOM230. Tumor progression upon treatments was also monitored in a model of orthotopic syngeneic grafting of pancreatic cancer cells with murine primary cultures of fibroblasts (pancreatic stellate cells, PSC), which activate in the tumor into CAF.

We showed a therapeutic benefit of the gemcitabine+SOM230 combination, as compared to gemcitabine, with reduced primary tumor growth and abrogation of metastasis. Tumor cell aggressiveness is reduced, as demonstrated using tumor surrogates (STAT3 phosphorylation), together with drastic decreased ECM deposit. Intriguingly, recruitment into the tumor of M2 macrophages is inhibited upon SOM230 treatment, simultaneously with reduced plasmatic concentration of CSF-1 which is mainly produced by tumor CAF. Sst1 is demonstrated to mediate these SOM230 inhibitory effects which are partially lost when PSC isolated from KO<sub>sst1</sub> mice are used instead of wild-type PSC.

In conclusion, SOM230 in combo with chemotherapy represents a promising therapeutic strategy, involving inhibition of CSF-1 secretion by CAF and indirect negative impact on cancer cell metastasis induced by M2 macrophages.

## Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) remains one of the deadliest neoplasm. Most patients die from a metastatic disease within the first year after diagnosis [1]. Stratifying PDA tumors using genetic profiles has not proven to be valuable for predicting therapeutic responses and clinical outcome in PDA, whereas transcriptomic profiles have defined two-to-four tumor subgroups related with tumor aggressivity, and each with distinct mechanisms of evolution that could be of potential therapeutic relevance [2, 3]. Not only molecular profiles of the tumor compartment but also those of its stroma is reported of prognostic value [4, 5]. Consistently, a dialog between tumor cells and their stroma is now recognized as critically involved in PDA progression and resistance to treatments [6]. Hence, PDA tumors are characterized by a prominent desmoplastic reaction, which represents up to 80% of the tumor mass and comprises acellular organized matrix fibers mainly produced by activated fibroblasts within the tumor and named cancer-associated fibroblasts (CAFs). CAFs are the most abundant cells in PDA stroma, and secrete, in addition to extracellular matrices, growth and angiogenic factors, as well as cytokines and chemokines, which favor tumor progression and chemoresistance [7, 8]. Immaturity of PDA stroma, in link with a high stromal cell content, correlates with a poor prognostic, emphasizing the critical role of stromal cells in dictating tumor cell behavior [9]. In addition to CAFs, PDA stroma comprises immune cells, for most tumor-associated macrophages (TAMs) of myeloïd origin and polarized to a phenotype named M2 owed with immune suppressive activities. By secreting extracellular matrix remodelling enzymes, growth, angiogenic and redox factors, or cytokines, this myeloïd subset not only damps anti-tumoral immune reactions but also facilitate tumor cell invasion and metastasis [10]. Recently, high expression of macrophage markers was linked to the most aggressive PDA subtypes [11]. PDA is characterized by exclusion from the tumor parenchyma of CD8+ T cells, which are instead found in the fibroblast- and collagen-rich peritumoral stroma. Interestingly, immune suppression and lack of response to an anti-programmed death 1 (PD-1) immunotherapy was associated with a signature of transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )

signaling in fibroblasts in metastatic urothelial cancer, another immune-excluded tumor [12]. This suggests that a dynamic dialog exists between CAFs and immune subsets within the tumor, impacting tumor cell biology.

Our work has contributed to the demonstration that CAFs promote pancreatic tumor cell metastasis and chemoprotection [13, 14]. The Akt-mTOR pathway was specifically identified as abnormally activated in CAFs as compared to normal pancreatic fibroblasts, triggering exacerbated protein synthesis activity in CAFs and subsequent secretion of growth factors and cytokines such as IL-6, which was demonstrated to contribute to CAF-induced tumor cell invasion and chemoresistance. Strikingly, inhibition of the Akt-mTOR pathway in CAFs was also able to abolish CAF deleterious effects *in vitro*, in co-culture models of CAFs and tumor cells, and *in vivo*, in immunocompromised mice orthotopically grafted with tumor cells and CAFs. With the aim to exhaustively identify proteins that contribute to CAF function within pancreatic tumors and which are under the Akt-mTOR regulatory program, we have now compiled transcriptomic and secretome analyses data obtained using human primary cultures of CAFs isolated from PDA surgical resections. We are now able to show that a CAF-derived CSF1 (colony-stimulating factor 1, also known as M-CSF for macrophage colony-stimulating factor) -driven program dramatically shifts pancreatic tumor cells into a metastatic state, in correlation with increased macrophage M2 polarization within the primary tumor of immunocompetent mouse PDA models. Inhibiting this program within CAFs abrogates tumor cell metastasis, further underpinning the therapeutic interest of targeting the CSF1-CSF1R dialog within PDA, such as recently demonstrated using CSF1R blockade [11, 15, 16].

## **Results**

### **CSF1, a CAF-secreted cytokine correlating to PI3K-Akt pathway activity**

To obtain an exhaustive identification of CAF secreted proteins, the expression of which is under the control of the Akt-mTOR pathway, we have performed mass-spectrometry analyses of conditioned media from 9 primary cultures of CAFs, each isolated by outgrowth from

different patient surgical tumor resections, and treated or not with the somatostatin analog SOM230. We have previously described that SOM230 is a potent inhibitor in CAFs of the Akt-mTOR pathway, the activity of which correlates with CAF's pro-metastatic and chemoprotective features on tumor cells. Hence, by targeting the somatostatin receptor subtype sst1 specifically expressed in CAFs, but not in non-activated pancreatic stellate cells (PSCs) isolated from healthy pancreas, pharmacologic treatment using SOM230 inhibits the pro-metastatic and chemoprotection features induced by CAFs when co-cultured *in vitro*, or orthotopically co-xenografted in nude mice with pancreatic cancer cells [13, 14]. Our mass-spectrometry secretome analysis identifies 272 proteins as significantly ( $p < 0.05$ ) regulated in expression by SOM230 treatment (threshold of 2-fold), all being downregulated (Fig 1A, Fig S1). Pathway enrichment analysis (KEGG) identifies proteins involved in diverse downregulated pathways by SOM230 (Fig. 1B), including in PI3K/Akt signaling (Fig. 1B-C), which confirms our previously reported effect of the SOM230 analog [13]. "Focal Adhesion", "ECM-receptor interaction" and "Proteoglycans in cancer" signatures are also enriched as downregulated in the SOM230 treated group (Fig. 1B, 1D). We here identify the cytokine CSF1 as significantly downregulated by SOM230 and comprised in the enriched PI3K/Akt signature (Fig. 1C). These results indicate that CAF express and secrete the cytokine CSF1, this secretion being downregulated by the drug SOM230 and associated with a PI3K/Akt pathway signature in CAFs.

### **Tumor and plasmatic CSF1 concentrations correlate with tumor cell metastatic potential in a preclinical immunocompetent mouse PDA model of orthotopic tumor cell graft**

To explore the role of CAF-derived CSF1, especially in association to the previously reported anti-metastatic potential of the drug SOM230 [14], we used immunocompetent mouse models of PDA. Hence, CSF1 acts through its receptor CSF1R, mainly expressed in immune myeloid subsets. Syngeneic and orthotopic co-grafting of mouse tumor cells (derived from PDA tumors developed in the genetically-engineered mouse KPC (*LSL-K-Ras<sup>G12D/+</sup>; p53<sup>R172H/+</sup>; Pdx1-Cre*) model [17]) with fibroblasts (PSCs isolated from mouse pancreas) was performed as described

(Methods and Fig. 2A). Treatment started 2-weeks post-grafting and tumor growth was monitored by ultrasound weekly up to 5-weeks (sacrifice) (Fig. 2A). Co-grafting of tumor KPC cells plus PSCs results in increased tumor growth and metastatic potential, as compared to grafting of tumor cells alone (Fig. 2B-C). We observed that mouse treatment with SOM230 does not impact, as compared to the non-treated group, the growth of tumor cell grafts, nor of tumor cells plus PSC co-grafts (Fig. 2B), but dramatically reduces the number of metastatic lung foci especially in the condition where PSCs are co-grafted with tumor cells (Fig. 2C-D). To investigate the role of the receptor *sst1* expressed in CAFs [13] on SOM230 inhibitor effects, we also co-grafted tumor cells with PSCs isolated from *sst1* knockout mouse pancreata, and treated the grafted mice with SOM230 or not. We observed that PSCs grown *in vitro* get activated since they acquire the expression of the activation marker  $\alpha$ SMA after 5-days of culture, and also expression of the receptor *sst1* after 9-days (Fig. S2A). In contrast, PSCs isolated from *sst1* KO mouse pancreata don't express the *SSTR1* mRNA, as expected (Fig. S2B). Whereas *sst1* expression knockout in PSCs co-grafted with tumor cells does not significantly impact the growth and metastasis of tumors, as compared to grafts composed of tumor cells with wild-type PSCs, it partially prevents SOM230 to exert its anti-metastatic effect (Fig. 2C). These results demonstrate that SOM230 effect is at least CAF-dependent and triggered by the somatostatin receptor *sst1*.

We then performed a membrane cytokine array to identify plasmatic factors regulated by the SOM230 treatment and found several growth factors, cytokines and chemokines mainly downregulated including CSF1 (Fig. S2C). Interestingly, CSF1 plasmatic concentration, as measured by ELISA, is found increased in mice co-grafted with both tumor cells and PSCs, as compared to mice grafted with tumor cells alone ( $p=0.057$ ), and we confirmed that SOM230 dramatically decreases plasmatic CSF1 ( $p<0.01$ ) (Fig. 2E). This result is further confirmed when CSF1 protein level is analyzed by Western-blot using tumors from mice co-grafted with tumor cells plus PSC and treated or not with SOM230 (Fig. 2F). In contrast, SOM230 is less potent to decrease plasmatic CSF1 concentration in mice co-grafted with tumor cells with *sst1* knockout PSCs, as compared with wild-type PSCs (Fig. 2E). Interestingly, CSF1 is shown by

immunohistochemistry to be expressed in our murine co-grafted tumors by stromal fibroblastic cells also expressing  $\alpha$ SMA (Fig. 2G).

### **Tumor and plasmatic CSF1 concentrations correlate with tumor cell metastatic potential in a preclinical immunocompetent mouse PDA model**

To confirm these results in a spontaneous PDA mouse model recognized to mimic the human pathology and to develop a fibrotic stroma (KPC mice, *Pdx-1-Cre* ; *LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>* ; *LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>*) [17], we treated KPC mice with SOM230. Tumor apparition was monitored using ultrasound in mice starting at 8-weeks of age (Fig. 3A), since tumors appear in this model with heterogeneous kinetic [17]. This enabled to start treatments at homogeneous tumor volumes between treatment groups (Fig. S3A) and the corresponding age of enrolled mice is reported in Table 1. Tumor volumes were weekly monitored by ultrasound. One cohort was sacrificed at day-21 post-treatment start, and another cohort at ethical endpoint for survival study. SOM230 treatment was evaluated alone, but also in a chemotherapy-treated background (gemcitabine), as all PDA patients receive chemotherapies. We observed that 4 out of 9 mice left untreated, and 2 out of 5 mice treated with gemcitabine, but none of the combo-treated (gemcitabine plus SOM230) mice, died within the first 21-days of treatment (Fig. S3B-D), and mouse survival is significantly extended within this period of time with the combo treatment, as compared to both untreated or gemcitabine-treated mice (Fig. S3E). When evaluating the full survival curves, the combo gemcitabine plus SOM230 treatment extends mouse survival as compared to no-treatment only, whereas gemcitabine effect is not significant by itself. The increased in life expectancy with gemcitabine or with combo gemcitabine plus SOM230 treatment is obtained when treating the PKI (*Pdx1-Cre;KrasG12D;Ink4a<sup>-/-</sup>*) mouse model, another spontaneous and immunocompetent model of PDA (Fig. S3F) [18].

When analyzing tumor volume progression in the two KPC cohorts within day-1 to day-21, we observed a significant reduction of tumor growth with gemcitabine alone, SOM230 alone, or with the combo, as compared to no treatment (Fig. 3B), as also quantified by the calculation of the tumor growth slopes (Fig. 3C). Importantly, we then analyzed incidence of liver

metastasis in KPC mice from the survival cohort, to compare metastases in mice with a comparable volume of their primary tumor (1 cm<sup>3</sup>, at ethical endpoint). The corresponding treatment duration at ethical endpoint is reported in Table 1. Whereas 90% of untreated and gemcitabine-treated mice had developed liver metastasis, gemcitabine surprisingly increasing the incidence of macrometastases (defined as covering more than 5% of the liver area), gemcitabine plus SOM230 treatment dramatically reduces both metastasis incidence (reduced to 50%) and metastasis size (no macrometastases observed) (Fig. 3D-E & S3G).

Additionally in KPC mice, a membrane cytokine array enabled to identify several growth factors, cytokines and chemokines regulated by gemcitabine plus SOM230 treatment as compared to gemcitabine alone (Fig. S3H), some of these factors being common to those identified with the grafted (tumor cells plus PSC) mouse model (Fig. S2C), including CSF1. Plasmatic CSF1 concentration decrease upon SOM230 treatment in addition to gemcitabine is confirmed by ELISA, as well as tumor CSF1 protein expression, as analyzed by Western-blot, which is decreased in tumors from gemcitabine plus SOM230-treated mice, as compared to untreated and gemcitabine-treated (Fig. 3F-G). Immunohistochemistry analyses show that, in addition to sst1, tumor CSF1 is expressed in the stroma (fibroblasts) (Fig. 3I-J).

Altogether, these results demonstrate in different experimental immunocompetent mouse models of PDA that SOM230 decreases, in a context of chemotherapeutic treatment (gemcitabine), tumor volume progression, and more importantly tumor metastasis, with a significant extension of life survival. SOM230 effect depends on sst1 expressed on activated PSCs, which are pro-tumoral and pro-metastatic. This negative effect of SOM230 on tumor progression and metastasis correlates to its robust inhibitory effect on both CSF1 plasmatic concentrations and tumoral expression. Finally, we show that the main CSF1 tumoral production in these PDA mouse models arises from the stroma (fibroblasts), and is under the negative control of the sst1-SOM230 system. This is consistent with comparative mRNA expression quantification in the pancreatic stroma vs. tumor compartment through RNAseq analyses on human patient-xenografts which quantifies a 20.8-fold increased stromal CSF1 (Fig. S3H).



### **Tumor CSF1 correlates with macrophage M2 polarization**

To investigate whether decreased CSF1 production by CAFs under SOM230 treatment correlates with alterations in myeloid cell recruitment and polarization within the primary tumor, we first performed FACS analyses on tumors isolated from the intra-pancreatic co-graft of KPC tumor cells alone, or with wild-type or *sst1*KO PSCs. Interestingly, addition of PSCs to tumor cells significantly increases macrophage recruitment, as compared to tumor cells alone, as well as polarization to M2 macrophages and recruitment of MDSC ( $p=0.07$ ) (Fig. 4A-C), although total CD45 and lymphoid CD3, CD4 and CD8 cell populations are not impacted (Fig. S4A-D). We confirmed these results in another mouse immunocompetent model of PDA using co-graft of KPC tumor cells with mouse embryo fibroblasts (MEFs) in mice treated or not with SOM230. Hence, the co-graft of MEFs with tumor cells significantly increases macrophage recruitment and M2 polarization, but not MDSC presence, as compared to grafts with tumor cells alone, and SOM230 significantly reduces M2 polarization (Fig. 4D-F). Total CD45 and lymphoid CD3, CD4 and CD8 cell populations are not impacted (Fig. S4E-H). We validated that MEFs express the *sst1* receptor (Fig. S4I).

In KPC mice, CD206 immunofluorescence quantification was used as readout of macrophage M2 presence which shows in primary tumors that gemcitabine does not affect M2 polarization as compared to untreated tumors, whereas addition of SOM230 to gemcitabine robustly decreases it, as compared to gemcitabine treatment alone (Fig. 4G-H). These results demonstrate in different immunocompetent mouse models of PDA that the presence of activated fibroblasts within primary tumors facilitates macrophage recruitment and M2 polarization, which is robustly decreased upon mouse treatment with SOM230 involving the receptor *sst1* expressed on these fibroblasts.

### **Extracellular-matrix deposits and angiogenesis are altered in primary KPC tumors upon SOM230 treatment**

We then explored in KPC primary tumors and metastases which are the biological effects putatively explaining SOM230 anti-metastatic potential. We observed by

immunohistochemistry on primary tumors that cell proliferation (Ki67) is not modified by the gemcitabine or gemcitabine plus SOM230 treatments as compared to untreated tumors, whereas both treatments similarly increase replicative stress induced by the chemotherapy (as quantified with the phospho- $\gamma$ -H2AX stain), as expected (Fig. 5A-B and 5C-D, respectively). A drastic difference observed between gemcitabine vs. gemcitabine plus SOM230 -treated tumors is the quantity of extracellular matrix deposit (glycoaminoglycans, proteoglycans and mucins, quantified using the Movat Pentachrome stain), which shows a robust decrease in the SOM230-treated condition (Fig. 5E-F). Tumor expression of  $\alpha$ -SMA, a marker of CAFs, is also decreased in the gemcitabine plus SOM230, as compared to gemcitabine, treatment condition (Fig. 5G-H). It is reported that ECM-induced stiffness causes mechanical stresses on tumor cells, stimulating signaling pathways including STAT3 activation which favors invasion. Accordingly, tumor cell STAT3 activity (as quantified through its phosphorylation level) is decreased upon SOM230 treatment (Fig. 5I-J). Additionally, vessel area, as quantified with the Meca32 stain, is significantly increased by the gemcitabine treatment (Fig. S5A), these vessels being immature because uncovered by pericytes, as quantified by the co-stain of the markers Meca32 with NG2 specific for pericytes (Fig. 5K-L); in contrast, the combo treatment gemcitabine plus SOM230 decreases angiogenesis (vessel area) (Fig. S5A), but increases vessel normalization (increased pericyte covering), as compared to gemcitabine treatment alone (Fig. 5K-L). Macrophages M2 are involved in ECM remodeling and angiogenesis through the secretion of matrix metalloproteases (MMPs) and angiogenic factors, respectively. These results are therefore consistent with the observed decrease in SOM230-treated mice of the plasmatic concentrations of several MMPs (MMP-2, -3, -9) and of the angiogenic factors VEGF and angiopoïetin-2, in contrast to the plasmatic concentration increase of the vessel normalization factor angiopoïetin-1 (Fig. S2C and Fig. S3H). As other myeloïd subsets than macrophages (e.g., granulocyte neutrophiles) can be involved in the metastatic process, especially in the preparation of the metastatic niche, corresponding specific (Ly6G) and non-specific (MPO, myeloperoxidase) markers to neutrophiles were quantified in the primary tumors as well as in the liver metastases together with CD206 marker for M2 macrophages. This

analysis was also provoked by the observed increase of plasmatic concentrations of the chemokines LIX and CXCL2 in SOM230-treated mice (Fig. S2C and Fig. S3H). Our results however show that the number of neutrophils is not different in tumors or liver metastases from untreated, gemcitabine, or gemcitabine plus SOM230 -treated mice (Fig. S5B-E, and not shown). Altogether, our results indicate that SOM230 treatment's major effects concern alterations, in pancreatic primary tumors of CAF activation, M2 macrophage polarization, angiogenesis and ECM deposits, and in the plasma of ECM remodelling enzymes and angiogenic factors, all consistent with its anti-metastatic benefit.

## Discussion

We previously showed that CAFs are master secretors of proteins, the synthesis of which is regulated by the PI3K-Akt-mTOR pathway recently shown as highly activated in CAFs as compared to non-activated PSCs [13]. Secretome analyses through exhaustive proteomic searches on 9 primary cultures of patient pancreatic tumor -derived CAFs treated with an inhibitor of the PI3K-Akt-mTOR pathway, i.e., the somatostatin analog SOM230 targeting the sst1 receptor expressed in CAFs, enabled to identify a PI3K-Akt pathway signaling signature indeed negatively regulated by SOM230. Signatures in pathways such as focal adhesion, ECM receptor interaction, or proteoglycans in cancer were also found negatively enriched by the drug. Negative regulation of these pro-tumoral pathways is consistent with the inhibitory effects of SOM230 that we obtained on tumor growth and metastatic dissemination using immunocompetent mouse models, developing either experimental or spontaneous pancreatic tumors, and treated with SOM230, in combination or not with the chemotherapy gemcitabine. Importantly, the cytokine CSF1 was identified to be potently downregulated upon treatment with SOM230, both in the CAF secretome (CSF1 belongs to the PI3K-Akt signaling pathway signature) and through cytokine profiling in the plasma of our two mouse models of PDA. By immunohistochemistry, we revealed that a main source of CSF1 in mouse pancreatic tumors is CAFs ( $\alpha$ SMA-positive cells). Additionally, the main stromal origin of CSF1 was confirmed in human pancreatic tumors by comparing its mRNA expression profile in the stroma *versus* tumoral compartment from a published transcriptomic database of patient-derived xenografts [5]; in this study, human tumor-derived mRNAs were quantitatively and separately analyzed by RNAseq from mouse-derived stromal mRNAs. CSF1 is a cytokine involved in the recruitment of monocytes into the tumor, as well as in their polarization into macrophages with a M2 phenotype, endowed with pro-angiogenic and ECM remodelling features that favor tumor cell metastasis. Downregulation of intra-tumoral and plasmatic CSF1 concentrations by SOM230 correlates with the phenotype of the primary tumors obtained upon treatment with this drug from the two immunocompetent mouse PDA models that we used, e.g., robust decrease in macrophage presence, mainly M2. Decreased ECM deposits and angiogenesis

were also observed upon SOM230 treatment in KPC mouse tumors, consistent with a decrease in M2 macrophage polarization. Our results are consistent with the dialog between CAFs and macrophages recently described *in vitro* to push macrophages toward the M2 phenotype through CAF-derived CSF1 [19]. Surprisingly, SOM230 treatment decreases primary tumor growth although not as importantly as metastatic dissemination which is dramatically reduced, only micrometastatic lesions being discovered in the SOM230-treated groups. Neither tumor cell proliferation decrease nor apoptosis increase can explain SOM230 anti-tumoral effect, but rather an inhibitory effect of the drug on ECM deposits, consistent with a reduction in stellate cell activation (decreased of the  $\alpha$ SMA marker), as we previously showed in an immunodeficient mouse model of human tumor cells plus CAF grafting [13]. Interestingly, tumor cell STAT3 phosphorylation, which reflects pancreatic cancer cell stemness and invasivity, is reduced in primary tumors from SOM230-treated mice, linking a biology parameter of the primary tumor with SOM230 anti-metastatic potential. STAT3 phosphorylation was shown to directly result from tissue stiffening and to be of poor prognostic in pancreatic cancer [20]. Intriguingly, another stromal effect of SOM230 is an anti-angiogenic but normalizing effect on endothelial vessels whose number is indeed decreased but coverage with pericytes increased in primary tumors of SOM230-treated mice. This result is consistent with the SOM230-induced plasmatic decrease of angiotensin-2, but increase of angiotensin-1, respectively involved in angiogenesis or in pericyte recruitment increase to endothelial cells. SOM230 may regulate vessel biology indirectly through CAFs and M2 macrophages which secrete angiogenic factors, or directly on endothelial cells which express somatostatin receptors [21]. Using PSCs knockout for the somatostatin receptor *sst1* and orthotopically co-grafted with tumor cells, we demonstrated that SOM230 anti-tumoral and anti-metastatic effect depends on *sst1* targeting on PSCs, and associated decrease of tumoral and plasmatic concentrations of CSF1, although a residual reduction of plasmatic CSF1 is observed in this model upon SOM230 treatment but which may involve its effect on endogenous PSCs (not knockout for *sst1*).

CSF1 - CSF1 receptor (CSF1-R) axis inhibition has been tested in different cancers including PDA to block tumor-associated macrophage development (monocyte extravasation, proliferation and differentiation) [22]. This axis is however mainly involved in the differentiation of the MHC-II<sup>low</sup>CD206<sup>high</sup> TAM phenotype (M2-like), whereas CSF2 (GM-CSF) sculpts the MHC-II<sup>high</sup>CD206<sup>low</sup> TAM subset (M1-like). This is probably explained by higher expression of CSF1-R by MHC-II<sup>low</sup>CD206<sup>high</sup> than by MHC-II<sup>high</sup>CD206<sup>low</sup> TAM (23). CSF1 - CSF1-R blockade using CSF1-R inhibitors or blocking antibodies resulted in several preclinical studies in a shift from mostly immunosuppressive properties to ameliorated antigen presentation capacity of TAM subsets, with a therapeutic benefit (reduction of the primary tumor growth) for breast cancer, glioblastoma, prostate or PDA in association with chemo- or radio-therapies. Intriguingly, radiotherapy was reported to increase CSF1 secretion in mouse prostate cancer models with subsequent increased recruitment into the primary tumor of tumor-promoting myeloid cells which was blocked with CSF1-R inhibition, explaining the synergistic therapeutic benefit of the combination of radiotherapy and CSF1-R blockade [23]. Gemcitabine also increased TAM in primary tumors of mouse PDA models [24], which we also observed although not statistically significant. We also observed an increased incidence of liver macrometastases in gemcitabine-treated vs. untreated KPC mice, as already reported by other groups [25], and correlating with increased phosphorylation in cancer cells of STAT3, a marker for tumor-initiating cells. A link between TAM and STAT3 phosphorylation upon gemcitabine treatment was already reported in PDA [24]. Combinatory treatments of CSF1-R inhibitor or blocking antibody with chemotherapy has resulted in PDA in decreased tumor growth, mainly through the recruitment of cytotoxic CD8 T cells [24], and addition of checkpoint-based immunotherapies was even more beneficial by enabling the activation of the recruited CD8 cells [15]. We couldn't observe intra-tumor CD8 T cell recruitment with our gemcitabine plus SOM230 therapeutic combo, although a primary tumor size reduction is obtained but probably due to reduced ECM deposits through CAF normalization (reduced ECM protein secretion activity and  $\alpha$ SMA expression). Rather, a dramatic reduction of tumor cell metastasis is obtained with the combo, in link with a survival improvement, as compared to untreated mice.

A significant mouse survival improvement is not obtained with gemcitabine treatment alone, consistent with clinical observations in patients. Finally, resistance to CSF1-R blockade was reported to involve either upregulation in tumors of pro-metastatic chemokines such as CXCL2 or CXCL5 (through the recruitment of neutrophils), or of IGF1 which triggers IGF1-R - expressing glioblastoma cell recurrence [26], this resistance being efficiently reversed using CSF3-R or IGF1-R inhibition, respectively [26, 27]. Importantly, although we observed a yet unexplained increase upon SOM230 treatment in both KPC and orthotopic graft models of plasmatic CXCL2 and LIX (mouse CXCL5 homolog), neutrophil recruitment into the primary tumor or liver metastases was not increased in SOM230-treated mice. This chemokine tumoral raise upon CSF1-R blockade was recently explained through a feedback onto CAFs which secrete these chemokines [16], and which probably also explains our results. Interestingly, an encouraging phase-I trial in metastatic PDA patients using gemcitabine combined to SOM230 demonstrated stabilization of pancreatic tumor growth in correlation to decreased plasmatic IGF1 concentrations [28], confirming the previous described inhibitory effect of somatostatin analog on IGF1 [29], and putatively important to prevent PDA tumor recurrence using CSF1-R blockade using SOM230. Importantly, CSF1-R blockade was recently shown to trigger a transcriptomic reprogramming of PDA cancer cells from the less differentiated and more aggressive PDA subtype to the more differentiated and less aggressive PDA subtype [11], further stressing on the critical role of CSF1-R -expressing TAM in PDA cell plasticity, in addition to their role in blocking T cell responses through immunosuppression. Our results, obtained in a mouse model of spontaneous PDA mimicking the human pathology, reveal a clear therapeutic anti-metastatic effect of the combo gemcitabine plus SOM230, which should benefit to non (yet) metastatic PDA patients.

**Acknowledgements & Grant supports:** This work was supported by LNCC (Ligue Nationale Contre le Cancer RAB09006BBA), the Canceropole Grand Sud-Ouest (RMA04002BPA), the ANR (Agence Nationale pour la Recherche, project n°R06423BS), the Labex TOUCAN, The Fondation de France (2014 00047506), and the French National Institute of Cancer (INCa, PLBIO13-134 and PLBIO15-115). R.S. and T. D. were recipients of a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). C.J. was recipient of a fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC).

## References

- 1 Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, *et al.* Pancreatic cancer. *Nature reviews Disease primers* 2016;**2**:16022.
- 2 Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, *et al.* Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* 2011;**17**:500-3.
- 3 Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 2016;**531**:47-52.
- 4 Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SG, Hoadley KA, *et al.* Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet* 2015;**47**:1168-78.
- 5 Nicolle R, Blum Y, Marisa L, Loncle C, Gayet O, Moutardier V, *et al.* Pancreatic Adenocarcinoma Therapeutic Targets Revealed by Tumor-Stroma Cross-Talk Analyses in Patient-Derived Xenografts. *Cell reports* 2017;**21**:2458-70.
- 6 Vennin C, Murphy KJ, Morton JP, Cox TR, Pajic M, Timpson P. Reshaping the Tumor Stroma for Treatment of Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 2018;**154**:820-38.
- 7 Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, Kong B, Esposito I, Friess H, *et al.* The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. *Curr Mol Med* 2012;**12**:288-303.
- 8 Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016;**16**:582-98.
- 9 Knudsen ES, Vail P, Balaji U, Ngo H, Botros IW, Makarov V, *et al.* Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Combinatorial Genetic, Stromal, and Immunologic Markers. *Clin Cancer Res* 2017;**23**:4429-40.
- 10 Song W, Mazziere R, Yang T, Gobe GC. Translational Significance for Tumor Metastasis of Tumor-Associated Macrophages and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Frontiers in immunology* 2017;**8**:1106.
- 11 Candido JB, Morton JP, Bailey P, Campbell AD, Karim SA, Jamieson T, *et al.* CSF1R(+) Macrophages Sustain Pancreatic Tumor Growth through T Cell Suppression and Maintenance of Key Gene Programs that Define the Squamous Subtype. *Cell reports* 2018;**23**:1448-60.
- 12 Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, Castiglioni A, Yuen K, Wang Y, *et al.* TGFbeta attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature* 2018;**554**:544-8.
- 13 Duluc C, Moatassim-Billah S, Chalabi-Dchar M, Perraud A, Samain R, Breibach F, *et al.* Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance. *EMBO Mol Med* 2015;**7**:735-53.



- 14 Moatassim-Billah S, Duluc C, Samain R, Jean C, Perraud A, Decaup E, *et al.* Anti-metastatic potential of somatostatin analog SOM230: Indirect pharmacological targeting of pancreatic cancer-associated fibroblasts. *Oncotarget* 2016.
- 15 Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, Nywening TM, West BL, Luo J, *et al.* CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res* 2014;**74**:5057-69.
- 16 Kumar V, Donthireddy L, Marvel D, Condamine T, Wang F, Lavilla-Alonso S, *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Neutralize the Anti-tumor Effect of CSF1 Receptor Blockade by Inducing PMN-MDSC Infiltration of Tumors. *Cancer Cell* 2017;**32**:654-68 e5.
- 17 Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, *et al.* Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005;**7**:469-83.
- 18 Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, *et al.* Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2003;**17**:3112-26.
- 19 Zhang A, Qian Y, Ye Z, Chen H, Xie H, Zhou L, *et al.* Cancer-associated fibroblasts promote M2 polarization of macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer medicine* 2017;**6**:463-70.
- 20 Laklai H, Miroshnikova YA, Pickup MW, Collisson EA, Kim GE, Barrett AS, *et al.* Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis and tumor progression. *Nat Med* 2016;**22**:497-505.
- 21 Albini A, Florio T, Giunciuglio D, Masiello L, Carlone S, Corsaro A, *et al.* Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. *Faseb J* 1999;**13**:647-55.
- 22 Bonelli S, Geeraerts X, Bolli E, Keirsse J, Kiss M, Pombo Antunes AR, *et al.* Beyond the M-CSF receptor - novel therapeutic targets in tumor-associated macrophages. *FEBS J* 2018;**285**:777-87.
- 23 Xu J, Escamilla J, Mok S, David J, Priceman S, West B, *et al.* CSF1R signaling blockade stanches tumor-infiltrating myeloid cells and improves the efficacy of radiotherapy in prostate cancer. *Cancer Res* 2013;**73**:2782-94.
- 24 Mitchem JB, Brennan DJ, Knolhoff BL, Belt BA, Zhu Y, Sanford DE, *et al.* Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res* 2013;**73**:1128-41.
- 25 Pothula SP, Xu Z, Goldstein D, Biankin AV, Pirola RC, Wilson JS, *et al.* Hepatocyte growth factor inhibition: a novel therapeutic approach in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2016;**114**:269-80.
- 26 Quail DF, Bowman RL, Akkari L, Quick ML, Schuhmacher AJ, Huse JT, *et al.* The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas. *Science* 2016;**352**:aad3018.
- 27 Swierczak A, Cook AD, Lenzo JC, Restall CM, Doherty JP, Anderson RL, *et al.* The promotion of breast cancer metastasis caused by inhibition of CSF-1R/CSF-1 signaling is blocked by targeting the G-CSF receptor. *Cancer immunology research* 2014;**2**:765-76.
- 28 Suleiman Y, Mahipal A, Shibata D, Siegel EM, Jump H, Fulp WJ, *et al.* Phase I study of combination of pasireotide LAR + gemcitabine in locally advanced or metastatic pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;**76**:481-7.
- 29 Theodoropoulou M, Stalla GK. Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol* 2013;**34**:228-52.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animal models**

#### **KPC mice**

LSL-Kras<sup>G12D/+</sup> ; LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup> ; Pdx-1-Cre (KPC) mice have been previously described (Hingorani et al. 2005). For all experiments, KPC mice were enrolled when 30-200 mm<sup>3</sup> tumor was detected by weekly ultrasound monitoring. Survival events were scored when mice lost >15% body weight, tumor burden reached > 1000 mm<sup>3</sup> in volume or per absolute survival events.

#### **Orthotopic graft models**

Age-matched 8 week-old female C57BL/6j mice were used for orthotopic mouse models. C57BL/6 mice were obtained from Charles River Laboratories. Syngeneic orthotopic PDAC tumors were established by surgical implantation, as previously described. Briefly, KPC cells and either PSCs or MEFs were trypsinized, washed and resuspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS). A 1:3 mix of pancreatic cancer cells (20000) and PSCs/MEFs (60000) were orthotopically injected in 20 µL PBS into each pancreas. Mice were anesthetized by inhalation of isoflurane. Treatments started two week after grafting when mice have been randomly placed in one of the treatment group (untreated and SOM230-LAR treated).

Blood and tissues were obtained at the indicated time points and processed for western blot, histology or flow cytometry. For protein analyses tissue pieces were snap frozen in liquid nitrogen. Serum was collected by centrifugation (10000 rpm, 10 min) was stored in aliquots at -80°C. Mice were kept under specific pathogen free conditions. All experiments were in accordance with institutional guidelines and European animal protection law and approved by the responsible government agency (agreement number 201612011806414).

#### **Treatments**

Mice have been treated s.c. with SOM-LAR (80 mg/kg) once every 28 days weeks and/or i.p. with gemcitabine (100 mg/kg, twice per week).

SOM230-LAR was provided by Novartis. Gemcitabine was obtained from "Institut Universitaire du Cancer de Toulouse" pharmacy and diluted in PBS.

Tumor volumes were measured by ultrasound (Vevo2100®-VisualSonics or Aixplorer®-Supersonic Imagine).

#### **Metastasis analyses**

Formalin-fixed paraffin-embedded livers were cut in whole (5  $\mu\text{m}$  -thick sections), and have been Hemalun-eosin-colored and examined for the presence and quantification of metastasis foci (mean number per section, and mean surface as a % of total liver surface), using the NanoZoomer Digital Pathology Virtual Slide Viewer (Hamamatsu).

### **Cell lines**

R211 KPC cells were derived from PDAC tumor tissue obtained from LSL-Kras<sup>G12D/+</sup> ; LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup> ; Pdx-1-Cre mice.

Pancreatic stellate cells (PSC) were isolated from WT C57BL/6J mice as previously described by Apte et al with minor modifications. In brief, pancreata were minced and digested for 30 min at 37°C in a dissociation buffer containing 0.05% collagenase P (Sigma-Aldrich) and 0.1% DNase I (Sigma-Aldrich) and 0.02% Pronase (Sigma-Aldrich) in Grey's balanced salt solution (GBSS; Sigma-Aldrich). Digested pancreata were filtered through a 100- $\mu\text{m}$  nylon mesh and washed in GBSS with 0.3% BSA. After spinning, the cell pellet was resuspended in 12 ml GBSS with 0.3% BSA and 10 ml of 43.75% Nicodenz (Sigma-Aldrich). 11 ml of cell suspension was layered below 4.5 ml of GBSS with 0.3% BSA, and the gradient was centrifuged for 20 min at 2600 rpm (with break switched off). The cells in the fuzzy band just above the interface between the Nicodenz and GBSS were harvested, washed in PBS, and plated.

MEFs were purified from 13.5-day-old WT C57BL/6J embryo and immortalized as described by Petroulakis et al.

CAFs were isolated from human pancreatic tumour tissues using the outgrowth method described by Bachem et al. Briefly, human CAFs were isolated by outgrowth, using explant techniques from histologically fibrotic areas of pancreas surgically resected from patients with PDAC disease. Small tissue blocks were cut (0.5–1 mm<sup>3</sup>) using a razor blade and were seeded in 10-cm<sup>2</sup> uncoated culture wells in the presence of Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM/F12 Lonza D8437) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Life Technologies) supplemented with L-Glutamine (L-glu, 2 mmol/L), penicillin, and streptomycin (P/S). Tissue blocks were cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>-air humidified atmosphere. 18 hours after seeding, culture medium was changed. CAFs grew out from the tissue blocks 1 to 3 days later.

### **Colorations and Immunostaining**

Serial sections of formalin-fixed, paraffin-embedded human tumor samples were deparaffinized in xylene, rehydrated in graded ethanol and water.

For H&E staining, slides were incubated 3min in hematoxylin and washed 5min in water. Slides were then soaked in acid bath (250mL water + 1mL 37% hydrochloric acid) and washed in water. Slides were incubated 3min in eosin and twice soaked in 100% ethanol before been incubated in xylene for 5min and mounted using Eukitt (Sigma-Aldrich #03989).

For Movat's pentachrome staining, slides were incubated 20min in working elastic stain solution (50% hematoxylin, 25% ferric chloride solution (10%) and 25% Lugol's iodine solution) and washed in running water. Slides were then dipped in ferric chloride (2%) 20 times, and rinsed in distilled water. Slides were then placed in sodium thiosulfate solution (5%) for 1 min, and washed in distilled water. Slides were then placed in acetic acid solution (3%) for 2 min, and without rinsing, placed in alcian blue solution pH 2.5 for 25 min. After rinsing with 3 changes of distilled water, slides were placed in Briebrich Scarlet - acid fuchsin solution for 3 min, and rinsed in distilled water. Slides were then placed in acetic acid solution (1%) for 10 sec, rinsed in distilled water, and placed in phosphotungtic acid solution (5%) for 5 min. Slides were then rinsed in distilled water, dipped in acetic acid solution (1%) and without rinsing, placed in tartrazine solution for 2 min. Slides were finally soaked in 100% ethanol before been incubated in xylene for 5min and mounted using Eukitt (Sigma-Aldrich #03989).

For immunostaining, slides subjected to antigen retrieval (10mM Sodium citrate pH6 or Tris-EDTA pH8.8 and autoclaved at 100°C for 15min), and quenched for peroxidase activity (10min with 3% hydrogen peroxide at RT) before been washed 5min in PBS. Periphery of section was marked with hydrophobic marker and sections were blocked in humidified chamber using blocking buffer (Dako #X0909) during 45min at RT. Slides were incubated with primary antibodies anti- $\alpha$ -Smooth Muscle Actin (anti- $\alpha$ -SMA, Abcam, #ab7817, 1/200), anti-Colony stimulating factor-1 (anti-CSF1 #ab99178, 1/200), anti-lymphocyte antigen 6 complex locus G (anti-Ly6g [RB6-8C5] #ab25377, 1/100), anti-myeloperoxidase (anti-MPO #ab188211, 1/500), anti-phospho-STAT3 ((Tyr705)[D3A7] #CST9145, 1/200), anti-Ki67 ([SP6] #ab16667, 1/200), anti-phospho- $\gamma$ H2AX ((Ser139) [20E3] #CST9718, 1/500) anti-CD8 ([D4W2Z] #CST98941, 1/400) overnight at 4°C. Slides were washed thrice 5min in PBS and incubated in ImmPRESS secondary antibody (Vector, mouse #MP-7402, rabbit #MP7401 or rat #MP7404) for 1h at RT. After washing slides thrice in PBS, antibody binding was visualized with DAB (3,3'-diaminobenzidine) substrate kit (Vector, #SK4105) or AEC (aminoethyl carbazole) substrate chromogen (DAKO, #K3464) and counterstained with hematoxylin (1 min). Slides were washed in water. Sections were permanently mounted using glycergel (DAKO, #C0563) and imaged using NanoZoomer XR Hamamatsu (Imag'IN core from "Institut Universitaire du Cancer Toulouse", France). Quantifications were performed using ImageJ software

For immunofluorescence staining, after incubation with anti- $\alpha$ -Smooth Muscle Actin (anti- $\alpha$ -SMA, Abcam, #ab7817, 1/200) and anti-mannose receptor (anti-CD206 #ab64693, 1/500) overnight at 4°C, slides were washed in PBS and DAPI (1/1000, Sigma-Aldrich, #D9545) plus secondary antibodies Goat anti-Mouse Alexa Fluor 488 (1/1000, Invitrogen, #A-11001) or Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 647 (1/1000, Invitrogen, #A-21244) were added for 1h at RT. After PBS washes, slides were mounted in Fluorescent mounting Medium (Dako, #S3023) and images acquired using Cell Observer videomicroscope (Zeiss), Zen 2012 blue edition. Quantification was performed using ImageJ software.

### **Blood vessel density and pericyte coverage**

Tumor sections were co-immunostained by anti-MECA32 for detecting tumor vessel and anti-NG2 antibodies for staining pericyte. Tumor vessels and pericyte coverage analysis were performed as described in Gilles et al. Cancer Research 2016. Briefly, tumor blood vessel density, and pericyte coverage are plotted as the % of the MECA32 staining normalized to nuclei or the % of the co-localization between MECA32 and NG2 normalized to nuclei. Immunofluorescence images of tumor sections of PDAC were captured by using a FV1000 IX81 laser-scanning confocal microscope (Olympus), with a 10x or 40x oil objective (NA 1.3). Acquisitions were performed with the same settings on multiple tissue sections (5 fields per mouse) and included negative controls for determination of background staining, which was negligible.

### **Flow-cytometric analysis**

Single-cell suspensions were prepared from dissected pancreatic tumors by manual mincing using a scalpel, followed by enzymatic digestion with Tumor Dissociation Kit (130-096-730, Milteny Biotec) according to the manufacturers' recommended protocol for 20 minutes at 37°C with constant stirring. Digestion mixtures were filtered through 40- $\mu$ m nylon strainers (Fisher Scientific). Cells were washed twice in FACS buffer (PBS + BSA 1% + SVF 10%) and incubated for 45 minutes with 50  $\mu$ L of fluorophore-conjugated anti-mouse antibodies [CD45 (30-F11), CD3 (17-A2), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), CD11b (M1/70), Ly-6g (1A8)] (all from BD Biosciences), CD206 (C068C2) (from BioLegend) and F4/80 (BM8) (from ThermoFisher)] using the manufacturers' recommended concentrations. Data acquisition was performed on the Fortessa LSR (BD Biosciences) and Diva software was used for analysis.

### **Western blot**

Tumor were crushed with Precellys® device (Ozyme) in lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF and a cocktail of

protease inhibitors, Roche). Equal amount of proteins were resolved by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in 5% powdered milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) for 30 min followed by incubation with primary antibodies (anti-Colony stimulating factor-1 (anti-CSF1 #ab99178, 1/1000); anti-Akt; anti-sst1) overnight at 4°C. Membranes were then washed with TBST three times and incubated with horseradish peroxidase-coupled secondary antibody for 1 h at room temperature, washed again, and treated with Pierce™ ECL Western Blotting Substrate prior to detection with PXi imaging system (Syngene).

### **ELISA and cytokine arrays**

CSF-1 detection in plasma was performed using Mouse M-CSF Quantikine ELISA Kit (MMC00; R&D Systems) according to manufacturer's instructions.

Cytokine assay was performed using Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array Kit (ARY028; R&D Systems) according to manufacturer's instruction. Membranes chemoluminescences were captured with PXi imaging system (Syngene). Data acquisition and quantification was performed using Quick Spots Tool software (Western Vision Software).

### **Secretome**

CAFs were plated in 100mm dishes, deprived overnight and treated or not with SOM230 for 48h. Conditioned media were harvested, filtered, and frozen for mass-spectrometry analysis (n=9 CAFs).

### **Statistics**

Unless stated otherwise in figure legend, statistical significance was determined using two-ways Student's t-test. All values are mean +/- SD. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$  (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

## **FIGURE LEGENDS**

### **Figure 1: CSF1, a CAF-secreted cytokine correlating to PI3K-Akt pathway activity**

**A)** Graphical representation of quantitative proteomics data. Proteins are ranked in a volcano plot according to their statistical Pvalue (y-axis) and their relative abundance ratio (log fold change) between untreated (NT) and SOM230-treated CAFs (x-axis). **B)** KEGG pathway analysis for down-regulated proteins in conditioned media of SOM230-treated CAFs compared with untreated-CAFs. The value of  $-\log_{10}$  (P value) is shown. **C)** Top-proteins down-regulated

in PI3K/AKT KEGG pathway. **D)** Top-proteins down-regulated in Focal adhesion, ECM-receptor interaction and proteoglycans in cancer KEGG pathways.

**Figure 2: Tumor and plasmatic CSF1 concentrations correlate with tumor cell metastatic potential in a preclinical immunocompetent mouse PDA model of orthotopic tumor cell graft**

**A)** Experimental design of study. Tumours cells were syngeneically and orthotopically co-grafted with mouse sst1-WT or sst1-KO pancreatic stellate cells (PSCs). After 2 weeks, mice were randomized and treated or not with SOM230-LAR. After 3 weeks, mice were euthanized (n=4-10). **B)** Tumor volumes evolution from treatment day 1 to 21. **C, D)** Metastatic foci quantification (One-way ANOVA. All values are mean  $\pm$  sd. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$  (\* $P < 0.05$ )) and representative pictures of mice lungs. **E)** Plasmatic CSF-1 quantification of grafted-mice at sacrifice. One-way ANOVA. All values are mean  $\pm$  sd. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$  (\*\* $P < 0.01$ ). **F)** Western blot analysis of tumor lysates from cancer cells-injected mice treated or not with SOM230 (n=6). **G)** Representative immunohistochemistry (IHC) stainings of tumor from a cancer cells-PSC injected mice.

**Figure 3: Tumor and plasmatic CSF1 concentrations correlate with tumor cell metastatic potential in a preclinical immunocompetent mouse PDA model KPC**

**A)** Experimental design of study. KPC mice were enrolled and treated or not with gemcitabine, SOM230-LAR or both when tumor is detected. **B)** Tumor volumes evolution from treatment day 1 to 21 (n=5-13 mice). **C)** Tumor growth slopes from treatment day 1 to 21 (n=5-13 mice). One-way ANOVA. All values are mean  $\pm$  sd. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$  (\* $P > 0.05$  ; \*\*\* $P < 0.001$ ). **D, E)** Macroscopic (>5% liver area) and microscopic metastasis liver incidence and representative pictures of mice livers (n=5-8 mice). **F)** Plasmatic CSF-1 quantification of KPC mice at sacrifice (n=4-5 mice). One-way ANOVA. All values are mean  $\pm$  sd. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$  (\* $P < 0.05$ ). **G)** Western blot analysis of tumor lysates from KPC mice (n=3-5 mice). **H, I)** Representative immunohistochemistry (IHC) stainings of tumor from a KPC mice.

**Figure 4: Tumor CSF1 correlates with macrophage M2 polarization**

**A-F)** Proportions of tumoral macrophages (CD45+; F4/80+; CD11b+ cells) (**A, D**), M2 macrophages (CD206<sup>hi</sup> macrophages) (**B, E**) and MDSC (CD45+; CD11b; Ly6g+ cells) (**C, F**) were determined by flow cytometry on tumors from cancer cells-PSC-injected mice (**A-C**) (n=4-

5) or cancer cells-MEF-injected mice **(D-F)** (n=5-11). **G, H)** Quantification and representative pictures of immunofluorescence stainings of CD206 marker on KPC tumors (n=4-7).

**Figure 5: Extracellular-matrix deposits and angiogenesis are altered in primary KPC tumors upon SOM230 treatment**

Quantification and representative pictures of Ki67 positive-cells **(A, B)**, phospho- $\gamma$ H2AX positive-cells **(C, D)**, alcian blue area from Movat pentachrome staining **(E, F)**,  $\alpha$ -SMA positive area **(G, H)**, phospho-STAT3 tumoral positive nuclei **(I, J)** and pericyte coverage (co-staining of MECA32 and NG2) **(K, L)** in KPC tumors (n=5-7).



FIGURE 1

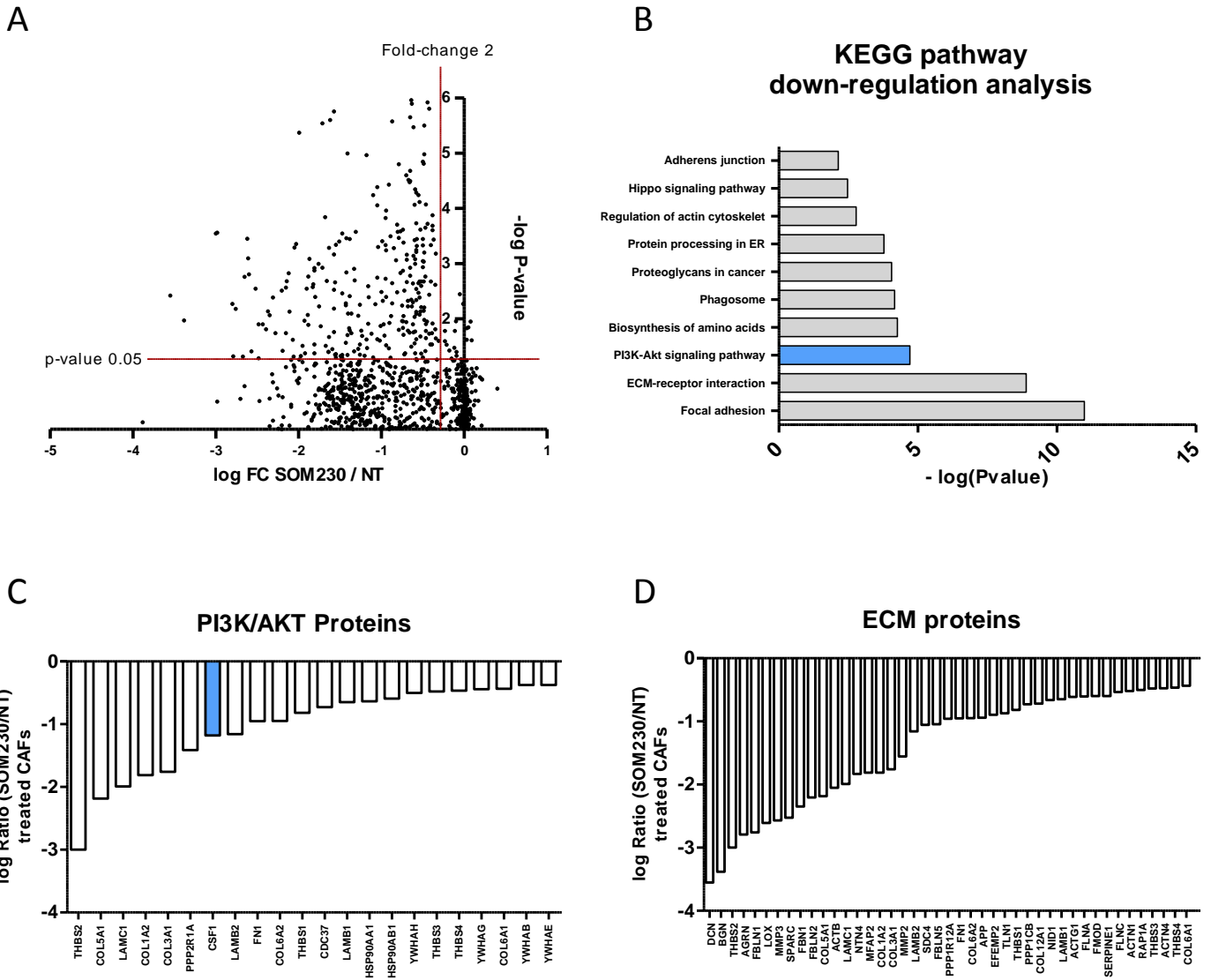
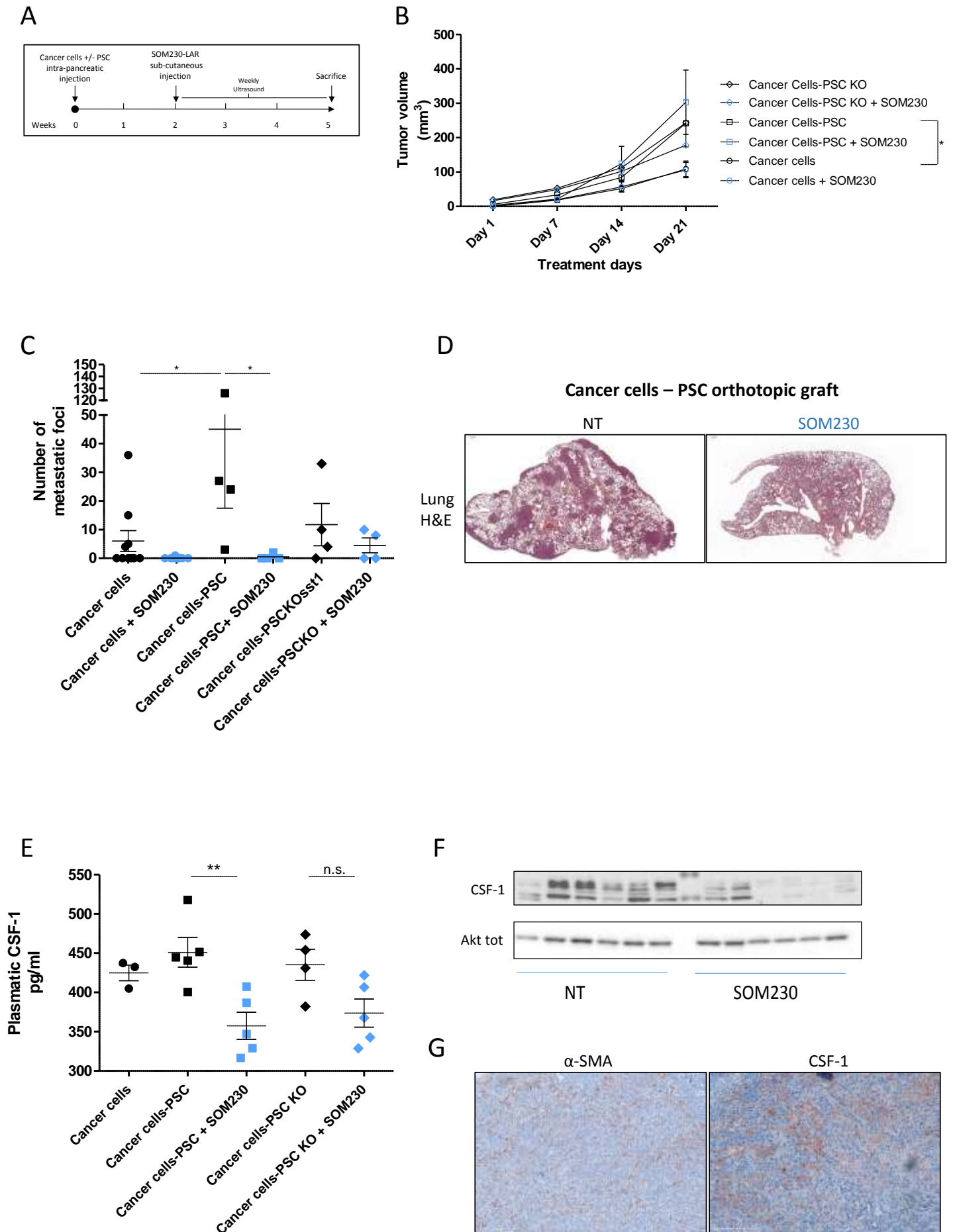


FIGURE 2



**FIGURE 3**

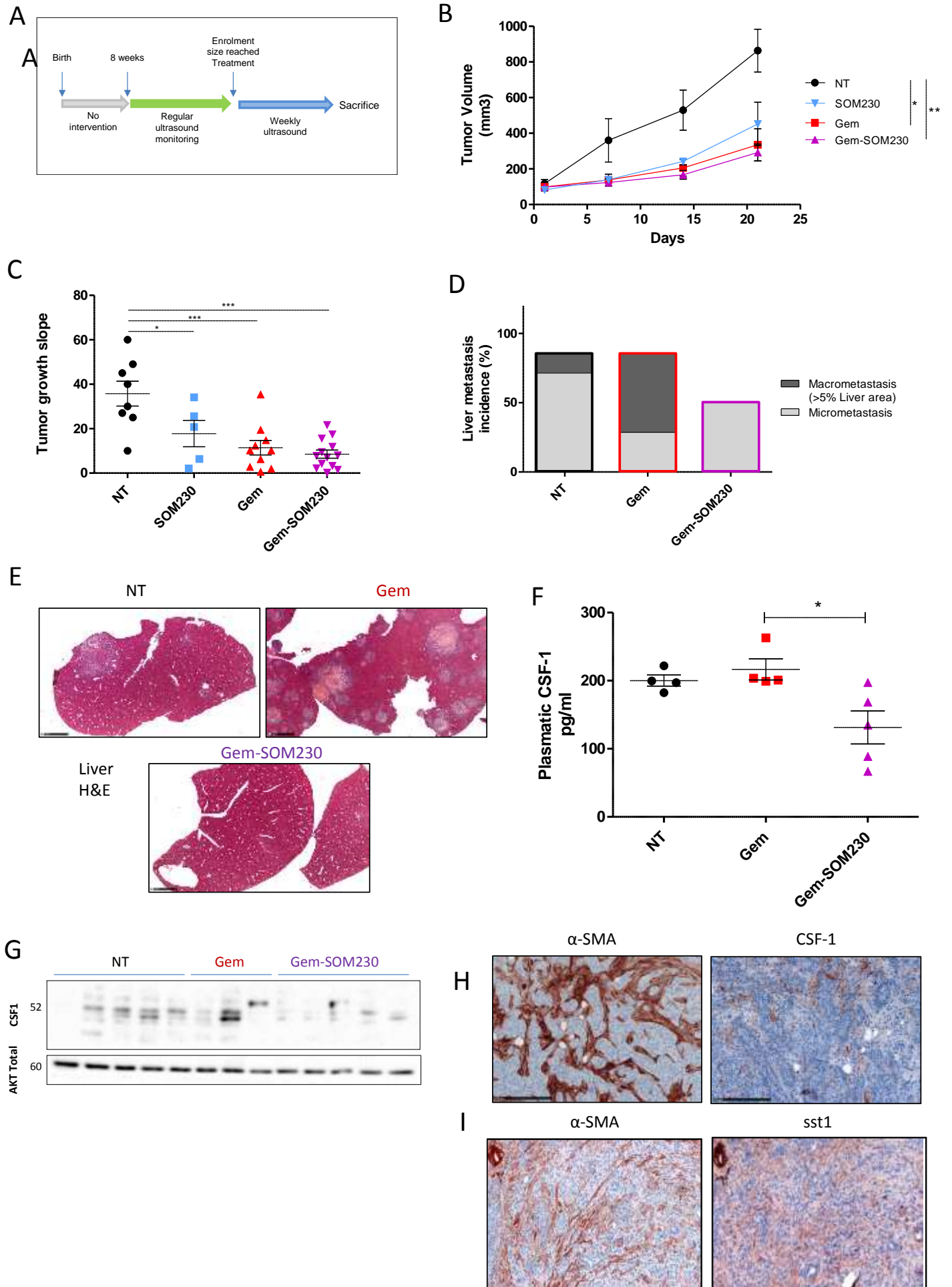
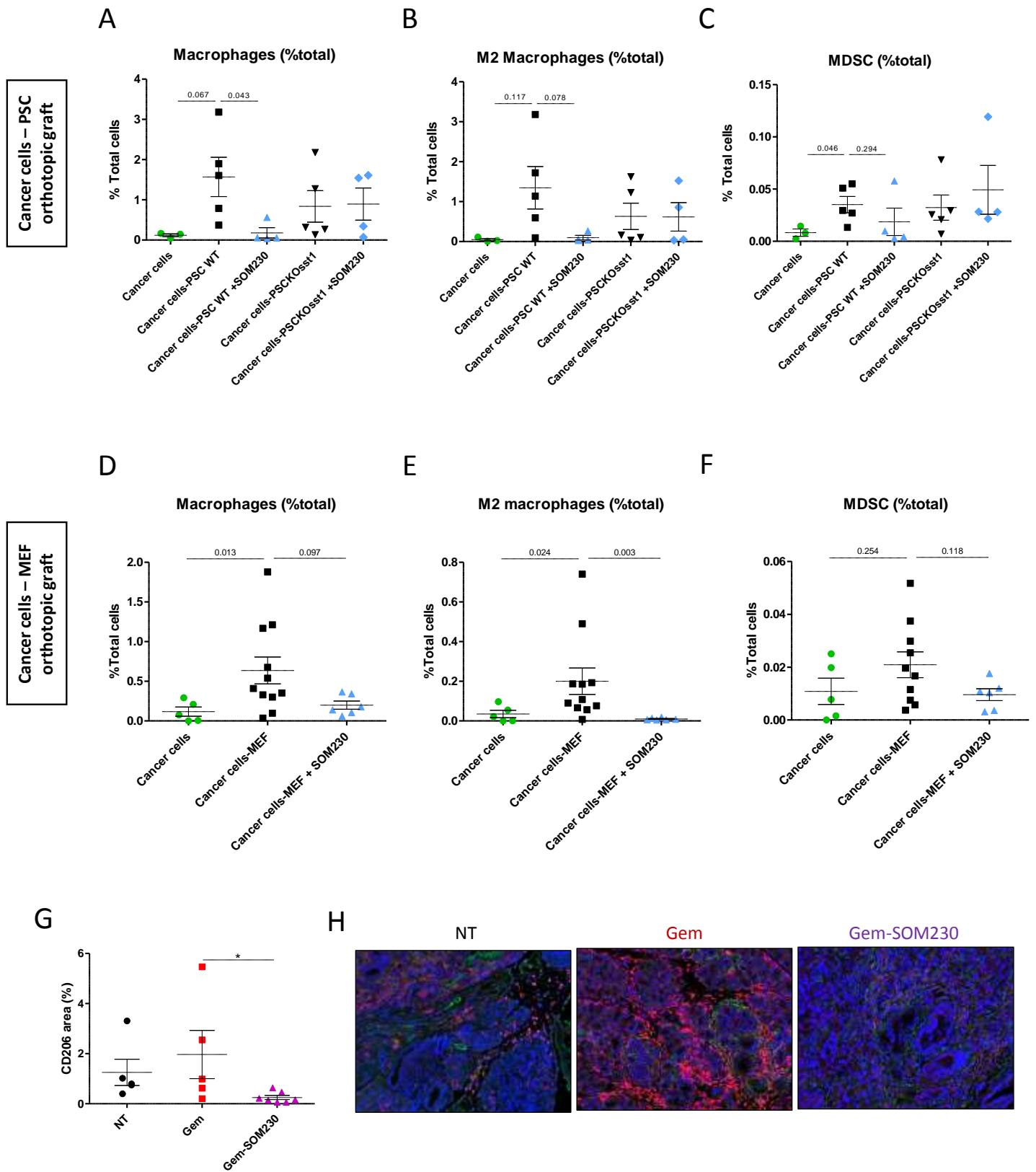
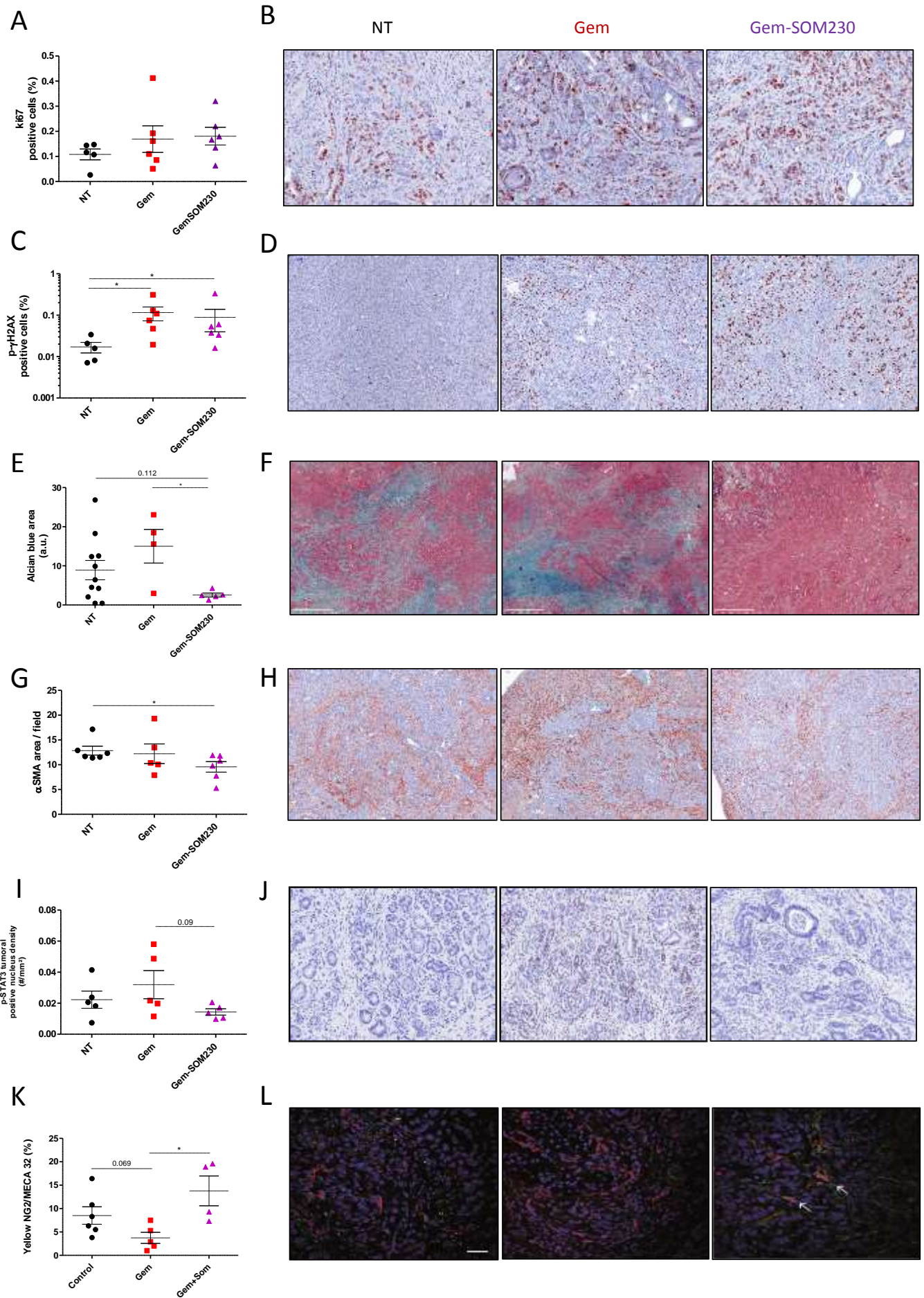


FIGURE 4



**FIGURE 5**



### Figure S1

**A)** Listing of significantly down-regulated proteins in CAFs (SOM230 versus untreated) (n=9 CAFs lines,  $p < 0.05$ )

### Figure S2

**A)** Western blot analysis of indicated proteins in pancreatic stellate cells (PSCs) isolated for 5, 9 and 13 days (n=1). **B)** The abundance of SSTR1 mRNA was analyzed by real-time PCR in PSCs either WT or KO for sst1, and spleen as a positive control. **C)** Graphical representation of cytokine array quantification on grafted mice plasma. Proteins are ranked according to their relative abundance ratio (log ratio) between untreated and SOM230-treated mice (plasma of 5 mice were pooled). **D)** Membrane antibody array assay using plasma from untreated and SOM230-treated mice (pool of n = 5).

### Figure S3

**A-D)** Mice were divided into 4 treatments groups with homogenous tumor volumes (n=5-13 mice) **(A)**, and tumor growth was weekly monitored by ultrasound **(B, C, D)**. **E)** Gemcitabine-SOM230 treatment significantly extend survival in KPC mice compared to untreated mice ( $P = 0.032$  Log-Rank Test) but not compared to gemcitabine-treated mice (n=5-8 mice) ( $P = 0.3965$  Log-Rank Test). **F)** In KIC model, Gemcitabine-SOM230 treatment significantly extend survival compared to untreated mice ( $P < 0,0001$  Log-Rank Test) and compared to gemcitabine-treated mice ( $P = 0,0259$  Log-Rank Test) (n=7-12 mice). **G)** Metastatic liver area quantification in livers of untreated, gemcitabine-treated and gemcitabine-SOM230 treated KPC mice (n=5-22 mice). **H)** Comparative CSF1 mRNA expression quantification of pancreatic stromal and tumoral through RNAseq analyses on human patient-xenografts (from PaCaOmics database, Nicolle et al. 2017). **I)** Graphical representation of cytokine array quantification on KPC mice plasma. Proteins are ranked according to their relative abundance ratio (log ratio) between gemcitabine-treated and gemcitabine+SOM230-treated KPC mice (plasma of 5 mice were pooled). **J)** Membrane antibody array assay using plasma from gemcitabine and gemcitabine+SOM230-treated KPC mice (pool of n = 5).

### Figure S4

**A-H)** Proportions of tumoral immune cells (CD45+ cells) **(A, E)**, T lymphocytes (CD45+; CD3+ cells) **(B, F)**, helper T lymphocytes (CD4+ T lymphocytes) **(C, G)** and cytotoxic T lymphocytes

(CD8+ T lymphocytes) were determined by flow cytometry on tumors from cancer cells-PSC-injected mice **(A-D)** (n=4-5) or cancer cells-MEF-injected mice **(E-H)** (n=5-11). **I)** Western blot analysis of indicated proteins in MEF and CAFs (n=1).

### Figure S5

Quantification of blood vessels density **(A)**, and quantification and representative pictures of Ly-6G positive-cells **(B, C)**, myeloperoxidase (MPO) positive-cells **(D, E)** in KPC tumors (n=5-7).

**Figure S1** : Listing of proteins down-regulated in CAFs (SOM230 versus untreated), p<0.05

Protein names	Gene names	Moy ratio NNT/SOM230	P value
Decorin	DCN	3565,20	0,0037699
Biglycan	BGN	2416,98	0,0105944
Thrombospondin-2	THBS2	993,52	0,0002836
Glia-derived nexin	SERPINE2	944,33	0,0002733
Adipocyte enhancer-binding protein 1	AEBP1	629,64	0,0053412
Agrin	AGRN	618,31	0,0478032
Fibulin-1	FBLN1	572,34	0,0065804
Peroxidasin homolog	PXDN	468,76	0,0481937
Carboxypeptidase E	CPE	448,97	0,0017332
HLA class I histocompatibility antigen	HLA-A	412,95	0,0003536
Protein-lysine 6-oxidase	LOX	405,09	0,0007965
Elongation factor 1-delta	EEF1D	401,99	0,0015514
Stromelysin-1	MMP3	369,77	0,0387783
SPARC	SPARC	334,84	0,0028440
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	GAPDHS	302,95	0,0125467
Coiled-coil domain-containing protein 80	CCDC80	269,82	0,0124452
Calumenin	CALU	244,86	0,0154646
Out at first protein homolog	OAF	232,27	0,0072591
Fibrillin-1	FBN1	223,43	0,0085725
Testican-1	SPOCK1	202,29	0,0041202
Connective tissue growth factor	CTGF	189,63	0,0180345
Fibulin-2	FBLN2	160,13	0,0030805
Collagen alpha-1(V) chain	COL5A1	153,20	0,0376581
Syndecan-4	SDC4	142,77	0,0181431
Phospholipid transfer protein	PLTP	140,32	0,0027074

A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1	ADAMTS1	139,38	0,0020889
Sushi repeat-containing protein SRPX2	SRPX2	131,96	0,0014868
Complement C1r subcomponent	C1R	129,50	0,0073546
Sushi repeat-containing protein SRPX	SRPX	116,75	0,0239367
Vitamin K-dependent protein S	PROS1	115,14	0,0483223
Actin, cytoplasmic 1;Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed	ACTB	112,36	0,0005106
Plasma alpha-L-fucosidase	FUCA2	108,05	0,0004376
Laminin subunit gamma-1	LAMC1	97,78	0,0000042
Inhibin beta A chain	INHBA	93,39	0,0471213
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	89,42	0,0306750
Stanniocalcin-2	STC2	84,81	0,0108231
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B	TNFRSF11B	82,61	0,0418658
Tryptophan--tRNA ligase	WARS	79,58	0,0028410
Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	LTBP1	78,27	0,0084952
Myosin-14	MYH14	76,43	0,0017097
Gelsolin	GSN	76,16	0,0128688
Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	LTBP2	74,59	0,0008218
Netrin-4	NTN4	67,79	0,0026525
Protein transport protein Sec23A	SEC23A	65,55	0,0023638
Coagulation factor IX	F9	64,96	0,0289241
Septin-7	SEPT-7	64,92	0,0419335
Microfibrillar-associated protein 2	MFAP2	64,75	0,0011975
Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	64,69	0,0013190
Serine protease HTRA1	HTRA1	62,57	0,0039875
Collagen alpha-1(III) chain	COL3A1	57,28	0,0010022
Gamma-enolase	ENO2	56,15	0,0059011
Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	53,61	0,0135799
Beta-hexosaminidase subunit beta	HEXB	51,51	0,0000029
T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3	51,00	0,0011871
Amyloid-like protein 2	APLP2	48,18	0,0001436
Urotensin-2	UTS2	47,26	0,0307781
60S acidic ribosomal protein P1	RPLP1	45,66	0,0020590
Angiopoietin-related protein 2	ANGPTL2	43,54	0,0396281
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	NACA	43,35	0,0397871
Complement C1s subcomponent	C1S	43,01	0,0212752
Glutathione S-transferase P	GSTP1	42,75	0,0005148
Calsyntenin-1;Soluble Alc-alpha;CTF1-alpha	CLSTN1	41,57	0,0000025
Ras-related protein Rab-6A	RAB6A	38,84	0,0354047
Proactivator polypeptide;Saposin-A	PSAP	37,12	0,0000017
Dickkopf-related protein 3	DKK3	37,04	0,0064695
F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB	36,85	0,0006800
Tubulin alpha-4A chain	TUBA4A	36,76	0,0029517



Clathrin heavy chain 1	CLTC	36,73	0,0172379
Deoxyuridine 5-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	DUT	36,34	0,0021730
Proteasome subunit beta type-6	PSMB6	35,95	0,0444021
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	PCSK9	35,87	0,0432914
72 kDa type IV collagenase;PEX	MMP2	35,79	0,0004569
Prolyl 3-hydroxylase 1	LEPRE1	35,26	0,0496856
Lactadherin;Lactadherin short form;Medin	MFGE8	32,58	0,0003940
Elongation factor 1-gamma	EEF1G	31,24	0,0469751
Ferritin light chain	FTL	29,77	0,0450262
Lupus La protein	SSB	29,38	0,0002821
Follistatin-related protein 5	FSTL5	29,37	0,0034505
Matrix-remodeling-associated protein 5	MXRA5	27,17	0,0056534
Eukaryotic initiation factor 4A-II	EIF4A2	27,13	0,0271990
WD repeat-containing protein 65	WDR65	27,05	0,0052157
Extracellular sulfatase Sulf-1	SULF1	26,38	0,0003432
Calponin-3	CNN3	26,17	0,0014325
Protein Phosphatase 2 Scaffold Subunit Alpha	PPP2R1A	25,84	0,0446915
Beta-1,4-galactosyltransferase 5	B4GALT5	25,78	0,0196639
Serum albumin	ALB	25,68	0,0000003
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	VAT1	25,46	0,0000100
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	24,92	0,0079895
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	24,56	0,0146303
Cochlin	COCH	24,14	0,0038765
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	PAFAH1B1	23,88	0,0003566
Extracellular matrix protein 1	ECM1	23,79	0,0160787
Vacuolar protein sorting-associated protein 35	VPS35	23,12	0,0179969
Exostosin-1	EXT1	22,83	0,0080334
Protein S100-A6	S100A6	21,49	0,0386695
Neutral alpha-glucosidase AB	GANAB	21,27	0,0012394
Podocan	PODN	20,85	0,0020030
Fascin	FSCN1	20,41	0,0002658
Olfactomedin-like protein 3	OLFML3	19,10	0,0087429
T-complex protein 1 subunit eta	CCT7	19,08	0,0349927
Membrane-bound transcription factor site-1 protease	MBTPS1	18,28	0,0444638
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	PLOD3	18,25	0,0290330
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	18,10	0,0055013
Peroxiredoxin-4	PRDX4	17,52	0,0163462
Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAP1	16,80	0,0203181
ANK repeat and PH domain-containing protein 1	ACAP1	15,73	0,0465981
Clusterin;Clusterin beta chain;Clusterin alpha chain	CLU	15,19	0,0000107
Macrophage colony-stimulating factor 1	CSF1	15,06	0,0234921
EMILIN-1	EMILIN1	14,74	0,0335435
Low-density lipoprotein receptor	LDLR	14,45	0,0122306
Laminin subunit beta-2	LAMB2	14,41	0,0025413
Carbonyl reductase [NADPH] 3	CBR3	14,29	0,0040576

Serpin B6	SERPINB6	13,24	0,0184994
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	12,71	0,0000572
ATP-citrate synthase	ACLY	12,46	0,0495593
Glypican-1;Secreted glypican-1	GPC1	11,88	0,0054106
Periostin	POSTN	11,34	0,0000412
45 kDa calcium-binding protein	SDF4	11,31	0,0000878
Importin-5	IPO5	11,24	0,0232329
Inositol monophosphatase 1	IMPA1	11,10	0,0017802
Fibulin-5	FBLN5	11,09	0,0004997
Collagen triple helix repeat-containing protein 1	CTHRC1	10,55	0,0246140
Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1	10,24	0,0134160
Beta-2-microglobulin	B2M	9,94	0,0032569
Actin-related protein 3	ACTR3	9,67	0,0003930
Transcriptional activator protein Pur-beta	PURB	9,53	0,0046924
Elongation factor 1-beta	EEF1B2	9,41	0,0125778
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	PPP1R12A	9,11	0,0201546
Nucleobindin-2	NUCB2	8,99	0,0004586
Fibronectin	FN1	8,92	0,0001491
Collagen alpha-2(VI) chain	COL6A2	8,87	0,0018644
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD	8,79	0,0040032
Amyloid beta A4 protein	APP	8,77	0,0005750
Transferrin receptor protein 1	TFRC	8,65	0,0001086
Annexin A2	ANXA2	8,64	0,0301342
Elongation factor 2	EEF2	8,11	0,0000368
Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	ACAT2	8,05	0,0340549
Alpha-soluble NSF attachment protein	NAPA	7,90	0,0118155
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	EFEMP2	7,84	0,0003193
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSPA1A	7,64	0,0088805
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	7,44	0,0052055
Talin-1	TLN1	7,41	0,0000026
Tropomyosin alpha-3 chain	TPM3	7,41	0,0022479
Nucleophosmin	NPM1	7,14	0,0005244
Thrombospondin-1	THBS1	6,59	0,0008619
Beta-hexosaminidase subunit alpha	HEXA	6,47	0,0001968
Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	CARS	6,47	0,0033002
C-type lectin domain family 11 member A	CLEC11A	6,34	0,0002634
Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1	6,23	0,0157997
Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	6,20	0,0003411
Nucleobindin-1	NUCB1	6,19	0,0000158
Proteasome subunit beta type-4	PSMB4	5,86	0,0014785
Follistatin-related protein 1	FSTL1	5,86	0,0002589
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IQGAP1	5,68	0,0108885
Ribonuclease inhibitor	RNH1	5,63	0,0057533
Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC1	5,55	0,0002417
Cathepsin B	CTSB	5,53	0,0145813

Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4	5,51	0,0109743
Myosin light polypeptide 6	MYL6	5,45	0,0013450
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	PPP1CB	5,36	0,0194514
Hsp90 co-chaperone Cdc37	CDC37	5,34	0,0088745
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	TGFBI	5,33	0,0004158
Purine nucleoside phosphorylase	PNP	5,26	0,0437861
Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A1	5,22	0,0030738
T-complex protein 1 subunit theta	CCT8	5,14	0,0419163
Peroxiredoxin-2	PRDX2	5,03	0,0113992
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFEMP1	5,00	0,0000249
Nucleosome assembly protein 1-like 4	NAP1L4	4,88	0,0008493
Myosin-9	MYH9	4,88	0,0021392
Tubulin beta chain	TUBB	4,85	0,0006886
Hsc70-interacting protein	ST13	4,81	0,0047255
Importin subunit alpha-3	KPNA4	4,81	0,0059251
Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1	4,74	0,0163887
Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	4,68	0,0000303
Nidogen-1	NID1	4,58	0,0176328
Cathepsin D	CTSD	4,57	0,0000334
Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1	4,51	0,0000022
Importin subunit beta-1	KPNB1	4,51	0,0011822
Laminin subunit beta-1	LAMB1	4,46	0,0016507
WD repeat-containing protein 1	WDR1	4,45	0,0000318
Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	4,43	0,0000209
Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	4,42	0,0044962
Proteasome subunit alpha type-6	PSMA6	4,39	0,0317503
Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	4,33	0,0000011
Coronin-1C	CORO1C	4,26	0,0000013
Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	4,24	0,0059134
Transgelin-2	TAGLN2	4,20	0,0022821
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	4,20	0,0125521
Nucleoside diphosphate kinase B	NME2	4,15	0,0049568
Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	4,08	0,0000034
Neuropilin-2	NRP2	4,06	0,0175685
Pentraxin-related protein PTX3	PTX3	4,04	0,0007182
Nucleolin	NCL	4,01	0,0276738
Filamin-A	FLNA	4,01	0,0003733
Fibromodulin	FMOD	3,98	0,0092232
Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1	3,97	0,0000854
Chloride intracellular channel protein 4	CLIC4	3,92	0,0008258
Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1	MINPP1	3,91	0,0418345
Neuropilin-1	NRP1	3,91	0,0167928
Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	3,91	0,0000448
14-3-3 protein sigma	SFN	3,88	0,0010093
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	3,84	0,0028596

Reticulocalbin-1	RCN1	3,83	0,0001862
Vimentin	VIM	3,81	0,0081098
Putative elongation factor 1-alpha-like 3	EEF1A1P5	3,80	0,0005683
Lumican	LUM	3,80	0,0000514
Exostosin-2	EXT2	3,79	0,0233352
Puromycin-sensitive aminopeptidase	NPEPPS	3,79	0,0045265
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	QPCT	3,76	0,0074783
Pyruvate kinase PKM	PKM	3,76	0,0006099
C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	SPAG9	3,74	0,0003581
Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1	3,71	0,0004751
Farnesyl pyrophosphate synthase	FDPS	3,55	0,0033517
Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4	3,53	0,0022587
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	3,52	0,0000575
Hyaluronan-binding protein 2	HABP2	3,50	0,0021050
Serglycin	SRGN	3,49	0,0041091
Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2	3,46	0,0000760
Phosphoglucomutase-1	PGM1	3,43	0,0083578
Filamin-C	FLNC	3,42	0,0073859
Heat shock 70 kDa protein 6	HSPA6	3,42	0,0002413
78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	3,36	0,0206891
Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYSL2	3,36	0,0000008
Protein CYR61	CYR61	3,33	0,0021073
Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	3,32	0,0000008
Alpha-actinin-1	ACTN1	3,29	0,0025329
Histone H2A type 2-C;Histone H2A type 2-A	HIST2H2AC	3,29	0,0061036
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1	3,28	0,0423517
Proteasome subunit alpha type-1	PSMA1	3,20	0,0008972
Ras-related protein Rap-1A	RAP1A	3,19	0,0000007
Gremlin-1	GREM1	3,18	0,0497429
Gamma-glutamyl hydrolase	GGH	3,17	0,0003584
14-3-3 protein eta	YWHAH	3,17	0,0004627
Peroxiredoxin-1	PRDX1	3,14	0,0000143
Protein SET	SET	3,14	0,0011534
Protein CutA	CUTA	3,09	0,0021038
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	3,09	0,0071350
Galectin-1	LGALS1	3,08	0,0000155
Protein disulfide-isomerase	P4HB	3,08	0,0009140
F-actin-capping protein subunit alpha-1	CAPZA1	3,05	0,0000032
Histone H2B type 1-L	HIST1H2BL	3,01	0,0104479
Thrombospondin-3	THBS3	3,01	0,0061737
Alpha-actinin-4	ACTN4	2,99	0,0006276
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	PLOD1	2,99	0,0000104
Acylamino-acid-releasing enzyme	APEH	2,97	0,0382093
Lysyl oxidase homolog 2	LOXL2	2,96	0,0002226
Thrombospondin-4	THBS4	2,92	0,0017107
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	PLOD2	2,90	0,0165680

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	2,89	0,0000848
Calmodulin	CALM1	2,89	0,0223212
X-ray repair cross-complementing protein 5	XRCC5	2,88	0,0123259
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	2,81	0,0111379
14-3-3 protein gamma	YWHAG	2,77	0,0000012
Collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	2,72	0,0001905
Rho guanine nucleotide exchange factor 18	ARHGEF18	2,66	0,0000016
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	2,66	0,0185247
Triosephosphate isomerase	TPI1	2,63	0,0036592
Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	2,59	0,0288449
Vinculin	VCL	2,54	0,0021035
Alpha-enolase	ENO1	2,51	0,0004602
Apolipoprotein C-III	APOC3	2,46	0,0180784
Secernin-1	SCRN1	2,45	0,0288882
Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52	2,39	0,0001326
14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB	2,38	0,0002045
DnaJ homolog subfamily C member 13	DNAJC13	2,38	0,0120707
14-3-3 protein epsilon	YWHAE	2,37	0,0002483
Moesin	MSN	2,35	0,0003671
Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	2,24	0,0024083
Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	2,22	0,0153174
Ferritin heavy chain	FTH1	2,20	0,0224213
Aldose 1-epimerase	GALM	2,18	0,0006598
Nuclear receptor subfamily 1 group D member 2	NR1D2	2,02	0,0248565

FIGURE S2

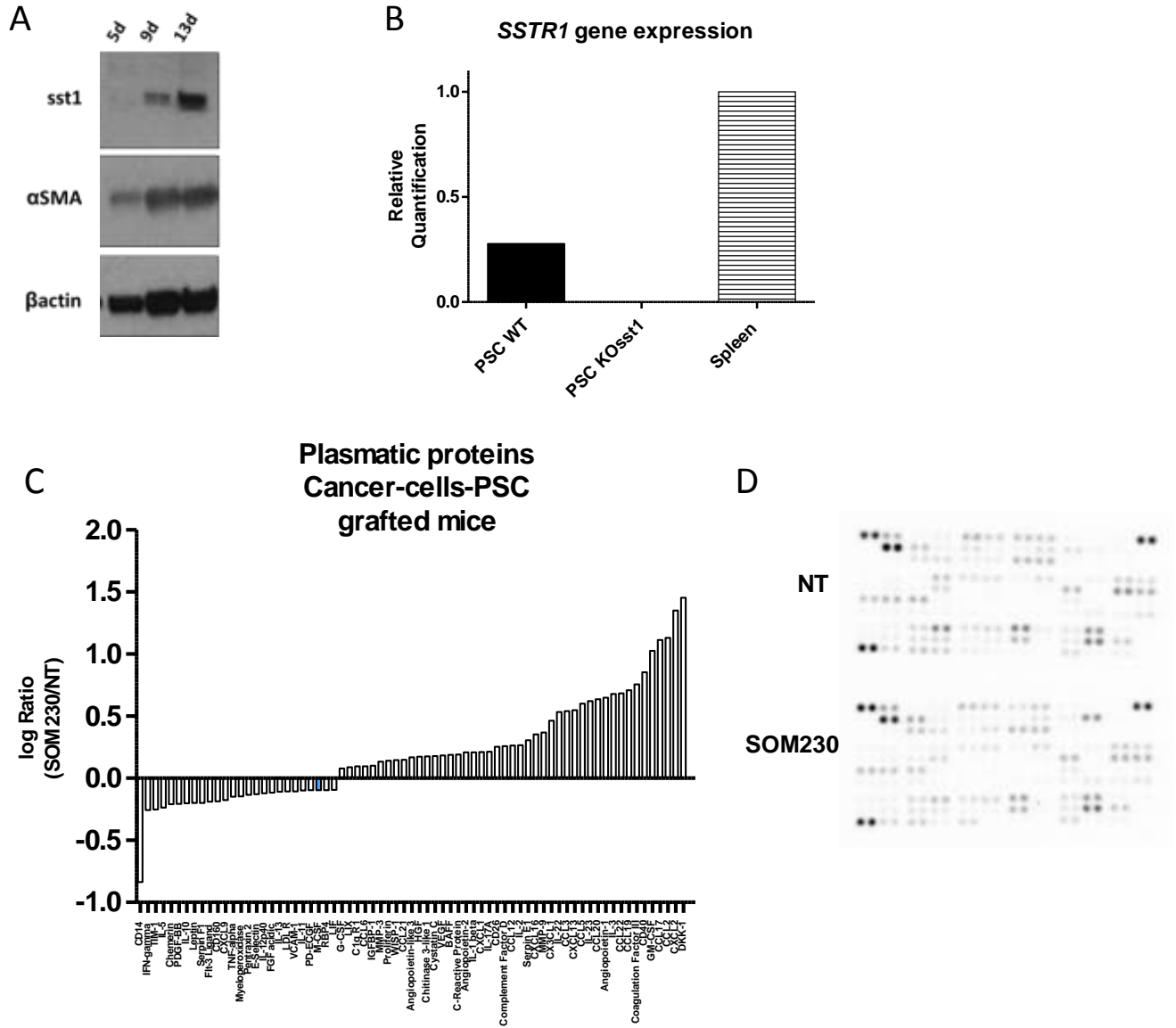


FIGURE S3

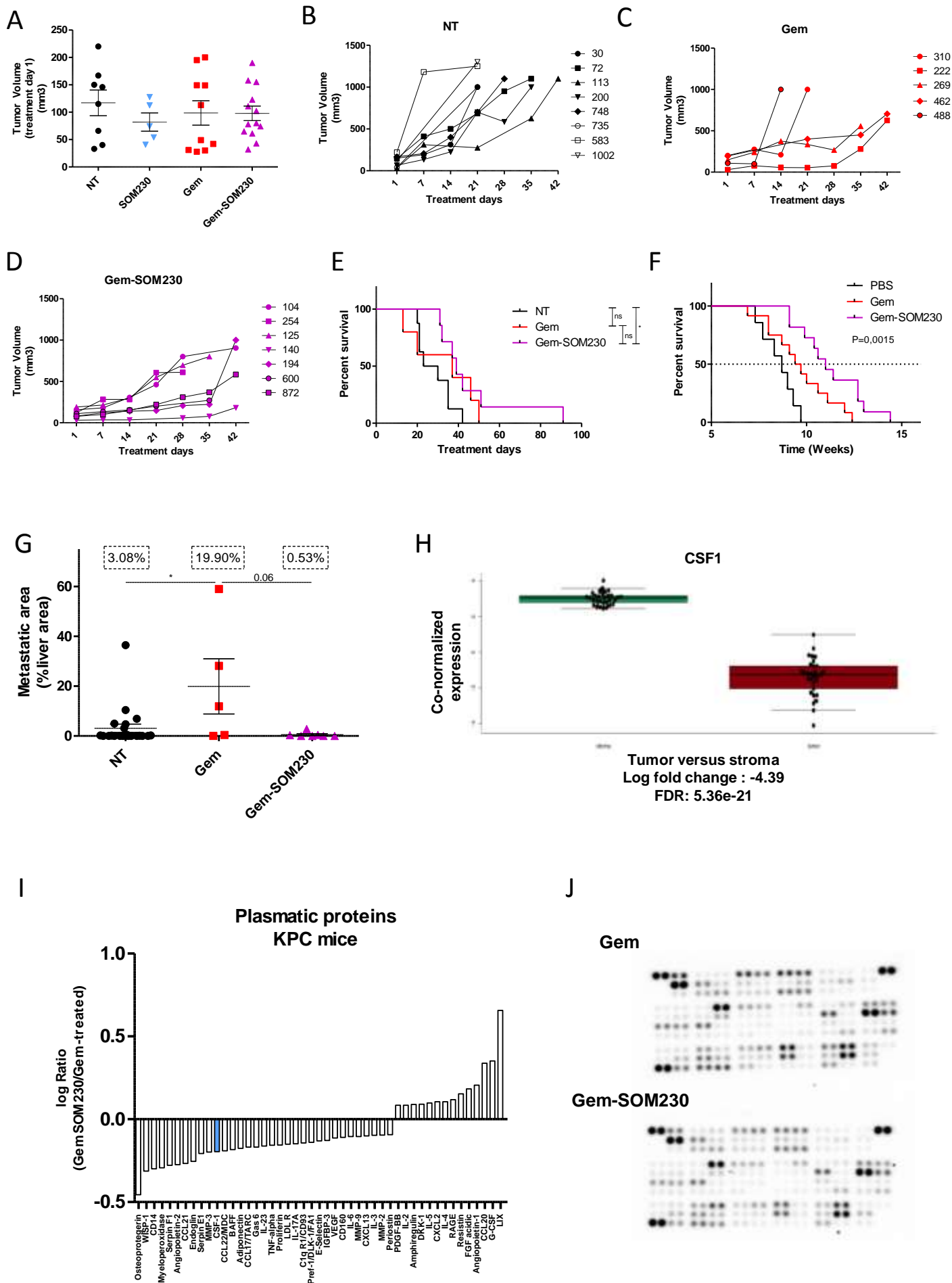


FIGURE S4

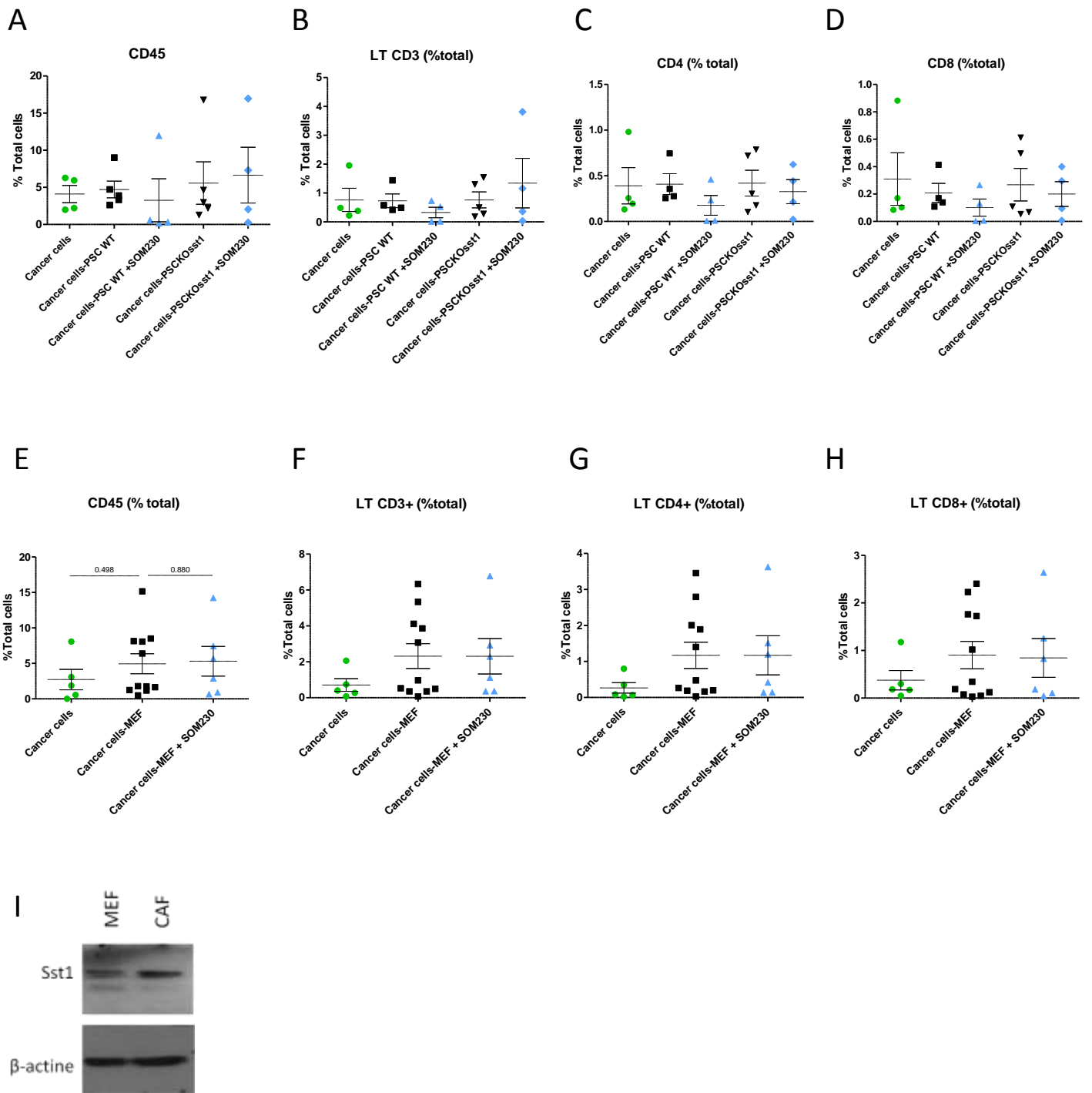
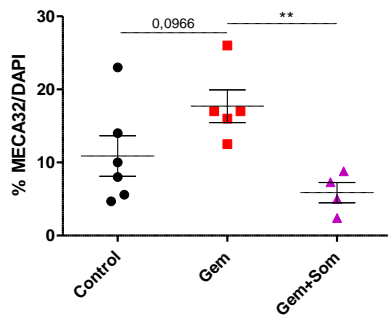


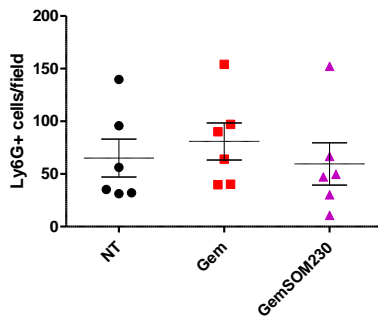


FIGURE S5

A



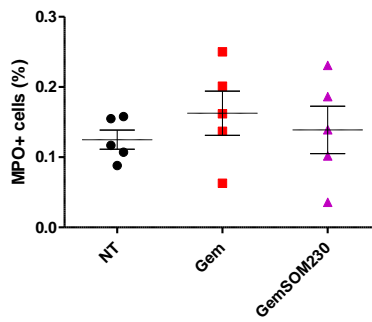
B



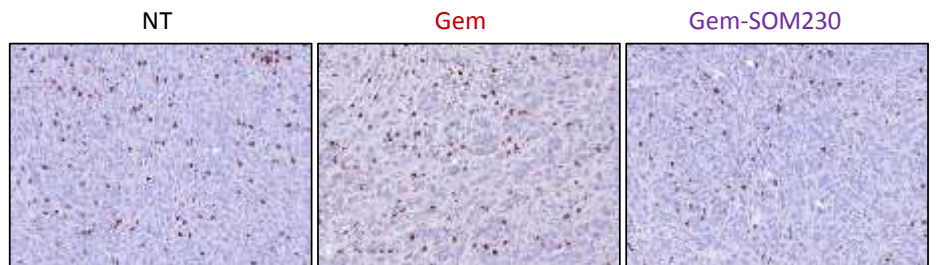
C



D



E



**Table 1 :** Summary table and clinical spectrum of KPC included in study

ID	Drug	Treatment age (days)	Tumor Volume treatment day 1 (mm3)	Tumor Volume sacrifice (mm3)	Survival (days)	Metastasis	Liver Metastatic area (%)	Ascites
30	No	203	150	~1000	21	Liver	0,02	Yes
72	No	203	146	~1000	35	Liver	0,24	No
113	No	161	34	~1000	42	Liver	0,01	No
200	No	133	66	~1000	35	Liver	0,11	No
748	No	131	167	~1000	30	Liver, Lung	4,72	Yes
735	No	175	40	~1000	21	Liver	6,94	Yes
583	No	246	220	~1000	20	ND	ND	ND
1002	No	114	115	~1000	23	Liver	4,98	Yes
310	Gencitabine	162	200	900	20	Liver	28,15	No
222	Gencitabine	162	31	~1000	37	Liver	0,04	No
269	Gencitabine	172	149	557	50	Liver, Lung	59,03	No
462	Gencitabine	205	195	~1000	46	Liver, Lung	11,89	Yes
488	Gencitabine	273	108	~1000	13	Liver	0,41	Yes
104	Gencitabine SOM230	210	158	904	31	No	0,00	No
254	Gencitabine SOM230	145	123	900	39	Liver	0,05	No
125	Gencitabine SOM230	267	190	950	32	Liver	0,46	No
140	Gencitabine SOM230	192	32	800	91	No	0,00	No
194	Gencitabine SOM230	212	80	~1000	42	Liver	2,86	Yes
600	Gencitabine SOM230	197	111	~1000	37	Liver	0,35	Yes
872	Gencitabine SOM230	150	78	~1000	51	No	0,00	Yes



### III) DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) est associé à un très mauvais pronostic. Si de nombreuses avancées ont été réalisées dans les dernières années dans la compréhension des mécanismes moléculaires et génétiques impliqués la physiopathologie de ce cancer, ils n'ont pas encore permis la mise au point de stratégies thérapeutiques efficaces.

Le rôle du microenvironnement, impliqué dans la progression tumorale, le développement de métastases et la chimiorésistance, peut expliquer la difficulté à développer des traitements. Le décryptage des dialogues et mécanismes d'interactions entre les différents compartiments tumoraux donne l'espoir d'associations thérapeutiques ciblant plusieurs types cellulaires avec une action synergique et une réelle efficacité.

Cependant, la complexité du microenvironnement du PDAC rend ces stratégies délicates à mettre en place. En effet, chaque composante est caractérisée par un rassemblement de cellules hétérogènes, dont les rôles sur la progression tumorale sont souvent ambigus. Plus précisément, les CAFs, qui ont d'abord été décrits comme clairement pro-tumoraux, sont maintenant considérés comme une population hétérogène, avec des sous-types de CAFs potentiellement capables de ralentir la progression tumorale (Ohlund et al. 2017 ; Costa et al. 2018). De la même manière, les macrophages et neutrophiles recrutés dans les tumeurs et les métastases peuvent être polarisés différenciellement en macrophages M1 ou M2 (Mielgo et Schmid 2013) et neutrophiles N1 et N2, aux propriétés biologiques opposées (Shaul et Friedlander 2018). Les différents types de vaisseaux sanguins peuvent également jouer des rôles variés, soit en facilitant la croissance tumorale et l'intravasation de cellules cancéreuses dans la circulation sanguine, soit au contraire en favorisant l'arrivée des drogues au contact de ces cellules cancéreuses. L'équilibre est complexe.

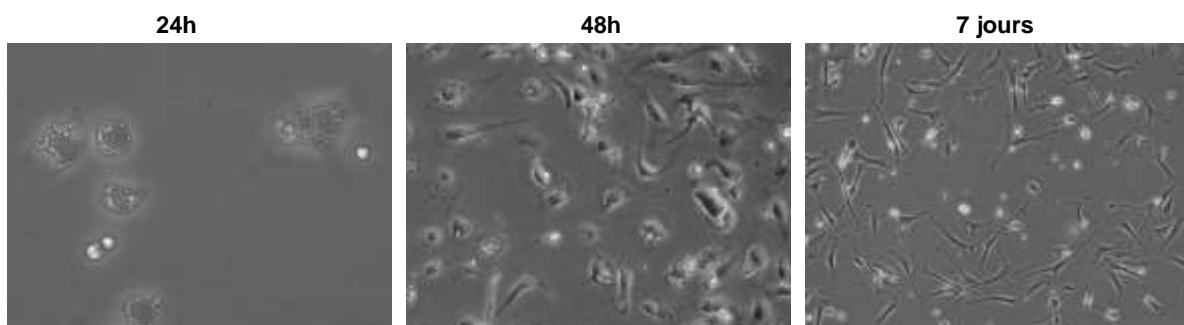
Le ciblage d'une population générale ne peut donc pas être considéré comme la solution ; il faut plutôt envisager l'inhibition de fonctions biologiques, chimiques ou mécaniques admises comme pro-tumorales. L'idée serait d'agir de manière plus « fine » et de reprogrammer, reconfigurer, ou encore normaliser, plutôt que détruire ces cellules (Whatcott et al. 2015). C'est cette stratégie que notre équipe applique en ciblant les CAFs avec les analogues de somatostatine.

Les objectifs de ma thèse étaient d'abord de développer des modèles murins immunocompétents de cancer du pancréas, puis d'étudier l'effet de l'analogue de somatostatine SOM230 dans ces modèles.

## Modèles de PDAC

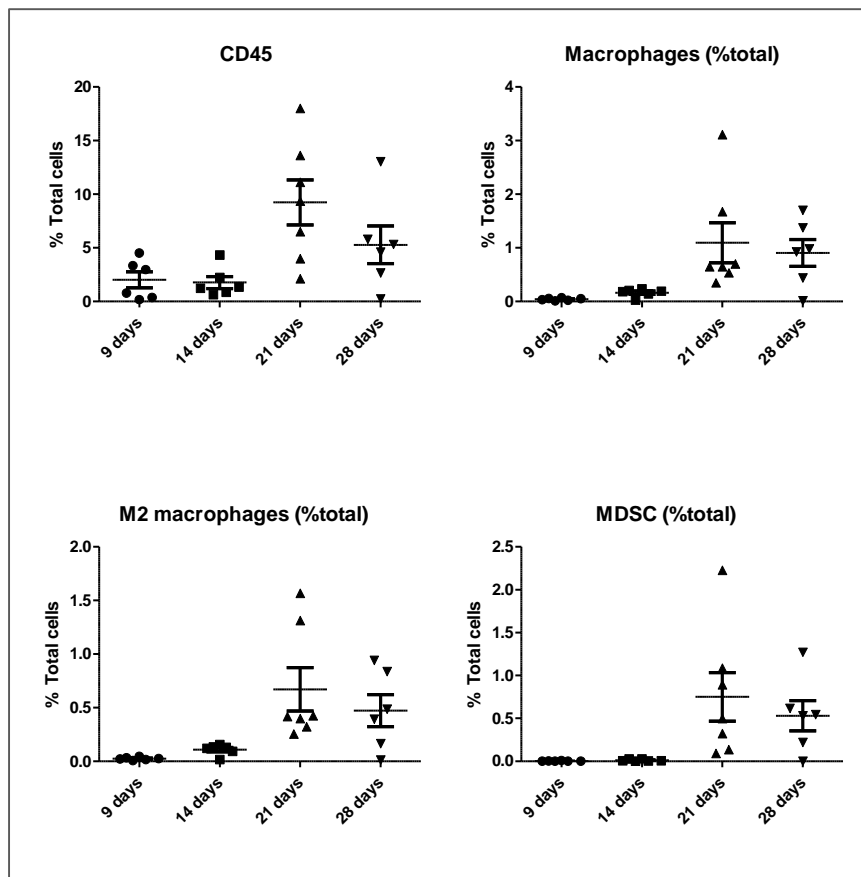
Nous avons développé deux modèles différents et complémentaires de PDAC. Le premier est le modèle transgénique KPC, très bien décrit et de référence dans les études précliniques de PDAC (Partie 1). Ce modèle, s'il permet d'obtenir des tumeurs relativement proches biologiquement des tumeurs humaines, présente une forte hétérogénéité qui complique sa bonne utilisation. Dans l'équipe, le suivi longitudinal par échographie a permis de réaliser des études pertinentes de l'effet des traitements, avec des souris traitées au diagnostic des tumeurs.

Le second modèle consiste en l'injection intra-pancréatique d'un mélange de cellules cancéreuses et de fibroblastes. Les cellules cancéreuses ont été isolées de tumeurs de souris transgéniques KPC ; plusieurs lignées ont été testées et une lignée R211 a été choisie pour les expérimentations, du fait de sa cinétique de progression. Les souris développent en deux à trois semaines des tumeurs observables en échographie abdominale, avec une médiane de survie d'environ 6 semaines. Cette cinétique laisse une fenêtre de temps adaptée au test de molécules thérapeutiques, avec une très bonne reproductibilité et homogénéité intra- et inter-expériences. Des cellules étoilées pancréatiques ont en parallèle été isolées de pancréas sain, puis amplifiées. Après plusieurs passages, ces cellules acquièrent un phénotype proche des CAFs, avec l'expression du marqueur  $\alpha$ -SMA et une morphologie allongée en fuseau (Figure 36).



**Figure 36 : Changement de morphologie des PSCs après isolement**

Comme attendu et précédemment décrit (Xu et al. 2010), la co-injection de ces cellules avec les cellules cancéreuses (ratio 3 fibroblastes pour 1 cellules cancéreuse) accélère la croissance tumorale ainsi que le développement de métastases pulmonaires. Dans l'objectif d'étudier les différentes sous-populations immunitaires recrutées dans ces tumeurs, nous avons réalisé une cinétique par cytométrie en flux, dans laquelle on observe un pic de recrutement trois semaines après la greffe (Figure 37). Ce résultat a permis d'établir notre protocole d'immunophénotypage et dans la suite du projet, les analyses ont par conséquent toutes été réalisées 21 jours après la greffe.



**Figure 37 : Cinétique de recrutement immunitaire dans le modèle de greffes cellules cancéreuses-PSC**

## Implications des CAFs, des macrophages et de leurs sécrétions dans le développement de métastases

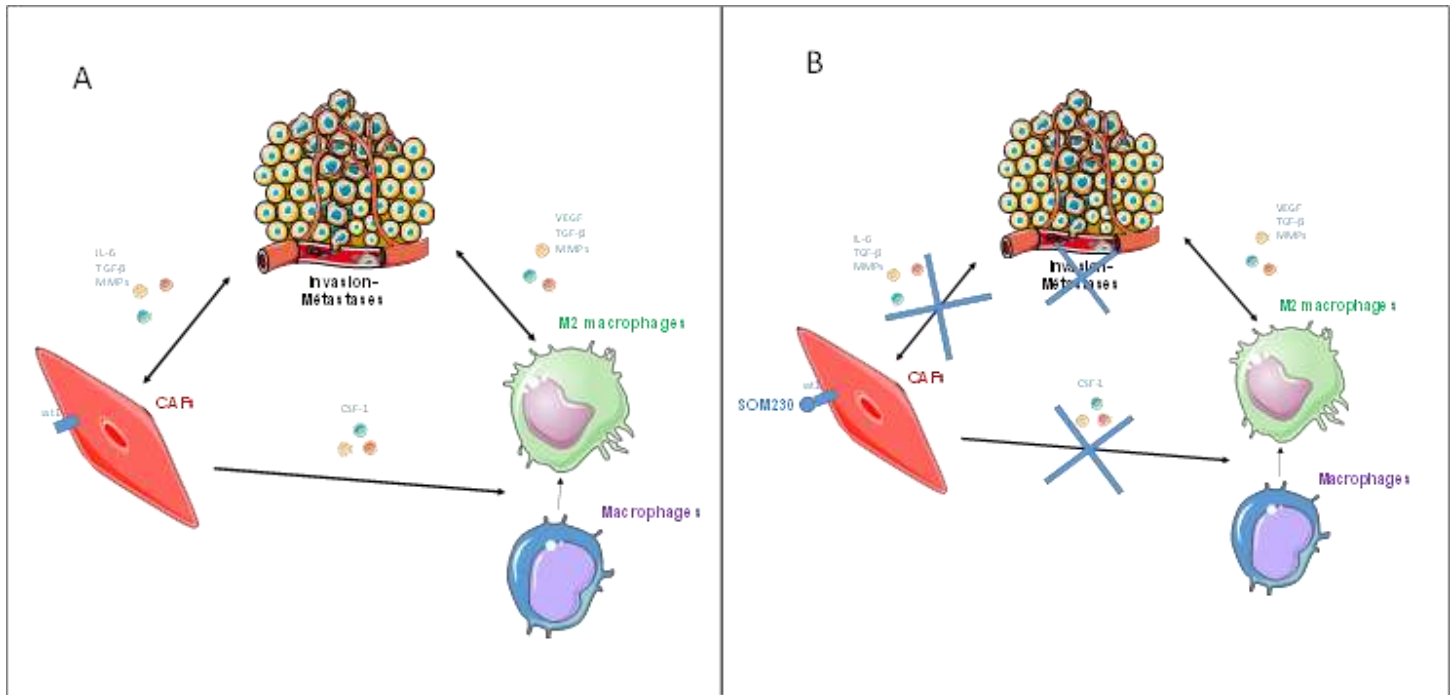
Nous avons montré, ainsi que d'autres, le rôle des CAFs dans l'apparition de métastases (Xu et al. 2010 ; Giannoni et al. 2010 ; Gaggioli et al. 2007 ; Erdogan et al. 2017). En plus d'un effet direct des sécrétions des CAFs sur les cellules tumorales, ces sécrétions favorisent aussi le recrutement de macrophages ainsi que leur polarisation en macrophages de phénotype M2 pro-tumoraux. Les CAFs et les macrophages favorisent aussi l'apparition de métastases, notamment en remodelant la matrice extracellulaire et la vascularisation intratumorale. Les CAFs et les macrophages agissent aussi au niveau de la niche métastatique, en pourvoyant un environnement favorable à la mise en place et au développement des lésions métastatiques. Ce cercle vicieux entre ces trois acteurs est au cœur du processus d'invasion-métastases (Figure 38, A).

Nos résultats démontrent que l'analogue de somatostatine SOM230 est capable d'intervenir dans ce cycle. En agissant sur les CAFs, le SOM230 bloque les sécrétions qui vont agir de manière paracrine à la fois sur les cellules tumorales, et ainsi diminuer leur prolifération, leur chimiorésistance et leurs capacités invasives et migratoires, mais aussi sur les autres composantes du microenvironnement. Au cours de mon projet de thèse, nous avons identifié le CSF-1 comme acteur majeur de l'action du SOM230. Le CSF-1 est impliqué dans le recrutement de monocytes depuis la circulation sanguine, leur différenciation en macrophages au niveau de la tumeur primaire, mais aussi la polarisation de ces macrophages en macrophages M2 (Song et al. 2017). Le CSF-1 et son récepteur sont d'ailleurs des cibles thérapeutiques à l'étude dans différents cancers (Laoui et al. 2014). Les macrophages de phénotype M2, ainsi que la signalisation en aval du CSF-1-R dans ces macrophages, sont très bien décrits comme favorisant la progression tumorale et l'apparition de métastases (Lin et al. 2001 ; Goswami et al. 2005 ; Kubota et al. 2009 ; Priceman et al. 2010 ; Strachan et al. 2013 ; Mitchem et al. 2013 ; Pyonteck et al. 2013 ; Zhu et al. 2014 ; Ries et al. 2014 ; Yu et al. 2017). Nous avons montré que les CAFs sécrètent le CSF-1, et que, *in vitro* et *in vivo*, le traitement au SOM230 réduit significativement la concentration du CSF-1 dans des milieux conditionnés de CAFs et dans le plasma et les tumeurs de souris développant des tumeurs pancréatiques. Dans l'essai clinique de phase 1 associant le SOM230 à la gemcitabine sur des patients atteints de

PDAC (partie 4), le dosage plasmatique de l'IGF-1 était utilisé comme marqueur de réponse au traitement et le niveau d'IGF-1 était plus bas chez les patients avec une maladie stabilisée (Suleiman et al. 2015). De manière intéressante, ce facteur de croissance a été associé à une résistance des patients atteints de glioblastome traités avec des inhibiteurs du récepteur au CSF-1. L'équipe de Joyce décrit en effet que dans leur modèle de glioblastome murin, les souris en rechute présentaient une suractivation de la voie de signalisation PI3K provoquée par l'action de l'IGF-1 sécrété par les macrophages sur le récepteur IGF-1R des cellules tumorales (Quail et al. 2016). Le dosage de l'IGF-1 plasmatique dans nos modèles murins permettra peut-être d'identifier un autre mécanisme de l'effet anti-tumoral du SOM230, par inhibition concomitante des sécrétions de CSF-1 et d'IGF-1. Enfin, le CSF-1 est beaucoup décrit dans la littérature comme étant sécrété par le compartiment tumoral plutôt que stromal. Nous analyserons les immunomarquages du CSF-1 stromal sur des coupes de tumeurs patients, et essaierons d'associer son expression à un risque métastatique accentué. De manière intéressante, dans nos modèles, si le CSF-1 est quasiment exclusivement exprimé par les CAFs dans la tumeur primaire, il semblerait que les cellules tumorales métastatiques acquièrent l'expression de cette cytokine, peut-être simultanément à la capacité d'envahir un tissu à distance. Cette hypothèse sera également à vérifier.

Ainsi, le SOM230, en inhibant à la fois les sécrétions des CAFs agissant sur les cellules tumorales et du CSF-1 impliqué dans le recrutement et la polarisation des macrophages au sein de la tumeur, exerce ainsi un effet anti-tumoral et plus particulièrement anti-métastatique (Figure 38, B). En parallèle, nous avons également mis en évidence un effet important du SOM230 sur la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire par les CAFs. En effet, l'analyse bioinformatique du sécrétome des CAFs traitées ou non au SOM230 fait ressortir une forte réduction de la signature « matrice » avec le traitement SOM230. Ceci a été confirmé par les colorations au bleu alcian des tumeurs de souris KPC, qui permet le marquage des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes. Ces protéines sont surexprimées dans le cancer du pancréas et souvent associées à des stades plus avancés et à une progression plus rapide du cancer (Jacobetz et al. 2013 ; Melo et al. 2015 ; Huang et al. 2017). Dans les tumeurs de souris KPC traitées au SOM230, la surface colorée est largement réduite.





**Figure 38 : Interactions entre CAFs macrophages et cellules tumorales, et impact thérapeutique du SOM230**

Les CAFs et les macrophages sont également impliqués dans les modifications de la vascularisation au sein des tumeurs. Ils stimulent une angiogenèse anormale, propice à la croissance et à l'invasion des cellules tumorales. Nous montrons que le traitement au SOM230 réduit la vascularisation au sein des tumeurs KPC, mais aussi qu'il normalise les vaisseaux. Cet effet présente un intérêt thérapeutique, car l'accès des chimiothérapies aux cellules tumorales est souvent compromis par la vascularisation anormale au sein des tumeurs.

En revanche, il semblerait que le traitement à la gemcitabine augmente cette vascularisation anormale dans les tumeurs. Cette observation, associée à une augmentation des protéines matricielles et à une forte augmentation des marqueurs de macrophages M2 dans les tumeurs après traitement à la gemcitabine, pourrait expliquer en partie l'effet pro-tumoral de la gemcitabine de nos modèles. En effet, les souris KPC traitées à la gemcitabine présentent des lésions métastatiques de tailles significativement plus importantes que les souris sans traitement. Plusieurs études récentes ont mis en évidence un tel effet de chimiothérapies, et notamment de la gemcitabine. Toste et ses collaborateurs avaient montré que la chimiothérapie induisait sur les CAFs une augmentation d'expression de différents médiateurs inflammatoires, similaire au phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Les CAFs chimiorésistants favorisaient ainsi davantage la croissance tumorale que les CAFs

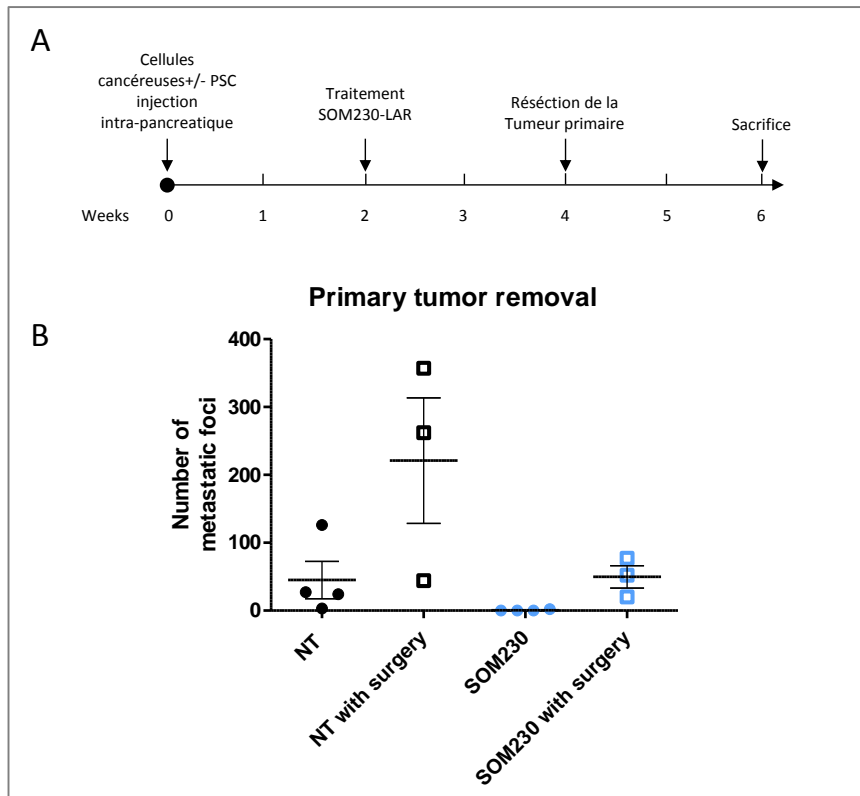
naïfs (Toste et al. 2016). Lotti et ses collaborateurs ont quant à eux montré dans le cancer colorectal que la chimiothérapie était capable d'activer les CAFs. Cette activation se caractérisait par une sécrétion exacerbée de plusieurs cytokines dont l'IL-17A, et induisait un auto-renouvellement des populations de cellules initiatrices de cancer (CIC) et une augmentation de l'invasion tumorale (Lotti et al. 2013). Enfin, en 2016, l'équipe de Apte a utilisé l'inhibition du HGF dans le traitement du PDAC. L'effet anti-métastatique de l'inhibiteur de HGF était perdu en association avec la gemcitabine, et les immunomarquages réalisés sur les tumeurs suggéraient que la gemcitabine sélectionne des sous-populations de cellules cancéreuses avec des caractéristiques souches, et d'avantage d'EMT (Pothula et al. 2016). Ces résultats sont à considérer avec attention à l'heure où les traitements néoadjuvants sont à l'étude. Il sera nécessaire de caractériser avec précision les mécanismes des effets des chimiothérapies sur les CAFs, et probablement sur les autres composants du microenvironnement tumoral, pour définir le risque potentiel des chimiothérapies néoadjuvantes. En revanche, l'association du SOM230 à la gemcitabine serait une alternative pour maintenir l'effet cytotoxique de la chimiothérapie sur les cellules cancéreuses, en abolissant les effets associés, particulièrement sur le développement de métastases.

Dans la continuité de ces travaux, nous essayons maintenant d'améliorer notre modèle d'étude en pratiquant des réssections de tumeurs primaires (Figure 39, A). Le développement de modèles pertinents par rapport aux pathologies étudiées est absolument nécessaire pour éviter les fréquents échecs cliniques des drogues testées en recherche précliniques. L'association de plusieurs modèles est même indispensable pour produire des résultats robustes.

Une revue de Nicolas Gengenbacher, publiée en 2017, a porté sur les modèles précliniques utilisés dans l'étude des tumeurs solides. Il apparaît que dans plus de 80% des études, un seul modèle préclinique était utilisé. De plus, dans 82% des études analysées, les greffes des lignées cancéreuses isolées sont utilisées et que ces modèles sont donc à l'origine de la majorité des connaissances sur la biologie des cancers. Paradoxalement, cette proportion atteint même 89% dans les études impliquant une thérapie. Nous avons cependant montré les limites de ces modèles, notamment la perte d'hétérogénéité cellulaire, et les modifications provoquées par la culture à long terme. Il est aussi important de noter que dans plus de 60% des cas, les études utilisent des modèles murins immunodéficient, apportant

encore un biais par rapport au cancer humain. Sur l'ensemble des études, les modèles murins transgéniques (GEMM) et les modèles PDXs représentent respectivement seulement 24% et 7% des études. La part de ces différents modèles varie cependant selon le type de cancer étudié. Dans le cas du PDAC, la part des études utilisant des greffes tombe à 60%, tandis que les études impliquant les GEMMs et les PDXs atteignent 60% et 13%. A titre de comparaison, 93% des études sur le cancer du sein utilisent des modèles de greffe. Une partie de cette étude était consacrée à l'étude des métastases, qui ne représentent que 25% d'entre elles, alors que 90% des décès de patients sont causés par ces lésions à distance. Parmi ces études, une minorité implique des modèles de métastases spontanées, tandis que plus de 70% des études mettent en œuvre des modèles expérimentaux (intraveineux, intracardiaque, intrasplénique principalement), qui ne reproduisent pas entièrement le processus métastatique. Enfin, dans à peine plus de 10% des modèles spontanés de métastases, les expérimentateurs pratiquent une résection de la tumeur primaire (Gengenbacher et al. 2017). Cette étude insiste donc sur l'importance des modèles précliniques pour obtenir une pertinence clinique. Dans l'étude des tumeurs solides, le suivi du volume de la tumeur primaire n'est pas toujours le parfait indicateur de réponse à un traitement. Il convient alors de définir des protocoles d'études plus proches de la clinique, en faisant plutôt intervenir par exemple la survie liée aux métastases (Francia et al. 2011). C'est dans cette logique que nous développons le modèle de résection de greffe orthotopique.

Nos résultats préliminaires confirment l'effet anti-métastatique du SOM230 et, en rappelant que les métastases sont la principale cause de décès dans le PDAC, ce traitement est susceptible d'allonger significativement la survie des patients en retardant drastiquement la progression des métastases (Figure 39, B). Dans notre modèle de chirurgie de greffes intra-pancréatique, à améliorer, l'exérèse n'est pas complète (marges saines, classification R0), la reprise de la croissance tumorale est rapide, et les souris sont sacrifiées en raison d'une masse tumorale trop importante, et pas de leurs métastases. D'autres manipulations sont en cours pour améliorer ce protocole en modifiant certains paramètres expérimentaux (cinétiques différentes, splénectomie associée).



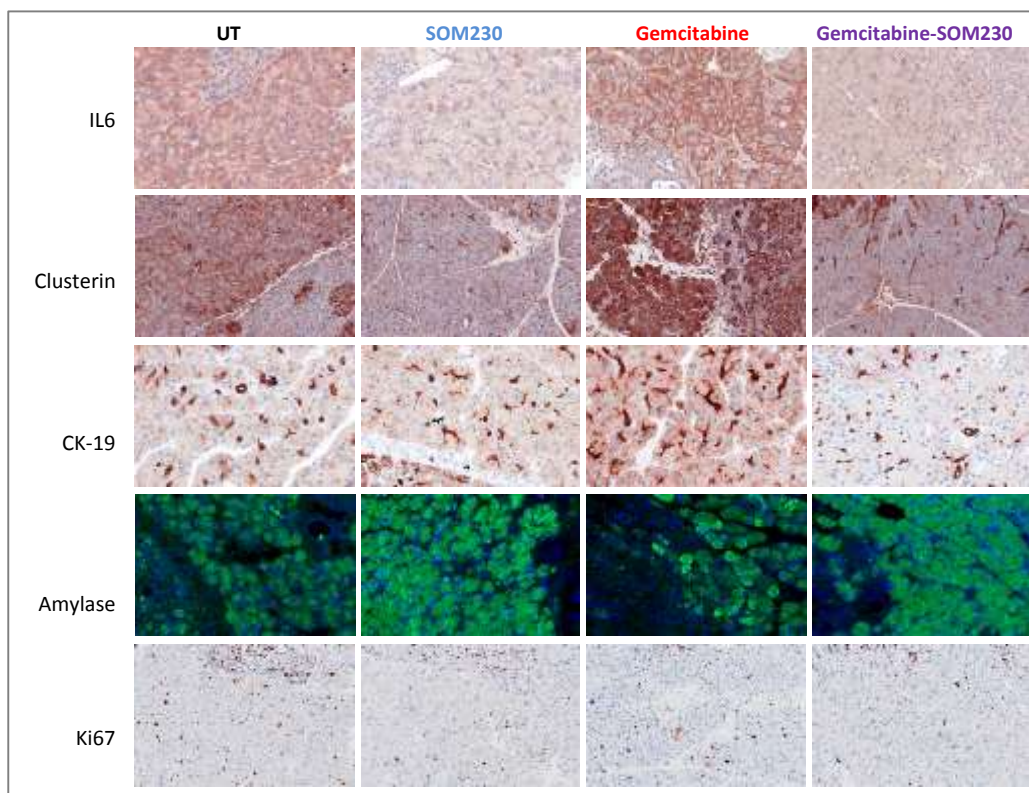
**Figure 39 : Protocole d'étude du développement de métastases avec résection de la tumeur primaire, et effets du traitement au SOM230**

## Effets du SOM230 sur d'autres types cellulaires

Les travaux de notre équipe sont pour l'instant focalisés sur le ciblage des CAFs, mais il est raisonnable de penser que l'analogue de somatostatine SOM230 pourrait également agir sur d'autres types cellulaires, et induire un effet anti-tumoral.

Les acini expriment le récepteur sst2 à la somatostatine, et son expression est perdue au cours de la carcinogénèse pancréatique (Chalabi-Dchar et al. 2015). Cependant, ce sont ces acini qui, sous l'effet de mutations et de stress notamment inflammatoire, vont se dédifférencier, et acquérir un phénotype canalaire à l'origine du PDAC (métaplasies acino-canalisaires ADM). Dans les études où l'apparition d'ADM et de pancréatite est analysée, plusieurs marqueurs protéiques sont habituellement caractérisés. Parmi eux, la clusterine, une glycoprotéine impliquée dans différentes fonctions biologiques (prolifération, apoptose, angiogénèse, chimiorésistance), l'amylase, enzyme produite par les cellules acinaires saines, le marqueur de cellules canalaire cytokératine-19, et le marqueur de prolifération Ki-67 (Tang

et al. 2012 ; Fu et al. 2013 ; Liou et al. 2013 ; Karki et al. 2015). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire indiquent que, dans les souris greffées orthotopiquement et traitées au SOM230 seul ou en association avec la gemcitabine, les acini semblent moins sensibles au stress de l'environnement cancéreux. Ils expriment en effet moins de cytokine inflammatoire, notamment l'IL-6. De plus, dans le tissu adjacent aux lésions cancéreuses, les acini expriment bien moins la clusterine, la cytokératine-19, et le marqueur de prolifération Ki-67 avec le traitement au SOM230, tandis que la gemcitabine semble augmenter l'expression de ces marqueurs. En revanche, les acini traités au SOM230 expriment plus fortement l'amylase que les souris non traitées (Figure 40). Des travaux complémentaires seront nécessaires pour valider un effet du SOM230 seul ou en association avec la gemcitabine sur les acini, et si ces mécanismes contribuent au ralentissement de l'apparition des lésions pancréatiques.



**Figure 40 : Effets du SOM230 sur le compartiment exocrine pancréatique**

Un autre rôle possible du SOM230 dans l'adénocarcinome pancréatique, mais aussi dans d'autres cancers, pourrait passer par son effet sur les cellules immunitaires. Si les inhibiteurs de points de contrôles immunitaires ne sont pas parvenus à améliorer le pronostic

des patients atteints de PDAC (Brahmer et al. 2012), ils ont montré une efficacité impressionnante dans d'autres cancers solides comme le mélanome (Karlsson et al. 2017). Si les monothérapies ne sont pas efficaces, des associations de drogues seront peut-être capables de sensibiliser les tumeurs pancréatiques aux inhibiteurs de points de contrôle, comme l'équipe de De Nardo l'a montré récemment dans des modèles murins. Le traitement des souris avec un inhibiteur de FAK réduisait drastiquement les sous-populations immunosuppressives. L'inhibition de FAK rendait également les tumeurs plus sensibles aux chimiothérapies, mais aussi aux immunothérapies avec une survie largement prolongée, des souris survivantes à long terme et une forte augmentation de l'infiltration des tumeurs en lymphocytes T CD8 cytotoxiques (Jiang et al. 2016).

D'autres stratégies thérapeutiques ciblant l'immunité sont à l'étude, en association ou non avec les chimiothérapies (partie 4), visant le plus souvent dans le PDAC à réduire l'influence des populations immunitaires immunosuppressives. Nos résultats préliminaires confirment que les macrophages, et notamment les macrophages M2, expriment des récepteurs de somatostatine (Figure 41). Il est envisageable que l'effet du traitement au SOM230 passe en partie par les macrophages, par un effet anti-sécrétoire ou anti-prolifératif.

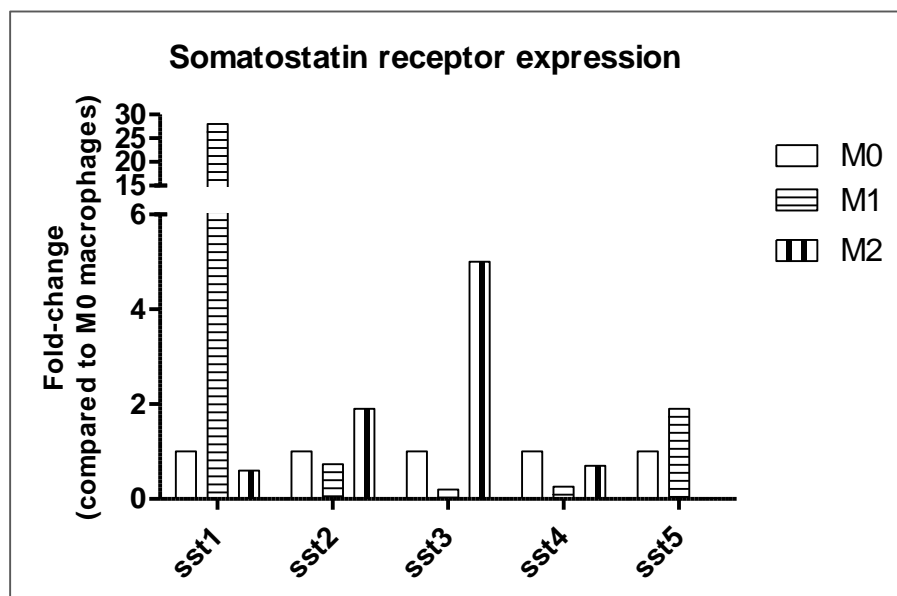


Figure 41 : Profil d'expression des récepteurs de somatostatine par les macrophages

## Conclusion générale

Il est urgent de réaliser des avancées permettant d'améliorer la survie des patients atteints de PDAC. De mon point de vue, deux stratégies sont à valoriser pour y parvenir.

Le développement d'outils de diagnostic précoce, capables d'identifier les patients avec une excellente sensibilité et spécificité est l'une d'elles, l'exérèse de la tumeur étant actuellement la seule stratégie curative dans le PDAC. En détectant tôt la présence de tumeur, les chances de chirurgie curative sont nettement améliorées. Plusieurs travaux récents sont extrêmement prometteurs, notamment les études sur les biopsies liquides. Les techniques de dosages simultanés de mutations et de protéines caractéristiques permettent les diagnostics de différents cancers dont le PDAC avec une bonne sensibilité, et une excellente spécificité, indispensable lors de dépistage.

L'autre stratégie, plus tardive, est d'agir au niveau des métastases, responsables de la mortalité du cancer dans l'écrasante majorité des cas. En ralentissant la mise en place et la croissance des lésions dans les organes à distance, et en traitant en parallèle la tumeur primaire (association de drogues et chirurgie), il serait théoriquement possible de prolonger la survie des patients. Mes travaux de thèse ont contribué à montrer que c'est par cette stratégie que le SOM230, en association avec la chimiothérapie, pourrait être considéré comme une nouvelle alternative thérapeutique dans le traitement du PDAC.

# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**



- Abdellatif, A.A.H., Aldalaen, S.M., Faisal, W., and Tawfeek, H.M. (2018). Somatostatin receptors as a new active targeting sites for nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*.
- Adams, R.L., Adams, I.P., Lindow, S.W., Zhong, W., and Atkin, S.L. (2005). Somatostatin receptors 2 and 5 are preferentially expressed in proliferating endothelium. *Br. J. Cancer* *92*, 1493–1498.
- Afik, R., Zigmund, E., Vugman, M., Klepfish, M., Shimshoni, E., Pasmanik-Chor, M., Shenoy, A., Bassat, E., Halpern, Z., Geiger, T., et al. (2016). Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix. *Journal of Experimental Medicine* *jem.20151193*.
- Aguirre, A.J., Nowak, J.A., Camarda, N.D., Moffitt, R.A., Ghazani, A.A., Hazar-Rethinam, M., Raghavan, S., Kim, J., Brais, L.K., Ragon, D., et al. (2018). Real-time genomic characterization of advanced pancreatic cancer to enable precision medicine. *Cancer Discovery* *CD-18-0275*.
- Albini, A., Florio, T., Giunciuglio, D., Masiello, L., Carlone, S., Corsaro, A., Thellung, S., Cai, T., Noonan, D.M., and Schettini, G. (1999). Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. *FASEB J.* *13*, 647–655.
- Albregues, J., Bertero, T., Grasset, E., Bonan, S., Maiel, M., Bourget, I., Philippe, C., Herraiz Serrano, C., Benamar, S., Croce, O., et al. (2015). Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat Commun* *6*, 10204.
- Aleamar, B., Gregório, C., and Ashton-Prolla, P. (2015). miRNAs As Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions: A Review. *Biomark Insights* *10*, 113–124.
- Alissafi, T., Hatzioannou, A., Mintzas, K., Barouni, R.M., Banos, A., Sormendi, S., Polyzos, A., Xilouri, M., Wielockx, B., Gogas, H., et al. (2018). Autophagy orchestrates the regulatory program of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *J. Clin. Invest.*
- Alvarez, R., Musteanu, M., Garcia-Garcia, E., Lopez-Casas, P.P., Megias, D., Guerra, C., Muñoz, M., Quijano, Y., Cubillo, A., Rodriguez-Pascual, J., et al. (2013). Stromal disrupting effects of nab-paclitaxel in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* *109*, 926–933.
- Andoh, A., Hata, K., Shimada, M., Fujino, S., Tasaki, K., Bamba, S., Araki, Y., Fujiyama, Y., and Bamba, T. (2002). Inhibitory effects of somatostatin on tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* *10*, 89–93.
- Antonyak, M., and Cerione, R. (2009). Ras and the FAK Paradox. *Molecular Cell* *35*, 141–142.
- Apte, M., Pirola, R., and Wilson, J. (2011). The fibrosis of chronic pancreatitis: new insights into the role of pancreatic stellate cells. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 2711–2722.
- Arce Vargas, F., Furness, A.J.S., Solomon, I., Joshi, K., Mekkaoui, L., Lesko, M.H., Miranda Rota, E., Dahan, R., Georgiou, A., Sledzinska, A., et al. (2017). Fc-Optimized Anti-CD25 Depletes Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells and Synergizes with PD-1 Blockade to Eradicate Established Tumors. *Immunity* *46*, 577–586.
- Armani, C., Catalani, E., Balbarini, A., Bagnoli, P., and Cervia, D. (2007). Expression, pharmacology, and functional role of somatostatin receptor subtypes 1 and 2 in human macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 845–855.

- Armstrong, T., Packham, G., Murphy, L.B., Bateman, A.C., Conti, J.A., Fine, D.R., Johnson, C.D., Benyon, R.C., and Iredale, J.P. (2004). Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* *10*, 7427–7437.
- Attieh, Y., Clark, A.G., Grass, C., Richon, S., Pocard, M., Mariani, P., Elkhatib, N., Betz, T., Gurchenkov, B., and Vignjevic, D.M. (2017). Cancer-associated fibroblasts lead tumor invasion through integrin- $\beta$ 3-dependent fibronectin assembly. *J. Cell Biol.* *216*, 3509–3520.
- Augsten, M., Hägglöf, C., Olsson, E., Stolz, C., Tsagozis, P., Levchenko, T., Frederick, M.J., Borg, A., Micke, P., Egevad, L., et al. (2009). CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 3414–3419.
- Bai, A., Meetze, K., Vo, N.Y., Kollipara, S., Mazsa, E.K., Winston, W.M., Weiler, S., Poling, L.L., Chen, T., Ismail, N.S., et al. (2010). GP369, an FGFR2-IIIb-specific antibody, exhibits potent antitumor activity against human cancers driven by activated FGFR2 signaling. *Cancer Res.* *70*, 7630–7639.
- Bailey, P., Chang, D.K., Nones, K., Johns, A.L., Patch, A.-M., Gingras, M.-C., Miller, D.K., Christ, A.N., Bruxner, T.J.C., Quinn, M.C., et al. (2016). Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* *531*, 47–52.
- Banerjee, S., Modi, S., McGinn, O., Zhao, X., Dudeja, V., Ramakrishnan, S., and Saluja, A.K. (2016). Impaired Synthesis of Stromal Components in Response to Minnelide Improves Vascular Function, Drug Delivery, and Survival in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* *22*, 415–425.
- Bao, S., Ouyang, G., Bai, X., Huang, Z., Ma, C., Liu, M., Shao, R., Anderson, R.M., Rich, J.N., and Wang, X.-F. (2004). Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell* *5*, 329–339.
- Barbazán, J., Alonso-Alconada, L., Elkhatib, N., Geraldo, S., Gurchenkov, V., Glentis, A., van Niel, G., Palmulli, R., Fernández, B., Viaño, P., et al. (2017). Liver Metastasis Is Facilitated by the Adherence of Circulating Tumor Cells to Vascular Fibronectin Deposits. *Cancer Res.* *77*, 3431–3441.
- Barbieri, F., Pattarozzi, A., Gatti, M., Porcile, C., Bajetto, A., Ferrari, A., Culler, M.D., and Florio, T. (2008). Somatostatin receptors 1, 2, and 5 cooperate in the somatostatin inhibition of C6 glioma cell proliferation in vitro via a phosphotyrosine phosphatase-eta-dependent inhibition of extracellularly regulated kinase-1/2. *Endocrinology* *149*, 4736–4746.
- Bayne, L.J., Beatty, G.L., Jhala, N., Clark, C.E., Rhim, A.D., Stanger, B.Z., and Vonderheide, R.H. (2012). Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. *Cancer Cell* *21*, 822–835.
- Beatty, G.L., Chiorean, E.G., Fishman, M.P., Saboury, B., Teitelbaum, U.R., Sun, W., Huhn, R.D., Song, W., Li, D., Sharp, L.L., et al. (2011). CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* *331*, 1612–1616.
- Ben, Q.-W., Jin, X.-L., Liu, J., Cai, X., Yuan, F., and Yuan, Y.-Z. (2011). Periostin, a matrix specific protein, is associated with proliferation and invasion of pancreatic cancer. *Oncol. Rep.* *25*, 709–716.
- Benali, N., Cordelier, P., Calise, D., Pages, P., Rochaix, P., Nagy, A., Esteve, J.P., Pour, P.M., Schally, A.V., Vaysse, N., et al. (2000). Inhibition of growth and metastatic progression of

pancreatic carcinoma in hamster after somatostatin receptor subtype 2 (sst2) gene expression and administration of cytotoxic somatostatin analog AN-238. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9180–9185.

Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., et al. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2, 737–744.

Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R.J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B.R., Wang, H., Luber, B., Alani, R.M., et al. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6, 224ra24.

Bhasin, M.K., Ndebele, K., Bucur, O., Yee, E.U., Otu, H.H., Plati, J., Bullock, A., Gu, X., Castan, E., Zhang, P., et al. (2016). Meta-analysis of transcriptome data identifies a novel 5-gene pancreatic adenocarcinoma classifier. *Oncotarget* 7, 23263–23281.

Bhowmick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A.E., Dumont, N., Shappell, S., Washington, M.K., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004). TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 303, 848–851.

Boj, S.F., Hwang, C.-I., Baker, L.A., Chio, I.I.C., Engle, D.D., Corbo, V., Jager, M., Ponz-Sarvisé, M., Tiriác, H., Spector, M.S., et al. (2015). Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 160, 324–338.

Bournazou, E., and Bromberg, J. (2013). Targeting the tumor microenvironment. *JAK-STAT* 2, e23828.

Bousquet, C., Puente, E., Buscail, L., Vaysse, N., and Susini, C. (2001). Antiproliferative effect of somatostatin and analogs. *Chemotherapy* 47 Suppl 2, 30–39.

Bousquet, C., Guillermet-Guibert, J., Saint-Laurent, N., Archer-Lahlou, E., Lopez, F., Fanjul, M., Ferrand, A., Fourmy, D., Pichereaux, C., Monsarrat, B., et al. (2006). Direct binding of p85 to sst2 somatostatin receptor reveals a novel mechanism for inhibiting PI3K pathway. *EMBO J.* 25, 3943–3954.

Bouvier, A.-M., Uhry, Z., Jooste, V., Drouillard, A., Remontet, L., Launoy, G., Leone, N., and French Network of Cancer Registries (FRANCIM) (2017). Focus on an unusual rise in pancreatic cancer incidence in France. *Int J Epidemiol* 46, 1764–1772.

Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q.M., Hwu, W.-J., Topalian, S.L., Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., et al. (2012). Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *New England Journal of Medicine* 366, 2455–2465.

Brand, R.E., Nolen, B.M., Zeh, H.J., Allen, P.J., Eloubeidi, M.A., Goldberg, M., Elton, E., Arnoletti, J.P., Christein, J.D., Vickers, S.M., et al. (2011). Serum Biomarker Panels for the Detection of Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 17, 805–816.

Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., and Guillemin, R. (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179, 77–79.

Brooks, J., Fleischmann-Mundt, B., Woller, N., Niemann, J., Ribback, S., Peters, K., Demir, I.E., Armbrecht, N., Ceyhan, G.O., Manns, M.P., et al. (2018). Perioperative, Spatiotemporally Coordinated Activation of T and NK Cells Prevents Recurrence of Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 78, 475–488.

- Bruns, C., Lewis, I., Briner, U., Meno-Tetang, G., and Weckbecker, G. (2002). SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antiseecretory profile. *Eur. J. Endocrinol.* *146*, 707–716.
- Bruns, C.J., Harbison, M.T., Davis, D.W., Portera, C.A., Tsan, R., McConkey, D.J., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Hicklin, D.J., and Radinsky, R. Epidermal Growth Factor Receptor Blockade with C225 Plus Gemcitabine Results in Regression of Human Pancreatic Carcinoma Growing Orthotopically in Nude Mice by Antiangiogenic Mechanisms. *14*.
- Buchan, A.M.J., Lin, C.-Y., Choi, J., and Barber, D.L. (2002). Somatostatin, acting at receptor subtype 1, inhibits Rho activity, the assembly of actin stress fibers, and cell migration. *J. Biol. Chem.* *277*, 28431–28438.
- Buscail, L., Saint-Laurent, N., Chastre, E., Vaillant, J.C., Gespach, C., Capella, G., Kalthoff, H., Lluis, F., Vaysse, N., and Susini, C. (1996). Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic and colorectal cancer. *Cancer Res.* *56*, 1823–1827.
- Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R.P., Chaudhry, S.I., Harrington, K., Williamson, P., Moendarbary, E., Charras, G., et al. (2013). Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* *15*, 637–646.
- Campbell, P.J., Yachida, S., Mudie, L.J., Stephens, P.J., Pleasance, E.D., Stebbings, L.A., Morsberger, L.A., Latimer, C., McLaren, S., Lin, M.-L., et al. (2010). The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* *467*, 1109–1113.
- Candido, J.B., Morton, J.P., Bailey, P., Campbell, A.D., Karim, S.A., Jamieson, T., Lapienyte, L., Gopinathan, A., Clark, W., McGhee, E.J., et al. (2018). CSF1R+ Macrophages Sustain Pancreatic Tumor Growth through T Cell Suppression and Maintenance of Key Gene Programs that Define the Squamous Subtype. *Cell Rep* *23*, 1448–1460.
- Cantelmo, A.R., Conradi, L.-C., Brajic, A., Goveia, J., Kalucka, J., Pircher, A., Chaturvedi, P., Hol, J., Thienpont, B., Teuwen, L.-A., et al. (2016). Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell* *30*, 968–985.
- Capparelli, C., Guido, C., Whitaker-Menezes, D., Bonuccelli, G., Balliet, R., Pestell, T.G., Goldberg, A.F., Pestell, R.G., Howell, A., Sneddon, S., et al. (2012). Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis via glycolysis and ketone production. *Cell Cycle* *11*, 2285–2302.
- Celià-Terrassa, T., and Kang, Y. (2016). Distinctive properties of metastasis-initiating cells. *Genes Dev* *30*, 892–908.
- Chalabi, M., Duluc, C., Caron, P., Vezzosi, D., Guillermet-Guibert, J., Pyronnet, S., and Bousquet, C. (2014). Somatostatin analogs: does pharmacology impact antitumor efficacy? *Trends Endocrinol. Metab.* *25*, 115–127.
- Chalabi-Dchar, M., Cassant-Sourdy, S., Duluc, C., Fanjul, M., Lulka, H., Samain, R., Roche, C., Breibach, F., Delisle, M.-B., Poupot, M., et al. (2015). Loss of Somatostatin Receptor Subtype 2 Promotes Growth of KRAS-Induced Pancreatic Tumors in Mice by Activating PI3K Signaling and Overexpression of CXCL16. *Gastroenterology* *148*, 1452–1465.

- Chan, A., Prassas, I., Dimitromanolakis, A., Brand, R., Serra, S., Diamandis, E.P., and Blasutig, I.M. (2014). Validation of biomarkers that complement CA19.9 in detecting early pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 20, 5787–5795.
- Chang, C.-H., Qiu, J., O’Sullivan, D., Buck, M.D., Noguchi, T., Curtis, J.D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, M.M., van der Windt, G.J.W., et al. (2015). Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* 162, 1229–1241.
- Chauhan, V.P., Martin, J.D., Liu, H., Lacorre, D.A., Jain, S.R., Kozin, S.V., Stylianopoulos, T., Mousa, A.S., Han, X., Adstamongkonkul, P., et al. (2013). Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. *Nat Commun* 4, 2516.
- Che, S.P.Y., Park, J.Y., and Stokol, T. (2017). Tissue Factor-Expressing Tumor-Derived Extracellular Vesicles Activate Quiescent Endothelial Cells via Protease-Activated Receptor-1. *Front Oncol* 7, 261.
- Chen, J., Chen, Z., Chen, M., Li, D., Li, Z., Xiong, Y., Dong, J., and Li, X. (2009). Role of fibrillar Tenascin-C in metastatic pancreatic cancer. *Int. J. Oncol.* 34, 1029–1036.
- Chen, W.-J., Ho, C.-C., Chang, Y.-L., Chen, H.-Y., Lin, C.-A., Ling, T.-Y., Yu, S.-L., Yuan, S.-S., Chen, Y.-J.L., Lin, C.-Y., et al. (2014). Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling. *Nat Commun* 5, 3472.
- Chen, Y., LeBleu, V.S., Carstens, J.L., Sugimoto, H., Zheng, X., Malasi, S., Saur, D., and Kalluri, R. (2018). Dual reporter genetic mouse models of pancreatic cancer identify an epithelial-to-mesenchymal transition-independent metastasis program. *EMBO Mol Med*.
- Chéry, L., Lam, H.-M., Coleman, I., Lakely, B., Coleman, R., Larson, S., Aguirre-Ghiso, J.A., Xia, J., Gulati, R., Nelson, P.S., et al. (2014). Characterization of single disseminated prostate cancer cells reveals tumor cell heterogeneity and identifies dormancy associated pathways. *Oncotarget* 5, 9939–9951.
- Chew, C.L., Lunardi, A., Gulluni, F., Ruan, D.T., Chen, M., Salmena, L., Nishino, M., Papa, A., Ng, C., Fung, J., et al. (2015). In vivo role of INPP4B in tumor and metastasis suppression through regulation of PI3K/AKT signaling at endosomes. *Cancer Discov* 5, 740–751.
- Chiang, S.P.H., Cabrera, R.M., and Segall, J.E. (2016). Tumor cell intravasation. *Am J Physiol Cell Physiol* 311, C1–C14.
- Childs, E.J., Mocci, E., Campa, D., Bracci, P.M., Gallinger, S., Goggins, M., Li, D., Neale, R., Olson, S.H., Scelo, G., et al. (2015). Common variation at 2p13.3, 3q29, 7p13 and 17q25.1 associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet* 47, 911–916.
- Chinen, T., Kannan, A.K., Levine, A.G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2016). An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat. Immunol.* 17, 1322–1333.
- Chiorean, E.G., Schneider, B.P., Akisik, F.M., Perkins, S.M., Anderson, S., Johnson, C.S., DeWitt, J., Helft, P., Clark, R., Johnston, E.L., et al. (2014). Phase 1 pharmacogenetic and pharmacodynamic study of sorafenib with concurrent radiation therapy and gemcitabine in locally advanced unresectable pancreatic cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 89, 284–291.
- Chiu, D.K.-C., Tse, A.P.-W., Xu, I.M.-J., Di Cui, J., Lai, R.K.-H., Li, L.L., Koh, H.-Y., Tsang, F.H.-C., Wei, L.L., Wong, C.-M., et al. (2017). Hypoxia inducible factor HIF-1

promotes myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 8, 517.

Chmielewski, M., Hahn, O., Rappl, G., Nowak, M., Schmidt-Wolf, I.H., Hombach, A.A., and Abken, H. (2012). T cells that target carcinoembryonic antigen eradicate orthotopic pancreatic carcinomas without inducing autoimmune colitis in mice. *Gastroenterology* 143, 1095-1107.e2.

Chronopoulos, A., Robinson, B., Sarper, M., Cortes, E., Auernheimer, V., Lachowski, D., Attwood, S., García, R., Ghassemi, S., Fabry, B., et al. (2016). ATRA mechanically reprograms pancreatic stellate cells to suppress matrix remodelling and inhibit cancer cell invasion. *Nat Commun* 7, 12630.

Coffelt, S.B., Kersten, K., Doornebal, C.W., Weiden, J., Vrijland, K., Hau, C.-S., Verstegen, N.J.M., Ciampricotti, M., Hawinkels, L.J.A.C., Jonkers, J., et al. (2015). IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 522, 345–348.

Cohen, J.D., Javed, A.A., Thoburn, C., Wong, F., Tie, J., Gibbs, P., Schmidt, C.M., Yip-Schneider, M.T., Allen, P.J., Schattner, M., et al. (2017). Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 10202–10207.

Collisson, E.A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W.J., Truitt, M., Gu, S., Cooc, J., Weinkle, J., Kim, G.E., Jakkula, L., et al. (2011). Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Differing Responses to Therapy. *Nat Med* 17, 500–503.

Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., Sirven, P., Magagna, I., Fuhrmann, L., Bernard, C., et al. (2018). Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* 33, 463-479.e10.

Costa-Silva, B., Aiello, N.M., Ocean, A.J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B.K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M.T., Molina, H., et al. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* 17, 816–826.

Cote, G.A., Gore, A.J., McElyea, S.D., Heathers, L.E., Xu, H., Sherman, S., and Korc, M. (2014). A pilot study to develop a diagnostic test for pancreatic ductal adenocarcinoma based on differential expression of select miRNA in plasma and bile. *Am. J. Gastroenterol.* 109, 1942–1952.

Cros, J., Raffenne, J., Couvelard, A., and Poté, N. (2018). Tumor Heterogeneity in Pancreatic Adenocarcinoma. *Pathobiology* 85, 64–71.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 10, 942–949.

Curtis, M., Kenny, H.A., Ashcroft, B., Mukherjee, A., Johnson, A., Zhang, Y., Helou, Y., Batlle, R., Liu, X., Gutierrez, N., et al. (2018). Fibroblasts Mobilize Tumor Cell Glycogen to Promote Proliferation and Metastasis. *Cell Metab.*

Dalm, V.A.S.H., van Hagen, P.M., van Koetsveld, P.M., Achilefu, S., Houtsmuller, A.B., Pols, D.H.J., van der Lely, A.-J., Lamberts, S.W.J., and Hofland, L.J. (2003). Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E344-353.

- Dasgupta, A., Lim, A.R., and Ghajar, C.M. (2017). Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? *Mol Oncol* *11*, 40–61.
- Dauer, P., Zhao, X., Gupta, V.K., Sharma, N., Kesh, K., Gnamlin, P., Dudeja, V., Vickers, S.M., Banerjee, S., and Saluja, A. (2018). Inactivation of Cancer-Associated-Fibroblasts Disrupts Oncogenic Signaling in Pancreatic Cancer Cells and Promotes Its Regression. *Cancer Res.* *78*, 1321–1333.
- D’Costa, Z., Jones, K., Azad, A., van Stiphout, R., Lim, S.Y., Gomes, A.L., Kinches, P., Smart, S.C., Gillies McKenna, W., Buffa, F.M., et al. (2017). Gemcitabine-Induced TIMP1 Attenuates Therapy Response and Promotes Tumor Growth and Liver Metastasis in Pancreatic Cancer. *Cancer Research* *77*, 5952–5962.
- De Henau, O., Rausch, M., Winkler, D., Campesato, L.F., Liu, C., Cymerman, D.H., Budhu, S., Ghosh, A., Pink, M., Tchaicha, J., et al. (2016). Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3K $\gamma$  in myeloid cells. *Nature* *539*, 443–447.
- De Monte, L., Reni, M., Tassi, E., Clavenna, D., Papa, I., Recalde, H., Braga, M., Di Carlo, V., Doglioni, C., and Protti, M.P. (2011). Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* *208*, 469–478.
- Deer, E.L., González-Hernández, J., Coursen, J.D., Shea, J.E., Ngatia, J., Scaife, C.L., Firpo, M.A., and Mulvihill, S.J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* *39*, 425–435.
- Delgoffe, G.M., Woo, S.-R., Turnis, M.E., Gravano, D.M., Guy, C., Overacre, A.E., Bettini, M.L., Vogel, P., Finkelstein, D., Bonnevier, J., et al. (2013). Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature* *501*, 252–256.
- Delitto, D., Pham, K., Vlada, A.C., Sarosi, G.A., Thomas, R.M., Behrns, K.E., Liu, C., Hughes, S.J., Wallet, S.M., and Trevino, J.G. (2015). Patient-derived xenograft models for pancreatic adenocarcinoma demonstrate retention of tumor morphology through incorporation of murine stromal elements. *Am. J. Pathol.* *185*, 1297–1303.
- DeNicola, G.M., Karreth, F.A., Humpton, T.J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K.H., Yeo, C.J., Calhoun, E.S., et al. (2011). Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* *475*, 106–109.
- Deryugina, E.I., and Kiosses, W.B. (2017). Intratumoral Cancer Cell Intravasation Can Occur Independent of Invasion into the Adjacent Stroma. *Cell Rep* *19*, 601–616.
- Díaz, V.M., Planaguma, J., Thomson, T.M., Reventós, J., and Paciucci, R. (2002). Tissue plasminogen activator is required for the growth, invasion, and angiogenesis of pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* *122*, 806–819.
- Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M.A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., Thornton, K., Agrawal, N., Sokoll, L., Szabo, S.A., et al. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine* *14*, 985–990.
- Djurec, M., Graña, O., Lee, A., Troulé, K., Espinet, E., Cabras, L., Navas, C., Blasco, M.T., Martín-Díaz, L., Burdiel, M., et al. (2018). Saa3 is a key mediator of the protumorigenic properties of cancer-associated fibroblasts in pancreatic tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *115*, E1147–E1156.

- Dobrynin, Y.V. (1963). Establishment and Characteristics of Cell Strains From Some Epithelial Tumors of Human Origin. *J Natl Cancer Inst* 31, 1173–1195.
- Donnelly, S.K., Cabrera, R., Mao, S.P.H., Christin, J.R., Wu, B., Guo, W., Bravo-Cordero, J.J., Condeelis, J.S., Segall, J.E., and Hodgson, L. (2017). Rac3 regulates breast cancer invasion and metastasis by controlling adhesion and matrix degradation. *J. Cell Biol.* 216, 4331–4349.
- Duluc, C., Moatassim-Billah, S., Chalabi-Dchar, M., Perraud, A., Samain, R., Breibach, F., Gayral, M., Cordelier, P., Delisle, M.-B., Bousquet-Dubouch, M.-P., et al. (2015). Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance. *EMBO Mol Med* 7, 735–753.
- Duong, H.-Q., Hwang, J.S., Kim, H.J., Kang, H.J., Seong, Y.-S., and Bae, I. (2012). Aldehyde dehydrogenase 1A1 confers intrinsic and acquired resistance to gemcitabine in human pancreatic adenocarcinoma MIA PaCa-2 cells. *Int. J. Oncol.* 41, 855–861.
- Elliott, D.E., Li, J., Blum, A.M., Metwali, A., Patel, Y.C., and Weinstock, J.V. (1999). SSTR2A is the dominant somatostatin receptor subtype expressed by inflammatory cells, is widely expressed and directly regulates T cell IFN-gamma release. *Eur. J. Immunol.* 29, 2454–2463.
- Ene-Obong, A., Clear, A.J., Watt, J., Wang, J., Fatah, R., Riches, J.C., Marshall, J.F., Chin-Aleong, J., Chelala, C., Gribben, J.G., et al. (2013). Activated pancreatic stellate cells sequester CD8<sup>+</sup> T cells to reduce their infiltration of the juxtatumoral compartment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 145, 1121–1132.
- Erdogan, B., Ao, M., White, L.M., Means, A.L., Brewer, B.M., Yang, L., Washington, M.K., Shi, C., Franco, O.E., Weaver, A.M., et al. (2017). Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *J. Cell Biol.* 216, 3799–3816.
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S.T., and Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell* 17, 135–147.
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Nicolau, M., Dornhöfer, N., Kong, C., Le, Q.-T., Chi, J.-T.A., Jeffrey, S.S., and Giaccia, A.J. (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440, 1222–1226.
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Cox, T.R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q.-T., and Giaccia, A.J. (2009). Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* 15, 35–44.
- Farrow, B., Berger, D.H., and Rowley, D. (2009). Tumor-derived pancreatic stellate cells promote pancreatic cancer cell invasion through release of thrombospondin-2. *J. Surg. Res.* 156, 155–160.
- Feig, C., Jones, J.O., Kraman, M., Wells, R.J.B., Deonaraine, A., Chan, D.S., Connell, C.M., Roberts, E.W., Zhao, Q., Caballero, O.L., et al. (2013). Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 20212–20217.
- Feigin, M.E., and Tuveson, D.A. (2016). Challenges and Opportunities in Modeling Pancreatic Cancer. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 81, 231–235.



- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458.
- Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S.T.C., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., et al. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 527, 472–476.
- Fong, M.Y., Zhou, W., Liu, L., Alontaga, A.Y., Chandra, M., Ashby, J., Chow, A., O’Connor, S.T.F., Li, S., Chin, A.R., et al. (2015). Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* 17, 183–194.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–336.
- Frampton, A.E., Prado, M.M., López-Jiménez, E., Fajardo-Puerta, A.B., Jawad, Z.A.R., Lawton, P., Giovannetti, E., Habib, N.A., Castellano, L., Stebbing, J., et al. (2018). Glypican-1 is enriched in circulating-exosomes in pancreatic cancer and correlates with tumor burden. *Oncotarget* 9, 19006–19013.
- Francia, G., Cruz-Munoz, W., Man, S., Xu, P., and Kerbel, R.S. (2011). Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 11, 135–141.
- Fremd, C., Schuetz, F., Sohn, C., Beckhove, P., and Domschke, C. (2013). B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology* 2, e25443.
- Frese, K.K., Neesse, A., Cook, N., Bapiro, T.E., Lolkema, M.P., Jodrell, D.I., and Tuveson, D.A. (2012). nab-Paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Discov* 2, 260–269.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2009). Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev* 28, 129–135.
- Friedland, J.C., Lee, M.H., and Boettiger, D. (2009). Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science* 323, 642–644.
- Froeling, F.E.M., Feig, C., Chelala, C., Dobson, R., Mein, C.E., Tuveson, D.A., Clevers, H., Hart, I.R., and Kocher, H.M. (2011). Retinoic Acid-Induced Pancreatic Stellate Cell Quiescence Reduces Paracrine Wnt-β-Catenin Signaling to Slow Tumor Progression. *Gastroenterology* 141, 1486-1497.e14.
- Fu, A., Ma, S., Wei, N., Tan, B.X.X., Tan, E.Y., and Luo, K.Q. (2016). High expression of MnSOD promotes survival of circulating breast cancer cells and increases their resistance to doxorubicin. *Oncotarget* 7, 50239–50257.
- Fu, Y., Lai, Y., Wang, Q., Liu, X., He, W., Zhang, H., Fan, C., and Yang, G. (2013). Overexpression of clusterin promotes angiogenesis via the vascular endothelial growth factor in primary ovarian cancer. *Mol Med Rep* 7, 1726–1732.
- Fukuda, A., Wang, S.C., Morris, J.P., Foliass, A.E., Liou, A., Kim, G.E., Akira, S., Boucher, K.M., Firpo, M.A., Mulvihill, S.J., et al. (2011). Stat3 and MMP7 Contribute to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Initiation and Progression. *Cancer Cell* 19, 441–455.
- Fukunaga, A., Miyamoto, M., Cho, Y., Murakami, S., Kawarada, Y., Oshikiri, T., Kato, K., Kurokawa, T., Suzuoki, M., Nakakubo, Y., et al. (2004). CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating

lymphocytes together with CD4<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 28, e26-31.

Gadaleta, E., Cutts, R.J., Kelly, G.P., Crnogorac-Jurcevic, T., Kocher, H.M., Lemoine, N.R., and Chelala, C. (2011). A global insight into a cancer transcriptional space using pancreatic data: importance, findings and flaws. *Nucleic Acids Res* 39, 7900–7907.

Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K., and Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 1392–1400.

Gailhouse, L., Liew, L.C., Hatada, I., Nakagama, H., and Ochiya, T. (2018). Epigenetic reprogramming using 5-azacytidine promotes an anti-cancer response in pancreatic adenocarcinoma cells. *Cell Death Dis* 9, 468.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960–1964.

Gao, H., Korn, J.M., Ferretti, S., Monahan, J.E., Wang, Y., Singh, M., Zhang, C., Schnell, C., Yang, G., Zhang, Y., et al. (2015). High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nat. Med.* 21, 1318–1325.

Gengenbacher, N., Singhal, M., and Augustin, H.G. (2017). Preclinical mouse solid tumour models: status quo, challenges and perspectives. *Nature Reviews Cancer* 17, 751–765.

Ghansah, T., Vohra, N., Kinney, K., Weber, A., Kodumudi, K., Springett, G., Sarnaik, A.A., and Pilon-Thomas, S. (2013). Dendritic cell immunotherapy combined with gemcitabine chemotherapy enhances survival in a murine model of pancreatic carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 1083–1091.

Giovannetti, E., van der Borden, C.L., Frampton, A.E., Ali, A., Firuzi, O., and Peters, G.J. (2017). Never let it go: Stopping key mechanisms underlying metastasis to fight pancreatic cancer. *Seminars in Cancer Biology* 44, 43–59.

Gjorevski, N., Sachs, N., Manfrin, A., Giger, S., Bragina, M.E., Ordóñez-Morán, P., Clevers, H., and Lutolf, M.P. (2016). Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature* 539, 560–564.

Glentis, A., Oertle, P., Mariani, P., Chikina, A., El Marjou, F., Attieh, Y., Zaccarini, F., Lae, M., Loew, D., Dingli, F., et al. (2017). Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane. *Nat Commun* 8, 924.

Gopinathan, A., Morton, J.P., Jodrell, D.I., and Sansom, O.J. (2015). GEMMs as preclinical models for testing pancreatic cancer therapies. *Disease Models & Mechanisms* 8, 1185–1200.

Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J.B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F.J., Stanley, E.R., Segall, J.E., and Condeelis, J.S. (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res.* 65, 5278–5283.

Grasset, E.M., Bertero, T., Bozec, A., Friard, J., Bourget, I., Pisano, S., Lecacheur, M., Mael, M., Bailleux, C., Emelyanov, A., et al. (2018). Matrix stiffening and EGFR cooperate to promote the collective invasion of cancer cells. *Cancer Res.*

- Grinberg-Bleyer, Y., Oh, H., Desrichard, A., Bhatt, D.M., Caron, R., Chan, T.A., Schmid, R.M., Klein, U., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2017). NF- $\kappa$ B c-Rel Is Crucial for the Regulatory T Cell Immune Checkpoint in Cancer. *Cell* *170*, 1096-1108.e13.
- Grozinsky-Glasberg, S., Shimon, I., Korbonits, M., and Grossman, A.B. (2008). Somatostatin analogues in the control of neuroendocrine tumours: efficacy and mechanisms. *Endocr. Relat. Cancer* *15*, 701–720.
- Grünwald, B., Harant, V., Schaten, S., Frühschütz, M., Spallek, R., Höchst, B., Stutzer, K., Berchtold, S., Erkan, M., Prokopchuk, O., et al. (2016). Pancreatic Premalignant Lesions Secrete Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1, Which Activates Hepatic Stellate Cells Via CD63 Signaling to Create a Premetastatic Niche in the Liver. *Gastroenterology* *151*, 1011-1024.e7.
- Grzesiak, J.J., and Bouvet, M. (2006). The alpha2beta1 integrin mediates the malignant phenotype on type I collagen in pancreatic cancer cell lines. *Br. J. Cancer* *94*, 1311–1319.
- Grzesiak, J.J., Smith, K.C., Burton, D.W., Deftos, L.J., and Bouvet, M. (2007). Integrin-mediated laminin-1 adhesion upregulates CXCR4 and IL-8 expression in pancreatic cancer cells. *Surgery* *141*, 804–814.
- Guan, J., Zhang, H., Wen, Z., Gu, Y., Cheng, Y., Sun, Y., Zhang, T., Jia, C., Lu, Z., and Chen, J. (2014). Retinoic acid inhibits pancreatic cancer cell migration and EMT through the downregulation of IL-6 in cancer associated fibroblast cells. *Cancer Lett.* *345*, 132–139.
- Guillemin, R. (2008). Somatostatin: the beginnings, 1972. *Mol. Cell. Endocrinol.* *286*, 3–4.
- Guillermet, J., Saint-Laurent, N., Rochaix, P., Cuvillier, O., Levade, T., Schally, A.V., Pradayrol, L., Buscail, L., Susini, C., and Bousquet, C. (2003). Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 155–160.
- Guillermet-Guibert, J., Lahlou, H., Cordelier, P., Bousquet, C., Pyronnet, S., and Susini, C. (2005). Physiology of somatostatin receptors. *J. Endocrinol. Invest.* *28*, 5–9.
- Hackam, D.G., and Redelmeier, D.A. (2006). Translation of Research Evidence From Animals to Humans. *JAMA* *296*, 1727.
- van Hagen, P.M., Dalm, V.A., Staal, F., and Hofland, L.J. (2008). The role of cortistatin in the human immune system. *Mol. Cell. Endocrinol.* *286*, 141–147.
- Hakanpaa, L., Sipila, T., Leppanen, V.-M., Gautam, P., Nurmi, H., Jacquemet, G., Eklund, L., Ivaska, J., Alitalo, K., and Saharinen, P. (2015). Endothelial destabilization by angiopoietin-2 via integrin  $\beta$ 1 activation. *Nature Communications* *6*, 5962.
- Harrison, D.A. (2012). The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *4*, a011205–a011205.
- Heiden, K.B., Williamson, A.J., Doscas, M.E., Ye, J., Wang, Y., Liu, D., Xing, M., Prinz, R.A., and Xu, X. (2014). The sonic hedgehog signaling pathway maintains the cancer stem cell self-renewal of anaplastic thyroid cancer by inducing snail expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *99*, E2178-2187.
- Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., and Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* *1*, 313–323.

Hessmann, E., Patzak, M.S., Klein, L., Chen, N., Kari, V., Ramu, I., Bapiro, T.E., Frese, K.K., Gopinathan, A., Richards, F.M., et al. (2017). Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer. *Gut* *gutjnl-2016-311954*.

Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N., and Depinho, R.A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* *20*, 1218–1249.

Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A.V., Budinska, E., Byrne, A.T., Caldas, C., Clarke, R.B., de Jong, S., Jonkers, J., Maelandsmo, G.M., et al. (2014). Patient-Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research. *Cancer Discovery* *4*, 998–1013.

Hingorani, S.R., and Potter, J.D. (2012). Pancreas Cancer Meets the Thunder God. *Science Translational Medicine* *4*, 156ps21-156ps21.

Hingorani, S.R., III, E.F.P., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., et al. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *CANCER CELL* *14*.

Hingorani, S.R., Wang, L., Multani, A.S., Combs, C., Deramaudt, T.B., Hruban, R.H., Rustgi, A.K., Chang, S., and Tuveson, D.A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* *7*, 469–483.

Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T., and Hirohashi, S. (2006). Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin. Cancer Res.* *12*, 5423–5434.

Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H., Shipley, J.M., Senior, R.M., and Shibuya, M. (2002). MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* *2*, 289–300.

Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H., and Maru, Y. (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1369–1375.

Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., et al. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* *527*, 329–335.

Huang, C., Li, N., Li, Z., Chang, A., Chen, Y., Zhao, T., Li, Y., Wang, X., Zhang, W., Wang, Z., et al. (2017a). Tumour-derived Interleukin 35 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell extravasation and metastasis by inducing ICAM1 expression. *Nat Commun* *8*, 14035.

Huang, G., Ge, G., Izzi, V., and Greenspan, D.S. (2017b).  $\alpha 3$  Chains of type V collagen regulate breast tumour growth via glypican-1. *Nat Commun* *8*, 14351.

Huang, L., Holtzinger, A., Jagan, I., BeGora, M., Lohse, I., Ngai, N., Nostro, C., Wang, R., Muthuswamy, L.B., Crawford, H.C., et al. (2015). Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell and patient-derived tumor organoids. *Nat Med* *21*, 1364–1371.

Huang, Q., Huang, M., Meng, F., and Sun, R. (2018a). Activated pancreatic stellate cells inhibit NK cell function in the human pancreatic cancer microenvironment. *Cellular & Molecular Immunology* *1*.

- Huang, Q., Hu, X., He, W., Zhao, Y., Hao, S., Wu, Q., Li, S., Zhang, S., and Shi, M. (2018b). Fluid shear stress and tumor metastasis. *Am J Cancer Res* 8, 763–777.
- Huanwen, W., Zhiyong, L., Xiaohua, S., Xinyu, R., Kai, W., and Tonghua, L. (2009). Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines. *Mol. Cancer* 8, 125.
- Huelsken, J., and Hanahan, D. (2018). A Subset of Cancer-Associated Fibroblasts Determines Therapy Resistance. *Cell* 172, 643–644.
- Hulit, J., Suyama, K., Chung, S., Keren, R., Agiostratidou, G., Shan, W., Dong, X., Williams, T.M., Lisanti, M.P., Knudsen, K., et al. (2007). N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res.* 67, 3106–3116.
- Hwang, C.-I., Boj, S.F., Clevers, H., and Tuveson, D.A. (2016). Pre-clinical Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Pathol* 238, 197–204.
- Hwang, R.F., Moore, T.T., Hattersley, M.M., Scarpitti, M., Yang, B., Devereaux, E., Ramachandran, V., Arumugam, T., Ji, B., Logsdon, C.D., et al. (2012). Inhibition of the hedgehog pathway targets the tumor-associated stroma in pancreatic cancer. *Mol. Cancer Res.* 10, 1147–1157.
- Ilkow, C.S., Marguerie, M., Batenchuk, C., Mayer, J., Ben Neriah, D., Cousineau, S., Falls, T., Jennings, V.A., Boileau, M., Bellamy, D., et al. (2015). Reciprocal cellular cross-talk within the tumor microenvironment promotes oncolytic virus activity. *Nat. Med.* 21, 530–536.
- Infante, J.R., Somer, B.G., Park, J.O., Li, C.-P., Scheulen, M.E., Kasubhai, S.M., Oh, D.-Y., Liu, Y., Redhu, S., Stepleski, K., et al. (2014). A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of trametinib, an oral MEK inhibitor, in combination with gemcitabine for patients with untreated metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Eur. J. Cancer* 50, 2072–2081.
- Inman, K.S., Francis, A.A., and Murray, N.R. (2014). Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 20, 11160–11181.
- Jacobetz, M.A., Chan, D.S., Nesses, A., Bapiro, T.E., Cook, N., Frese, K.K., Feig, C., Nakagawa, T., Caldwell, M.E., Zecchini, H.I., et al. (2013). Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 62, 112–120.
- Jean, C., Chen, X.L., Nam, J.-O., Tancioni, I., Uryu, S., Lawson, C., Ward, K.K., Walsh, C.T., Miller, N.L.G., Ghassemian, M., et al. (2014). Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *J. Cell Biol.* 204, 247–263.
- Jiang, H., Hegde, S., Knolhoff, B.L., Zhu, Y., Herndon, J.M., Meyer, M.A., Nywening, T.M., Hawkins, W.G., Shapiro, I.M., Weaver, D.T., et al. (2016). Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nat. Med.*
- Jiang, W.G., Sanders, A.J., Katoh, M., Ungefroren, H., Gieseler, F., Prince, M., Thompson, S.K., Zollo, M., Spano, D., Dhawan, P., et al. (2015). Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Seminars in Cancer Biology* 35, S244–S275.
- Johnson, J.I., Decker, S., Zaharevitz, D., Rubinstein, L.V., Venditti, J.M., Schepartz, S., Kalyandrug, S., Christian, M., Arbuck, S., Hollingshead, M., et al. (2001). Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer* 84, 1424–1431.

- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., et al. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321, 1801–1806.
- Jung, J., Lee, C.H., Seol, H.S., Choi, Y.S., Kim, E., Lee, E.J., Rhee, J.-K., Singh, S.R., Jun, E.S., Han, B., et al. (2016). Generation and molecular characterization of pancreatic cancer patient-derived xenografts reveals their heterologous nature. *Oncotarget* 7, 62533–62546.
- Jurasz, P., Alonso-Escolano, D., and Radomski, M.W. (2004). Platelet–cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 143, 819–826.
- Kalli, M., and Stylianopoulos, T. (2018). Defining the Role of Solid Stress and Matrix Stiffness in Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Front Oncol* 8.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* 16, 582–598.
- Kaneda, M.M., Cappello, P., Nguyen, A.V., Ralainirina, N., Hardamon, C.R., Foubert, P., Schmid, M.C., Sun, P., Mose, E., Bouvet, M., et al. (2016a). Macrophage PI3K $\gamma$  drives pancreatic ductal adenocarcinoma progression. *Cancer Discov.*
- Kaneda, M.M., Messer, K.S., Ralainirina, N., Li, H., Leem, C.J., Gorjestani, S., Woo, G., Nguyen, A.V., Figueiredo, C.C., Foubert, P., et al. (2016b). PI3K $\gamma$  is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature* 539, 437–442.
- Karki, A., Humphrey, S.E., Steele, R.E., Hess, D.A., Taparowsky, E.J., and Konieczny, S.F. (2015). Silencing Mist1 Gene Expression Is Essential for Recovery from Acute Pancreatitis. *PLoS ONE* 10, e0145724.
- Karlsson, A.K., and Saleh, S.N. (2017). Checkpoint inhibitors for malignant melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 10, 325–339.
- Kawai, O., Ishii, G., Kubota, K., Murata, Y., Naito, Y., Mizuno, T., Aokage, K., Saijo, N., Nishiwaki, Y., Gemma, A., et al. (2008). Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 113, 1387–1395.
- Khuon, S., Liang, L., Dettman, R.W., Sporn, P.H.S., Wysolmerski, R.B., and Chew, T.-L. (2010). Myosin light chain kinase mediates transcellular intravasation of breast cancer cells through the underlying endothelial cells: a three-dimensional FRET study. *J. Cell. Sci.* 123, 431–440.
- Kim, S., Takahashi, H., Lin, W.-W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J.-L., and Karin, M. (2009). Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457, 102–106.
- Koikawa, K., Ohuchida, K., Ando, Y., Kibe, S., Nakayama, H., Takesue, S., Endo, S., Abe, T., Okumura, T., Iwamoto, C., et al. (2018). Basement membrane destruction by pancreatic stellate cells leads to local invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Lett.* 425, 65–77.
- Kojima, Y., Acar, A., Eaton, E.N., Mellody, K.T., Scheel, C., Ben-Porath, I., Onder, T.T., Wang, Z.C., Richardson, A.L., Weinberg, R.A., et al. Autocrine TGF- $\beta$  and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor- promoting mammary stromal myofibroblasts. *MEDICAL SCIENCES* 6.

- Königer, J., Giese, N.A., di Mola, F.F., Berberat, P., Giese, T., Esposito, I., Bachem, M.G., Büchler, M.W., and Friess, H. (2004). Overexpressed decorin in pancreatic cancer: potential tumor growth inhibition and attenuation of chemotherapeutic action. *Clin. Cancer Res.* *10*, 4776–4783.
- Kordes, S., Klumpen, H.J., Weterman, M.J., Schellens, J.H.M., Richel, D.J., and Wilmink, J.W. (2015). Phase II study of capecitabine and the oral mTOR inhibitor everolimus in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *75*, 1135–1141.
- Kou, G., Shi, J., Chen, L., Zhang, D., Hou, S., Zhao, L., Fang, C., Zheng, L., Zhang, X., Liang, P., et al. (2010). A bispecific antibody effectively inhibits tumor growth and metastasis by simultaneous blocking vascular endothelial growth factor A and osteopontin. *Cancer Lett.* *299*, 130–136.
- Kraman, M., Bambrough, P.J., Arnold, J.N., Roberts, E.W., Magiera, L., Jones, J.O., Gopinathan, A., Tuveson, D.A., and Fearon, D.T. (2010). Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein- $\alpha$ . *Science* *330*, 827–830.
- Krebs, A.M., Mitschke, J., Lasierra Losada, M., Schmalhofer, O., Boerries, M., Busch, H., Boettcher, M., Mougiakakos, D., Reichardt, W., Bronsert, P., et al. (2017). The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat. Cell Biol.* *19*, 518–529.
- Krempley, B.D., and Yu, K.H. (2017). Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chinese Clinical Oncology* *6*.
- Kubota, Y., Takubo, K., Shimizu, T., Ohno, H., Kishi, K., Shibuya, M., Saya, H., and Suda, T. (2009). M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J. Exp. Med.* *206*, 1089–1102.
- Kuchnio, A., Moens, S., Bruning, U., Kuchnio, K., Cruys, B., Thienpont, B., Broux, M., Ungureanu, A.A., Leite de Oliveira, R., Bruyère, F., et al. (2015). The Cancer Cell Oxygen Sensor PHD2 Promotes Metastasis via Activation of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cell Rep* *12*, 992–1005.
- Kumar, U., and Grant, M. (2010). Somatostatin and somatostatin receptors. *Results Probl Cell Differ* *50*, 137–184.
- Kumar, V., Donthireddy, L., Marvel, D., Condamine, T., Wang, F., Lavilla-Alonso, S., Hashimoto, A., Vonteddu, P., Behera, R., Goins, M.A., et al. (2017). Cancer-Associated Fibroblasts Neutralize the Anti-tumor Effect of CSF1 Receptor Blockade by Inducing PMN-MDSC Infiltration of Tumors. *Cancer Cell* *32*, 654-668.e5.
- Lai, X., Wang, M., McElyea, S.D., Sherman, S., House, M., and Korc, M. (2017). A microRNA signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer. *Cancer Lett* *393*, 86–93.
- Lakins, M.A., Ghorani, E., Munir, H., Martins, C.P., and Shields, J.D. (2018). Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8 + T Cells to protect tumour cells. *Nat Commun* *9*, 948.
- Laklai, H., Laval, S., Dumartin, L., Rochaix, P., Hagedorn, M., Bikfalvi, A., Le Guellec, S., Delisle, M.-B., Schally, A.V., Susini, C., et al. (2009). Thrombospondin-1 is a critical effector of oncosuppressive activity of sst2 somatostatin receptor on pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 17769–17774.

- Laklai, H., Miroshnikova, Y.A., Pickup, M.W., Collisson, E.A., Kim, G.E., Barrett, A.S., Hill, R.C., Lakins, J.N., Schlaepfer, D.D., Mouw, J.K., et al. (2016). Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis and tumor progression. *Nat. Med.* 22, 497–505.
- Lambrechts, D., Wauters, E., Boeckx, B., Aibar, S., Nittner, D., Burton, O., Bassez, A., Decaluwé, H., Pircher, A., Van den Eynde, K., et al. (2018). Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. *Nature Medicine*.
- Laoui, D., Van Overmeire, E., De Baetselier, P., Van Ginderachter, J.A., and Raes, G. (2014). Functional Relationship between Tumor-Associated Macrophages and Macrophage Colony-Stimulating Factor as Contributors to Cancer Progression. *Front Immunol* 5, 489.
- Le, D.T., Lutz, E., Uram, J.N., Sugar, E.A., Onners, B., Solt, S., Zheng, L., Diaz, L.A., Donehower, R.C., Jaffee, E.M., et al. (2013). Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer. *J. Immunother.* 36, 382–389.
- LeBleu, V.S., Taduri, G., O’Connell, J., Teng, Y., Cooke, V.G., Woda, C., Sugimoto, H., and Kalluri, R. (2013). Origin and Function of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis. *Nat Med* 19, 1047–1053.
- Leca, J., Martinez, S., Lac, S., Nigri, J., Secq, V., Rubis, M., Bressy, C., Sergé, A., Lavaut, M.-N., Dusetti, N., et al. (2016). Cancer-associated fibroblast-derived annexin A6+ extracellular vesicles support pancreatic cancer aggressiveness. *J. Clin. Invest.*
- Lee, J.J., Perera, R.M., Wang, H., Wu, D.-C., Liu, X.S., Han, S., Fitamant, J., Jones, P.D., Ghanta, K.S., Kawano, S., et al. (2014). Stromal response to Hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E3091-3100.
- Lee, K.E., Spata, M., Bayne, L.J., Buza, E.L., Durham, A.C., Allman, D., Vonderheide, R.H., and Simon, M.C. (2016). Hif1a Deletion Reveals Pro-Neoplastic Function of B Cells in Pancreatic Neoplasia. *Cancer Discov* 6, 256–269.
- Lenos, K.J., Miedema, D.M., Lodestijn, S.C., Nijman, L.E., van den Bosch, T., Romero Ros, X., Lourenço, F.C., Lecca, M.C., van der Heijden, M., van Neerven, S.M., et al. (2018). Stem cell functionality is microenvironmentally defined during tumour expansion and therapy response in colon cancer. *Nat. Cell Biol.*
- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., et al. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891–906.
- Li, X., Nadauld, L., Ootani, A., Corney, D.C., Pai, R.K., Gevaert, O., Cantrell, M.A., Rack, P.G., Neal, J.T., Chan, C.W.-M., et al. (2014). Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture. *Nat Med* 20, 769–777.
- Li, X., Gao, P., Wang, Y., and Wang, X. (2018). Blood-Derived microRNAs for Pancreatic Cancer Diagnosis: A Narrative Review and Meta-Analysis. *Front Physiol* 9, 685.
- Li, Y., VandenBoom, T.G., Wang, Z., Kong, D., Ali, S., Philip, P.A., and Sarkar, F.H. (2010). Up-regulation of miR-146a contributes to the inhibition of invasion of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 70, 5703.



- Li, Y.-J., Wei, Z.-M., Meng, Y.-X., and Ji, X.-R. (2005).  $\beta$ -catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: Relationships with carcinogenesis and metastasis. *World J Gastroenterol* 11, 2117–2123.
- Liang, C., Shi, S., Meng, Q., Liang, D., Ji, S., Zhang, B., Qin, Y., Xu, J., Ni, Q., and Yu, X. (2018). Do anti-stroma therapies improve extrinsic resistance to increase the efficacy of gemcitabine in pancreatic cancer? *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 1001–1012.
- Lichtenauer-Kaligis, E.G.R., Dalm, V.A.S.H., Oomen, S.P.M.A., Mooij, D.M., van Hagen, P.M., Lamberts, S.W.J., and Hofland, L.J. (2004). Differential expression of somatostatin receptor subtypes in human peripheral blood mononuclear cell subsets. *Eur. J. Endocrinol.* 150, 565–577.
- Lin, E.Y., Nguyen, A.V., Russell, R.G., and Pollard, J.W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med.* 193, 727–740.
- Linde, N., Casanova-Acebes, M., Sosa, M.S., Mortha, A., Rahman, A., Farias, E., Harper, K., Tardio, E., Reyes Torres, I., Jones, J., et al. (2018). Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. *Nat Commun* 9, 21.
- Liou, G.-Y., Döppler, H., Necela, B., Krishna, M., Crawford, H.C., Raimondo, M., and Storz, P. (2013). Macrophage-secreted cytokines drive pancreatic acinar-to-ductal metaplasia through NF- $\kappa$ B and MMPs. *J. Cell Biol.* 202, 563–577.
- Liu, Y., and Cao, X. (2016). Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell* 30, 668–681.
- Liu, R., Chen, X., Du, Y., Yao, W., Shen, L., Wang, C., Hu, Z., Zhuang, R., Ning, G., Zhang, C., et al. (2012). Serum MicroRNA Expression Profile as a Biomarker in the Diagnosis and Prognosis of Pancreatic Cancer. *Clinical Chemistry* 58, 610–618.
- Liu, X., Wu, H., Byrne, M., Jeffrey, J., Krane, S., and Jaenisch, R. (1995). A targeted mutation at the known collagenase cleavage site in mouse type I collagen impairs tissue remodeling. *J. Cell Biol.* 130, 227–237.
- Liu, X., Mo, W., Ye, J., Li, L., Zhang, Y., Hsueh, E.C., Hoft, D.F., and Peng, G. (2018). Regulatory T cells trigger effector T cell DNA damage and senescence caused by metabolic competition. *Nat Commun* 9, 249.
- Liu, Y., Li, F., Gao, F., Xing, L., Qin, P., Liang, X., Zhang, J., Qiao, X., Lin, L., Zhao, Q., et al. (2016). Periostin promotes tumor angiogenesis in pancreatic cancer via Erk/VEGF signaling. *Oncotarget*.
- Liu, Y., Li, F., Gao, F., Xing, L., Qin, P., Liang, X., Zhang, J., Qiao, X., Lin, L., Zhao, Q., et al. (2017). Role of microenvironmental periostin in pancreatic cancer progression. *Oncotarget* 8, 89552–89565.
- Long, D., Lu, J., Luo, L., Guo, Y., Li, C., Wu, W., Shan, J., Li, L., Li, S., Li, Y., et al. (2012). Effects of octreotide on activated pancreatic stellate cell-induced pancreas graft fibrosis in rats. *J. Surg. Res.* 176, 248–259.
- López-Otín, C., and Matrisian, L.M. (2007). Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 7, 800–808.
- Lotti, F., Jarrar, A.M., Pai, R.K., Hitomi, M., Lathia, J., Mace, A., Gantt, G.A., Sukhdeo, K., DeVecchio, J., Vasanji, A., et al. (2013). Chemotherapy activates cancer-associated

fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J. Exp. Med.* *210*, 2851–2872.

Lunardi, S., Muschel, R.J., and Brunner, T.B. (2014). The stromal compartments in pancreatic cancer: are there any therapeutic targets? *Cancer Lett.* *343*, 147–155.

Ma, L., Teruya-Feldstein, J., and Weinberg, R.A. (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* *449*, 682–688.

Maddipati, R., and Stanger, B.Z. (2015). Pancreatic Cancer Metastases Harbor Evidence of Polyclonality. *Cancer Discov* *5*, 1086–1097.

Maire, F., Micard, S., Hammel, P., Voitot, H., Lévy, P., Cugnenc, P.-H., Ruszniewski, P., and Puig, P.L. (2002). Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: value of the detection of KRAS2 mutations in circulating DNA. *Br J Cancer* *87*, 551–554.

Maitra, A., Fukushima, N., Takaori, K., and Hruban, R.H. (2005). Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol* *12*, 81–91.

Maj, T., Wang, W., Crespo, J., Zhang, H., Wang, W., Wei, S., Zhao, L., Vatan, L., Shao, I., Szeliga, W., et al. (2017). Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor. *Nat. Immunol.* *18*, 1332–1341.

Mak, I.W., Evaniew, N., and Ghert, M. (2014). Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res* *6*, 114–118.

Makohon-Moore, A.P., Zhang, M., Reiter, J.G., Bozic, I., Allen, B., Kundu, D., Chatterjee, K., Wong, F., Jiao, Y., Kohutek, Z.A., et al. (2017). Limited heterogeneity of known driver gene mutations among the metastases of individual patients with pancreatic cancer. *Nature Genetics* *49*, 358–366.

Makohon-Moore, A.P., Matsukuma, K., Zhang, M., Reiter, J.G., Gerold, J.M., Jiao, Y., Sikkema, L., Attiyeh, M.A., Yachida, S., Sandone, C., et al. (2018). Precancerous neoplastic cells can move through the pancreatic ductal system. *Nature* *1*.

Maliar, A., Servais, C., Waks, T., Chmielewski, M., Lavy, R., Altevogt, P., Abken, H., and Eshhar, Z. (2012). Redirected T cells that target pancreatic adenocarcinoma antigens eliminate tumors and metastases in mice. *Gastroenterology* *143*, 1375-1384.e5.

Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., and Allavena, P. (2017). Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* *advance online publication*.

Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* *6*.

Masamune, A., Hamada, S., Kikuta, K., Takikawa, T., Miura, S., Nakano, E., and Shimosegawa, T. (2013). The angiotensin II type I receptor blocker olmesartan inhibits the growth of pancreatic cancer by targeting stellate cell activities in mice. *Scand. J. Gastroenterol.* *48*, 602–609.

Melo, S.A., Luecke, L.B., Kahlert, C., Fernandez, A.F., Gammon, S.T., Kaye, J., LeBleu, V.S., Mittendorf, E.A., Weitz, J., Rahbari, N., et al. (2015). Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* *523*, 177–182.

- Mentlein, R., Eichler, O., Forstreuter, F., and Held-Feindt, J. (2001). Somatostatin inhibits the production of vascular endothelial growth factor in human glioma cells. *Int. J. Cancer* 92, 545–550.
- Michl, P., and Gress, T.M. (2013). Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer. *Gut* 62, 317–326.
- Mielgo, A., and Schmid, M.C. (2013). Impact of tumour associated macrophages in pancreatic cancer. *BMB Rep* 46, 131–138.
- Miles, F.L., Pruitt, F.L., van Golen, K.L., and Cooper, C.R. (2008). Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 25, 305–324.
- Miller, B.W., Morton, J.P., Pinese, M., Saturno, G., Jamieson, N.B., McGhee, E., Timpson, P., Leach, J., McGarry, L., Shanks, E., et al. (2015). Targeting the LOX/hypoxia axis reverses many of the features that make pancreatic cancer deadly: inhibition of LOX abrogates metastasis and enhances drug efficacy. *EMBO Mol Med* 7, 1063–1076.
- Millrud, C.R., Bergenfelz, C., and Leandersson, K. (2017). On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* 8, 3649–3665.
- Mitchem, J.B., Brennan, D.J., Knolhoff, B.L., Belt, B.A., Zhu, Y., Sanford, D.E., Belaygorod, L., Carpenter, D., Collins, L., Piwnica-Worms, D., et al. (2013). Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res* 73, 1128–1141.
- Mitra, A.K., Zillhardt, M., Hua, Y., Tiwari, P., Murmann, A.E., Peter, M.E., and Lengyel, E. (2012). MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer. *Cancer Discov* 2, 1100–1108.
- Moatassim-Billah, S., Duluc, C., Samain, R., Jean, C., Perraud, A., Decaup, E., Cassant-Sourdy, S., Bakri, Y., Selves, J., Schmid, H., et al. (2016). Anti-metastatic potential of somatostatin analog SOM230: Indirect pharmacological targeting of pancreatic cancer-associated fibroblasts. *Oncotarget* 7, 41584–41598.
- Moffitt, R.A., Marayati, R., Flate, E.L., Volmar, K.E., Loeza, S.G.H., Hoadley, K.A., Rashid, N.U., Williams, L.A., Eaton, S.C., Chung, A.H., et al. (2015). Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet* 47, 1168–1178.
- Moreira, L., Bakir, B., Chatterji, P., Dantes, Z., Reichert, M., and Rustgi, A.K. (2018). Pancreas 3D Organoids: Current and Future Aspects as a Research Platform for Personalized Medicine in Pancreatic Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 5, 289–298.
- Moskaluk, C.A., Hruban, R.H., and Kern, S.E. (1997). p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 57, 2140–2143.
- Movahedi, K., Guilliams, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J.A. (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111, 4233–4244.
- Mueller, S., Engleitner, T., Maresch, R., Zukowska, M., Lange, S., Kaltenbacher, T., Konukiewicz, B., Öllinger, R., Zwiebel, M., Strong, A., et al. (2018). Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature* 554, 62–68.

- Naba, A., Clauser, K.R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S.A., and Hynes, R.O. (2012). The Matrisome: In Silico Definition and In Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices. *Mol Cell Proteomics* 11.
- Nakai, Y., Isayama, H., Ijichi, H., Sasaki, T., Sasahira, N., Hirano, K., Kogure, H., Kawakubo, K., Yagioka, H., Yashima, Y., et al. (2010). Inhibition of renin-angiotensin system affects prognosis of advanced pancreatic cancer receiving gemcitabine. *Br. J. Cancer* 103, 1644–1648.
- Nakamori, S., Kameyama, M., Imaoka, S., Furukawa, H., Ishikawa, O., Sasaki, Y., Kabuto, T., Iwanaga, T., Matsushita, Y., and Irimura, T. (1993). Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res.* 53, 3632–3637.
- Nakazawa, Y., Taniyama, Y., Sanada, F., Morishita, R., Nakamori, S., Morimoto, K., Yeung, K.T., and Yang, J. (2018). Periostin blockade overcomes chemoresistance via restricting the expansion of mesenchymal tumor subpopulations in breast cancer. *Scientific Reports* 8, 4013.
- Nesse, A., Frese, K.K., Bapiro, T.E., Nakagawa, T., Sternlicht, M.D., Seeley, T.W., Pilarsky, C., Jodrell, D.I., Spong, S.M., and Tuveson, D.A. (2013). CTGF antagonism with mAb FG-3019 enhances chemotherapy response without increasing drug delivery in murine ductal pancreas cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 12325–12330.
- Nesse, A., Algül, H., Tuveson, D.A., and Gress, T.M. (2015). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm. *Gut* 64, 1476–1484.
- Neoptolemos, J.P., Kleeff, J., Michl, P., Costello, E., Greenhalf, W., and Palmer, D.H. (2018). Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 333–348.
- Neuzillet, C., Bachet, J., Baugeon, L., Colson Durand, L., and Hammel, P. (2018). «Cancer du pancréas». *Thésaurus National de Cancérologie Digestive*.
- Ni, X., Tao, J., Barbi, J., Chen, Q., Park, B.V., Li, Z., Zhang, N., Lebid, A., Ramaswamy, A., Wei, P., et al. (2018). YAP Is Essential for Treg-Mediated Suppression of Antitumor Immunity. *Cancer Discov* 8, 1026–1043.
- Nicolle, R., Blum, Y., Marisa, L., Loncle, C., Gayet, O., Moutardier, V., Turrini, O., Giovannini, M., Bian, B., Bigonnet, M., et al. (2017). Pancreatic Adenocarcinoma Therapeutic Targets Revealed by Tumor-Stroma Cross-Talk Analyses in Patient-Derived Xenografts. *Cell Reports* 21, 2458–2470.
- Nicoloso, M.S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S., and Calin, G.A. (2009). MicroRNAs — the micro steering wheel of tumour metastases. *Nature Reviews Cancer* 9, 293–302.
- Nielsen, S.R., Quaranta, V., Linford, A., Emeagi, P., Rainer, C., Santos, A., Ireland, L., Sakai, T., Sakai, K., Kim, Y.-S., et al. (2016). Macrophage-secreted granulins supports pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis. *Nat. Cell Biol.* 18, 549–560.
- Nitsche, U., Kong, B., Balmert, A., Friess, H., and Kleeff, J. (2016). Should every patient with pancreatic cancer receive perioperative/neoadjuvant therapy? *Indian J Med Paediatr Oncol* 37, 211–213.
- Niu, G., Wright, K.L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., et al. (2002). Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 21, 2000–2008.

- Noll, E.M., Eisen, C., Stenzinger, A., Espinet, E., Muckenhuber, A., Klein, C., Vogel, V., Klaus, B., Nadler, W., Rösli, C., et al. (2016). CYP3A5 mediates basal and acquired therapy resistance in different subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Medicine* 22, 278–287.
- Nomura, A., Gupta, V.K., Dauer, P., Sharma, N.S., Dudeja, V., Merchant, N., Saluja, A.K., and Banerjee, S. (2018). NFκB-Mediated Invasiveness in CD133<sup>+</sup> Pancreatic TICs Is Regulated by Autocrine and Paracrine Activation of IL1 Signaling. *Molecular Cancer Research* 16, 162–172.
- Nywening, T.M., Wang-Gillam, A., Sanford, D.E., Belt, B.A., Panni, R.Z., Cusworth, B.M., Toriola, A.T., Nieman, R.K., Worley, L.A., Yano, M., et al. (2016). Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: a single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial. *The Lancet Oncology* 17, 651–662.
- Nywening, T.M., Belt, B.A., Cullinan, D.R., Panni, R.Z., Han, B.J., Sanford, D.E., Jacobs, R.C., Ye, J., Patel, A.A., Gillanders, W.E., et al. (2018). Targeting both tumour-associated CXCR2<sup>+</sup> neutrophils and CCR2<sup>+</sup> macrophages disrupts myeloid recruitment and improves chemotherapeutic responses in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* 67, 1112–1123.
- Oh, H., Grinberg-Bleyer, Y., Liao, W., Maloney, D., Wang, P., Wu, Z., Wang, J., Bhatt, D.M., Heise, N., Schmid, R.M., et al. (2017). An NF-κB Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function. *Immunity* 47, 450-465.e5.
- Ohlund, D., Lundin, C., Ardnor, B., Oman, M., Naredi, P., and Sund, M. (2009). Type IV collagen is a tumour stroma-derived biomarker for pancreas cancer. *Br. J. Cancer* 101, 91–97.
- Öhlund, D., Franklin, O., Lundberg, E., Lundin, C., and Sund, M. (2013). Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC Cancer* 13, 154.
- Öhlund, D., Elyada, E., and Tuveson, D. (2014). Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med* 211, 1503–1523.
- Öhlund, D., Handly-Santana, A., Biffi, G., Elyada, E., Almeida, A.S., Ponz-Sarvisse, M., Corbo, V., Oni, T.E., Hearn, S.A., Lee, E.J., et al. (2017). Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.*
- Olivares, O., Mayers, J.R., Gouirand, V., Torrence, M.E., Gicquel, T., Borge, L., Lac, S., Roques, J., Lavaut, M.-N., Berthezène, P., et al. (2017). Collagen-derived proline promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell survival under nutrient limited conditions. *Nat Commun* 8.
- Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., et al. (2009). Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science (New York, N.Y.)* 324, 1457.
- Olson, O.C., Kim, H., Quail, D.F., Foley, E.A., and Joyce, J.A. (2017). Tumor-Associated Macrophages Suppress the Cytotoxic Activity of Antimitotic Agents. *Cell Rep* 19, 101–113.
- Omary, M.B., Lugea, A., Lowe, A.W., and Pandol, S.J. (2007). The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest* 117, 50–59.

- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335–348.
- Ouyang, H., Gore, J., Deitz, S., and Korc, M. (2014). microRNA-10b enhances pancreatic cancer cell invasion by suppressing TIP30 expression and promoting EGF and TGF- $\beta$  actions. *Oncogene* 33, 4664–4674.
- Ouzounova, M., Lee, E., Piranlioglu, R., Andaloussi, A.E., Kolhe, R., Demirci, M.F., Marasco, D., Asm, I., Chadli, A., Hassan, K.A., et al. (2017). Monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells differentially regulate spatiotemporal tumour plasticity during metastatic cascade. *Nature Communications* 8, 14979.
- Overacre-Delgoffe, A.E., Chikina, M., Dadey, R.E., Yano, H., Brunazzi, E.A., Shayan, G., Horne, W., Moskovitz, J.M., Kolls, J.K., Sander, C., et al. (2017). Interferon- $\gamma$  Drives Treg Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell* 169, 1130-1141.e11.
- Özdemir, B.C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J.L., Zheng, X., Wu, C.-C., Simpson, T.R., Laklai, H., Sugimoto, H., Kahlert, C., Novitskiy, S.V., et al. (2014). Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 25, 719–734.
- Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, S., Martín, M., Castellanos, A., Attolini, C.S.-O., Berenguer, A., Prats, N., Toll, A., Hueto, J.A., et al. (2017). Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature* 541, 41–45.
- Patel, Y.C. (1999). Somatostatin and Its Receptor Family. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20, 157–198.
- Pein, M., and Oskarsson, T. (2015). Microenvironment in metastasis: roadblocks and supportive niches. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 309, C627–C638.
- Peinado, H., Zhang, H., Matei, I.R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R.N., Bromberg, J.F., Kang, Y., et al. (2017). Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nature Reviews Cancer* 17, 302–317.
- Peixoto, R.D., Ho, M., Renouf, D.J., Lim, H.J., Gill, S., Ruan, J.Y., and Cheung, W.Y. (2017). Eligibility of Metastatic Pancreatic Cancer Patients for First-Line Palliative Intent nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine Versus FOLFIRINOX. *Am. J. Clin. Oncol.* 40, 507–511.
- Pergamo, M., and Miller, G. (2017). Myeloid-derived suppressor cells and their role in pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther.* 24, 100–105.
- Philip, P.A., Benedetti, J., Corless, C.L., Wong, R., O'Reilly, E.M., Flynn, P.J., Rowland, K.M., Atkins, J.N., Mirtsching, B.C., Rivkin, S.E., et al. (2010). Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205. *J. Clin. Oncol.* 28, 3605–3610.
- Pickup, M.W., Mouw, J.K., and Weaver, V.M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 15, 1243–1253.
- Poruk, K.E., Firpo, M.A., Adler, D.G., and Mulvihill, S.J. (2013). Screening for pancreatic cancer: why, how, and who? *Ann. Surg.* 257, 17–26.

- Posey, A.D., Schwab, R.D., Boesteanu, A.C., Steentoft, C., Mandel, U., Engels, B., Stone, J.D., Madsen, T.D., Schreiber, K., Haines, K.M., et al. (2016). Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer-Associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma. *Immunity* 44, 1444–1454.
- Pothula, S.P., Xu, Z., Goldstein, D., Biankin, A.V., Pirola, R.C., Wilson, J.S., and Apte, M.V. (2016). Hepatocyte growth factor inhibition: a novel therapeutic approach in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 114, 269–280.
- Pothula, S.P., Xu, Z., Goldstein, D., Merrett, N., Pirola, R.C., Wilson, J.S., and Apte, M.V. (2017). Targeting the HGF/c-MET pathway: stromal remodelling in pancreatic cancer. *Oncotarget* 8, 76722–76739.
- Priceman, S.J., Sung, J.L., Shaposhnik, Z., Burton, J.B., Torres-Collado, A.X., Moughon, D.L., Johnson, M., Lusic, A.J., Cohen, D.A., Iruela-Arispe, M.L., et al. (2010). Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood* 115, 1461–1471.
- Provenzano, P.P., Cuevas, C., Chang, A.E., Goel, V.K., Von Hoff, D.D., and Hingorani, S.R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21, 418–429.
- Psaila, B., and Lyden, D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat. Rev. Cancer* 9, 285–293.
- Pyonteck, S.M., Akkari, L., Schuhmacher, A.J., Bowman, R.L., Sevenich, L., Quail, D.F., Olson, O.C., Quick, M.L., Huse, J.T., Teijeiro, V., et al. (2013). CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* 19, 1264–1272.
- Pyronnet, S., Bousquet, C., Najib, S., Azar, R., Laklai, H., and Susini, C. (2008). Antitumor effects of somatostatin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286, 230–237.
- Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder, L.A., and Pollard, J.W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475, 222–225.
- Quail, D.F., Bowman, R.L., Akkari, L., Quick, M.L., Schuhmacher, A.J., Huse, J.T., Holland, E.C., Sutton, J.C., and Joyce, J.A. (2016). The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas. *Science* 352, aad3018.
- Quaranta, V., Rainer, C., Nielsen, S.R., Raymant, M.L., Ahmed, M.S., Engle, D.D., Taylor, A., Murray, T., Campbell, F., Palmer, D.H., et al. (2018). Macrophage-Derived Granulin Drives Resistance to Immune Checkpoint Inhibition in Metastatic Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 78, 4253–4269.
- Rai, U., Thrimawithana, T.R., Valery, C., and Young, S.A. (2015). Therapeutic uses of somatostatin and its analogues: Current view and potential applications. *Pharmacol. Ther.* 152, 98–110.
- Raj, D., Yang, M.-H., Rodgers, D., Hampton, E.N., Begum, J., Mustafa, A., Lorizio, D., Garces, I., Propper, D., Kench, J.G., et al. (2018). Switchable CAR-T cells mediate remission in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut*.
- Rawlings, J.S., Rosler, K.M., and Harrison, D.A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science* 117, 1281–1283.

- Rébé, C., Végran, F., Berger, H., and Ghiringhelli, F. (2013). STAT3 activation: A key factor in tumor immunoescape. *JAKSTAT* 2, e23010.
- Reichert, M., Bakir, B., Moreira, L., Pitarresi, J.R., Feldmann, K., Simon, L., Suzuki, K., Maddipati, R., Rhim, A.D., Schlitter, A.M., et al. (2018). Regulation of Epithelial Plasticity Determines Metastatic Organotropism in Pancreatic Cancer. *Dev. Cell* 45, 696-711.e8.
- Reiter, J.G., Makohon-Moore, A.P., Gerold, J.M., Heyde, A., Attiyeh, M.A., Kohutek, Z.A., Tokheim, C.J., Brown, A., DeBlasio, R.M., Niyazov, J., et al. (2018). Minimal functional driver gene heterogeneity among untreated metastases. *Science* 361, 1033–1037.
- Reymond, N., d'Água, B.B., and Ridley, A.J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer* 13, 858–870.
- Reynaert, H., Vaeyens, F., Qin, H., Hellems, K., Chatterjee, N., Winand, D., Quartier, E., Schuit, F., Urbain, D., Kumar, U., et al. (2001). Somatostatin suppresses endothelin-1-induced rat hepatic stellate cell contraction via somatostatin receptor subtype 1. *Gastroenterology* 121, 915–930.
- Reynaert, H., Rombouts, K., Jia, Y., Urbain, D., Chatterjee, N., Uyama, N., and Geerts, A. (2005). Somatostatin at nanomolar concentration reduces collagen I and III synthesis by, but not proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Br. J. Pharmacol.* 146, 77–88.
- Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., et al. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148, 349–361.
- Rhim, A.D., Oberstein, P.E., Thomas, D.H., Mirek, E.T., Palermo, C.F., Sastra, S.A., Dekleva, E.N., Saunders, T., Becerra, C.P., Tattersall, I.W., et al. (2014). Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 25, 735–747.
- Ries, C.H., Cannarile, M.A., Hoves, S., Benz, J., Wartha, K., Runza, V., Rey-Giraud, F., Pradel, L.P., Feuerhake, F., Klaman, I., et al. (2014). Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell* 25, 846–859.
- Roberts, N.J., Norris, A.L., Petersen, G.M., Bondy, M.L., Brand, R., Gallinger, S., Kurtz, R.C., Olson, S.H., Rustgi, A.K., Schwartz, A.G., et al. (2016). Whole Genome Sequencing Defines the Genetic Heterogeneity of Familial Pancreatic Cancer. *Cancer Discov* 6, 166–175.
- Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G., Zabaleta, J., Ortiz, B., Zea, A.H., Piazuelo, M.B., Delgado, A., Correa, P., Brayer, J., Sotomayor, E.M., et al. (2004). Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res.* 64, 5839–5849.
- Rogers, T.L., and Holen, I. (2011). Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *J Transl Med* 9, 177.
- Roife, D., Dai, B., Kang, Y., Perez, M.V.R., Pratt, M., Li, X., and Fleming, J.B. (2016). Ex Vivo Testing of Patient-Derived Xenografts Mirrors the Clinical Outcome of Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 22, 6021–6030.
- Ross, T.D., Coon, B.G., Yun, S., Baeyens, N., Tanaka, K., Ouyang, M., and Schwartz, M.A. (2013). Integrins In Mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol* 25, 613–618.



- Rowson-Hodel, A.R., Wald, J.H., Hatakeyama, J., O'Neal, W.K., Stonebraker, J.R., VanderVorst, K., Saldana, M.J., Borowsky, A.D., Sweeney, C., and Carraway, K.L. (2018). Membrane Mucin Muc4 promotes blood cell association with tumor cells and mediates efficient metastasis in a mouse model of breast cancer. *Oncogene* 37, 197–207.
- Saio, M., Radoja, S., Marino, M., and Frey, A.B. (2001). Tumor-infiltrating macrophages induce apoptosis in activated CD8(+) T cells by a mechanism requiring cell contact and mediated by both the cell-associated form of TNF and nitric oxide. *J. Immunol.* 167, 5583–5593.
- Samuel, M.S., Lopez, J.I., McGhee, E.J., Croft, D.R., Strachan, D., Timpson, P., Munro, J., Schröder, E., Zhou, J., Brunton, V.G., et al. (2011). Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and  $\beta$ -catenin activation to induce interfollicular epidermal hyperplasia and tumor growth. *Cancer Cell* 19, 776–791.
- Sanborn, J.Z., Chung, J., Purdom, E., Wang, N.J., Kakavand, H., Wilmott, J.S., Butler, T., Thompson, J.F., Mann, G.J., Haydu, L.E., et al. (2015). Phylogenetic analyses of melanoma reveal complex patterns of metastatic dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 10995–11000.
- Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnajatic, S., Ambrosone, C., et al. (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 18538–18543.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., Wetering, M. van de, Barker, N., Stange, D.E., Es, J.H. van, Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt&#150;villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.
- Sato, T., Stange, D.E., Ferrante, M., Vries, R.G.J., Van Es, J.H., Van den Brink, S., Van Houdt, W.J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P.D., et al. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141, 1762–1772.
- Sausen, M., Phallen, J., Adleff, V., Jones, S., Leary, R.J., Barrett, M.T., Anagnostou, V., Parpart-Li, S., Murphy, D., Li, Q.K., et al. (2015). Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat Commun* 6, 7686.
- Schally, A.V., Huang, W.Y., Chang, R.C., Arimura, A., Redding, T.W., Millar, R.P., Hunkapiller, M.W., and Hood, L.E. (1980). Isolation and structure of pro-somatostatin: a putative somatostatin precursor from pig hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 4489–4493.
- Scharfmann, R., Xiao, X., Heimberg, H., Mallet, J., and Ravassard, P. (2008). Beta cells within single human islets originate from multiple progenitors. *PLoS ONE* 3, e3559.
- Schneiderhan, W., Diaz, F., Fundel, M., Zhou, S., Siech, M., Hasel, C., Möller, P., Gschwend, J.E., Seufferlein, T., Gress, T., et al. (2007). Pancreatic stellate cells are an important source of MMP-2 in human pancreatic cancer and accelerate tumor progression in a murine xenograft model and CAM assay. *J. Cell. Sci.* 120, 512–519.
- Schönhuber, N., Seidler, B., Schuck, K., Veltkamp, C., Schachtler, C., Zukowska, M., Eser, S., Feyerabend, T.B., Paul, M.C., Eser, P., et al. (2014). A next-generation dual-recombinase system for time and host specific targeting of pancreatic cancer. *Nat Med* 20, 1340–1347.

- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565–1570.
- Schultheis, B., Reuter, D., Ebert, M.P., Siveke, J., Kerkhoff, A., Berdel, W.E., Hofheinz, R., Behringer, D.M., Schmidt, W.E., Goker, E., et al. (2017). Gemcitabine combined with the monoclonal antibody nimotuzumab is an active first-line regimen in KRAS wildtype patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a multicenter, randomized phase IIb study. *Ann Oncol* 28, 2429–2435.
- Sharma, K., Patel, Y.C., and Srikant, C.B. (1996). Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Mol. Endocrinol.* 10, 1688–1696.
- Shaul, M.E., and Fridlender, Z.G. Cancer related circulating and tumor-associated neutrophils – subtypes, sources and function. *The FEBS Journal* 0.
- Sheahan, A.V., Biankin, A.V., Parish, C.R., and Khachigian, L.M. (2018). Targeted therapies in the management of locally advanced and metastatic pancreatic cancer: a systematic review. *Oncotarget* 9, 21613–21627.
- Sherman, M.H., Yu, R.T., Engle, D.D., Ding, N., Atkins, A.R., Tiriack, H., Collisson, E.A., Connor, F., Van Dyke, T., Kozlov, S., et al. (2014). Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell* 159, 80–93.
- Shi, Q., and Boettiger, D. (2003). A novel mode for integrin-mediated signaling: tethering is required for phosphorylation of FAK Y397. *Mol. Biol. Cell* 14, 4306–4315.
- Shintani, Y., Hollingsworth, M.A., Wheelock, M.J., and Johnson, K.R. (2006). Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Res.* 66, 11745–11753.
- Shiozawa, Y., Berry, J.E., Eber, M.R., Jung, Y., Yumoto, K., Cackowski, F.C., Yoon, H.J., Parsana, P., Mehra, R., Wang, J., et al. (2016). The marrow niche controls the cancer stem cell phenotype of disseminated prostate cancer. *Oncotarget* 7, 41217–41232.
- Sideras, K., Braat, H., Kwekkeboom, J., van Eijck, C.H., Peppelenbosch, M.P., Sleijfer, S., and Bruno, M. (2014). Role of the immune system in pancreatic cancer progression and immune modulating treatment strategies. *Cancer Treat. Rev.* 40, 513–522.
- Singh, B.N., Fu, J., Srivastava, R.K., and Shankar, S. (2011). Hedgehog Signaling Antagonist GDC-0449 (Vismodegib) Inhibits Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics: Molecular Mechanisms. *PLOS ONE* 6, e27306.
- Sosa, M.S., Bragado, P., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2014). Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* 14, 611–622.
- Steding, C.E., Wu, S., Zhang, Y., Jeng, M.-H., Elzey, B.D., and Kao, C. (2011). The role of interleukin-12 on modulating myeloid-derived suppressor cells, increasing overall survival and reducing metastasis. *Immunology* 133, 221–238.
- Steele, C.W., Karim, S.A., Leach, J.D.G., Bailey, P., Upstill-Goddard, R., Rishi, L., Foth, M., Bryson, S., McDaid, K., Wilson, Z., et al. (2016). CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*.

- Stoecklein, N.H., Hosch, S.B., Bezler, M., Stern, F., Hartmann, C.H., Vay, C., Siegmund, A., Scheunemann, P., Schurr, P., Knoefel, W.T., et al. (2008). Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell* 13, 441–453.
- Stokes, J.B., Adair, S.J., Slack-Davis, J.K., Walters, D.M., Tilghman, R.W., Hershey, E.D., Lowrey, B., Thomas, K.S., Bouton, A.H., Hwang, R.F., et al. (2011). Inhibition of focal adhesion kinase by PF-562,271 inhibits the growth and metastasis of pancreatic cancer concomitant with altering the tumor microenvironment. *Mol. Cancer Ther.* 10, 2135–2145.
- Stoletov, K., Willetts, L., Paproski, R.J., Bond, D.J., Raha, S., Jovel, J., Adam, B., Robertson, A.E., Wong, F., Woolner, E., et al. (2018). Quantitative in vivo whole genome motility screen reveals novel therapeutic targets to block cancer metastasis. *Nat Commun* 9, 2343.
- Strachan, D.C., Ruffell, B., Oei, Y., Bissell, M.J., Coussens, L.M., Pryer, N., and Daniel, D. (2013). CSF1R inhibition delays cervical and mammary tumor growth in murine models by attenuating the turnover of tumor-associated macrophages and enhancing infiltration by CD8+ T cells. *Oncoimmunology* 2, e26968.
- Stromnes, I.M., Brockenbrough, J.S., Izeradjene, K., Carlson, M.A., Cuevas, C., Simmons, R.M., Greenberg, P.D., and Hingorani, S.R. (2014). Targeted depletion of an MDSC subset unmasks pancreatic ductal adenocarcinoma to adaptive immunity. *Gut* 63, 1769–1781.
- Stromnes, I.M., Schmitt, T.M., Hulbert, A., Brockenbrough, J.S., Nguyen, H.N., Cuevas, C., Dotson, A.M., Tan, X., Hotes, J.L., Greenberg, P.D., et al. (2015). T Cells Engineered against a Native Antigen Can Surmount Immunologic and Physical Barriers to Treat Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 28, 638–652.
- Su, S., Chen, J., Yao, H., Liu, J., Yu, S., Lao, L., Wang, M., Luo, M., Xing, Y., Chen, F., et al. (2018). CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell* 172, 841-856.e16.
- SUBRAMANI, R., GANGWANI, L., NANDY, S.B., ARUMUGAM, A., CHATTOPADHYAY, M., and LAKSHMANASWAMY, R. (2015). Emerging roles of microRNAs in pancreatic cancer diagnosis, therapy and prognosis (Review). *Int J Oncol* 47, 1203–1210.
- Suleiman, Y., Mahipal, A., Shibata, D., Siegel, E.M., Jump, H., Fulp, W.J., Springett, G.M., and Kim, R. (2015). Phase I study of combination of pasireotide LAR + gemcitabine in locally advanced or metastatic pancreatic cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 76, 481–487.
- Susini, C., and Buscail, L. (2006). Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Ann. Oncol.* 17, 1733–1742.
- Suzuki, K., Takano, S., Yoshitomi, H., Nishino, H., Kagawa, S., Shimizu, H., Furukawa, K., Miyazaki, M., and Ohtsuka, M. (2017). Metadherin promotes metastasis by supporting putative cancer stem cell properties and epithelial plasticity in pancreatic cancer. *Oncotarget* 8, 66098–66111.
- Tai, C.-J., Huang, M.-T., Wu, C.-H., Wang, C.-K., Tai, C.-J., Chang, C.-C., Hsieh, C.-I., Chang, Y.-J., Wu, C.-J., Kuo, L.-J., et al. (2016). Combination of Two Targeted Medications (Bevacizumab Plus Cetuximab) Improve the Therapeutic Response of Pancreatic Carcinoma. *Medicine (Baltimore)* 95, e3259.

- Takahashi, H., Sakakura, K., Kudo, T., Toyoda, M., Kaira, K., Oyama, T., and Chikamatsu, K. (2016). Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages. *Oncotarget*.
- Taki, M., Abiko, K., Baba, T., Hamanishi, J., Yamaguchi, K., Murakami, R., Yamanoi, K., Horikawa, N., Hosoe, Y., Nakamura, E., et al. (2018). Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation. *Nat Commun* 9, 1685.
- Tape, C.J., Ling, S., Dimitriadi, M., McMahon, K.M., Worboys, J.D., Leong, H.S., Norrie, I.C., Miller, C.J., Poulgiannis, G., Lauffenburger, D.A., et al. (2016). Oncogenic KRAS Regulates Tumor Cell Signaling via Stromal Reciprocation. *Cell*.
- Teng, Y., Ross, J.L., and Cowell, J.K. (2014). The involvement of JAK-STAT3 in cell motility, invasion, and metastasis. *JAKSTAT* 3.
- Theodoropoulou, M., and Stalla, G.K. (2013). Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol* 34, 228–252.
- Tipton, D.A., and Dabbous, M.K. (1998). Autocrine Transforming Growth Factor  $\beta$  Stimulation of Extracellular Matrix Production by Fibroblasts From Fibrotic Human Gingiva. *Journal of Periodontology* 69, 609–619.
- Tiriach, H., Belleau, P., Engle, D.D., Plenker, D., Deschênes, A., Somerville, T., Froeling, F.E.M., Burkhart, R.A., Denroche, R.E., Jang, G.-H., et al. (2018). Organoid profiling identifies common responders to chemotherapy in pancreatic cancer. *Cancer Discov*.
- Toste, P.A., Nguyen, A.H., Kadera, B.E., Duong, M., Wu, N., Gawlas, I., Tran, L.M., Bikhchandani, M., Li, L., Patel, S.G., et al. (2016). Chemotherapy-induced Inflammatory Gene Signature and Pro-tumorigenic Phenotype in Pancreatic CAFs via Stress-associated MAPK. *Mol Cancer Res* 14, 437–447.
- Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E.A., Rickman, B., Betz, K.S., Penz-Oesterreicher, M., Bjorkdahl, O., Fox, J.G., et al. (2008). Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell* 14, 408–419.
- Vakoc, C.R., and Tuveson, D.A. (2017). Soils and Seeds That Initiate Pancreatic Cancer Metastasis. *Cancer Discovery* 7, 1067–1068.
- Valastyan, S., and Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147, 275–292.
- Valkenburg, K.C., de Groot, A.E., and Pienta, K.J. (2018). Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 15, 366–381.
- Vennin, C., Chin, V.T., Warren, S.C., Lucas, M.C., Herrmann, D., Magenau, A., Melenec, P., Walters, S.N., del Monte-Nieto, G., Conway, J.R.W., et al. (2017). Transient tissue priming via ROCK inhibition uncouples pancreatic cancer progression, sensitivity to chemotherapy, and metastasis. *Sci Transl Med* 9.
- Vennin, C., Murphy, K.J., Morton, J.P., Cox, T.R., Pajic, M., and Timpson, P. (2018). Reshaping the Tumor Stroma for Treatment of Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 154, 820–838.

- Vlachogiannis, G., Hedayat, S., Vatsiou, A., Jamin, Y., Fernández-Mateos, J., Khan, K., Lampis, A., Eason, K., Huntingford, I., Burke, R., et al. (2018). Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science* 359, 920–926.
- Vonlaufen, A., Joshi, S., Qu, C., Phillips, P.A., Xu, Z., Parker, N.R., Toi, C.S., Pirola, R.C., Wilson, J.S., Goldstein, D., et al. (2008). Pancreatic Stellate Cells: Partners in Crime with Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res* 68, 2085–2093.
- Voskoglou-Nomikos, T., Pater, J.L., and Seymour, L. Clinical Predictive Value of the in Vitro Cell Line, Human Xenograft, and Mouse Allograft Preclinical Cancer Models. 14.
- Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.-M., Chang, D.K., Kassahn, K.S., Bailey, P., Johns, A.L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., et al. (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 518, 495–501.
- Waghray, M., Yalamanchili, M., Dziubinski, M., Zeinali, M., Erkkinen, M., Yang, H., Schradle, K.A., Urs, S., Pasca Di Magliano, M., Welling, T.H., et al. (2016). GM-CSF Mediates Mesenchymal-Epithelial Crosstalk in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.*
- Wang, H., Yu, C., Gao, X., Welte, T., Muscarella, A.M., Tian, L., Zhao, H., Zhao, Z., Du, S., Tao, J., et al. (2015a). The Osteogenic Niche Promotes Early-Stage Bone Colonization of Disseminated Breast Cancer Cells. *Cancer Cell* 27, 193–210.
- Wang, P., Chen, L., Zhang, J., Chen, H., Fan, J., Wang, K., Luo, J., Chen, Z., Meng, Z., and Liu, L. (2014). Methylation-mediated silencing of the miR-124 genes facilitates pancreatic cancer progression and metastasis by targeting Rac1. *Oncogene* 33, 514–524.
- Wang, X., Lee, S.O., Xia, S., Jiang, Q., Luo, J., Li, L., Yeh, S., and Chang, C. (2013). Endothelial cells enhance prostate cancer metastasis via IL-6→androgen receptor→TGF-β→MMP-9 signals. *Mol. Cancer Ther.* 12, 1026–1037.
- Wang, X., Luo, G., Zhang, K., Cao, J., Huang, C., Jiang, T., Liu, B., Su, L., and Qiu, Z. (2018). Hypoxic tumor-derived exosomal miR-301a mediates M2 macrophage polarization via PTEN/PI3Kγ to promote pancreatic cancer metastasis. *Cancer Res.*
- Wang, Y., Li, Z., Zheng, S., Zhou, Y., Zhao, L., Ye, H., Zhao, X., Gao, W., Fu, Z., Zhou, Q., et al. (2015b). Expression profile of long non-coding RNAs in pancreatic cancer and their clinical significance as biomarkers. *Oncotarget* 6, 35684–35698.
- Watson, J.C., Balster, D.A., Gebhardt, B.M., O’Dorisio, T.M., O’Dorisio, M.S., Espenan, G.D., Drouant, G.J., and Woltering, E.A. (2001). Growing vascular endothelial cells express somatostatin subtype 2 receptors. *Br. J. Cancer* 85, 266–272.
- Wculek, S.K., and Malanchi, I. (2015). Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature* 528, 413–417.
- Weber, C.K., Sommer, G., Michl, P., Fensterer, H., Weimer, M., Gansauge, F., Leder, G., Adler, G., and Gress, T.M. (2001). Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterology* 121, 657–667.
- Wehr, A.Y., Furth, E.E., Sangar, V., Blair, I.A., and Yu, K.H. (2011). Analysis of the Human Pancreatic Stellate Cell Secreted Proteome. *Pancreas* 40, 557–566.
- Weiss, G.J., Waypa, J., Blaydorn, L., Coats, J., McGahey, K., Sangal, A., Niu, J., Lynch, C.A., Farley, J.H., and Khemka, V. (2017). A phase Ib study of pembrolizumab plus chemotherapy in patients with advanced cancer (PembroPlus). *Br. J. Cancer* 117, 33–40.

- Welte, T., Kim, I.S., Tian, L., Gao, X., Wang, H., Li, J., Holdman, X.B., Herschkowitz, J.I., Pond, A., Xie, G., et al. (2016). Oncogenic mTOR signaling recruits myeloid-derived suppressor cells to promote tumor initiation. *Nat Cell Biol* *18*, 632–644.
- Whatcott, C.J., Diep, C.H., Jiang, P., Watanabe, A., LoBello, J., Sima, C., Hostetter, G., Shepard, H.M., Hoff, D.D.V., and Han, H. (2015a). Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* *21*, 3561–3568.
- Whatcott, C.J., Hanl, H., and Von Hoff, D.D. (2015b). Orchestrating the Tumor Microenvironment to Improve Survival for Patients With Pancreatic Cancer Normalization, Not Destruction. *Cancer J* *21*, 299–306.
- Wiehagen, K.R., Girgis, N.M., Yamada, D.H., Smith, A.A., Chan, S.R., Grewal, I.S., Quigley, M., and Verona, R.I. (2017). Combination of CD40 Agonism and CSF-1R Blockade Reconditions Tumor-Associated Macrophages and Drives Potent Antitumor Immunity. *Cancer Immunol Res* *5*, 1109–1121.
- Wieland, E., Rodriguez-Vita, J., Liebler, S.S., Mogler, C., Moll, I., Herberich, S.E., Espinet, E., Herpel, E., Menuchin, A., Chang-Claude, J., et al. (2017). Endothelial Notch1 Activity Facilitates Metastasis. *Cancer Cell* *31*, 355–367.
- Wight, T.N. (2002). Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 617–623.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science* *322*, 271–275.
- Witkiewicz, A.K., McMillan, E.A., Balaji, U., Baek, G., Lin, W.-C., Mansour, J., Mollae, M., Wagner, K.-U., Koduru, P., Yopp, A., et al. (2015). Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun* *6*, 6744.
- Wolpin, B.M., Rizzato, C., Kraft, P., Kooperberg, C., Petersen, G.M., Wang, Z., Arslan, A.A., Beane-Freeman, L., Bracci, P.M., Buring, J., et al. (2014). Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pancreatic cancer. *Nat. Genet.* *46*, 994–1000.
- Wörmann, S.M., Diakopoulos, K.N., Lesina, M., and Algül, H. (2014). The immune network in pancreatic cancer development and progression. *Oncogene* *33*, 2956–2967.
- Wu, Z.-Q., Brabletz, T., Fearon, E., Willis, A.L., Hu, C.Y., Li, X.-Y., and Weiss, S.J. (2012). Canonical Wnt suppressor, Axin2, promotes colon carcinoma oncogenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 11312–11317.
- Wyckoff, J.B., Wang, Y., Lin, E.Y., Li, J., Goswami, S., Stanley, E.R., Segall, J.E., Pollard, J.W., and Condeelis, J. (2007). Direct Visualization of Macrophage-Assisted Tumor Cell Intravasation in Mammary Tumors. *Cancer Res* *67*, 2649–2656.
- Xie, T., Huang, F.-J., Aldape, K.D., Kang, S.-H., Liu, M., Gershenwald, J.E., Xie, K., Sawaya, R., and Huang, S. (2006). Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis. *Cancer Res.* *66*, 3188–3196.
- Xie, Z., Chen, X., Li, J., Guo, Y., Li, H., Pan, X., Jiang, J., Liu, H., and Wu, B. (2016). Salivary HOTAIR and PVT1 as novel biomarkers for early pancreatic cancer. *Oncotarget* *7*, 25408–25419.

- Xu, Z., Vonlaufen, A., Phillips, P.A., Fiala-Beer, E., Zhang, X., Yang, L., Biankin, A.V., Goldstein, D., Pirola, R.C., Wilson, J.S., et al. (2010). Role of Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Cancer Metastasis. *Am J Pathol* *177*, 2585–2596.
- Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, R.H., Eshleman, J.R., Nowak, M.A., et al. (2010). Distant Metastasis Occurs Late during the Genetic Evolution of Pancreatic Cancer. *Nature* *467*, 1114–1117.
- Yadav, D.K., Bai, X., Yadav, R.K., Singh, A., Li, G., Ma, T., Chen, W., and Liang, T. (2018). Liquid biopsy in pancreatic cancer: the beginning of a new era. *Oncotarget* *9*, 26900–26933.
- Yan, P., Zhu, H., Yin, L., Wang, L., Xie, P., Ye, J., Jiang, X., and He, X. (2018). Integrin  $\alpha\beta6$  Promotes Lung Cancer Proliferation and Metastasis through Upregulation of IL-8-Mediated MAPK/ERK Signaling. *Transl Oncol* *11*, 619–627.
- Yang, X., Lin, Y., Shi, Y., Li, B., Liu, W., Yin, W., Dang, Y., Chu, Y., Fan, J., and He, R. (2016). FAP Promotes Immunosuppression by Cancer-Associated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment via STAT3–CCL2 Signaling. *Cancer Research* *76*, 4124–4135.
- Yardley, D.A. (2013). nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *J Control Release* *170*, 365–372.
- Yeo, S.-Y., Lee, K.-W., Shin, D., An, S., Cho, K.-H., and Kim, S.-H. (2018). A positive feedback loop bi-stably activates fibroblasts. *Nat Commun* *9*, 3016.
- Yi, J.M., Guzzetta, A.A., Bailey, V.J., Downing, S.R., Van Neste, L., Chiappinelli, K.B., Keeley, B.P., Stark, A., Herrera, A., Wolfgang, C., et al. (2013). Novel methylation biomarker panel for the early detection of pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* *19*, 6544–6555.
- Yook, J.I., Li, X.-Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H.S., Kim, N.H., Cha, S.Y., Ryu, J.K., Choi, Y.J., Kim, J., et al. (2006). A Wnt-Axin2-GSK3 $\beta$  cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1398–1406.
- Youn, J.-I., and Gabrilovich, D.I. (2010). The biology of myeloid-derived suppressor cells: The blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol* *40*, 2969–2975.
- Yu, D.-L., Zhang, T., Wu, K., Li, Y., Wang, J., Chen, J., Li, X.-Q., Peng, X.-G., Wang, J.-N., and Tan, L.-G. (2017a). MicroRNA-448 suppresses metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma through targeting JAK1/STAT3 pathway. *Oncol. Rep.* *38*, 1075–1082.
- Yu, M., Ting, D.T., Stott, S.L., Wittner, B.S., Ozsolak, F., Paul, S., Ciciliano, J.C., Smas, M.E., Winokur, D., Gilman, A.J., et al. (2012a). RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis. *Nature* *487*, 510–513.
- Yu, X., Ji, S., Xu, J., Yao, W., Qu, B., Zhu, W., Xu, W., Zhang, B., and Xu, Y. (2012b). CD8<sup>+</sup> T Cells Are Compromised In Human Pancreatic Cancer. *Translational Medicine* *2*, 1–4.
- Yu, Y.X., Wu, H.J., Tan, B.X., Qiu, C., and Liu, H.Z. (2017b). CSF-1R regulates non-small cell lung cancer cells dissemination through Wnt3a signaling. *Am J Cancer Res* *7*, 2144–2156.
- Zhang, A., Qian, Y., Ye, Z., Chen, H., Xie, H., Zhou, L., Shen, Y., and Zheng, S. (2017). Cancer-associated fibroblasts promote M2 polarization of macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Med* *6*, 463–470.

- Zhao, Y., Sun, J., Zhang, H., Guo, S., Gu, J., Wang, W., Tang, N., Zhou, X., and Yu, J. (2014). High-frequency aberrantly methylated targets in pancreatic adenocarcinoma identified via global DNA methylation analysis using methylCap-seq. *Clin Epigenetics* 6, 18.
- Zheng, Y., and Lu, Z. (2009). Paradoxical roles of FAK in tumor cell migration and metastasis. *Cell Cycle* 8, 3474–3479.
- Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.-C., LeBleu, V.S., and Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 527, 525–530.
- Zhi, Y.-H., Song, M.-M., Wang, P.-L., Zhang, T., and Yin, Z.-Y. (2009). Suppression of matrix metalloproteinase-2 via RNA interference inhibits pancreatic carcinoma cell invasiveness and adhesion. *World J. Gastroenterol.* 15, 1072–1078.
- Zhong, Y., Macgregor-Das, A., Saunders, T., Whittle, M.C., Makohon-Moore, A., Kohutek, Z.A., Poling, J., Herbst, B.T., Javier, B.M., Cope, L., et al. (2017). Mutant p53 Together with TGF $\beta$  Signaling Influence Organ-Specific Hematogenous Colonization Patterns of Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* 23, 1607–1620.
- Zhou, B., Xu, J.-W., Cheng, Y.-G., Gao, J.-Y., Hu, S.-Y., Wang, L., and Zhan, H.-X. (2017). Early detection of pancreatic cancer: Where are we now and where are we going? *Int. J. Cancer* 141, 231–241.
- Zhu, Y., Knolhoff, B.L., Meyer, M.A., Nywening, T.M., West, B.L., Luo, J., Wang-Gillam, A., Goedegebuure, S.P., Linehan, D.C., and DeNardo, D.G. (2014). CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res.* 74, 5057–5069.
- Zhu, Y., Herndon, J.M., Sojka, D.K., Kim, K.-W., Knolhoff, B.L., Zuo, C., Cullinan, D.R., Luo, J., Bearden, A.R., Lavine, K.J., et al. (2017). Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity* 47, 323-338.e6.
- Zou, Y., Li, J., Chen, Z., Li, X., Zheng, S., Yi, D., Zhong, A., and Chen, J. (2015). miR-29c suppresses pancreatic cancer liver metastasis in an orthotopic implantation model in nude mice and affects survival in pancreatic cancer patients. *Carcinogenesis* 36, 676–684.
- Zwenger, A., Rabassa, M., Demichelis, S., Grossman, G., Segal-Eiras, A., and Croce, M.V. (2014). High expression of sLex associated with poor survival in Argentinian colorectal cancer patients. *Int. J. Biol. Markers* 29, e30-39.





# ANNEXES

## Pancreatic cancer cell invasion: mesenchymal switch or just hitchhiking?

Rémi Samain, Christine Jean, Corinne Bousquet

INSERM U1037, Cancer Research Center of Toulouse, University Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

Correspondence to: Corinne Bousquet, INSERM U1037, Cancer Research Center of Toulouse, 2 Avenue Hubert Curien, Oncopôle Entrée C, CS53717, 31037 Toulouse cedex1, France. Email: corinne.bousquet@inserm.fr

Submitted Oct 17, 2016, Accepted for publication Oct 31, 2016.

doi: 10.21037/tcr.2016.11.09

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/tcr.2016.11.09>

For the majority of pancreatic cancer patients, metastatic spread is the most life-threatening issue, significantly shortening survival (1). Yet, the road for a cancer cell to successfully set its metastatic niche and to grow there is fortunately long and sown with pitfalls. Consistently, the estimated time for pancreatic cancer patients to develop a widely disseminated disease through subclonal metastatic evolution from a parental clone inside the primary carcinoma is 6.8-year, as recently reported (2). To the important question of whether the poor prognosis of pancreatic cancer is due to its late diagnosis, or because it metastasizes early during clonal evolution, Yachida *et al.* indeed answered that there is a long latency to development of an infiltrating cancer, and thus a large window of opportunity for early diagnosis and cure. Yet, until early detection of pancreatic cancer becomes routine, the reality is that most patients will likely continue to be diagnosed with advanced disease, as recently mathematically predicted through a comprehensive study that benefited from a large group of patient's autopsy data (3).

Subclonal metastatic evolution implies gain of (epi)genetic heterogeneity that may arise from preexistent small populations of cancer stem cells that continuously give rise to genetically diverse populations of non-tumorigenic cells (4), as lately evidenced in pancreatic cancer (5). As epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) seems a robust feature that arises during pancreatic cancer progression (6,7), even if recently reconsidered (8), the probability of generating, through the EMT program, highly tumorigenic cells capable of self-renewal and of repopulation of all phenotypic progeny present within the neoplasm (9), is plausible. The EMT is a reprogramming phase giving to

epithelial cells not only features of stemness, but above all of motility and invasiveness, properties required to successfully accomplish their metastasis route. Mesenchymal traits are acquired at the expense of epithelial markers which are lost through transcriptional and/or epigenetic repression. Whether this phenotypic switch is irreversible, or subjected to constant reversibility considering that both epithelial and mesenchymal markers have been found in a same cell, is under intense debate (10). Oversimplification would be dangerous and one imagines that the picture is not unique, since (I) the high cellular and molecular heterogeneity of pancreatic tumor confers robust plasticity; (II) the stresses that pancreatic tumors are facing during their metastatic cascade or disease treatment history (e.g., stroma-derived, mechanical, hypoxia, genotoxic) select the most adapted subclones, and EMT seems a prerequisite. Nevertheless, the epithelial phenotype of metastases has shed the light on the reverse transition, i.e., mesenchymal-to-epithelial transition (MET), putatively occurring in the metastatic cancer cells that may have previously lost their epithelial phenotype to acquire metastatic skills, MET giving them back their proliferative properties required for efficient metastatic outgrowth.

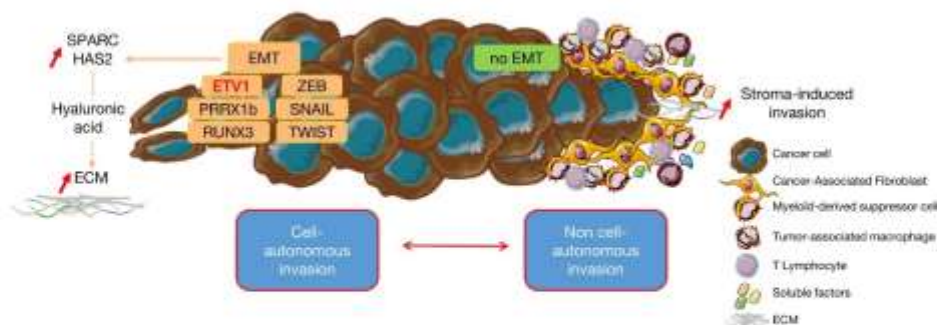
EMT is driven by a family of transcription factors, mainly of ZEB, SNAIL and TWIST families, that in a multi-stage process remodel epithelial cell architecture, for the acquisition of increased cell migration, invasion and survival. Lineage tracing experiments in genetically engineered mouse models (GEMMs) have revealed that EMT occurs early during the pancreatic disease evolution (7). Indeed, circulating tumor cells with acquired mesenchymal traits enabling their migration/invasion into the blood flow, yet incapable of establishing metastases, are delaminated from

the primary neoplasm as soon as precancerous lesions are present. Nevertheless, two recent studies on breast and pancreatic cancer suggested that EMT, although critical for tumor cells to acquire chemoresistance features, is dispensable for a tumor to metastasize (8,11). Those studies reopened the debate on the need "to be mesenchymal or not" during the cell metastatic cascade. Although Zheng *et al.* upon conditional deletion of the transcription factors *twist* or *snail* genes in a pancreatic cancer GEMM background, still observed as many metastases in those conditions as in the parental model, with metastatic cells keeping their epithelial features (E-cadherin expression) (8), one can envision that, in this model, partial EMT is present owing to compensatory mechanisms driving mesenchymal switch. Consistently, other transcription factors have been reported to do the job.

Recently, Heeg *et al.* reported that the expression of the ETS-transcription factor ETV1, which is essential for mesenchymal differentiation and stromal tissue identity during pancreatic branching morphogenesis, is progressively induced during the pancreatic ductal carcinogenesis sequence from preinvasive [pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)] to invasive/metastatic lesions (12). Then, they showed that ETV1 is critical for stromal expansion and metastatic progression of pancreatic tumors. To do so, they used pancreatic ductal cells isolated from invasive lesions in GEMM (Pdx1Cre;*Kras*<sup>G12D/+</sup>; *p53*<sup>0/+</sup>, named KPC), that could be traced owing to the expression of reporter proteins (YFP or dTomato), and in which they overexpressed ETV1. Orthotopic graft of ETV1-overexpressing cells in immunodeficient mice increased, as compared to parental mock cells, primary tumor growth *via* stroma expansion, and metastasis development. Interestingly, ETV1 overexpression provided to epithelial cells mesenchymal and metastatic features, in association with loss of E-cadherin expression, with upregulation of the matricellular protein SPARC expression, and with deposition of hyaluronic acid. The regulation by ETV1 was transcriptional, through direct activation of *sparc* and hyaluronic synthase 2 (*hst2*) promoter activities. Interestingly, SPARC was expressed in YFP-positive tumor cells, suggesting a direct molecular link with ETV1. *Sparc* knockout in ETV1-overexpressing KPC cells functionally abrogated their potential, upon orthotopic graft in mice, to form stroma-rich tumors and to metastasize (although some SPARC was still detectable in the host stroma), placing SPARC as an autonomous functional target of ETV1 pro-metastatic effect in cancer cells. Altogether, these results place the transcription factor ETV1 as a novel driver of mesenchymal traits in pancreatic tumor cells, and

tumor cell-derived SPARC as its direct functional effector. Whether this transcription factor is indeed a master regulator of stroma expansion and metastasis driven by KPC cells that endogenously present a 184-fold increase of ETV1, as compared to normal pancreatic ductal cells, is currently under investigation using conditional invalidation of *etv1* in the KPC background. First results confirm that ETV1 is indeed involved but not as dramatically as expected, suggesting that activation of other pathway(s) may compensate for ETV1 absence. Unraveling one mechanism for hyaluronic acid production in pancreatic tumors (via HAS2 regulation by ETV1) is of high therapeutic interest since this matrix glycosaminoglycan is responsible for mechanic stresses that result in vascular collapse and subsequent reduced perfusion of these tumors (13). Enzymatic strategies aimed at alleviating hyaluronic acid to restore perfusion and help the diffusion of chemotherapies to tumor cells, are under clinical trials.

Redundancy of transcription factors that regulate the epithelial versus mesenchymal fate is multiple, suggesting that selection pressure during the subclonal metastatic evolution is high to keep this plasticity feature in the selected cancer clones. Among the panoply of transcription factors regulating EMT, the two major isoforms of the paired-related homeodomain transcription factor 1 (PRRX1), PRRX1a and PRRX1b, have recently been uncovered to play a role (14). Those transcription factors are up-regulated during ductal development, induction of acinar-to-ductal metaplasia, and evolution of PanINs. Strikingly, those splicing variants have opposite effects, i.e., EMT for PRRX1b (induction of invasion and tumor dedifferentiation), and MET for PRRX1a (stimulation of metastatic outgrowth in the liver and tumor differentiation), giving a first mechanistic information (through alternative splicing regulation between both isoforms) for the dynamic switch occurring between EMT and MET, observed in primary tumors *vs.* in metastases, respectively. The hepatocyte growth factor (HGF) was identified as a novel transcriptional target of PRRX1b explaining at least in part its mesenchymal-inducing effect, and therapeutic targeting of HGF in combination with gemcitabine was given as a promising strategy in a preclinical model of pancreatic cancer. Lastly, the transcription factor RUNX3 has been identified when comparing the expression profiles of non-metastatic versus metastatic pancreatic tumor cells that presented, in a KPC background, a mono-allelic loss of *smad4/dpc4*, versus wild-type or *smad4/dpc4* bi-allelic loss, respectively (15).



**Figure 1** Tumor cell invasion may involve either cell-autonomous events depending on partial or complete EMT, or non-cell-autonomous features including tumor cell hitchhiking on the stroma [e.g., cancer-associated fibroblasts (CAFs) (22)]. Whereas transcription factors of the ZEB, SNAIL, or TWIST families have been well-described in EMT, more recently described factors including ETV1 allow, in addition to repression of epithelial markers (E-cadherin), the direct transcription of genes that encode for ECM or that control ECM production (SPARC, hyaluronic acid) (12). HAS2, hyaluronic synthase 2; ECM, extracellular matrix; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; PRRX1, paired-related homeodomain transcription factor 1.

High RUNX3 expression explained cell differences in metastatic skills, mainly because RUNX3 can control both extracellular matrix (ECM) protein production (e.g., osteopontin, SPARC) and/or proliferation, depending on *smad4/dpc4* status, facilitating cell seeding and/or growth in the primary tumor and metastatic niches. This study is consistent with the two phenotypes of pancreatic cancer patients that differ not in their morphologic differences at diagnosis but in their metastatic efficiencies for which inactivation of *SMAD4*, and as a result loss of SMAD4 protein expression, is a marker (16). Surprisingly in this study, metastatic potential *in vivo*, and migration or invasive skills *in vitro*, were not reminiscent of E-cadherin expression loss, yet a conventional marker of EMT. These results suggested that loss of E-cadherin expression is not a sufficient marker to monitor "complete functional EMT", and that cell invasion and metastasis can co-exist with persistence of the epithelial phenotype (e.g., high E-cadherin expression).

Consistently, the induction of EMT with downregulation of E-cadherin expression is likely tunable, dependent on whether complete or partial EMT signaling is present. The EMT program is thought to be controlled by the tumor microenvironment, including by soluble factors released by stromal cells [e.g., cancer-associated fibroblasts (CAFs) (17,18) or tumor-associated macrophages (19,20)], mechanical (tumor stiffening) or metabolic stresses (hypoxia) (21), which locally downregulate epithelial

characteristics and facilitate cell escape from the primary tumor. However, with local upstream signaling lost, cells undergo MET reversion after metastatic seeding in the secondary organ (10). Yet likely indispensable during the metastatic process, the observed differences in EMT reprogramming, [i.e., induced in a cell-autonomous fashion through irreversible mesenchymal phenotype acquisition, or stroma-induced tunable and localized phenotypic switch (e.g., in leading cells of the invasive fronts)], may explain also the large differences observed in cell migration, individual in undifferentiated tumors, or collective in differentiated tumors where CAFs certainly help epithelial cancer cell clusters to crawl into the stroma (22) (Figure 1). These types of migration eventually co-exist in different regions of a same tumor, and are plastic such as during therapeutic stresses, probably explaining the difficulty to therapeutically target the metastatic process (23).

Nevertheless a common feature of cancer invading cells is their entwined required relationship with the stroma, that they may either directly produce through EMT reprogramming, as described by Heeg *et al.* (12), or interact with during collective yet highly efficient migration in which EMT may not be necessary.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Servier Medical Art for

their image bank used to create the illustrations.

**Funding:** CRCT team 6 is supported by LNCC (Ligue Nationale Contre le Cancer RAB09006BBA), the Cancerpole Grand Sud-Ouest (RMA04002BPA), the ANR (Agence Nationale pour la Recherche, project n°R06423BS), the Labex TOUCAN, the Fondation de France (2014 00047506), and the French National Institute of Cancer (INCa, PLBIO13-134 and PLBIO15-115). R Samain salary is funded by Fondation pour la Recherche Médicale (FRM40493).

#### Footnote

**Provenance:** This is a Guest Editorial commissioned by the Section Editor Xiaotian Sun (Department of Internal Medicine, Clinic of August First Film Studio, Beijing, China).

**Conflicts of Interest:** The authors have no conflicts of interest to declare.

**Comment on:** Heeg S, Das KK, Reichert M, et al. ETS-Transcription Factor ETV1 Regulates Stromal Expansion and Metastasis in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 2016;151:540-553.e14.

#### References

1. Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA. Evolution and dynamics of pancreatic cancer progression. *Oncogene* 2013;32:5253-60.
2. Yachida S, Jones S, Bozic I, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 2010;467:1114-7.
3. Haeno H, Gonen M, Davis MB, et al. Computational modeling of pancreatic cancer reveals kinetics of metastasis suggesting optimum treatment strategies. *Cell* 2012;148:362-75.
4. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 2012;21:283-96.
5. Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67:1030-7.
6. Iacobuzio-Donahue CA, Fu B, Yachida S, et al. DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:1806-13.
7. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 2012;148:349-61.
8. Zheng X, Carstens JL, Kim J, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 2015;527:525-30.
9. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704-15.
10. Diepenbruck M, Christofori G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? *Curr Opin Cell Biol* 2016;43:7-13.
11. Fischer KR, Durrans A, Lee S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 2015;527:472-6.
12. Heeg S, Das KK, Reichert M, et al. ETS-Transcription Factor ETV1 Regulates Stromal Expansion and Metastasis in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 2016;151:540-553.e14.
13. Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, et al. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012;21:418-29.
14. Reichert M, Takano S, von Burstin J, et al. The Prx1 homeodomain transcription factor plays a central role in pancreatic regeneration and carcinogenesis. *Genes Dev* 2013;27:288-300.
15. Whittle MC, Izeradjene K, Rani PG, et al. RUNX3 Controls a Metastatic Switch in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cell* 2015;161:1345-60.
16. Blackford A, Serrano OK, Wolfgang CL, et al. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:4674-9.
17. Moatassim-Billah S, Duluc C, Samain R, et al. Anti-metastatic potential of somatostatin analog SOM230: Indirect pharmacological targeting of pancreatic cancer-associated fibroblasts. *Oncotarget* 2016. [Epub ahead of print].
18. Duluc C, Moatassim-Billah S, Chalabi-Dehar M, et al. Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance. *EMBO Mol Med* 2015;7:735-53.
19. Harney AS, Arwert EN, Entenberg D, et al. Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2hi Macrophage-Derived VEGFA. *Cancer Discov* 2015;5:932-43.

20. Karnevi E, Rosendahl AH, Hilmersson KS, et al. Impact by pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer cell invasion: Adding a third dimension in vitro. *Exp Cell Res* 2016;346:206-15.
21. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:178-96.
22. Gaggioli C. Collective invasion of carcinoma cells: when the fibroblasts take the lead. *Cell Adh Migr* 2008;2:45-7.
23. Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 2011;147:992-1009.

**Cite this article as:** Samain R, Jean C, Bousquet C. Pancreatic cancer cell invasion: mesenchymal switch or just hitchhiking? *Transl Cancer Res* 2016;5(Suppl 6):S1093-S1097. doi: 10.21037/tcr.2016.11.09





