



HAL
open science

Chimiorésistance du cancer du pancréas : rôle de la transition épithéliomésenchymateuse et les voies de signalisation impliquées

Mehdi El Amrani

► To cite this version:

Mehdi El Amrani. Chimiorésistance du cancer du pancréas : rôle de la transition épithéliomésenchymateuse et les voies de signalisation impliquées. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS069 . tel-03529864

HAL Id: tel-03529864

<https://theses.hal.science/tel-03529864>

Submitted on 17 Jan 2022

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.

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE II

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE II

Discipline : Sciences de la vie et de la Santé

Présentée par

Mehdi EL AMRANI

**Chimiorésistance du cancer du pancréas : Rôle de la transition épithélio-
mésenchymateuse et les voies de signalisation impliquées.**

Thèse dirigée par Madame le Docteur Isabelle VAN SEUNINGEN

et Madame le Dr Guillemette HUET

Soutenue le 11 Décembre 2019

Devant le jury composé de :

Madame le Professeur Stéphanie Truant (Présidente)

Monsieur le Professeur Olivier Turrini (Examineur)

Monsieur le Docteur Kayvan Mohkam (Rapporteur)

Monsieur le Docteur Pierre Cordelier (Rapporteur)

Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen (Co-directrice)

Madame le Docteur Guillemette Huet (Co-directrice)

Remerciements

Cette Thèse a été effectuée au sein de l'équipe "Mucines, différenciation et cancérogenèse épithéliales" au Centre de recherche Jean-Pierre Aubert, UMR-S 1172 INSERM
- Université de Lille - CHRU de Lille

sous la direction scientifique de **Madame le Docteur Guillemette Huet et Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen**

Remerciements

Je tiens à remercier infiniment toutes les personnes qui ont participé de loin ou de près à ce travail de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement,

Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen, qui m'a encadré, soutenu et accueilli au sein de son équipe depuis mon master 2. Merci Isabelle pour tout ce que vous avez fait pour moi, c'est grâce à vous que cette thèse a pu aboutir.

Madame le Docteur Guillemette Huet pour son encadrement tout au long de ces années, ses conseils, sa disponibilité et son savoir faire. Guillemette, c'est en grande partie grâce à vous que j'ai décidé de continuer jusqu'au bout.

Madame le Professeur Truant de m'avoir confié ce travail et de m'avoir soutenu toutes ces années.

Les rapporteurs de mon jury de Thèse pour l'honneur qu'ils me font : **Monsieur le Docteur Pierre Cordelier** et **Monsieur le docteur Kayvan Mohkam**. Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Monsieur le Professeur Olivier Turrini, un imminent spécialiste du cancer du pancréas qui a bien voulu être examinateur malgré ses contraintes professionnelles.

Monsieur le Professeur François-René Pruvot, mon maître qui m'a accueilli dans son service et accompagné au quotidien depuis des années. Monsieur, au fil du temps, je me rends compte de tout ce que vous m'avez apporté. **Madame le Professeur Xuefen le Bourhis** et **Monsieur le Professeur Philippe Delannoy** pour leurs conseils pertinents, leurs directives et leur soutien pendant mes comités de suivi de Thèse.

Remerciements

Monsieur le Docteur Matthieu Corvaisier : Comment puis-je décrire la complicité, l'amitié et la solidarité que j'ai pu constater en travaillant avec toi. Les soirées passées au labo resteront dans ma mémoire autant que les fous rires... C'est grâce à toi que j'ai pu faire mes premières manip et c'est grâce à toi que j'ai su me dépasser. Je te suis très reconnaissant.

Monsieur le Docteur François Corfiotti : Merci François pour tout ce que t'as fait pour moi pendant mon master 1 et master 2. Tes idées brillantes ont fait avancer ce projet. Je te souhaite une bonne continuation dans ta nouvelle carrière.

Monsieur le Docteur Maxence Fulbert : Le chirurgien le plus gentil de la planète !!! Tu étais toujours présent pour me soutenir et très courageux pour me supporter !!! Merci beaucoup.

Je tiens également à remercier ,

Madame le docteur Fatima Lahdaoui, pour son soutien, son aide et ses encouragements au quotidien. Tu étais pour moi une sœur et une amie.

Monsieur le Docteur Romain Vasseur, pour sa disponibilité et son aide.

Madame le Docteur Audrey Vincent, **Monsieur le Docteur Michael Perrais** et **Monsieur le Docteur Nicolas Jonckheere**, de m'avoir apporté le soutien dans les moments difficiles.

À **Monsieur Mouloud Souidi**, **Madame Brigitte Hémon**, **Madame Kelly Gaudelot**, **Madame Marie-Paule Ducourouble**, **Madame Céline Schulz**, **Madame Belinda Duchêne**, **Monsieur Frederick De-Miollis** et à toute l'équipe.

Remerciements

Enfin,

Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents et ma femme qui me soutiennent au quotidien. Mes enfants, Sami, Sofia et Sarah ... je vous aime plus ce que tout.

Valorisation des travaux

Articles publiés

- Article de thèse

Mehdi El Amrani, François Corfiotti, Matthieu Corvaisier, Romain Vasseur, Maxence Fulbert, Cécile Skrzypczyk, Anne-Claire Deshorgues, Viviane Gnemmi, David Tulasne, Fatima Lahdaoui, Audrey Vincent, François-René Pruvot, Isabelle Van Seuningen, Guillemette Huet, Stéphanie Truant. *Gemcitabine-induced epithelial-mesenchymal transition-like changes sustain chemoresistance of pancreatic cancer cells of mesenchymal-like phenotype. Mol Carcinog* 2019.

- Article de recherche fondamentale

Matthieu Corvaisier, Marjolaine Bauzone, François Corfiotti, Florence Renaud, **Mehdi El Amrani**, Didier Monté, Stéphanie Truant, Emmanuelle Leteurtre, Pierre Formstecher, Isabelle Van Seuningen, Christian Gespach, Guillemette Huet. *Regulation of cellular quiescence by YAP/TAZ and Cyclin E1 in colon cancer cells: Implication in chemoresistance and cancer relapse. Oncotarget*, 2016

- Articles sur la thématique pancréas

Charles Poiraud, **Mehdi El Amrani**, Louise Barbier, Laurence Chiche, Jean Yves Mabrut, Philippe Bachellier, François-René Pruvot, Jean-Robert Delpero, Jean Jacques Tuech, Mustapha Adham, Alain Sauvanet, Olivier Turrini, Stéphanie Truant. *Total Pancreatectomy for Presumed Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. A Multicentric Study of the French Surgical Association (AFC). Ann Surg* 2018.

Mehdi El Amrani, Guillaume Clement, Xavier Lenne, Olivier Farges, Jean Robert Delpero, Didier Theis, François-René Pruvot, Stéphanie Truant. *Failure-to-rescue in Patients Undergoing Pancreatectomy: Is Hospital Volume a Standard for Quality Improvement Programs? Nationwide Analysis of 12,333 Patients. Ann Surg* 2018.

Mehdi El Amrani, Maxence Fulbert, Elodie Drumez, Guillaume Clément, François-René Pruvot, Stéphanie Truant. *Les complications des pancréatectomies impactent-elles les coûts hospitaliers ? Etude médico-économique sur 127 patients. Hospital costs of pancreatectomies in France. Medico-economic study on 127 patients. J Visc Surg* 2018.

Valorisation des travaux

Mehdi El Amrani, Mathilde Vermersch, Maxence Fulbert, Mathieu Prodeau, Katia Lecolle, Mohamed Hebbar, Olivier Ernst, François-René Pruvot, Stéphanie Truant. ***Impact of sarcopenia on outcomes of patients undergoing pancreatectomy: A retrospective analysis of 107 patients. Medicine 2018.***

Edouard Roussel , Guillaume Clement, Xavier Lenne, François-René Pruvot, Lilian Schwarz, Didier Theis, Stéphanie Truant, **Mehdi El Amrani**. ***Is Centralization Needed for Patients Undergoing Distal Pancreatectomy? A Nationwide Study of 3314 Patients. Pancreas 2019.***

Mehdi El Amrani, Anthony Turpin, François-René Pruvot. ***Minimum activity threshold for digestive cancer surgery in France: What are the issues? Bull Cancer 2019.***

Communications orales

- **2015** : *Implication de la transition épithélio-mésenchymateuse dans la chimiorésistance du cancer du pancréas. Congrès de l'Association Française de Chirurgie, Forum de recherche chirurgicale (Paris).*
- **2016** : *ETOP : Approche ex-vivo de la TEM dans l'adénocarcinome du pancréas. Réunion pancréas (Lille).*

Communications affichées

- **Club Français du Pancréas** (18-19 Septembre 2014, Paris)
- **Pancreatic Cancer Symposium** (18-30 Octobre 2015, Marseille)
- **Journée des doctorants "Journée André Verbert" de l'Ecole Doctorale de Lille** (28 Janvier 2015, Lille)

Résumé & Abstract

Résumé

Le cancer du pancréas constitue une véritable problématique de santé publique. Il est souvent diagnostiqué à des stades localement avancés ou métastatiques, limitant ainsi les possibilités d'une résection chirurgicale qui constitue le seul traitement éventuellement curatif. Malgré les progrès médico-chirurgicaux réalisés dans la prise en charge du cancer du pancréas, le pronostic reste sombre ne dépassant pas les 5% à 5 ans. De plus, les données récentes suggèrent une augmentation significative de l'incidence du cancer du pancréas qui va se poursuivre avec une hausse estimée à 29% en 2040 des les pays européens.

Plusieurs molécules de chimiothérapie sont utilisées dans le traitement du cancer du pancréas. La gemcitabine fait partie de cet arsenal thérapeutique mais son efficacité reste modérée avec la survenue précoce d'une chimiorésistance. Il a été récemment suggéré que la chimiorésistance des cellules cancéreuses pancréatiques pourrait être en relation avec leurs caractéristiques phénotypiques. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est caractérisée par la survenue de modifications morphologiques et phénotypiques permettant aux cellules cancéreuses d'acquérir des propriétés de cellules mésenchymateuses. Des travaux récents suggèrent l'implication de la TEM dans le phénomène de chimiorésistance du cancer du pancréas. Ainsi, l'étude du rôle de la TEM dans l'échappement à la chimiothérapie dans le cancer du pancréas est d'intérêt majeur. L'objectif de cette thèse est d'étudier l'émergence d'un phénotype de TEM au sein de populations cellulaires pancréatiques chimiorésistantes et d'étudier les principales voies de signalisation impliquées. La première partie de notre travail a consisté en la sélection de sous-populations chimiorésistantes dérivées des lignées cancéreuses pancréatiques BxPC-3 (Gem-BxPC-3), Capan-2 (Gem-Capan-2), Panc-1 (Gem-Capan-2) et MiaPaca-2 (Gem-MiaPaca-2), sous pression de la chimiothérapie

Résumé & Abstract

par gemcitabine. Les clones chimiorésistants Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2 ont acquis sous chimiothérapie des caractéristiques phénotypiques et morphologiques compatibles avec un phénomène de TEM. De plus, les capacités d'invasion des Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2 étaient significativement supérieures que celles des cellules parentales. A l'inverse, les Gem-BxPC-3 et Gem-Capan-2 gardait le même phénotype épithélial mis à part une diminution de l'expression de l'occludine. La suite de notre travail a consisté en l'étude des principales voies de signalisations associées à la chimiorésistance des cellules cancéreuses pancréatiques et leur implication dans la TEM. L'activation des voies de signalisation MEK/ERK et mTOR/AKT a été observée dans les lignées Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2. Inhibition pharmacologique de la voie MEK/ERK dans les lignées Gem-Pan-1 et Gem-MiaPaca-2 par le U0126 induisait non seulement une diminution de la chimiorésistance, mais également une réversion du phénomène de TEM avec une réexpression des marqueurs épithéliaux et une diminution de l'expression de ZEB-1. Afin d'étudier le rôle du répresseurs transcriptionnel ZEB-1 dans les cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2, nous avons utilisé des siRNA anti-ZEB-1 et étudié l'effet de ces siRNA sur la chimiorésistance et la TEM. Le siZEB-1 induisait une augmentation de la chimiosensibilité et une perte du phénotype TEM dans les cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2 suggérant que la chimiorésistance est corrélée à l'émergence d'un phénotype de TEM médié par ZEB-1.

Nos résultats sur une cohorte de patients opérés de cancer du pancréas a montre une corrélation entre l'expression de ZEB-1 et la chimiothérapie néoadjuvante.

En conclusion, Nos résultats suggèrent une corrélation entre la chimiorésistance des lignées cancéreuses pancréatiques et l'émergence d'un phénotype de TEM dont le principal acteur est ZEB-1.

Résumé & Abstract

Abstract

Pancreatic cancer is a major public health problem. The great majority of patients suffer from a locally advanced or metastatic stages. These patients are not candidates for surgery which considered the only potential curative treatment for pancreatic cancer. Despite recent progress, the 5-year survival rate for patients with pancreatic cancer does not exceed 5% for all stages. In addition, recent data suggest a significant increase in the incidence of pancreatic cancer (+ 29% in 2040 in Europe).

Gemcitabine is a one the main chemotherapeutic drug used for pancreatic cancer. However, this chemotherapy is often ineffective due to early chemoresistance of pancreatic cancer cells. It has been suggested that the chemoresistance of pancreatic cancer could be attributable to a specific subgroup of cells within the tumor having an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) phenotype. EMT is a characterized by the occurrence of morphological and phenotypic changes allowing tumor cells to acquire mesenchymal cell properties. Also, recent Data suggest the involvement of EMT in chemoresistance of pancreatic cancer. Thus, understanding the role of EMT in the escape of chemotherapy in pancreatic cancer is required. The aim of this study is to analyze the role of EMT in chemoresistance of pancreatic cancer cells and to identify signaling pathways involved in this phenomena. Chemoresistant cells of BxPC-3 (Gem-BxPC-3), Capan-2 (Gem-Capan-2), Panc-1 (Gem-Panc-1) and MiaPaca-2 (Gem-MiaPaca-2) were established using chronic exposure to gemcitabine. We show that gemcitabine-resistance induces differential EMT changes in Gem-Panc-1 and Gem- MiaPaca-2. However, gemcitabine-resistant BxPC-3 and Capan-2 cells did not show such typical EMT molecular changes although the expression of occludin could be

Résumé & Abstract

found decreased. The next step was to study of signaling pathways involved in chemoresistance and EMT in pancreatic cancer cells. We found that gemcitabine resistance is associated with activation of mTOR/AKT and MEK/ERK signaling pathways.

In addition, MEK1/2 inhibitor (U0126) significantly decreased the chemoresistant potential of Gem-Panc-1 and Gem-MiaPaca-2 cells and tended to reverse the mesenchymal phenotype toward an epithelial phenotype. Moreover, U0126 decreased the expression of ZEB-1 in both Gem-Panc-1 and Gem-MiaPaca-2 cells. To study the functional role of ZEB-1 in gemcitabine resistance, the expression of ZEB-1 was inhibited by RNA interference. Inhibition of ZEB-1 expression alleviated the mesenchymal phenotype and re-sensitized Gem-Panc-1 and Gem-MiaPaca-2 cells to gemcitabine. Our pathological study from patients with pancreatic cancer showed that high expression of ZEB-1 was correlated with neoadjuvant chemotherapy.

These findings support the involvement of EMT in the resistance to gemcitabine of pancreatic cancer cells.

Sommaire

Introduction	8
1. Le cancer du pancréas	8
1.1. Anatomie descriptive	8
1.2. Anatomie fonctionnelle	9
1.3. Histologie du pancréas	10
1.4. Classification histologique du cancer du pancréas	12
1.5. Les lésions précancéreuses du pancréas	16
1.6. Classification moléculaire du cancer du pancréas	22
1.7. Epidémiologie du cancer du pancréas	23
1.8. Facteurs de risque du cancer du pancréas	26
1.9. Diagnostic du cancer du pancréas	28
1.10. Classifications thérapeutiques du cancer du pancréas	30
1.11. Les principaux facteurs pronostiques du cancer du pancréas	33
1.12. Traitement du cancer du pancréas	34
1.13. Conclusion	44
2. Mécanismes de chimiorésistance du cancer du pancréas	45
2.1. Les facteurs génétiques	45
2.2. Les facteurs épigénétiques	48
2.3. Le métabolisme de la gemcitabine	50
2.4. Le micro-environnement tumoral	53
2.5. Conclusion	56
3. La transition épithélio-mésenchymateuse	57
3.1. Définition	57
3.2. La perte du phénotype épithélial	57
3.3. L'acquisition d'un phénotype mésenchymateux	65
3.4. La réversibilité du processus	72
3.5. Les régulateurs transcriptionnels de la TEM	74
3.6. Les principales voies de signalisation impliquées dans la TEM	83
3.7. Les différents types de TEM	93
4. Situation du sujet et objectifs du travail	96
Résultats	98
1. Etablissement de lignées cellulaires pancréatiques chimiorésistantes et caractérisation morphologique et phénotypique	98
1.1. Etablissement de lignées chimiorésistantes	98
1.2. Caractérisation morphologique des cellules chimiorésistantes	100

1.3.	Caractérisation phénotypique.....	103
1.4.	Les capacités d'invasion associées à la chimiorésistance	105
2.	Les principales voies de signalisation impliquées dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses pancréatiques et leur rôle dans la TEM	107
2.1.	Identification des voies de signalisation.....	107
2.2.	Implication des voies MEK/ERK et mTOR dans la chimiorésistance	109
2.3.	Implication de la voie MEK/ERK dans la TEM dans les lignées Panc-1 et MiaPaca-2.....	111
3.	Implication de ZEB-1 dans la TEM et la chimiorésistance des lignées Panc-1 et MiaPaca2.	113
3.1.	Impact du siZEB-1 sur l'expression des marqueurs de TEM.....	113
3.2.	Impact de ZEB-1 sur propriétés invasives des cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca2 .	115
3.3.	Effets du si-ZEB-1 sur la chimiorésistance des cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca2 .	116
4.	Etude immunohistochimique de l'expression de ZEB-1	117
	Discussion.....	122
	Perspectives	129
	Appendice technique.....	139
1.	Lignées cellulaires	139
A.	Lignée BxPC-3	139
B.	Lignée Capan-2	139
C.	Lignée Panc-1	139
D.	Lignée MiaPaca-2	140
2.	Culture cellulaire.....	140
3.	Test de viabilité cellulaire.....	141
4.	Inhibiteurs pharmacologiques	141
5.	Analyse de l'expression des transcrits	141
5.1.	Extraction d'ARN	141
5.2.	Rétro-transcription : synthèse d'ADN complémentaire (ADNc)	142
5.3.	qPCR.....	142
5.4.	Interprétation des résultats	143
6.	Analyse protéique.....	144
6.1.	Extraction protéique.....	144
6.2.	Western blot.....	144
7.	Etude de l'invasion cellulaire	146
8.	Invalidation transitoire de gènes par si-RNA.....	147
9.	Microscopie confocale.....	148
10.	Immunohistochimie.....	149
11.	Analyse statistique	150

Références..... 152

Liste des abréviations

5-FU : 5-FLUOROURACILE

ACE : antigène carcino-embryonnaire

ACP : Adénocarcinome canalaire pancréatique

AJCC : American Joint Committee on Cancer AJCC

APC : Adenomatous polyposis coli

aPKC: Atypical protein kinase

ARF: Alternative reading frame

Arp : Actin-related protein

bHLH : basic-helix-loop-helix

BID : Bcl-interacting death

BMP : Bone morphogenetic proteins

CA 19-9 : Carbohydrate Antigen 19-9

CAF : Fibroblastes associés au cancer

CBFA : CArG-binding factor-A

CDA : Cytidine désaminase

CDK : Cyclin-dependent kinase

CSC : Cellules souches cancéreuses

CTBP : C-Terminal Binding Protein

dCK : désoxycytidine kinase

DCTD : désoxycytidylate désaminase

dFdC : 2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine

dFdCDP : 2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine di-phosphate

dFdCTP : 2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine tri-phosphate

dFdU : désoxyfluorouridine

DFF : DNA fragmentation factor

Dhh : Desert Hedgehog

DNMT : ADN méthyltransférases

DPC : Duodéno pancréatectomie céphalique

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule
ERK : Extracellular signal regulated kinases
FAK : Focal adhesion Kinase
FGF: Fibroblast growth factor
FOX : Forkhead box
FSP1 : fibroblast-specific protein
GAP : GTPase Activating Proteine
GLI : Glioma-associated oncogene homolog
Grb2 : Growth receptor bound 2
GRG1 : Brahma-related gene-1
GSK3 β : Glycogen synthase kinase-3 β
hECN : human Concentrative Nucleoside Transporter
hENT : human Equilibrative Nucleoside Transporter
HES : Hairy-enhancer of split
HGF : Hepatocyte growth factor
HIF1 α : Hypoxia-inducible factor 1 α
HMGA2 : High mobility group A2
HRT : Hairy-related transcription factor
IAP : Integrin associated protein
ID: Inhibitor of differentiation
I κ B : Inhibitor of NF- κ B
JNK : Jun amino-terminal kinases
KAP1: KRAB-associated protein
KLF8: Krueppel-like factor
LEF : Lymphoid enhancer factor
Lgl : Lethal giant Larvae
LIMK : LIM domain kinase
LRP : Lipoprotein receptor-related protein
LRP : Low Density Lipoprotein-Related Protein
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MEC : Matrice extra-cellulaire

MEK : MAPK-ERK-Kinase

Met : Mesenchymal-epithelial transition factor

miR : micro-ARN

MKK : Mitogen-activated protein kinase kinase

MMP : Métalloprotéases de la matrice

mTOR : mammalian target of rapamycin

NCCN : National Comprehensive Cancer Network

NF-κB : nuclear factor-κB

NKD-1 : Naked cuticle homolog 1

PAK : p21-activated kinase

PALS1 : Protein associated with Lin-1

PanIN : Pancreatic intraepithelial neoplasia

PATJ : PALS1-associated tight-junction protein

PDGF : Platelet-derived growth factor

PDK1 : Phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1

PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase

PIP-2 : Phosphatidylinositol (4,5) Diphosphate

PIP-3 : Phosphatidylinositol (3, 4 5) Triphosphate

PKA : protein kinase A

PKC : protein kinase C

PLC : Phospholipase C

PRX1 : Paired-related homeobox

PTEN : Protéine phosphatase and tensin homolog

PTH(rP)R : parathyroid hormone related peptide receptor

RAPTOR : Regulatory-associated protein of mTOR

RICTOR : Rapamycin-insensitive companion of mTOR

RISC : RNA-induced silencing complex

ROCK : Rho-associated protein kinase

RR : Ribonucléotide réductase

RTK : Récepteurs tyrosines kinases

S6K1 : S6 kinase 1

SCF : Stem cell factor

Scrib : Scribble

SFK : SRC family kinase

Shc : Src homology2/ α -collagen

Shh : Sonic hedgehog

Smurf : Smad ubiquitination-regulatory factor

Sos : Son of sevenless

SOX : SRY box

SPARC : Secreted protein acidic and rich cystein

SPG : Spléno pancréatectomie gauche

STAT : Signal transducer and activator of transcription

TAK1 : Transforming growth factor beta-activated kinase

TAM : Tumor associated macrophage

TCF : T cell factor

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TGF β : Transforming growth factor β

TIPMP : Tumeurs intra-canalaires, papillaires et mucineuses du pancréas

TME : transition mésenchymato-épithéliale

TNM : Tumor-Node-Metastasis

TSC2 : Tuberous sclerosis complex-2

uPA : urokinase-type plasminogen activator

WAVE : WASP-family Verprolin-homologous protein

WIF-1 : Wnt inhibitory factor-1

XR11 : Xenopus Bcl-xL homologue

ZEB : Zinc E-box Binding factor

ZO : Zona Occludens

α -SMA : α -Smooth muscle actin

Introduction

1. Le cancer du pancréas

1.1. Anatomie descriptive

Le pancréas est un organe plein profondément situé dans la cavité abdominale (Agostini et al., 2013). L'essentiel du pancréas est en situation rétropéritonéale, séparé des organes intrapéritonéaux par le péritoine postérieur. Le pancréas est allongé selon un axe oblique en haut et à gauche en direction du hile splénique. Il est concave vers l'arrière et s'étend de la 12ème vertèbre thoracique et la 3ème vertèbre lombaire. Il mesure environ 20 cm pour une épaisseur de 2 cm et un poids entre 60 et 80 grammes. Le pancréas peut être séparé en 4 portions anatomiques (Figure 1) :

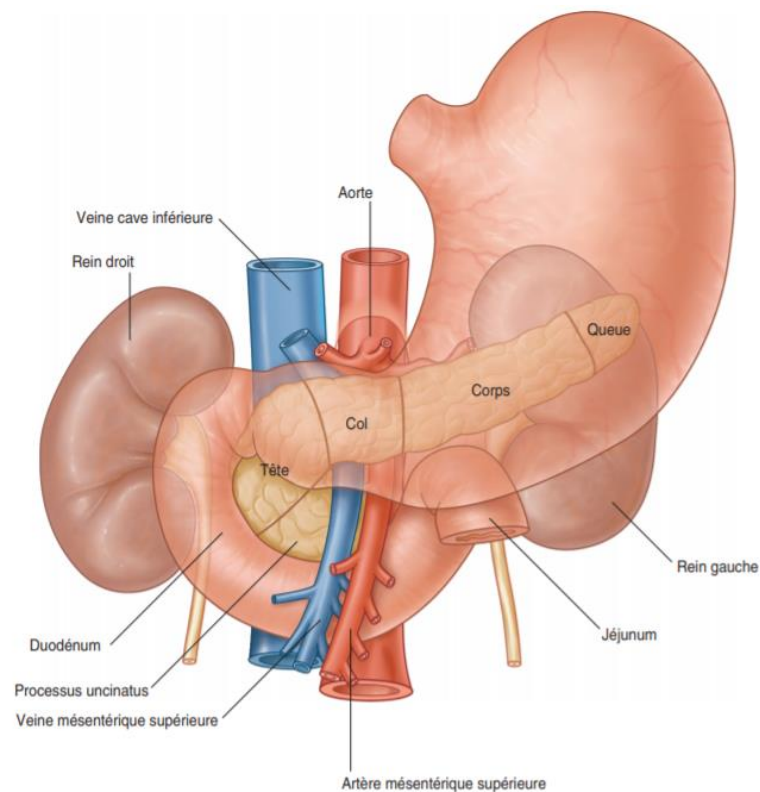


Figure 1 : Anatomie du pancréas et de ses rapports avec les différents organes de voisinage. Schéma issu de *Gray's Anatomy for Students, 2nd ed, 978044306952*). Elsevier Masson, 2e édition, 2011. Figure 4.98

- **La tête du pancréas** : c'est la portion du pancréas la plus à droite et la plus large de la glande pancréatique. Cette portion est entièrement enchâssée dans le cadre duodénal. La tête du pancréas présente un prolongement sur son bord inférieur appelé le processus *uncinatus* (appelé aussi crochet ou petit pancréas). L'*uncinatus* est en étroite relation avec l'artère et la veine mésentérique supérieure. Le corps du pancréas est traversé par la portion distale du canal cholédoque avant son abouchement dans le deuxième duodénum via l'ampoule de Vater.
- **L'isthme pancréatique** : c'est une zone de rétrécissement du pancréas qui fait la jonction entre la tête et le corps pancréatique. L'isthme est situé juste en avant de l'axe veineux mésentérico-porte.
- **Le corps du pancréas** : s'étend obliquement vers le haut et vers la gauche et épouse la concavité rachidienne. Il est en contact avec la face postérieure de l'estomac et passe devant la veine rénale gauche.
- **La queue du pancréas** : c'est la partie distale de la glande qui est en relation étroite avec la hile splénique et l'angle colique.

Le pancréas comporte deux canaux excréteurs. Le canal pancréatique principal ou canal de Wirsung et le canal pancréatique accessoire ou de Santorini. Ces deux canaux permettent de cheminer le suc pancréatique vers le deuxième duodénum (Guérit 2001).

1.2. Anatomie fonctionnelle

Le pancréas est une glande à sécrétion endocrine et exocrine. La fonction endocrine du pancréas est assurée par les îlots de Langerhans formés d'amas de cellules sécréteurs

d'hormones : les cellules β qui produisent l'insuline et les cellules α qui produisent le glucagon. Ces hormones assurent l'homéostasie glucidique en régulant la glycogénolyse et la néoglucogénèse. La fonction exocrine du pancréas joue un rôle clé dans la digestion des protéines, des glucides et des lipides. Elle est assurée par les cellules acineuses et canalaire qui représentent environ 90% des cellules pancréatiques (Figure 2). Les cellules acineuses sécrètent les enzymes digestives et les cellules canalaire produisent des sécrétions hydroélectrolytiques, formant ainsi le suc pancréatique (Dufresne et al., 2013).

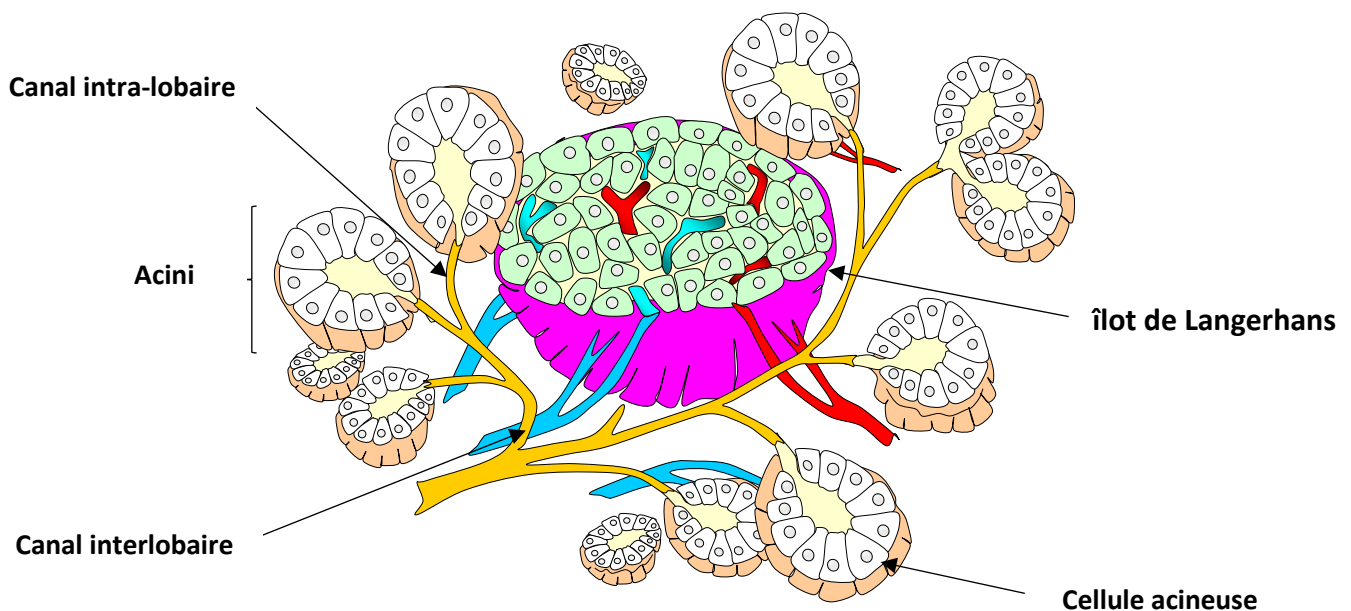


Figure 2 : Représentation schématique de la portion endocrine et exocrine du pancréas.

1.3. Histologie du pancréas

Le parenchyme pancréatique est organisé en lobules séparés par des septa fibreux. Ces lobules contiennent essentiellement des acini et des canaux excréteurs. Les îlots de Langerhans sont dispersés dans les lobules pancréatiques.

1.3.1. Pancréas exocrine

Les cellules acineuses, formant les acini, sont des cellules épithéliales polarisées. Leur partie basale contient le noyau et un riche réticulum endoplasmique rugueux. La partie apicale est chargée de grains de zymogènes qui contiennent les précurseurs enzymatiques. Au sein de l'acinus pancréatique, on trouve des cellules souches multipotentes appelées les cellules centro-acineuses qui peuvent se différencier en cellules acineuses, cellules canalaire et même en cellules endocrines. Les sécrétions enzymatiques sont drainées par des canaux excréteurs (canaux intralobulaires puis interlobulaires et enfin canaux collecteurs). Les canaux sont bordés par des cellules épithéliales cubiques ou cylindriques (Figure 3).

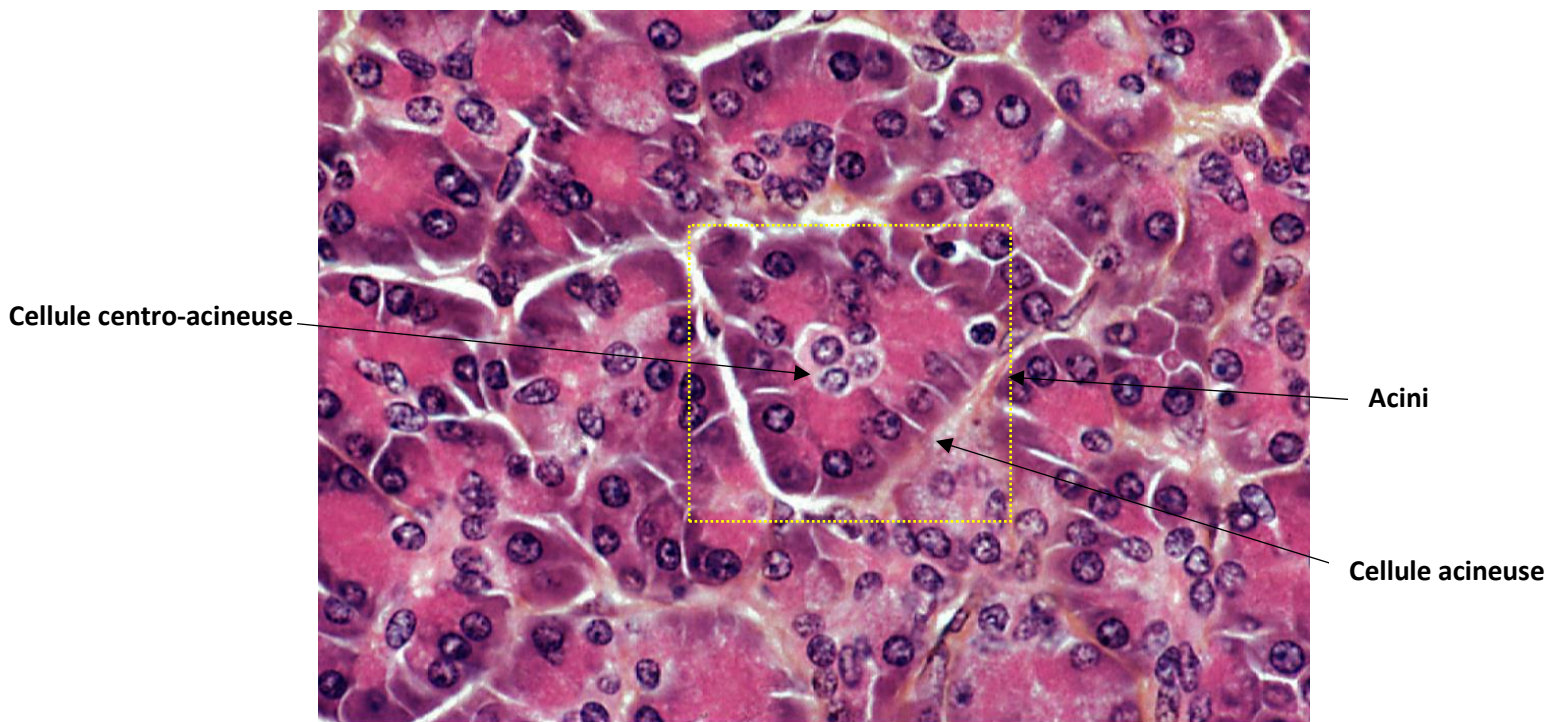


Figure 3 : Coupe histologique d'un lobule pancréatique avec des acini et des cellules centro-acineuses. Photographie issue du site Histologie spéciale humaine de l'université de Namur : <http://www.histology.be/atlas/HSH/index.html>

1.3.2. Pancréas endocrine

Les îlots de Langerhans s'organisent sous forme de travées dispersées dans le parenchyme et richement vascularisées. Les îlots de Langerhans sont formés d'une mosaïque de cellules endocrines, parmi elles on peut distinguer : les cellule β qui sécrètent l'insuline, les cellules α productrices de glucagon, les cellules δ à somatostatine et d'autres lignées cellulaires plus rares (cellules PP ...) (Figure 4).

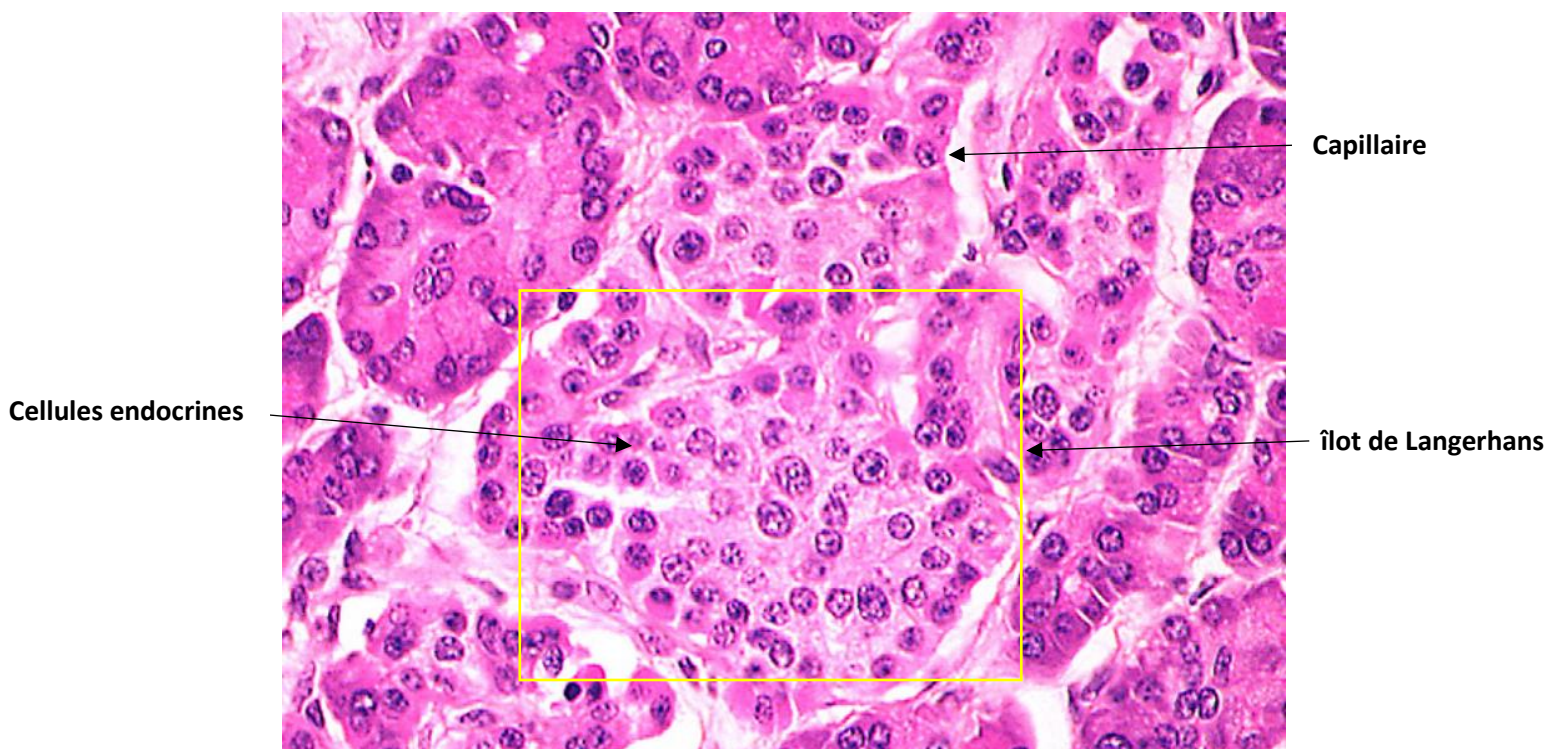


Figure 4 : coupe histologique du pancréas endocrine. Photographie issue du site Histologie spéciale humaine de l'université de Namur : <http://www.histology.be/atlas/HSH/index.html>

1.4. Classification histologique du cancer du pancréas

La classification des tumeurs pancréatiques a été établie par l'OMS. La majorité des cancers du pancréas se développe à partir des cellules épithéliales exocrines. On distingue plusieurs sous-types tumoraux dont les caractéristiques histopathologiques sont différentes.

1.4.1. Adénocarcinome canalaire pancréatique (ACP)

Il s'agit de la tumeur maligne pancréatique la plus fréquente. Elle se développe à partir des cellules épithéliales des canaux excréteurs pancréatiques caractérisées par une expression de cytokératine et une production de mucines. La majorité de ces tumeurs sont moyennement ou bien différenciées avec souvent des contingents de différenciation différents au sein de la même tumeur. L'ACP se caractérise également par un stroma fibreux très dense composé de collagènes, de glycoprotéines non collagéniques, d'élastine et de protéoglycannes. Les ACPs bien différenciés se caractérisent par des formations néoplasiques canalaire glandulaires ou tubulaires à faible index mitotique, qu'il est parfois difficile de distinguer de canaux non tumoraux. Les cellules canalaire néoplasiques sont généralement plus grandes que celles des canaux non néoplasiques. Elles contiennent de gros noyaux ronds qui peuvent varier en taille, avec des membranes nucléaires pointues et des nucléoles distincts qui ne sont pas trouvés dans les cellules des canaux normaux.

Les ACPs moyennement différenciés présentent des canaux néoplasiques et des structures glandulaires de différentes formes. Ces ACPs se caractérisent également par des formes et des tailles différentes de leur noyau par rapport aux ACPs bien différenciés et présentent un index mitotique plus élevé.

Les ACPs peu différenciés sont plus rares. Ils sont caractérisés par une perte de l'architecture canalaire avec des foyers anaplasiques et des plages de nécrose et d'hémorragie. Les cellules tumorales ont une très faible production de mucine avec un index mitotique très élevé.

Même s'il n'existe pas de marqueur histochimique spécifique de l'ACP, certaines spécificités moléculaires peuvent être utilisées pour le différencier des autres adénocarcinomes :

- **Mucines** : La majorité des ACPs expriment les mucines MUC1, MUC3, MUC5AC, MUC6 et MUC17 (Kaur et al. 2013). La mucine MUC4 présente la particularité de ne pas être exprimée dans le pancréas sain mais uniquement dans les lésions précancéreuses pancréatiques et dans l'ACP (Vasseur et al., 2015; Jonckheere et al., 2004).
- **Le CA 19-9 (Carbohydre Antigen 19-9)**: Il s'agit d'un ganglioside contenant un radical sialyllacto-N-fucopentose, et fait partie des antigènes du groupe sanguin Lewis. Il est synthétisé par le pancréas normal mais également par plusieurs autres tissus (colique, biliaire, œsophagien, gastrique ...) (Atkinson et al., 1982). Il est exprimé à la surface des cellules épithéliales et sert de ligand pour les monocytes et les macrophages. L'élévation du taux sanguin de CA 19-9 traduit souvent un processus tumoral malin mais survient aussi au cours de certaines pathologies bénignes (Ballehaninna et al., 2011).
- **ACE (antigène carcino-embryonnaire)** : Il s'agit d'une glycoprotéine d'un poids moléculaire entre 180 et 200 kDa. Son taux est élevé chez 30 à 60% des patients avec un cancer du pancréas (Meng et al. 2017).
- **Autres marqueurs** : L'ACP exprime les mêmes cytokératines que le pancréas normal (7, 8, 18 et 19). Environ 50% des ACPs expriment la cytokératine 4, mais restent généralement négatifs pour la cytokératine 20. De plus, l'ACP n'exprime pas la vimentine, ni les marqueurs endocrines.

1.4.2. Carcinome adénoquameux

Il s'agit d'une tumeur rare caractérisée par la présence de cellules glandulaires productrices de mucines et une composante épidermoïde. Son incidence varie de 0,5 à 2 % selon les études

(Gunjan et al., 2016). Pour qu'une tumeur soit considérée comme adénosquameuse, le contingent épidermoïde doit représenter plus de 30 % de la tumeur (Bideau et al., 2008). Le carcinome épidermoïde primitif du pancréas a été déjà décrit (Bideau et al., 2008).

1.4.3. Carcinome anaplasique ou indifférencié

Les carcinomes anaplasiques sont des tumeurs rares très agressives qui représentent 0,8 à 5,7% des tumeurs malignes du pancréas (Hoshimoto et al. 2016). Plusieurs entités pathologiques ont été décrites : carcinome sarcomatoïde, carcinome à cellules géantes ou pléïomorphe, carcinome à cellules ostéoclastiques ...

1.4.4. Carcinome mucineux non kystique

Appelée aussi carcinome colloïde ou gélatineux, cette tumeur est caractérisée par une forte expression de mucines. Elle représente 1 à 3% des tumeurs malignes pancréatiques ('Tumours of the Exocrine Pancreas WHO Histological Classification of Tumours of the Exocrine Pancreas' 2010).

1.4.5. Autres tumeurs malignes du pancréas

On distingue d'autres carcinomes pancréatiques qui sont plus rares ('Tumours of the Exocrine Pancreas WHO Histological Classification of Tumours of the Exocrine Pancreas' 2010). Le carcinome pancréatique à cellules indépendantes est extrêmement rare et de très mauvais pronostic. Le carcinome mixte canalaire et endocrine est défini par la présence d'au moins 30% de cellules tumorales endocrines en plus des cellules canalaire néoplasiques. D'autres carcinomes sont exceptionnels comme les carcinomes médullaires, hépatoïdes, à cellules ciliées ...

1.5. Les lésions précancéreuses du pancréas

Les lésions précancéreuses du pancréas sont des lésions canalaire intraépithéliales d'évolution progressive. Elles suivent le même processus de cancérisation que le cancer du côlon (dysplasie de bas, moyen et haut grade, puis carcinome in situ et enfin le carcinome infiltrant). Trois lésions précancéreuses ont été décrites dont les particularités cliniques, pathologiques et moléculaires sont distinctes.

1.5.1. Les néoplasies pancréatiques intra-épithéliales (PanIN)

Décrites pour la première fois en 1998 (Brat et al. 1998), les PanINs sont les lésions précancéreuses pancréatiques les plus fréquentes. Il s'agit de lésions canalaire non invasives se développant sur des petits canaux pancréatiques. Elles sont caractérisées par l'accumulation d'anomalies cytologiques et architecturales permettant de les classer en plusieurs catégories :

- **PanIN 1A** : Il s'agit de lésions plates caractérisées par des cellules organisées en colonnes à noyau situé au contact de la membrane basale. Ces cellules accumulent une quantité abondante de mucine intra-cytoplasmique.
- **PanIN 1B** : Les PanIN 1B sont des lésions épithéliales papillaires mais par ailleurs identiques aux PanIN 1A.
- **PanIN 2** : Les cellules épithéliales mucineuses plates ou papillaires, présentent des anomalies nucléaires (perte de la polarité cellulaire, noyaux dilatés, hyperchromatie...). Généralement, les mitoses sont rares sans atypie et le cytoplasme est normal.
- **PanIN 3** : D'architecture papillaire le plus souvent, les PanIN 3 ou carcinome *in situ* présentent des anomalies cyto-nucléaires marquées. La présence de clusters de

cellules épithéliales comblant la lumière canalaire et la survenue de nécrose canalaire sont caractéristiques des lésions de PanIN 3.

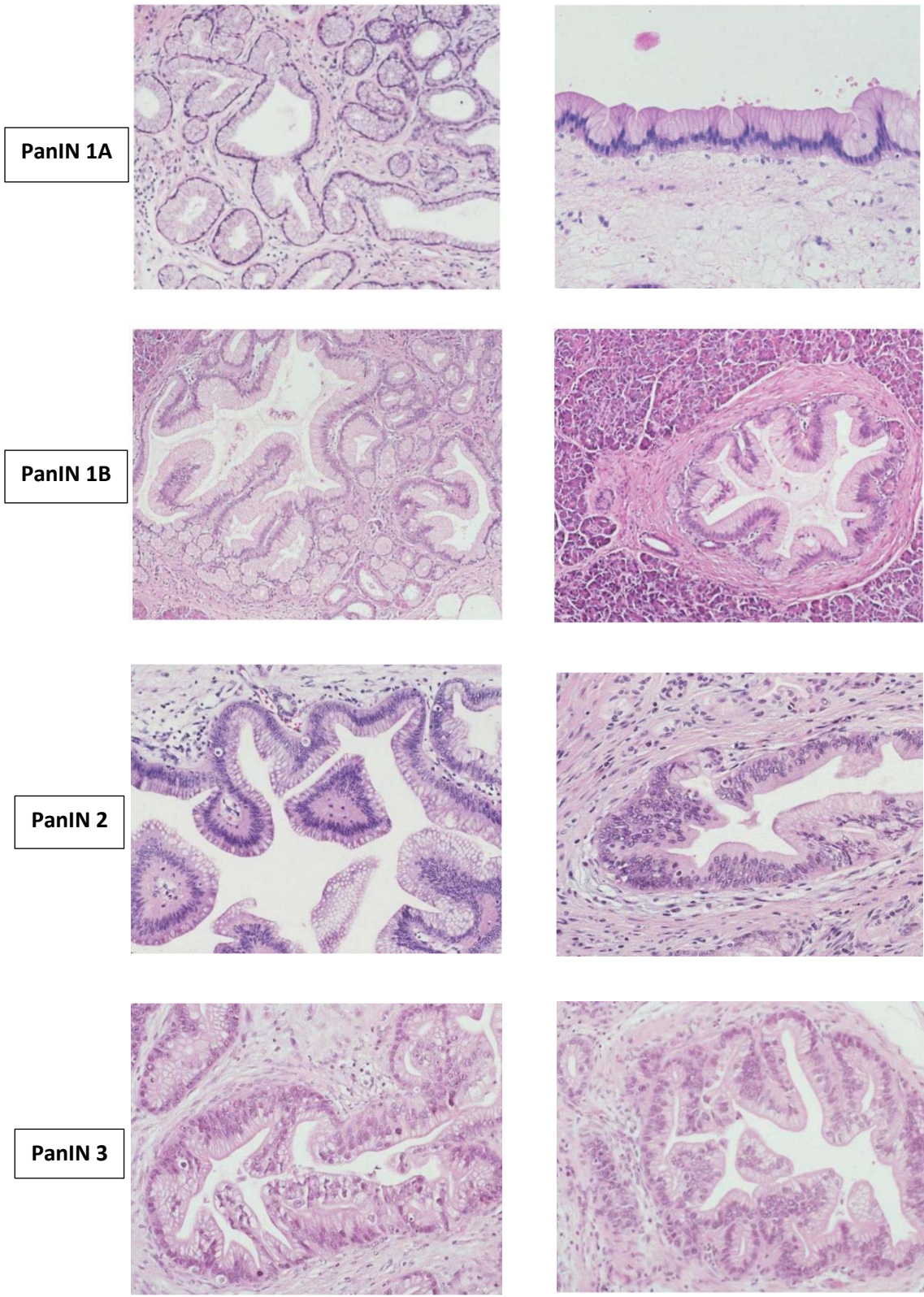


Figure 5 : Coupes histologiques des différentes anomalies histologiques des PanIN (photographies issues du site John Hopkins Medicine Pathology : <http://www.path.jhu.edu/pancreas/professionals/DuctLesions.php>)

La progression des lésions de PanIN s'accompagne d'anomalies moléculaires qui s'apparentent à celles observées dans le cancer du pancréas (Takaori et al., 2006). La mutation du gène *K-ras* apparaît très précocement dans les lésions des PanIN. Une méta-analyse a révélé que la mutation *K-ras* sur le codon 12 (G12D) a été retrouvé dans 36% des lésions de PanIN 1, 44% des PanIN 2 et 87% des PanIN 3 (Löhr et al., 2005). Collins *et al*, ont démontré que la mutation *K-ras*, la perte de l'expression de la protéine p53 et l'activation de voie Hedgehog joueraient un rôle essentiel dans le développement et la progression des lésions de PanINs (Collins et al., 2012). Certains gènes suppresseurs de tumeurs sont inactivés dans les PanIN. Le taux d'inactivation du gène *CDKN2A/p16* est directement proportionnel au grade de dysplasie des PanIN (30% dans les PanIN 1A/B, 55% dans les PanIN 2 et >70% dans les PanIN 3) (Wilentz et al., 1998). La perte de l'expression de la protéine *TP53* n'est observée que dans 12% des PanIN 3 sans inactivation dans les PanIN 1 et 2 (DiGiuseppe et al., 1994). De la même façon, l'expression de la protéine *SMAD4* est conservée dans les PanIN 1 et 2 mais perdue dans 30% des PanIN 3 (Wilentz et al., 2000). D'autres mutations sont observées dans les PanIN telles que les mutations des gènes *BRCA2* (Goggins et al., 2000) et *ERBB2* (Day et al., 1996) (Figure 6).

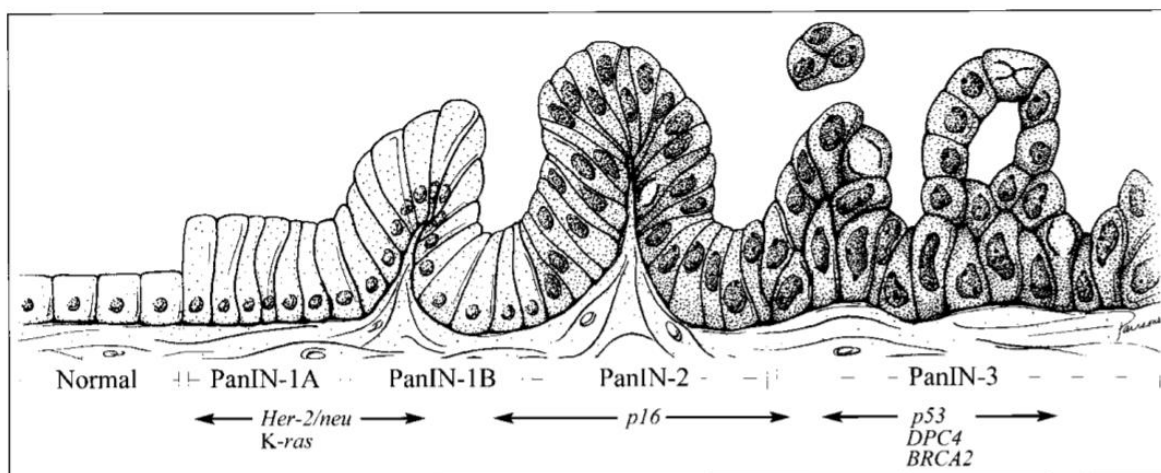


Figure 6 : Modèle de progression histologique des lésions de PanIN avec les principales mutations selon le grade de dysplasie d'après Wilentz et al (Wilentz et al., 2000).

1.5.2. Les Tumeurs intra-canaliaires, papillaires et mucineuses du pancréas (TIPMP)

Il s'agit de lésions mucineuses développées aux dépens des canaux pancréatiques principaux et/ou secondaires sans stroma ovarien à la différence des cystadénome mucineux. Les TIPMP s'accompagnent d'une mucosécrétion abondante et communiquent avec les canaux pancréatiques.

Leur symptomatologie est souvent fruste et leur diagnostic est souvent fortuit ou à l'occasion d'une poussée de pancréatite aiguë. Selon leur phénotype, les TIPMP sont classés en 4 types histologiques (Fernández et al., 2010) (Figure 7):

- **Le phénotype gastrique :** Il présente des points communs avec la muqueuse gastrique au niveau morphologique et phénotypique. Ce phénotype présente une faible agressivité et reste de meilleur pronostic et caractérise les TIPMP des canaux secondaires. La dégénérescence de ce type histologique aboutit le plus souvent à un adénocarcinome tubulaire.

- **Le phénotype intestinal** : de morphologie très similaire aux adénomes coliques, ce phénotype évolue rapidement vers un cancer invasif de type colloïde. Ce phénotype caractérise le plus souvent les TIPMP du canal principal ou mixte.
- **Le phénotype oncocytaire** : il est souvent caractérisé par la présence d'atypies cytologiques sévères. Les papilles sont épaisses et l'architecture est souvent complexe.
- **Le phénotype bilio-pancréatique** : c'est le type histologique avec le pronostic le plus sombre. La dégénérescence en adénocarcinome tubulaire est fréquente.

Les altérations génétiques observées dans les TIPMP sont relativement comparables à celles de l'adénocarcinome pancréatique. Ces anomalies intéressent fréquemment les gènes *K-ras*, *TP53*, *CDKN2A* et *SMAD4* (Makohon-Moore et al., 2013). La majorité des TIPMP présente une mutation d'une autre protéine activatrice de la prolifération, la protéine *GNAS*. Il s'agit d'une G-protéine dont la mutation est responsable d'une activation de la prolifération cellulaire. La mutation de la protéine *GNAS* est spécifique des TIPMP puisqu'elle n'est pas retrouvée dans les adénocarcinomes pancréatiques. De plus, la prévalence des mutations *K-ras* et *GNAS* est directement corrélée au degré de dysplasie et au type histologique. En effet, la mutation *GNAS* est souvent retrouvée dans le phénotype intestinal alors que le sous-type bilio-pancréatique est souvent muté *K-ras*.

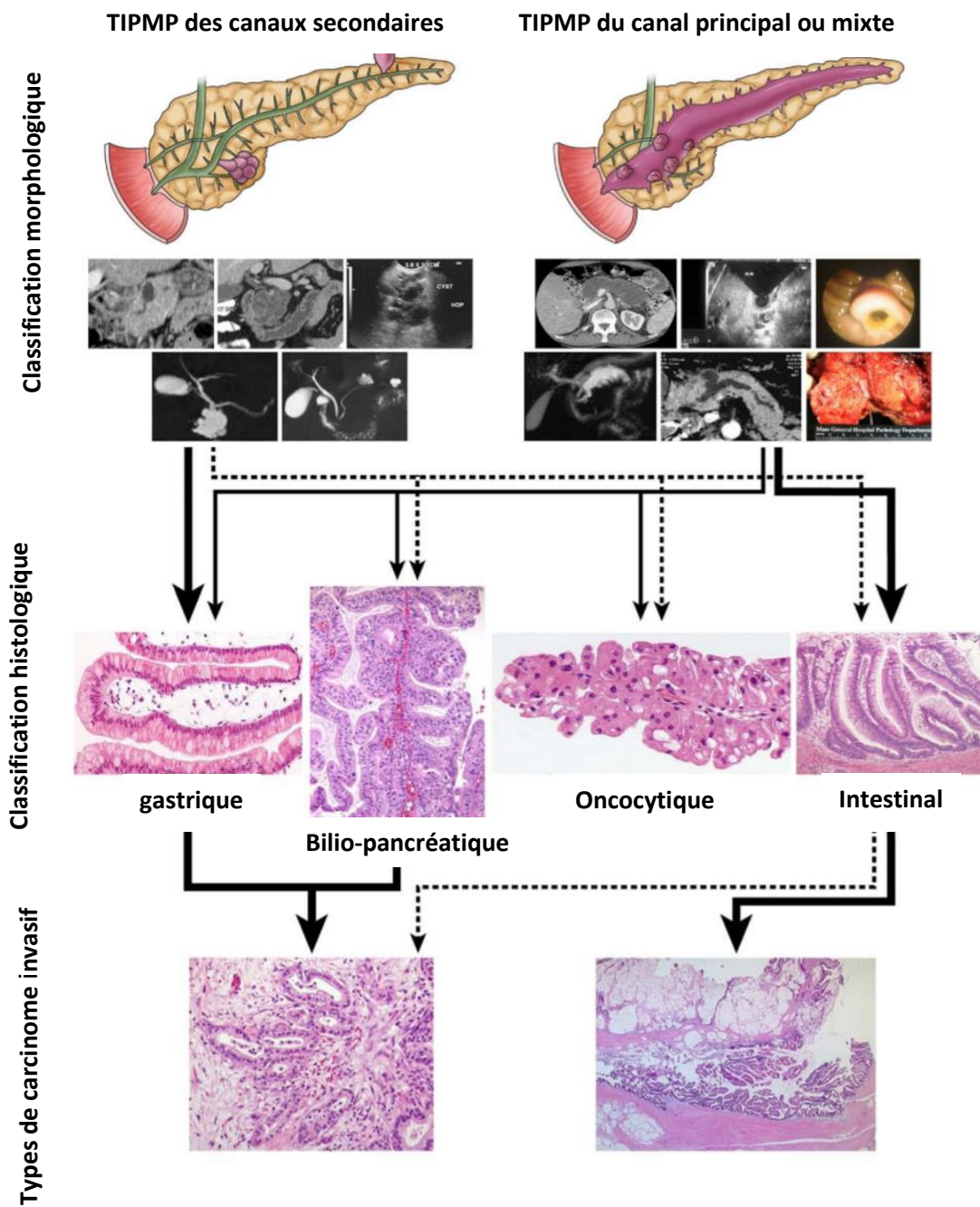


Figure 7 : Classifications morphologique et histologique des TIPMP et les types de carcinome invasif en cas de dégénérescence d'après *Fernández-del Castillo et al* (Fernández del Castillo et al., 2010).

1.5.3. Le cystadénome mucineux du pancréas

Il s'agit d'une lésion kystique mucineuse caractérisée par la présence d'un stroma ovarien. Cette lésion, souvent unique avec une paroi épaisse, survient le plus souvent chez la femme jeune entre 20 et 40 ans. Le cystadénome mucineux est souvent localisé dans le corps et la queue du pancréas et ne présente pas de communication avec les canaux pancréatiques. L'évolution vers le cystadénocarcinome mucineux est la conséquence de l'accumulation de mutations des mêmes gènes impliqués dans l'adénocarcinome du pancréas (Suguru et al., 2008).

1.6. Classification moléculaire du cancer du pancréas

Les travaux de séquençage génétique et épigénétique ont révélé l'existence d'une hétérogénéité dans le cancer du pancréas. Plusieurs classifications moléculaires ont été proposées, distinguant plusieurs sous-types de cancer du pancréas. Collison et al., ont décrit en 2011 une première classification moléculaire du cancer du pancréas réséqué sans traitement néoadjuvant selon une approche transcriptomique. Trois sous-types ont été identifiés : classique, quasi-mésenchymateux et exocrine-like (Collison et al., 2011). De plus, les auteurs ont montré une corrélation entre un mauvais pronostic et le sous-type quasi-mésenchymateux. En 2015, Moffitt et al., ont identifié avec une analyse transcriptomique, 4 sous-types moléculaires du cancer du pancréas : Basal-like, classique, avec stroma normal et avec un stroma activé (Moffitt et al., 2015). Une autre classification a été proposée en 2016 par Bailey qui distingue 4 sous-types de cancer du pancréas avec des caractéristiques moléculaires différentes impactant le pronostic : squameux, progéniteur pancréatique, immunogénique et le sous-type ADEX (Aberrantly Differentiated Endocrine Exocrine) (Bailey et al., 2016).

- **Le sous type squameux** : est caractérisé par l'altération de l'expression de plusieurs gènes dont ceux impliqués dans l'inflammation, l'hypoxie, la voie du TGF β , la voie myc et certains

gènes dans la modulation de la chromatine. Ce sous-type est également caractérisé par l'expression d'un isoforme de la protéine p63 appelé Δ Np63 (Somerville et al., 2018). Cette dernière est caractéristique des tissus épithéliaux squameux. Ce sous-type est également caractérisé par une perte de la signature endodermique via la méthylation de certains gènes comme le *HNF4A* et *GATA6* (Collisson et al., 2019). Enfin, ce sous-type est associé à un mauvais pronostic.

- **Le sous-type progéniteur pancréatique** : ce sous-type est caractérisé par l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules pancréatiques à partir de leurs progéniteurs endodermiques. L'un de ces principaux facteurs de transcription est le PDX1 qui semble jouer un rôle oncogénique. De plus, les mucines MUC5AC et MUC1 sont préférentiellement co-exprimées dans ce sous-type moléculaire (Bailey et al., 2016).
- **Le sous-type ADEX** : ce sous-type est caractérisé par la régulation de gènes impliqués dans les stades tardifs de différenciation des cellules pancréatiques en cellules endocrines et exocrines. Parmi les facteurs de transcription surexprimés dans ce sous-type, le NR5A2 joue un rôle dans l'acquisition de propriétés de cellules souches et dans le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (Luo et al., 2017).
- **Le sous-type immunogénique** : ce sous-type est caractérisé par une réaction immunitaire significative impliquant plusieurs médiateurs de la réponse immunitaire (lymphocyte B, lymphocyte T CD4+ et CD8+, macrophages ...) et des voies de signalisation impliquant PD1 et CTLA4 (Bailey et al., 2016).

1.7. Epidémiologie du cancer du pancréas

Le cancer du pancréas est classé au 12^{ème} rang en termes d'incidence et de prévalence dans le monde. Les données mondiales fournies par l'*International Agency for Research on Cancer* évaluent l'incidence à 458 918 cas enregistrés de cancer du pancréas en 2018 avec une

prévalence estimée à 282 574 (Figure 8), ce qui représente environ 2,5% des cas de cancer enregistrés dans le monde (Bray et al., 2018). Selon les estimations de GLOBOCAN pour l'année 2018, les taux d'incidence et de prévalence les plus élevés sont estimés en Europe, en Amérique du nord, au Japon, en Australie et en Nouvelle Zélande (Figure 9). L'incidence du cancer du pancréas semble être légèrement plus élevée chez les hommes par rapport aux femmes (5,5 cas par 100 000 chez les hommes, 4 cas par 100 000 chez les femmes) (Bray et al., 2018). L'incidence du cancer du pancréas augmente avec l'âge ; il reste rare avant 55 ans et concerne essentiellement des patients âgés de plus de 65 ans (Howlader et al., 2015; Malvezzi et al., 2016).

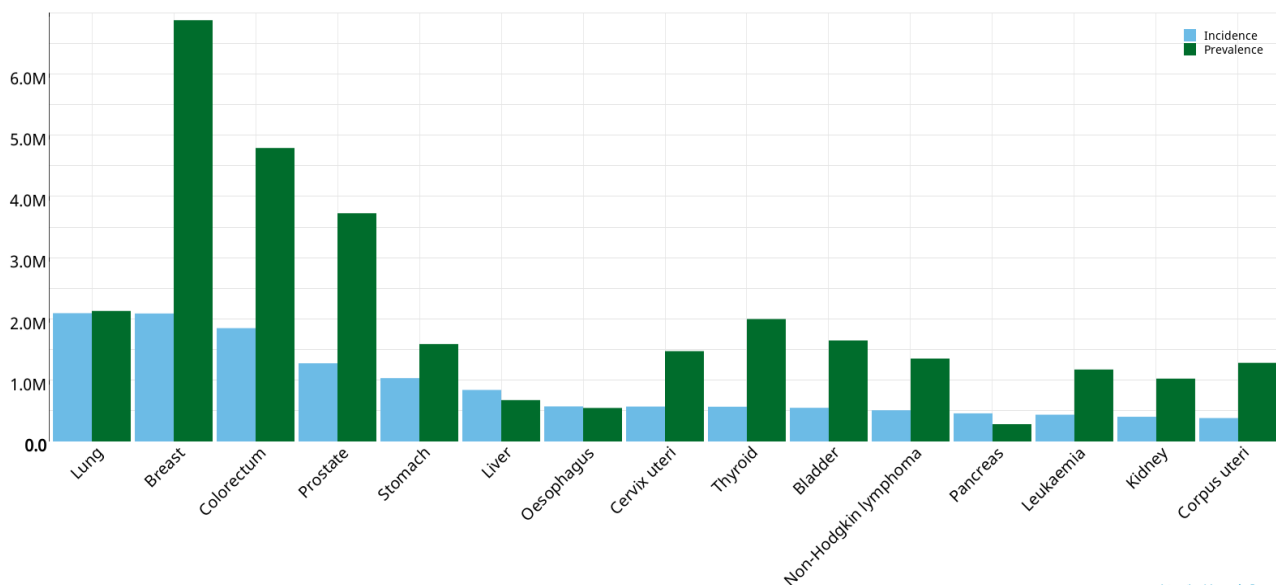


Figure 8: Estimation de la prévalence et de l'incidence des 15 cancers les plus fréquents dans le monde selon GLOBOCAN pour l'année 2018. <https://gco.iarc.fr/today/home>

En France, En 2018, on estime le nombre de nouveaux cas de cancers du pancréas à 7301 chez l'homme et à 6883 chez la femme. Selon les données de GLOBOCAN, le cancer du pancréas arrive au 9^{ème} rang en terme d'incidence en France, avec un taux supérieur à la moyenne

européenne (Binder-Foucard et al., 2014). De plus, le cancer du pancréas représente environ 3% des nouveaux cas de cancers diagnostiqués annuellement en France (Heuzé et al., 2019).

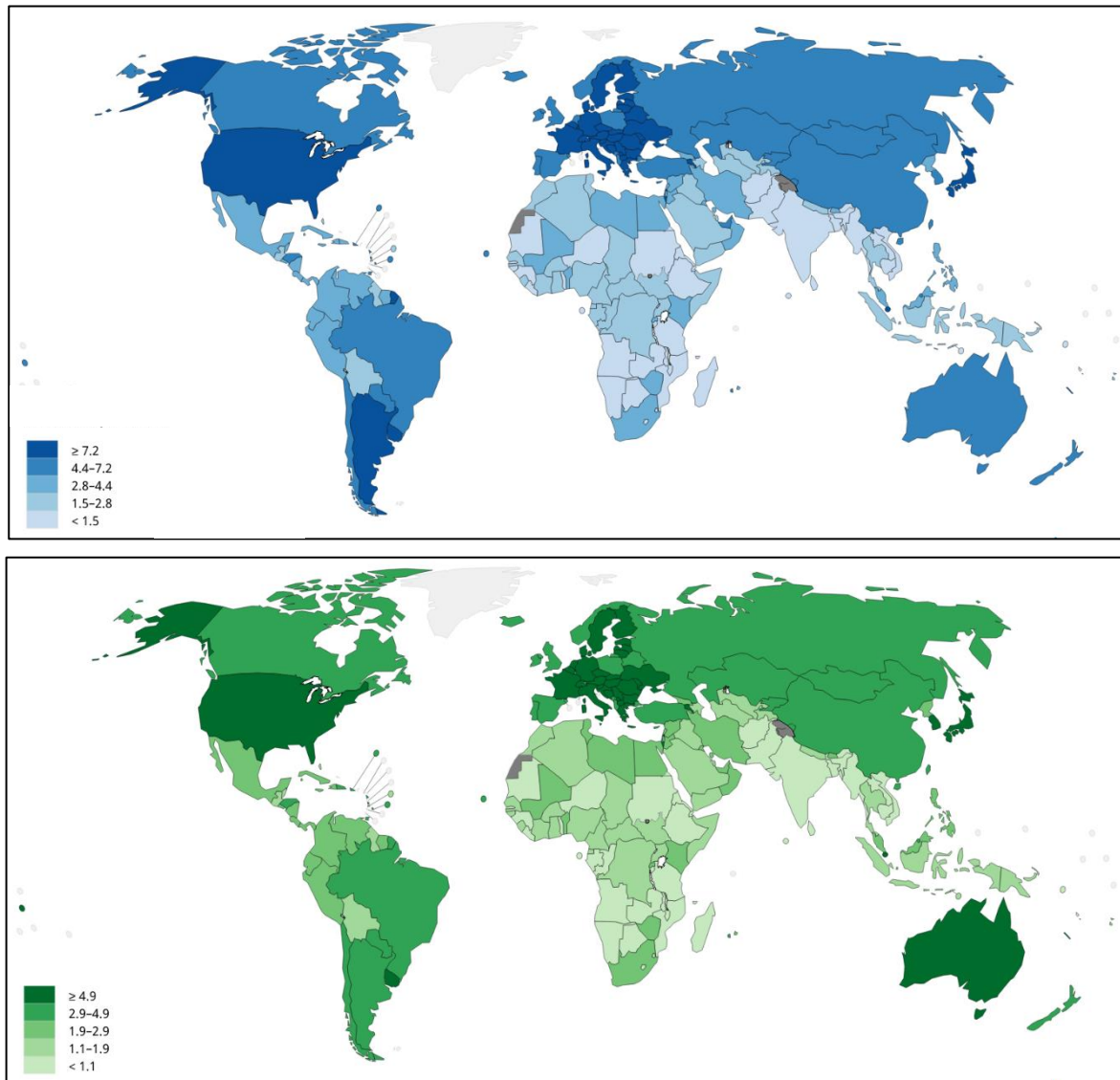


Figure 9: Les taux d'incidence standardisés sur l'âge (A) et de prévalence (B) dans le monde selon GLOBOCAN 2018. <https://gco.iarc.fr/today/home>

L'incidence du cancer du pancréas est en hausse croissante. Nous disposons de plusieurs données récentes qui montrent une augmentation progressive des nouveaux cas de cancer du pancréas dans tous les pays mais surtout en Europe et aux Etats-Unis (Luo et al., 2019).

L'analyse des bases de données SEER a révélé une augmentation de l'incidence ajustée à l'âge du cancer du pancréas de 11,85/100 000 en 2000 à 14,70/100 000 en 2014, avec une augmentation annuelle moyenne de 1,6% (Wu et al., 2018). Cette tendance se confirme en France puisque l'Institut National du Cancer (INCa) a rapporté durant la période 1990-2018, une augmentation du l'incidence du cancer du pancréas selon un rythme moyen de +2,7 % et +3,8 % par an respectivement chez l'homme et la femme (Defossez et al., 2019). Cette tendance à l'augmentation de l'incidence du cancer du pancréas va se poursuivre durant les trois prochaines décennies. Selon la base de donnée GLOBOCAN, l'incidence mondiale du cancer du pancréas augmenterait de 77,7% entre 2018 et 2040 avec une différence significative entre les pays. En Europe, cette hausse d'incidence serait estimée à 29% (Ferlay et al., 2018).

1.8. Facteurs de risque du cancer du pancréas

Plusieurs facteurs de risque du cancer du pancréas ont été identifiés ces dernières années. Le tabagisme est le principal facteur de risque environnemental de la majorité des cancers, y compris le cancer du pancréas. Ce risque de survenue de cancer du pancréas a été évalué dans une méta-analyse à 1,74 (Iodice et al., 2008) et semble augmenter avec la durée et la sévérité de la consommation tabagique. De plus, une étude a estimé que le tabac serait à l'origine de 26% des cas de cancer du pancréas chez les hommes et 31% chez les femmes au Royaume Uni (Parkin et al., 2011).

Plusieurs études suggèrent que l'obésité est associée à un risque de cancer du pancréas (Renehan et al., 2008; Stolzenberg-Solomon et al., 2008). De plus, il a été observé la présence de lésions précancéreuses pancréatiques chez des patients obèses (Rebours et al., 2015) suggérant l'implication de ce phénomène dans la carcinogénèse pancréatique. En effet,

l'insulino-résistance provoquée par la graisse viscérale est l'événement clé qui induit un relargage de facteurs pro-inflammatoires qui favorisent la carcinogénèse pancréatique par l'activation de certaines voies de signalisation pro-oncogéniques et l'induction de dommages génétiques (Van Kruijsdijk et al., 2009).

Le rôle du diabète dans la survenue du cancer du pancréas a été largement étudié (Maisonneuve et al., 2015; Batabyal et al., 2014; Pezzilli et al., 2013). Dans une étude italienne, la survenue de cancer du pancréas a été attribuée au diabète chez 10% des patients (Rosato et al., 2015). Le cancer du pancréas peut également se manifester par la survenue d'un diabète de novo ou par une aggravation d'un diabète préexistant et certains auteurs supposent que le diabète n'est que la manifestation d'une condition précancéreuse ou d'un authentique cancer de pancréas jusqu'alors asymptomatique (Gullo et al., 1999).

La pancréatite chronique est également considérée comme un facteur de risque de cancer du pancréas (Ekbohm et al., 1994; Raimondi et al., 2010; Duell et al., 2012). Cependant, seulement 1,8% de ces patients développeront un cancer du pancréas après 10 ans d'évolution de la pancréatite chronique et 4% à 20 ans (Hirota et al., 2012; Yadav et al., 2010). Ce risque est majoré en cas de pancréatite chronique héréditaire (mutation de PRSS1, CFTR, SPINK1 ...), multipliant le risque par 50 à 60 par rapport à la population générale (Lowenfels et al., 2000).

La prédisposition génétique représente environ 10% des cancers du pancréas (Shi, Daniels, and Hruban 2008). Plusieurs mutations génétiques ont été identifiées comme associées à un risque de cancer du pancréas. Parmi les gènes impliqués, on trouve BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, CDKN2A, APC, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, PRSS1 et STK11 (Grant et al., 2015; Vincent et al., 2011). Le cancer du pancréas est également associé à certains syndromes comme le Lynch, Peutz-Jeghers, la polypose adénomateuse familiale et le syndrome de Li-Fraumeni.

D'autres facteurs de risques de cancer du pancréas ont été décrits dans la littérature comme l'infection à *Helicobacter pylori*, les groupes sanguins A et B, l'ethnie afro-américaine...

1.9. Diagnostic du cancer du pancréas

1.9.1. Les signes cliniques du cancer du pancréas

Le diagnostic du cancer du pancréas est souvent fait à des stades avancés. En effet, environ 80% des patients sont jugés non résécables ou métastatiques au moment du diagnostic (Siegel et al., 2019). Les symptômes sont le plus souvent non spécifiques et dominés par l'apparition d'une altération de l'état général. De plus, le type des symptômes cliniques dépend principalement de la localisation de la tumeur dans le pancréas et du stade (Modolell et al., 1999). La survenue d'un ictère est un symptôme précoce du cancer du pancréas céphalique contrairement à celui du corps et de la queue dont le diagnostic est souvent fait à des stades avancés. Le cancer de la tête du pancréas peut également être associé à une stéatorrhée liée à l'insuffisance pancréatique exocrine par obstruction du canal de Wirsung. D'autres symptômes comme la découverte ou l'aggravation d'un diabète, une douleur abdominale, une pancréatite aiguë ... peuvent constituer un mode de révélation d'un cancer du pancréas.

1.9.1.1. Diagnostic biologique du cancer du pancréas

Le taux sérique du CA19-9 a une sensibilité et une spécificité de 80% chez les patients atteints de cancer du pancréas mais sa valeur prédictive positive est faible (Huang et al., 2014). En effet, le CA19-9 peut être élevé dans d'autres circonstances cliniques comme la choléstase, le diabète et la pancréatite chronique. De plus, étant donné que l'antigène CA19-9 est présent dans l'épithélia de plusieurs tissus, son élévation peut être notée en cas de cancers des voies

biliaires, d'un hépatocarcinome, d'un cancer gastrique, colique ou œsophagien (Steinberg et al., 1990). Enfin, l'apport diagnostique du CA19-9 en cas de découverte d'une lésion pancréatique est faible. Poruk et al., ont rapporté dans une méta-analyse une sensibilité du CA19-9 à 78,2% en cas de cancer du pancréas et une spécificité à 82,8% en cas de tumeur bénigne (Poruk et al., 2013).

D'autres marqueurs tumoraux (ACE, CA-125, ADN tumoral circulant, micro-ARN tumoraux ...) sont décrits mais dont le dosage n'est pas recommandé en pratique clinique.

1.9.2. Les examens morphologiques

En cas de suspicion de cancer du pancréas, le scanner abdominopelvien avec injection en coupes fines et en acquisition multiphasique est l'examen de première intention (Al-Hawary et al., 2014). En plus de son intérêt diagnostique, le scanner permet d'évaluer la résecabilité, l'extension vasculaire et la recherche de métastases hépatiques. En cas de cancer du pancréas, le scanner à une précision diagnostique de 90% et de résecabilité de 85-95% (Kamisawa et al., 2016).

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) a une sensibilité et une spécificité comparables à celles du scanner (Kamisawa et al., 2016). En revanche, l'IRM est supérieure au scanner pour le diagnostic des lésions pancréatiques de petites tailles, isodenses au scanner et pour la détection des métastases hépatiques (Marion-Audibert et al., 2018).

L'écho-endoscopie doit être réalisée après le scanner abdominal. Son intérêt est de permettre d'obtenir une preuve histologique et à moindre degré d'évaluer l'extension vasculaire et locorégionale. Au cours de cette procédure, un drainage biliaire prothétique peut être réalisé dans certains cas.

Concernant la tomographie par émission de positons au 18-fluorodesoxyglucose (TEP FDG), son utilisation pour le diagnostic positif du cancer du pancréas ou le diagnostic différentiel avec d'autres pathologies pancréatiques n'est pas recommandée.

1.10. Classifications thérapeutiques du cancer du pancréas

1.10.1. Classification du National Comprehensive Cancer Network (NCCN)

La définition de la résecabilité du cancer du pancréas nécessite une expertise radiologique à partir d'un examen scanographique de qualité. L'évaluation de la résecabilité déterminera ainsi une approche thérapeutique médicale et/ou chirurgicale. Plusieurs classifications ont été proposées pour définir la résecabilité du cancer du pancréas en se basant sur l'évaluation du contact tumoral avec les structures vasculaires adjacentes (Figure 10). La classification *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) est la plus souvent utilisée. Elle définit les tumeurs comme résecables d'emblée, borderline ou localement avancées (Tableau 1). Cette évaluation est basée sur la présence ou non d'un contact vasculaire veineux mésentérico-porte ou artérielle intéressant l'artère mésentérique supérieure (AMS) ou le tronc cœliaque (TC) et sur sa quantification (Figure 10).

Tableau 1 : Définition de la résecabilité selon la classification NCCN 2019

Résécabilité	Atteinte artérielle	Atteinte veineuse
Résécable	Aucun contact artériel: <ul style="list-style-type: none"> • Artère mésentérique supérieure (AMS) • Tronc cœliaque (TC) • Artère hépatique commune (AHC) 	Aucun contact veineux mésentérico- oporte ou contact <180° sans irrégularité veineuse
Borderline	Tête du pancréas: <ul style="list-style-type: none"> • Contact avec AHC sans extension au TC ou à la bifurcation de l'artère hépatique sans possibilité de reconstruction • Contact avec AMS <180° Corps-Queue du pancréas: <ul style="list-style-type: none"> • Contact avec TC <180° • Contact avec TC >180° sans envahissement aortique ni l'artère gastroduodénale 	<ul style="list-style-type: none"> • Contact avec mésentérico-porte >180° ou contact <180° avec irrégularité veineuse ou thrombose veineuse avec possibilité de reconstruction • Contact avec la veine cave inférieure
Localement avancée	Tête du pancréas: <ul style="list-style-type: none"> • Contact avec AMS >180° • Contact avec le TC >180° Corps-Queue du pancréas: <ul style="list-style-type: none"> • Contact avec AMS ou TC >180° • Envahissement aortique 	Envahissement veineux mésentérico-porte sans possibilité de reconstruction

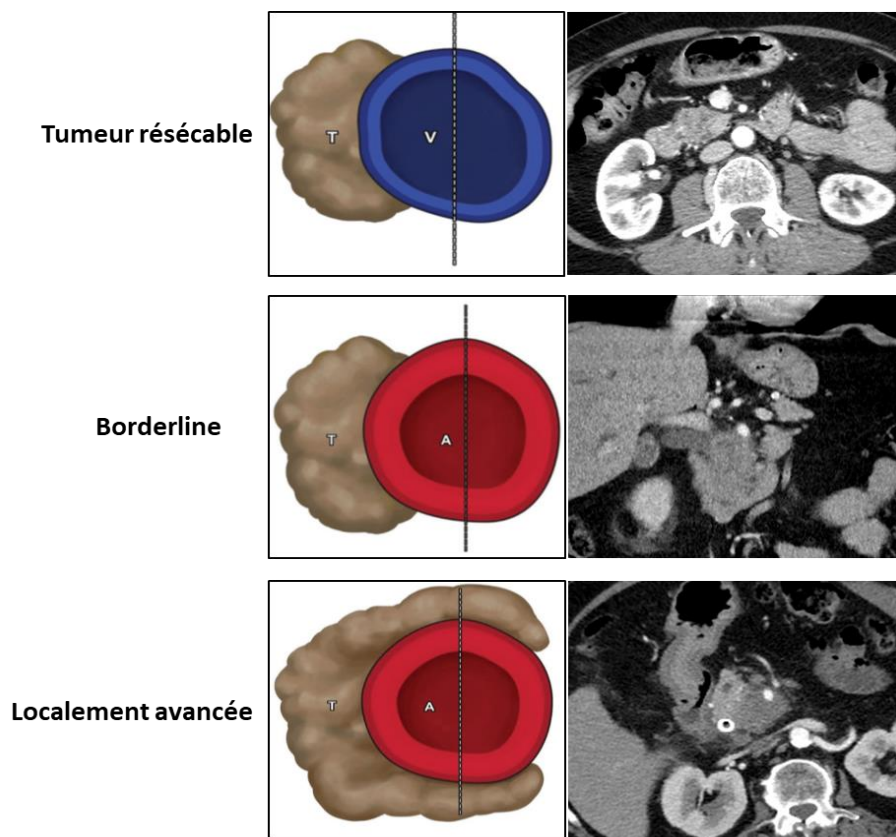


Figure 10: Coupes scanographiques de tumeurs pancréatiques résécable, borderline et localement avancée selon NCCN

1.10.2. Classification TNM (Tumor-Node-Metastasis)

La classification TNM du cancer du pancréas permet de caractériser les tumeurs selon leur taille (T), leur extension ganglionnaire locale et régionale (N) et la présence de métastase(s) (M). La 8^{ème} édition de cette classification a été publiée par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) en 2017 (Tableau 2) (Brierley et al., 2017). Sa détermination peut être clinique (cTNM) en se basant sur les données pré-thérapeutiques (clinique, endoscopie, imagerie ...) ou histopathologiques après analyse histologique de la pièce opératoire (pTNM). Elle permet également de classer les tumeurs en plusieurs stades ce qui permet de guider la prise en charge thérapeutique (Tableau 3). Contrairement à la classification NCCN, son utilisation en pratique clinique reste limitée.

Tableau 2 : Classification TNM selon la 8^{ème} édition de l'AJCC

T	N	M
T1 : tumeur < 2 cm	N0 : pas de métastases ganglionnaires	M0 : pas de métastase (s) à distance
T1a : tumeur <0,5 cm	N1 : 1 à 3 ganglions régionaux métastatiques	M1 : métastase (s) à distances
T1b : tumeur entre 0,5 et 1 cm	N2 : ≥ 4 ganglions régionaux métastatiques	
T1c : tumeur entre 1 et 2 cm		
T2 : tumeur entre 2 et 4 cm		
T3 : tumeur > 4 cm		
T4 : tumeur envahissant le Tc, AMS ou l'AHC quelque soit la taille		

Tableau 3: Stades TNM du cancer du pancréas selon l'AJCC

Stade IA	T1	N0	M0
Stade IB	T2	N0	M0
Stade IIA	T3	N0	M0
Stade IIB	T1-T3	N1	M0
Stade III	Tx T4	N2 Nx	M0 M0
Stade IV	Tx	Nx	M1

1.11. Les principaux facteurs pronostiques du cancer du pancréas

Plusieurs facteurs pronostiques ont été identifiés comme prédictifs de la survie des patients atteints de cancer du pancréas. Plusieurs études ont montré que l'état général était un facteur prédictif de survie ; les patients altérés avaient un mauvais pronostic indépendamment du stade tumoral (Le, Sund, and Vinci 2016). Le taux de CA19-9 au diagnostic a été également étudié. Plusieurs études ont montré l'impact pronostique du taux préopératoire de CA19-9 sérique sur la survie des patients avec un cancer du pancréas réséqué (Barton et al., 2009; Ueda et al., 2009; Hernandez et al., 2009). Chez les patients non résécables, le CA19-9 est aussi un facteur pronostique de survie (Saad et al., 2002). De plus, le taux de CA19-9 pourrait avoir un intérêt dans l'évaluation de la réponse à la chimiothérapie. En effet, la diminution du CA19-9 sérique est le plus souvent associée à une réponse radiologique et une meilleure survie (Wong et al., 2008). D'autres marqueurs biologiques comme la protéine C-réactive (CRP), le taux sérique de LDH, le ratio neutrophile/lymphocyte ont été décrits récemment comme prédictifs de la survie.

La taille tumorale impacte également le pronostic des patients avec un cancer du pancréas. Elle est directement corrélée à la survie et limite souvent les possibilités de résection. De plus, l'atteinte ganglionnaire est un facteur pronostique important qui a été largement étudiée (Winter et al., 2006; Konstantinidis et al., 2010; Riediger et al., 2009). Le ratio ganglions envahis/ganglions prélevés est un marqueur pronostique plus pertinent que l'envahissement ganglionnaire seul.

Enfin, la résection en marge positive et l'envahissement périnerveux sont associée à une réduction significative de la survie (Gnerlich et al., 2012; Winter et al., 2006; Hirai et al., 2002).

Les principaux facteurs pronostiques sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Les principaux facteurs pronostiques du cancer du pancréas

Facteurs pronostiques du cancer du pancréas				
Cliniques	Biologiques	Histologiques	Moléculaires	Mode de traitement
<ul style="list-style-type: none"> - Etat général <ul style="list-style-type: none"> • Score OMS - Dénutrition - Mode de présentation <ul style="list-style-type: none"> • Ictère • Douleur 	<ul style="list-style-type: none"> - CA19-9 - CRP - Plaquettes - LDH - Ratio neutrophile/lymphocyte 	<ul style="list-style-type: none"> - Stade TNM - Différenciation tumorale - Envahissement ganglionnaire - Ratio ganglions envahis/ganglions prélevés - Envahissement périnerveux - Marges de résection positives - Envahissement vasculaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Mutation p16 - Mutation SMAD4 - Expression SPARC - Cellules tumorales circulantes - HIF1α ... 	<ul style="list-style-type: none"> - Résécabilité - Chimiothérapie adjuvante

1.12. Traitement du cancer du pancréas

Le traitement du cancer du pancréas dépend de l'extension locale de la tumeur définie par la classification NCCN et la présence ou non de métastases. Les deux principales modalités du traitement sont la résection chirurgicale et la chimiothérapie.

1.12.1. La chirurgie du cancer du pancréas

Malgré les progrès récents, peu de patients sont concernés par la prise en charge chirurgicale car la majorité des patients ($\approx 80\%$) sont diagnostiqués à un stade avancé ou métastatique. La chirurgie pancréatique est complexe et nécessite une expertise technique et oncologique. Son taux de mortalité est élevé et varie considérablement en fonction du volume du centre (El Amrani et al., 2018). Elle offre les meilleures chances de survie en cas de résection complète associée à une chimiothérapie adjuvante (Conroy et al., 2018). Plusieurs types de résections chirurgicales sont possibles en fonction de la localisation tumorale :

- **La duodéno pancréatectomie céphalique (DPC) :** c'est la résection chirurgicale la plus fréquente. Elle est réservée aux tumeurs céphaliques et isthmiques du pancréas et consiste en l'exérèse en monobloc de la tête du pancréas, le cadre duodéal, l'antrum gastrique, la première anse jéjunale, la vésicule biliaire et le canal cholédoque (Figure 11A). Elle est associée à un curage ganglionnaire défini pas un consensus international (Tol et al., 2014). L'intervention se termine généralement par le curage de la lame rétroporte, emportant ainsi le tissu rétroportal définissant les marges artérielle et veineuse dont la résection complète impacte fortement le pronostic (Delpero et al., 2017). La deuxième phase consiste en la réalisation de plusieurs anastomoses selon le montage de Child (Figure 11B).
- **La spléno pancréatectomie gauche (SPG) :** est l'intervention réservée aux tumeurs corporeo-caudales. Cette résection est moins fréquente que la DPC en raison du caractère tardif de la découverte de ces tumeurs (Lau et al., 2010). La SPG emporte l'isthme, le corps, la queue du pancréas ainsi que la rate (Figure 12). La morbi-mortalité de la SPG reste

inférieure à celle de la DPC avec un taux de survie équivalent entre les deux types de résection (Delpero et al., 2010).

D'autres types de résections et des résections étendues aux organes de voisinage sont possibles.

La chirurgie du cancer du pancréas n'a d'intérêt qu'en cas de résection microscopiquement complète (R0). En cas de résection microscopiquement (R1) ou macroscopiquement (R2) incomplète, la survie après résection est faible (Delpero., 2010). Par conséquent, en vue de la morbi-mortalité de la chirurgie pancréatique, seule une résection complète (R0) peut-être envisagée. La place de la chirurgie dans la prise en charge du cancer du pancréas dépend de son extension locale évaluée par la classification NCCN.

- **Tumeurs résécables d'emblée** : la résection pancréatique reste la règle en cas de tumeur classée comme résécable. La chimiothérapie néoadjuvante n'est pas la référence dans cette situation en attendant les résultats des essais randomisés.
- **Tumeurs borderline et localement avancées** : la chirurgie d'emblée n'est pas recommandée en cas de tumeurs borderline ou localement avancées en raison du risque majeur de résection R1. Un traitement d'induction par chimiothérapie ± radiochimiothérapie complémentaire permet d'augmenter le taux de résécabilité secondaire avec des résultats prometteurs (Pietrasz et al., 2019).
- **Tumeurs métastatiques** : la résection chirurgicale n'a aucune place dans la prise en charge du cancer du pancréas métastatique.

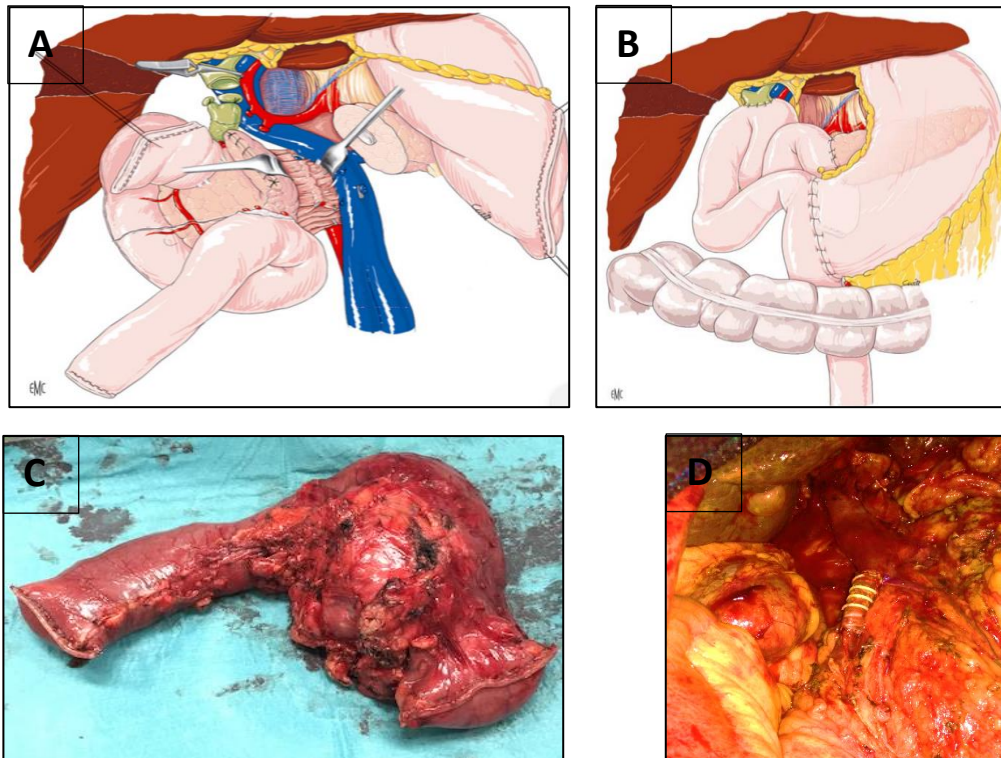


Figure 11 : La duodéno pancréatectomie céphalique.

A- Représentation schématique de la pièce opératoire à la fin de la phase de résection qui se termine par la section de la lame retroportée. **B-** Le montage chirurgical selon Child avec les anastomoses pancréatico-jéjunale, bilio-digestive et gastro-entéro-anastomose, **C-** photographie de la pièce de duodéno pancréatectomie céphalique, **D-** image peropératoire après chute de pièce opératoire.

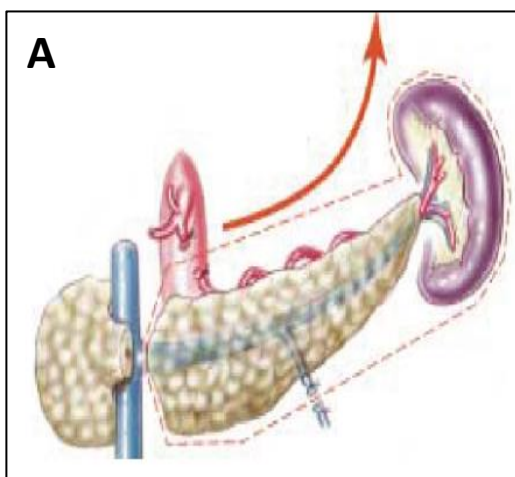


Figure 12 : Spléno pancréatectomie gauche.

A- Représentation schématique de la spléno pancréatectomie gauche, **B-** Pièce opératoire de la spléno pancréatectomie gauche

1.12.2. La chimiothérapie

Plusieurs molécules de chimiothérapie sont utilisées dans le traitement du cancer du pancréas. Ces molécules sont proposées en situation néoadjuvante, comme traitement d'induction ou en situation palliative. Plusieurs molécules et associations de molécules sont utilisées dans le traitement du cancer du pancréas avec une efficacité variable. L'objectif de ces traitements est de détruire (drogues cytotoxiques) ou de diminuer la multiplication des cellules tumorales.

- **5-FLUOROURACILE (5-FU)**

Il s'agit du traitement historique du cancer du pancréas jusqu'à 1997. Le 5-FU est une molécule cytostatique appartenant à la famille des antimétabolites. Son mode d'action passe par le blocage de la méthylation de l'uracile en thymine en inhibant la thymidilate synthétase aboutissant à l'inhibition de la synthèse de l'ADN. Il peut être administré par voie intraveineuse ou orale (sous forme d'un précurseur : Capécitabine).

Le 5-FU était considéré pendant longtemps comme la seule molécule de chimiothérapie proposée aux patients avec un cancer du pancréas. Plusieurs études ont comparé le 5-FU à une abstention thérapeutique chez des patients avec des tumeurs non résécables ou métastatiques avec des résultats souvent décevants (Kovach et al., 1974; Hansen et al., 1988).

- **GEMCITABINE**

La gemcitabine, ou 2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine (dFdC) est une drogue de la classe des antimétabolites. Après son entrée dans la cellule tumorale par les transporteurs membranaires appelés *human Equilibrative ou Concentrative Nucleoside Transporter* (hENT ou hECN), la gemcitabine est métabolisée par des nucléosides kinases en nucléosides di (dFdCDP)- et tri-phosphate (dFdCTP). Le dFdCTP est incorporé dans l'ADN, inhibant ainsi l'élongation de l'ADN. La dFdCDP bloque la synthèse des désoxyribonucléotides en inhibant la ribonucléase réductase (Figure 13).

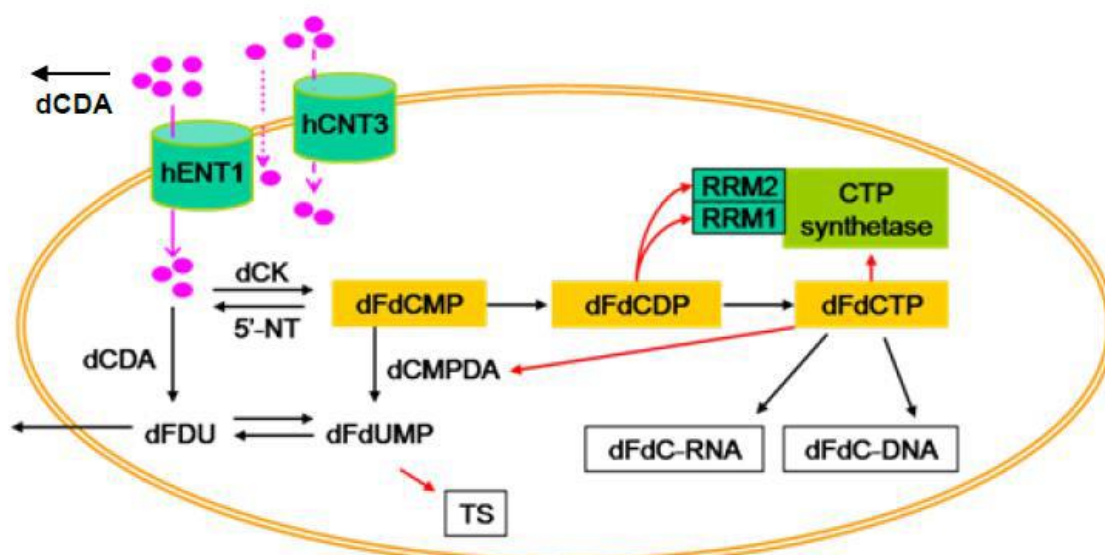


Figure 13 : Métabolisme de la gemcitabine. dFdC : difluoro désoxycytidine, dCK : désoxycytidine kinase, RR : ribonucléotide réductase, TS : thymidylate synthétase, dCDA : désoxycytidine desaminase, 5'-NT : 5'-nucléotidase.

Les résultats du premier essai sur l'efficacité de la gemcitabine dans le traitement du cancer du pancréas ont été publiés en 1997. Burris et al., ont évalué le bénéfice clinique et la survie des patients avec un cancer du pancréas localement avancé ou métastatique traités par gemcitabine ou 5-FU (Burris et al., 1997). Les auteurs ont démontré une amélioration du bénéfice clinique (23% vs 5%, p=0,0022) et de la médiane de survie (5,6 mois vs 4,4 mois, p=0,0025) en faveur de la gemcitabine.

La gemcitabine a été également évaluée en association à d'autres drogues. Le protocole GEMOX, association gemcitabine et oxaliplatine, était associé à un taux de réponse (27% vs 17%, $p=0,04$), à une survie sans progression (5,8 vs 3,7 mois, $p=0,04$) et à un bénéfice clinique (38% vs 27%) supérieurs à la gemcitabine seule. Cependant, le protocole GEMOX n'impactait pas la survie globale (9 vs 7,1 mois, $p=0,13$) (Louvret et al., 2005). De plus, l'association gemcitabine-capecitabine a fait l'objet d'un essai randomisé qui n'a pas montré d'amélioration de la survie globale mais un bénéfice en termes de survie sans récurrence et de taux de réponse objective (Cunningham et al., 2009). D'autres combinaisons ont été rapportées associant gemcitabine à l'oxaliplatine, erlotinib, bevacizumab ou cetuximab.

- **FOLFIRINOX**

Il s'agit de l'association de trois molécules de chimiothérapie : un analogue des bases pyrimidiques (5-FU), un sel de platine (oxaliplatine) et un inhibiteur de topoisomérase I (l'irinotecan).

Les sels de platine sont des agents alkylants qui inhibent la réplication et la transcription de l'ADN par la formation de liaisons covalentes entre ces molécules et les guanines ou les arginines de l'hélice de l'ADN. L'oxaliplatine est l'agent le plus souvent utilisé en oncologie et son spectre d'action est plus large par rapport aux autres platines (cisplatine et carboplatine).

L'irinotecan est un inhibiteur de la topoisomérase de type I qui intervient dans les modifications de structure de l'ADN lors des processus d'élongation, de réparation, de recombinaison, de réplication et de transformation (Soria et al., 2013). L'irinotecan est une prodrogue dont le métabolite actif est le SN38 après action de la carboxylestérase. L'irinotecan est souvent indiqué dans le traitement des cancers colorectaux avancés en

association avec le 5-FU et l'acide folinique. Il peut également être proposé en monothérapie après échec d'un traitement comportant le 5-FU (Soria et al., 2013).

Les résultats des premiers essais évaluant l'intérêt du folfirinox chez les patients atteints de cancer du pancréas étaient encourageants. En 2003, un essai de phase I évaluant la tolérance du folfirinox chez des patients avec des tumeurs solides métastatiques avec des résultats intéressants en terme de réponse tumorale chez les patients avec un cancer du pancréas (Ychou et al., 2003). Un essai de phase III a confirmé ces bons résultats avec un taux de réponse de 26% chez les patients avec un cancer du pancréas avancé traités par folfirinox (Conroy et al., 2005). La même équipe a montré dans l'essai PRODIGE 4 une amélioration significative de la survie globale (11,1 vs 6,8 mois) et sans progression (6,4 vs 3,3 mois) des patients avec un cancer du pancréas métastatique traités par folfirinox par rapport à ceux traités par gemcitabine (Conroy et al., 2011). A partir de ces résultats, le folfirinox est devenu le traitement de référence du cancer du pancréas métastatique. De plus, une étude récente (PRODIGE 24) a montré une amélioration significative de la survie des patients ayant été opérés d'un cancer du pancréas et traités par folfirinox en adjuvant (Conroy et al., 2018).

Le folfirinox a montré également son intérêt chez les patients avec des tumeurs borderline et localement avancées même si le niveau de preuve reste faible (Ferrone et al., 2015; Petrelli et al., 2015).

- **NAB-PACLITAXEL**

Le nab-paclitaxel fait partie de la famille des taxanes qui sont des poisons du fuseau mitotique. Les taxanes ciblent les microtubules en facilitant leur assemblage et leur stabilisation, conduisant ainsi à l'inhibition de la mitose. Le paclitaxel présente des caractéristiques physico-chimiques qui nécessitent l'utilisation de solvants. La particularité du nab-paclitaxel est la

présence de nanoparticules d'albumine permettant d'augmenter sa solubilité et sa biodisponibilité sans faire appel à des solvants. Les protéines d'albumine permettent de faciliter la transcytose du paclitaxel dans les cellules tumorales via le récepteur gp60. Ce récepteur est présent à la surface des cellules endothéliales et permet au nab-paclitaxel d'atteindre la région tumorale par des cavéoles. D'autres facteurs favorisent l'accumulation du nab-paclitaxel dans le micro-environnement tumoral comme la protéine SPARC (secreted protein acidic and rich cystein) dont l'expression dans le stroma tumoral du cancer du pancréas est un critère de mauvais pronostic (Infante et al., 2007).

L'essai de phase III évaluant l'efficacité du nab-paclitaxel associé à la gemcitabine chez les patients avec un cancer du pancréas métastatique a montré une amélioration significative de la survie globale (8,5 vs 6,7 mois) et sans récurrence (5,5 vs 3,7 mois) par rapport à la gemcitabine seul (Von Hoff et al., 2013).

- **Autres thérapeutiques**

Les essais d'immunothérapie dans le cancer du pancréas sont décevants. La majorité des tumeurs pancréatiques présente une faible immunogénicité, ce qui les rendent chimiorésistantes aux principales thérapies comme les anticorps anti-PD1 et anti-PDL1. En revanche, il existe probablement un bénéfice des anti-PD1 chez les patients avec un cancer du pancréas présentant une instabilité des microsatellites (MSI). Le et al., ont montré dans une série de patients avec des tumeurs non-colorectales MSI traités par pembrolizumab, des taux de réponses objectives et de stabilité de la maladie de 53% et 77% respectivement (Le et al., 2017). Parmi ces patients, 8 avaient un cancer du pancréas et les taux de réponse objective et de stabilité de la maladie étaient respectivement de 62% et de 75%. Cependant, la prévalence du statut MSI dans le cancer du pancréas ne dépasse pas les 2%.

Les patients atteints d'un adénocarcinome du pancréas dans le cadre d'une mutation germinale des gènes BRCA1 ou BRCA2 sont plus sensibles aux agents entraînant des lésions de l'ADN, comme les sels de platine. Un inhibiteur de la protéine PARP (poly-ADP-ribose-polymérase) (olaparib) a été testé dans un essai randomisé international de phase III comme traitement de maintenance après un traitement d'au moins 16 semaines de chimiothérapie première à base de platine chez des patients avec un cancer du pancréas métastatique. Les patients avec mutations BRCA ont été randomisés en traitement de maintenance par olaparib vs placebo. L'étude était positive en améliorant significativement la survie sans progression (7,4 mois vs 3,8 mois avec un placebo, HR = 0,53, p = 0,004) quelle que soit la réponse à la chimiothérapie d'induction (Golan et al., 2019).

1.12.3. La radiothérapie

La place de la radiothérapie dans l'arsenal thérapeutique contre le cancer du pancréas est controversée. En situation adjuvante, les résultats des études sont contradictoires et aucun bénéfice de survie n'a été démontré même en cas de résection R1 (Liu et al., 2015; Neoptolemos et al., 2001). Plusieurs essais nord-Américains sont en cours pour évaluer l'intérêt d'une radiothérapie adjuvante à la résection chirurgicale d'un cancer du pancréas.

En situations borderline et localement avancée, la radiochimiothérapie de clôture après chimiothérapie d'induction est une option thérapeutique qui permettrait d'optimiser la réponse objective et d'augmenter le taux de résécabilité (Pietrasz et al., 2019). Deux essais randomisés sont en cours actuellement afin de déterminer la place de la radiothérapie dans la prise en charge du cancer du pancréas borderline (essai PANDA) et localement avancé (essai NEOPAN).

1.13. Conclusion

Le cancer du pancréas est une véritable problématique de santé publique avec un pronostic très sombre malgré les récents progrès médico-chirurgicaux. En effet, la plupart des patients récidivent après une résection chirurgicale et ceux traités par chimiothérapie présentent souvent un échappement thérapeutique. L'installation d'une chimiorésistance est à l'origine de ce mauvais pronostic. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la chimiorésistance du cancer du pancréas que nous allons détailler dans cette deuxième partie d'introduction.

2. Mécanismes de chimiorésistance du cancer du pancréas

2.1. Les facteurs génétiques

Comme détaillé dans la première partie du mémoire, la transformation en adénocarcinome pancréatique est orchestrée par la survenue progressive de plusieurs mutations génétiques (*K-ras*, *p16* ...). Certaines de ces mutations seraient impliquées également dans la chimiorésistance. La mutation de l'oncogène *K-ras* est la mutation génétique la plus fréquemment observée dans le cancer du pancréas. La mutation la plus fréquente est localisée sur le codon 12 avec une substitution d'un résidu glycine (G) par un résidu acide aspartique (D) (mutation G12D). En effet, l'oncogène *K-ras* code pour une protéine de 21 kDa à activité GTPasique impliquée dans la transduction de signaux prolifératifs et antiapoptotiques. Leur activité GTPasique fonctionne comme interrupteur GDP/GTP. La forme GTP est active tandis que la forme GDP est inactive. L'inactivation de la protéine *K-Ras* est assurée par une GTPase Activating Proteine (GAP) qui hydrolyse le substitut GTP. La mutation G12D bloque l'interaction *K-Ras*/GAP et aboutit ainsi à une suractivation de la protéine *K-Ras* et par conséquent l'activation de voies de signalisation impliquées dans la survie, la prolifération, la migration et la chimiorésistance (Réjiba et al., 2007; Collins et al., 2014; Bryant et al., 2014).

Plusieurs données suggèrent l'implication de *K-ras* dans la chimiorésistance du cancer du pancréas. En effet, les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques non mutées *K-ras* sont sensibles à la gemcitabine contrairement aux lignées mutées. De plus, certains auteurs ont montré que l'inhibition de *k-ras* était associée à une amélioration de l'efficacité de la gemcitabine in vitro et à une réduction du volume tumoral in vivo (Réjiba et al., 2007). Par ailleurs, plusieurs études ont analysé l'impact pronostique de la mutation *K-ras* en cas de chimiothérapie comportant la gemcitabine. Une étude de phase II a montré que les patients

avec un cancer du pancréas localement avancé ou métastatique muté *K-ras* avaient un pronostic plus péjoratif que les patients sans mutation *K-ras* en cas de traitement par gemcitabine (Schultheis et al., 2017). Un autre essai de phase III évaluant l'association gemcitabine-erlotinib suivie par capecitabine par rapport à la capecitabine associée à l'erlotinib, a montré que la mutation *K-ras* est un critère de mauvais pronostic (Boeck et al., 2013). Ces résultats ont amené à considérer la voie de signalisation K-ras comme une potentielle cible thérapeutique (Waters et al., 2018).

D'autres mutations génétiques ont été décrites comme potentiellement associées à la chimiorésistance du cancer du pancréas. La voie de signalisation PI3K/AKT est une des cibles activées par K-ras mais qui peut également subir des mutations durant la carcinogenèse pancréatique. Une fois activée, la protéine AKT a plusieurs cibles dont le *mammalian target of rapamycin* (mTOR) et le facteur de transcription NFκB qui jouent un rôle dans la prolifération, la survie, la résistance à l'apoptose et l'invasion (Schneider et al., 2009). L'activation de cette voie de signalisation peut également survenir après l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur codant pour la protéine *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) considérée comme un inhibiteur naturel de cette voie de signalisation. Des travaux in vitro ont montré que la chimiorésistance des cellules cancéreuses pancréatiques était inversement proportionnelle au niveau d'expression de l'antagoniste PTEN (Kim et al., 2007). Plusieurs acteurs de la voie de signalisation PI3K/AKT ont été ciblés par des inhibiteurs pharmacologiques dans des essais cliniques de phase I et II avec des résultats intéressants (Conway et al., 2019).

L'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) est un récepteur transmembranaire qui fait partie de la famille des facteurs de croissance épidermiques erbB. Son domaine intracellulaire à

activité tyrosine kinase est impliqué dans de nombreux processus de prolifération cellulaire, de motilité et d'apoptose. Après l'activation du récepteur EGFR, une cascade de phosphorylation par son domaine tyrosine kinase va déclencher l'activation de plusieurs voies de signalisation dont les voies K-ras, MAP kinases et PI3K/AKT. La surexpression de l'EGFR est souvent observé dans le cancer du pancréas et reste associée à un mauvais pronostic (Garcea et al., 2005). Il a été démontré que le niveau d'expression de l'EGFR est directement corrélée à la chimiorésistance des cellules cancéreuses pancréatiques, suggérant l'implication de l'EGFR dans la résistance à la gemcitabine (Walsh et al., 2013). Plusieurs molécules antagonistes de l'EGFR ont été développées dont la plus connue est l'Erlotinib qui n'a pas montré d'efficacité en terme de survie en association à la gemcitabine en situation adjuvante et localement avancée (Sinn et al., 2015, 2017; Hammel et al., 2016). En revanche, un essai de phase III a montré une amélioration significative de la survie en cas d'association gemcitabine-Erlotinib par rapport à la gemcitabine seule chez les patients avec un cancer du pancréas non résecable ou métastatique même si le gain de survie n'était que très modeste (Moore et al., 2007).

SMAD4 est un gène suppresseur de tumeur dont l'inactivation survient dans les stades tardifs de la cancérogenèse pancréatique. Après activation du récepteur du TGF- β par son ligand, une cascade de phosphorylation permet l'activation de SMAD4 qui forme un complexe avec d'autres protéines de la famille SMAD. Ce complexe se fixe sur un site spécifique (Smad binding element) d'ADN permettant la régulation de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire. La mutation du gène de *SMAD4* survient chez environ 50% des patients avec un cancer du pancréas (Hahn et al. 1996) et elle est considérée comme un facteur de mauvais pronostic (Wang et al., 2017). De plus, les études réalisées in vitro montrent

clairement que la perte d'expression de *SMAD4* est associée à une chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques (Chen et al., 2014).

P53 est un gène suppresseur de tumeur qui régule le cycle cellulaire. Sa mutation ne survient que tardivement dans le cycle de la carcinogenèse pancréatique et elle est retrouvée chez 40 à 87% des patients avec un cancer du pancréas (Lu et al., 2017). La mutation *p53* est associée à un mauvais pronostic et contribue à la chimiorésistance du cancer du pancréas. En effet, les données in vitro suggèrent que la protéine p53 mutée diminue la chimiosensibilité des cellules tumorales pancréatiques à la gemcitabine et que la restauration de l'activité p53 améliore la réponse à la chimiothérapie (Cascalló et al., 2005; Camp et al., 2013; Fiorini et al., 2015).

Malheureusement, les résultats des essais ciblant les mécanismes génétiques impliqués dans la chimiorésistance sont décevants. De plus, ces mutations ne sont pas suffisantes pour expliquer la chimiorésistance du cancer du pancréas ce qui laisse penser que la résistance aux drogues impliquerait le phénotype tumoral plutôt que le génotype.

2.2. Les facteurs épigénétiques

En plus de la survenue de mutations génétiques, la carcinogenèse pancréatique est la conséquence de modifications épigénétiques impliquées dans le développement et la progression tumorales. Plusieurs processus épigénétiques ont été décrits comme des facteurs pouvant expliquer la chimiorésistance du cancer du pancréas.

2.2.1. La méthylation de l'ADN

Il s'agit de l'ajout par des ADN méthyltransférases (DNMT) de groupement méthyl sur des cytosines dans des sites spécifiques (riches en cytosine et guanine). La carcinogenèse pancréatique fait appel à des processus d'hypométhylation qui activent certains oncogènes et

d'hyperméthylation de promoteurs de gènes suppresseur de tumeurs aboutissant à leur inactivation. Une surexpression de la DNMT est associée à des stades avancés et un mauvais pronostic du cancer pancréas. Des inhibiteurs de la DNMT ont été développés dont les plus connus sont l'azacytidine et la decitabine. Ces inhibiteurs réduisent significativement la prolifération des cellules tumorales pancréatiques et augmentent leur chimiosensibilité à la gemcitabine (Susanto et al., 2015; Missiaglia et al., 2005).

2.2.2. La modification des histones

Différentes modifications épigénétiques sur les histones ont été décrites dans le cancer du pancréas (méthylation, acétylation, phosphorylation ...). L'implication de ces modifications épigénétiques dans la chimiorésistance du cancer du pancréas a été étudiée in vitro. Ono et al. ont démontré que l'histone acétylase p300 jouait un rôle dans la résistance à la gemcitabine des cellules tumorales pancréatiques (Ono et al., 2016). La méthylation des histones est également impliquée dans la chimiorésistance du cancer du pancréas (Hung et al., 2013).

2.2.3. Les micro-ARNs

Les micro-ARNs (miR) sont des petits ARN non codants composés de 18 à 24 nucléotides et jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes. Après sa liaison à un ARN messager (ARNm) cible, un complexe *RNA-induced silencing complex* (RISC) se forme et active des voies de dégradation ce qui aboutit au clivage de l'ARNm. Leur implication dans chimiorésistance a été évoquée dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses dont celles du cancer du pancréas. Moriyama et al., ont étudié l'expression de miR-21 dans les lignées pancréatiques normales et cancéreuses et son rôle dans la chimiorésistance. miR-21 était surexprimé dans les cellules cancéreuses pancréatiques par rapport aux cellules normales. En outre, la transfection de miR-21 dans les cellules cancéreuses pancréatiques

permettait d'accroître leurs capacités de prolifération, d'invasion et de résistance à la gemcitabine (Moriyama et al., 2009). A l'inverse, miR-497 et miR-33a sont sous-exprimés dans les cellules cancéreuses pancréatiques résistantes à la gemcitabine et que leur surexpression augmente ainsi la chimiosensibilité (Jianwei Xu et al., 2014; Liang et al., 2015). D'autres miR sont impliqués dans la chimiorésistance du cancer du pancréas en régulant plusieurs voies de signalisation impliquées dans le cycle cellulaire, la survie, la réparation de l'ADN et le métabolisme des drogues (Le Ren et al., 2018). Par exemple, une forte expression intratumorale de miR-1266 était corrélée à un mauvais pronostic et à une résistance à la chimiothérapie adjuvante (Zhang et al., 2018). De plus, les auteurs ont montré que la surexpression de miR-1266 dans les cellules cancéreuses pancréatiques leur conférait des propriétés de chimiorésistance à la gemcitabine. La chimiorésistance à la gemcitabine médiée par miR-1266 est due à l'activation des voies de signalisation NFκB et STAT3 (Zhang et al., 2018).

Il a été également démontré que la chimiorésistance induite par miR-365 ciblait la une protéine de la famille Src et la protéine BAX impliquée dans l'apoptose (Hamada et al., 2014). Une autre étude a montré que l'expression de miR-1246 induisait une chimiorésistance en inhibant l'expression d'une cycline (CCNG2) (Hasegawa et al., 2014).

Plusieurs essais de phase I/II évaluant des thérapeutiques qui ciblent des processus épigénétiques sont en cours. Les monothérapies semblent inefficaces et une association avec les molécules de chimiothérapie serait probablement plus pertinente.

2.3. Le métabolisme de la gemcitabine

L'effet cytotoxique de la gemcitabine ou dFdC est conditionné par le passage intracellulaire de la molécule. Les transporteurs membranaires hENT (hENT1, et 2) et hCNT (hCNT1, 2 et

3) assurent le passage intracellulaire de la gemcitabine avec un rôle primordial du transporteur hENT1 (Mini et al. 2006). comme détaillé dans la figure 13, la gemcitabine est métabolisée par la désoxycytidine kinase (dCK) en nucléosides di (dFdCDP)- et tri-phosphate (dFdCTP). Le dFdCTP est incorporé dans l'ADN, inhibant ainsi l'élongation de l'ADN. La dFdCDP bloque la synthèse des désoxy-ribonucléotides en inhibant la ribonucléase réductase. D'un autre côté, la cytidine désaminase (CDA) et désoxycytidylate désaminase (DCTD) inactivent respectivement le dFdC et le dFdCDP.

La chimiorésistance associée au métabolisme de la gemcitabine est due à des anomalies de l'expression d'un ou plusieurs acteurs qui participent à l'activation ou l'inhibition de la gemcitabine.

2.3.1. Anomalies des transporteurs membranaires

La corrélation entre l'expression des transporteurs membranaires et la chimiorésistance à la gemcitabine a été rapportée in vitro. En effet, une faible expression membranaire du transporteur hENT1 réduit la concentration intracellulaire de gemcitabine et permet donc à la cellule tumorale de développer une résistance à la gemcitabine (Mackey et al., 1998). De même, les tumeurs pancréatiques à faible expression des transporteurs hENT1 et hCNT3 sont associées à mauvais pronostic par rapport aux tumeurs exprimant fortement ces molécules (Maréchal et al., 2009; Ciccolini et al., 2011). L'expression des transporteurs membranaires est modulée par d'autres mécanismes. La protéine transmembranaire MUC4 joue un rôle dans la chimiorésistance du cancer du pancréas et inhibe l'expression de hCNT1 via la voie de signalisation NFκB (Chaturvedi et al., 2007; N. Skrypek et al., 2013). De la même façon, le récepteur HER2 induit une résistance à la gemcitabine des lignées Capan-1 et Capan-2 en modulant l'expression des transporteurs hCNT1 et hCNT3 (Skrypek et al., 2015). Il a été

également suggéré que le microenvironnement tumoral induit une résistance à la gemcitabine en régulant l'expression de certains transporteurs (Hesler et al., 2016).

2.3.2. La désoxycytidine kinase (dCK)

La dCK joue un rôle clé dans le métabolisme de la gemcitabine. Les études réalisées in vitro et in vivo ont montré une forte corrélation entre l'expression de la dCK et la sensibilité à la gemcitabine (Funamizu et al., 2010; Kroep et al., 2002). En immunohistochimie, une faible expression de la dCK est corrélée à une faible survie des patients avec un cancer du pancréas traités par gemcitabine (Sebastiani et al., 2006).

2.3.3. La cytidine désaminase (CDA)

La CDA est une enzyme qui transforme la gemcitabine en un métabolite inactif, la 2'-désoxyfluorouridine (dFdU). Les résultats des études in vitro montrent une surexpression de la CDA dans les cellules résistantes à la gemcitabine (Eda et al., 1998). Cependant, on manque de données cliniques pour mieux comprendre le rôle de la CDA dans la chimiorésistance à la gemcitabine.

2.3.4. La ribonucléotide réductase (RR)

La RR est responsable de la conversion des ribonucléotides en désoxyribonucléotides, substrat essentiel pour la synthèse de l'ADN. La forme bi-phosphorylée de la gemcitabine ou dFdCDP inhibe la RR bloquant ainsi la synthèse de l'ADN dans la cellule tumorale. In vitro, l'acquisition d'une chimiorésistance à la gemcitabine des cellules Panc-1 était associée à une surexpression de la RR et son inhibition dans les cellules MiaPaca-2 rendait ces cellules sensibles à la gemcitabine (Wang et al., 2015; Minami et al., 2015). Des résultats similaires ont été observés dans les modèles murins de xénogreffe de cancer du pancréas (Jonckheere et al., 2012). De

plus, le niveau d'expression de la RR est inversement corrélé à la survie globale des patients avec un cancer du pancréas traités par gemcitabine (Nakahira et al., 2007).

L'altération du métabolisme de la gemcitabine est un des mécanismes expliquant l'émergence d'une chimiorésistance dans le cancer du pancréas. L'utilisation de prodrogues ou de nanoparticules couplées à la gemcitabine pourrait améliorer sa disponibilité.

2.4. Le micro-environnement tumoral

Le micro-environnement tumoral ou stroma tumoral joue un rôle majeur dans la chimiorésistance du cancer du pancréas. Composé de matrice extra-cellulaire (MEC) et d'une composante cellulaire polymorphe, le stroma constitue l'essentiel du volume tumoral pancréatique. Le stroma tumoral est une structure complexe et dynamique qui induit la prolifération des cellules tumorales et la résistance aux traitements (Erkan et al., 2008).

2.4.1. La matrice extra-cellulaire (MEC)

Le cancer du pancréas est caractérisé par une riche MEC, ce qui explique le caractère dense et fibreux de ces tumeurs. Elle est composée essentiellement de collagènes, de glycoprotéines, d'élastine et de protéoglycannes. La MEC interagit avec les différentes composantes cellulaires du stroma formant un stroma réactif appelé réaction desmoplastique qui favorise la prolifération, l'invasion et la chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques. In vitro, les protéines composant la MEC (collagène, fibronectine, laminine...) augmentent la chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques (Miyamoto et al., 2004). Les collagène de type I, III et IV sont abondamment sécrétés dans les tumeurs pancréatiques. Nous disposons de quelques données qui suggèrent l'implication du collagène de type I dans la résistance des cellules tumorales pancréatiques à la gemcitabine par une augmentation de

l'acétylation des histones (Dangi-Garimella et al., 2013). D'autres auteurs ont montré que la fibronectine, un autre composant de la MEC, contribuait à la chimiorésistance à la gemcitabine via l'activation de la voie de signalisation médiée par ERK1/2 (Amrutkar et al., 2019).

1.4.1. Les cellules souches cancéreuses (CSC)

Les CSC jouent un rôle critique dans la chimiorésistance de plusieurs cancers dont le cancer du pancréas (Valle et al., 2018). Elles sont intrinsèquement plus résistantes que les autres types cellulaires et leur présence indique une résistance accrue à la gemcitabine dans les modèles murins de xénogreffe de cancer du pancréas (Li et al., 2011). Cette chimiorésistance médiée par les CSC implique divers mécanismes dont le métabolisme des drogues, activation de certains oncogènes et l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs (Dawood et al., 2014). Les CSC représentent environ 1% des cellules du cancer du pancréas et expriment certains marqueurs spécifiques (CD133, CD24, CD44...) (Di Carlo et al., 2018) leur permettant d'assurer une croissance des cellules tumorales dans un milieu propice.

2.4.2. Les fibroblastes associés au cancer (CAF)

Il s'agit de cellules pancréatiques stellaires différenciées en un phénotype de myofibroblastes activés. Les CAF sécrètent des protéines comme le collagène, la fibronectine et la laminine qui servent à la formation d'un stroma fibreux. Elles interagissent avec toutes les composantes du stroma tumoral afin de préserver la plasticité phénotypique, la prolifération des cellules tumorales et développer une chimiorésistance (Figure 14). Le rôle des CAF dans la résistance à la gemcitabine a été largement étudié. Qian et al., ont montré que la mise en culture de cellules tumorales pancréatiques en présence de CAF leur permet d'acquérir des capacités invasives et de chimiorésistance (Qian et al., 2003; Muerköster et al., 2004).

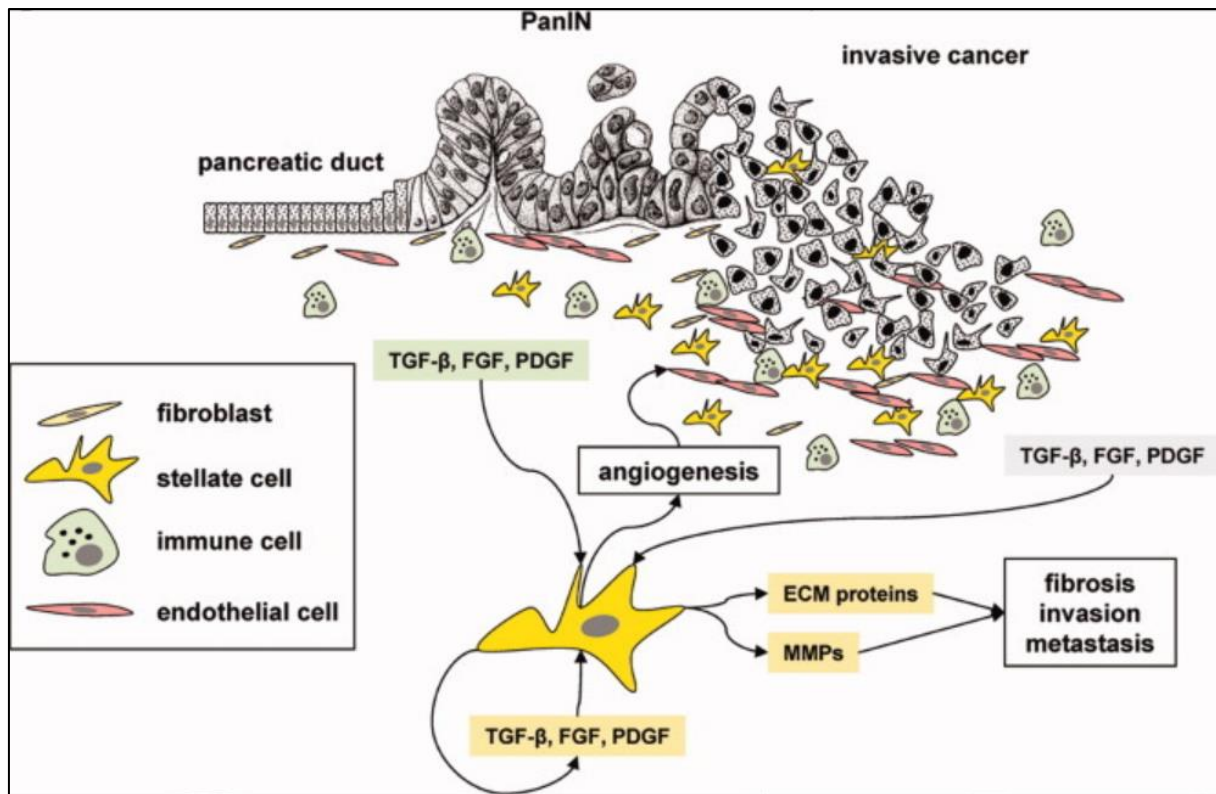


Figure 14 : Les interactions entre la cellule stellaire pancréatique activée (CAF) et le stroma tumoral selon Kleeff et al (Kleeff et al. 2007). Les CAF jouent un rôle central dans l'activation des composantes cellulaires et acellulaires du stroma tumoral via la sécrétion de cytokines qui ont une action autocrine et paracrine.

2.4.3. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM)

Les TAM sont une composante essentielle du stroma tumoral et jouent un rôle critique dans la régulation de la progression tumorale. Ces cellules sont capables non seulement de stimuler la croissance des cellules cancéreuses pancréatiques, mais également d'inhiber la réponse immunitaire et stimuler l'angiogenèse (Ino et al. 2013; Kurahara et al. 2011). Leur implication dans la chimiorésistance a été évoquée par Amit et al., qui ont montré que les TAM stimulaient l'expression de l'enzyme CDA qui catabolise la gemcitabine en forme inactive (Amit et al., 2013).

Le microenvironnement tumoral du cancer du pancréas est une cible thérapeutique intéressante pour réduire la résistance aux drogues. Le caractère immuno-quiescent du

cancer du pancréas explique l'échec jusqu'à présent des mono-immunothérapies. Des essais sont en cours pour évaluer l'efficacité de l'association gemcitabine – antiPD1 et gemcitabine – anti-CTLA4.

2.5. Conclusion

Les mécanismes mis en jeu par les cellules cancéreuses pancréatiques sont multiples ce qui explique la survenue rapide d'une chimiorésistance et d'un échappement thérapeutique. Tous ces mécanismes sont en interaction permanente et impliquent des processus génétiques, cellulaires et environnementaux complexes dont certains ont fait l'objet de ciblage thérapeutique.

3. La transition épithélio-mésenchymateuse

3.1. Définition

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un processus dynamique caractérisé par une transdifférenciation cellulaire permettant aux cellules épithéliales d'acquérir des caractéristiques de cellules mésenchymateuses. La TEM a été décrite initialement par Gary Greenburg et Elizabeth Hay en 1982 dans une lignée d'embryons de poulet (Greenburg and Hay 1982) rapportant un phénomène de "transformation épithélio-mésenchymateuse". Au fil du temps, la transformation a laissé place à transition pour refléter le caractère transitoire et la réversibilité de la TEM. En plus de modifications morphologiques, la TEM est associée à des changements phénotypiques et fonctionnels en réponse à des stimuli extérieurs. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la TEM au cours de plusieurs processus physiologiques ou pathologiques.

3.2. La perte du phénotype épithélial

Les cellules épithéliales sont des cellules juxtaposées et jointives qui sont solidarées par des complexes jonctionnels multiples. Elles sont séparées du tissu conjonctif par une membrane basale. Les cellules épithéliales sont polarisées et présentent un pôle apical vers la lumière de l'organe ou le milieu extérieur, un pôle basal qui communique avec le tissu conjonctif et des faces latérales communiquant avec les cellules adjacentes.

3.2.1. La perte de l'adhésion intercellulaire

La perte de l'adhésion intercellulaire est secondaire à la diminution de l'expression des protéines adhésives :

- **Les intégrines :** Elles jouent un rôle essentiel dans les interactions entre les cellules épithéliales et la MEC. Elles sont composées de deux sous-unités α et β qui interagissent avec les ligands de la MEC (collagène, laminine, fibronectine ...), permettant ainsi la transmission des signaux en provenance du cytosquelette. Les intégrines jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologique (adhésion cellulaire, migration, prolifération et survie) ou pathologique (progression tumorale) (Chen et al., 2012). Après liaison avec un ligand spécifique, les intégrines activent des kinases d'adhésion focale (FAK) et des kinases de la famille SRC (SFK) qui vont à leur tour activer plusieurs voies de signalisations dont celle des MAPKinases (Mitogen Activated Protein Kinase) (Figure 15). L'implication des intégrines dans la TEM a été largement étudiée. Weaver et al., ont montré que l'utilisation d'anticorps anti-intégrine $\beta 1$ induisait une formation de jonctions adhérentes et la réapparition d'une polarité cellulaire (Weaver et al., 1997). A l'inverse, la surexpression de l'intégrine $\beta 1$ était associée à une perte de l'adhésion intercellulaire au niveau des jonctions adhérentes (Gimond et al., 1999). De plus, les intégrines $\alpha 5\beta 6$ et $\alpha 5\beta 8$ sont directement impliquées dans la TEM par l'activation de la voie du TGF β (Guo and Giancotti 2004).

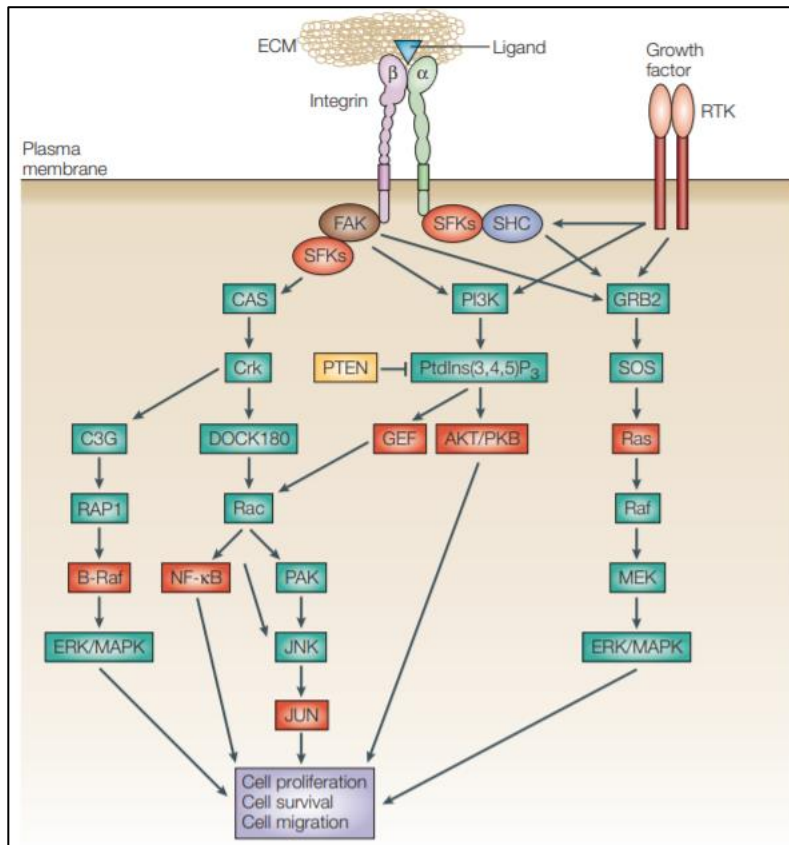


Figure 15 : La signalisation des intégrines selon Guo and Giancotti 2004.

L'activation des intégrines par un ligand de la MEC permet l'activation des voies de signalisation des MAPkinases, JNK/JUN, NFκB et AKT/PKB qui stimulent la prolifération, la survie et la migration cellulaire. Les intégrines exercent également un contrôle sur les Récepteurs tyrosines kinases (RTK).

- **Les cadhérines :** Il s'agit de la principale classe protéique de l'adhésion intercellulaire. Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires, caractéristiques des cellules épithéliales. La famille des cadhérines comporte plusieurs membres dont la principale est la E-cadhérine ou CDH1. Elle est localisée dans les jonctions adhérentes et dans la membrane plasmique basolatérale et permet par son extrémité extracellulaire des interactions entre deux cellules voisines. Parallèlement, la région intracytoplasmique de la E-cadhérine interagit avec le cytosquelette d'actine via les α et β-caténines (Yilmaz and Christofori 2009). Ce complexe assure donc une stabilité cellulaire et permet de moduler l'organisation du cytosquelette.

En plus de sa fonction d'adhésion intercellulaire, la E-cadhérine transmet des signaux en interagissant avec la β -caténine, c-Met, les récepteurs de l'HGF ou l'IGF1 ou les intégrines (Comoglio et al., 2003). Son expression est strictement contrôlée par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels.

La répression de la transcription de la E-cadhérine est assurée par des facteurs de transcription dont Snail1, Snail 2, ZEB-1, ZEB-2 et Twist. Ces répresseurs transcriptionnels de la E-cadhérine sont généralement exprimés après l'activation de voies de signalisation médiées par des facteurs inducteur de la TEM (TGF β , HGF, EGF ...). La fixation de ces répresseurs transcriptionnels sur le promoteur du gène de la E-cadhérine permet la répression de sa transcription via des mécanismes épigénétiques (Lin et al., 2014; Serrano-Gomez et al., 2016).

La répression de la E-cadhérine peut également survenir pendant la phase post-transcriptionnelle par inhibition de son transport vers la membrane par O-glycolysation, par clivage protéolytique ou par endocytose (Yilmaz and Christofori 2009). La E-cadhérine peut également être phosphorylée par des RTK, ce qui aboutit à son ubiquitination et sa dégradation par la E3 ubiquitine ligase (Fujita et al., 2002). Par ailleurs, la phosphorylation de la β -caténine par les FAKs se traduit par une déstabilisation des jonctions adhérentes et la perte de l'adhésion intercellulaire (Koenig et al., 2006).

- **Les caténines** : Ce sont des partenaires incontournables des cadhérines. Composée de plusieurs membres, la famille des caténines joue un rôle incontournable dans l'adhésion intercellulaire et le contrôle de l'expression de certains gènes.

- **La β -caténine** : Elle relie le versant intracellulaire de la E-cadhérine aux filaments d'actine dans un complexe qui comprend α -caténine. Habituellement, le niveau basal de la β -

caténine cytoplasmique reste bas. Cela est dû au complexe Axin/APC/GSK3 β dont elle fait partie et qui va déclencher la phosphorylation de la β -caténine par la GSK3 β (Glycogen synthase kinase-3 β) et puis sa dégradation par le protéasome (Figure 16). Cependant, la liaison d'une protéine de la famille Wnt sur le récepteur Frizzled et au corécepteur LRP (Low Density Lipoprotein-Related Protein) permet l'inhibition de la phosphorylation de la β -caténine par GSK3 β et son accumulation dans le cytoplasme puis sa translocation dans le noyau pour se lier au complexe TCF (T cell factor)/LEF (lymphoid enhancer factor) et réguler l'expression de gènes cibles (Novak and Dedhar 1999).

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation et la progression tumorale (Tanabe et al., 2018). Son implication dans la TEM a été évoquée dans de nombreux cancers dont le cancer de la prostate (Jiang et al., 2007), le cancer du côlon (Brabletz et al., 2005) et le cancer du pancréas (Sarkar et al., 2009). Sur le plan moléculaire, certains gènes codant pour des acteurs de la TEM (Snail2, ZEB1, Twist et la vimentine) sont des cibles de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, qui stimule leur expression et permet ainsi une diminution de l'expression de la E-cadhérine (Menezes et al., 2014). Il a été également montré que les antagonistes de la voie Wnt/ β -caténine comme la protéine WIF-1 (Wnt inhibitory factor-1), NKD-1 (Naked cuticle homolog 1) et les protéines Dickkopfs (DKKs) inhibaient la TEM (Menezes et al., 2014).

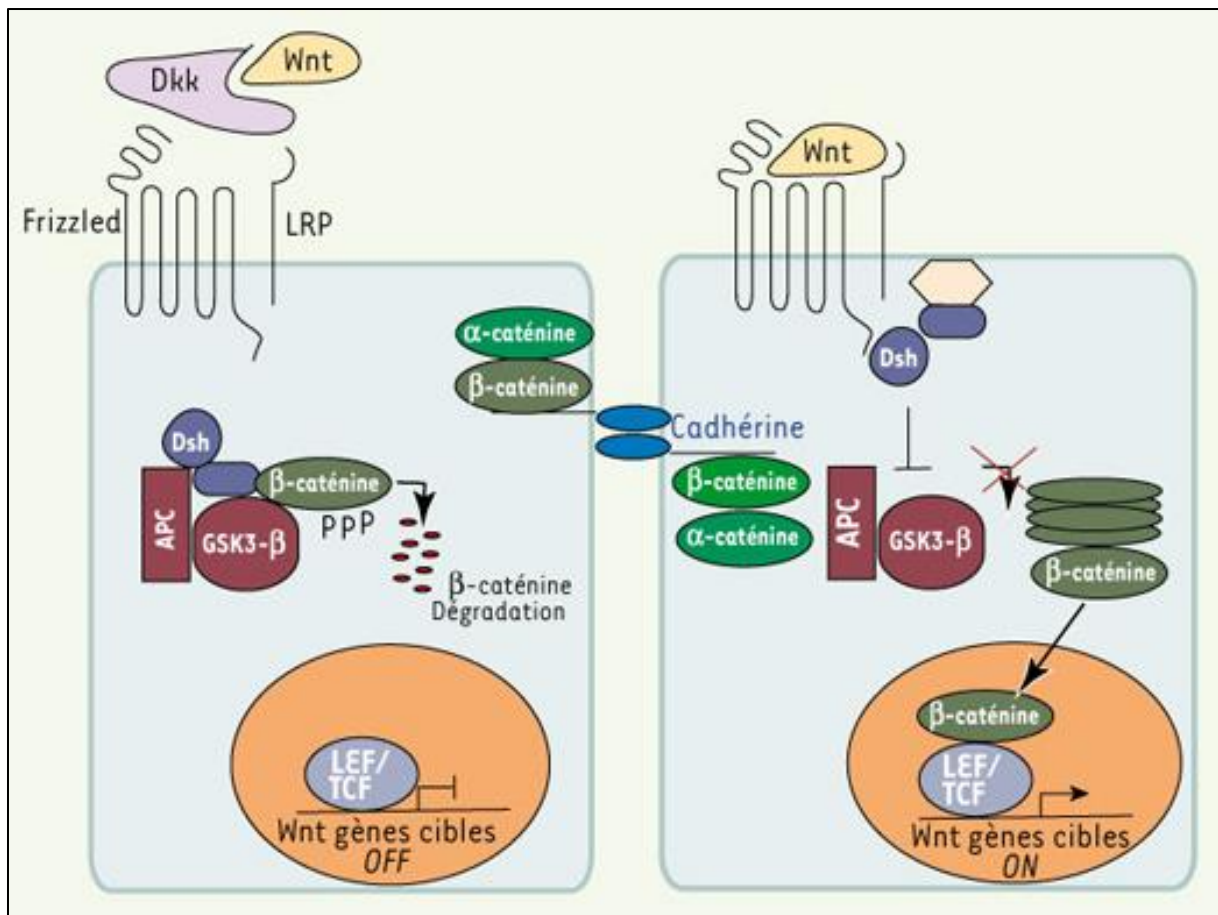


Figure 16 : La voie de signalisation Wnt/ β -caténine selon Blanpain (Blanpain et al., 2007). En absence du ligand wnt, la voie de signalisation est inhibée et la β -caténine cytoplasmique est rapidement phosphorylée par la GSK3 β ce qui aboutit à son ubiquitination puis sa dégradation par le protéasome. La fixation de Wnt sur son récepteur membranaire Frizzled inhibe la phosphorylation de la β -caténine et qui sera transloquée dans le noyau et formera un complexe avec les facteurs LEF/TCF pour activer l'expression des gènes impliqués dans la TEM.

- **α -Caténine** : Elle est liée à la β -caténine et participe à l'ancrage de la E-cadhérine à l'actine permettant ainsi régulation de l'adhésion intercellulaire. Le rôle joué par α -caténine dans TEM n'est pas bien élucidé même si les quelques données suggèrent son implication dans ce phénomène. En effet, une perte d'expression de α -caténine a été observée dans de nombreuses lignées cancéreuses in vitro. Il a été également démontré qu'une faible expression de α -caténine était considérée comme un facteur de mauvais pronostic dont la sensibilité était meilleure que celle de la perte d'expression de la E-cadhérine (Benjamin and

Nelson 2008). De plus, des auteurs ont montré une plus forte expression de α -caténine dans les sites métastatiques par rapport aux tumeurs primitives (Bukholm et al., 2000). Ces données laissent penser que α -caténine pourrait jouer un rôle dans la TEM.

- **La P120 caténine** : C'est une protéine de 120 kDa qui interagit avec le domaine cytoplasmique de la E-cadhérine dans les jonctions adhérentes. La P120 régule l'endocytose de la E-cadhérine et assure sa stabilité. Outre sa régulation de la E-cadhérine, la P120 contrôle l'activité de certaines Rho GTPases qui sont responsables de la motilité cellulaire (Anastasiadis et al., 2007). Il existe plusieurs isoformes de la P120 qui diffèrent en fonction de leur capacité à inhiber ou activer les Rho GTPases. L'isoforme 1 de la P120 est un inhibiteur de la Rho GTPase avec une expression prédominante dans les cellules mésenchymateuses. En revanche, les isoformes 3 et 4 activent la Rho GTPase et prédominent dans les cellules épithéliales (Kourtidis et al., 2013). Au niveau nucléaire, la P120 active la voie de signalisation Wnt/ β -caténine en inhibant le facteur de transcription Kaiso.

- **ZO (Zona Occludens)** : est la principale protéine des jonction serrées en plus de l'occludine et de la claudine. Ces dernières, sont des protéines transmembranaires alors que les protéines ZO sont intracellulaires reliant le complexe des jonctions serrées aux filaments d'actine. Il a été rapporté une délocalisation de la protéine ZO-1 de la membrane vers le cytoplasme au cours des processus de migration cellulaire, voire une translocation de cette protéine vers le noyau (Gottardi et al., 1996). ZO-1 jouerait un rôle dans la TEM en interaction avec la voie Wnt/ β -caténine (Polette et al., 2007).
- **EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule)** : Appelée aussi CD326, EpCAM est une glycoprotéine transmembranaire spécifique des cellules épithéliales. Il s'agit d'une protéine oncogénique exprimée dans de nombreux cancers et impliquée dans une multitude de

processus comme la migration, la prolifération, la différenciation et la progression tumorale (Patriarca et al., 2012). De plus, Il a été montré que EpCAM est un marqueur de cellules souches tumorales dont la surexpression est un marqueur d'agressivité tumorale (Imrich et al., 2012). Le signal prolifératif et induisant la TEM est dû au clivage d'EpCAM par des protéases permettant la libération du domaine intracellulaire d'EpCAM qui forme un complexe avec FHL2 (Four and a half LIM domains 2) et la β -caténine. Ce complexe est transloqué au noyau afin d'activer la transcription de gènes cibles de la famille TCF/LEF.

La TEM est associée à la perte de l'expression d'autres protéines épithéliales comme la desmoplakine, la cytokératine, l'ostéopontine ...

3.2.2. La perte de la polarité cellulaire

Les cellules épithéliales sont caractérisées par une polarité en un domaine apical et un domaine basolatéral, séparés par des jonctions serrées. Le domaine apical est en contact avec le monde extérieur ou la lumière de l'organe et le domaine basolatéral communique avec les cellules voisines et la MEC. Malgré l'existence d'une continuité entre les deux domaines, ils sont fonctionnellement et biochimiquement distincts. Le domaine apical comporte les protéines nécessaires aux fonctions spécifiques de l'organe alors que le domaine basolatéral est constitué de protéines requises pour les processus cellulaires fondamentaux. Cette polarité est régulée par trois complexes protéiques : Crumbs (Crb), Scribble (Scrib) et PAR. Le domaine apical est maintenu par le complexe PAR composé des protéines PAR-3, PAR-6 et aPKC (atypical protein kinase) et le complexe associant Crb, PALS1 (Protein associated with Lin-1) et PATJ (PALS1-associated tight junction) (Iden and Collard 2008). Le domaine basolatéral est par ailleurs sous le contrôle du complexe Scrib composé des protéines Scrib, Dlg (Discs large) et Lgl (Lethal giant Larvae).

La perte de la polarité cellulaire est un évènement clé de la TEM. Cela implique une interaction entre les complexes protéiques de la polarité et des voies de signalisation impliquées dans la TEM. Par exemple, il a été montré que la protéine aPKC inhibait Snail1 par phosphorylation et que l'inactivation du complexe PAR induit une TEM (Jung et al., 2019). ZEB-1 est un autre facteur de transcription clé de la TEM et qui régule l'expression des protéines impliquées dans la polarité cellulaire (Aigner et al., 2007).

3.3. L'acquisition d'un phénotype mésenchymateux

3.3.1. Expression de marqueurs mésenchymateux

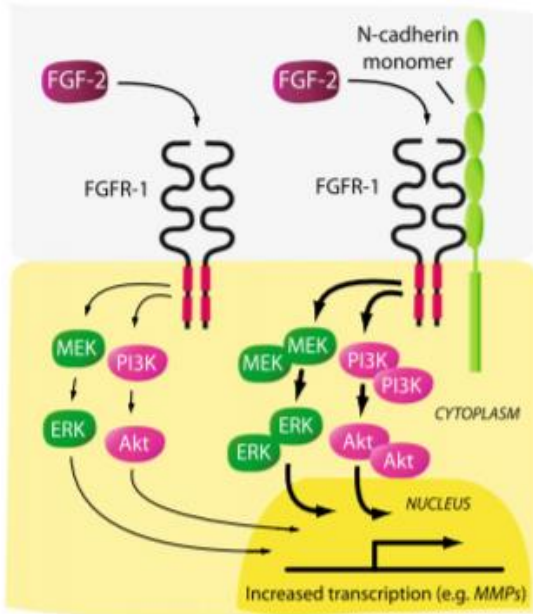
Plusieurs marqueurs mésenchymateux sont exprimés par les cellules au cours du processus de TEM. L'expression de ces protéines est sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcription.

- **N-cadhérine** : C'est une protéine de 130 KDa qui a été identifiée pour la première fois dans la rétine de poulet. La N-cadhérine est normalement exprimée dans les tissus dérivés du neuroectoderme et du mésoderme. Elle est impliquée dans de nombreux processus dont l'adhésion, la différenciation, l'embryogenèse, la migration et l'invasion (Derycke and Bracke 2004). Son domaine intracellulaire est en relation avec de nombreuses protéines comme les caténines α , β et P120. L'implication de la N-cadhérine dans l'agressivité tumorale a été démontrée dans de nombreux cancers. En effet, Il existe une expression *de novo* de la N-cadhérine dans les cellules cancéreuses mammaires, de prostate, de vessie et de thyroïde alors que les cellules normales n'expriment jamais ce marqueur (Derycke and Bracke 2004). De plus, cette néo-

expression de la N-cadhérine est corrélée à l'acquisition de propriétés d'invasion et de potentiel métastatique (Derycke and Bracke 2004). Dans le mélanome et le cancer de l'estomac, les cellules tumorales réexpriment la N-cadhérine, déjà présente dans les précurseurs embryonnaires des mélanocytes et cellules gastriques. Au niveau morphologique, de multiples études *in vitro* et *in vivo* ont révélé une corrélation entre l'augmentation de l'expression de la N-cadhérine et l'acquisition d'un phénotype fibroblastique (Derycke and Bracke 2004).

Comme la E-cadhérine, la N-cadhérine régule plusieurs voies de signalisation. A titre d'exemple, l'activité pro-invasive de la N-cadhérine est due partiellement à une interaction synergique avec le récepteur du facteur de croissance fibroblastique (fibroblast growth factor receptor ou FGFR) permettant sa stabilisation et l'activation de la voie des MAPkinases (Suyama et al., 2002). Elle active également la voie PI3K/AKT permettant ainsi de promouvoir la progression tumorale (Ciolczyk-Wierzbicka et al., 2012; Nalla et al., 2011). Concernant la motilité cellulaire, la N-cadhérine stimule la migration cellulaire en modulant la distribution des protéines de la famille Rho GTPases dans le cytoplasme (Mrozik et al., 2018). Enfin, le complexe intracellulaire de la N-cadhérine libère la β -caténine séquestrée après la liaison de Wnt sur son ligand, ce qui permet l'activation de la transcription des gènes TCF/LEF (Figure 17).

A. Activation du récepteur du FGF



B. Activation de la voie Wnt/ β -caténine

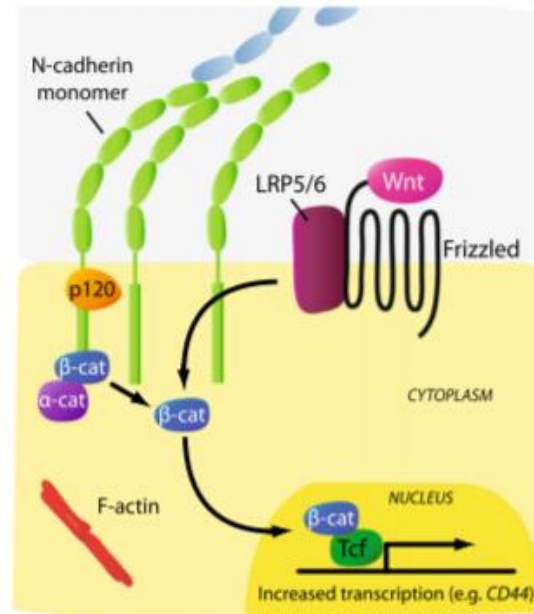


Figure 17 : La signalisation de la N-cadhérine selon Mrozik et al (Mrozik et al., 2018). A : L'interaction entre la N-cadhérine et le FGFR1 potentialise la signalisation du FGF2 permettant l'activation des voies de signalisation MEK/ERK et PI3K/AKT qui stimulent la progression métastatique des cellules tumorales par l'augmentation de l'expression des métalloprotéases (MMP). B : En libérant la β -caténine sur son domaine intracellulaire, la N-cadhérine active régule la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

- **La vimentine :** C'est une protéine de 57 kDa appartenant à la famille des filaments intermédiaires qui constituent avec les microtubules et les microfilaments d'actine, le cytosquelette. La composition des filaments intermédiaires est variable en fonction du type cellulaire; les cytokératines ou filaments intermédiaires de type I sont spécifiques des cellules épithéliales alors que la vimentine fait partie des filaments intermédiaires de type III qui caractérisent les cellules mésenchymateuses. La vimentine participe au maintien de l'intégrité cellulaire mais son expression subit des modifications majeures au cours de la cancérogenèse. L'expression de la vimentine est considérée comme un facteur de mauvais pronostic (Satelli and Li 2011) et prédictive de récurrence tumorale dans de nombreux cancers (Zhang et al., 2009). Au cours de la TEM, les cellules cancéreuses d'origine épithéliale

subissent une perte d'expression de la cytokératine au profit de la vimentine. La régulation de l'expression de la vimentine pendant la TEM implique des mécanismes transcriptionnels, post-transcriptionnels et épigénétiques. Il a été mis en évidence que le promoteur du gène de la vimentine contient des sites de fixation pour le TGF β , NF κ B et β -caténine (Lilienbaum and Paulin 1993; Yongzhong Wu et al., 2007; Gilles et al., 2003). Il a été également montré que la phosphorylation de la vimentine par AKT inhibe sa dégradation par les caspases (Zhu et al., 2011). D'autre part, la vimentine joue un rôle dans l'expression des facteurs impliqués dans la TEM comme Snail2 (Liu et al., 2015). De manière intéressante, il a été montré que l'expression de la vimentine est à l'origine des modifications morphologiques et de la migration cellulaire au cours de la TEM. En effet, la vimentine se lie à la protéine Scrib et inhibe sa dégradation, ce qui favorise la migration cellulaire (Phua, Humbert, and Hunziker 2009). Par ailleurs, la phosphorylation de la vimentine par PKC ϵ (protein kinase C) permet le recyclage de la β 1-intégrine à la surface cellulaire, favorisant ainsi la motilité cellulaire (Ivaska et al., 2011).

- **La fibronectine :** est une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire, la différenciation et la migration (Hynes and Yamada 1982). De haut poids moléculaire, la fibronectine est présente sous forme fibrillaire et joue un rôle clé dans la modulation des interactions entre la cellule et la MEC. Elle comporte une séquence spécifique appelée RGDS (Arginine, Glycine, Acide aspartique, Sérine) qui sera reconnue par un complexe formé d'intégrines et IAP (Integrin associated protein). Ce complexe est relié au cytosquelette par la taline ou la vinculine (Poulouin et al., 1997). En plus de la vimentine, la fibronectine est un des marqueurs clés de la TEM. L'induction de la TEM via la fibronectine est transmise par le complexe des intégrines permettant l'activation des kinases FAK qui ont comme effecteur la voie Ras/MAPKinases. De plus, la fibronectine contrôle l'activité des protéines Rho GTPases

associées au cytosquelette et permet par conséquent l'activation de la motilité cellulaire. Son interaction avec le collagène est également essentielle pour les processus de migration (Erat et al. 2013). Enfin, Il a été démontré la surexpression de la fibronectine était associée à un progression tumorale, un mauvais pronostic et une résistance aux traitements (Yao et al., 2007; Mehrotra et al., 2010; Yu et al., 2013).

- **α -SMA (α -Smooth muscle actin):** est l'une des isoformes de l'actine qui est surtout exprimée dans les cellules musculaires lisses composant les parois vasculaires. L' α -SMA est également exprimée dans les myofibroblastes et permet de les différencier des fibroblastes. En exprimant α -SMA, les myofibroblastes acquièrent des capacités de contraction et jouent un rôle dans des processus physiologiques comme la cicatrisation mais également dans des processus pathologiques comme la fibrose et la carcinogénèse (Anggorowati et al., 2017). De plus, α -SMA est considérée comme un marqueur de TEM, et son expression est considérée comme un critère de mauvais pronostic (Ding et al., 2014).

3.3.2. Acquisition de capacités de migration

La TEM permet aux cellules d'acquérir des capacités de migration lors de plusieurs processus physiologiques (inflammation, cicatrisation, embryogenèse...) ou pathologiques (processus métastatique). La migration fait appel à une réorganisation du cytosquelette d'actine sous l'influence des protéines de la famille Rho GTPases. La polymérisation des filaments d'actine crée des extensions cytoplasmiques appelées lamellipodes et filipodes.

Le processus de migration suit des étapes successives qui se répètent de façon cyclique. D'abord, la polymérisation des filaments d'actine permet la formation de lamellipodes dans le sens de la migration. Ensuite, des jonctions adhérentes se forment au front de migration permettant ainsi de stabiliser la cellule en mouvement. Parallèlement, un détachement des

jonctions adhérentes à l'arrière de la cellule permet de propulser la cellule vers l'avant. La formation des lamellipodes au front de migration est due à la présence d'une polarité cellulaire en terme d'activité kinase PI3K qui phosphoryle PIP-2 (Phosphatidylinositol (4,5) Diphosphate) en PIP-3 (Phosphatidylinositol (3, 4 5) Triphosphate). Ce dernier va permettre d'activer la GTPase Rac-1 qui active à son tour la protéine WAVE (WASP-family Verprolin-homologous protein) qui va permettre d'assembler les filaments d'actine via Arp2/3 (Actin-related protein) (Kurusu and Takenawa 2009) (Figure 18).

Au cours de la TEM, la fixation de facteurs de croissance sur les récepteurs tyrosine kinase active des voies de signalisation permettant de moduler le cytosquelette et déclencher la motilité cellulaire. Héréguline et Amphiréguline sont des ligands du récepteur EGFR, impliquées dans la carcinogenèse et la progression métastatique dans le cancer du sein (Atlas et al. 2003; Willmarth and Ethier 2006). De plus, la surexpression de l'EGFR augmente significativement les capacités migratoires des cellules tumorales ainsi que leur potentiel métastatique, ce qui démontre le rôle crucial de l'EGFR dans le phénomène de migration cellulaire (Xue et al., 2006; Wyckoff et al., 2004). Le récepteur Met (mesenchymal-epithelial transition factor) est un récepteur à tyrosine kinase dont le seul ligand connu est le facteur de croissance hépatocytaire ou HGF (hepatocyte growth factor). Le complexe Met/HGF participe au remodelage du cytosquelette et active des métalloprotéases ce qui favorise la motilité de la cellule (Ma et al., 2003). Le stroma tumoral joue également un rôle majeur dans la motilité cellulaire via les CAFs et les MATs en sécrétant les facteurs de croissance HGF et EGF (Kedrin et al., 2007).

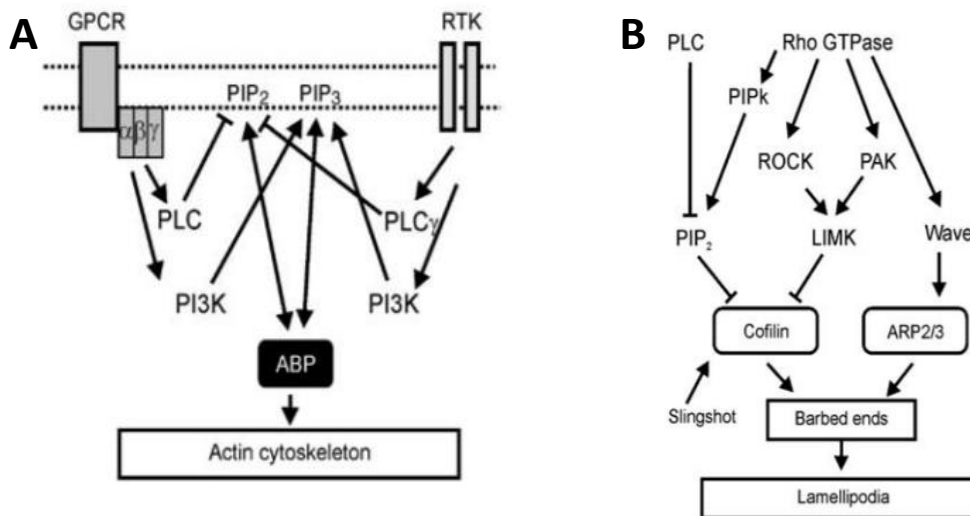


Figure 18 : Formation des lamellipodes et remodelage du cytosquelette d'actine au cours de la migration cellulaire selon Kedrin et al (Kedrin et al., 2007). A : l'activation des récepteurs tyrosine kinase (RTK) et des récepteurs couplés à la protéine G (GPCR) permet l'activation de PI3K et de la phospholipase C (PLC). PI3K et PLC convertissent PIP₂ en PIP₃, ce dernier active un complexe protéique ABP (actin binding proteins) qui va moduler le cytosquelette. B : La cofiline et Arp2/3 permettent d'assembler les filaments d'actine nécessaires à la formation des lamellipodes. D'autres protéines, ROCK (Rho-associated protein kinase) et PAK (p21-activated kinase) activent l'inhibiteur de la cofiline, la protéine LIMK (LIM domain kinase).

3.3.3. Acquisition d'un potentiel invasif

Les intégrines jouent un rôle clé dans l'invasion des cellules tumorales au cours de la TEM. Par exemple, le facteur de transcription Snail stimule l'expression de l'intégrine $\alpha_5\beta_3$ qui présente des propriétés pro-invasives (Haraguchi et al., 2008). Les métalloprotéases jouent également un rôle majeur dans l'invasion cellulaire. Les métalloprotéases de la matrice (MMP) sont activées pendant la TEM et permettent en plus du clivage des composants de la MEC, l'induction de la prolifération cellulaire, l'invasion et la migration cellulaires (Sternlicht and Werb 2001). Il a été montré que l'expression des MMP était corrélée à celle des marqueurs mésenchymateux et que l'inhibition de l'activité de certaines MMP réduisait les capacités d'invasion et de migration des cellules tumorales (Gilles et al., 1997). De plus, la surexpression

des MMP est marqueurs d'agressivité tumorale et de mauvais pronostic dans de nombreux cancers (Somiari et al., 2006; Jones et al., 2004; Morgia et al., 2005).

3.4. La réversibilité du processus

On ne peut parler de TEM que si le phénomène est réversible après la perte du signal inducteur. La Transition mésenchymato-épithéliale (TME) est un évènement indispensable dans de nombreux processus physiologiques et pourrait expliquer le processus métastatique (Yao et al., 2011) (Figure 19). Si l'évènement clé de la TEM est la perte de l'expression de la E-cadhérine, la TME est caractérisée par une réexpression de la E-cadhérine par les cellules tumorales dans les sites métastatiques. De manière intéressante, il a été montré une similitude dans les mécanismes moléculaires impliqués dans la TEM et la TME. Par exemple, il a été montré que le récepteur FGFR2b déclenchait une TME dans des cellules cancéreuses prostatiques alors que son isoforme FGFR2c était rapportée comme inductrice de TEM (Baraniak., 2006; Chaffer et al., 2007). De plus, dans les cellules du cancer du côlon métastatique CT26 qui présente un phénotype mésenchymateux, l'inhibition de la protéine BMP2 (Bone morphogenetic protein) conduit à la restauration d'un phénotype épithélial via l'activation de la voie AKT (Myoung Hee Kang et al. 2009). D'autres voies de signalisation comme Wnt/ β -caténine, PI3K/AKT et TGF β sont également impliquées dans la TME (Yao et al., 2011). La E-cadhérine est également impliquée dans le processus de TME et sa réexpression dans les cellules cancéreuses pancréatiques MiaPaca-2 induit une réversion du processus de TEM (Seidel et al., 2004). Les répresseurs transcriptionnels de la E-cadhérine (Snail, ZEB-1, ZEB-2 ...) sont inhibés pendant la TME, ce qui aboutit à la réexpression de la E-cadhérine (Yao., 2011). Certains MiR sont également impliqués dans la TME comme MiR-200 qui inhibe la TEM

en agissant directement sur les répresseurs transcriptionnels de la E-cadhérine (Gregory et al., 2008).

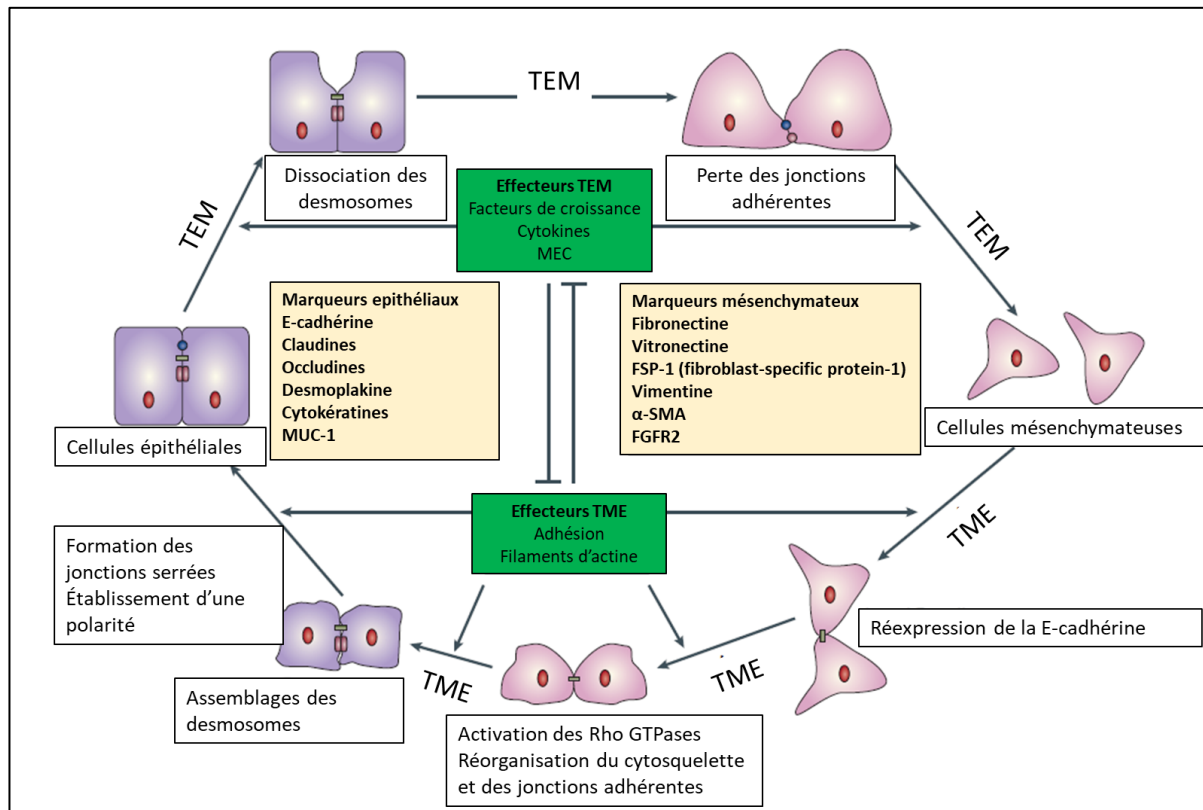


Figure 19 : Différentes étapes de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et de la transition mésenchylato-épithéliale (TME) selon Thiery et Sleeman (Thiery and Sleeman 2006).

En conclusion, la TEM est un processus dynamique associant des modifications phénotypiques et morphologiques qui permettent à la cellule tumorale d'acquérir des capacités de migration et d'invasion. La réversibilité du phénomène de TEM permet d'expliquer plusieurs phénomènes physio-pathologiques.

3.5. Les régulateurs transcriptionnels de la TEM

3.5.1. La famille Snail

C'est une famille qui comporte plusieurs membres dont Snail1, Snail2 (ou Slug) et les protéines Scratch. Toutes les protéines de la famille Snail partagent un domaine spécifique appelé SNAG et sont impliquées dans des processus de différenciation et de survie cellulaire (Kaufhold and Bonavida 2014). Les protéines de cette famille sont des inducteurs de la TEM lors des processus physiologiques comme la formation du mésoderme ou pathologique pendant la progression métastatique des cancers (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005). Leur implication dans la TEM est principalement due à leur capacité d'inhiber l'expression de la E-cadhérine en se fixant sur le domaine E-box du gène *CDH1* codant pour la E-cadhérine. L'inhibition de la transcription du gène *CDH1* implique des mécanismes épigénétiques complexes médiés par Snail (Kaufhold and Bonavida 2014). D'autres marqueurs de cellules épithéliales sont aussi réprimés par de Snail1 comme l'occludine, les claudines, MUC1 et la cytokératine 18 (Ikenouchi et al., 2003; Guaita et al., 2002). Snail1 va se fixer sur les promoteurs d'autres gènes suppresseurs de tumeurs comme *PTEN* et *RKIP* conduisant à leur répression et par conséquent l'optimisation de la TEM et des processus de prolifération et de survie (Escriva et al., 2008; Beach et al., 2008). Par ailleurs, Snail1 active l'expression de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, la fibronectine et les MMP-2 et 9 et il est capable d'activer d'autres facteurs transcriptionnels de la TEM comme ZEB-1 et LEF-1 (Guaita et al., 2002; De Craene., 2005)(Figure 20).

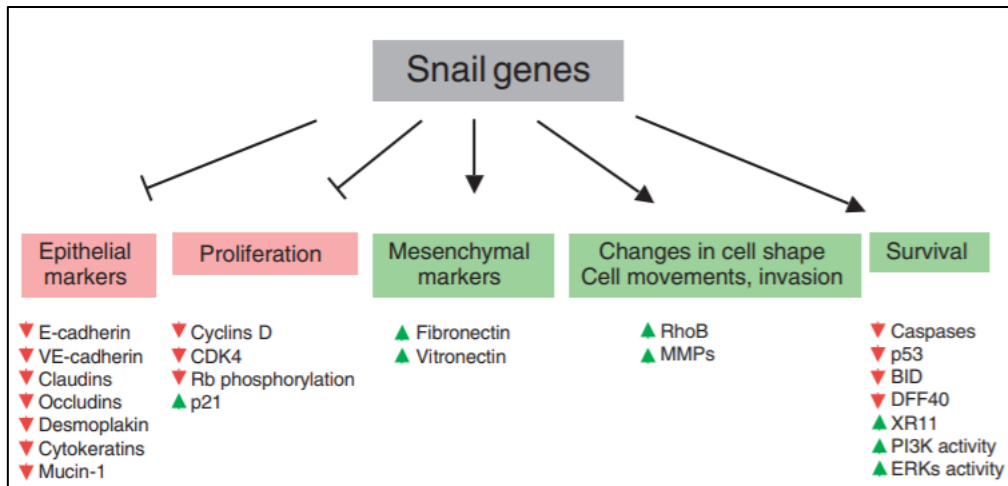


Figure 20 : Les gènes cibles des protéines Snail. Les membres de la famille Snail répriment la transcription des gènes codant pour des marqueurs épithéliaux et activent ceux codant pour des marqueurs mésenchymateux. De plus, les facteurs de transcription Snail contrôlent la prolifération, la migration et la survie. BID : Bcl-interacting death agonist; CDK : cyclin-dependent kinase; DFF : DNA fragmentation factor; ERKs : extracellular signal regulated kinases; MMPs : metalloproteinases; PI3K : phosphoinositide 3-Kinase; Rb : retinoblastoma; XR11, Xenopus Bcl-xL homologue.

Le promoteur du gène *Snail1* est la cible de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la TEM comme la voie TGFβ/Smad, MAPKinases, Wnt/β-caténine et NFκB (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005) (Figure 21). La régulation de l'expression de *Snail1* est également modulée par la protéine GSK-3β qui phosphoryle *Snail1* provoquant son ubiquitination puis sa dégradation par le protéasome. La phosphorylation de *Snail1* ne conduit pas toujours à sa dégradation. En effet, les kinases de la famille PAK induisent une phosphorylation active de *Snail1*, permettant son accumulation dans le noyau (Z. Yang et al., 2005).

Snail1 est exprimé dans beaucoup de cancers dont le cancer du pancréas et son élévation est souvent corrélée à des stades avancés et un mauvais pronostic (Kaufhold and Bonavida 2014).

Snail2 ou *Slug* possède les mêmes caractéristiques que *Snail1* mais son affinité pour les motifs E-box du promoteur du gène *CDH1* est plus faible que *Snail1* (Bolós et al., 2003).

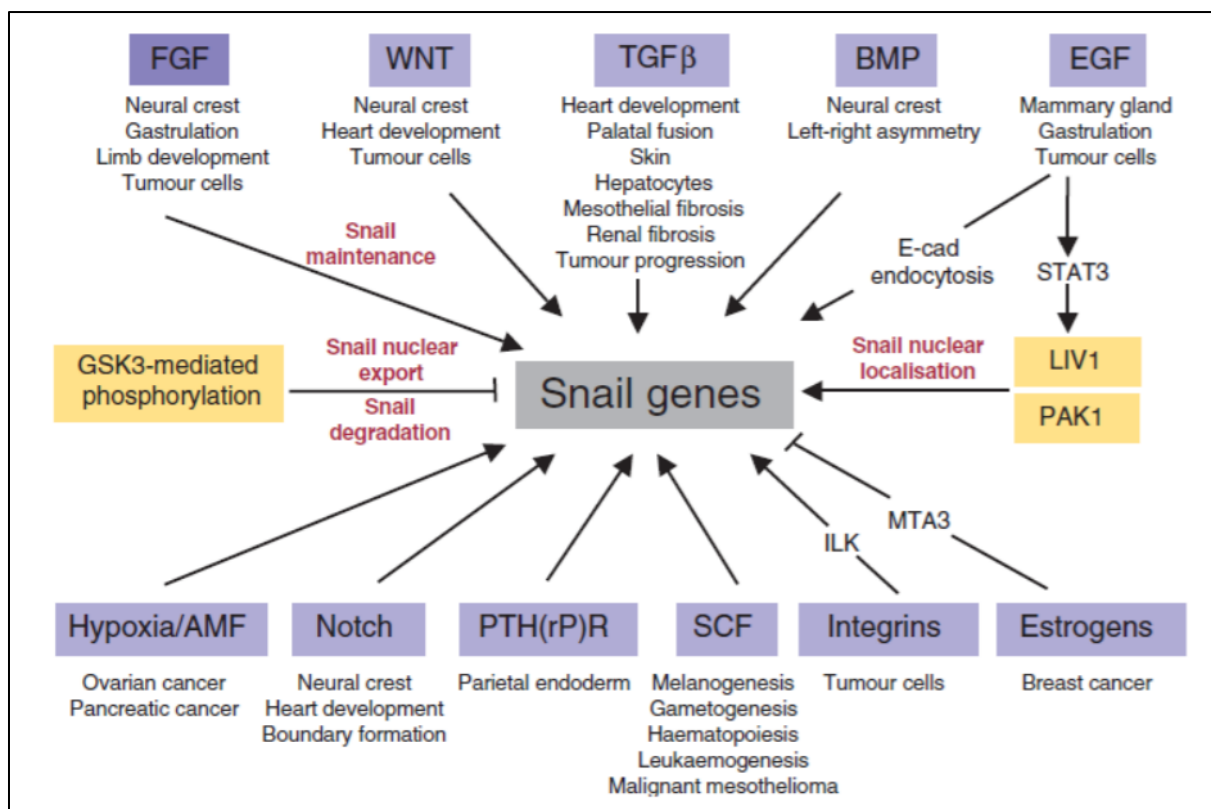


Figure 21 : Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression des gènes de la famille Snail et leurs sites d'activation selon Barrallo et al (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005). Plusieurs voies de signalisation agissent directement sur le promoteur des gènes Snail pour induire la TEM. D'autres facteurs comme GSK3 β , PAK1 et LIV1 sont des régulateurs post-traductionnels de Snail. AMF: autocrine motility factor; E-cad : E-cadherin; EGF : epidermal growth factor; FGF : fibroblast growth factor; BMP : bone morphogenetic protein; ILK : integrin-linked kinase; MTA3 : metastasis-associated protein 3; PAK1 : p21-activated kinase; TGF β : transforming growth factor β ; PTH(rP)R : parathyroid hormone related peptide receptor; SCF : stem cell factor.

3.5.2. ZEB-1/2 (Zinc E-box Binding factor)

La famille ZEB est composée de deux homologues (ZEB-1 et ZEB-2) qui comportent des motifs en doigt de zinc nécessaires pour leur fixation sur les promoteurs de gènes cibles. Sa principale cible reste la E-cadhérine dont ZEB est l'un des répresseurs transcriptionnels. Les motifs en doigts de zinc comportent une séquence spécifique leur permettant une fixation sur les domaines E-box du gène de la *E-cadhérine* (Comijn et al., 2001). Leur fonction répressive sur

la E-cadhérine nécessite parfois le recrutement de complexes corépresseurs comme le CTBPs (C-Terminal Binding Proteins) ou le GRG1 (Brahma-related gene-1) qui interagissent avec des facteurs de remodelage de la chromatine (Wang et al., 2009; Sánchez-Tilló et al., 2010).

L'expression de ZEB est sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation (Figure 22). Le TGF β induit l'expression de ZEB-1 via le complexe Smad2/3 qui se fixe sur le promoteur du gène *ZEB-1* (Joseph et al., 2014). L'activation de la voie des MAPKinases par des facteurs de croissance comme HGF permet également de stimuler l'expression de ZEB-1 (Han et al., 2016). De la même façon, le gène *ZEB-1* est une cible de la voie Wnt/ β -caténine (Kalra et al., 2018), PI3K/AKT (Wu et al., 2012) mais également de Snail1 et Twist (Dave et al., 2011).

ZEB-1 et ZEB-2 orchestrent le processus de TEM en modulant directement l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. En plus de la TEM, ZEB-1 est impliqué dans différents processus au cours de la carcinogenèse comme l'apoptose, l'échappement immunitaire, l'invasion et la résistance aux traitements (Zhang et al., 2015). Une expression aberrante de ZEB-1 a été observée dans plusieurs cancers dont celui du pancréas avec une nette corrélation entre une forte expression et un mauvais pronostic (Bronsert et al. 2014). ZEB-1 serait également impliqué dans la chimiorésistance et la radiorésistance de nombreux cancers (Zhang et al., 2015).

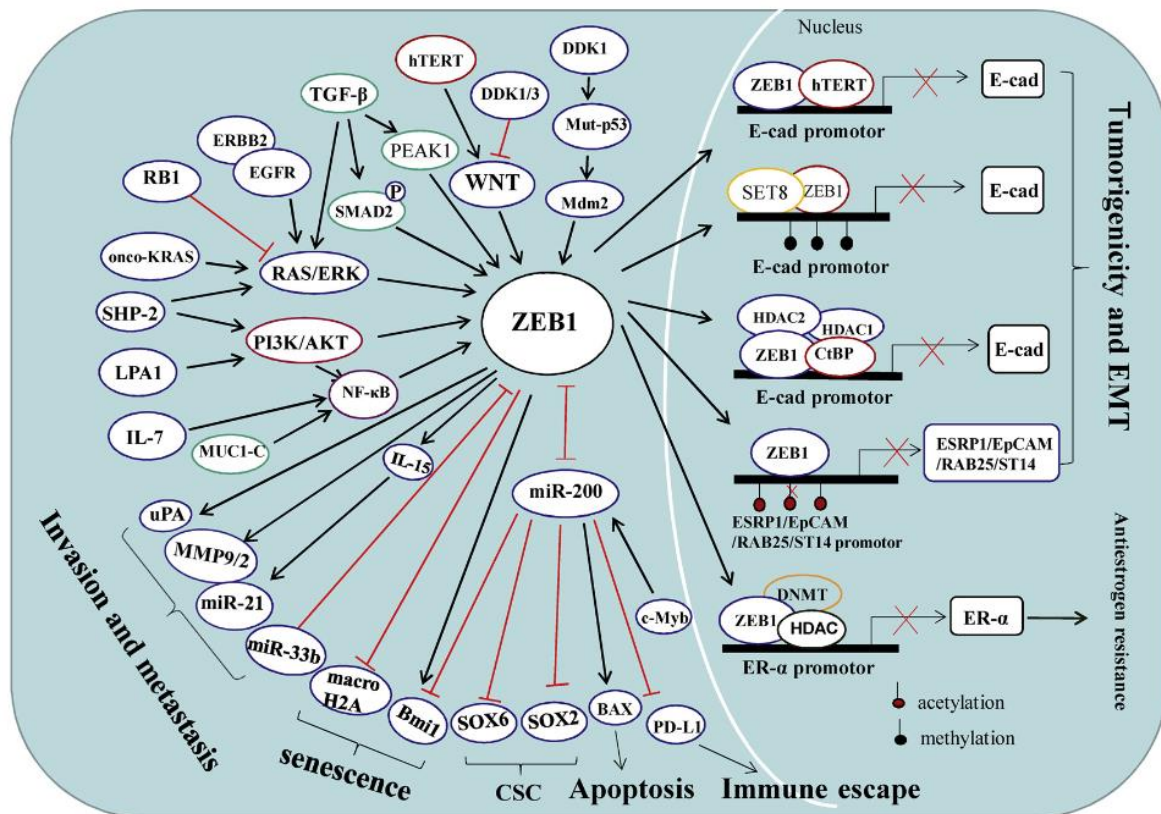


Figure 22 : Les inducteurs et cibles de ZEB-1 au cours de la carcinogénèse selon Wang et al (Wang et al., 2015). ZEB-1 interagit avec plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'invasion, la sénescence, l'apoptose, l'échappement immunitaire, le recrutement de cellules souches tumorales, la TEM et la résistance aux traitements. Dans le noyau, ZEB-1 inhibe la transcription de gènes cibles codant pour des protéines épithéliales comme la E-cadhérine et EpCam.

3.5.3. Twist

Twist fait partie de la famille des facteurs de transcription à domaine basique hélice-boucle-hélice (bHLH : basic-helix-loop-helix). Les protéines Twist ont un domaine formé de deux hélices permettant de former des dimères puis à se lier sur les motifs E-box (Cabrera et al., 2013). Deux protéines très similaires ont été identifiées chez l'homme, Twist1 et Twist2. Ces deux protéines contrôlent la différenciation de plusieurs types cellulaires comme les cellules musculaires, cartilagineuses et ostéogéniques (Puisieux et al., 2006). Dans des modèles murins, Twist joue un rôle dans l'embryogénèse en favorisant la migration cellulaire et la

réorganisation tissulaire (Yang et al., 2004). Twist est surexprimé dans différents cancers dont le cancer du pancréas (Ohuchida et al., 2007). L'hyperméthylation du promoteur de *Twist* active son expression dans les cellules cancéreuses issues de tumeurs primitives alors que cela provoque une perte de son expression dans les cellules métastatiques, ce qui montre le rôle de Twist dans la TEM et la progression métastatique (Cabrera et al., 2013)(Figure 23). Par ailleurs, la surexpression de Twist est associée à un mauvais pronostic (Puisieux et al., 2006). La surexpression de Twist fait appel à plusieurs mécanismes comme l'hypoxie et l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquant Wnt, IGF ou EGF (Cabrera et al., 2013). Twist subit également une régulation post-transcriptionnelle par la protéine PAK qui inhibe sa dégradation par le protéasome (Firulli and Conway 2008). Les propriétés pro-métastatiques de Twist sont liées à son effet inducteur de TEM permettant aux cellules tumorales d'envahir la MEC et d'atteinte des sites métastatiques à distance. Plusieurs études *in vitro* ont montré que la suppression de Twist dans les cellules cancéreuses mammaires empêchait la survenue de métastases et que son surexpression réduisait l'expression de la E-cadhérine, permettant ainsi aux cellules tumorales d'acquérir des marqueurs mésenchymateux et des propriétés invasives (Casas et al., 2011; Yang et al., 2004).

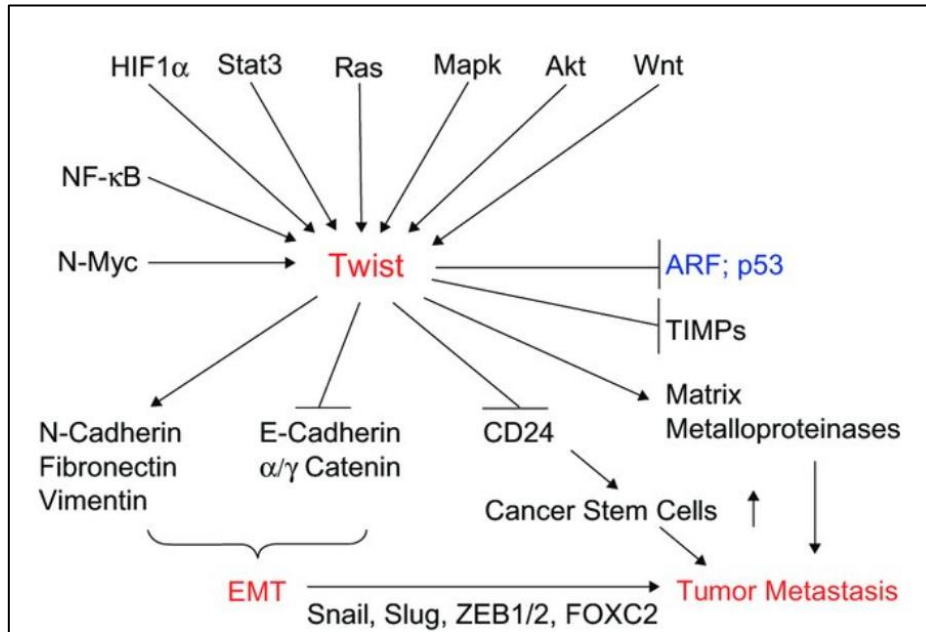


Figure 23 : La signalisation médiée par Twist et son implication dans la TEM et le processus métastatique selon Inoue et al (Inoue and Fry 2016). Plusieurs voies de signalisation activent l'expression de Twist permettant ainsi la TEM via la perte d'expression de la E-cadhérine. Twist favorise aussi le processus métastatique en activant certaines métalloprotéases. Ses propriétés anti-apoptotiques passent par l'inhibition de la voie ARF (alternative reading frame)/p53. Il confère également aux cellules tumorales des propriétés de cellules souches par l'inactivation de l'expression de CD24. L'action pro-métastatique de Twist est potentialisée par les autres facteurs de transcription (Snail, Slug, ZEB1/2 ...).

3.5.4. Les autres facteurs de transcription impliqués dans la TEM

D'autres facteurs de transcription ont été identifiés récemment comme inducteurs de la TEM et résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la TEM (Lamouille et al., 2014)

Facteur de transcription	Gènes cibles inhibés	Gènes surexprimés	Voies de signalisation impliquées
Snail 1 et 2 (Slug)	E-cadhérine, claudines, occludine, Crumbs3, PALS1, PATJ, cytokératines, desmoplakine, plakophiline	Fibronectine, N-cadhérine, collagène, MMP15, MMP2, MMP9, TWIST, ID1, ID2, ZEB1, ZEB2	TGFβ/SMAD3, Wnt/β-caténine, Notch, PI3K–AKT, NFκB, EGF,FGF
Twist	E-cadhérine, claudines, occludine, desmoplakine plakoglobine	Fibronectine, N-cadhérine α5 intégrine	MAPKinases
ZEB-1 et 2	E-cadhérine, ZO1, Crumbs3 plakophiline	N-cadhérine MMPs	TGFβ/SMAD3, Wnt/β-caténine RAS–MAPK
FOXD3	Non connus	Non connus	β1 intégrine laminine
FOXC2	E-cadhérine	Fibronectine, Vimentine, N-cadhérine αSMA	TGFβ/SMAD3
FOXF1	E-cadhérine, claudine1, occludine, desmogleine1β, desmogleine2, desmocolline2, desmoplakine	Fibronectine N-cadhérine	Non connues
FOXQ1	E-cadhérine	Fibronectine N-cadhérine Vimentine	Non connues
FOXO3A	E-cadhérine	SNAIL1	AKT
FOXA1	E-cadhérine	Fibronectine, Vimentine SNAIL1	TGFβ, HGF, AKT
FOXO3A	E-cadhérine	SNAIL1	AKT
FOXA1	E-cadhérine	Fibronectine,	TGFβ,

		Vimentine SNAIL1	HGF, AKT
FOXA2	E-cadhérine, ZO1	Fibronectine, Vimentine, N-cadhérine, Snail1, Snail2	TGFβ, HGF, AKT
Serpent, GATA6	GATA4, E-cadhérine, Crumbs, Claudines	N-cadhérine MMP1	Non connues
HMGA2	E-cadhérine	Snail1, Snail2, TWIST	TGFβ/SMAD3
SOX9	Non connus	Snail2	BMPs, PKA
KLF8	E-cadhérine	MMP9	Non connues
BFA-KAP1	Non connus	FSP1	Non connues
ZNF703	E-cadhérine	Vimentine, N-cadhérine, Snail1 cytokératine	Rho-GTPase
PRX1	E-cadhérine	Vimentine, Laminine	BMP2, TGFβ

αSMA: α-smooth muscle actin; BMPs: bone morphogenetic proteins; CBFA: CArG-binding factor-A; EGF: epidermal growth factor; FGF: fibroblast growth factor; FOX: forkhead box; FSP1: fibroblast-specific protein 1; HGF: hepatocyte growth factor; HMGA2: high mobility group A2; ID: inhibitor of differentiation; KAP1: KRAB-associated protein 1; KLF8: Krueppel-like factor 8; MMP: matrix metalloproteinase; NF-κB: nuclear factor-κB; TGFβ: transforming growth factor-β; PALS1: protein associated with Lin-7 1; PATJ: PALS1-associated tight-junction protein; PKA: protein kinase A; PRX1: paired-related homeobox 1; SOX: SRY box; ZNF703: zinc-finger 703; ZO1: zonula occludens 1; ZEB: zinc-finger E-box-binding.

Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la TEM. Ils ciblent les promoteurs de gènes codant pour des protéines épithéliales et mésenchymateuses après l'activation de certaines voies de signalisation.

3.6. Les principales voies de signalisation impliquées dans la TEM

Nous détaillons dans cette partie les principaux inducteurs de la TEM décrits dans le cancer du pancréas.

3.6.1. La voie du TGF β (Transforming Growth Factor)

La voie du TGF β est la principale voie de signalisation de la TEM. Elle stimule l'expression des facteurs de transcription Snail1/2, ZEB1/2 et Twist, permettant ainsi une perte de l'expression de la E-cadhérine et l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux. Le TGF β est reconnu comme étant un suppresseur tumoral par l'inhibition de la croissance tumorale. Cependant, aux stades avancés de la cancérogenèse, le TGF β induit la dissémination métastatique, notamment par l'activation de la TEM (Massague et al., 2008). Le TGF β est une cytokine ubiquitaire activant plusieurs voies de signalisation. Il s'agit d'une superfamille comportant plusieurs membres dont TGF β -1 et 2, les activines et les BMP (Bone Morphogenic Proteins). Après fixation à son récepteur de type I ou II, le TGF β conduit à la transduction du signal par deux voies de signalisation différentes :

- **La voie canonique du TGF β (Figure 24)**

La voie canonique met en jeu les protéines Smads (Polyak and Weinberg 2009). La fixation du TGF β sur son récepteur permet la phosphorylation des protéines Smad2 et -3, qui à leur tour vont se lier à la protéine Smad4. Ce complexe est transloqué au noyau où il se fixe sur des promoteurs de gènes cibles pour réguler leur expression en présence de co-activateurs transcriptionnels (Liu et al., 2015). Par ailleurs, la fixation des BMP sur leurs récepteurs induit la phosphorylation des Smad 1, 5 et 8, qui forment un complexe avec Smad4 avant d'être transloqué au noyau. Des protéines Smads antagonistes, Smad6 et Smad7, inhibent la voie

canonique du TGF β en interagissant avec le complexe Smad (Massague et al., 2008). D'autres inhibiteurs comme Smurf 1 et 2 (Smad ubiquitination-regulatory factor) favorisent la dégradation des récepteurs du complexe Smad-récepteur par ubiquitination.

D'autres voies de signalisation régulent la signalisation des protéines Smads. L'activation de l'EGFR, de la voie NF κ B, de la voie JAK/STAT (signal transducer and activator of transcription) induit l'expression de Smad7 et permet donc d'inhiber la signalisation médiée par le TGF β .

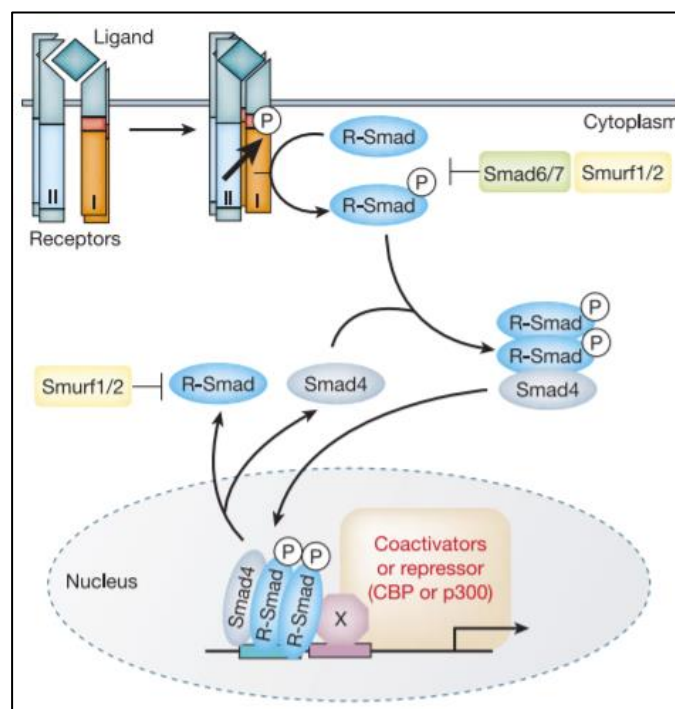


Figure 24 : La voie canonique du TGF β médiée par les protéines Smads selon Derynck et Zhang (Derynck and Zhang 2003). La fixation du TGF β sur son récepteur membranaire formé de deux hétérodimères induit la phosphorylation du récepteur de type I par le récepteur de type II. Le récepteur de type I étant activé, va induire une phosphorylation du complexe Smad (R-Smad). Ce dernier va s'associer à Smad4 et activer ou réprimer la transcription de gènes cibles en présence de coactivateurs ou corépresseurs. Le rétrocontrôle de la voie canonique est assurée par les facteurs Smurf1/2, Smad6 et Smad7.

- **La voie non canonique du TGF β (Figure 25)**

L'effet inducteur de la TEM via le TGF β peut se faire par des voies de signalisation indépendantes des protéines Smads. Le TGF β peut activer la voie de signalisation

Ras/MAPKinases permettant ainsi d'induire une TEM (Derynck and Zhang 2003). De plus, l'activation de la voie Ras/MAPKinases renforce la signalisation du TGF β , ce qui évoque une interaction entre les deux voies de signalisation (Xie et al., 2004). De plus, le TGF β induit la phosphorylation des kinases p38, JNK1/2 et PI3K permettant l'activation de ces voies de signalisation. Le TGF β active également la voie des Rho GTPases et induit les modifications du cytosquelette associées à la TEM (Xu et al., 2009).

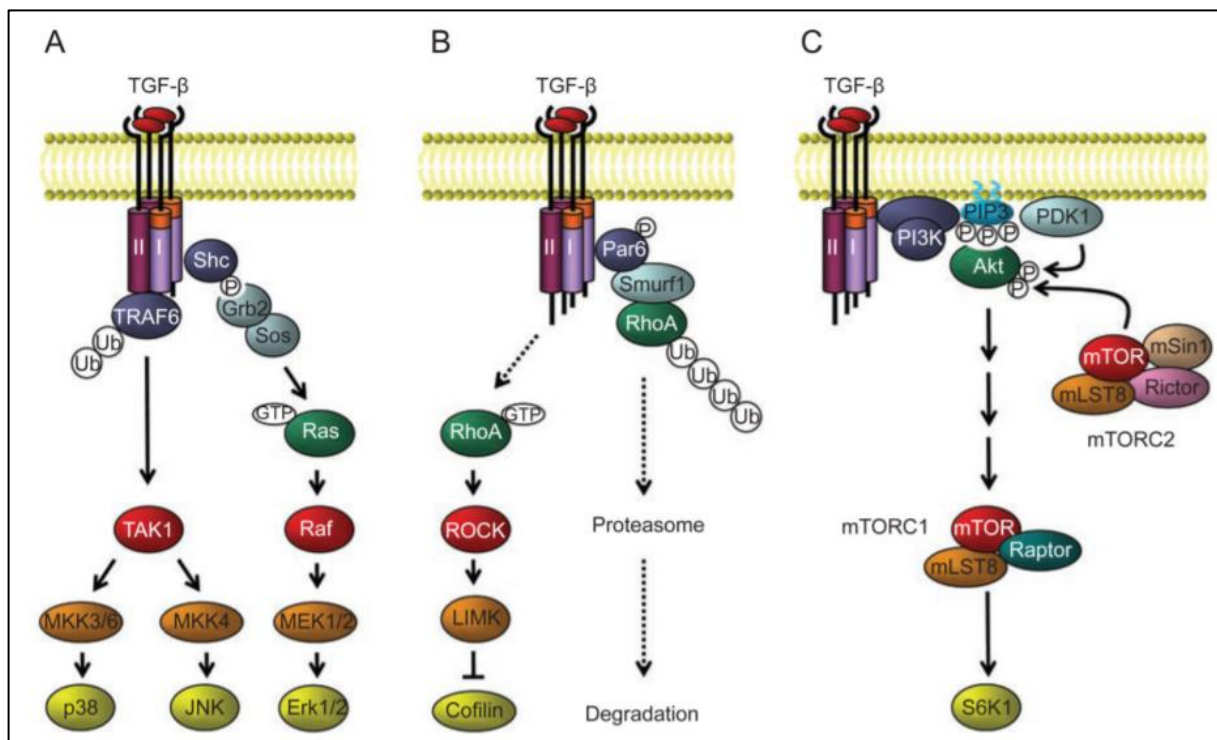


Figure 25 : Les voies de signalisation TGF β non Smad dépendantes selon Xu et al (Xu., 2009).
 A : L'activation du récepteur du TGF β permet le recrutement de plusieurs kinases permettant l'activation de TAK1 (Transforming growth factor beta-activated kinase) qui active les protéines MKK (Mitogen-activated protein kinase kinase) qui permettent l'activation des voies p38 et JNK. L'activation du récepteur du TGF β permet aussi de recruter les kinases Shc (Src homology2/ α -collagen), Grb2 (growth receptor bound 2) et Sos (son of sevenless) induisant l'activation de la voie Ras/Raf/MEK/Erk. B : Le récepteur du TGF β active de la voie des Rho GTPases et essentiellement la protéine RhoA qui agit sur la réorganisation du cytosquelette d'actine cytosquelette via les protéines ROCK et LIMK. C : Activation de la voie PI3K/AKT par le TGF β permet la transduction du signal médié par mTOR et la protéine S6K1 (S6 kinase 1).

3.6.2. La voie Wnt/ β -caténine (Figure 26)

Cette voie de signalisation est associée au développement embryonnaire, à la fibrose rénale et au cancer (Frisch et al., 2013), avec un rôle central joué par la β -caténine. La liaison de Wnt sur son récepteur Frizzled couplé à la protéine LRP (lipoprotein receptor-related protein), permet l'activation de la protéine APC (adenomatous polyposis coli) et Axin 1. La conséquence directe de l'activation de ce complexe est la déphosphorylation de GSK3 β et le recrutement de Dishevelled (Dvl) ce qui permet l'accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau et former un complexe avec LEF/TCF et activer les gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine (Clevers and Nusse 2012). Les principaux gènes cibles de voie Wnt/ β -caténine sont la cycline D1, c-myc et la survivine ce qui permet la répression transcriptionnelle de la E-cadhérine ainsi qu'à la déstabilisation des complexes d'adhérence intercellulaire.

Les Voies Wnt/ β -caténine et TGF β interagissent pour réguler l'expression des gènes impliqués dans la TEM. En effet, le signal TGF β déstabilise les jonctions adhérentes, ce qui permet de libérer la β -caténine et sa translocation dans le noyau pour activer l'expression des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine. De plus, le TGF β 3 induit la formation de complexe entre Smad2, Smad4 et LEF1, qui se fixe sur le promoteur de *CDH1* et inhibe ainsi la transcription de la E-cadhérine (Nawshad et al., 2007).

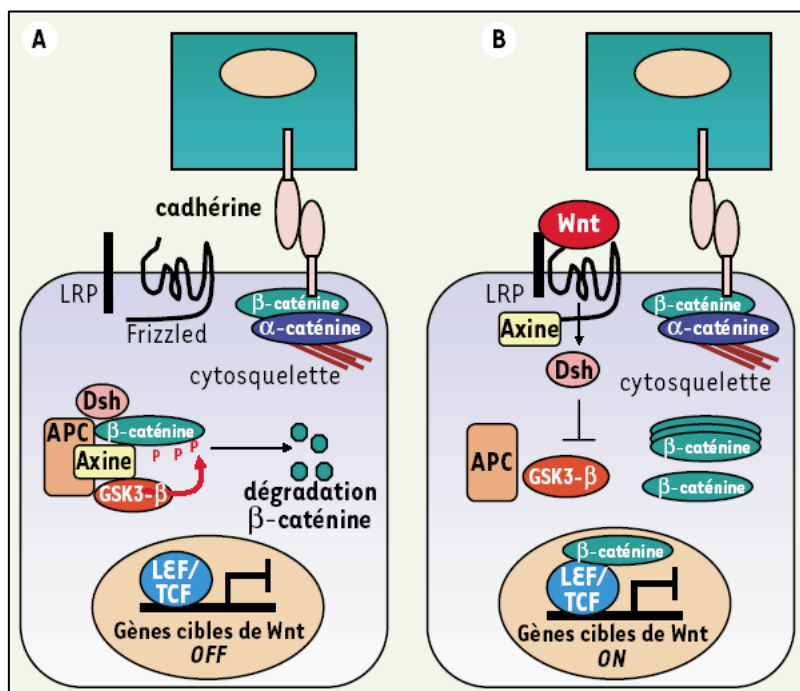


Figure 26 : La voie de signalisation Wnt/ β caténine selon Andreu et al (Andreu et al., 2006). En l'absence de Wnt (A), la β -caténine est incluse dans un complexe protéique, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome. La β -caténine peut aussi être liée à la E-cadhérine et contrôler l'adhérence intercellulaire. En présence du ligand Wnt (B) lié au complexe récepteur frizzled/LRP, la β -caténine se dissocie du complexe APC/Axine/GSK3 β et migre dans le noyau où elle se lie aux facteurs LEF/TCF pour activer la transcription de gènes cibles.

3.6.3. La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est impliquée dans l'apoptose, la migration, l'invasion et l'angiogenèse (Allenspach et al., 2002). Il existe 4 récepteurs Notch (Notch 1 à 4) qui fixent 5 ligands (Deltalike1,3,4, Jagged-1 et Jagged-2). La liaison d'un ligand sur un récepteur Notch provoque une série de clivages protéolytiques du récepteur et la translocation d'un domaine intracellulaire au noyau pour réguler l'expression de gènes cibles de la famille HES (Hairy-enhancer of split) et HRT (hairy-related transcription factor). Notch stimule l'expression d'autres facteurs de transcription impliqués dans la TEM comme Snail1, Slug, ZEB1, ZEB2 et Twist (Wang et al., 2010).

Pour induire un phénotype de TEM, Notch interagit avec plusieurs voies de signalisation comme celles du TGF β , FGF, HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) et le PDGF (platelet-derived growth factor) (Wang et al., 2010) (Figure 27).

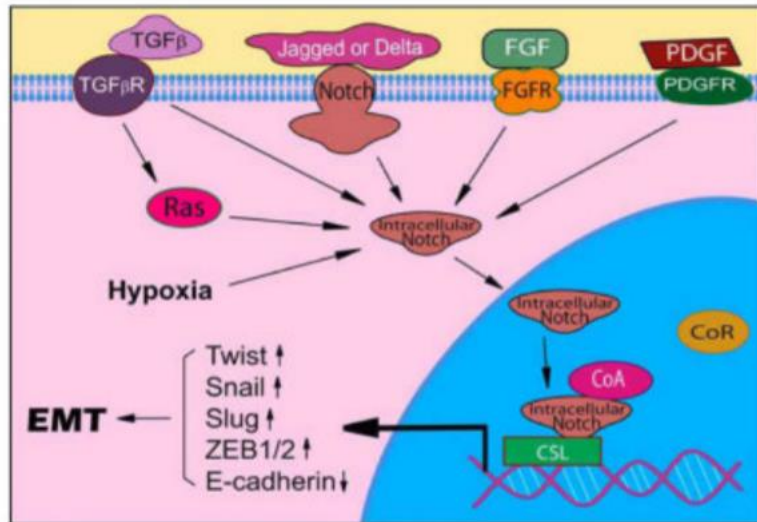


Figure 27 : L'implication de Notch dans la TEM et ses principaux inducteurs selon Wang et al (Wang et al., 2010). Les voies de signalisation médiée par le TGF β , FGF, PDGF et l'hypoxie activent Notch. Sa translocation nucléaire active la transcription de plusieurs inducteurs de la TEM.

3.6.4. La voie Hedgehog

Cette voie de signalisation est impliquée dans de nombreux processus physiologiques comme la différenciation cellulaire, la régénération et la maintenance de cellules souches (Beachy., 2004). La famille Hedgehog (Hh) comporte 3 membres (Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) and Desert Hedgehog (Dhh)) qui se fixent sur 2 récepteurs transmembranaires : Patched (PTCH) et Smoothed (SMO) (Liu et al., 2015). La fixation de Hh sur le récepteur PTCH va permettre de lever l'inhibition sur SMO qui active les facteurs de transcription à doigt de zinc GLI (Glioma-associated oncogene homolog). Ces derniers vont activer la transcription de gènes cibles impliqués dans la TEM (Briscoe and Théron 2013).

3.6.5. La voie des MAPKinases (Figure 28)

La voie des MAPKinases est activée généralement par des récepteurs tyrosine kinase en réponse à un facteur de croissance ou une cytokine. L'activité tyrosine kinase de ces récepteurs est à l'origine d'une cascade de phosphorylation de plusieurs kinases cytoplasmiques conduisant à la transmission d'un signal différent en fonction de la voie de signalisation activée. Les voies Ras/Raf/MAPkinases et PI3K/AKT/mTOR sont les deux principales voies de signalisation des MAPKinases impliquées dans la TEM.

- **La voie Ras/Raf/MAPKinases**

La famille Ras comprend 3 isoformes appelés HRas, NRas et Kras. Il s'agit de protéines cytoplasmiques de la familles GTPases, qui permettant la transmission de signaux transmis par des récepteurs transmembranaires et qui régulent la prolifération, la survie, la différenciation et la TEM (Cobb et al., 1999). L'activation de Ras via l'activité tyrosine kinase d'un récepteur transmembranaire permet la phosphorylation de Raf et par conséquent son activation. Ce la conduit une cascade d'activation avec la phosphorylation de MEK1/2 (MAPK-ERK-Kinase) qui phosphoryle à son tour ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase), qui sera transloqué au noyau pour activer la transcription de gènes cibles codant pour plusieurs facteurs de transcription comme C-Jun et C-Fos.

La voie Ras/Raf/MAPKinases augmente l'expression des gènes impliqués dans la TEM en collaboration avec d'autres voies de signalisation(Cano et al., 2010). Elle induit également une motilité cellulaire en stimulant l'expression des MMP et en régulant l'activité des protéines GTPases (Vial and Pouyssegur 2004).

L'activation de la voie Ras/Raf/MAPKinases est souvent activé de façon aberrante dans de nombreux cancers. Dans le cancer du pancréas, une surexpression des récepteurs à tyrosine kinase avec ou sans altération génétique peut expliquer l'activation de la voie Ras/Raf/MAPKinases (Preis and Korc 2010). Cependant, le mécanisme le plus fréquent pour expliquer l'activation de cette voie de signalisation dans le cancer du pancréas est la mutation *Kras* qui intéresse le codon 12 avec une substitution d'une Glycine G en acide aspartique D (mutation G12D) (Réjiba et al., 2007).

- **La voie PI3K/AKT/mTOR**

La voie PI3K/AKT/mTOR est impliquée dans la croissance cellulaire, la prolifération, l'angiogenèse et l'oncogenèse (Porta, Paglino, and Mosca 2014). Comme la voie Ras/Raf/MAPKinases, elle est souvent activée par des récepteurs tyrosine kinase. La fixation d'un ligand sur son RTK entraîne sa dimérisation puis l'activation de son domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. L'activation de ce récepteur entraîne une cascade de phosphorylation qui débute par celle de la protéine PI3K. La PI3K est inhibée par le PTEN qui régule l'activité de la voie PI3K/AKT/mTOR. Une fois activée, la PI3K forme une protéine membranaire appelée le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate qui va recruter la protéine AKT et permet sa phosphorylation par la PDK1 (phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1). AKT va activer à son tour la protéine mTOR soit par phosphorylation directe, soit par inhibition de TSC2 (Tuberous sclerosis complex-2). mTOR agit sous la forme d'un complexe protéique appelé mTORC1 qui est associé à la protéine RAPTOR (regulatory-associated protein of mTOR) ou mTORC2 qui est associé à RICTOR (rapamycin-insensitive companion of mTOR). Plusieurs gènes cibles sont régulés par cette voie de signalisation dont *eIF4E*, *S6K1*, *cyclin D1*, *HIF1/2* ...

- D'autres MAPKinases sont impliquées dans la TEM comme p38 MAPKinases et JNK (Jun amino-terminal kinases).

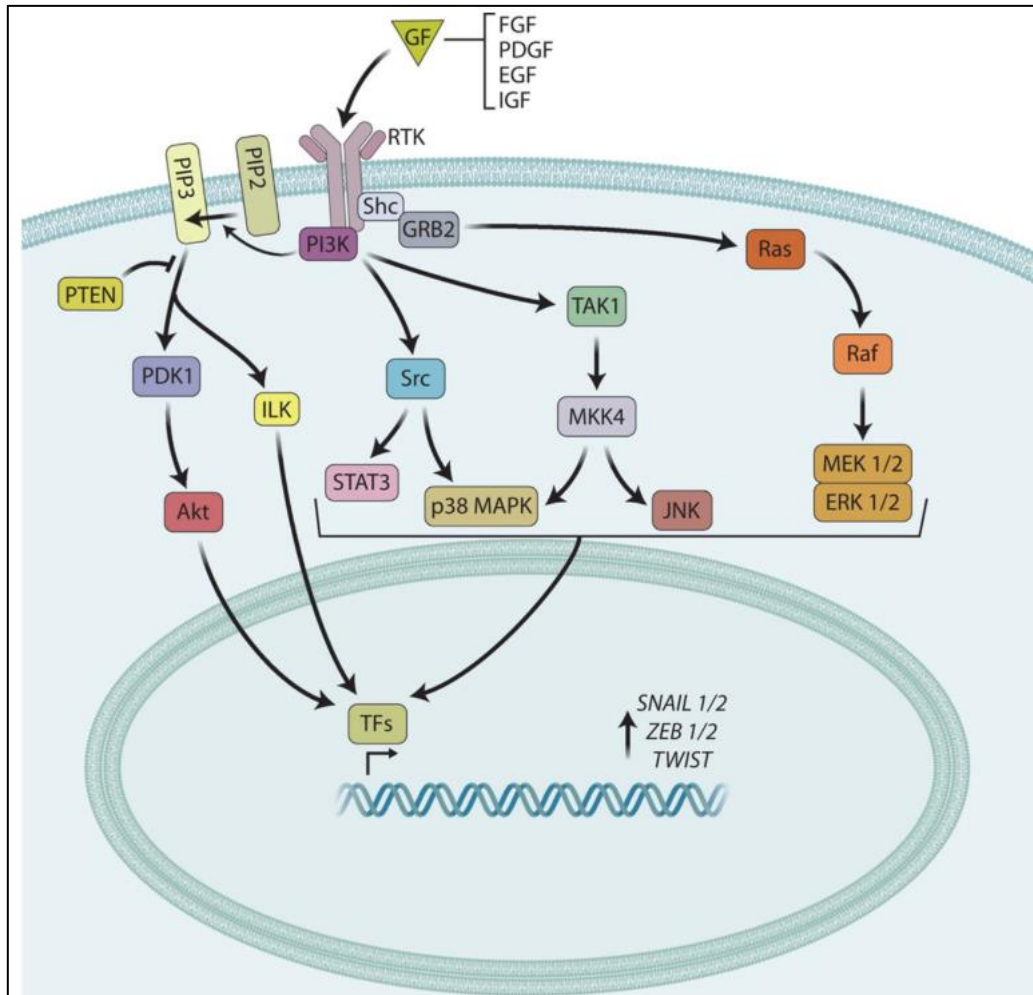


Figure 28 : L'activation de la voie des MAPKinases par le récepteur tyrosine kinase selon Gonzalez et Medici (Gonzalez and Medici 2014). Les facteurs de croissance tels que FGF, EGF, PDGF ou IGF, stimulent les récepteurs tyrosine kinase, qui activent diverses voies de signalisation. Ces cascades de signalisation activent des facteurs de transcription (TF) qui se lient aux promoteurs de gènes codant pour des facteurs de transcription comme Snail1/2, ZEB1/2 et Twist qui induisent la TEM.

3.6.6. La voie NFκB (Nuclear Factor-kappaB)

Les protéines NFκB sont des régulateurs transcriptionnels composées de 5 membres : p50, p52, c-rel, p65 et relB. En absence de signal externe, les NFκB sont sous forme inactive en interagissant avec les protéines de la famille IκB (Inhibitor of NF-κB). Les protéines IκB sont composées de 5 membres : IκBα, IκBβ, IκBε, et les protéines p105 et p100. L'activation de la voie NFκB passe par la phosphorylation des protéines IκB par des kinases IKK. Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitination des IκB puis leur dégradation par le protéasome libérant ainsi les protéines NFκB qui sont transloquées dans le noyau pour se fixer sur les promoteurs de gènes cibles. La voie NFκB est impliquée dans la réponse immunitaire et joue un rôle dans la prolifération et l'apoptose (Guttridge et al., 1999; Perkins et al., 1997). Cette voie de signalisation est activée dans de nombreux cancers et favorise la prolifération et la résistance à l'apoptose des cellules tumorales (Sethi et al. 2012). De plus, plusieurs études ont montré que l'activation de la voie NFκB était corrélée à une évolution métastatique et un mauvais pronostic (Chung et al., 2006; Shao et al., 2009; Zhang et al., 2009). Elle est également impliquée dans la TEM en activant l'expression de l'uPA (urokinase-type plasminogen activator) des MMPs qui induisent une dégradation des éléments de la MEC (Min et al., 2008). L'activation de la voie NFκB en réponse aux stimuli inflammatoires générés par le stroma, induit une stabilisation de Snail par l'inhibition de la protéine GSK3β (Wu et al., 2009).

Il existe plusieurs interactions entre ces différentes voies de signalisation qui vont aboutir à l'expression de gènes codant pour les régulateurs de la TEM. Ce réseau complexe de signalisation explique l'inefficacité des monothérapies dans le cancer du pancréas et surtout des thérapies ciblées visant certains facteurs de croissance.

3.7. Les différents types de TEM

Le champ d'étude de la TEM s'est étendu à plusieurs conditions physiopathologiques. Une classification en trois entités a été proposée (Figure 29).

3.7.1. TEM de type 1 (Embryogenèse)

Ce phénomène est observé au cours de l'implantation, l'embryogenèse et l'organogenèse. Les phénomènes d'implantation de l'embryon et la formation du placenta nécessitent une TEM. Notamment, les cellules du trophoctoderme subissent une TEM leur permettant d'envahir l'endomètre et d'initier la formation du placenta (Bischof et al., 2006). La gastrulation est un autre processus embryologique où la TEM joue un rôle crucial. Durant la gastrulation, une réorganisation complète des cellules embryonnaires avec des d'importants mouvements cellulaires permettent la création de trois couches embryonnaires : ectoderme, endoderme et mésoderme. Les cellules épithéliales de l'épiblaste subissent des changements programmés dictés par l'expression spécifique de protéines associées à la migration et la différenciation cellulaires (Thiery and Sleeman 2006a). De plus, la TEM est impliquée dans d'autres processus embryologiques comme la formation de la crête neurale et des valves cardiaques (Thiery and Sleeman 2006b).

3.7.2. La TEM de type 2 (Cicatrisation et fibrose)

La TEM est associée aux processus de réparation cellulaire et de fibrose. La reconstruction tissulaire après un traumatisme nécessite la migration de fibroblastes et d'autres types cellulaires afin de combler la plaie et procéder au phénomène de réparation tissulaire. Ce même processus est également mis en jeu dans la régénération hépatique (Choi and Diehl 2009).

La fibrose rénale est un exemple pathologique impliquant le phénomène de TEM. Il a été montré dans un modèle murin transgénique exprimant le gène *LacZ* qui code pour la β -galactosidase, une enzyme spécifique des cellules épithéliales tubulaires proximales. La création d'une fibrose rénale par obstruction urétérale induit un afflux de fibroblastes dont certains expriment la β -galactosidase, ce qui suggère la survenue d'une TEM à partir des cellules tubulaires proximales dont le principal facteur déclenchant est le TGF β (Iwano et al., 2002; Qi et al., 2005). De plus, des données suggèrent l'implication de la TEM dans le développement de fibrose après greffe rénale (Vongwiwatana et al., 2005).

3.7.3. La TEM de type 3 (Progression et diffusion métastatique)

Nous disposons de données suffisantes dans la littérature pour associer la TEM aux stades avancés de cancers. De plus, l'expression des marqueurs de TEM est souvent corrélée à des tumeurs avancées de mauvais pronostic (Lu and Kang 2019).

La TEM induirait également la séparation de quelques cellules cancéreuses de la tumeur primaire, leur permettant ainsi d'envahir la matrice extracellulaire grâce à la production de métalloprotéases et de migrer grâce à la réorganisation du cytosquelette (émission de lamellipodes). Les cellules vont ainsi pouvoir passer dans la circulation où elles deviendront des cellules tumorales circulantes puis s'ancreront au site métastatique notamment par la réexpression de la E-cadhérine pour former une métastase par le phénomène de TME.

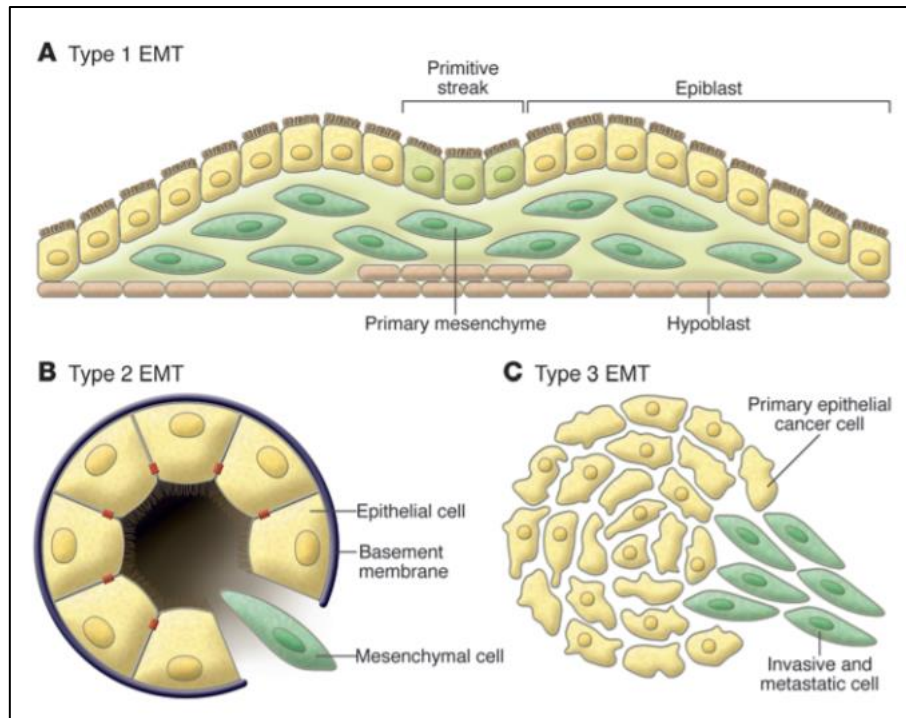


Figure 29 : Les différents types de TEM selon Kalluri et Weinberg (Kalluri and Weinberg 2009).
 A : La TEM de type 1 est associée à la phase embryonnaire. Elle est impliquée dans la gastrulation et la migration de la crête neurale. Pendant la gastrulation, les cellules épithéliales de l'épiblaste subissent une TEM pour donner le mésenchyme primaire. B : La TEM de type 2 survient au cours des procédures d'inflammation ou de fibrose. A la différence de la TEM de type 1, la TEM de type 2 évolue le plus souvent sur un mode chronique. C : La TEM de type 3 concerne le processus métastatique permettant aux cellules tumorales au sein de la tumeur primitive de se détacher et d'atteindre la circulation sanguine pour former des métastases dans d'autres sites.

La TEM est impliquée dans des processus physiologiques et pathologiques. Les mécanismes moléculaires sont relativement comparables et le spectre de modifications survenant au cours de la TEM dépend de l'intensité des stimuli extérieurs.

4. Situation du sujet et objectifs du travail

Le phénomène de la chimiorésistance du cancer du pancréas est à l'origine de son mauvais pronostic. Il demeure un problème majeur dont les causes sont multiples et souvent intriquées. Il a été récemment proposé que la résistance particulière des cellules tumorales pancréatiques pourrait être en relation avec leurs caractéristiques phénotypiques (phénotype de cellules souches ou phénotype TEM). Les travaux antérieurs de l'équipe ont permis de mettre en évidence dans des lignées tumorales pancréatiques humaines rendues chimiorésistantes de manière chronique, des modifications morphologiques évoquant un phénomène de TEM. Nous avons cherché à approfondir cet aspect d'une part en comparant plusieurs lignées tumorales pancréatiques ayant un profil mutationnel et un phénotype différents et d'autre part en étudiant les mécanismes mis en jeu dans l'induction du phénotype de TEM et ses relations avec la chimiorésistance.

Les objectifs spécifiques de notre travail étaient :

- ✓ D'étudier les caractéristiques du phénotype TEM dans les cellules chimiorésistantes
 - Expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux
 - Expression des facteurs de transcription
 - Modifications morphologiques
 - Capacités de migration et d'invasion
- ✓ D'étudier les voies de signalisation impliquées et leurs relations avec la chimiorésistance
 - Mise en évidence d'éléments régulateurs de signalisation cellulaire
 - Effet des inhibiteurs pharmacologiques sur la TEM et la chimiorésistance

- ✓ D'étudier sur une cohorte de patients, la corrélation entre l'expression des marqueurs de TEM, les données histopathologiques et l'exposition à un traitement néoadjuvant

Résultats

1. Etablissement de lignées cellulaires pancréatiques chimiorésistantes et caractérisation morphologique et phénotypique

1.1. Etablissement de lignées chimiorésistantes

Nous avons choisi 4 lignées cellulaires tumorales pancréatiques, BxPC-3, Capan-2, Panc-1 et MiaPaca-2. Nous avons d'abord analysé l'effet cytotoxique de l'augmentation des concentrations de gemcitabine sur les lignées BxPC-3, Capan-2, Panc-1 et MiaPaca-2 après une exposition de 72 heures (figure 1). L'analyse des valeurs de l' IC_{50} ont révélé des différences intrinsèques de chimiorésistance à la gemcitabine entre les lignées tumorales pancréatiques. Comme le montre la figure 30 et le tableau 6, les cellules BxPC-3 sont beaucoup plus sensibles à la gemcitabine ($IC_{50} = 8 \times 10^{-8}$ M) en comparaison avec les lignées Panc-1 ($IC_{50} = 10^{-7}$) et MiaPaca-2 ($IC = 7 \times 10^{-7}$ M), ce qui est en accord avec les données précédemment publiées (Arumugam et al., 2009; Funamizu et al., 2012). Comme précédemment rapporté, la lignée cellulaire Capan-2 était très chimiorésistante à la gemcitabine (Bellone et al., 2006; Amrutkar et al., 2018).

Les sous-populations cellulaires chimiorésistantes ont été obtenues après un traitement chronique avec des concentrations croissantes de gemcitabine. Les paliers de concentrations ont été déterminés à partir de l' IC_{50} de chaque lignée. Ces lignées chimiorésistantes Gem-MiaPaca-2, Gem-Panc-1, Gem-Capan-2 et Gem-BxPC-3 ont été respectivement stabilisées à 10^{-8} , 5×10^{-8} , 10^{-8} et 10^{-7} M. Nous avons ensuite réalisé une caractérisation du potentiel de chimiorésistance des clones chimiorésistants par rapport aux cellules parentales par un test MTT avec augmentation progressive des doses de chimiothérapie par gemcitabine.

La figure 30 montre que Gem-MiaPaca-2, Gem-Panc-1, Gem-Capan-2 et Gem-BxPC-3 étaient plus chimiorésistantes à la gemcitabine en comparaison avec les cellules parentales.

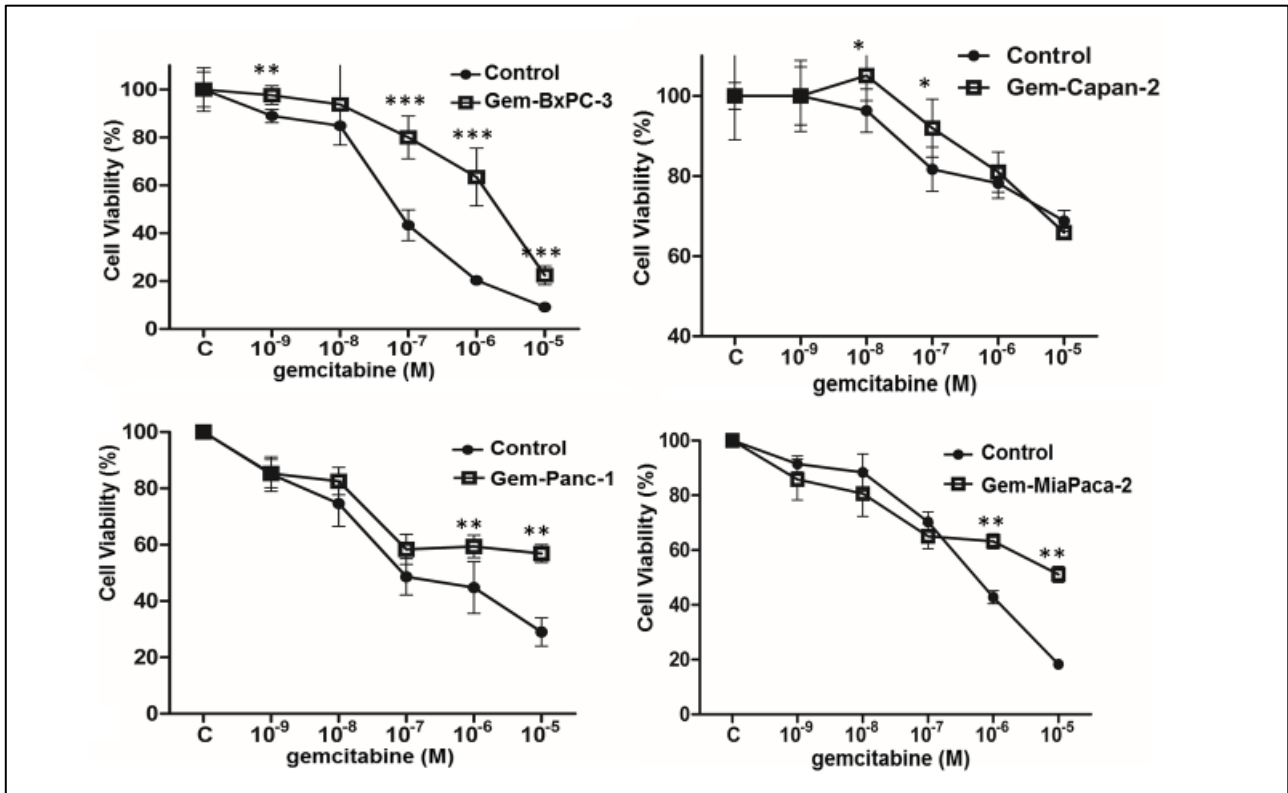


Figure 30 : Comparaison de la résistance à la gemcitabine des lignées parentales et chimiorésistantes. Les cellules sont ensemencées et traitées par gemcitabine pendant 72h. *P < 0,05 ; **P < 0,01 et ***P < 0,001.

Les valeurs d'IC₅₀ dans lignées parentales et chimiorésistantes sont détaillées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Les valeurs d'IC₅₀ des lignées parentales et chimiorésistantes

Lignée	IC ₅₀	
	Cellules parentales	Cellules chimiorésistantes
BxPC-3	8.10 ⁻⁸	3.10 ⁻⁶ **
Capan-2	> 10 ⁻⁵ †	> 10 ⁻⁵ †
Panc-1	10 ⁻⁷	> 10 ⁻⁵ †
MiaPaca-2	7. 10 ⁻⁷	> 10 ⁻⁵ **, †

** : p<0.01

† : IC₅₀ non atteint

Nous avons donc confirmé par ces premiers résultats que nos lignées chimiorésistantes avaient un potentiel de résistance à la gemcitabine plus élevé que les cellules parentales.

1.2. Caractérisation morphologique des cellules chimiorésistantes

Les données de microscopie optique ont montré que les cellules chimiorésistantes présentaient des modifications morphologiques par rapport aux cellules parentales telles que la perte d'adhérence intercellulaire et l'acquisition d'une morphologie fusiforme (Figure 31A). Ces variations morphologiques étaient présentes dans les cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2 alors qu'aucune modification n'a été observée dans les lignées BxPC-3 et Capan-2 qui gardaient leur morphologie épithéliale classique.

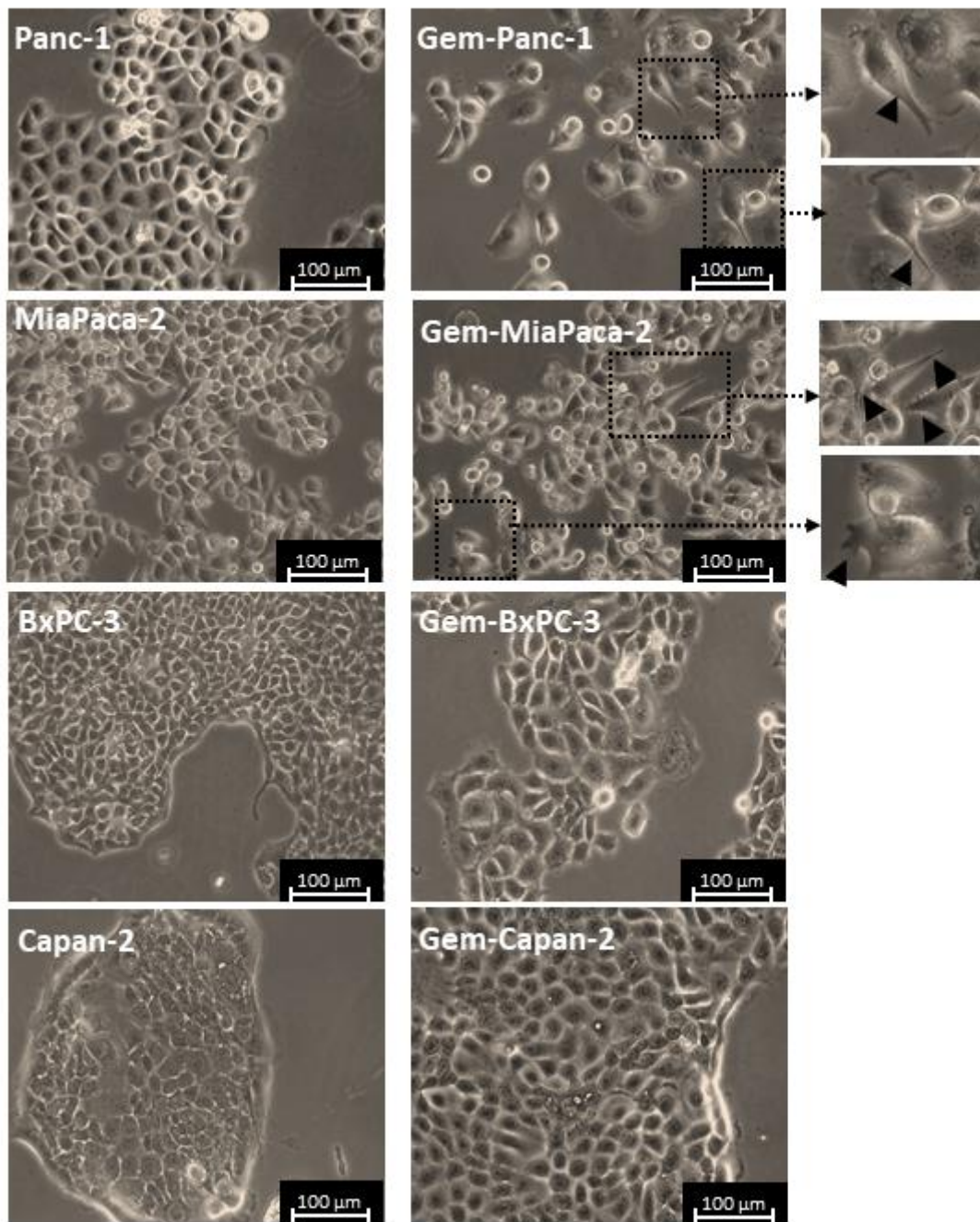


Figure 31A : Images de microscopie optique à contraste de phase (X20) des cellules parentales et chimiorésistantes. Les têtes de flèches indiquent les cellules présentant une perte d'adhérence intercellulaire avec une morphologie fusiforme.

Nous avons également réalisé une analyse morphométrique afin de déterminer si le taux de cellules fusiformes étaient statistiquement différents entre les cellules parentales et chimiorésistantes des 4 lignées tumorales pancréatiques (Figure 31B).

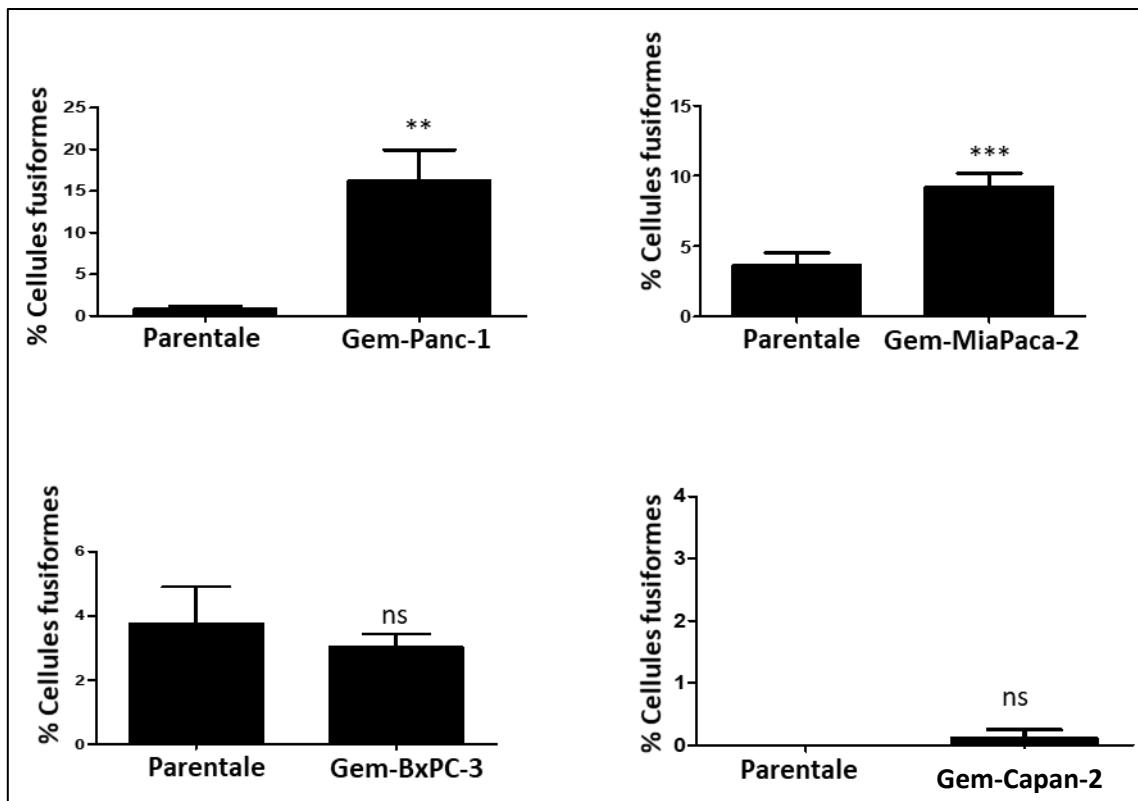


Figure 31B : Analyse quantitative morphométrique de la proportion de cellules fusiformes entre lignées parentales et chimiorésistantes. ** P < 0,01 et * P < 0,001.**

Les résultats ont montré que la proportion de cellules fusiformes dans les Gem-Panc-1 et les Gem-MiaPaca-2 était respectivement multiplié par 18 ($p = 0,008$) et 2,5 ($P = 0,0007$) par rapport aux cellules parentales. En revanche, aucune variation morphologique significative n'a été observé dans les lignées chimiorésistantes des BxPC-3 et Capan-2.

Nous avons pu donc mettre en évidence que la chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques était associée à des modifications morphologiques qui peuvent s'apparenter à un phénotype de TEM. De plus, seules les lignes Panc-1 et MiaPaca-2 présentaient ces changements morphologiques.

1.3. Caractérisation phénotypique

Nous avons d'abord étudié l'expression de protéines épithéliales (E-cadhérine et occludine), mésenchymateuses (vimentine) du facteur de transcription ZEB - 1 dans différentes lignées tumorales pancréatique (Figure 32A). Les cellules Capan-1, Capan-2 et BxPC-3 présentent une forte expression de la E-cadhérine sans détection de la vimentine ni de ZEB-1. Inversement, les cellules Panc-1 et MiaPaca-2 expriment peu ou pas la E-cadhérine alors qu'elles expriment fortement la vimentine (Figure 32A). Ensuite, nous avons analysé les modifications phénotypiques induites par la chimiorésistance à la gemcitabine dans les 4 lignées tumorales pancréatiques (Figure 32B). Dans les cellules Panc-1, la résistance à la gemcitabine était associée à une diminution de l'expression de la E-cadhérine et de l'occludine. Dans les cellules MiaPaca-2, qui n'expriment pas la E-cadhérine (Seidel et al., 2004; Fukumoto et al., 2008), la résistance à la gemcitabine était marquée essentiellement par une forte diminution de l'expression de l'occludine. Concernant l'expression de marqueurs mésenchymateux, nous avons observé une augmentation non significative de l'expression de la vimentine ($p= 0,08$) dans les cellules Gem-Panc-1 par rapport aux cellules parentales. Cependant, l'expression de la vimentine basale étant très élevée, nous n'avons pas constaté d'augmentation significative de la vimentine dans les cellules chimiorésistantes des MiaPaca-2 (Figure 32B).

L'expression du répresseur transcriptionnel ZEB-1 a été également étudiée par Western blot. Nous avons montré que la chimiorésistance des lignées Panc-1 et MiaPaca-2 était associée à une augmentation de l'expression de ZEB-1.

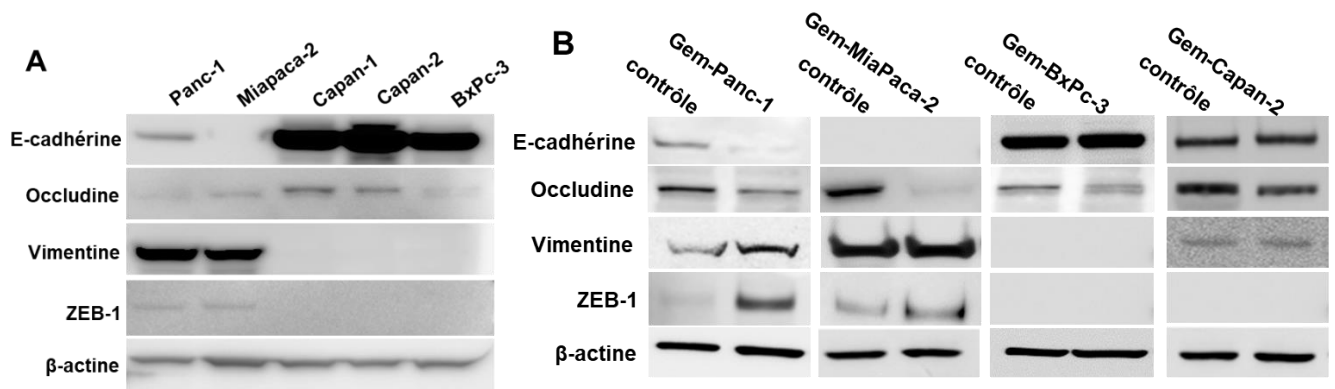


Figure 32 : Expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dans les lignées tumorales pancréatiques. A : Analyse par Western blot de l'expression de la E-cadhérine, occludine, vimentine et ZEB-1 dans les tumorales pancréatiques non traitées. B : Analyse comparative par Western blot de l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dans les lignées chimiorésistantes par rapport aux lignées contrôles.

Ensuite, nous avons utilisé la microscopie confocale pour étudier la morphologie des cellules et la distribution cellulaire de la E-cadhérine dans les cellules de phénotype épithélial (BxPC-3 et Capan-2) et de la vimentine dans les cellules mésenchymateuses (Panc-1 et MiaPaca-2).

La figure 33 montre une redistribution de la vimentine dans le cytoplasme des cellules chimiorésistantes des Panc-1 et MiaPaca-2 avec l'apparition de quelques protubérances cytoplasmiques évoquant des lamellipodes. En revanche, aucune modification morphologique n'a été constatée dans les lignées chimiorésistantes Gem-BxPC-3 et Gem-Capan-2. Par ailleurs, l'analyse de la distribution de la E-cadhérine dans les Gem-BxPC-3 et Gem-Capan-2 a révélé une relocalisation de cette protéine de la membrane vers le cytoplasme.

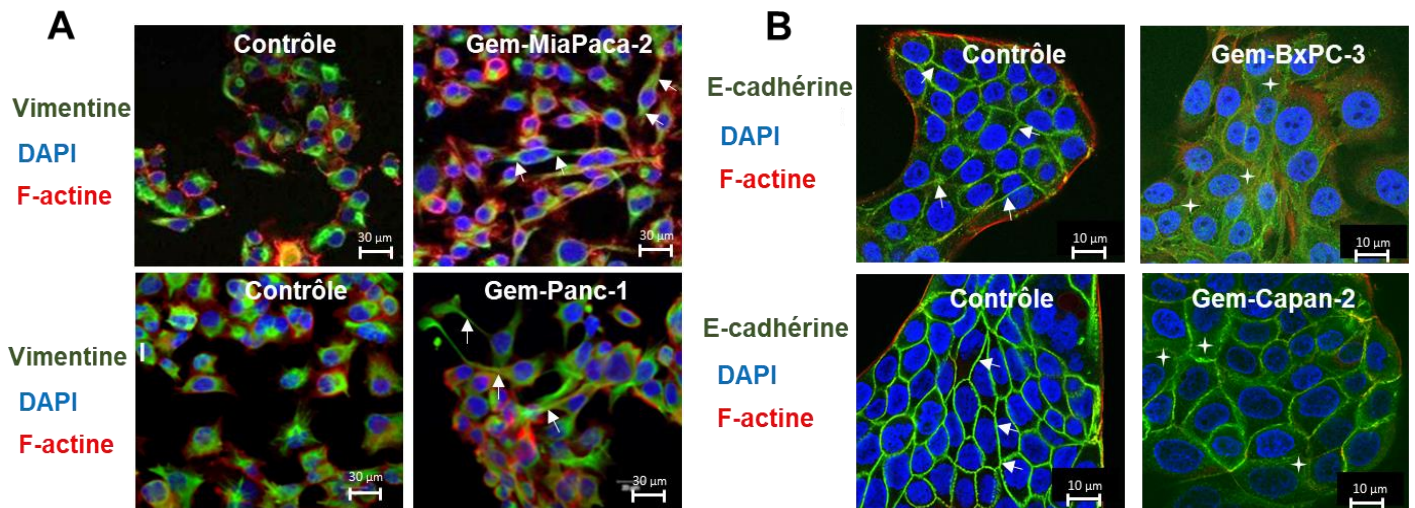


Figure 33 : Etude par microscopie confocale de la distribution de la E-cadhérine (A, x60) et la vimentine (B, x40) dans les lignées contrôles et chimiorésistantes de BxPC-3, Capan-2, Panc-1 et MiaPaca-2. Marquage nucléaire au DAPI (bleu), du cytosquelette à la phalloïdine (rouge) et des protéines d'intérêt par Alexa Fluor 488 (vert).

Par conséquent, l'acquisition d'une chimiorésistance est associée à des modifications phénotypiques qui varient en fonction des caractéristiques des cellules tumorales pancréatiques. Dans les cellules à profil mésenchymateux (Panc-1 et MiaPaca-2), ces changements pourraient être attribués au processus de TEM alors que les cellules de phénotype épithélial (BxPC-3 et Capan-2) ne présentaient qu'une diminution de l'occludine sans modifications morphologiques.

1.4. Les capacités d'invasion associées à la chimiorésistance

Nous avons ensuite réalisé une analyse fonctionnelle afin de savoir si la chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques était associée à l'acquisition de propriétés d'invasion. Le test de blessure a été utilisé pour évaluer la capacité des cellules tumorales pancréatiques à envahir le collagène de type I.

Nos résultats montrent que les lignées chimiorésistantes Gem-Panc-1, Gem-MiaPaca-2 et Gem-Capan-2 présentent un potentiel plus invasif en collagène de type I par rapport aux cellules contrôles (Figure 34). Pour les cellules BxPC-3, qui sont intrinsèquement invasives, aucune différence entre les cellules contrôles et chimiorésistantes n'a été observée.

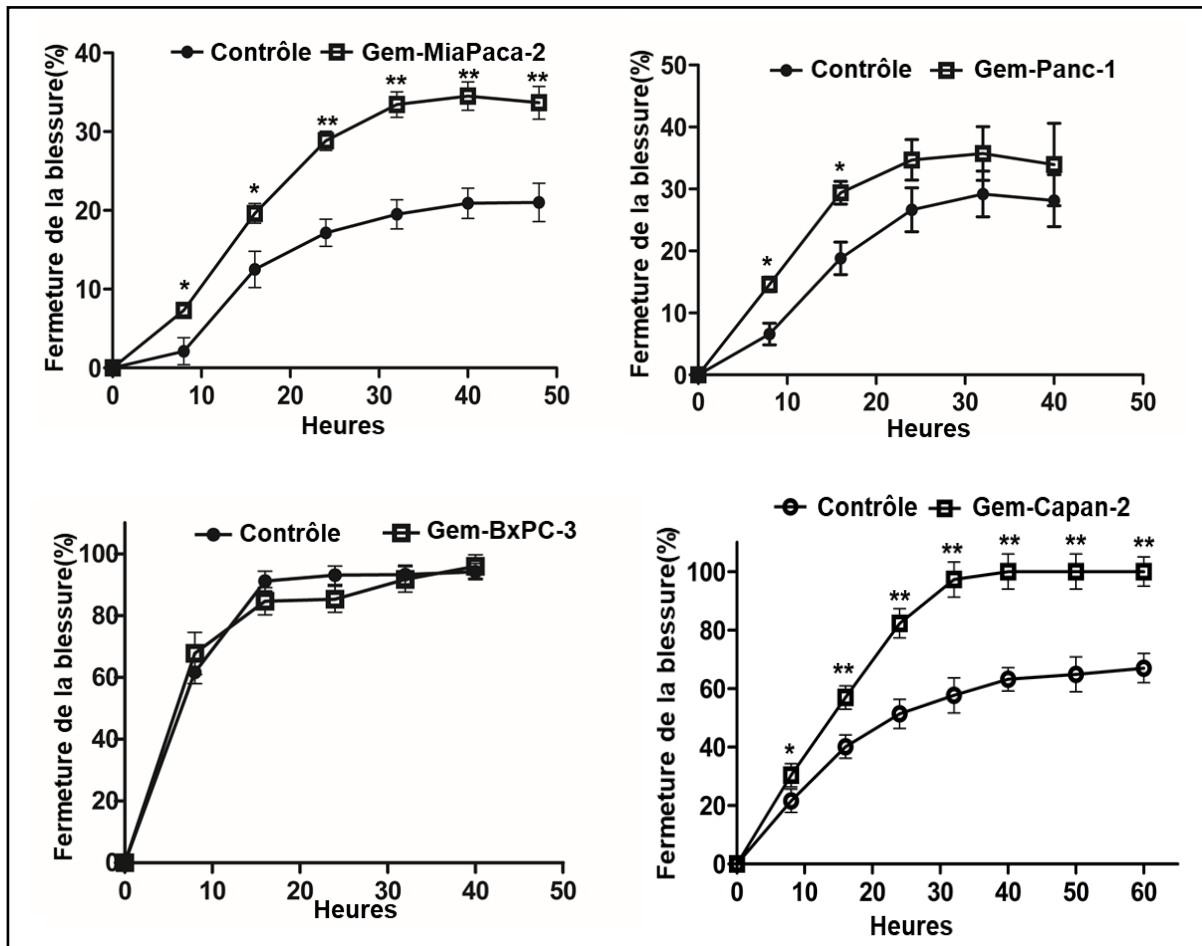


Figure 34: Potentiel invasif des différentes lignées tumorales pancréatiques chimiorésistantes par rapport aux lignées contrôles. Les courbes représentent le pourcentage de fermeture de la blessure en fonction du temps. *P < 0,05 , **P < 0,01.

En conclusion de cette analyse morphologique et phénotypique, nous avons montré que les lignées BxPC-3 et Capan-2 chimiorésistantes s'individualisent essentiellement par une perte fonctionnelle de la E-cadhérine sans modification marquée des régulateurs de la TEM. Ces lignées, dont le phénotype épithélial est très marqué, deviennent chimiorésistantes sans modification quantitative de l'expression des marqueurs de la TEM. En revanche, les cellules

dont le phénotype mésenchymateux est prédominant (Panc-1 et MiaPaca-2), acquièrent sous chimiothérapie des caractéristiques de cellules plus agressives combinant un phénotype de TEM et une augmentation des capacités d'invasion dans une matrice de collagène. Ces données suggèrent que l'émergence d'un phénotype de TEM n'est pas systématique au cours de l'acquisition d'une chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques, et que cela dépend d'autres paramètres intrinsèques.

2. Les principales voies de signalisation impliquées dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses pancréatiques et leur rôle dans la TEM

2.1. Identification des voies de signalisation

Nous avons analysé par une méthode systématique (Human Phospho-Kinase Antibody Array, R & D) l'activité des principales kinases régulatrices de la signalisation cellulaire (données non présentées). Les principales voies de signalisation qui se sont avérées activées étaient les voies MEK/ERK, mTor et le récepteur Met. Nous nous sommes donc au départ penchés sur l'étude de ces éléments de signalisation par Western blot dans les lignées contrôles et chimiorésistantes (Figure 35).

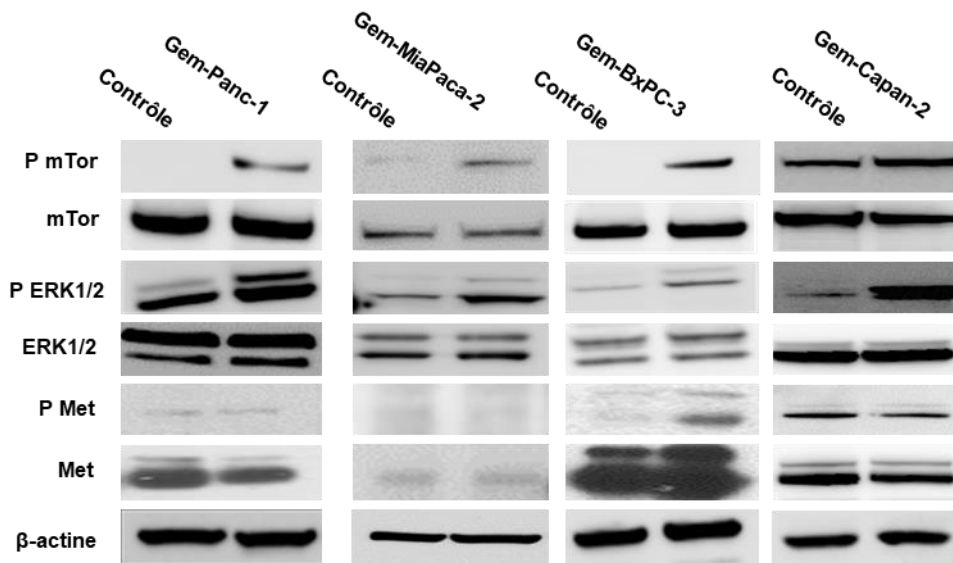


Figure 35 : Expression en Western blot des principales kinases (phospho-mTor(Ser 2448), phospho-ERK(Thr202/Tyr204), et phospho-Met(Tyr1234/1235 dans les lignées contrôles et chimiorésistantes des Panc-1, MiaPaca-2, BxPC-3 et Capan-2.

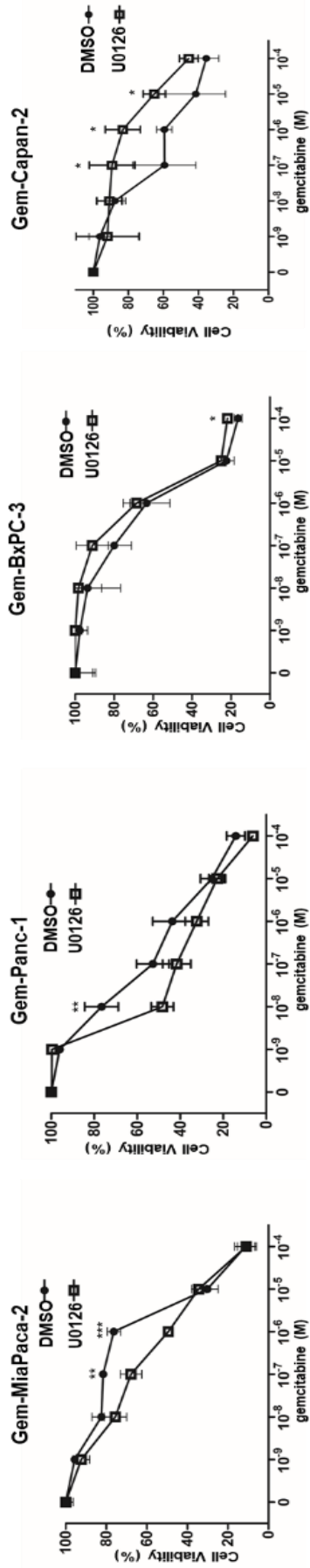
L'analyse par Western blot a montré une augmentation de la phosphorylation de mTOR et ERK1/2 dans toutes les lignées tumorales pancréatiques chimiorésistantes par rapport aux lignées contrôles. Concernant l'expression de Met, nous avons constaté une forte expression de phospho-Met dans les Gem-BxPC-3 par rapport aux cellules contrôles mais sans pouvoir détecter une différence significative entre les lignées contrôles et chimiorésistantes des Capan-2. Par ailleurs, Met est à peine détectable dans les lignées Panc-1 et MiaPaca-2 (Figure 35).

Nos résultats suggèrent pour les cellules Panc-1, MiaPaca-2 et Capan-2 un rôle important de la voie MEK/ERK et mTOR dans l'acquisition d'un phénotype chimiorésistant. En revanche, pour les cellules BxPC-3, les résultats font particulièrement ressortir une activation du récepteur Met dans les lignées chimiorésistantes. Ce récepteur est aussi bien connu pour son activité oncogénique, pro-proliférative et pro-invasive.

2.2. Implication des voies MEK/ERK et mTOR dans la chimiorésistance

Afin d'appréhender le rôle fonctionnel de ces voies de signalisation dans la chimiorésistance, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques ciblant les principales protéines activées. Nous avons étudié l'effet de l'inhibiteur de MEK/ERK (U0126) sur la résistance à la gemcitabine des lignées contrôles et chimiorésistantes des BxPC-3, Capan-2, Panc-1 et MiaPaca-2. L'effet de cet inhibiteur sur la chimiosensibilité a été analysé par un test de viabilité cellulaire MTT. Les cellules ont été incubées à des concentrations croissantes de gemcitabine en présence du U0126 (Figure 36).

A



B

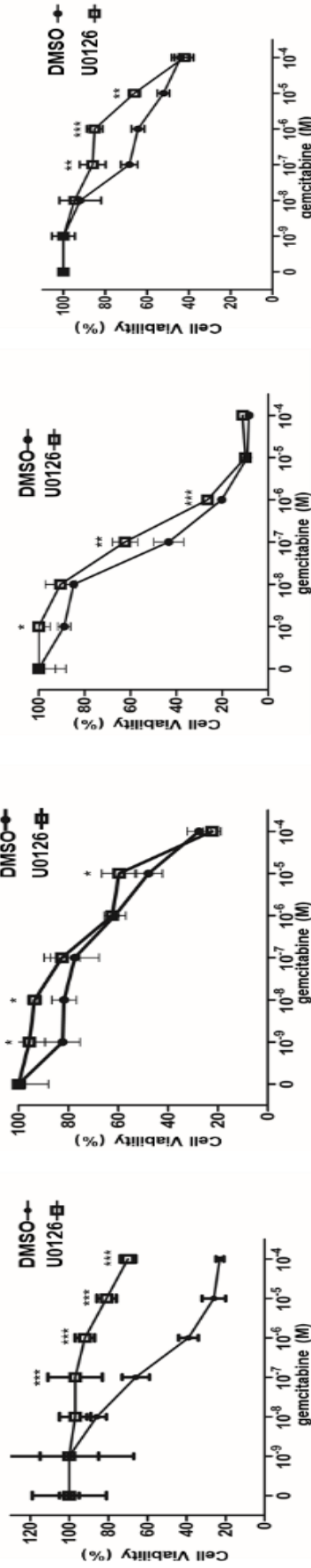


Figure 36 : Potentiel de résistance à la gemcitabine avec ou sans traitement par l'inhibiteur U0126 des lignées chimiorésistantes (A) et parentales (B). *P < 0,05 ; **P < 0,01 ; *P < 0,001. DMSO : Dimethylsulfoxyde.**

Le U0126 a significativement diminué la résistance à la gemcitabine des cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2 mais sans effet significatif sur les cellules Gem-BxPC-3 et Gem-Capan-2 (Figure 36A). Nous avons ensuite analysé si la combinaison de la gemcitabine avec le U0126 affecterait la résistance des cellules parentales (Figure 36B). Les résultats ont montré que l'association de la gemcitabine au U0126 augmentait la chimiorésistance de toutes les lignées tumorales pancréatiques.

Ainsi, l'inhibition de la voie MEK/ERK n'a pas montré un effet sur la chimiorésistance des cellules parentales ou résistantes à la gemcitabine dans les lignées BxPC-3 et Capan-2. Concernant les lignées mésenchymateuses Panc-1 et MiaPaca-2, l'inhibition de ERK1/2 impactait la chimiorésistance uniquement dans les lignées Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2. Toutes ces données suggèrent que la chimiorésistance des lignées Panc-1 et MiaPaca-2 implique la voie de signalisation MEK/ERK. Mais quel est le rôle de cette voie de signalisation dans l'acquisition d'un phénotype de TEM ?

2.3. Implication de la voie MEK/ERK dans la TEM dans les lignées Panc-1 et MiaPaca-2

Afin d'étudier le rôle de cette voie de signalisation dans l'acquisition d'un phénotype de TEM dans les lignées chimiorésistantes Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2, nous avons traité ces deux populations cellulaires par l'inhibiteur U0126. L'expression de la E-cadhérine, la vimentine, Snail1 et ZEB-1 a été analysée par Western blot et RTqPCR (Figure 37).

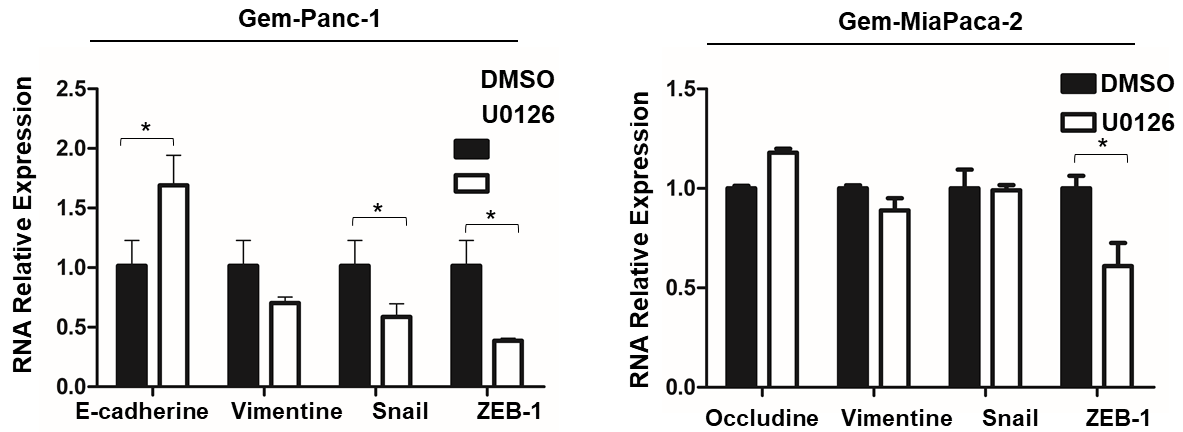
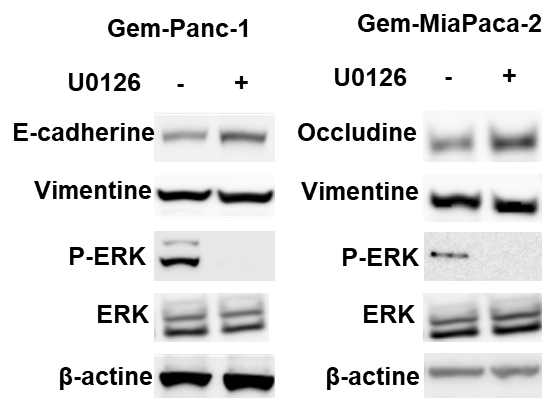
A**B**

Figure 37 : Expression des marqueurs de la TEM dans les lignées Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2 après traitement par le U0126. A : Analyse de l'expression de la E-cadhérine, occludine, vimentine, Snail-1 et ZEB-1 par RTqPCR après traitement par U0126 (10 μ M). Les résultats sont exprimés en prenant comme référence les cellules traitées par DMSO. B : Expression de la E-cadhérine, occludine, vimentine, phospho-ERK1/2 et ERK1/2 dans les Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2 après traitement par U0126. * P < 0,05. DMSO : Diméthylsulfoxyde.

De manière intéressante, le traitement par U0126 des cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2 était respectivement associé à une réexpression de la E-cadhérine et de l'occludine. Cependant, aucune variation de l'expression de la vimentine n'a été observée dans les cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2 après traitement par le U0126. Nous avons également constaté que le traitement des cellules Gem-Panc-1 par le U0126 réduisait significativement l'expression de Snail-1 et ZEB-1 (Figure 37A).

L'analyse de l'expression de phospho-ERK par Western blot après traitement par le U0126 confirme l'inactivation de la voie MEK/ERK par cet inhibiteur (Figure 37B).

Ces résultats montrent que l'inhibition de la voie MEK/ERK permet de reverser le phénotype de TEM associée à la chimiorésistance des lignées Panc-1 et MiaPaca-2. Ces données plaident pour une implication de la signalisation MEK/ERK dans la chimiorésistance et la TEM dans les cellules tumorales pancréatiques de phénotype mésenchymateux.

3. Implication de ZEB-1 dans la TEM et la chimiorésistance des lignées Panc-1 et MiaPaca2

Nous avons observé une augmentation de l'expression de ZEB-1 dans les cellules chimiorésistantes Gem-panc-1 et Gem-MiaPaca-2 par rapport aux cellules parentales. Afin d'étudier le rôle du répresseur transcriptionnel ZEB-1 dans la chimiorésistance et la TEM, nous avons utilisé des siRNA anti-ZEB-1 et analysé l'effet de ces siRNA sur la TEM, les capacités d'invasion et la chimiorésistance des cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2.

3.1. Impact du siZEB-1 sur l'expression des marqueurs de TEM

Nous avons analysé par RTqPCR et Western blot l'expression de la E-cadhérine, occludine, vimentine et ZEB-1 après traitement des Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2 par le si-ZEB-1. L'inhibition de ZEB-1 a atténué le phénotype mésenchymateux des cellules chimiorésistantes avec une ré-expression de la E-cadhérine dans les cellules Gem-Panc-1 et de l'occludine dans les cellules Gem-MiaPaca-2. De manière intéressante, nous avons observé une diminution significative de l'expression de la vimentine après traitement des cellules Gem-Panc-1 par le si-ZEB-1. En revanche, aucun impact n'a été constaté sur l'expression de la vimentine dans les cellules Gem-MiaPaca-2 (Figure 38A).

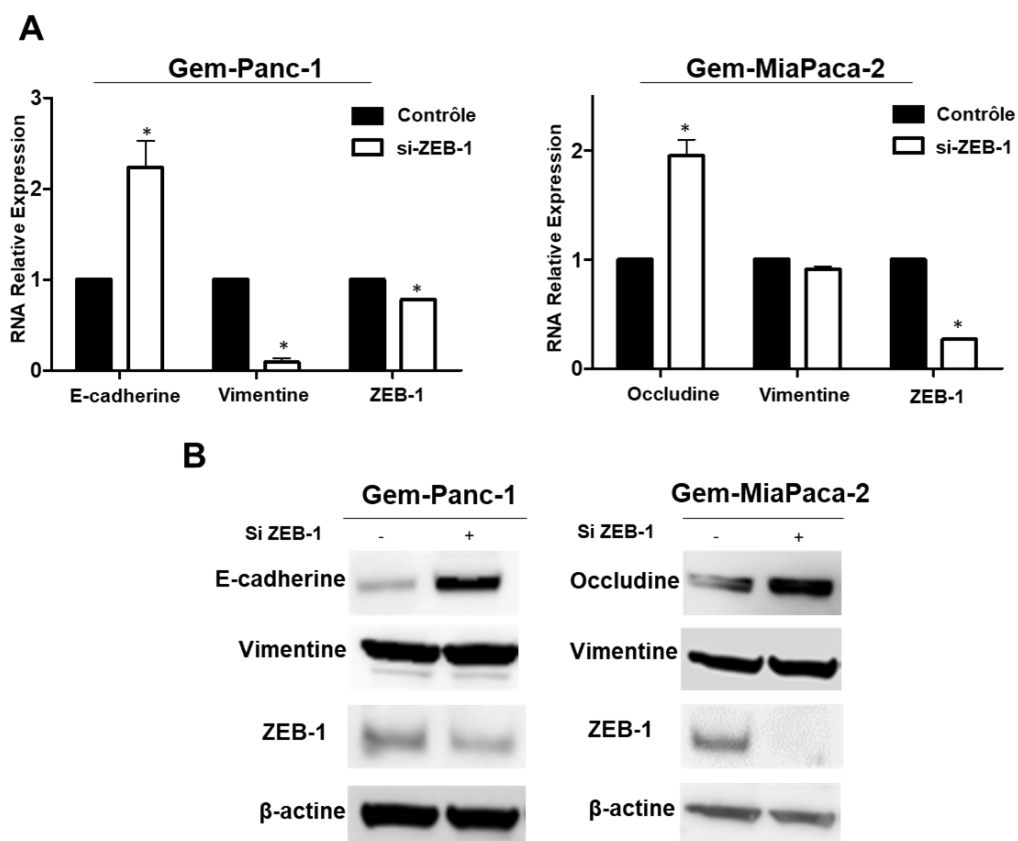


Figure 38 : Impact de l'inhibition de ZEB-1 sur l'expression des marqueurs épithéiaux et mésenchymateux. A : Analyse par RTqPCR de l'expression de la E-cadhérine, occudine, vimentine et ZEB-1. Les résultats sont exprimés en prenant comme référence l'expression des marqueurs dans les cellules transfectées par le si-contrôle. B : Expression des même marqueurs par Western blot en présence de siZEB-1 ou du si-contrôle. * : $P < 0,05$.

Les mêmes résultats ont été observés en western blot (Figure 38B). A noter que l'inhibition de l'expression de ZEB-1 a été vérifiée par RTqPCR et Western blot.

Ces résultats montrent que ZEB-1 joue un rôle majeur dans la répression des marqueurs épithéiaux et l'induction d'une TEM dans les cellules chimiorésistantes Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2.

3.2. Impact de ZEB-1 sur propriétés invasives des cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca2

Nous avons ensuite évalué l'effet du si-ZEB-1 sur l'invasion du collagène de type I sur Incucyte (Figure 39).

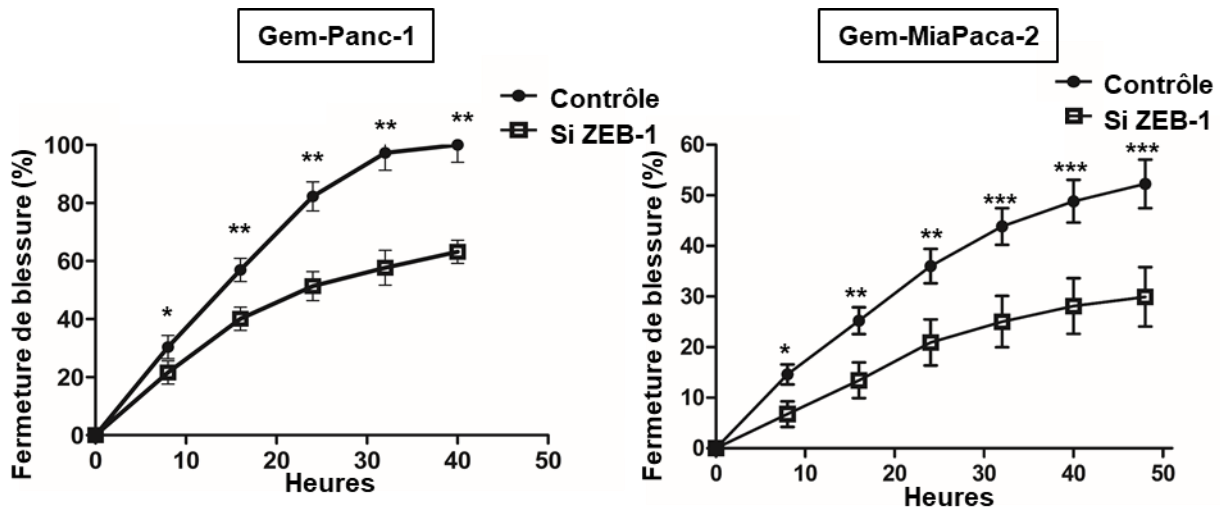


Figure 39 : Impact du si-ZEB-1 sur les propriétés d'invasion des cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2. Les courbes correspondent au pourcentage de fermeture de la blessure sur collagène de type I en fonction du temps. Les cellules sont transfectées par le si-ZEB-1 ou le si-contrôle et incubées sur une plaque où la blessure est remplie par du collagène de type I. P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001.

L'inhibition de ZEB-1 est associée à une diminution significative des capacités d'invasion du collagène de type I dans les cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2.

Ainsi, ZEB-1 semble jouer un rôle crucial dans l'acquisition des capacités d'invasion associées à la chimiorésistance dans les lignées Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2.

3.3. Effets du si-ZEB-1 sur la chimiorésistance des cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca2

Nous avons étudié ensuite l'impact de la transfection du si-ZEB-1 sur la chimiorésistance des cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2 (Figure 40). Les cellules ont été traitées par si-ZEB-1 ou si-contrôle et incubées avec concentrations croissantes de gemcitabine.

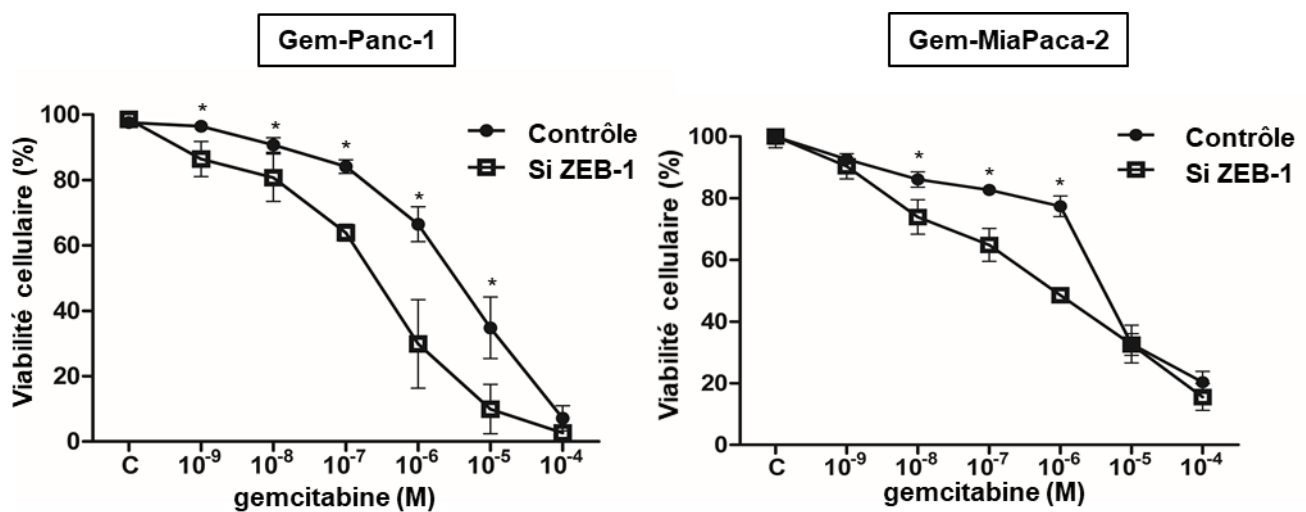


Figure 40 : Impact du si-ZEB-1 sur la chimiorésistance des Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2. Les cellules sont transfectées par si-ZEB-1 ou si-contrôle pendant 48h et traitées parallèlement par une gamme de gemcitabine. * : P < 0,05.

L'inhibition de ZEB-1 resensibilisait les cellules Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2 à la gemcitabine en réduisant l'IC₅₀ dans ces deux populations (Gem-Panc-1 siZEB-1 : 4×10^{-7} M, Gem-Panc-1 : 55×10^{-5} M ; Gem-MiaPaca-2 si-ZEB-1: 10^{-6} M, Gem-MiaPaca-2 : 6×10^{-6} M).

En conclusion, ZEB-1 semble jouer un rôle majeur dans l'induction du phénotype TEM avec une répression de l'expression de la E-cadhérine et l'acquisition de propriétés invasives. L'inhibition de ZEB-1 diminue la résistance à la gemcitabine suggérant que la TEM est impliquée directement dans l'acquisition d'un phénotype chimiorésistant des cellules tumorales pancréatiques de phénotype mésenchymateux.

4. Etude immunohistochimique de l'expression de ZEB-1

Nous avons ensuite analysé ces mécanismes au sein de tumeurs pancréatiques humaines en utilisant la technique d'immunohistochimie. Pour cela, nous avons sélectionné une série de 20 patients avec un adénocarcinome du pancréas borderline opérés avec ou sans traitement néoadjuvant par chimiothérapie ou radiochimiothérapie. Les caractéristiques cliniques et histologique des patients sont résumées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Caractéristiques cliniques et histologiques des patients de la cohorte

N	Patient	Procédure chirurgicale	Taille tumeur(cm)	ZEB-1 (%)	BT	N+	EPN	IV	R0/R1	TNM	traitement néoadjuvant
1	F, 67 ans	DPC	0.4	1	+	+	-	-	R0	T1	+
2	M, 58 ans	DPC	2.5	20	+	-	+	-	R1	T3	+
3	F, 69 ans	DPC	1.5	5	-	+	+	-	R1	T4	+
4	F, 76 ans	DPC	3	1	+	-	-	-	R0	T3	+
5	M, 68 ans	DPC	2	30	+	+	+	-	R0	T1	+
6	M, 60 ans	DPC	3.5	15	+	+	+	+	R1	T4	+
7	M, 60 ans	DPC	2.5	0	-	+	-	-	R1	T3	+
8	F, 66 ans	DPC	3	1	+	+	-	+	R1	T3	+
9	M, 59 ans	DPC	2.3	20	+	-	+	+	R1	T2	+
10	F, 59 ans	DPC	2	40	+	+	+	-	R0	T3	+
11	M, 58 ans	DPC	2.9	0	-	+	+	-	R0	T3	-
12	M, 65 ans	DPC	2	1	+	+	+	-	R0	T3	-
13	F, 71 ans	DPC	2.5	0	-	-	-	-	R1	T3	-
14	F, 77 ans	DPC	3	0	-	+	+	-	R1	T3	-
15	F, 72 ans	DPC	5	50	-	+	+	-	R1	T3	-
16	F, 60 ans	SPC	7	10	+	+	+	-	R0	T3	-
17	F, 59 ans	SPC	3	2	+	+	+	+	R0	T3	-
18	M, 61 ans	SPC	7	0	-	+	+	-	R1	T4	-
19	F, 69 ans	DPC	2	0	-	+	-	-	R0	T3	-
20	M, 75 ans	DPC	2.5	0	-	+	+	-	R0	T3	-

IV: invasion vasculaire, EPN: Envahissement périnerveux, N+: Envahissement ganglionnaire, BT: budding tumoral, DPC: duodéno pancréatectomie céphalique, SPC: spléno pancréatectomie caudale, R0 : résection microscopiquement complète, R1 : résection microscopiquement incomplète.

La majorité des patients de notre série ont été opérés par DPC (17/20). L'âge médian était de 65,5 ans [58-77]. Le score d'expression de ZEB-1 était $\geq 1\%$ chez 65 % des patients et seulement 35% ne présentaient pas de budding tumoral (i.e cellules isolées ou amas de cellules). La moitié des patients avaient une résection microscopiquement complète (R0) et la majorité des tumeurs étaient classées T3 ou T4.

Nous avons ensuite étudié au front d'invasion tumorale, la présence de cellules en budding tumoral (Figure 41).

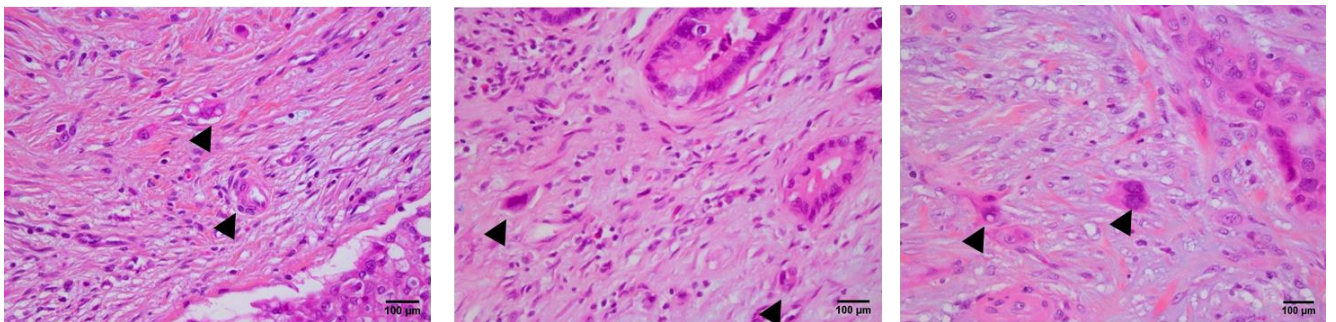


Figure 41 : Budding tumoral au front d'invasion sur HES (x40). Les têtes de flèches représentent des cellules isolées ou des amas de cellules isolées définissant le budding tumoral.

L'analyse histologique sur HES a révélé la présence au front d'invasion de cellules isolées de la tumeur primitive, envahissant le stroma tumoral. Ce phénomène de budding tumoral était présent chez 11 patients de notre série. Nous avons ensuite analysé l'expression de la E-cadhérine, la vimentine et ZEB-1 par immunohistochimie (Figure 42).

L'analyse immunohistochimique montre une faible expression de la E-cadhérine dans les cellules en budding tumoral. Ces cellules présentent également une forte expression de la vimentine et une surexpression nucléaire de ZEB-1.

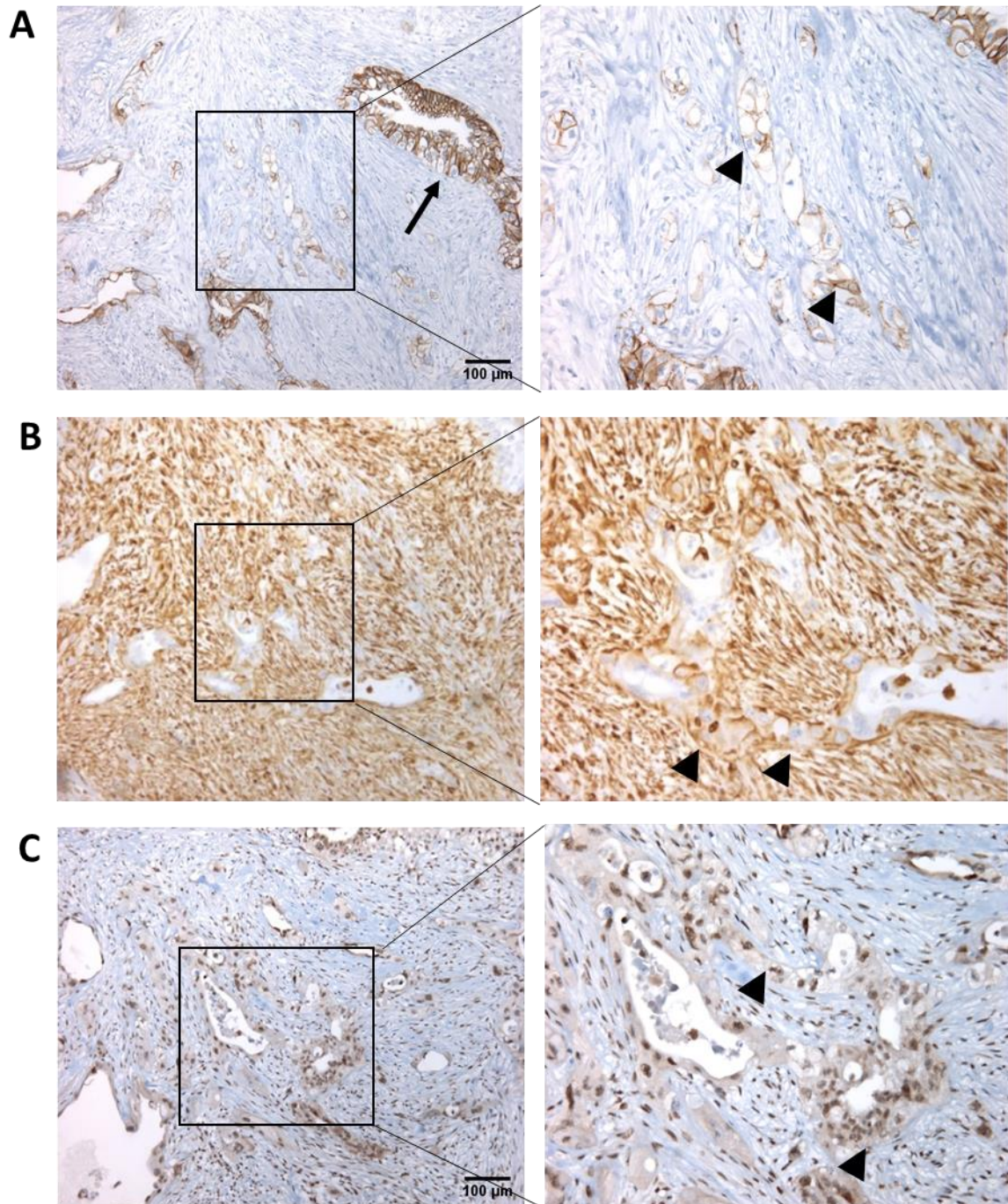


Figure 42 : Expression en immunohistochimie de la E-cadhérine, vimentine et ZEB-1 chez un patient opéré d'un adénocarcinome pancréatique. A : Expression de la E-cadhérine dans la tumeur (flèche) et les cellules en budding tumoral (têtes de flèches). B : Expression de la vimentine dans les cellules en budding tumoral au front d'invasion (têtes de flèches). C : Expression nucléaire de ZEB-1 dans les cellules en budding tumoral.

L'expression de ZEB-1 a été ensuite quantifiée dans toutes les tumeurs et corrélée aux caractéristiques histologiques et au budding tumoral (Tableau 8). L'expression de ZEB-1 était

corrélée à l'invasion périnerveuse ($P = 0,05$) et au budding tumoral ($P = 0,069$). De plus, le phénotype du budding tumoral était corrélé à certains marqueurs d'agressivité tumorale ; envahissement vasculaire et des organes de voisinage ($p=0,09$ et $p=0,08$ respectivement)(tableau 8). Enfin, les patients traités en néoadjuvant par chimiothérapie ou radiochimiothérapie avaient tendance à présenter dans leurs tumeurs un phénotype de budding tumoral ($P = 0,069$).

Tableau 8 : Analyse des données anatomopathologiques en fonction du traitement néoadjuvant, de l'expression de ZEB-1 et du budding tumoral

	Traitement néoadjuvant			Expression ZEB-1			Budding tumoral		
	Oui (n=10)	Non (n=10)	p	Forte (n=7)	Faible (n=13)	p	Yes (n=11)	No (n=9)	p
Age (médiane)	63	67	0,38	60	67	0,12	60	69	0,08
Sexe (M/F)	0,67	1	1	1,33	0,63	0,64	0,83	0,80	1
Localisation tumorale									
(Tête/Corps-queue)	10/0	7/3	0,21	6/1	11/2	1	9/2	8/1	1
Taille (cm)	2,53	3,69	0,11	3,47	2,71	0,63	2,79	3,21	0,75
Envahissement rétropéritonéal	4	0	0,08	2	2	0,56	2	2	1
Envahissement organes de voisinages	5	8	0,3	4	9	0,65	5	8	0,08
Envahissement veine porte	3	1	0,5	2	2	0,58	4	0	0,09
IV	5	3	0,64	4	4	0,35	4	4	1
EPN	6	8	0,62	7	7	0,05	8	6	1
Statut ganglionnaire									
N+	7	9	0,58	5	9	0,58	8	8	0,59
N+/N	0,22	0,17	0,87	0,15	0,22	0,96	0,13	0,18	0,5
Résection R1	6	4	0,64	4	6	1	2	2	1
T1-T2	3	0	0,21	2	1	0,27	3	0	0,21
T3-T4	7	10		5	12		8	9	
Budding tumoral	8	3	0,069	6	5	0,07	-	-	-
Expression ZEB-1									
Forte	5	2	0,34	-	-	-	6	1	0,07
Faible	5	8		-	-		5	8	
Traitement néoadjuvant									
Oui	-	-	-	5	5	0,34	8	2	0,069
Non	-	-		2	8		3	7	

Discussion

Implication de la TEM dans la chimiorésistance du cancer du pancréas

Les patients atteints d'un cancer du pancréas sont souvent diagnostiqués à des stades tardifs ce qui limite l'accès à la chirurgie pour la majorité des patients et péjore le pronostic. Le mauvais pronostic du cancer du pancréas est également dû au phénomène de chimiorésistance aux agents anti-cancéreux. Les mécanismes impliqués dans la chimiorésistance du cancer du pancréas sont multiples et souvent complexes. La TEM joue un rôle crucial dans la progression tumorale et l'initiation du processus métastatique et semble contribuer à la chimiorésistance du cancer du pancréas (Wang et al., 2017). Le facteur Snail est impliqué dans ce processus en inhibant l'apoptose des cellules cancéreuses pancréatiques et en leur permettant ainsi d'acquérir une résistance au 5-FU et à la gemcitabine (Yin et al., 2007). De la même façon, le traitement par la gemcitabine de souris invalidées pour Snail permet d'augmenter l'expression des transporteurs membranaires de gemcitabine et d'augmenter ainsi la sensibilité à la gemcitabine et la survie des souris (Zheng et al., 2015). L'inhibition de Slug ou de ZEB-1 permet aussi de sensibiliser les cellules tumorales pancréatiques à la gemcitabine (Tsukasa et al., 2015; Arumugam et al., 2009). Suite à l'expression de ces facteurs de transcription, les cellules cancéreuses pancréatiques chimiorésistantes perdent leurs caractéristiques épithéliales et acquièrent un phénotype mésenchymateux et des capacités de migration et d'invasion. D'autres mécanismes peuvent expliquer l'implication de la TEM dans la chimiorésistance du cancer du pancréas. Le facteur HIF-1 α est un inducteur de TEM via l'activation de la voie NF κ B et permet l'acquisition d'une chimiorésistance à la gemcitabine par les cellules tumorales pancréatiques (Wang et al., 2014). Une autre caractéristique des cellules cancéreuses pancréatiques est l'expression de marqueurs de cellules souches (CD133, CD24, CD44, EpCAM ...). Or, la TEM permet d'activer l'expression des marqueurs de cellules souches dans le cancer du pancréas (Nomura et al., 2015; Zhou et al., 2014). De plus, les CSC expriment des marqueurs de TEM suggérant que les deux processus sont étroitement liés (Singh and Settleman 2010). Il a été rapporté notamment que ZEB-1 inhibe l'expression des membres de la famille

miR-200 qui sont impliqués dans l'inhibition de l'expression des marqueurs de cellules souches (Riediger et al., 2009). L'expression de ZEB-1 est aussi sous le contrôle de miR-200. Il a été également rapporté que le marqueur de cellules souches CD44 stimule l'expression de ZEB-1 et que ce dernier est l'un des inducteurs de CD44 suggérant que les deux mécanismes collaborent pour favoriser la chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques (Preca et al., 2015). L'activation d'autres voies de signalisation comme Notch permet l'acquisition d'un phénotype de TEM et d'une résistance à la gemcitabine des cellules cancéreuses pancréatiques (Wang et al., 2009).

Nos résultats confortent les données de littérature et montrent clairement l'implication de la TEM dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses pancréatiques. Cependant, ces études se sont intéressées essentiellement à la chimiorésistance intrinsèque des lignées du cancer du pancréas et peu d'études se sont focalisées sur la résistance induite par l'exposition chronique à la gemcitabine. Nous avons ainsi montré que la chimiorésistance des lignées cancéreuses pancréatiques de phénotype intermédiaire (Panc-1) ou mésenchymateux (MiaPaca-2) était associée à des modifications phénotypiques compatibles avec une TEM. En revanche, les lignées BxPC-3 et Capan-2 ne présentaient pas de telles modifications mais une perte d'expression de l'occludine, marqueur épithélial des jonctions serrées. Ces résultats suggèrent que la chimiorésistance acquise des cellules cancéreuses pancréatiques est associée à différents types de modifications morphologiques.

Une TEM partielle ou complète

La TEM est un processus dynamique dans lequel le phénotype mésenchymateux n'est pas totalement exprimé. Des phénotypes intermédiaires ont été décrits pour caractériser une TEM dite partielle ou incomplète (Umbreit et al., 2014; Lundgren et al., 2009). Les mécanismes impliqués dans la TEM partielle sont mal connus. Pour expliquer ce phénomène, l'existence de sous populations de cellules mésenchymateuses a été évoquée. Certains auteurs suggèrent l'existence d'un phénotype hybride épithélio-mésenchymateux au sein d'une même cellule tumorale (Steinway et al., 2015). Ce phénotype

hybride serait suffisant pour générer une agressivité et une progression tumorale (Jolly et al., 2016) et pourrait être à l'origine de plusieurs processus impliquant la TEM (Grigore et al., 2016).

L'amplitude d'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux permet de classer les lignées cellulaires en plusieurs catégories. Pour le cancer du pancréas, le niveau d'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux est variable d'une lignée à un autre et permet de définir des sous-populations de phénotypes différents (Collisson et al., 2011).

Nos résultats confortent ces données en montrant que la chimiorésistance des lignées Panc-1 et MiaPaca-2 est associée à un phénotype de TEM partielle qui permet aux cellules tumorales pancréatiques d'acquérir des propriétés invasives.

ERK/ZEB-1 et la chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques

Le facteur de transcription ZEB-1 est un répresseur transcriptionnel de la E-cadhérine qui joue un rôle majeur dans la TEM et la chimiorésistance du cancer du pancréas. Plusieurs auteurs ont rapporté l'implication de ZEB-1 dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses pancréatiques (Wellner et al., 2009; Arumugam et al., 2009; Anurag Singh et al., 2009; Buck et al., 2007). Arumugam et al., ont montré que l'expression de ZEB-1 dans les lignées cancéreuses pancréatiques était corrélée à la résistance à la gemcitabine, au 5FU et au cisplatine (Arumugam et al., 2009). Wang et al., ont généré des cellules chimiorésistantes en exposant les cellules L3.6pl à la gemcitabine par un traitement chronique. Par conséquent, les cellules chimiorésistantes deviennent invasives et expriment fortement ZEB-1 ainsi que les marqueurs de cellules souches (Wang et al., 2009).

Bien que la corrélation entre ZEB-1/TEM et chimiorésistance est connue, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à déterminer.

Nos résultats montrent que le traitement des Panc-1 et MiaPaca-2 par la gemcitabine permet d'induire une TEM via une surexpression de ZEB-1 médiée par ERK1/2. De nombreuses études se sont intéressées à l'interaction entre ZEB-1 et ERK1/2. De manière très intéressante, il a été montré que la

résistance au pemetrexed des cellules cancéreuses pulmonaires était associée à l'acquisition d'une TEM par l'activation de la voie ERK1/2-ZEB-1 (Chiu et al., 2016). Dans les cellules cancéreuses prostatiques, ERK1/2 régule l'expression de ZEB-1 via le facteur de transcription FRA1 (Fos-like antigen 1) (Wu et al., 2016). Dans les cellules cancéreuses pancréatiques, un phénotype de TEM est exprimé après activation de la voie ERK1/2-ZEB-1 (Peng et al., 2018).

Nous avons également montré que l'inhibition de la voie MEK/ERK permet de réduire la chimiorésistance des lignées Gem-Panc-1 et Gem-MiaPaca-2 et induit une TME. A l'inverse, nous avons observé que l'inhibition de ERK1/2 n'avait pas d'effet bénéfique sur la sensibilité des cellules parentales à la gemcitabine. Ces résultats laissent penser que la combinaison initiale de la gemcitabine et d'un inhibiteur de la voie MEK/ERK n'aurait pas d'avantage. Des observations de même nature ont été rapportées pour la résistance des cellules cancéreuses ovariennes au cisplatine (Kielbik et al., 2018). En outre, plusieurs essais de phase II chez les patients avec un cancer du pancréas non résecable n'ont pas montré de bénéfice en terme de survie pour les inhibiteurs de MEK (Chung et al., 2017; Bodoky et al., 2012). L'association de la gemcitabine à un inhibiteur de MEK, le trametinib, n'apportait pas non plus de bénéfice de survie chez les patients avec un cancer du pancréas métastatique (Infante et al., 2014).

Nos données suggèrent que l'inhibition de MEK pourrait avoir un intérêt seulement après l'acquisition d'une résistance à la gemcitabine pour les cellules cancéreuses pancréatiques de phénotype mésenchymateux. Nous avons également montré que la voie MEK/ERK induit une TEM en activant l'expression de ZEB-1. Effectivement, l'inhibition de ZEB-1 permettait de reverser partiellement le phénotype mésenchymateux vers le phénotype épithélial. De façon intéressante, l'inhibition de ZEB-1 réduisait la chimiorésistance de nos modèles cellulaires chimiorésistants in vitro. Ces données suggèrent que l'acquisition d'une TEM est liée à la résistance à la gemcitabine des cellules cancéreuses pancréatiques.

Dans ce contexte, cibler les inducteurs de la TEM pourrait constituer une piste thérapeutique intéressante. Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été proposées pour cibler différents facteurs impliqués dans la TEM. Certains auteurs ont mis en place des inhibiteurs ciblant les stimuli provenant du stroma tumoral qui induisent une TEM. Par exemple, des inhibiteurs d'HIF1 α (Digoxin, PX-478, PT2385 ...) ont été élaborés et testés in vitro et in vivo avec des résultats encourageants (Wong et al., 2012). Un grand nombre de médiateurs extracellulaires (cytokines, chimiokines ou facteurs de croissance) connus comme inducteurs de TEM ont fait l'objet d'inhibition pharmacologique. Parmi ces cibles, HGF, MET, Wnt, Frizzled, TGF β et leurs récepteurs ont été neutralisés (Canadas et al., 2014; Wu et al., 2012; Guo et al., 2015; Bholra et al., 2013). L'inhibition de la TEM fait parfois intervenir des inhibiteurs ciblant les principales voies de signalisation comme PI3K/AKT/mTOR, SRC ou FAK (Puls et al., 2011; Lin et al., 2014; Infante et al., 2012). Cibler les répresseurs transcriptionnels pour inhiber la TEM est une autre approche thérapeutique. Azmi et al., ont montré que le GN-25 inhibait l'interaction entre Snail et p53, réduisant ainsi le phénotype de TEM et l'agressivité tumorale (Azmi et al., 2013). Ces résultats précliniques encourageants ont permis de mener des essais de phases I et II afin de tester plusieurs molécules ciblant un des intermédiaires impliqués dans le phénomène de TEM (Cho et al., 2019).

Le budding tumoral, le reflet d'une TEM histologique

Le budding tumoral est un marqueur histologique qui a été décrit initialement dans le cancer colorectal. Il traduit l'existence de cellules tumorales isolées ou groupées en petits clusters essentiellement au front d'invasion (Hase et al., 1993). Le budding tumoral peut également s'observer au centre de la tumeur et caractérise différents carcinomes d'origine gastro-intestinale (Berg and Schaeffer 2018). Dans le cancer colorectal, l'impact pronostique péjoratif du budding tumoral justifie l'administration d'une chimiothérapie adjuvante après résection d'un cancer colorectal présentant ce marqueur histologique. De plus, sa détermination est fortement recommandée et doit figurer dans le

compte rendu anatomopathologique après résection d'un cancer colorectal (Koelzer et al., 2016; Compton et al., 2000).

Il existe un parallélisme entre le budding tumoral et la TEM. En effet, il a été montré que les cellules constituant les buds (ou bourgeons) n'expriment pas les marqueurs épithéliaux mais présentent un marquage intense de β -caténine nucléaire (Coppola et al., 1998; Hörkö et al., 2006). L'expression des facteurs de transcription ZEB-1 et ZEB-2 est également élevée dans les cellules en budding tumoral (Galván et al., 2015). Dans le cancer du pancréas, Chouat et al., ont montré une corrélation entre un budding tumoral de haut grade et une forte expression de la vimentine au sein de la tumeur (Chouat et al., 2018). Kohler et al., ont observé une réduction de l'expression de la E-cadhérine dans les cellules en Budding tumoral par rapport au centre de de la tumeur chez les patients avec un adénocarcinome du pancréas (Kohler et al., 2015). Ces données suggèrent qu'il existe une forte corrélation entre la TEM et le concept du budding tumoral même si ce lien semble plus évident pour les hauts grades de budding tumoral (Lawlor et al., 2019).

L'impact pronostique du budding tumoral dans le cancer du pancréas a été rapporté dans de nombreuses études. Une méta-analyse récente portant sur 6 études a montré que les tumeurs avec un budding tumoral de haut grade étaient associées à des taux de survie plus faible (Lawlor et al., 2019). Cette même étude a montré également que le risque de récurrence était significativement plus élevé en cas de tumeur avec un haut grade de budding tumoral. De manière intéressante, Wartenberg et al., ont décrit une classification des cancers du pancréas à partir de données génomiques et immuno-phénotypiques dont le budding tumoral (Wartenberg et al., 2018). Les auteurs ont révélé que les tumeurs avec un budding tumoral de haut grade présentaient une faible infiltration en lymphocytes T et B et une fréquence accrue de mutations Smad4 et CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A). En plus d'être un marqueur pronostique, le budding tumoral est considéré comme un facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie. Dans le cancer du rectum localement avancé, le budding tumoral est un facteur prédictif de réponse à la radio-chimiothérapie (Jäger et al., 2018). Les mêmes résultats ont

été obtenus dans le cancer de l'œsophage et le cancer colorectal métastatique (Miyata et al., 2009; Zlobec et al., 2010).

Nos résultats d'analyse histologique sur pièces opératoires de patients opérés d'un cancer du pancréas ont montré une association entre le budding tumoral et des caractéristiques histologiques péjoratives. De plus, nos données ont montré une tendance entre la présence du budding tumoral et une surexpression de ZEB-1. L'implication de la chimiothérapie dans le budding tumoral n'est pas bien connue. Une seule étude s'est intéressée à cette problématique chez des patients traités ou non par une chimiothérapie néoadjuvante par gemcitabine. Les auteurs n'ont pas observé de différence significative en terme d'expression de marqueurs de TEM entre le groupe traité ou non traité par chimiothérapie néoadjuvante (Tajima et al., 2012). D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre l'implication de la chimiothérapie dans le budding tumoral.

En conclusion, nos résultats confortent les données publiées sur l'implication de la TEM dans la chimiorésistance en s'intéressant à la chimiorésistance acquise à la gemcitabine des cellules cancéreuses pancréatiques. Les travaux permettant de comprendre les mécanismes de TEM et leur rôle dans la chimiorésistance semblent importants dans le cadre de la pathologie tumorale pancréatique au vu des nombreuses études montrant l'importance de la TEM dans la chimiorésistance du cancer du pancréas. Le budding tumoral est la traduction histologique d'une TEM initiée au front ou au centre de la tumeur permettant la progression tumorale. L'implication du budding tumoral dans la chimiorésistance du cancer du pancréas n'est pas encore élucidée.

Perspectives

Nos résultats obtenus in vitro s'intègrent dans la thématique de recherche sur les mécanismes impliqués dans la chimiorésistance du cancer du pancréas de l'unité Inserm UMR-S 1172. Une approche translationnelle s'impose afin de confirmer les résultats obtenus précédemment et intégrer une partie clinique dans ce travail de recherche strictement fondamental jusqu'à maintenant.

Etude des marqueurs de TEM avant et après traitement par chimiothérapie

Ce projet est destiné aux patients avec un cancer du pancréas métastatique. L'objectif est de comparer le niveau d'expression des marqueurs de TEM et du budding tumoral avant et après chimiothérapie.

Il s'agit d'une étude pilote sans bras contrôle. Effectif attendu est estimé à 100 patients étant donné que le stade métastatique est le mode de révélation le plus fréquent du cancer du pancréas.

Critères d'inclusion et d'exclusion

L'étude sera menée de façon prospective au sein du CHU de Lille en collaboration avec les services de chirurgie digestives (Pr Pruvot, Pr Truant), d'oncologie médicale (Dr Turpin) et d'anatomopathologie (Pr Leteurtre, Dr Renaud) en coordination avec l'unité Inserm UMR-S 1172 (Dr Van Seuning, Dr Vincent). Tout patient présentant un adénocarcinome du pancréas métastatique au niveau hépatique serait éligible à une inclusion dans l'étude.

Après accord du patient, un prélèvement percutané d'une métastase hépatique sera réalisé sous anesthésie locale au cours d'une courte hospitalisation (48h). La biopsie sera réalisée avant tout traitement par chimiothérapie.

Les critères d'inclusion :

- Adénocarcinome pancréatique confirmé histologiquement avec métastases hépatiques inaugurales sans traitement au préalable.
- Métastases hépatiques accessibles à une biopsie percutanée
- Absence de dilatation des voies biliaires intrahépatiques
- Projet de chimiothérapie envisageable
- Accord du patient après consentement éclairé

Les critères d'exclusion :

- Absence de métastases hépatiques
- Lésions hépatiques non caractérisables, ou biopsie difficile
- Absence de diagnostic certain d'adénocarcinome de la masse pancréatique
- Patient altéré, non candidat à une chimiothérapie
- Refus du patient

Méthodologie anatomopathologique

Le budding tumoral sera défini selon les recommandations de l'ITBCC (International Tumour Budding Consensus Conference) par la présence d'une cellule tumorale ou d'un cluster de 4 cellules tumorales au plus. Le budding tumoral peut être localisé au front d'invasion ou au centre de la métastase.

L'évaluation du budding tumoral sera réalisé sur HES et gradé en :

BD1 : 1 à 4 bourgeons

BD2 : 5 à 9 bourgeons

BD3 : ≥ 10

L'évaluation du budding sera réalisée en aveugle par deux anatomopathologistes séniors.

L'immunomarquage de la E-cadhérine, vimentine, Snail-1, ZEB-1 et Twist sera réalisé sur toutes les pièces de biopsie. L'expression de ces marqueurs sera réalisée de façon semi-quantitative.

Cette même méthodologie sera répétée après chimiothérapie chez les mêmes patients dont les métastases ont été prélevées initialement afin d'évaluer le budding tumoral et les marqueurs de la TEM post-traitement.

Protocole de l'étude

Après accord du patient et signature du consentement, la biopsie d'une métastase hépatique sera réalisée sans retarder le début de la chimiothérapie. Après la fin d'une chimiothérapie de première ligne et réévaluation morphologique, une deuxième biopsie d'une cible hépatique sera réalisée.

En plus des données anatomopathologiques, les informations cliniques (âge, sexe, antécédents, localisation tumorale, taux ACE et CA19-9, réponse histologique, réponse morphologique au scanner, survie globale, survie sans progression) seront recueillies de façon prospective. Les résultats seront analysés en étudiant :

- La corrélation entre l'exposition à la chimiothérapie et l'émergence d'un budding tumoral (grade histologique et niveau d'expression des marqueurs de TEM).
- La corrélation entre la réponse biologique (baisse du CA19-9) ou morphologique (réponse selon RECIST) après chimiothérapie et l'expression d'un phénotype de budding tumoral.

Une demande de financement régional est en cours de rédaction.

Etude de l'expression de ZEB-1 au niveau des marges de résection

Plusieurs études cliniques montrent clairement qu'une marge de résection chirurgicale envahie est un facteur de mauvais pronostic chez les patients opérés d'un cancer du pancréas (Delpero et al., Ann Surg 2017, van Roessel et al, Ann Surg Oncol 2018). Les outils disponibles actuellement pour

l'évaluation extemporané des limites de résection présentent plusieurs limites (SurgiMab, CellVizio ...). L'objectif de ce projet serait de redéfinir les marges de résection selon le niveau d'expression des marqueurs de TEM et surtout de ZEB-1. Une corrélation à la survie globale et sans récurrence sera réalisée afin d'identifier l'impact pronostique de l'expression de ZEB-1 au niveau des marges par rapport à l'expression globale de ZEB-1 au niveau de la tumeur.

Cette étude rétrospective sera réalisée au CHU de Lille en collaboration avec le service d'anatomopathologie et l'unité Inserm UMR-S 1172. Elle concerne uniquement les patients opérés d'un adénocarcinome pancréatique.

Les critères d'inclusion :

- Adénocarcinome pancréatique réséqué par DPC au CHU de Lille
- Marges encrées
- Suivi d'au moins 6 mois
- Une résection microscopiquement complète (R0)

Les critères d'exclusion :

- DPC pour autres tumeurs péri-ampullaires
- Marges non encrées ou marges non exploitables
- Patients décédés en postopératoires pour complications
- Patients ayant reçu un traitement néoadjuvant
- Tumeurs borderlines ou localement avancées
- Résections artérielles ou veineuses
- Résection microscopiquement (R1) ou macroscopiquement (R2) incomplète

Marquage ZEB-1 au niveau de la marge veineuse

Nous sélectionnerons pour chaque patient un bloc où la marge veineuse est identifiable (encre bleue).

Nous réaliserons un prélèvement au niveau de cette marge veineuse afin d'évaluer l'expression de ZEB-1. Ce prélèvement sera réalisé au-delà de la distance définissant une marge négative (1mm).

Les autres facteurs étudiés

Les paramètres étudiés seront l'âge, le sexe, le taux de CA 19-9, les paramètres peropératoires, la mortalité à 90 jours, la morbidité, la durée d'hospitalisation (jours), la taille tumorale (mm), l'atteinte ganglionnaire, le statut des marges de résections, l'engainement périnerveux, la réalisation d'un traitement adjuvant, la survenue d'une récurrence et son type (locorégionale ou métastatique).

L'impact clinique

Les résultats de cet essai permettront de proposer une nouvelle définition des marges de résection en fonction de l'expression de ZEB-1 et d'identifier un nouveau marqueur pronostique.

Une demande de financement sera réalisée. En cas d'effectif insuffisant, une collaboration avec d'autres centres sera envisagée. Ce travail, pourrait également faire l'objet d'un travail de thèse de médecine ou de master 2.

Etude de la corrélation entre l'expression des marqueurs de TEM par les cellules tumorales circulantes (CTC) et la réponse à la chimiothérapie des patients avec un cancer du pancréas

La TEM est considérée comme le processus à l'origine des CTC. Les données de la littérature suggèrent que l'expression des marqueurs de TEM par les CTC est corrélée à l'agressivité tumorale (Horimoto et al., J Transl Med 2018 ; Qi and al., Cancer Res 2018 ; Chen et al., Nature 2019). Il a été également rapporté une corrélation entre l'expression des marqueurs de TEM par les CTC et la réponse aux traitements dans de nombreux cancers (Horimoto et al., J Transl Med 2018).

L'objectif de ce travail serait d'étudier la corrélation entre l'expression de marqueurs de TEM (E-cadhérine, vimentine, Snail, ZEB-1) par les CTC et la réponse à la chimiothérapie. Les résultats de ce travail permettront de déterminer si l'expression de certains marqueurs de TEM par les CTC serait prédictive de la réponse à la chimiothérapie.

Population de l'étude : Patients avec un diagnostic confirmé d'adénocarcinome pancréatique non résecable d'emblé (borderline ou localement avancé) ou métastatique.

Méthodologie d'isolement : Nous utiliserons la méthode CellSearch®. Le prélèvement de sang périphérique est suivi d'une étape de capture immunomagnétique et d'un enrichissement par sélection positive des cellules exprimant EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), un marqueur spécifique des cellules épithéliales. Les anticorps anti-EpCAM sont couplés à des billes magnétiques. Les cellules tumorales circulantes seront détectées et isolées par le dispositif grâce à un champ magnétique attirant les cellules épithéliales marquées. Par immunofluorescence, un microscope fluorescent couplé à un logiciel permet ensuite la lecture automatique et le décompte des cellules tumorales circulantes.

Plan d'analyse : Les prélèvements seront réalisés avant le début de la chimiothérapie. La réponse à la chimiothérapie sera évaluée selon un score comprenant des données cliniques (prise de poids, score OMS ...), biologique (CA19-9) et scanographique (critères RECIST). Une corrélation avec la survie globale et sans progression sera également réalisée.

Les résultats de cette étude nous permettront de mieux comprendre le rôle des CTC exprimant les marqueurs de TEM dans la réponse à la chimiothérapie. En cas d'impact péjoratif, cet outil pourrait être utilisé dans un premier temps comme un marqueur prédictif à la réponse à la chimiothérapie. Cela nous permettra de renforcer la surveillance chez les patients à haut risque de chimiorésistance précoce afin de changer rapidement de ligné de chimiothérapie et éventuellement d'adapter la chimiothérapie en fonction du profil du patient en terme de niveau d'expression des marqueurs de TEM des CTC.

D'autres études cliniques sont en cours :

Essai caPaLong (Cohorte inter-régional de Long survivants au cancer du pancréas)

Objectif de la recherche : Certaines équipes ont déjà suivi cette idée de travailler sur les patients longs survivants en les comparant à des patients ayant une survie courte (Balachandran et al., Nature 2017 ;Jung et al., Pancreas 2014 ; Molin et al., Clin Cancer Res 2015 ; Shin et al., Pancreas 2014 ; Kardosh et al., Pancréas 2018 ; Ahola et al., Pancréatologie 2017 ; Sinn et al., J Surg Oncol 2013) .

Un jeune âge, une prise en charge dans un centre spécialisé, un faible stade TNM, une bonne différenciation tumorale, une prise en charge par chimiothérapie adjuvante étaient associés à une longue survie à partir de l'analyse des données du registre du cancer de la population américaine californienne (Kardosh., Pancréas 2018). A partir des données d'une étude nationale finlandaise, les patients opérés d'un adénocarcinome du pancréas et longs survivants pouvaient présenter un stade tumoral élevé (T3) et des métastases ganglionnaires (N1) ce qui suggérait que ces éléments du stade TNM étaient parfois insuffisants pour définir le pronostic à long terme de ces patients (Ahola., Pancréatologie 2017). De même, les résultats de Shin et al, soulignaient le manque de spécificité de critères histopronostiques classiques tels que la différenciation tumorale, les invasions lymphatiques, les engainements périnerveux, les métastases ganglionnaires pour identifier les patients longs survivants d'un adénocarcinome du pancréas (Shin et al., Pancreas 2014). Dans une autre étude, le faible grade tumoral, la petite taille de la tumeur, l'absence de métastase ganglionnaire, la prise en charge thérapeutique active étaient rattachés au statut de long survivant (Sinn et al., J Surg Oncol 2013). Une série Koréenne portant sur des patients atteints d'un adénocarcinome du pancréas inopérable identifiait un bon état général et un faible taux sérique de Ca19-9 comme marqueurs de bon pronostic chez des patients porteurs d'un adénocarcinome localement avancé, tandis qu'un jeune âge, un faible taux sérique de Ca19-9, un bon état général, des métastases péritonéales, un taux sérique plus élevé d'albumine comme marqueurs de bon pronostic chez des patients porteurs d'un adénocarcinome métastatique (Jung et al., Pancreas 2014). Le séquençage de l'exome portant sur les

mutations somatiques de l'adénocarcinome du pancréas ne permettait pas d'expliquer une très longue survie (plus de 10 ans) (Molin et al., Clin Cancer Res 2015). Balachandran et al. ont mis en évidence une association entre une survie longue, une réaction immune T et un taux élevé de néoantigènes (reliés à MUC16 en particulier) pour les adénocarcinomes du pancréas (V P Balachandran. Nature 2017).

Un travail de Thèse de Médecine réalisé dans notre service par le Dr Marie Jeanneau, sous la direction du Dr Florence Renaud en collaboration avec le Dr M El Amrani et le Pr S Truant, a mis en évidence un impact pronostique péjoratif du budding tumoral dans l'adénocarcinome du pancréas en analyse multivariée. Le budding tumoral est le reflet de la transition épithélio-mésenchymateuse (selon ITBCC – Lugli et al., Mod Pathol 2017).

Notre projet est particulièrement innovant puisqu'aucune équipe n'a analysé avec précision les caractéristiques microscopiques du stroma, du budding tumoral ni l'expression des mucines au sein des adénocarcinomes du pancréas, en utilisant une approche comparative de patients longs survivants/patients ayant une survie courte. Au-delà de données générales telles que le stade TNM, la différenciation du cancer, la qualité de la résection, la présence d'emboles vasculaires, la présence d'engainements périnerveux, notre objectif est ainsi d'analyser en profondeur plusieurs caractéristiques des adénocarcinomes excrétopancréatiques du pancréas accessibles en microscopie conventionnelle et en immunohistochimie: la présence de nécrose, la richesse en cellules tumorales, le budding tumoral reflet de la transition épithélio-mésenchymateuse, le type de stroma, l'abondance du stroma, la présence d'un stroma inflammatoire, la nature de l'infiltrat inflammatoire, le mode de répartition et la topographie de l'infiltrat inflammatoire au sein du cancer, l'immunophénotype de l'infiltrat inflammatoire en immunohistochimie, l'expression en immunohistochimie des mucines MUC1, MUC5AC, MUC4, MUC16, de la mésothéline, de la p53, du Ki67 (MIB1) et des marqueurs de sous-types agressifs identifiés par des études de transcriptome en particulier le sous type moléculaire « basal-like ».

Population concernée : Patients opérés d'un cancer du pancréas (adénocarcinome exocréto-pancréatique conventionnel).

Méthode d'observation : Il s'agit d'une recherche non interventionnelle, multicentrique régionale, évaluant de manière rétrospective et prospective l'influence des paramètres cliniques et anatomopathologiques (TEM) sur la survie prolongée de patients atteints d'Adénocarcinome du pancréas opérés entre 2001 et 2016. Origine et nature des données nominatives recueillies : Données médicales anonymisées, recueillies dans les services cliniques de Chirurgie, d'Oncologie et d'Anatomie Pathologique.

Durée et modalités d'organisation : Durée 4 ans, type multicentrique (CHU Lille, CHU Amiens, CHU Caen, CHU Rouen).

Méthode d'analyse des données : Les analyses statistiques seront réalisées à l'aide du logiciel SAS (version 9.4 ou supérieure) et conduite à la plateforme d'aide méthodologique du CHU de Lille sous la responsabilité du Pr A. Duhamel. Tous les tests statistiques seront bilatéraux avec un risque de première espèce de 5%. Pour répondre à l'objectif principal, les liens entre les marqueurs histologiques et la survie prolongée seront étudiés à l'aide de modèle linéaire mixte généralisé, permettant de tenir compte de l'appariement. Pour les variables quantitatives, l'hypothèse de loglinéarité sera évaluée en utilisant des fonctions splines cubiques. L'odds-ratio (cas vs. témoins) et son intervalle de confiance à 95% sera estimé pour chaque marqueur histologique comme mesure de taille d'effet. Les variables associées en analyses bivariées ($P < 0.20$) seront inclus dans un modèle linéaire mixte généralisé multivariée. La colinéarité entre les variables candidates sera examinée par le calcul du facteur d'inflation de la variance (VIF, variance inflation factors). La simplification du modèle multivariée sera effectuée par une procédure de sélection pas à pas descendante au niveau de significativité de 0,05. Justification du nombre de sujets ou analyse de puissance : D'après les données du service, il sera possible d'inclure entre 50 et 100 patients avec une survie prolongée. Il n'existe pas de consensus pour calculer un nombre de sujets nécessaires basé sur des hypothèses statistiques pour ce type d'analyse.

En considérant les règles de Concatto et Peduzzi, il sera possible d'inclure 5 à 10 variables indépendantes dans l'analyse multivariée, en considérant l'heuristique de disposer d'au moins 10 sujets par variables indépendantes étudiée.

Conclusion générale

L'ensemble de ces travaux permettront de mieux appréhender la problématique de la chimiorésistance du cancer du pancréas selon une approche translationnelle. Nous portons, à travers ces travaux, un intérêt majeur à l'implication de la TEM dans la chimiorésistance du cancer du pancréas. Nous poursuivrons ces recherches dans l'unité dans le cadre de cette collaboration entre cliniciens et chercheurs qui semble consolidé par de nombreuses publications communes.

Appendice technique

1. Lignées cellulaires

Toutes les lignées cellulaires ont été authentifiées par le profilage court de la séquence répétée en tandem (STR) d'ADN.

A. Lignée BxPC-3

Les cellules BxPC-3 (ATCC, CRL-1687) sont issues d'une biopsie d'un adénocarcinome pancréatique moyennement différencié localement avancé non métastatique situé dans le corps du pancréas d'une patiente de 61 ans. Sur un plan phénotypique, ces cellules présentent des caractéristiques de cellules épithéliales mais restent très invasives. Sur le plan génétique, plusieurs mutations ont été décrites dont celles de *p53*, de *p16* et de *Smad4* (entraînant la perte de leur expression protéique), mais de façon atypique, aucune mutation du gène *K-ras* n'a été retrouvée.

B. Lignée Capan-2

Ces cellules proviennent d'une biopsie d'un adénocarcinome bien différencié de la tête du pancréas d'un patient de 56 ans. La tumeur a été réséquée par DPC et le patient a reçu une chimiothérapie adjuvante. Ces cellules présentent une morphologie épithéliale et forment des tumeurs bien différenciées lorsqu'elles sont injectées à des souris immunodéprimées. Les cellules Capan-2 sont mutées *K-ras* et expriment des taux élevés d'EGFR. Contrairement aux BxPC-3, les Capan-2 ne sont pas mutées *p53*, *p16* ni *Smad4* (Deer et al., 2010).

C. Lignée Panc-1

Les cellules Panc-1 (ATCC CRL-1469) sont issues d'un adénocarcinome de la tête du pancréas d'un patient caucasien de 56 ans. Les Panc-1 ont un phénotype intermédiaire mais gardent une morphologie épithéliale. Elles ne sont pas mutées *Smad4* mais présentent une mutation *p53* et *p16* (Lieber et al., 1975; Deer et al., 2010).

D. Lignée MiaPaca-2

Les cellules MiaPaca-2 sont issues d'un adénocarcinome du pancréas peu différencié chez un patient de 65 ans. Elles sont peu cohésives et de morphologie fusiforme (Yunis et al., 1977). Elles sont mutées *K-ras* mais non mutées *Smad4* (Deer et al., 2010).

2. Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées en condition stérile dans une atmosphère humide à 37 °C enrichie en CO₂ (5 %). Les milieux de culture sont : le RPMI 1640 (pour les cellules BxPC-3), le DMEM (pour les cellules Panc-1 et MiaPaca-2) et le McCoy's 5A (Capan-2) enrichis avec 10 % (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (Gibco), 1% de L-glutamine (Gibco) et 0,5% de pénicilline-streptomycine (Gibco). Afin de générer les lignées chimiorésistantes, les cellules ont étéensemencées dans un support de culture de 25 cm² (T25) et cultivées pendant 48 heures. Ensuite, le milieu de culture est remplacé par un milieu contenant de la gemcitabine à la concentration de 10⁻⁹ M. Les cellules ont été maintenues sous pression de la chimiothérapie par gemcitabine pendant plusieurs semaines. La procédure a ensuite été répétée en augmentant progressivement les concentrations de gemcitabine jusqu'à ce que les cellules résistantes présentent des modifications morphologiques et/ou phénotypiques par rapport aux cellules parentales. Les cellules chimiorésistantes ont été stabilisées aux concentrations de 5 × 10⁻⁸ M pour Panc-1 (Gem-Panc-1), 10⁻⁸ M pour MiaPaca-2 (Gem-MiaPaca-2), 10⁻⁸M pour Capan-2 (Gem - Capan-2) et 10⁻⁷M pour les Cellules BxPC-3 (Gem-BxPC-3). Le milieu de culture est changé toutes les 48 heures et un passage est réalisé lorsque les cellules atteignent une confluence proche de 80 %. Pour cela, les cellules sont incubées en présence d'une solution de trypsine (0,05%) et d'EDTA (0,02%), pendant 5 minutes à 37 °C après lavage du tapis cellulaire avec une solution tampon saline de phosphate 1X selon Dulbecco (Dulbecco's phosphate buffer saline, D-PBS). Une fois le tapis cellulaire décollé, la trypsine est neutralisée avec du milieu de culture complet pour un volume final de 10 ml. La suspension cellulaire est transférée dans un tube à centrifuger, centrifugée (5 min, 500 x g) pour éliminer le surnageant contenant la trypsine neutralisée. Le culot est repris dans 5 ml de milieu de

culture et une numération cellulaire est réalisée sur cellule de Malassez après coloration au bleu de trypan. Le culot cellulaire est repris avec du milieu standard, le volume nécessaire de suspension cellulaire pour l'obtention d'un ensemencement à 0,2 million de cellules par T25 est déposé dans le flacon de culture contenant déjà le milieu de culture conditionné.

3. Test de viabilité cellulaire

Nous avons utilisé une plaque 96 puits avec un ensemencement à 10 000 cellules par puit. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont traitées par une gamme de chimiothérapie (1 nM - 10 µM) en présence et en absence d'inhibiteurs pendant 72 heures. Le test de viabilité cellulaire repose sur l'utilisation d'un test colorimétrique avec le sel de tétrazolium (MTT, Sigma-Aldrich) à 0,5 mg/m. La durée d'incubation avec le MTT varie selon le type cellulaire. Le MTT va être métabolisé par les succinates déshydrogénases mitochondriales en cristaux violets de formazan ; qui sont ensuite solubilisés dans 100 µL diméthylsulfoxyde (DMSO). L'absorbance à 570 nm est mesurée par spectrophotométrie.

4. Inhibiteurs pharmacologiques

Les cellules sont ensemencées dans une plaque 6 puits à raison de 200 000 cellules par puits. À 70 % de confluence, les cellules sont traitées pendant 24 h par un inhibiteur pharmacologique avec une condition contrôle utilisant le solvant dans lequel l'inhibiteur a été solubilisé (DMSO). L'action de l'inhibiteur U0126 à 10 µM (InvivoGen) a été testée. Suite au traitement, les cellules sont lysées afin de récupérer les ARN et/ou les protéines.

5. Analyse de l'expression des transcrits

5.1. Extraction d'ARN

L'extraction des ARN est réalisée à l'aide du kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel) en respectant les instructions du fournisseur. À 80 % de confluence, le tapis cellulaire est lavé avec du D-PBS 1X puis

lysé avec 350 µl de la solution RA1 et 3,5 µl de β-mercaptoéthanol, pendant 5 minutes. Le lysat cellulaire est ensuite récupéré pour être traité de suite ou conservé à -80 °C.

Le lysat cellulaire est d'abord filtré sur une colonne à 11 000g pendant 1 min. Un volume équivalent d'éthanol 70% est ajouté permettant la précipitation des acides nucléiques puis une centrifugation à 11 000g, sur une colonne contenant une membrane silice, est réalisée pendant 30s. La colonne est rincée avec une solution MBD avant ajout de 95 µl de DNase recombinante diluée au 10^{ème} suivi d'une incubation à température ambiante pendant 15 min. La colonne est ensuite lavée et l'ARN élué avec un volume de 50 µl d'eau RNAase free, puis conservé à -80 °C.

le dosage des ARN est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-visible) de type NanoDrop (Thermo Scientific).

5.2. Rétro-transcription : synthèse d'ADN complémentaire (ADNc)

Une quantité d'un µg d'ARN totaux est repris dans un volume final de 14 µl d'H₂O RNAse free , puis est incubé pendant 5 min à 70 °C en présence de 1 µl d'oligod(T)15 (Promega) qui va s'hybrider avec la queue poly A des ARNm. Le mélange réactionnel nécessaire à la reverse transcription (dNTP, M-MLV rétrotranscriptase et son tampon) est ensuite ajouté et incubé 1 h à 42 °C puis 5 min à 94 °C. Les ADNc sont dilués par ajout de 60 µl d'H₂O RNAse free puis conservés à -80 °C.

5.3. qPCR

Cette technique de PCR quantitative permet de quantifier les variations d'expression d'un gène, en suivant cycle après cycle l'amplification des ADNc grâce à l'intensité de fluorescence émise par le l' EvaGreen. Cette molécule est un fluorophore, qui une fois intégrée dans la double hélice d'ADN, émet une fluorescence détectable, proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé.

L'amplification des ADNc est réalisée avec le kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio Rad), contenant l'ADN polymérase, les dNTP, le tampon de réaction et le fluorochrome EvaGreen.

L'amplification est réalisée dans une plaque 96 puits en triplicate. Dans chaque puits, 10 µl de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio Rad), 6 µl d'eau RNase free, 1 µl d'amorce (Eurogentec) sens à 5 µM, 1 µl d'amorce anti-sens à 5 µM et 2 µl d'ADNc sont déposés. Après homogénéisation de la solution dans chaque puits, la plaque est disposée dans l'appareil C1000 Thermo Cycler® (Bio Rad), le protocole (Température de fusion, nombre de cycle, durée de chaque étape...) étant défini au préalable en fonction des amorces utilisées.

Les cibles étudiées sont amplifiées à l'aide d'amorces spécifiques décrites dans le tableau 9.

Tableau 9 : Liste des primers utilisés

Gène	Séquence sens	Séquence anti-sens
<i>E-cadhérine</i>	CAGCACGTACACAGCCCTAA	ACCTGAGGCTTTGGATTC
<i>Vimentine</i>	AGTCCACTGAGTACCGGAGAC	CATTCACGCATCTGGCGTTC
<i>Occludine</i>	TCCAAGTGCCGAAAAAGGAAG	CGAGTTCTGAGCTTTCAAGGT
<i>Snail</i>	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA	TAGAGGGTCACCGCGTCTAT
<i>ZEB-1</i>	CAGCTTGATACTGTGAATGGG	TATCTGTGGTCGTGTGGGACT
<i>GADPH</i>	CCACATCGCTCAGACACCAT	CCAGGCGCCCAATACG

A la fin de la réaction d'amplification, un contrôle de qualité est réalisé : la courbe de fusion (Melt Curve). A la fin du dernier cycle d'amplification, la température passe de 60 °C à 95 °C, par paliers de 0,5 °C toutes les 2 secondes. Ce contrôle permet de vérifier l'existence d'un seul type d'amplicon, et donc de confirmer la spécificité des amorces utilisées.

5.4. Interprétation des résultats

Pour chaque puits, on obtient une valeur appelée Cycle Threshold (Ct), qui correspond au nombre de cycles au-delà duquel la fluorescence émise franchit la valeur seuil du bruit de fond. L'interprétation des résultats se fait par le calcul de la différence (ΔCt) entre la valeur Ct du gène d'intérêt et la valeur Ct du gène de ménage (GAPDH) pour chaque puits. Puis pour chaque échantillon, la différence ($\Delta\Delta Ct$)

entre le ΔC_t de l'échantillon d'intérêt et le ΔC_t de l'échantillon témoin est calculée. La différence d'expression d'un gène donné est donc exprimée en nombre de fois par rapport à la population contrôle selon la formule $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

6. Analyse protéique

6.1. Extraction protéique

Les lysats protéiques sont réalisés à partir de tapis cellulaire ayant atteint 70 % de confluence. Après lavage au D-PBS 1X, les cellules sont lysées avec une solution tampon (Tris-HCl 20mM, NP40 1 %, Glycérol 10 %, EDTA 2mM, orthovanadate 1mM, Aprotinin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, leupeptin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pepstatine 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le lysat est centrifugé à 4 °C (5000 g, 10 minutes), afin de séparer le surnageant contenant les protéines du culot contenant les débris cellulaires. Les lysats sont ensuite conservés à -80 °C. Le dosage protéique est ensuite réalisé par méthode colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique (dosage BCA) (Pierce BCA Protein Assay Kit), selon les instructions du fabricant. Les concentrations sont déterminées par mesure d'absorbance par rapport à une gamme étalon de concentrations croissantes en sérumalbumine bovine (BSA).

6.2. Western blot

L'analyse électrophorétique est réalisée en gel de polyacrylamide précoulés commerciaux (Invitrogen) de type Tris-Acétate (3-8%) ou Bis-Tris (4-12%) (NuPAGE® Novex®) selon la masse moléculaire des protéines d'intérêt.

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est réalisé par électrotransfert à l'aide d'un kit de transfert iBlot pendant 7 min (iBlot™ Dry Blotting System, Invitrogen). Après 2 heures de saturation des sites non spécifiques dans une solution de TBST (Tris-Buffered Saline Tween 20) contenant 5% de lait, la membrane est incubée sur la nuit à 4 °C dans une solution contenant l'anticorps primaire, dirigé contre la protéine d'intérêt, dilué dans du lait ou de la BSA à 5 %. Les anticorps primaires utilisés sont détaillés dans le tableau 10.

Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois au TBST 1X, puis incubée pendant une heure avec l'anticorps secondaire adapté (souris ou lapin) couplé à la peroxydase de raifort (Horseradish Peroxydase, HRP, diluée au 1/5000).

La révélation des complexes protéines/anticorps primaire/anticorps secondaire est réalisée à l'aide du kit West Pico SuperSignal® (Thermo Scientific) et du logiciel LAS 4000.

Tableau 10 : Liste des anticorps primaires utilisés

Cible	Secondaire	Poids moléculaire (kDa)	Dilution	Référence (Fournisseur)
E-Cadhérine	Lapin	135	1/1000	4065 (Cell Signaling)
Vimentine	Souris	57	1/500	NCLIVMV9 (Novocastra)
Erk (p42-44)	Lapin	42-44	1/500	9102 (Cell Signaling)
Phospho Erk	Lapin	42-44	1/500	43775 (Cell Signaling)
Snail	Lapin	29	1/1000	sc-28199 (Santa Cruz)
ZEB-1	Lapin	200	1/500	3396 (Cell Signaling)
MET	Lapin	145	1/1000	4560 (Cell Signaling)
Phospho-MET	LapIN	145	1/1000	4560 (Cell Signaling)
Phospho-mTor	Lapin	289	1/1000	2971 (Cell Signaling)
mTor	Lapin	289	1/1000	2971 (Cell Signaling)
Occludine	Lapin	60-82	1/1000	sc-133256 (Santa Cruz)

7. Etude de l'invasion cellulaire

L'invasion des cellules tumorales pancréatiques d'une matrice de collagène de type I a été réalisée en utilisant le système Incucyte®. Les cellules sontensemencées à 50 000 cellules par puits dans une plaque 96 puits, préalablement coartée avec 40ul de collagène et incubées à 37 °C sous 5 % de CO₂ jusqu'à confluence. Les blessures sont réalisées manuellement à l'aide de l'outil 96-Well WoundMaker (EssenBio) qui permet d'effectuer une blessure d'une grande reproductibilité dans tous les puits. En cas d'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou de siRNA, ces derniers sont dilués à la fois dans le collagène et dans le milieu de culture (Figure 43).

La plaque est disposée dans l'incubateur et des photographies de chaque puits sont prises toutes les 2 h pendant 40 h, à l'aide du logiciel Incucyte Plate Map Editor. Les tailles des blessures sont alors mesurées permettant d'établir le pourcentage de fermeture des blessures au cours du temps.

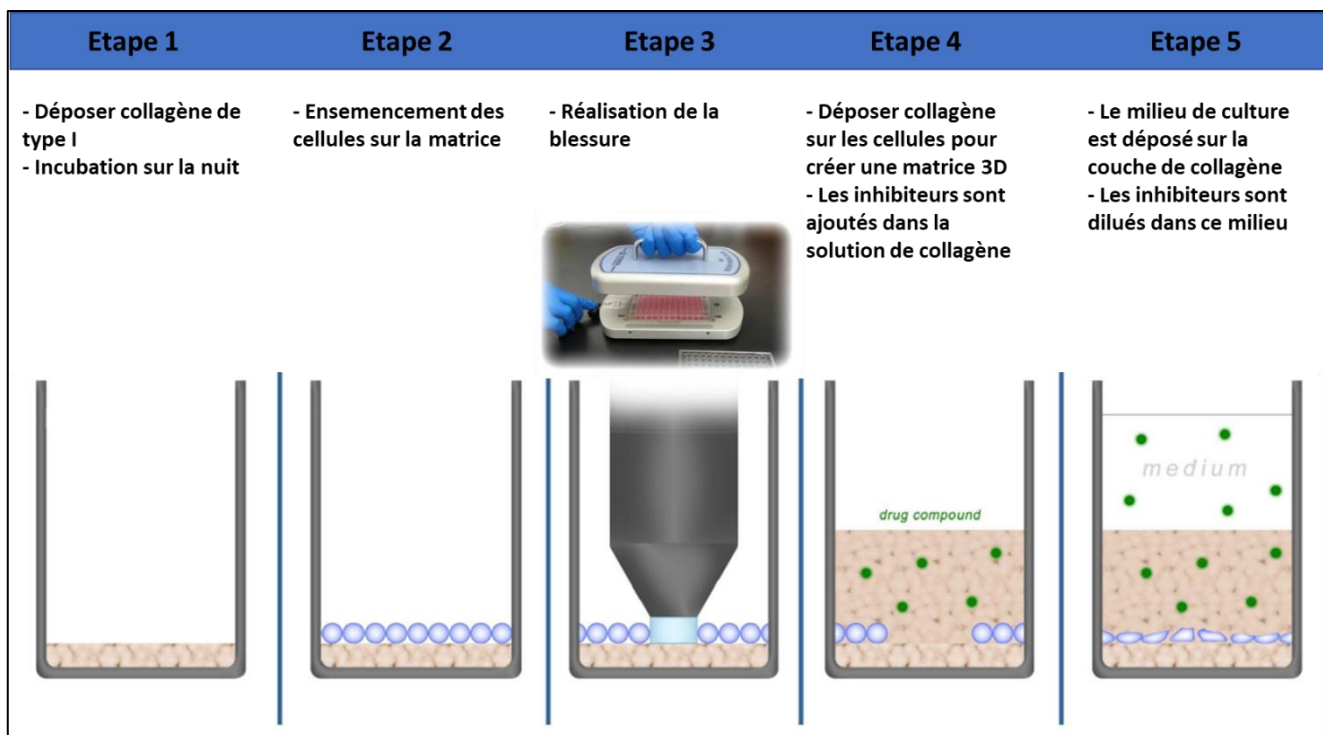


Figure 43 : Protocole d'invasion cellulaire sur collagène de type 1 sur Incucyte® selon Essen BioScience

8. Invalidation transitoire de gènes par si-RNA

L'inhibition de l'expression de la protéine ZEB-1 dans les cellules chimiorésistantes a été réalisée en utilisant un mélange de 4 siRNAs (Dharmacon) qui ciblent l'ARNm de ZEB-1 (si-RNA smartpools ON-TARGETplus® composé). Les siRNA sont préalablement solubilisés dans la solution du tampon fournie à la concentration de 20µM puis aliquotés à 5 µM dans du tampon siRNA buffer 1X. La transfection est réalisée lors du repiquage des cellules en utilisant l'agent de transfection (DharmaFECT®4), dans un milieu sans antibiotiques afin de maximiser le résultat de la transfection. Le volume de chaque composant est précisé dans le tableau 11.

Tableau 11 : Le volume pour un puit des différents réactifs utilisés pour l'invalidation par siRNA

Support	DharmaFECT4	siRNA (5μM)	Milieu du Mix	Suspension cellulaire
Plaque 6 puits	4 μ l	10 μ l	0,4 ml	1,6 ml
Plaque 96 puits	0,2 μ l	0,5 μ l	20 μ l	80 μ l

Les tubes contenant le siRNA et le DharmaFECT4 sont constitués séparément puis incubés 5 min à température ambiante avant d'être regroupés et le mélange est incubé pendant 20 min à température ambiante.

Les cellules transfectées sont incubées 48 h pour garantir une efficacité de transfection optimale avant de réaliser l'extraction d'ARN, de protéines, ou d'effectuer une mesure de la sensibilité aux drogues ou des capacités d'invasion.

9. Microscopie confocale

Les cellules sont ensemencées sur des lames en verre à 8 puits de type Lab-Tek (Nunc®) à raison de 10 000 cellules par puits. A 50 % de confluence, le tapis cellulaire est lavé à 3 reprises avec du D-PBS 1X (contenant du CaCl₂ et du MgCl₂). Les cellules sont ensuite fixées par incubation avec du paraformaldéhyde (PFA) à 3 % dans le PBS 1X durant 20 min à 4 °C et dans l'obscurité. Le groupement aldéhyde du PFA est ensuite neutralisé par une solution de NH₄Cl à 50 mM en PBS 1X durant 20 min à température ambiante. La perméabilisation membranaire est effectuée avec une solution de saponine à 0,2 %, Triton 100X à 0,05 % en PBS 1X, durant 20 min à température ambiante. La saturation des sites non spécifiques est ensuite réalisée par utilisation d'une solution de saponine 0,2 %, Triton 100X 0,05 % et BSA 1 % durant 20 min à température ambiante. Cette solution est utilisée lors des incubations avec l'anticorps primaire, secondaire, la phalloïdine/Texas Red ou le DAPI.

L'incubation avec les anticorps primaires dilués au 1/150 dans la solution de saponine/Triton/BSA, se déroule sur la nuit, dans l'obscurité et à température ambiante (Tableau 12).

Tableau 12 : Liste des anticorps utilisés en microscopie confocale

Cible	Dilution	Espèce	Référence (Fournisseur)
E-Cadhérine	1/200	lapin	4065 (Cell Signaling)
Vimentine	1/200	lapin	5741 (Cell Signaling)
ZEB-1	1/200	lapin	3396 (Cell Signaling)

Le lendemain, le tapis cellulaire est lavé 3 fois avec du PBS 1X, puis est incubé avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, le fluorescein isothiocyanate (FITC), dans l'obscurité durant 1 h 30 à température ambiante. Après 3 lavages, les cellules sont mises en contact avec la phalloïdine (marquage du cytosquelette d'actine) puis le DAPI (marquage du noyau) pendant 20 min (Tableau 13).

Tableau 13 : Anticorps couplés à un fluorochrome utilisé en microscopie confocale

Cible	Fluorochrome	Dilution	Référence (Fournisseur)
Phalloïdine	Texas Red®	1/50	T7371 (Invitrogene)
IgG de souris	Alexa Fluor® 488	1/200	I11029 (Invitrogene)
IgG de lapin	Alexa Fluor® 488	1/200	A11034 (Invitrogene)

Enfin, les lamelles sont montées à l'aide du milieu de montage Mowiol (Mowiol, glycérol, Tris-HCl). Les lames en verre sont conservées à 4 °C à l'abri de la lumière jusqu'à leur analyse sur le microscope confocal (Zeiss LSM 710) de la plateforme de l'Institut Fédératif de Recherche (IFR114)/Institut de Médecine Prédictive et de Recherche (IMPRT).

10. Immunohistochimie

Les patients ont été identifiés à partir d'une base de données du département de chirurgie digestive et transplantation du CHU de Lille. Ces patients ont été inclus dans un protocole local de traitement néoadjuvant par chimiothérapie ou radiochimiothérapie néoadjuvante chez des patients avec un cancer du pancréas borderline ou localement avancé. Les blocs de paraffine de tous les patients ont été désarchivés à l'institut de pathologie du CHU de Lille et une lame représentative de la tumeur était sélectionnée. Des lames de 4 μm d'épaisseur ont été utilisées pour les marquages d'immunohistochimie.

Les lames ont été immunomarquées avec les anticorps anti-cytokératine AE1/AE3 (DAKO-M3515; 1/100), vimentine (Cell Signaling-5741; 1/200), E-cadhérine (Cell Signaling-4065; 1/200) et ZEB1 (Cell Signaling-3396; 1/200). L'ensemble des lames était déparaffiné puis réhydraté. La désactivation des peroxydases endogènes était réalisée par l'eau oxygénée pendant 4 minutes. L'anticorps primaire est incubé sur une nuit à 4°C puis avec l'anticorps secondaire. La révélation utilise le kit ultraview Universal DAB Detection (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) en utilisant un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Les lames ont été contre-colorées avec de l'hématoxyline. La spécificité était vérifiée en effectuant une coloration contrôle en l'absence d'anticorps primaire et un contrôle positif sur un tissu exprimant fortement la protéine cible.

L'expression de ZEB-1 a été gradée selon le score suivant : forte expression (ZEB-1 > 10%), faible expression (ZEB-1 \leq 10%) sur l'ensemble de la tumeur. Pour cela, 5 zones représentatives de la tumeur ont été sélectionnées permettant de calculer une moyenne du score d'expression de ZEB-1.

Le budding tumoral a été défini par la présence de cellules ou d'amas de cellules isolées au front d'invasion, détachées de la tumeur principale. L'évaluation du budding tumoral a été réalisée par un anatomopathologiste sénior. En absence d'une méthode standardisée, l'évaluation du budding tumoral a été réalisée visuellement en analysant plusieurs champs.

11. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 4® (GraphPad Software Inc). Les données in vitro ont été exprimés en moyenne \pm écart type. La différence entre deux moyennes de deux échantillons est analysée par le t test de student ou par le test de ONE WAY ANOVA pour une analyse de plus de deux échantillons avec un paramètre ou le test de TWO WAY ANOVA pour plus de deux échantillons avec deux paramètres. Une p-value est considérée comme significative si inférieure à 0,05 ; lorsque la différence est significative, elle est signalée par le symbole *, par le symbole ** si $p < 0,01$ et *** si $p < 0,001$.

Références

A

Agostini, S. 2013. 'Radioanatomie Du Pancréas'. *EMC - Radiologie et Imagerie Médicale - Abdominale - Digestive*. [https://doi.org/10.1016/s1879-8527\(10\)72855-0](https://doi.org/10.1016/s1879-8527(10)72855-0).

Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M et al. 2007. 'The Transcription Factor ZEB1 (Δ EF1) Promotes Tumour Cell Dedifferentiation by Repressing Master Regulators of Epithelial Polarity'. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210508>.

Al-Hawary MM, Francis IR, Chari ST, Fishman EK, Hough DM, Lu DS et al. 2014. 'Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Radiology Reporting Template: Consensus Statement of the Society of Abdominal Radiology and the American Pancreatic Association'. *Radiology*. <https://doi.org/10.1148/radiol.13131184>.

Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, and Pear WS. 2002. 'Notch Signaling in Cancer'. *Cancer Biology and Therapy*. <https://doi.org/10.4161/cbt.1.5.159>.

Amit M, and Gil Z. 2013. 'Macrophages Increase the Resistance of Pancreatic Adenocarcinoma Cells to Gemcitabine by Upregulating Cytidine Deaminase'. *Oncolmmunology*. <https://doi.org/10.4161/onci.27231>.

Amrutkar M, Aasrum m, Verbeke CS, and Gladhaug IP. 2019. 'Secretion of Fibronectin by Human Pancreatic Stellate Cells Promotes Chemoresistance to Gemcitabine in Pancreatic Cancer Cells'. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5803-1>.

Anastasiadis PZ. 2007. 'P120-Ctn: A Nexus for Contextual Signaling via Rho GTPases'.

Biochimica et Biophysica Acta. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.040>.

Andreu P, Perret C, and Romagnolo B. 2006. 'Wnt et Cellules Souches Intestinales : Des Liaisons Dangereuses||'. *Medecine/Sciences*.
<https://doi.org/10.1051/medsci/20062289693>.

Anggorowati N, Ratna Kurniasari Ch, Damayanti K, Cahyanti T, Widodo I, Ghozali A, et al. 2017. 'Histochemical and Immunohistochemical Study of α -SMA, Collagen, and PCNA in Epithelial Ovarian Neoplasm'. *Asian Pac J Cancer Prev*.
<https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.3.667>.

Arun S Li S. 2011. 'Vimentin in Cancer and Its Potential as a Molecular Target for Cancer Therapy'. *Cell Mol Life Sci*. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0735-1>.

Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL et al. 2009. 'Epithelial to Mesenchymal Transition Contributes to Drug Resistance in Pancreatic Cancer'. *Cancer Res* 69 (14): 5820–28. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2819>.

Atkinson BF, Ernst CS, Sears HF, and Koprowski H. 1982. 'Gastrointestinal Cancer-Associated Antigen in Immunoperoxidase Assay'. *Cancer Res*.

Atlas E, Cardillo M, Mehmi I, Zahedkargaran H, Tang C, and Lupu R. 2003. 'Heregulin Is Sufficient for the Promotion of Tumorigenicity and Metastasis of Breast Cancer Cells in Vivo'. *Mol Cancer Res*

Azmi AS, Bollig-Fischer A, Bao B, Park BJ, Lee SH, Yong-Song G et al. 2013. 'Systems Analysis Reveals a Transcriptional Reversal of the Mesenchymal Phenotype Induced by SNAIL-Inhibitor GN-25'. *BMC Syst Biol*. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-85>.

B

- 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(7592):47–52.
<https://doi.org/10.1038/nature16965>.
- Ballehaninna UK, Chamberlain RS. 2011. 'Serum CA 19-9 as a Biomarker for Pancreatic Cancer-A Comprehensive Review'. *Indian J Surg Oncol*.
<https://doi.org/10.1007/s13193-011-0042-1>.
- Baraniak AP, Chen JR, Garcia-Blanco MA.. 2006. 'Fox-2 Mediates Epithelial Cell-Specific Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Exon Choice'. *Mol Cell Biol*.
<https://doi.org/10.1128/mcb.26.4.1209-1222.2006>.
- Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. 2005. 'The Snail Genes as Inducers of Cell Movement and Survival: Implications in Development and Cancer'. *Development*.
<https://doi.org/10.1242/dev.01907>.
- Barton JG, Bois JP, Sarr MG, Wood CM, Qin R, Thomsen KM et al. Farnell. 2009. 'Predictive and Prognostic Value of CA 19-9 in Resected Pancreatic Adenocarcinoma'. *J Gastrointest Surg*. <https://doi.org/10.1007/s11605-009-0849-z>.
- Batabyal P, Vander Hoorn S, Christophi C, Nikfarjam M. 2014. 'Association of Diabetes Mellitus and Pancreatic Adenocarcinoma: A Meta-Analysis of 88 Studies'. *Ann Surg Oncol*. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3625-6>.
- Beach S, Tang H, Park S, Dhillon AS, Keller ET, Kolch W et al. 2008. 'Snail Is a Repressor of RKIP Transcription in Metastatic Prostate Cancer Cells'. *Oncogene*.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210860>.

- Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM.. 2004. 'Tissue Repair and Stem Cell Renewal in Carcinogenesis'. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature03100>.
- Bellone G, Carbone A, Busso V, Scirelli T, Buffolino A, Smirne C et al. 2006. 'Antagonistic Interactions between Gemcitabine and 5-Fluorouracil in the Human Pancreatic Carcinoma Cell Line Capan-2'. *Cancer Biol Ther*. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.10.3152>.
- Benjamin JM, Nelson WJ. 2008. 'Bench to Bedside and Back Again: Molecular Mechanisms of α -Catenin Function and Roles in Tumorigenesis'. *Semin Cancer Biol*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.08.003>.
- Berg KB, Schaeffer DF. 2018. 'Tumor Budding as a Standardized Parameter in Gastrointestinal Carcinomas: More than Just the Colon'. *Mod Pathol*. <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0028-4>.
- Bhola NE, Balko JM, Dugger TC, Kuba MG, Sánchez V, Sanders M et al. 2013. 'TGF- β Inhibition Enhances Chemotherapy Action against Triple-Negative Breast Cancer'. *J Clin Invest*. <https://doi.org/10.1172/JCI65416>.
- Bideau K, Metges JP, Bayle S, André M, Robaszekiewicz M, Lagarde N et al. 2008. 'Traitement d'un Carcinome Épidermoïde Primitif Du Pancréas Par Gemcitabine'. *Gastroenterol Clin Biol*. [https://doi.org/10.1016/s0399-8320\(06\)73515-1](https://doi.org/10.1016/s0399-8320(06)73515-1).
- Binder-Foucard F, Bossard N, Delafosse P, Belot A, Woronoff AS, Remontet L et al. 2014. 'Cancer Incidence and Mortality in France over the 1980-2012 Period: Solid Tumors'. *Rev Epidemiol Sante Publique*. <https://doi.org/10.1016/j.respe.2013.11.073>.
- Bischof P, Aplin JD, Bentin-Ley U, Brannstrom M, Casslen B, Castrillo JL et al. 2006. 'Implantation of the Human Embryo: Research Lines and Models - From the

Implantation Research Network “Fruitful”. *Gynecol Obstet Invest*.

<https://doi.org/10.1159/000094005>.

Blanpain C. 2007. ‘Importance de La Voie de Signalization Wnt/ β -Caténine Dans l’identité, l’activation et La Différenciation Des Cellules Souches Épidermiques’.

Medecine/Sciences. <https://doi.org/10.1051/medsci/200723134>.

Bodoky G, Timcheva C, Spigel DR, La Stella PJ, Ciuleanu TE, Pover G et al. 2012. ‘A Phase II

Open-Label Randomized Study to Assess the Efficacy and Safety of Selumetinib

(AZD6244 [ARRY-142886]) versus Capecitabine in Patients with Advanced or Metastatic

Pancreatic Cancer Who Have Failed First-Line Gemcitabine Therapy’. *Invest New Drugs*.

<https://doi.org/10.1007/s10637-011-9687-4>.

Boeck S, Jung A, Laubender RP, Neumann J, Egg R, Goritschan C et al. 2013. ‘KRAS Mutation

Status Is Not Predictive for Objective Response to Anti-EGFR Treatment with Erlotinib in

Patients with Advanced Pancreatic Cancer’. *J Gastroenterol*.

<https://doi.org/10.1007/s00535-013-0767-4>.

Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A.. 2003. ‘The

Transcription Factor Slug Represses E-Cadherin Expression and Induces Epithelial to

Mesenchymal Transitions: A Comparison with Snail and E47 Repressors’. *J Cell Sci*.

<https://doi.org/10.1242/jcs.00224>.

Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A et al. 2005. ‘Invasion

and Metastasis in Colorectal Cancer: Epithelial-Mesenchymal Transition, Mesenchymal-

Epithelial Transition, Stem Cells and β -Catenin’. *Cells Tissues Organs*.

<https://doi.org/10.1159/000084509>.

- Brat DJ, Lillemoe KD, Yeo CJ, Warfield PB, Hruban RH. 1998. 'Progression of Pancreatic Intraductal Neoplasias to Infiltrating Adenocarcinoma of the Pancreas'. *Am J Surg Pathol*. <https://doi.org/10.1097/00000478-199802000-00003>.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018. 'Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.' *CA Cancer J Clin*. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Brierley JD, Gospodarowicz MK and Wittekind C. 2017. *TNM Classification of Malignant Tumours - 8th Edition. Union for International Cancer Control*. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200111>.
- Briscoe J, Théron PP. 2013. 'The Mechanisms of Hedgehog Signalling and Its Roles in Development and Disease'. *Nat Rev Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/nrm3598>.
- Bronsert P, Kohler I, Timme S, Kiefer S, Werner M, Schilling O et al. 2014. 'Prognostic Significance of Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 (ZEB1) Expression in Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Head Cancer'. *Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2014.02.018>.
- Bryant KL, Mancias JD, Kimmelman AC, Der CJ. 2014. 'KRAS: Feeding Pancreatic Cancer Proliferation'. *Trends in Biochem Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.004>.
- Buck E, Eyzaguirre A, Barr S, Thompson S, Sennello R, Young D et al. 2007. 'Loss of Homotypic Cell Adhesion by Epithelial-Mesenchymal Transition or Mutation Limits Sensitivity to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition'. *Mol Cancer Ther*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0462>.
- Bukholm IK, Nesland JM, Børresen-Dale AL. 2000. 'Re-Expression of E-Cadherin, α -Catenin

and β -Catenin, but Not of γ -Catenin, in Metastatic Tissue from Breast Cancer Patients’.

J Pathol. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(200001\)190:1<15::AID-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200001)190:1<15::AID-)

[PATH489>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200001)190:1<15::AID-PATH489>3.0.CO;2-L).

Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR et al. 1997.

‘Improvements in Survival and Clinical Benefit with Gemcitabine as First-Line Therapy for Patients with Advanced Pancreas Cancer: A Randomized Trial’. *JCO.*

<https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.6.2403>.

C

Cabrera- Escobar Je, Berumen Safe Lca and García Alcocer Ga. 2013. ‘The Role of

Transcription Factor TWIST in Cancer Cells’. *J Genet Syndr Gene Ther.*

<https://doi.org/10.4172/2157-7412.1000124>.

Camp ER1, Wang C, Little EC, Watson PM, Pirollo KF, Rait A et al. 2013. ‘Transferrin Receptor

Targeting Nanomedicine Delivering Wild-Type P53 Gene Sensitizes Pancreatic Cancer to Gemcitabine Therapy’. *Cancer Gene Ther.* <https://doi.org/10.1038/cgt.2013.9>.

Cañadas I, Rojo F, Taus Á, Arpí O, Arumí-Uría M, Pijuan L et al. 2014. ‘Targeting Epithelial-to-

Mesenchymal Transition with Met Inhibitors Reverts Chemoresistance in Small Cell Lung Cancer’. *Clin Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1330>.

Cano CE, Motoo Y, Iovanna JL. 2010. ‘Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Pancreatic

Adenocarcinoma’. *TheScientificWorldJournal.* <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.183>.

Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. 2011. ‘Snail2 Is an Essential

Mediator of Twist1-Induced Epithelial Mesenchymal Transition and Metastasis’. *Cancer*

Res. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2330>.

Cascalló M, Calbó J, Capellà G, Fillat C, Pastor-Anglada M, Mazo A. 2005. 'Enhancement of Gemcitabine-Induced Apoptosis by Restoration of P53 Function in Human Pancreatic Tumors'. *Oncology*. <https://doi.org/10.1159/000086772>.

Chaffer CL, Dopheide B, Savagner P, Thompson EW, Williams ED. 2007. 'Aberrant Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling in Bladder and Other Cancers'. *Differentiation*. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00210.x>.

Chaturvedi P1, Singh AP, Moniaux N, Senapati S, Chakraborty S, Meza JL et al. 2007. 'MUC4 Mucin Potentiates Pancreatic Tumor Cell Proliferation, Survival, and Invasive Properties and Interferes with Its Interaction to Extracellular Matrix Proteins'. *Mol Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0353>.

Chen W1, Sammani S, Mitra S, Ma SF, Garcia JG, Jacobson JR. 2012. 'Critical Role for Integrin-B4 in the Attenuation of Murine Acute Lung Injury by Simvastatin'. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00361.2011>.

Chen YW, Hsiao PJ, Weng CC, Kuo KK, Kuo TL, Wu DC et al. 2014. 'SMAD4 Loss Triggers the Phenotypic Changes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells'. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-181>.

Chiu LY, Hsin IL, Yang TY, Sung WW, Chi JY, Chang JT et al. 2016. 'The ERK-ZEB1 Pathway Mediates Epithelial-Mesenchymal Transition in Pemetrexed Resistant Lung Cancer Cells with Suppression by Vinca Alkaloids.' *Oncogene*, no. 110: 1–12. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.195>.

Cho ES, Kang HE, Kim NH, Yook JI. 2019. 'Therapeutic Implications of Cancer Epithelial-

- Mesenchymal Transition (EMT)'. *Arch Pharm Res*. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-01108-7>.
- Choi SS, Diehl AM. 2009. 'Epithelial-to-Mesenchymal Transitions in the Liver'. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.23196>.
- Chouat E, Zehani A, Chelly I, Njima M, Maghrebi H, Bani MA et al. 2018. 'Tumor Budding Is a Prognostic Factor Linked to Epithelial Mesenchymal Transition in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Study Report and Literature Review'. *Pancreatology*. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.11.010>.
- Chung CH, Parker JS, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy BA et al. 2006. 'Gene Expression Profiles Identify Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Activation of Nuclear Factor-KB Signaling as Characteristics of a High-Risk Head and Neck Squamous Cell Carcinoma'. *Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1213>.
- Chung V, McDonough S, Philip PA, Cardin D, Wang-Gillam A, Hui L et al. 2017. 'Effect of Selumetinib and MK-2206 vs Oxaliplatin and Fluorouracil in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer after Prior Therapy: SWOG S1115 Study Randomized Clinical Trial'. *JAMA Oncol*. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5383>.
- Ciccolini J, Mercier C, Dahan L, André N. 2011. 'Integrating Pharmacogenetics into Gemcitabine Dosing-Time for a Change?' *Nat Rev Clin Oncol*. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.1>.
- Ciołczyk-Wierzbicka D, Gil D, Laidler P.. 2012. 'The Inhibition of Cell Proliferation Using Silencing of N-Cadherin Gene by SiRNA Process in Human Melanoma Cell Lines'. *Curr Med Chem*. <https://doi.org/10.2174/092986712803414006>.

- Clevers H, Nusse R. 2012. 'Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease'. *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>.
- Cobb MH. 1999. 'MAP Kinase Pathways'. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(98\)00056-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(98)00056-X).
- Collins MA, Bednar F, Zhang Y, Brisset JC, Galbán S, Galbán CJ et al. 2012. 'Oncogenic Kras Is Required for Both the Initiation and Maintenance of Pancreatic Cancer in Mice'. *J Clin Invest*. <https://doi.org/10.1172/JCI59227>.
- Collins MA, Pasca di Magliano M. 2014. 'Kras as a Key Oncogene and Therapeutic Target in Pancreatic Cancer'. *Front Physiol*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00407>.
- Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S et al. 2011. 'Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Differing Responses to Therapy'. *Nat Med*.
<https://doi.org/10.1038/nm.2344>.
- Collisson EA, Bailey P, Chang DK, Biankin AV. 2019. Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0109-y>.
- Comijn J, Bex G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E et al. 2001. 'The Two-Handed E Box Binding Zinc Finger Protein SIP1 Downregulates E-Cadherin and Induces Invasion'. *Mol Cell*. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00260-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00260-X).
- Comoglio PM, Boccaccio C, Trusolino L. 2003. 'Interactions between Growth Factor Receptors and Adhesion Molecules: Breaking the Rules'. *Curr Opin Cell Biol*.
[https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00096-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00096-6).
- Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. 2000. 'American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group'.

Cancer. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(20000401\)88:7<1739::AID-CNCR30>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(20000401)88:7<1739::AID-CNCR30>3.0.CO;2-T).

Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL et al. 2018. 'FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer'. *N Eng J Med*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775>.

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y et al. 2011. 'FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer.' *N Eng J Med*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>.

Conroy T, Paillot B, François E, Bugat R, Jacob JH, Stein U et al. 2005. 'Irinotecan plus Oxaliplatin and Leucovorin-Modulated Fluorouracil in Advanced Pancreatic Cancer - A Groupe Tumeurs Digestives of the Fédération Nationale Des Centres de Lutte Contre Le Cancer Study'. *JCO*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.050>.

Conway JR, Herrmann D, Evans TJ, Morton JP, Timpson P. 2019. 'Combating Pancreatic Cancer with PI3K Pathway Inhibitors in the Era of Personalised Medicine'. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316822>.

Coppola D, Hyacinthe M, Fu L, Cantor AB, Karl R, Marcet J et al. 1998. 'CD44V6 Expression in Human Colorectal Carcinoma'. *Hum Pathol*. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(98\)80014-2](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(98)80014-2).

Cunningham D, Chau I, Stocken DD, Valle JW, Smith D, Steward W et al. 2009. 'Phase III Randomized Comparison of Gemcitabine versus Gemcitabine plus Capecitabine in Patients with Advanced Pancreatic Cancer'. *JCO*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.2446>.

D

- Dangi-Garimella S1, Sahai V, Ebine K, Kumar K, Munshi HG. 2013. 'Three-Dimensional Collagen I Promotes Gemcitabine Resistance In Vitro in Pancreatic Cancer Cells through HMGA2-Dependent Histone Acetyltransferase Expression'. *PLoS ONE*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064566>.
- Dave N, Guaita-Esteruelas S, Gutarra S, Frias À, Beltran M, Peiró S et al. 2011. 'Functional Cooperation between Snail1 and Twist in the Regulation of ZEB1 Expression during Epithelial to Mesenchymal Transition'. *J Biol Chem*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.168625>.
- Dawood S, Austin L, Cristofanilli M. 2014. 'Cancer Stem Cells: Implications for Cancer Therapy'. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*.
- Day JD, Diguseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN et al. 1996. 'Immunohistochemical Evaluation of HER-2/Neu Expression in Pancreatic Adenocarcinoma and Pancreatic Intraepithelial Neoplasms'. *Hum Pathol*.
[https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(96\)90364-0](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(96)90364-0).
- De Craene B1, van Roy F, Berx G. 2005. 'Unraveling Signalling Cascades for the Snail Family of Transcription Factors'. *Cell Signal*. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.10.011>.
- Del Castillo CF, and Volkan Adsay N. 2010. 'Mini-Reviews and Perspectives Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas'. *Gastroenterology*.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.07.025>.
- Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL et al. 2010. 'Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines'. *Pancreas*.

<https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181c15963>.

Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Remontet L, Colonna M, et al. 2019.

‘Estimations Nationales de l’incidence et de La Mortalité Par Cancer En France Métropolitaine Entre 1990 et 2018. Étude à Partir Des Registres Des Cancers Du Réseau Francim. Résultats Préliminaires. Synthèse. Saint Maurice : Santé Publique France, 2019.’, 2019.

Delpero JR, Jeune F, Bachellier P, Regenet N, Le Treut YP, Paye F, Carrere N, et al. 2017.

‘Prognostic Value of Resection Margin Involvement After Pancreaticoduodenectomy for Ductal Adenocarcinoma: Updates From a French Prospective Multicenter Study.’ *Ann Surg*. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1097/SLA.0000000000002432>.

Delpero JR, Paye F, Bachellier P. 2010. *Cancer Du Pancréas. Monographies de l’Association.*

Française de Chirurgie. 112e Congrès Français de Chirurgie Paris: Wolters Kluwer France.

Derycke LD, Bracke ME. 2004. ‘N-Cadherin in the Spotlight of Cell-Cell Adhesion,

Differentiation, Invasion and Signalling’. *Int J Dev Biol*.

<https://doi.org/10.1387/ijdb.041793ld>.

Derynck R, Zhang YE. 2003. ‘Smad-Dependent and Smad-Independent Pathways in TGF- β

Family Signalling’. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature02006>.

Di Carlo C, Brandi J, Cecconi D. 2018. ‘Pancreatic Cancer Stem Cells: Perspectives on

Potential Therapeutic Approaches of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma’. *World J Stem Cells*. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v10.i11.172>.

DiGiuseppe JA1, Hruban RH, Goodman SN, Polak M, van den Berg FM, Allison DC et al. 1994.

'Overexpression of P53 Protein in Adenocarcinoma of the Pancreas'. *Am J Clin Pathol*.

<https://doi.org/10.1093/ajcp/101.6.684>.

Ding L1, Zhang Z, Shang D, Cheng J, Yuan H, Wu Y et al. 2014. α -Smooth Muscle Actin-Positive Myofibroblasts, in Association with Epithelial-Mesenchymal Transition and Lymphogenesis, Is a Critical Prognostic Parameter in Patients with Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma'. *J Oral Pathol Med*. <https://doi.org/10.1111/jop.12143>.

Duell EJ, Lucenteforte E, Olson SH, Bracci PM, Li D, Risch HA et al. 2012. 'Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Pooled Analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4)'. *Ann Oncol*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds140>.

Dufresne, M. 2013. 'Physiologie Du Pancréas Exocrine'. *EMC - Hépatologie*.

[https://doi.org/10.1016/s1155-1976\(12\)59709-3](https://doi.org/10.1016/s1155-1976(12)59709-3).

E

Eda H1, Ura M, F-Ouchi K, Tanaka Y, Miwa M, Ishitsuka H. 1998. 'The Antiproliferative Activity of DMDC Is Modulated by Inhibition of Cytidine Deaminase'. *Cancer Res*.

Ekbom A, McLaughlin JK, Karlsson BM, Nyrén O, Gridley G, Adami HO et al. 1994.

'Pancreatitis and Pancreatic Cancer: A Population-Based Study'. *J Natl Cancer Inst*.

<https://doi.org/10.1093/jnci/86.8.625>.

El Amrani M, Clement G, Lenne X, Farges O, Delpero JR, Theis D et al. 2018. 'Failure-to-Rescue in Patients Undergoing Pancreatectomy'. *Ann Surg*.

<https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002945>.

Erat MC, Sladek B, Campbell ID, Vakonakis I. 2013. 'Structural Analysis of Collagen Type I Interactions with Human Fibronectin Reveals a Cooperative Binding Mode'. *J Biol Chem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.469841>.

Erkan M, Michalski CW, Rieder S, Reiser-Erkan C, Abiatari I, Kolb A et al. 2008. 'The Activated Stroma Index Is a Novel and Independent Prognostic Marker in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma'. *Clin Gastroenterol Hepatol*. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.05.006>.

Escrivà M, Peiró S, Herranz N, Villagrasa P, Dave N, Montserrat-Sentís B et al. 2008. 'Repression of PTEN Phosphatase by Snail1 Transcriptional Factor during Gamma Radiation-Induced Apoptosis'. *Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1128/mcb.02061-07>.

F

Ferlay J EM, Lam F, Colombet M, Mery L, Pineros M, Znaor A, Soerjomataram I, et al. 2018. 'Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.' [Http://Gco.Iarc.Fr/Tomorrow/ Graphic-Isotype?Type=1&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_Male=0&apc_female=0](http://Gco.Iarc.Fr/Tomorrow/Graphic-Isotype?Type=1&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_Male=0&apc_female=0). 2018. http://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=1&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0.

Ferrone CR, Marchegiani G, Hong TS, Ryan DP, Deshpande V, McDonnell EI et al. 2015. 'Radiological and Surgical Implications of Neoadjuvant Treatment with FOLFIRINOX for Locally Advanced and Borderline Resectable Pancreatic Cancer'. *Ann Surg*.

<https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000000867>.

Fiorini C, Cordani M, Padroni C, Blandino G, Di Agostino S, Donadelli M. 2015. 'Mutant P53 Stimulates Chemoresistance of Pancreatic Adenocarcinoma Cells to Gemcitabine'.

Biochimica et Biophysica Acta - Mol Cell Res.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.10.003>.

Firulli AB, Conway SJ. 2008. 'Phosphoregulation of Twist1 Provides a Mechanism of Cell Fate Control'. *Curr Med Chem.* <https://doi.org/10.2174/092986708785908987>.

Frisch SM, Schaller M, Cieply B. 2013. 'Mechanisms That Link the Oncogenic Epithelial-Mesenchymal Transition to Suppression of Anoikis'. *J Cell Sci.*

<https://doi.org/10.1242/jcs.120907>.

Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J et al. 2002. 'Hakai, a c-Cbl-like Protein, Ubiquitinates and Induces Endocytosis of the E-Cadherin Complex'. *Nature Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/ncb758>.

Fukumoto Y, Shintani Y, Reynolds AB, Johnson KR, Wheelock MJ. 2008. 'The Regulatory or Phosphorylation Domain of P120 Catenin Controls E-Cadherin Dynamics at the Plasma Membrane'. *Exp Cell Res.* <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.07.024>.

Funamizu N, Kamata Y, Misawa T, Uwagawa T, Lacy CR, Yanaga K et al. 2012. 'Hydroxyurea Decreases Gemcitabine Resistance in Pancreatic Carcinoma Cells with Highly Expressed Ribonucleotide Reductase'. *Pancreas.*

<https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e318224b5fb>.

Funamizu N, Okamoto A, Kamata Y, Misawa T, Uwagawa T, Gocho T et al. 2010. 'Is the Resistance of Gemcitabine for Pancreatic Cancer Settled Only by Overexpression of

Deoxycytidine Kinase?' *Oncol Rep.* <https://doi.org/10.3892/or-00000657>.

G

Galván JA, Zlobec I, Wartenberg M, Lugli A, Gloor B, Perren A et al. 2015. 'Expression of E-Cadherin Repressors SNAIL, ZEB1 and ZEB2 by Tumour and Stromal Cells Influences Tumour-Budding Phenotype and Suggests Heterogeneity of Stromal Cells in Pancreatic Cancer'. *Br J Cancer.* <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.177>.

Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP. 2005. 'Molecular Prognostic Markers in Pancreatic Cancer: A Systematic Review'. *Eur J Cancer.* <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.04.044>.

Gilles C, Polette M, Mestdagt M, Nawrocki-Raby B, Ruggeri P, Birembaut P et al. 2003. 'Transactivation of Vimentin by β -Catenin in Human Breast Cancer Cells'. *Cancer Res.*

Gilles C, Polette M, Seiki M, Birembaut P, Thompson EW. 1997. 'Implication of Collagen Type I-Induced Membrane-Type 1-Matrix Metalloproteinase Expression and Matrix Metalloproteinase-2 Activation in the Metastatic Progression of Breast Carcinoma'. *Lab Invest.*

Gimond C, van Der Flier A, van Delft S, Brakebusch C, Kuikman I, Collard JG et al. 1999. 'Induction of Cell Scattering by Expression of B1 Integrins in B1- Deficient Epithelial Cells Requires Activation of Members of the Rho Family of GTPases and Downregulation of Cadherin and Catenin Function'. *J Cell Biol.* <https://doi.org/10.1083/jcb.147.6.1325>.

Gnerlich JL, Luka SR, Deshpande AD, Dubray BJ, Weir JS, Carpenter DH et al. 2012. 'Microscopic Margins and Patterns of Treatment Failure in Resected Pancreatic

- Adenocarcinoma'. *Arch Surg*. <https://doi.org/10.1001/archsurg.2012.1126>.
- Goggins M, Hruban RH, Kern SE. 2000. 'BRCA2 Is Inactivated Late in the Development of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: Evidence and Implications'. *Am J Pathol*. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65047-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65047-X).
- Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ et al. 2019. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. <https://doi: 10.1056/NEJMoa1903387>. Epub 2019 Jun 2.
- Gonzalez DM, Medici D. 2014. 'Signaling Mechanisms of the Epithelial-Mesenchymal Transition'. *Sci Signal*. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005189>.
- Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, Louvard D. 1996. 'The Junction-Associated Protein, Zonula Occludens-1, Localizes to the Nucleus before the Maturation and during the Remodeling of Cell-Cell Contacts'. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10779>.
- Grant RC, Selander I, Connor AA, Selvarajah S, Borgida A, Briollais L et al. 2015. 'Prevalence of Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients with Pancreatic Cancer'. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.11.042>.
- Greenburg G, Hay ED. 1982. 'Epithelia Suspended in Collagen Gels Can Lose Polarity and Express Characteristics of Migrating Mesenchymal Cells'. *J Cell Biol*. <https://doi.org/10.1083/jcb.95.1.333>.
- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G et al. 2008. 'The MiR-200 Family and MiR-205 Regulate Epithelial to Mesenchymal Transition by Targeting ZEB1 and SIP1'. *Nat Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/ncb1722>.

- Grigore AD, Jolly MK, Jia D, Farach-Carson MC, Levine H. 2016. 'Tumor Budding: The Name Is EMT. Partial EMT.' *J Clin Med*. <https://doi.org/10.3390/jcm5050051>.
- Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E et al. 2002. 'Snail Induction of Epithelial to Mesenchymal Transition in Tumor Cells Is Accompanied by MUC1 Repression and ZEB1 Expression'. *J Biol Chem*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M206400200>.
- Guérit, J.M. 2001. Putz R, Pabst R, Eds. Atlas d'anatomie Humaine Sobotta. Tome I : Tête, Cou, Membre Supérieur. Tome II : Troncs, Viscères, Membre Inférieur. 4e Édition Française Sous La Direction de A. Dhem et A. Gouazé. Cachan : Éditions Médicales Internationales (2000'. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology*.
- Gullo L. 1999. 'Diabetes and the Risk of Pancreatic Cancer'. *Ann Oncol*.
https://doi.org/10.1093/annonc/10.suppl_4.S79.
- Gunjan D, Rana SS, Chhabra P, Parghane RV, Kumar R, Dhalaria L et al. 2016. 'Primary Squamous Cell Carcinoma of Pancreas Mimicking Walled-off Pancreatic Necrosis'. *J Dig Endosc*. <https://doi.org/10.4103/0976-5042.180094>.
- Guo J, Fu Z, Wei J, Lu W, Feng J, Zhang S.. 2015. 'PRRX1 Promotes Epithelial–Mesenchymal Transition through the Wnt/ β -Catenin Pathway in Gastric Cancer'. *Med Oncol*.
<https://doi.org/10.1007/s12032-014-0393-x>.
- Guo W, Giancotti FG. 2004. 'Integrin Signalling during Tumour Progression'. *Nat Rev Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/nrm1490>.
- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr. 1999. 'NF-KB Controls Cell Growth and Differentiation through Transcriptional Regulation of Cyclin D1'. *Mol Cell*

Biol. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.8.5785>.

H

Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E et al. 1996. 'DPC4, a Candidate Tumor Suppressor Gene at Human Chromosome 18q21.1'. *Science*.

<https://doi.org/10.1126/science.271.5247.350>.

Hamada S, Masamune A, Miura S, Satoh K, Shimosegawa T. 2014. MiR-365 induces gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by targeting the adaptor protein SHC1 and pro-apoptotic regulator BAX. *Cell Sign.* <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.003>. Epub 2013 Nov 9.

Hammel P, Huguet F, van Laethem JL, Goldstein D, Glimelius B, Artru P et al. 2016. 'Effect of Chemoradiotherapy vs Chemotherapy on Survival in Patients with Locally Advanced Pancreatic Cancer Controlled after 4 Months of Gemcitabine with or without Erlotinib the LAP07 Randomized Clinical Trial'. *JAMA*. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.4324>.

Han Y, Luo Y, Wang Y, Chen Y, Li M, Jiang Y. 2016. 'Hepatocyte Growth Factor Increases the Invasive Potential of PC-3 Human Prostate Cancer Cells via an ERK/MAPK and ZEB-1 Signaling Pathway'. *Oncol Lett.* <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3943>.

Hansen R, Quebbeman E, Ritch P, Chitambar C, Anderson T. 1988. 'Continuous 5-Fluorouracil (5FU) Infusion in Carcinoma of the Pancreas: A Phase II Study'. *Am J Med Sci.* <https://doi.org/10.1097/00000441-198802000-00001>.

Haraguchi M, Okubo T, Miyashita Y, Miyamoto Y, Hayashi M, Crotti TN et al. 2008. 'Snail Regulates Cell-Matrix Adhesion by Regulation of the Expression of Integrins and

- Basement Membrane Proteins'. *J BiolChem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801125200>.
- Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. 1993. 'Prognostic Value of Tumor "Budding" in Patients with Colorectal Cancer'. *Dis Colon Rectum*.
<https://doi.org/10.1007/BF02238588>.
- Hasegawa S, Eguchi H, Nagano H, Konno M, Tomimaru Y, Wada H et al. 2014. MicroR-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.454>. Epub 2014 Aug 12.
- Hernandez JM, Cowgill SM, Al-Saadi S, Collins A, Ross SB, Cooper J et al. 2009. 'CA 19-9 Velocity Predicts Disease-Free Survival and Overall Survival after Pancreatectomy of Curative Intent'. *J Gastrointestl Surg*. <https://doi.org/10.1007/s11605-008-0696-3>.
- Hesler RA, Huang JJ, Starr MD, Treboschi VM, Bernanke AG, Nixon AB et al. 2016. 'TGF- β -Induced Stromal CYR61 Promotes Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma through Downregulation of the Nucleoside Transporters HENT1 and HCNT3'. *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw093>.
- Heuzé G, and Billot-grasset A. 2019. 'Régionales Et Départementales D ' Incidence Et De Mortalité Par Cancers', 146.
- Hirai I, Kimura W, Ozawa K, Kudo S, Suto K, Kuzu H et al. 2002. 'Perineural Invasion in Pancreatic Cancer'. *Pancreas*. <https://doi.org/10.1097/00006676-200201000-00003>.
- Hirota M, Shimosegawa T, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Hamada S et al. 2012. 'The Sixth Nationwide Epidemiological Survey of Chronic Pancreatitis in Japan'. *Pancreatology*.
<https://doi.org/10.1016/j.pan.2012.02.005>.
- Hörkkö TT, Klintrup K, Mäkinen JM, Näpänkangas JB, Tuominen HJ, Mäkelä J et al. 2006.

'Budding Invasive Margin and Prognosis in Colorectal Cancer - No Direct Association with β -Catenin Expression'. *Eur J Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.017>.

Hoshimoto S, Matsui J, Miyata R, Takigawa Y, Miyauchi J. 2016. 'Anaplastic Carcinoma of the Pancreas: Case Report and Literature Review of Reported Cases in Japan'. *World J Gastroenterol*. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i38.8631>.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF et al. 2015. 'National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2012'. *National Cancer Institute*, 1975-2012.

Huang Z, Liu F. 2014. 'Diagnostic Value of Serum Carbohydrate Antigen 19-9 in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis'. *Tumor Biol*. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1995-9>.

Hung SW, Mody H, Marrache S, Bhutia YD, Davis F, Cho JH et al. 2013. 'Pharmacological Reversal of Histone Methylation Presensitizes Pancreatic Cancer Cells to Nucleoside Drugs: In Vitro Optimization and Novel Nanoparticle Delivery Studies'. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071196>. *J Cell Biol*.

I

Iden S, Collard JG. 2008. 'Crosstalk between Small GTPases and Polarity Proteins in Cell Polarization'. *Nat Rev Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/nrm2521>.

Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. 2003. 'Regulation of Tight Junctions during the Epithelium-Mesenchyme Transition: Direct Repression of the Gene Expression of Claudins/Occludin by Snail'. *J Cell Sci*. <https://doi.org/10.1242/jcs.00389>.

- Imrich S, Hachmeister M, Gires O. 2012. 'EpCAM and Its Potential Role in Tumor-Initiating Cells'. *Cell Adh Migr*. <https://doi.org/10.4161/cam.18953>.
- Infante JR, Camidge DR, Mileskin LR, Chen EX, Hicks RJ, Rischin D et al. 2012. 'Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Phase I Dose-Escalation Trial of PF-00562271, an Inhibitor of Focal Adhesion Kinase, in Advanced Solid Tumors'. *JCO*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.9346>.
- Infante JR, Matsubayashi H, Sato N, Tonascia J, Klein AP, Riall TA et al. 2007. 'Peritumoral Fibroblast SPARC Expression and Patient Outcome with Resectable Pancreatic Adenocarcinoma'. *JCO*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.8824>.
- Infante JR, Somer BG, Park JO, Li CP, Scheulen ME, Kasubhai SM 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*. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.04.024>.
- Ino Y1, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y et al. 2013. 'Immune Cell Infiltration as an Indicator of the Immune Microenvironment of Pancreatic Cancer'. *Br J Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.32>.
- Inoue K, Fry EA. 2016. 'Novel Molecular Markers for Breast Cancer'. *Biomark Cancer*. <https://doi.org/10.4137/bic.s38394>.
- Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. 2008. 'Tobacco and the Risk of Pancreatic Cancer: A Review and Meta-Analysis'. *Langenbeck's Arch Surg*. <https://doi.org/10.1007/s00423-007-0266-2>.
- Ivaska J. 2011. 'Vimentin: Central Hub in EMT Induction?' *Small GTPases*.

Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. 2002. 'Evidence That Fibroblasts Derive from Epithelium during Tissue Fibrosis'. *J Clin Invest*.
<https://doi.org/10.1172/JCI0215518>.

J

Jäger T, Neureiter D, Fallaha M, Schredl P, Kiesslich T, Urbas R et al. 2018. 'The Potential Predictive Value of Tumor Budding for Neoadjuvant Chemoradiotherapy Response in Locally Advanced Rectal Cancer'. *Strahlenther Onkol*. <https://doi.org/10.1007/s00066-018-1340-0>.

Jiang YG1, Luo Y, He DL, Li X, Zhang LL, Peng T et al. 2007. 'Role of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Prostate Cancer Induced by Hypoxia-Inducible Factor-1 α '. *Int J Urol*. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2007.01866.x>.

Jolly MK, Tripathi SC, Jia D, Mooney SM, Celiktas M, Hanash SM et al. 2016. 'Stability of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype'. *Oncotarget*.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.8166>.

Jonckheere N, Perrais M, Mariette C, Batra SK, Aubert JP, Pigny P et al. 2004. 'A Role for Human MUC4 Mucin Gene, the ErbB2 Ligand, as a Target of TGF- β in Pancreatic Carcinogenesis'. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207769>.

Jonckheere N1, Skrypek N, Merlin J, Dessein AF, Dumont P, Leteurtre E et al. 2012. 'The Mucin Muc4 and Its Membrane Partner Erbb2 Regulate Biological Properties of Human Capan-2 Pancreatic Cancer Cells via Different Signalling Pathways'. *PLoS ONE*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032232>.

Jones LE, Humphreys MJ, Campbell F, Neoptolemos JP, Boyd MT. 2004. 'Comprehensive Analysis of Matrix Metalloproteinase and Tissue Inhibitor Expression in Pancreatic Cancer: Increased Expression of Matrix Metalloproteinase-7 Predicts Poor Survival'. *Clin Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-1157-03>.

Joseph JV, Conroy S, Tomar T, Eggens-Meijer E, Bhat K, Copray S et al. 2014. 'TGF- β Is an Inducer of ZEB1-Dependent Mesenchymal Transdifferentiation in Glioblastoma That Is Associated with Tumor Invasion'. *Cell Death Dis*. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.395>.

Jung HY, Fattet L, Tsai JH, Kajimoto T, Chang Q, Newton AC. 2019. 'Apical–Basal Polarity Inhibits Epithelial–Mesenchymal Transition and Tumour Metastasis by PAR-Complex-Mediated SNAI1 Degradation'. *Nat Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0291-8>.

K

Kalluri R, Weinberg RA. 2009. 'The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition.' *J Clin Invest*. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.

Kalra RS, Chaudhary A, Yoon AR, Bhargava P, Omar A, Garg S et al. 2018. 'CARF Enrichment Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition via Wnt/ β -Catenin Signaling: Its Clinical Relevance and Potential as a Therapeutic Target'. *Oncogenesis*. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0048-4>.

Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. 2016. 'Pancreatic Cancer'. *The Lancet*.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00141-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00141-0).

Kang MH, Kang HN, Kim JL, Kim JS, Oh SC, Yoo YA. 2009. 'Inhibition of PI3 Kinase/Akt Pathway Is Required for BMP2-Induced EMT and Invasion'. *Oncol Rep*.

Kaufhold S, Bonavida B. 2014. 'Central Role of Snail1 in the Regulation of EMT and Resistance in Cancer: A Target for Therapeutic Intervention'. *J Exp Clin Cancer Res*.
<https://doi.org/10.1186/s13046-014-0062-0>.

Kaur S, Kumar S, Momi N, Sasson AR, Batra SK. 2013. 'Mucins in Pancreatic Cancer and Its Microenvironment'. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.120>.

Kedrin D, van Rheenen J, Hernandez L, Condeelis J, Segall JE. 2007. 'Cell Motility and Cytoskeletal Regulation in Invasion and Metastasis'. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*.
<https://doi.org/10.1007/s10911-007-9046-4>.

Kielbik M, Krzyzanowski D, Pawlik B, Klink M. 2018. 'Cisplatin-Induced ERK1/2 Activity Promotes G1 to S Phase Progression Which Leads to Chemoresistance of Ovarian Cancer Cells'. *Oncotarget* 9 (28): 19847–60.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.24884>.

Kim MP, Shah AN, Parikh NU, Gallick GE. 2007. 'Gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells is associated with increased expression of stem cell-like markers and a concomitant down-regulation of pten and activation of akt'. *Pancreas*.
<https://doi.org/10.1097/01.mpa.0000297723.08005.26>.

Kleeff J, Beckhove P, Esposito I, Herzig S, Huber PE, Löhr JM et al. 2007. 'Pancreatic Cancer Microenvironment'. *Int. J. Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.22871>.

- Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. 2016. 'Tumor Budding in Colorectal Cancer - Ready for Diagnostic Practice?' *Hum Pathol*. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.08.007>.
- Koenig A, Mueller C, Hasel C, Adler G, Menke A. 2006. 'Collagen Type I Induces Disruption of E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Contacts and Promotes Proliferation of Pancreatic Carcinoma Cells'. *Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2804>.
- Kohler I1, Bronsert P, Timme S, Werner M, Brabletz T, Hopt UT et al. 2015. 'Detailed Analysis of Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumor Budding Identifies Predictors of Long-Term Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma'. *J Gastroenterol Hepatol*. <https://doi.org/10.1111/jgh.12752>.
- Konstantinidis IT1, Deshpande V, Zheng H, Wargo JA, Fernandez-del Castillo C, Thayer SP et al. 2010. 'Does the Mechanism of Lymph Node Invasion Affect Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma?' *J Gastrointest Surg*. <https://doi.org/10.1007/s11605-009-1096-z>.
- Kourtidis A, Ngok SP, Anastasiadis PZ. 2013. 'P120 Catenin: An Essential Regulator of Cadherin Stability, Adhesion-Induced Signaling, and Cancer Progression'. *Prog Mol Biol Transl Sci*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00018-2>.
- Kovach JS, Moertel CG, Schutt AJ, Hahn RG, Reitemeier RJ. 1974. 'Proceedings: A Controlled Study of Combined 1,3-Bis-(2-Chloroethyl)-1-Nitrosourea and 5-Fluorouracil Therapy for Advanced Gastric and Pancreatic Cancer.' *Cancer*.
- Kroep JR1, Loves WJ, van der Wilt CL, Alvarez E, Talianidis I, Boven E et al. Peters. 2002. 'Pretreatment Deoxycytidine Kinase Levels Predict in Vivo Gemcitabine Sensitivity'. *Mol Cancer Ther*.

van Kruijsdijk RC, van der Wall E, Visseren FL. 2009. 'Obesity and Cancer: The Role of Dysfunctional Adipose Tissue'. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0372>.

Kurahara H1, Shinchu H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F et al. 2011. 'Significance of M2-Polarized Tumor-Associated Macrophage in Pancreatic Cancer'. *J Surg Res*.
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.05.026>.

Kurusu S, Takenawa T. 2009. 'The WASP and WAVE Family Proteins.' *Genome Biol*.

L

Lamouille S, Xu J, Derynck R. 2014. 'Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition'. *Nat Rev Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>.

Lau MK, Davila JA, Shaib YH. 2010. 'Incidence and Survival of Pancreatic Head and Body and Tail Cancers: A Population-Based Study in the United States'. *Pancreas*.
<https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181bd6489>.

Lawlor RT, Veronese N, Nottegar A, Malleo G, Smith L, Demurtas J et al. 2019. 'Prognostic Role of High-Grade Tumor Budding in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis with a Focus on Epithelial to Mesenchymal Transition'. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers11010113>.

Le N, Sund M, Vinci A. 2016. 'Prognostic and Predictive Markers in Pancreatic Adenocarcinoma'. *Dig Liver Dis*. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.11.001>.

Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK et al. 2017. Mismatch-repair

- deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aan6733>.
- Li C, Wu JJ, Hynes M, Dosch J, Sarkar B, Welling TH et al. 2011. 'C-Met Is a Marker of Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Target'. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.08.009>.
- Liang C, Yu XJ, Guo XZ, Sun MH, Wang Z, Song Y et al. 2015. 'MicroRNA-33a-Mediated Downregulation of Pim-3 Kinase Expression Renders Human Pancreatic Cancer Cells Sensitivity to Gemcitabine'. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3885>.
- Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. 1975. 'Establishment of a Continuous Tumor-cell Line (PANC-1) from a Human Carcinoma of the Exocrine Pancreas'. *Int J Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910150505>.
- Lilienbaum A, Paulin D. 1993. 'Activation of the Human Vimentin Gene by the Tax Human T-Cell Leukemia Virus I. Mechanisms of Regulation by the NFκB Transcription Factor'. *J Biol Chem*.
- Lin G, Gai R, Chen Z, Wang Y, Liao S, Dong R et al. 2014. 'The Dual PI3K/MTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Prevents Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Hypoxia and TGF-B1'. *Eur J Pharmacol*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.02.011>.
- Lin Y, Dong C, Zhou BP. 2014. 'Epigenetic Regulation of EMT: The Snail Story'. *Curr Pharm Des*. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990512>.
- Liu CY, Lin HH, Tang MJ, Wang YK. 2015. 'Vimentin Contributes to Epithelial-Mesenchymal Transition Ance Cell Mechanics by Mediating Cytoskeletal Organization and Focal Liu X, Yun F, Shi L, Li ZH, Luo NR, Jia YF. 2015. 'Roles of Signaling Pathways in the Epithelial-

Mesenchymal Transition in Cancer'. *Asian Pac J Cancer Prev*.

<https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.15.6201>.

Liu Z, Luo G, Guo M, Jin K, Xiao Z, Liu L et al. 2015. 'Lymph Node Status Predicts the Benefit of Adjuvant Chemoradiotherapy for Patients with Resected Pancreatic Cancer'.

Pancreatology. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2015.03.012>.

Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J. 2005. 'Frequency of K-Ras Mutations in Pancreatic Intraductal Neoplasias Associated with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis: A Meta-Analysis'. *Neoplasia*.

<https://doi.org/10.1593/neo.04445>.

Louvet C, Labianca R, Hammel P, Lledo G, Zampino MG, André T et al. 2005. 'Gemcitabine in Combination with Oxaliplatin Compared with Gemcitabine Alone in Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Cancer: Results of a GERCOR and GISCAD Phase III Trial'. *JCO*.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.023>.

Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC. 2000. 'Risk Factors for Cancer in Hereditary Pancreatitis. International Hereditary Pancreatitis Study Group'. *Med Clin North Am*.

Lu L, Zeng J. 2017. 'Evaluation of K-Ras and P53 Expression in Pancreatic Adenocarcinoma Using the Cancer Genome Atlas'. *PLoS ONE*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181532>.

Lu W, Kang Y. 2019. 'Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis'. *Dev Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.010>.

Lundgren K, Nordenskjöld B, Landberg G. 2009. 'Hypoxia, Snail and Incomplete Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer'. *Br J Cancer*.

<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605369>.

Luo G, Zhang Y, Guo P, Ji H, Xiao Y, Li K. 2019. 'Global Patterns and Trends in Pancreatic Cancer Incidence: Age, Period, and Birth Cohort Analysis'. *Pancreas*.

<https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001230>.

Luo Z, Li Y, Zuo M, Liu C, Tian W, Yan D et al. 2017. Effect of NR5A2 inhibition on pancreatic cancer stem cell (CSC) properties and epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers. *Mol Carcinog*. <https://doi.org/10.1002/mc.22604>. Epub 2017 Jan 12.

M

Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R. 2003. 'C-Met: Structure, Functions and Potential for Therapeutic Inhibition'. *Cancer Metastasis Rev*.

<https://doi.org/10.1023/A:1023768811842>.

Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA et al. 1998. 'Functional Nucleoside Transporters Are Required for Gemcitabine Influx and Manifestation of Toxicity in Cancer Cell Lines'. *Cancer Res*.

Maisonneuve P, Lowenfels AB. 2015. 'Risk Factors for Pancreatic Cancer: A Summary Review of Meta-Analytical Studies'. *Int J Epidemiol*. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu240>.

Makohon-Moore A, Brosnan JA, Iacobuzio-Donahue CA. 2013. 'Pancreatic Cancer Genomics: Insights and Opportunities for Clinical Translation'. *Genome Med*.

<https://doi.org/10.1186/gm430>.

Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Rosso T, Boffetta P, Levi F et al. 2016. 'European Cancer

- Mortality Predictions for the Year 2016 with Focus on Leukaemias'. *Ann Oncol*.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdw022>.
- Maréchal R, Mackey JR, Lai R, Demetter P, Peeters M, Polus M et al. 2009. 'Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 and Human Concentrative Nucleoside Transporter 3 Predict Survival after Adjuvant Gemcitabine Therapy in Resected Pancreatic Adenocarcinoma'. *Clin Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2080>.
- Marion-Audibert AM, Vullierme MP, Ronot M, Mabrut JY, Sauvanet A, Zins M et al. 2018. 'Routine MRI with DWI Sequences to Detect Liver Metastases in Patients with Potentially Resectable Pancreatic Ductal Carcinoma and Normal Liver CT: A Prospective Multicenter Study'. *AJR Am J Roentgenol*. <https://doi.org/10.2214/AJR.18.19640>.
- Massague J. 2008. 'TGFbeta in Cancer.' *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>.
- Mehrotra S, Languino LR, Raskett CM, Mercurio AM, Dohi T, Altieri DC. 2010. 'IAP Regulation of Metastasis'. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.11.021>.
- Menezes ME. 2014. 'The Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Epithelial Mesenchymal Transition'. *Postdoc Journal*. <https://doi.org/10.14304/surya.jpr.v2n7.1>.
- Meng Q, Shi S, Liang C, Liang D, Xu W, Ji S. 2017. 'Diagnostic and Prognostic Value of Carcinoembryonic Antigen in Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *Onco Targets Ther*. <https://doi.org/10.2147/OTT.S145708>.
- Min C, Eddy SF, Sherr DH, Sonenshein GE. 2008. 'NF-KB and Epithelial to Mesenchymal Transition of Cancer'. *J Cell Biochem*. <https://doi.org/10.1002/jcb.21695>.
- Minami K, Shinsato Y, Yamamoto M, Takahashi H, Zhang S, Nishizawa Y et al. 2015.

- 'Ribonucleotide Reductase Is an Effective Target to Overcome Gemcitabine Resistance in Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cancer Cells with Dual Resistant Factors'. *J Pharmacol Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.01.006>.
- Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. 2006. 'Cellular Pharmacology of Gemcitabine'. *Ann Oncol*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdj941>.
- Missiaglia E, Donadelli M, Palmieri M, Crnogorac-Jurcevic T, Scarpa A, Lemoine NR. 2005. 'Growth Delay of Human Pancreatic Cancer Cells by Methylase Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidine Treatment Is Associated with Activation of the Interferon Signalling Pathway'. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208018>.
- Miyamoto H, Murakami T, Tsuchida K, Sugino H, Miyake H, Tashiro S. 2004. 'Tumor-Stroma Interaction of Human Pancreatic Cancer: Acquired Resistance to Anticancer Drugs and Proliferation Regulation Is Dependent on Extracellular Matrix Proteins'. *Pancreas*. <https://doi.org/10.1097/00006676-200401000-00006>.
- Miyata H, Yoshioka A, Yamasaki M, Nushijima Y, Takiguchi S, Fujiwara Y et al. 2009. 'Tumor Budding in Tumor Invasive Front Predicts Prognosis and Survival of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinomas Receiving Neoadjuvant Chemotherapy'. *Cancer*. <https://doi.org/10.1002/cncr.24390>.
- Modolell I, Guarner L, Malagelada JR. 1999. 'Vagaries of Clinical Presentation of Pancreatic and Biliary Tract Cancer'. *Ann Oncol*. https://doi.org/10.1093/annonc/10.suppl_4.S82.
- Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SG, Hoadley KA et al. 2015. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet*. <https://doi.org/10.1038/ng.3398>. Epub 2015 Sep 7.

Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S et al. 2007. 'Erlotinib plus Gemcitabine Compared with Gemcitabine Alone in Patients with Advanced Pancreatic Cancer: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group'. *JCO*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.9525>.

Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G, Madonia M, Indelicato M, Travali S et al. 2005. 'Matrix Metalloproteinases as Diagnostic (MMP-13) and Prognostic (MMP-2, MMP-9) Markers of Prostate Cancer'. *Urol Res*. <https://doi.org/10.1007/s00240-004-0440-8>.

Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Sato N, Nabae T et al. 2009. 'MicroRNA-21 Modulates Biological Functions of Pancreatic Cancer Cells Including Their Proliferation, Invasion, and Chemoresistance'. *Mol Cancer Ther*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0592>.

Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. 2018. 'N-Cadherin in Cancer Metastasis, Its Emerging Role in Haematological Malignancies and Potential as a Therapeutic Target in Cancer'. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4845-0>.

Müerköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML et al. 2004. 'Tumor Stroma Interactions Induce Chemoresistance in Pancreatic Ductal Carcinoma Cells Involving Increased Secretion and Paracrine Effects of Nitric Oxide and Interleukin-1 β '. *Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-1860>.

N

Nakahira S, Nakamori S, Tsujie M, Takahashi Y, Okami J, Yoshioka S et al. 2007. 'Involvement of Ribonucleotide Reductase M1 Subunit Overexpression in Gemcitabine Resistance of

Human Pancreatic Cancer'. *Int J Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.22390>.

Nalla AK, Estes N, Patel J, Rao JS. 2011. 'N-Cadherin Mediates Angiogenesis by Regulating Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression via PI3K/Akt Signaling in Prostate Cancer Cells'. *Exp Cell Res*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.07.024>.

Nawshad A, Medici D, Liu CC, Hay ED. 2007. 'TGF β 3 Inhibits E-Cadherin Gene Expression in Palate Medial-Edge Epithelial Cells through a Smad2-Smad4-LEF1 Transcription Complex'. *J Cell Sci*. <https://doi.org/10.1242/jcs.003129>.

Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H et al. 2001. 'Adjuvant Chemoradiotherapy and Chemotherapy in Resectable Pancreatic Cancer: A Randomised Controlled Trial'. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06651-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06651-X).

Nomura A, Banerjee S, Chugh R, Dudeja V, Yamamoto M, Vickers SM et al. 2015. 'CD133 Initiates Tumors, Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Increases Metastasis in Pancreatic Cancer'. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3228>.

Novak A, Dedhar S. 1999. 'Signaling through β -Catenin and Lef/Tcf'. *Cell Mol Life Sci*. <https://doi.org/10.1007/s000180050449>.

O

Ohuchida K, Mizumoto K, Ohhashi S, Yamaguchi H, Konomi H, Nagai E et al. 2007. 'Twist, a Novel Oncogene, Is Upregulated in Pancreatic Cancer: Clinical Implication of Twist Expression in Pancreatic Juice'. *Int J Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.22295>.

Ono H, Basson MD, Ito H. 2016. 'P300 Inhibition Enhances Gemcitabine-Induced Apoptosis

of Pancreatic Cancer'. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10117>.

P

Parkin DM, Boyd L, Walker LC. 2011. 'The Fraction of Cancer Attributable to Lifestyle and Environmental Factors in the UK in 2010'. *Br J Cancer*.

<https://doi.org/10.1038/bjc.2011.489>.

Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Mellstedt H. 2012. 'Epithelial Cell Adhesion Molecule Expression (CD326) in Cancer: A Short Review'. *Cancer Treat Revs*.

<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.04.002>.

Peng YP, Zhu Y, Yin LD, Wei JS, Liu XC, Zhu XL et al. 2018. 'PIK3R3 Promotes Metastasis of Pancreatic Cancer via ZEB1 Induced Epithelial-Mesenchymal Transition'. *Cell Physiol Biochem*.

<https://doi.org/10.1159/000489382>.

Perkins ND. 1997. 'Achieving Transcriptional Specificity with NF-KB'. *Int J Biochem Cell Biol*.

[https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00088-5).

Petrelli F, Coinu A, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Lonati V et al. 2015. 'FOLFIRINOX-Based Neoadjuvant Therapy in Borderline Resectable or Unresectable Pancreatic Cancer: A Meta-Analytical Review of Published Studies'. *Pancreas*.

<https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000314>.

Pezzilli R, Pagano N. 2013. 'Is Diabetes Mellitus a Risk Factor for Pancreatic Cancer?' *World J Gastroenterol*. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i30.4861>.

Phua DC, Humbert PO, Hunziker W. 2009. 'Vimentin Regulates Scribble Activity by Protecting

- It from Proteasomal Degradation'. *Mol Biol Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-02-0199>.
- Pietrasz D, Turrini O, Vendrely V, Simon JM, Hentic O, Coriat R et al. 2019. 'How Does Chemoradiotherapy Following Induction FOLFIRINOX Improve the Results in Resected Borderline or Locally Advanced Pancreatic Adenocarcinoma? An AGEO-FRENCH Multicentric Cohort'. *Ann Surg Oncol*. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6931-6>.
- Polette M, Mestdagt M, Bindels S, Nawrocki-Raby B, Hunziker W, Foidart JM et al. 2007. 'β-Catenin and ZO-1: Shuttle Molecules Involved in Tumor Invasion-Associated Epithelial-Mesenchymal Transition Processes'. *Cells Tissues Organs*. <https://doi.org/10.1159/000101304>.
- Polyak K, Weinberg RA. 2009. 'Transitions between Epithelial and Mesenchymal States: Acquisition of Malignant and Stem Cell Traits.' *Nat Rev Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc2620>.
- Porta C, Paglino C, Mosca A. 2014. 'Targeting PI3K/Akt/MTOR Signaling in Cancer'. *Front Oncol*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00064>.
- Poruk KE, Gay DZ, Brown K, Mulvihill JD, Boucher KM, Scaife CL et al. J. Mulvihill. 2013. 'The Clinical Utility of CA 19-9 in Pancreatic Adenocarcinoma: Diagnostic and Prognostic Updates'. *Curr Mol Med*. <https://doi.org/10.2174/156652413805076876>.
- Poulouin L, Gallet O, mhoff JM. 1997. 'La Fibronectine: Proprietes et Fonctions de La Molecule Native et de Ses Fragments'. *Medecine/Sciences*.<http://doi.org/10.4267/10608/433>
- Preca BT, Bajdak K, Mock K, Sundararajan V, Pfannstiel J, Maurer J et al. 2015. 'A Self-

Enforcing CD44s/ZEB1 Feedback Loop Maintains EMT and Stemness Properties in Cancer Cells'. *Int J Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.29642>.

Preis M, Korc M. 2010. 'Kinase Signaling Pathways as Targets for Intervention in Pancreatic Cancer'. *Cancer Biol Ther*. <https://doi.org/10.4161/cbt.9.10.11534>.

Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S. 2006. 'A Twist for Survival and Cancer Progression'. *Br J Cancer*. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602876>.

Puls LN, Eadens M, Messersmith W. 2011. 'Current Status of Src Inhibitors in Solid Tumor Malignancies'. *The Oncologist*. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0408>.

Q

Qi W, Twigg S, Chen X, Polhill TS, Poronnik P, Gilbert RE et al. 2005. 'Integrated Actions of Transforming Growth Factor-B1 and Connective Tissue Growth Factor in Renal Fibrosis'. *Am J Physiol Renal Physiol*. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00179.2004>.

Qian LW, Mizumoto K, Maehara N, Ohuchida K, Inadome N, Saimura M et al. 2003. 'Co-Cultivation of Pancreatic Cancer Cells with Orthotopic Tumor-Derived Fibroblasts: Fibroblasts Stimulate Tumor Cell Invasion via HGF Secretion Whereas Cancer Cells Exert a Minor Regulative Effect on Fibroblasts HGF Production'. *Cancer Lett*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00517-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00517-7).

R

Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. 2010. 'Pancreatic

- Cancer in Chronic Pancreatitis; Aetiology, Incidence, and Early Detection'. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.02.007>.
- Rebours V, Gaujoux S, d'Assignies G, Sauvanet A, Ruszniewski P, Lévy P et al. 2015. 'Obesity and Fatty Pancreatic Infiltration Are Risk Factors for Pancreatic Precancerous Lesions (PanIN)'. *Clin Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2385>.
- Réjiba S, Wack S, Aprahamian M, Hajri A. 2007. 'K-Ras Oncogene Silencing Strategy Reduces Tumor Growth and Enhances Gemcitabine Chemotherapy Efficacy for Pancreatic Cancer Treatment'. *Cancer Sci*. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00506.x>.
- Ren L, Yu Y. 2018. The role of miRNAs in the diagnosis, chemoresistance, and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ther Clin Risk Manag*. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S154226>.
- Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. 2008. 'Body-Mass Index and Incidence of Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Observational Studies'. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60269-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60269-X).
- Riediger H, Keck T, Wellner U, zur Hausen A, Adam U, Hopt UT et al. 2009. 'The Lymph Node Ratio Is the Strongest Prognostic Factor after Resection of Pancreatic Cancer'. *J Gastrointest Surg*. <https://doi.org/10.1007/s11605-009-0919-2>.
- Rosato V, Polesel J, Bosetti C, Serraino D, Negri E, La Vecchia C. 2015. 'Population Attributable Risk for Pancreatic Cancer in Northern Italy'. *Pancreas*. <https://doi.org/10.1097/MPA.000000000000251>.

S

Saad ED, Machado MC, Wajsbrot D, Abramoff R, Hoff PM, Tabacof J et al. 2002.

‘Pretreatment CA 19-9 Level as a Prognostic Factor in Patients with Advanced Pancreatic Cancer Treated with Gemcitabine’. *Int J Gastrointest Cancer*.

Sánchez-Tilló E, Lázaro A, Torrent R, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A et al. 2010. ‘ZEB1

Represses E-Cadherin and Induces an EMT by Recruiting the SWI/SNF Chromatin-Remodeling Protein BRG1’. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.102>.

Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. 2009. ‘Pancreatic Cancer Stem Cells and EMT in Drug

Resistance and Metastasis’. *Minerva Chir*.

Schneider MR, Wolf E. 2009. ‘The Epidermal Growth Factor Receptor Ligands at a Glance’. *J*

Cell Physiol.. <https://doi.org/10.1002/jcp.21635>.

SSchultheis B, Reuter D, Ebert MP, Siveke J, Kerkhoff A, Berdel WE 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*.

<https://doi.org/10.1093/annonc/mdx343>.

Sebastiani V, Ricci F, Rubio-Viqueira B, Kulesza P, Yeo CJ, Hidalgo M et al. 2006.

‘Immunohistochemical and Genetic Evaluation of Deoxycytidine Kinase in Pancreatic Cancer: Relationship to Molecular Mechanisms of Gemcitabine Resistance and Survival’. *Clin Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2655>.

Seidel B, Braeg S, Adler G, Wedlich D, Menke A. 2004. ‘E- and N-Cadherin Differ with Respect

to Their Associated P120 Ctn Isoforms and Their Ability to Suppress Invasive Growth in

- Pancreatic Cancer Cells'. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207718>.
- Serrano-Gomez SJ, Maziveyi M, Alahari SK. 2016. 'Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition through Epigenetic and Post-Translational Modifications'. *Mol Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0502-x>.
- Sethi G, Shanmugam MK, Ramachandran L, Kumar AP, Tergaonkar V. 2012. 'Multifaceted Link between Cancer and Inflammation'. *Biosci Rep*. <https://doi.org/10.1042/BSR20100136>.
- Shao M, Cao L, Shen C, Satpathy M, Chelladurai B, Bigsby RM et al. 2009. 'Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Ovarian Tumor Progression Induced by Tissue Transglutaminase'. *Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1257>.
- Shi C, Daniels JA, Hruban RH. 2008. 'Molecular Characterization of Pancreatic Neoplasms'. *Adv Anat Pathol*. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e31817bf57d>.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2019. 'Cancer Statistics, 2019.' *CA Cancer J Clin*. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>.
- Singh A, Settleman J. 2010. 'EMT, Cancer Stem Cells and Drug Resistance: An Emerging Axis of Evil in the War on Cancer'. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.215>.
- Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N et al. 2009. 'A Gene Expression Signature Associated with "K-Ras Addiction" Reveals Regulators of EMT and Tumor Cell Survival'. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.022>.
- Sinn M, Bahra M, Liersch T, Gellert K, Messmann H, Bechstein W et al. 2017. 'CONKO-005: Adjuvant Chemotherapy with Gemcitabine plus Erlotinib versus Gemcitabine Alone in Patients after R0 Resection of Pancreatic Cancer: A Multicenter Randomized Phase III

- Trial'. *J Clin Oncol*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.6463>.
- Skrypek N, Duchêne B, Hebbar M, Leteurtre E, Van Seuningen I, Jonckheere N. 2013. 'The MUC4 Mucin Mediates Gemcitabine Resistance of Human Pancreatic Cancer Cells via the Concentrative Nucleoside Transporter Family'. *Oncogene*.
<https://doi.org/10.1038/onc.2012.179>.
- Skrypek N, Vasseur R, Vincent A, Duchêne B, Van Seuningen I, Jonckheere N. 2015. 'The Oncogenic Receptor ErbB2 Modulates Gemcitabine and Irinotecan/SN-38 Chemoresistance of Human Pancreatic Cancer Cells via HCNT1 Transporter and Multidrug-Resistance Associated Protein MRP-2'. *Oncotarget* 6 (13): 10853–67.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.3414>.
- Somerville TDD, Xu Y, Miyabayashi K, Tiriach H, Cleary CR, Maia-Silva D et al. 2018. TP63-Mediated enhancer reprogramming drives the Squamous Subtype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cell Rep*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.051>.
- Somiari SB, Somiari RI, Heckman CM, Olsen CH, Jordan RM, Russell SJ et al. 2006. 'Circulating MMP2 and MMP9 in Breast Cancer - Potential Role in Classification of Patients into Low Risk, High Risk, Benign Disease and Breast Cancer Categories'. *Int J Cancer*.
<https://doi.org/10.1002/ijc.21989>.
- Soria JC, Vignat S, Massard C, Mir O. 2013. *Cours de Chimiothérapie Antitumorale et Traitement Médical Du Cancer*.
- Steinberg W. 1990. 'The Clinical Utility of the CA 19-9 Tumor-Associated Antigen'. *Am J Gastroentero*.
- Steinway SN, Zañudo JGT, Michel PJ, Feith DJ, Loughran TP, Albert R. 2015. 'Combinatorial

Interventions Inhibit TGF β -Driven Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Support Hybrid Cellular Phenotypes'. *NPJ Syst Biol Appl*.

<https://doi.org/10.1038/npjbsa.2015.14>.

Sternlicht MD, Werb Z. 2001. 'How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior'. *Annu Rev Cell Dev Biol*. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.463>.

Stolzenberg-Solomon RZ, Adams K, Leitzmann M, Schairer C, Michaud DS, Hollenbeck A et al. 2008. 'Adiposity, Physical Activity, and Pancreatic Cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Cohort'. *Am J Epidemiol*.

<https://doi.org/10.1093/aje/kwm361>.

S Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, Goto M. 2008. 'Precursor Lesions of Pancreatic Cancer'. *Gut Liver*. <https://doi.org/10.1159/000493554>.

Susanto JM, Colvin EK, Pinese M, Chang DK, Pajic M, Mawson A et al. 2015. 'The Epigenetic Agents Suberoylanilide Hydroxamic Acid and 5-AZA-2' Deoxycytidine Decrease Cell Proliferation, Induce Cell Death and Delay the Growth of MiaPaCa2 Pancreatic Cancer Cells in Vivo'. *Int J Oncol*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2894>.

Suyama K, Shapiro I, Guttman M, Hazan RB. 2002. 'A Signaling Pathway Leading to Metastasis Is Controlled by N-Cadherin and the FGF Receptor'. *Cancer Cell*.

[https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00150-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00150-2).

T

Tajima H, Ohta T, Kitagawa H, Okamoto K, Sakai S, Kinoshita J et al. 2012. 'Neoadjuvant Chemotherapy with Gemcitabine for Pancreatic Cancer Increases in Situ Expression of

the Apoptosis Marker M30 and Stem Cell Marker CD44'. *Oncology Lett.*

<https://doi.org/10.3892/ol.2012.657>.

Takaori K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N. 2006. 'Current Topics on Precursors to Pancreatic Cancer.' *Adv Med Sci.*

Tanabe S. 2018. 'Wnt Signaling and Epithelial-Mesenchymal Transition Network in Cancer Wnt Signaling and Mesenchymal Transition Wnt Signaling in Cancer Epithelial-Mesenchymal Transition And'. *Res J Oncol.*

Thiery JP, Sleeman JP. 2006a. 'Complex Networks Orchestrate Epithelial-Mesenchymal Transitions'. *Nat Rev Mol Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/nrm1835>.

Thiery JP, Sleeman JP. 2006b. 'Complex Networks Orchestrate Epithelial-Mesenchymal Transitions.' *Nat Rev Mol Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/nrm1835>.

Tol JA, Gouma DJ, Bassi C, Dervenis C, Montorsi M, Adham M et al. 2014. 'Definition of a Standard Lymphadenectomy in Surgery for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Consensus Statement by the International Study Group on Pancreatic Surgery (ISGPS)'. *Surgery.* <https://doi.org/10.1016/j.surg.2014.06.016>.

Tsukasa K, Ding Q, Yoshimitsu M, Miyazaki Y, Matsubara S, Takao S. 2015. 'Slug Contributes to Gemcitabine Resistance through Epithelial-Mesenchymal Transition in CD133 + Pancreatic Cancer Cells'. *Hum Cell.* <https://doi.org/10.1007/s13577-015-0117-3>.

'Tumours of the Exocrine Pancreas WHO Histological Classification of Tumours of the Exocrine Pancreas'. 2010. *World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System.*

U

Ueda M, Endo I, Nakashima M, Minami Y, Takeda K, Matsuo K et al. 2009. 'Prognostic Factors after Resection of Pancreatic Cancer'. *World J Surg*. <https://doi.org/10.1007/s00268-008-9807-2>.

Umbreit C, Flanjak J, Weiss C, Erben P, Aderhold C, Faber A et al. 2014. 'Incomplete Epithelial-Mesenchymal Transition in P16-Positive Squamous Cell Carcinoma Cells Correlates with β -Catenin Expression'. *Anticancer Res*.

V

Valle S, Martin-Hijano L, Alcalá S, Alonso-Nocelo M, Sainz B Jr. 2018. 'The Ever-Evolving Concept of the Cancer Stem Cell in Pancreatic Cancer'. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers10020033>.

Vasseur R, Skrypek N, Duchêne B, Renaud F, Martínez-Maqueda D, Vincent A et al. 2015. 'The Mucin MUC4 Is a Transcriptional and Post-Transcriptional Target of K-Ras Oncogene in Pancreatic Cancer. Implication of MAPK/AP-1, NF-KB and RalB Signaling Pathways'. *Biochim Biophys Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.10.014>.

Viala E, Pouyssegur J. 2004. 'Regulation of Tumor Cell Motility by ERK Mitogen-Activated Protein Kinases'. *Ann N Y Acad Sci*. <https://doi.org/10.1196/annals.1329.027>.

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. 2011. 'Pancreatic Cancer'. *Lancet* 378 (9791): 607–20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0); [10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0).

Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M et al. 2013. 'Increased Survival in Pancreatic Cancer with Nab-Paclitaxel plus Gemcitabine'. *N Eng J Med*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304369>.

Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A, Halloran PF. 2005. 'Epithelial to Mesenchymal Transition during Late Deterioration of Human Kidney Transplants: The Role of Tubular Cells in Fibrogenesis'. *Am J Transplant*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00843.x>.

W

Walsh N, Kennedy S, Larkin A, Corkery B, O'Driscoll L, Clynes M et al. 2013. 'EGFR and HER2 Inhibition in Pancreatic Cancer'. *Invest New Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9891-x>.

Wang C, Zhang W, Fu M, Yang A, Huang H, Xie J. 2015. 'Establishment of Human Pancreatic Cancer Gemcitabine-Resistant Cell Line with Ribonucleotide Reductase Overexpression'. *Oncol Rep*. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3599>.

Wang JD, Jin K, Chen XY, Lv JQ, Ji KW. 2017. 'Clinicopathological Significance of SMAD4 Loss in Pancreatic Ductal Adenocarcinomas: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14335>.

Wang J, Lee S, Teh CE, Bunting K, Ma L, Shannon MF. 2009. 'The Transcription Repressor, ZEB1, Cooperates with CtBP2 and HDAC1 to Suppress IL-2 Gene Activation in T Cells'. *Int Immunol*. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn143>.

Wang R, Cheng L, Xia J, Wang Z, Wu Q, Wang Z. 2014. 'Gemcitabine Resistance Is Associated

with Epithelial-Mesenchymal Transition and Induction of HIF-1 α ; in Pancreatic Cancer Cells'. *Curr Cancer Drug Targets*.

<https://doi.org/10.2174/1568009614666140226114015>.

Wang S, Huang S, Sun YL. 2017. 'Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer: A Review'. *BioMed Res Int*. <https://doi.org/10.1155/2017/2646148>.

Wang Z, Li Y, Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Azmi AS et al. 2009. 'Acquisition of Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype of Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cancer Cells Is Linked with Activation of the Notch Signaling Pathway'. *Cancer Res*.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4312>.

Wang Z, Li Y, Kong D, Sarkar FH. 2010. 'The Role of Notch Signaling Pathway in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) During Development and Tumor Aggressiveness'. *Curr Drug Targets*. <https://doi.org/10.2174/138945010791170860>.

Wartenberg M, Cibin S, Zlobec I, Vassella E, Eppenberger-Castori S, Terracciano L et al. 2018. 'Integrated Genomic and Immunophenotypic Classification of Pancreatic Cancer Reveals Three Distinct Subtypes with Prognostic/ Predictive Significance'. *Clin Cancer Res*.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3401>.

Waters AM, Der CJ. 2018. 'KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer'. *Cold Spring Harb Perspect Med*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031435>.

Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C. 1997. 'Reversion of the Malignant Phenotype of Human Breast Cells in Three- Dimensional Culture and in Vivo by Integrin Blocking Antibodies'. *J Cell Biol*. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.1.231>.

Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A et al. 2009. 'The EMT-

Activator ZEB1 Promotes Tumorigenicity by Repressing Stemness-Inhibiting MicroRNAs.' *Nat Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/ncb1998>.

Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, Offerhaus GJ, Kang M, Goggins M et al. 1998. 'Inactivation of the P16 (INK4A) Tumor-Suppressor Gene in Pancreatic Duct Lesions: Loss of Intranuclear Expression'. *Cancer Res.*

Wilentz RE1, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ et al. 2000. 'Loss of Expression of Dpc4 in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: Evidence That DPC4 Inactivation Occurs Late in Neoplastic Progression'. *Cancer Res.*

Willmarth NE, Ethier SP. 2006. 'Autocrine and Juxtacrine Effects of Amphiregulin on the Proliferative, Invasive, and Migratory Properties of Normal and Neoplastic Human Mammary Epithelial Cells'. *J Biol Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M606532200>.

Winter, Jordan M., John L. Cameron, Kurtis A. Campbell, Meghan A. Arnold, David C. Chang, JoAnn Coleman, Mary B. Hodgin, et al. 2006. '1423 Pancreaticoduodenectomies for Pancreatic Cancer: A Single-Institution Experience'. *J Gastrointest Surg.* <https://doi.org/10.1016/j.gassur.2006.08.018>.

Wong CC1, Zhang H, Gilkes DM, Chen J, Wei H, Chaturvedi P et al. 2012. 'Inhibitors of Hypoxia-Inducible Factor 1 Block Breast Cancer Metastatic Niche Formation and Lung Metastasis'. *J Mol Med.* <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0855-y>.

Wong D, Ko AH, Hwang J, Venook AP, Bergsland EK, Tempero MA. 2008. 'Serum CA19-9 Decline Compared to Radiographic Response as a Surrogate for Clinical Outcomes in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer Receiving Chemotherapy'. *Pancreas.* <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31816d8185>.

- Wu J, Ivanov AI, Fisher PB, Fu Z. 2016. 'Polo-like Kinase 1 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Promotes Epithelial Cell Motility by Activating CRAF/ERK Signaling'. *ELife*.
<https://doi.org/10.7554/eLife.10734>.
- Wu K, Fan J, Zhang L, Ning Z, Zeng J, Zhou J et al. 2012. 'PI3K/Akt to GSK3 β / β -Catenin Signaling Cascade Coordinates Cell Colonization for Bladder Cancer Bone Metastasis through Regulating ZEB1 Transcription'. *Cell Signal*.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.08.004>.
- Wu W, He X, Yang L, Wang Q, Bian X, Ye Ji. 2018. 'Rising Trends in Pancreatic Cancer Incidence and Mortality in 2000–2014'. *Clin Epidemiol*.
<https://doi.org/10.2147/CLEP.S160018>.
- Wu Y, Ginther C, Kim J, Mosher N, Chung S, Slamon D, Vadgama JV. 2012. 'Expression of Wnt3 Activates Wnt/ β -Catenin Pathway and Promotes EMT-like Phenotype in Trastuzumab Resistant HER2- Overexpressing Breast Cancer Cells'. *Mol Cancer Res*.
<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP. 2009. 'Stabilization of Snail by NF-KB Is Required for Inflammation-Induced Cell Migration and Invasion'. *Cancer Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.016>.
- Wu Y1, Zhang X, Salmon M, Lin X, Zehner ZE. 2007. 'TGF β 1 Regulation of Vimentin Gene Expression during Differentiation of the C2C12 Skeletal Myogenic Cell Line Requires Smads, AP-1 and Sp1 Family Members'. *Biochimica et Biophysica Acta*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.017>.
- Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER et al. 2004. 'A Paracrine Loop

between Tumor Cells and Macrophages Is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors'. *Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1449>.

X

Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL. 2004. 'Activation of the Erk Pathway Is Required for TGF-B1-Induced EMT in Vitro'. *Neoplasia*. <https://doi.org/10.1593/neo.04241>.

Xu J, Lamouille S, Derynck R. 2009. 'TGF-B-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition'. *Cell Res.* <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>.

Xu J, Wang T, Cao Z, Huang H, Li J, Liu W et al. 2014. 'MiR-497 Downregulation Contributes to the Malignancy of Pancreatic Cancer and Associates with a Poor Prognosis'. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2184>.

Xue C, Wyckoff J, Liang F, Sidani M, Violini S, Tsai KL et al. 2006. 'Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression Results in Increased Tumor Cell Motility in Vivo Coordinately with Enhanced Intravasation and Metastasis'. *Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1242>.

Y

Yadav D, Whitcomb DC. 2010. 'The Role of Alcohol and Smoking in Pancreatitis'. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.6>.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C et al. 2004. 'Twist, a

- Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis'. *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>.
- Yang Z, Rayala S, Nguyen D, Vadlamudi RK, Chen S, Kumar R. 2005. 'Pak1 Phosphorylation of Snail, a Master Regulator of Epithelial-to- Mesenchyme Transition, Modulates Snail's Subcellular Localization and Functions'. *Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3480>.
- Yao D, Dai C, Peng S. 2011. 'Mechanism of the Mesenchymal-Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation'. *Mol Cancer Res*.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0568>.
- Yao ES, Zhang H, Chen YY, Lee B, Chew K, Moore D et al. 2007. 'Increased β 1 Integrin Is Associated with Decreased Survival in Invasive Breast Cancer'. *Cancer Res*.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2768>.
- Ychou 1, Conroy T, Seitz JF, Gourgou S, Hua A, Mery-Mignard D et al. 2003. 'An Open Phase I Study Assessing the Feasibility of the Triple Combination: Oxaliplatin plus Irinotecan plus Leucovorin/5-Fluorouracil Every 2 Weeks in Patients with Advanced Solid Tumors'. *Ann Oncol*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdg119>.
- Yilmaz M, Christofori G. 2009. 'EMT, the Cytoskeleton, and Cancer Cell Invasion'. *Cancer Metastasis Rev*. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9169-0>.
- Yin T, Wang C, Liu T, Zhao G, Zha Y, Yang M. 2007. 'Expression of Snail in Pancreatic Cancer Promotes Metastasis and Chemoresistance'. *J Surg Res*.
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.09.027>.
- Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT et al. 2013. 'Circulating Breast Tumor

Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition'. *Science*.

<https://doi.org/10.1126/science.1228522>.

Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ. 1977. 'Human Pancreatic Carcinoma (Mia Paca-2) in

Continuous Culture: Sensitivity to Asparaginase'. *Int J Cancer*.

<https://doi.org/10.1002/ijc.2910190118>.

Z

Zhang P, Sun Y, Ma L. 2015. 'ZEB1: At the Crossroads of Epithelial-Mesenchymal Transition,

Metastasis and Therapy Resistance'. *Cell Cycle*.

<https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1006048>.

Zhang X, Ren D, Wu X, Lin X, Ye L, Lin C et al. 2018. miR-1266 Contributes to Pancreatic

Cancer Progression and Chemoresistance by the STAT3 and NF- κ B Signaling Pathways.

Mol Ther Nucleic Acids. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.01.004>.

Zhang Q, Helfand BT, Jang TL, Zhu LJ, Chen L, Yang XJ et al. 2009. 'Nuclear Factor- κ B-

Mediated Transforming Growth Factor- β -Induced Expression of Vimentin Is an

Independent Predictor of Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy'. *Clin*

Cancer Res. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1656>.

Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H et al. 2015. 'Epithelial-to-

Mesenchymal Transition Is Dispensable for Metastasis but Induces Chemoresistance in

Pancreatic Cancer'. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature16064>.

Zhou W, Lv R, Qi W, Wu D, Xu Y, Liu W et al. 2014. 'Snail Contributes to the Maintenance of

Stem Cell-like Phenotype Cells in Human Pancreatic Cancer'. *PLoS ONE*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087409>.

Zhu QS, Rosenblatt K, Huang KL, Lahat G, Brobey R, Bolshakov S et al. 2011. 'Vimentin Is a Novel AKT1 Target Mediating Motility and Invasion'. *Oncogene*.

<https://doi.org/10.1038/onc.2010.421>.

Zlobec I, Molinari F, Martin V, Mazzucchelli L, Saletti P, Trezzi R et al. 2010. 'Tumor Budding Predicts Response to Anti-EGFR Therapies in Metastatic Colorectal Cancer Patients'.

World J Gastroenterol. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i38.4823>.