



Implications oncogéniques des protéines SMAD2 & SMAD3 dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique SMAD4-négatif

Adrien Bertrand

► To cite this version:

Adrien Bertrand. Implications oncogéniques des protéines SMAD2 & SMAD3 dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique SMAD4-négatif. Cancer. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1299 . tel-03735480

HAL Id: tel-03735480

<https://theses.hal.science/tel-03735480>

Submitted on 21 Jul 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.



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1299

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
(Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)

Spécialité de doctorat : Biologie, Médecine et Santé

Discipline : Cancérologie

Soutenue publiquement le 16/12/2021, par :

Adrien Bertrand

Implications oncogéniques des protéines SMAD2 & SMAD3 dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique SMAD4-négatif

Devant le jury composé de :

Dr. GAUTHIER-ROUVIERE Cécile
Dr. GUILLERMET-GUIBERT Julie
Pr. MOYRET-LALLE Caroline
Dr. TOMASINI Richard
Dr. VERRECCHIA Franck

DR2, INSERM
CR1, INSERM
PU, Université Lyon 1
DR2, INSERM
DR1, INSERM

Rapporteure
Rapporteure
Examinatrice
Examineur
Examineur

Pr. BLAY Jean-Yves
Dr. SENTIS Stéphanie

PU-PH, Centre Léon Bérard
MCU, Université Lyon 1

Directeur de thèse
Co-directrice de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	Mme Céline BROCHIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directeur : M. Claude DUSSART

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Directeur : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

REMERCIEMENTS

Les travaux de recherche effectués au cours de ma thèse ont été réalisés au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL, INSERM U1052 – CNRS UMR5286). Je tiens tout d’abord à remercier le **Pr Alain PUISIEUX** ainsi que le **Dr Patrick MEHLEN**, pour m’avoir accueilli au sein de l’unité au cours de mes stages de master et durant ces trois années de thèse.

Je souhaite remercier les rapporteurs de ma thèse, le **Dr Cécile GAUTHIER-ROUVIERE** et le **Dr Julie GUILLERMET-GUIBERT**, pour leurs commentaires et leurs conseils sur la rédaction de ce manuscrit. Je remercie également les autres membres de mon jury, le **Pr Caroline MOYRET-LALLE**, le **Dr Richard TOMASINI** et le **Dr Franck VERRECCHIA**, pour avoir accepté d’examiner mes travaux de thèse.

Je remercie le **Dr Julie CAMEL** et le **Dr Alain MAUVIEL**, tous deux membres de mon comité de suivi de thèse, pour leur aide et leurs précieux conseils tout au long de ces trois années de thèse.

Je tiens également à remercier l’ensemble des **enseignants-chercheurs** rencontrés tout au long de mon parcours universitaire, en particulier ceux du **Master Cancer** de l’Université Lyon 1, qui m’ont donné le goût pour la recherche et la force nécessaire à la réalisation de cette thèse.

Je remercie l’école doctorale **BMIC** d’avoir mis tout en œuvre pour m’assurer une formation scientifique et transversale de qualité.

Merci à la **Ligue Nationale Contre le Cancer**, et particulièrement, **aux membres des comités de l’Ain et de l’Ardèche**, pour leurs précieuses aides financières tout au long de mes projets de master et de thèse. Sans votre implication et votre détermination, nos travaux n’auraient certainement pas pu se concrétiser. Merci encore pour les moments de partage lors de vos nombreux événements caritatifs.

Je voudrais ensuite remercier le **Dr Laurent BARTHOLIN** et le **Dr Stéphanie SENTIS** pour m’avoir accueilli dans le laboratoire dès le master. Je vous remercie sincèrement d’avoir pris le temps de préparer « le petit jeune » au concours BMIC, de m’avoir donné la possibilité de réaliser mes travaux de thèse sans manquer de rien, et de m’avoir endurci pour affronter la dure réalité du monde de la recherche. Laurent, j’espère que tu pourras t’épanouir dans ton nouveau challenge professionnel. Stéphanie, je retiendrai ta disponibilité pour le design des expériences (sans oublier les bons contrôles), la relecture et la correction des nombreux manuscrits, ainsi que ton écoute, aussi bien au niveau scientifique que personnel.

Je tiens à remercier le **Pr Jean-Yves Blay** ainsi que le **Dr Marie Castets** pour leur accueil au sein de leur équipe pour la fin de ma thèse.

Jean-Yves, merci pour votre accueil dans l'équipe, vos conseils et votre disponibilité malgré un emploi du temps extrêmement chargé. Marie, je te remercie grandement pour ton implication dans mon papier et pour tous tes conseils. Je suis très heureux d'avoir rejoint ton équipe. Merci de m'avoir redonné le goût de la recherche publique et de la curiosité scientifique. Je te dois beaucoup ! Nous aurons encore l'occasion de travailler ensemble pendant quelque temps sur d'autres projets (pour le plus grand plaisir des cultivateurs de cafés...) J'ai déjà hâte !

Je souhaite ensuite remercier **Sylvie MARTEL**, notre « super-technicienne » qui, comme pour beaucoup, m'a tout appris. Merci beaucoup pour ta bienveillance, ta disponibilité et ton soutien sans faille durant ces cinq années au labo. Et promis, je ne t'embête plus sur ton « grand âge » (je me fais vieux maintenant !..). Je remercie **Sophie AIRES**, qui a rejoint mon projet au cours de ma thèse. Un grand merci pour ton savoir-faire, ta gentillesse et ta douceur... sans oublier ta détermination à faire fonctionner les qPCR ! Merci également pour ces bons moments partagés chez toi avec Fabien et Nathan. **A toutes les deux**, un énorme merci pour votre soutien au cours de cette thèse et surtout durant ces huit longs mois de turbulences ! Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous deux et j'espère pouvoir reformer ce trio de travail rapidement. En attendant, je vous souhaite bon courage pour vos futurs projets dans vos nouvelles équipes.

Je remercie bien sûr **Elodie ROGER** et **Alexandra LAINE**, avec qui nous avons formé le trio infernal du Cheney A5 ! Que de bons moments partagés ensemble au labo, mais surtout en dehors autour d'un bon repas et de quelques bonnes bouteilles... Sans oublier nos nombreux fous rires (cristaux de menthe, Radio Labo'...). Merci beaucoup pour vos nombreux conseils, votre bienveillance, et tout simplement votre présence. Un trio complété par **Bastien KANIEWSKI** (MacKaniewski pour les intimes), un ancien de l'équipe Bartholin que j'ai eu plaisir de retrouver en fin de thèse dans l'équipe de Marie. Merci pour ta rigueur, ta disponibilité et surtout pour ton sens du système D ! Quelle chance de vous compter tous les trois dans mon entourage.

Je remercie également les anciens Bartholin - Roxane, Nicolas, Cassandre, Véronique, Victoire, Aurélie, Clélia, Arnaud, Alexandre, Agathe, Valentin, Philippe et Ulrich – votre aide, votre écoute et votre enthousiasme.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe Castets/Blay, ma seconde équipe d'accueil, et tout particulièrement **Marie CASTETS**, **Martine CORDIER-BUSSAT**, **Aurélie DUTOUR** et **Laura BROUTIER**, les quatre cheffes #FP. A toutes les quatre, je vous adresse mes remerciements les plus

sincères pour votre gentillesse, votre complémentarité et votre dévouement pour faire fonctionner cette grande équipe ! C'est un réel plaisir de travailler avec vous.

Et comment oublier les autres membres de la C3Team – **Virginie BARBET, Paul BERCHARD, Joseph BISACCIA, Alexandra BOMANE, Claire COQUET, Anne-Lise DECHAUME, Thomas DIOT, Iveta FAJNAROVA, Cindy GALLERNE, Quentin HECQUET, Paul HUCHEDE, Léa LUCIANA, Swann MEYER, Nina MEYNARD, Solène POSTY, Clara SAVARY, Arthur TOURBEZ**, et tous les anciens stagiaires/étudiants... A tous, un énorme MERCI pour votre gentillesse, votre accueil et votre précieuse aide pour la finalisation du papier. J'ai la chance d'avoir rencontré des amis, avec qui j'ai déjà partagé de très bons moments au labo, mais surtout en dehors (#Bandal #JoséphineBaker ...). A très vite !

Je remercie également les membres des équipes MARIE, DANTE, MULLIGAN, ABLAIN, LAVIAL et ICHIM, avec qui nous avons partagé le 5^{ème} étage du Cheney A. A tous, un grand merci pour nos discussions (scientifiques ou pas), votre accompagnement et vos conseils.

Je souhaite remercier l'ensemble du personnel des plateformes du CRCL et du Centre Léon Bérard, et en particulier Christophe VANBELLE et Priscillia BATTISTON-MONTAGNE pour vos conseils en microscopie/cytométrie.

Je remercie également les équipes supports du CRCL, Cécile, Julie, Cathy, Blandine, Yohann, Pierre, Cidem, Bérangère, Sophie, Hervé, Joseph... Un grand merci pour votre gentillesse, votre écoute et votre disponibilité pour surmonter les lourdeurs administratives !

Je te remercie **Yannick** pour m'avoir soutenu (et surtout supporté) durant ces années de thèse. Merci pour ta patience, ta disponibilité, ton aide, et surtout ton amour. Ton calme et ta capacité à relativiser m'ont permis d'affronter les moments parfois difficiles d'une vie de thésard. Merci d'être là.

Et enfin, je remercie **mes amis et ma famille**, qui m'ont toujours soutenu et encouragé durant ces longues années d'études. Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents pour votre soutien, votre écoute, votre patience et votre confiance. Je suis extrêmement reconnaissant de tout ce que vous m'avez apporté. J'espère que ce manuscrit vous apportera quelques éclaircissements sur mon quotidien qui vous paraît parfois « mystérieux ».

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
TABLE DES FIGURES.....	8
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
<i>Avant-propos.....</i>	10
I- Le pancréas : aspects physiologiques et pathologiques.....	10
a. Anatomie et physiologie pancréatique.....	10
i. Morphogenèse et anatomie générale du pancréas.....	10
ii. Physiologie du pancréas endocrine.....	12
iii. Physiologie du pancréas exocrine.....	14
b. Pathologies pancréatiques.....	17
i. Diabète et inflammations.....	17
ii. Cancers pancréatiques.....	19
c. L'adénocarcinome canalaire pancréatique (ADKP).....	20
i. Épidémiologie.....	21
ii. Diagnostic.....	24
iii. Prise en charge thérapeutique.....	26
1. Chirurgie.....	26
2. Chimiothérapies.....	27
3. Radiothérapie.....	28
4. Autres thérapies et essais cliniques.....	28
iv. Étiologie de l'ADKP.....	31
1. Lésions pré-néoplasiques.....	31
2. Bases moléculaires des ADKP.....	35
2.1/Altérations génétiques.....	35
2.2/Modulation de la signalisation cellulaire.....	38

II-	TGF-β : signalisation et rôles physiologiques.....	40
a.	Synthèse, sécrétion & biodisponibilité.....	42
b.	Activation du TGF-β	45
c.	Signalisation intracellulaire du TGF-β.....	45
i.	Les récepteurs au TGF- β	45
ii.	La voie canonique du TGF- β	48
1.	<i>Les SMAD, effecteurs centraux de la voie canonique</i>	48
2.	<i>Régulation de la voie canonique</i>	52
iii.	Les voies non-canoniques du TGF- β	53
1.	<i>Voie ERK/MAPK</i>	55
2.	<i>Voie PI3K-AKT</i>	55
3.	<i>Voie des Rho-GTPases</i>	56
4.	<i>Régulation et interactions des voies non canoniques</i>	56
d.	Les rôles physiologiques du TGF-β.....	57
i.	TGF- β et développement.....	57
ii.	Implication du TGF- β dans l'homéostasie tissulaire.....	58
iii.	Régulations de l'activité du système immunitaire.....	59
iv.	Impact du TGF- β au cours de la cicatrisation.....	60
III-	Dualité fonctionnelle du TGF-β dans l'ADKP	62
a.	Mutations de la voie du TGF-β dans les ADKP.....	62
b.	La perte de SMAD4 : cause centrale du « switch » oncogénique.....	63
c.	Mécanismes d'action oncogéniques du TGF-β dans les ADKP.....	65
i.	Au niveau de la cellule tumorale.....	65
1.	<i>Migration et invasion : de l'EMT au « homing » métastatique</i>	65
2.	<i>Survie cellulaire médiée par le TGF-β</i>	69
ii.	Au niveau du stroma/micro-environnement.....	69
1.	<i>Fibrose péri-tumorale, dissémination et résistance thérapeutique</i>	70
2.	<i>Angiogenèse, croissance tumorale et dissémination métastatique</i>	72
3.	<i>Immunosuppression</i>	72

OBJECTIF GENERAL DU PROJET DE THESE.....	75
RESULTATS.....	76
Introduction et approches expérimentales.....	77
Résumé des résultats obtenus.....	78
Publication originale.....	79
Article : “ <i>SMAD2/3 mediate oncogenic effects of TGF-β in the absence of SMAD4</i> ”	
DISCUSSION & PERSPECTIVES.....	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	134
ANNEXES.....	165
Article : “ <i>Schwann cells support oncogenic potential of pancreatic cancer cells through TGFβ signaling</i> ” Roger et al., Cell Death & Disease, 2019.....	166
Encadrements, Présentations, Séminaires et Formations transversales.....	187

ABBREVIATIONS

ADKP	ADénocarcinome CAnalaire Pancréatique
ALK5	Activin receptor-Like Kinase 5
α -SMA	alpha Smooth Muscle Actin
AMH	Anti-Mullerian Hormone
ANGPTL4	Angiopoietin-like 4
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BAMBI	BMP and Activin
BCL2	B-Cell Lymphoma 2
β IG-H3	Beta Ig-H3
BD-IPMN	Branch Duct – Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms
BIM	Bcl2-Interacting Mediator of cell death
BMF	Bcl2-Modifying Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein Membrane Bound Inhibitor
BRAF	B-RAF (v-RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) murine sarcoma viral oncogene homolog B) proto-oncogene, serine/threonine kinase.
BRCA2	BReast CAncer 2
CA19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
CAF	Cancer Associated Fibroblast
CDC42	Cell Division Cycle 42
CDKN2A/2B	Cyclin Dependent Kinase INhibitor 2A/2B
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
Co-SMAD	Common SMAD
COL(6A1)	Collagène (type 6 alpha chain 1)
CPA1	CarboxyPeptidase A1
DPC4	Deleted in Pancreatic Cancer 4
E-CADHERIN	Epithelial Cadherin
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
ERK1/2	Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2
FBG	Fibrinogen-like domain
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptors
FOLFIRINOX	(acide) FOLinique 5-Fluoro-uracile IRINotecan Oxaliplatine
GADD34	Groth Arrest and DNA Damage-inducible protein
GARP	Glycoprotein A Repetitions Predominant
GDF	Growth and Differentiation Factor

GDP	Guanosine DiPhosphate
GNAS	Guanine Nucleotide binding protein (G protein), Alpha Stimulating activity polypeptide 1
GRB2	Growth factor Receptor Bound protein 2
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
GTP	Guanosine TriPhosphate
GTPase	Guanosine TriPhosphatase
HMGA2	High Mobility Group A2
IARC	International Agency for Research on Cancer
ID	Inhibitor of DNA binding
IFN γ	Interferon gamma
IKK α	I-Kappa-B-Kinase alpha
IL	InterLeukine
INK4A	INhibitor of CDK4 A
IPMN	Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms
I-SMAD	Inhibitory SMAD
JAK/STAT	JANus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KRAS	Kirsten RAt Sarcoma
LAP	Latency-Associated Peptide
LCN2	Lipocalin 2
LLC	Large Latent Complex
LOH	Loss Of Heterozygosity
LTBP	Latent TGF-beta Binding Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	Mapk-Erk-Kinase
MCN	Mucinous Cystic Neoplasms
MCP1	Monocytic Chemotactic Protein 1
MD-IPMN	Main Duct – Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cells
MH1/2	Mad Homology 1/2
MLL3/4	Mixed-Lineage Leukemia $\frac{3}{4}$
MMP	Matrix MetalloProteinase
MSC	Mesenchymal Stem Cell
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NEDD4	Neural precursor cell-expressed Developmentally Down-regulated 4
NES	Nuclear Export Signal

NFκB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer
NLS	Nuclear Localization Signal
NRP1	Neuropilin 1
PALB2	PARTner and Localizer of BRCA2
PARP	Poly ADP Ribose Polymerase 1
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PD1/PD-L1	Programmed cell Death 1 / Programmed cell Death Ligand 1
PDX1	Pancreatic and Duodenal homeobox 1
PEGPH20	PEGylated recombinant human hyaluronidase (rHuPH20)
PI3K/AKT	PhosphoInositide 3-Kinase / AKT Serine/Threonine Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PP	Polypeptide Pancréatique
PP1	Phosphatase Protein 1
PPM1A	Protein Phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent 1A
PRSS1	Sérine Protéase 1
PSC	Pancreatic Stellate Cell
PTF1A	Pancreatic associated Transcription Factor 1A
R-SMAD	Receptor SMAD
RAC1	RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1
RECK	REversion inducing Cystein rich protein with Kazals motifs
RHOA	Ras Homolog gene family, member A
ROCK	Rho associated coiled-coil-containing protein kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
RR	Risque Relatif
RUNX3	Runt related transcription factor 3
SARA	SMAD Anchor for Receptor Activation
SBE	SMAD Binding Element
SHC	Src Homology 2 domain-Containing transforming protein
SHIP	SH2-domain-containing Inositol 5-Phosphatase
SLC	Small Latent Complex
SMAD1/2/3/4/5/6/7/8/9	Sma (Small body size) Mothers Against Decapentaplegic homolog 1/2/3/4/5/6/7/8/9
SMURF1/2	SMAD Ubiquitination Regulatory Factor ½
SPINK1	Serine Peptidase INhibitor Kazal type 1
TAK1	TGF-β Activated Kinase 1
TAM	Tumor Associated Macrophage

TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TGF β R1/2	Transforming Growth Factor Beta Receptor 1/2
TIE	TGF- β Inhibitory Element
TIEG	TGF- β Inducible Early-response Gene
TIF1 γ	Transcription Intermediate Factor 1 gamma
TIMP	Tissue Inhibitors of MetalloProteinases
TIPMP	Tumeurs Intracanalaires Papillaires et Mucineuses du Pancréas
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TNX	Tenascin-X
TP53	Tumor Protein 53
TRAF4/6	Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 4/6
TSP-1/2	Thrombospondin 1/2
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WWP1	WW domain-containing Protein 1
YAP/TAZ	Yes-Associated Protein / Tafazzin

TABLE DES FIGURES

Figure 1 – Localisation et anatomie générale du pancréas

Figure 2 – Fonctions endocrines du pancréas

Figure 3 – Fonctions exocrines du pancréas

Figure 4 – Épidémiologie des cancers pancréatiques

Figure 5 – Facteurs de risque associés aux adénocarcinomes canaux pancréatiques

Figure 6 – Prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un adénocarcinome canalaire pancréatique

Figure 7 – Vers de nouvelles thérapies ciblées

Figure 8 – Histologie des lésions pré-néoplasiques et des adénocarcinomes canaux pancréatiques

Figure 9 – Mutations récurrentes au cours du développement des adénocarcinomes canaux pancréatiques

Figure 10 – Synthèse et activation du TGF- β

Figure 11 – Fixation du TGF- β avec ses récepteurs membranaires

Figure 12 – Les protéines SMAD impliquées dans la voie canonique du TGF- β

Figure 13 – La voie canonique du TGF- β

Figure 14 – Les voies non-canoniques du TGF- β

Figure 15 – Le switch oncogénique du TGF- β au cours de la carcinogenèse pancréatique

Figure 16 – TGF- β , migration, invasion et survie cellulaire

Figure 17 – TGF- β , stroma et microenvironnement tumoral

Figure 18 – Objectif principal du projet de thèse

Figure 19 – Schéma récapitulatif des résultats obtenus

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Avant-propos

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (ADKP) reste à ce jour une impasse thérapeutique majeure, avec un taux de survie à 5 ans d'environ 10%. Ce mauvais pronostic est le résultat d'un diagnostic souvent tardif, d'un potentiel métastatique élevé et de l'échec des thérapies conventionnelles. L'étude des mécanismes d'initiation, de transformation et de progression tumorale du pancréas exocrine constitue donc un enjeu majeur pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Mon projet de thèse s'est inscrit dans cette perspective.

Afin de situer le contexte de mon doctorat, cette introduction sera subdivisée en 3 parties, en débutant par i) une description de la physiologie et des pathologies du pancréas, puis en décrivant ii) la voie de signalisation du TGF- β et ses rôles physiologiques, et enfin iii) la dualité fonctionnelle du TGF- β dans les adénocarcinomes pancréatiques.

I- Le pancréas : aspects physiologiques et pathologiques

a. Anatomie et physiologie pancréatique (ADKP)

i. Morphogenèse et anatomie générale du pancréas

Chez l'Homme, le pancréas trouve son origine dans l'endoderme de l'intestin antérieur, par la formation d'un bourgeon dorsal et d'un bourgeon ventral à partir de la 4^{ème} semaine de développement embryonnaire. Les ébauches pancréatiques se développent et fusionnent au cours de la 7^{ème} semaine de développement embryonnaire pour former le pancréas définitif. Les îlots de Langerhans se développent à partir de la 10^{ème} semaine et deviennent fonctionnels à partir du 5^{ème} mois de développement embryonnaire (Encha-Razavi and Escudier, 2010; Pandol, 2010a).

Le pancréas est un organe profond situé dans la cavité abdominale qui appartient au système gastro-intestinal. Il est situé en arrière de l'estomac, en avant du rachis lombaire (L1-L2), entre le duodénum et la rate, et possède une forte proximité avec l'aorte abdominale et la veine cave.

Le pancréas est irrigué par les artères pancréatico-duodénales, les branches de l'artère splénique et de l'artère mésentérique supérieure. Le retour sanguin se réalise par les veines pancréatiques et pancréatico-duodénales, qui convergent vers les veines spléniques et la veine porte. Le drainage lymphatique est

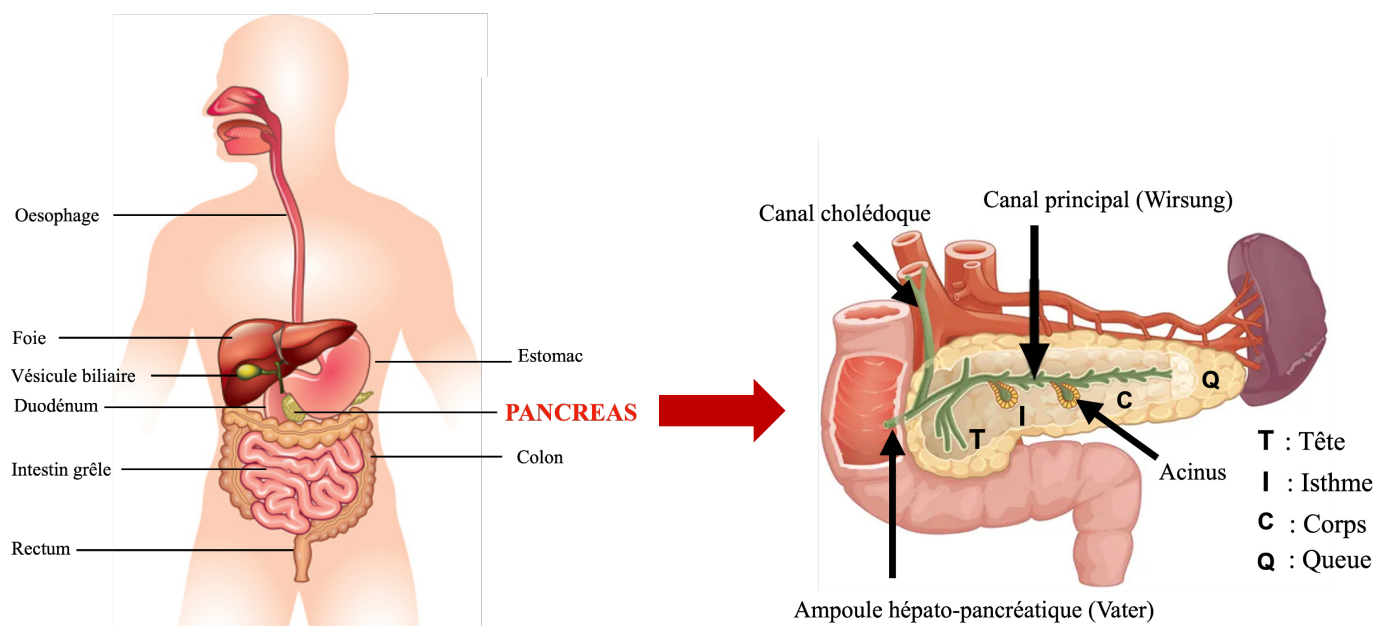


Figure 1 – Localisation et anatomie générale du pancréas

réalisé principalement par la chaîne hépatique commune et le groupe ganglionnaire mésentérique supérieur. L'innervation parasympathique du pancréas vient du nerf vague, alors que l'innervation sympathique est assurée par les nerfs splanchniques.

Le pancréas est subdivisé en quatre parties anatomiques : la tête, bordée par le duodénum, l'isthme, le corps et la queue, à proximité de la rate. Le pancréas est une glande amphicrine composée de tissus spécifiques, permettant la distinction de deux compartiments fonctionnels : la partie endocrine, impliquée dans la synthèse et la sécrétion d'hormones, et la partie exocrine, impliquée dans la synthèse et la sécrétion d'enzymes digestives.

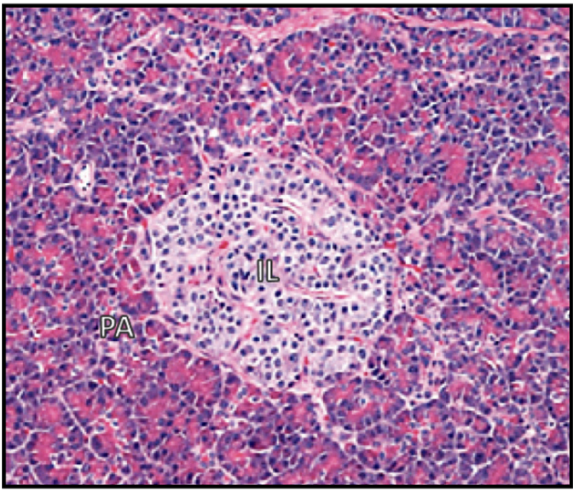
En interne, le pancréas est composé de multiples canaux débouchant dans le canal pancréatique principal (ou canal de Wirsung), traversant l'intégralité du pancréas avant de se jeter, accompagné du canal biliaire, dans le duodénum au niveau de l'ampoule hépato-pancréatique.

ii./ Physiologie du pancréas endocrine

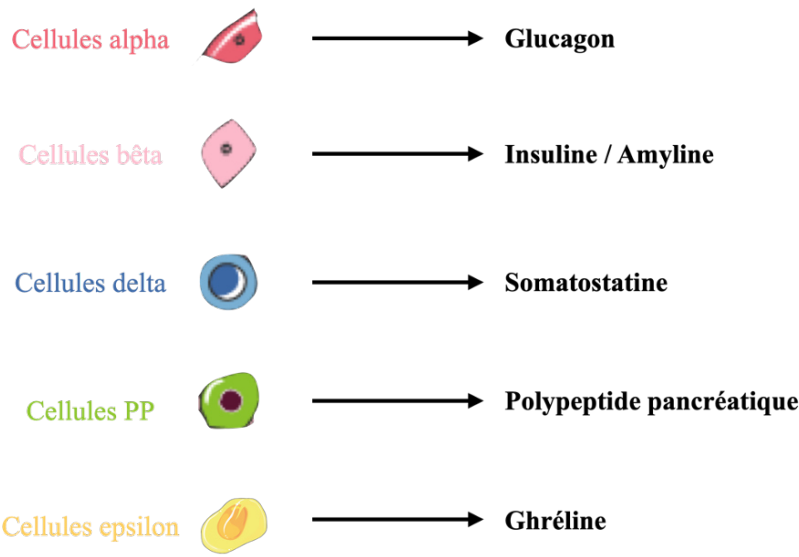
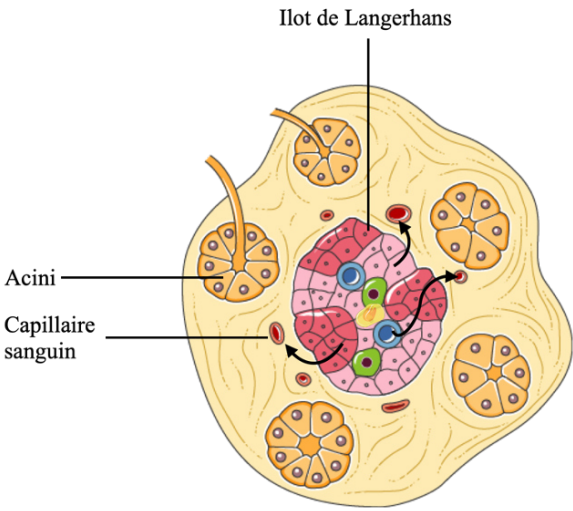
Le compartiment endocrine représente moins de 10% du volume pancréatique. Il est spécialisé dans la sécrétion d'hormones et de polypeptides dans la circulation sanguine, et participe de fait au contrôle de l'homéostasie glucidique et du comportement alimentaire. Le pancréas endocrine est organisé en structures, appelées îlots pancréatiques (ou îlots de Langerhans), bordées par le compartiment exocrine (ou parenchyme acinaire). Les îlots pancréatiques sont composés en majeure partie par les cellules alpha et bêta, sécrétant respectivement le glucagon et l'insuline, les cellules delta et gamma (ou PP), synthétisant la somatostatine et le polypeptide pancréatique (PP), et dans une moindre mesure, par les cellules epsilon à l'origine de la synthèse de la ghréline (Da Silva Xavier, 2018; Sakata et al., 2019). Pour drainer l'ensemble de ces sécrétions hormonales dans l'intégralité de l'organisme, les îlots pancréatiques sont irrigués par de nombreux capillaires.

Le pancréas assure le maintien de la glycémie entre 4 et 7 mM, via la synthèse de deux hormones au rôle antagoniste, le glucagon par les cellules alpha et l'insuline par les cellules bêta (Röder et al., 2016). En effet, l'insuline, sécrétée en réponse à une glycémie élevée, aura pour fonction de faire diminuer la concentration en glucose sanguin. On parle d'hormone hypoglycémiante. L'insuline agit sur différentes voies métaboliques au niveau de trois tissus principaux, à savoir, le foie, le muscle et le tissu adipeux. L'insuline favorise notamment la dégradation hépatique du glucose (glycolyse), la synthèse et le stockage du glycogène par la glycogénèse, et inhibe la néoglucogénèse qui permet la synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques (Röder et al., 2016). L'insuline permet également l'entrée et la métabolisation du glucose dans les cellules des tissus musculaires et adipeux, contribuant ainsi aux synthèses protéiques et lipidiques (Khan and Pessin, 2002). Le glucagon, hormone hyperglycémiante,

Histologie d'un îlot de Langerhans
d'un pancréas humain



IL Îlot de Langerhans
PA Parenchyme Acinaire



MÉTABOLISME
COMPORTEMENT ALIMENTAIRE

Les cellules des îlots de Langerhans : sécrétions et fonctions principales

Figure 2 – Fonctions endocrines du pancréas
Coupe histologique issue de Hezel et al., Genes & Development ; 2006

est quant à lui sécrété par les cellules alpha lorsque la glycémie est faible, notamment lors d'exercice physique ou entre les repas. Le glucagon agit principalement au niveau hépatique en favorisant la glycogénolyse, c'est-à-dire la dégradation rapide du glycogène, polymère du glucose (Röder et al., 2016).

La somatostatine, sécrétée par l'hypothalamus, l'estomac et l'intestin, est également sécrétée par les cellules delta des îlots de Langerhans. Au niveau pancréatique, cette hormone agit de façon paracrine en inhibant la synthèse d'insuline et de glucagon, mais également de façon autocrine en régulant sa propre sécrétion (Rorsman and Huising, 2018). En inhibant la sécrétion du glucagon et de l'insuline par les cellules alpha et beta respectivement, la somatostatine est un acteur clé de la régulation de l'homéostasie glucidique. La somatostatine est impliquée dans de nombreux processus d'inhibition de la sécrétion endocrine et exocrine, mais possède également des rôles de neuro-modulateur dans les fonctions cognitives et locomotrices (Ando, 2016).

Le compartiment endocrine du pancréas est également à l'origine d'hormones impliquées dans le contrôle du comportement alimentaire. En effet, la ghréline, sécrétée majoritairement par l'estomac, est également produite par les cellules epsilon du pancréas. Son action principale est de stimuler l'appétit via la régulation hypothalamique de l'homéostasie nutritionnelle (Nakazato et al., 2001). La ghréline est également impliquée dans la régulation de l'homéostasie glucidique, en inhibant la sécrétion d'insuline par les cellules bêta des îlots pancréatiques (Sakata et al., 2019). Une autre hormone est impliquée dans le comportement alimentaire, il s'agit de l'amyline. Co-sécrétée avec l'insuline par les cellules bêta des îlots pancréatiques, l'amyline participe au sentiment de satiété en agissant au niveau hypothalamique (Rushing et al., 2000; Woods et al., 2006). Elle contribue également au contrôle glycémique postprandial en ralentissant la vidange gastrique et en inhibant la sécrétion de glucagon (Lutz, 2010). Le polypeptide pancréatique, sécrété par les cellules PP (ou gamma) du pancréas, joue également un rôle majeur dans le sentiment de satiété mais aussi dans le rétrocontrôle négatif des sécrétions exocrines gastriques, et de l'activité endocrine pancréatique, en bloquant la synthèse du glucagon par les cellules alpha des îlots de Langerhans (Aragón et al., 2015; Asakawa et al., 2003; Batterham et al., 2003).

iii./ Physiologie du pancréas exocrine

Le pancréas exocrine est quant à lui spécialisé dans la synthèse et la sécrétion du suc pancréatique, composé d'enzymes digestives (*e.g.* trypsine, amylase, lipase). Il est majoritairement constitué par les cellules canalaire et les cellules acineuses. Ce compartiment est caractérisé par un ensemble de canaux qui permet la conduction des enzymes, synthétisées et excrétées par les cellules acineuses organisées en acinus, jusqu'au canal principal (ou canal de Wirsung) débouchant dans le duodénum au niveau de

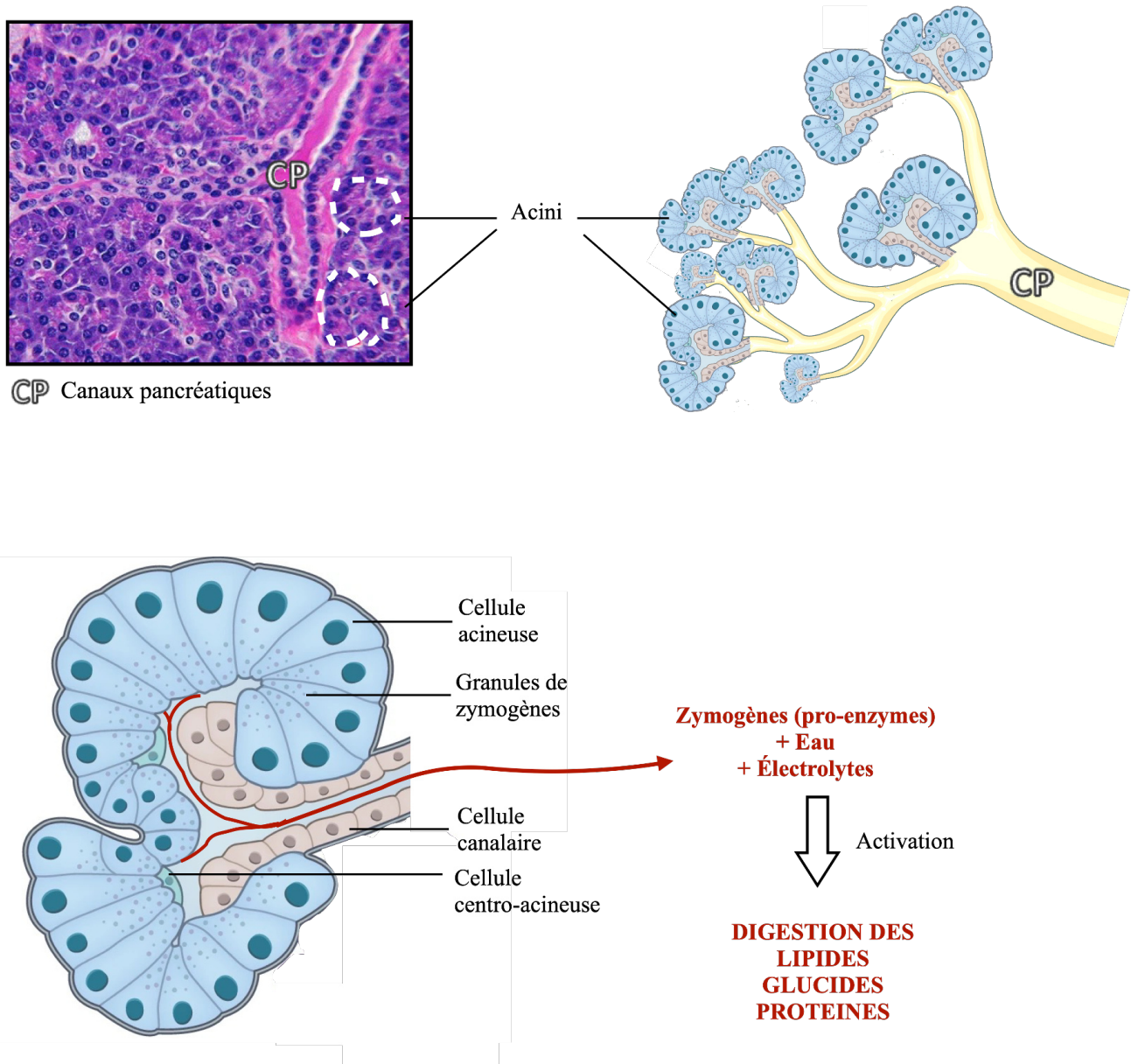


Figure 3 – Fonctions exocrines du pancréas

Adapté de Zhou et Melton, Nature ; 2018 et Bardeesy, Nature Reviews Cancer ; 2002

Coupe histologique issue de Longnecker, Anatomy and Histology of the Pancreas; 2014

l'ampoule hépato-pancréatique (ou ampoule de Vater). Le débit du suc pancréatique s'établit entre 1,5 et 3L par jour. Il est constitué en très grande partie d'eau, d'électrolytes et d'enzyme sécrétées par les cellules acineuses. Les enzymes contenues dans le suc pancréatique sont spécialisées dans la digestion des lipides, glucides et des protéines. On trouve aussi des nucléases permettant la dégradation des résidus nucléotidiques (Whitcomb and Lowe, 2007). Du fait de sa composition riche en bicarbonates, le pH du suc pancréatique est basique (entre 8,2 et 8,4). Cette alcalinité équilibre l'acidité du chyme gastrique et favorise ainsi le fonctionnement optimal des enzymes digestives. Ces enzymes sont la plupart du temps sécrétées sous une forme inactive appelée zymogène (ou pro-enzyme), afin d'éviter l'autodigestion du pancréas, et sont activées une fois parvenues dans le tube digestif (Dufresne, 2012).

Les protéases pancréatiques clivent les protéines en oligopeptides et en acides aminés, absorbés au niveau intestinal. Les lipases et les amylases digèrent les lipides et des sucres complexes, respectivement. Enfin, les nucléases catalysent les oligonucléotides.

Les cellules acineuses s'organisent en acini. Elles présentent un réticulum endoplasmique granuleux imposant permettant la synthèse des pro-enzymes digestives. Après leur synthèse, ces pro-enzymes s'organisent en granules de zymogènes et s'accumulent dans le cytoplasme de la cellule acineuse. La sécrétion des enzymes se fait via l'exocytose des granules de zymogènes dans la lumière des canaux pancréatiques. Pour rappel, les enzymes ne sont fonctionnelles qu'une fois dans le tractus digestif afin d'éviter l'autodigestion du pancréas. De plus, le suc pancréatique contient des inhibiteurs de l'activité enzymatique, tel que SPINK1, inhibant l'activité de la trypsine. Les pro-enzymes sont activées par une entérokinase digestive, qui dégrade la pro-enzyme trypsinogène en trypsine active, qui activera elle-même les autres enzymes pancréatiques. Les cellules canalaire (ou ductales) de forme cubique ou pyramidale, forment les canaux excréteurs mais synthétisent également l'eau et les électrolytes nécessaires à la constitution du suc pancréatique. Au niveau de la lumière acinaire, les cellules centro-acineuses marquent le début des canaux pancréatiques (Dufresne, 2012; Whitcomb and Lowe, 2007). L'organisation en grappe des acini permet de distinguer différents types de canaux. A la sortie d'un acinus, les cellules canalaire forment les canaux intercalaires à la lumière étroite. La fusion des canaux intercalaires permet la constitution des canaux intra-lobulaires qui se jettent dans les canaux interlobulaires. Ces derniers débouchent dans le canal pancréatique principal. Les cellules canalaire sont responsables de la sécrétion des éléments inorganiques du suc pancréatique (eau et ions). Elles possèdent un nombre important d'échangeurs (chlore/bicarbonates), de pompes à proton, de canaux (calcium, chlore, potassium) et d'aquaporines (Pandolfi, 2010b). L'un des échangeurs les plus étudiés est l'échangeur chlore/bicarbonate (CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), localisé à la surface apicale des cellules canalaire. Les ions bicarbonates sont sécrétés à l'extérieur de la cellule afin de rendre alcalin le suc pancréatique pour tamponner l'acidité gastrique et rendre les enzymes digestives pancréatiques actives (Ishiguro et al., 2009). La composition du suc pancréatique permet de solubiliser

et de transporter les enzymes digestives pancréatiques et de créer les conditions favorables à leur activation et leur fonctionnement.

Les sécrétions exocrines peuvent être régulées par de nombreuses hormones et neurotransmetteurs. Le relargage par exocytose des granules de zymogènes est particulièrement régulé : la sécrétine, la cholécystokinine, la sérotonine ou encore la mélatonine, sont autant d'hormones qui permettent de stimuler la sécrétion des enzymes pancréatiques par les cellules acineuses, alors que la somatostatine ou le polypeptide pancréatique inhibent cette sécrétion (Chandra and Liddle, 2009). La présence de nombreux récepteurs couplés aux protéines G au niveau des cellules acineuses permet la régulation fine de l'exocytose des enzymes pancréatiques (Williams, 2010).

A ce stade du tractus digestif, la digestion des aliments est partielle. Certains sont déjà assimilables par l'intestin. D'autres devront encore être digérés tout au long de l'intestin avec les enzymes intestinales.

Le pancréas se situe donc, via les compartiments endocrine et exocrine, au cœur d'axes de régulation inter-organes, permettant de réguler finement de nombreux processus physiologiques, notamment l'homéostasie glucidique, le comportement alimentaire et la digestion. Les dysfonctionnements de cet organe ont donc réciproquement des impacts physiopathologiques.

b. Pathologies pancréatiques

i./ Diabète et inflammations

Le pancréas est une glande amphicrine. Les pathologies associées à cet organe peuvent toucher autant la partie endocrine que la partie exocrine, dérégulant ainsi l'homéostasie glucidique et les fonctions digestives.

L'homéostasie glucidique est altérée en cas de diabète. Cette maladie métabolique chronique est caractérisée par un excès de glucides dans le sang (hyperglycémie). Ce déséquilibre homéostatique résulte d'un trouble de la sécrétion et/ou d'action de l'insuline, l'hormone hypoglycémisante sécrétée par les cellules bêta des îlots pancréatiques. Le diabète de type 1, ou insulino-dépendant, représente 5 à 10% des diabètes et touche essentiellement les jeunes enfants. Il est caractérisé par une auto-immunité dirigée contre les cellules bêta des îlots pancréatiques. Le diabète de type 2, le plus fréquent, est caractérisé par une déficience partielle de sécrétion et/ou une diminution de la sensibilité à l'insuline des tissus cibles : on parle d'insulino-résistance (Kharroubi and Darwish, 2015).

Les pancréatites aiguës sont des inflammations extrêmement douloureuses du pancréas. Ce trouble inflammatoire peut être le résultat d'un calcul biliaire, d'une consommation excessive d'alcool ou encore d'une hypertriglycéridémie (Lankisch et al., 2015). Le diabète de type 2 augmente également le risque de développer une pancréatite aiguë (Aune et al., 2020). Les pancréatites aiguës sont souvent le fait d'une autodigestion du pancréas par les enzymes digestives pancréatiques, activées précocement au sein des acini et des canaux, libérant de nombreux facteurs pro-inflammatoires tels que des cytokines et des radicaux libres, et provoquant de fait une inflammation du pancréas. La plupart du temps, les pancréatites aiguës n'ont pas de conséquences graves pour la patient atteint, mais sur le long terme, 30 à 50% d'entre elles évoluent en pancréatite chronique, tandis que 20 à 30% des patients souffriront de dysfonctionnements endocrine et exocrine, dérégulant ainsi l'homéostasie glucidique et la digestion (Forsmark et al., 2016).

Les pancréatites chroniques se manifestent par des douleurs, généralement moins intenses qu'en cas de pancréatite aiguë mais perdurant dans le temps. Ces pathologies sont fortement associées à la consommation excessive et prolongée d'alcool, associée ou non au tabagisme. Elles peuvent également être le fruit de mutations génétiques de gènes tels que *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) ou *SPINK1* (Serine Peptidase Inhibitor Kazal type 1) - codant pour un facteur dégradant la trypsine - ou résulter d'une auto-immunité ou d'une obstruction des canaux pancréatiques (Braganza et al., 2011; Finkelberg et al., 2006; Pham and Forsmark, 2018). Il existe des formes héréditaires de pancréatites chroniques, dont l'incidence reste très faible (0,3/100 000), et le plus souvent liées à la mutation du gène de la sérine protéase 1 (PRSS1), qui conduit à la production d'une forme de trypsine résistance à la dégradation (Rebours et al., 2012). Les pancréatites chroniques ont des répercussions importantes sur la qualité de vie du patient. En effet, l'état d'inflammation permanent est tel que le pancréas est constamment dégradé, menant à la perte progressive des fonctions pancréatiques endocrines (perte de l'homéostasie glucidique notamment) et exocrines (troubles de la digestion) (Kleeff et al., 2017; Lindkvist, 2013).

Lors des pancréatites, les lésions causées par la dégradation des tissus pancréatiques mettent notamment en jeu des médiateurs inflammatoires tels que le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), des interleukines (IL-1 β , IL-6 ou encore IL-10) ou le MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1), ainsi que des cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les monocytes ou encore les macrophages (Inman et al., 2014; Manohar et al., 2017; Shrivastava and Bhatia, 2010). Dans un contexte physiologique, ces cellules permettent la réparation tissulaire suite à la dégradation des tissus. Or, ces mécanismes sont exacerbés dans les pancréatites chroniques, conduisant à une fibrose excessive au dépend des tissus fonctionnels du pancréas (Kleeff et al., 2017). Cet emballement inflammatoire peut même évoluer jusqu'à un état inflammatoire systémique du patient (Kylänpää et al., 2010).

Les patients atteints de pancréatite chronique ont un risque seize fois plus élevé de développer un cancer pancréatique, deux ans après le diagnostic d'une pancréatite chronique. Ce risque est encore huit fois plus élevé cinq ans après le diagnostic (Kirkegård et al., 2017). Les mécanismes moléculaires induisant le passage d'une pancréatite chronique au cancer pancréatique restent mal connus. Cependant, l'état fibrotique aberrant induit par une inflammation pancréatique non modulée, semble critique pour l'émergence des carcinomes pancréatiques (Huang et al., 2021a). Par ailleurs, certaines études ont montré que l'inflammation liée aux pancréatites est nécessaire à la progression des tumeurs bénignes du pancréas induite par l'oncogène *KRAS* (Guerra et al., 2007). D'autres travaux ont montré que les pancréatites chroniques contribuaient à la progression tumorale en inhibant la sénescence des cellules des lésions pancréatiques bénignes (Guerra et al., 2011).

ii./ Cancers pancréatiques

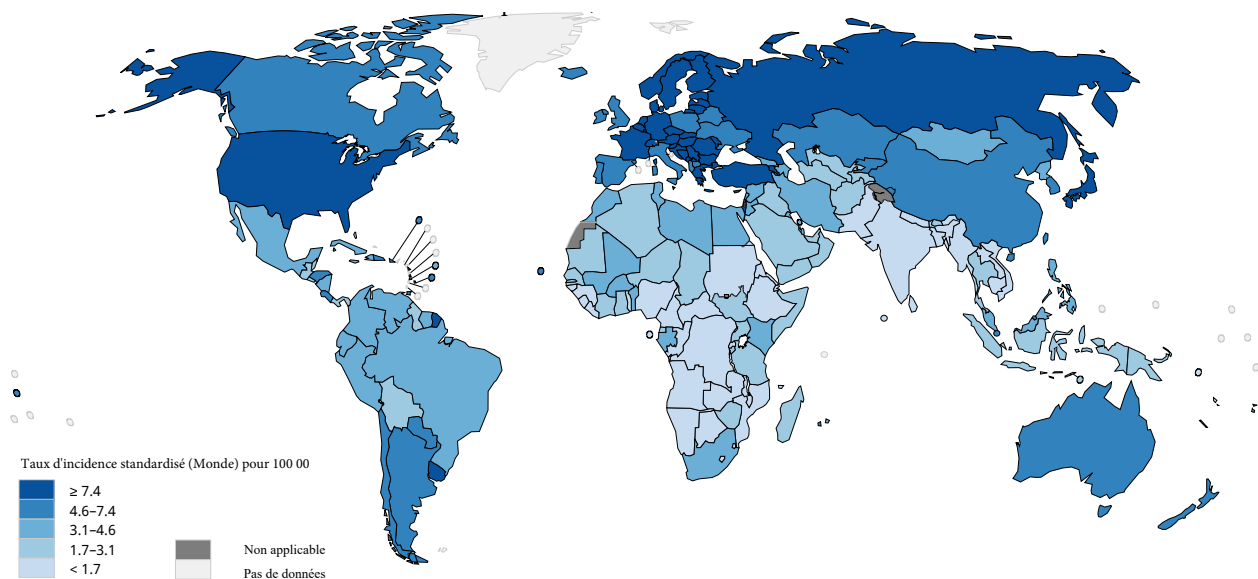
Les deux compartiments, exocrine et endocrine, peuvent donner lieu à la formation de tumeurs.

Cependant, les cancers du pancréas endocrines restent rares (environ 5% des tumeurs pancréatiques), évoluent lentement et sont bénins dans la plupart des cas. Ces tumeurs dérivent des cellules des îlots de Langerhans et sont classées en deux groupes majeurs, les tumeurs fonctionnelles (*e.g.* insulinomes, gastrinomes, glucagonomes...) caractérisées par une hypersécrétion hormonale, et les tumeurs non fonctionnelles sans symptômes particuliers (Davies and Conlon, 2009). Le pronostic est relativement favorable, avec un taux de survie à 5 ans de 85% pour les cancers localisés et de 28% pour les cancers métastatiques (Sonbol et al., 2020).

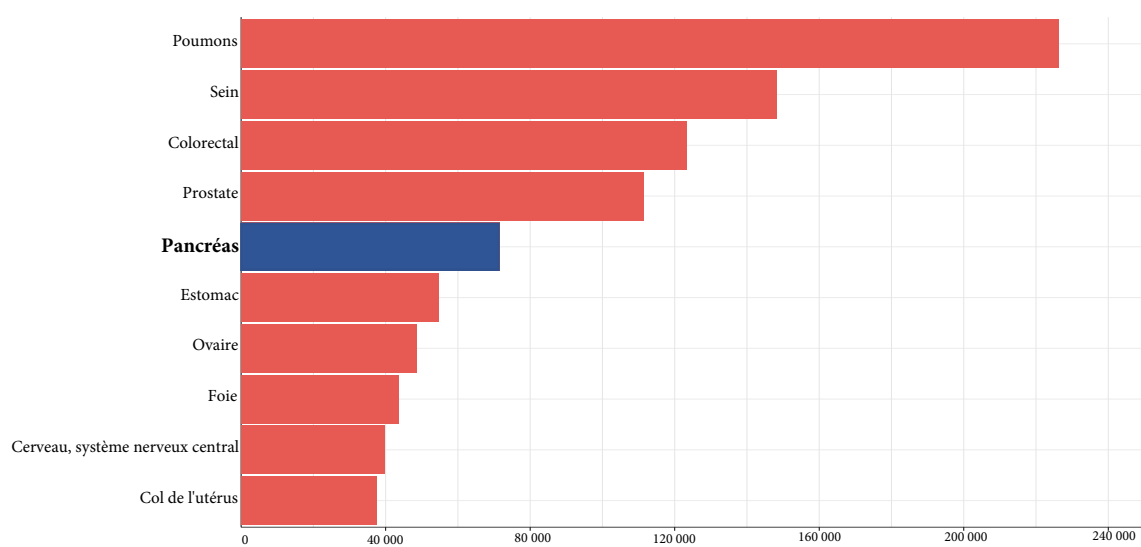
Au contraire, les cancers de la partie exocrine du pancréas sont un enjeu majeur de santé publique, compte-tenu de leur incidence et de leur taux de mortalité. Mon projet de thèse s'étant focalisé sur ces cancers, ils sont décrits plus en détail ci-dessous.

c. L'adénocarcinome canalaire pancréatique (ADKP)

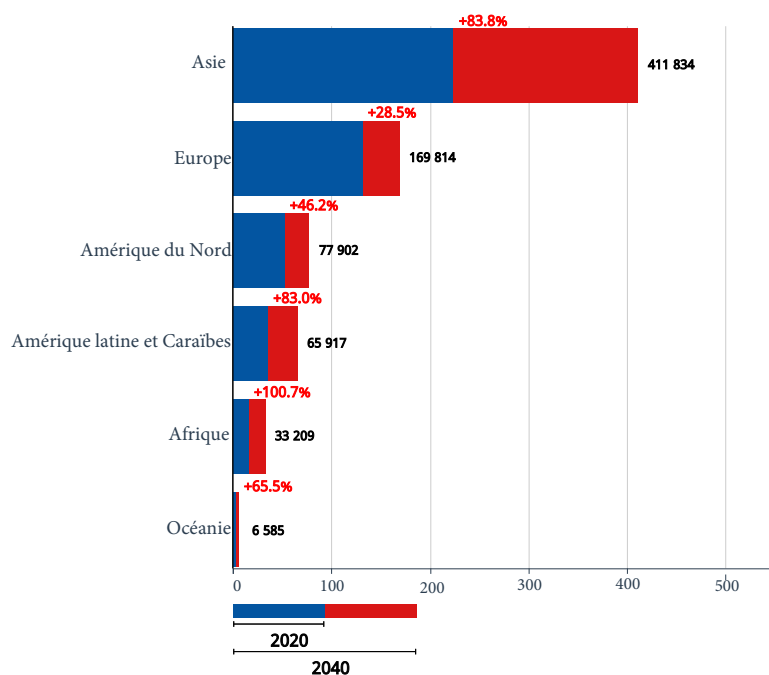
L'adénocarcinome canalaire pancréatique (ADKP) est un cancer au pronostic sombre, représentant plus de 90% des tumeurs du pancréas et touchant la partie exocrine de l'organe. En effet, il s'agit d'une hyperplasie des cellules épithéliales canalaire du pancréas. L'ADKP est également caractérisé par un imposant stroma entourant la tumeur, pouvant représenter entre 50 et 80% du volume tumoral total (Erkan et al., 2012).



Cancer du pancréas, taux d'incidence standardisé estimé en 2020



Nombre de décès par cancer estimé en 2020 en Europe



Nombre de décès par cancer du pancréas estimé en 2020 et en 2040 (par continent)

Figure 4 – Epidémiologie des cancers pancréatiques

Adapté de GLOBOCAN, International Agency for Research on Cancer – WHO ; 2020

i./ Épidémiologie

D'après l'étude GLOBOCAN de l'IARC (International Agency for Research on Cancer), 495 773 cancers pancréatiques ont été diagnostiqués et 466 003 décès ont été dénombrés durant l'année 2020 dans le monde (Sung et al., 2021). Au niveau mondial, les cancers pancréatiques représentent de fait actuellement la 12^{ème} cause de cancer et la 7^{ème} cause de décès par cancer. En Europe, tout comme dans la majorité des pays développés, l'incidence et la mortalité de l'ADKP sont beaucoup plus élevées. En effet, il s'agit du 7^{ème} cancer en termes d'incidence et de la 5^{ème} cause de décès par cancer en Europe (Rawla et al., 2019; Sung et al., 2021). Cependant, des études prospectives ont montré que les cancers pancréatiques représenteraient en 2030, la 2^{ème} cause de cancer (augmentation d'environ 33% des cas) et la 2^{ème} cause de mortalité par cancer, devant les cancers hépatiques et derrière les cancers pulmonaires (Rahib et al., 2014).

En France, sur la période 2010-2018, le taux d'incidence des cancers pancréatiques a augmenté selon un rythme moyen annuel de 2,6% chez l'homme et 3,2% chez la femme (Defossez et al., 2019). Cette évolution de l'incidence peut s'expliquer par les changements démographiques mais aussi par les habitudes de vie (alimentation, sédentarité...) ou encore l'impact de l'exposome.

Les cancers pancréatiques sont légèrement plus fréquents chez les hommes par rapport aux femmes, avec un ratio homme/femme d'environ 1,4 (Sung et al., 2021). La majorité des patients sont diagnostiqués à un âge avancé, avec une médiane de 71 ans lors du diagnostic. Seulement 20% des diagnostics ont lieu chez des patients de moins de 60 ans (Mizrahi et al., 2020).

Le taux de mortalité est particulièrement élevé. En effet, compte-tenu du diagnostic tardif en raison de signes cliniques absents ou non spécifiques et de l'échec des thérapies conventionnelles, la survie globale cinq ans après le diagnostic du cancer est relativement basse et s'établit à 9% (Rawla et al., 2019).

Durant les deux dernières décennies, de nombreuses études se sont intéressées aux facteurs génétiques et environnementaux favorisant l'apparition des ADKP.

Tout d'abord, il est démontré que les individus présentant au moins un parent au premier degré (parents, enfants, frères et sœurs) atteint d'un ADKP ont un risque de 5 à 32% plus élevé de développer eux-mêmes ce cancer (Klein et al., 2004; Petersen, 2016). Par ailleurs, environ 10% des ADKP sont associés à d'autres syndromes héréditaires, tels que le syndrome de Peutz-Jeghers, le syndrome de Lynch, les cancers héréditaires de l'ovaire et du sein, le syndrome familial des nævus atypiques ou encore la pancréatite héréditaire (Lynch et al., 2001; Ohmoto et al., 2019). Des analyses -omiques ont permis de mettre en lumière l'implication de gènes de prédisposition familiale dans la carcinogenèse pancréatique,

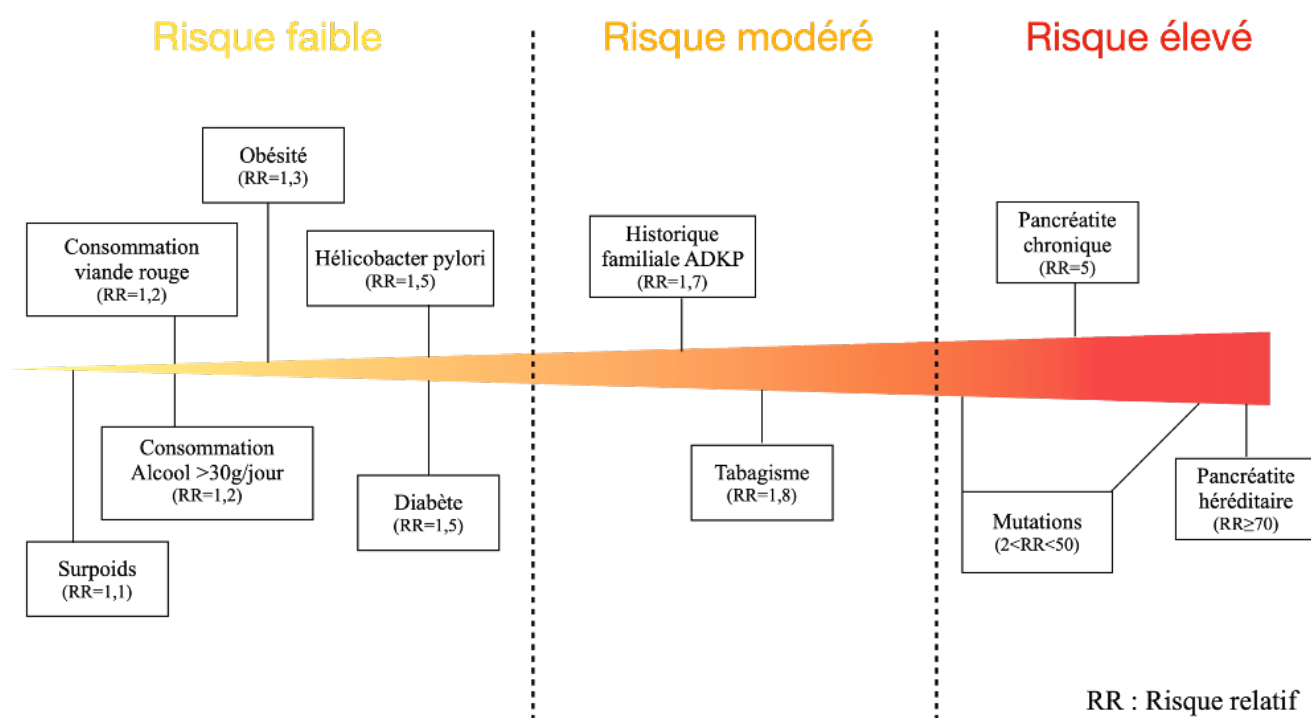


Figure 5 – Facteurs de risque associés aux adénocarcinomes canaux pancréatiques
Adapté de Maisonneuve et Lowenfels, International Journal of Epidemiology ; 2015

tels que les gènes *BRCA2*, *CDKN2A*, *PALB2*, *ATM* ou encore *CPAI*, conduisant au développement de cancers pancréatiques dits familiaux (Diaz and Lucas, 2019; Roberts et al., 2016).

Par ailleurs, de nombreux autres facteurs, d'ordre environnementaux ou comportementaux, sont connus ou suspectés pour favoriser la survenue des ADKP.

Le tabagisme est l'un des facteurs de risque identifié, augmentant par deux le risque de développement d'un ADKP. Le risque diminue chez les ex-fumeurs (RR=1,8) mais persiste au minimum 10 ans après l'arrêt de la consommation de tabac (Drouillard et al., 2018; Vrieling et al., 2010). En 2011, une étude de *Parkin et al.* a estimé qu'environ 30% des ADKP au Royaume-Uni étaient liés à la consommation de tabac (Parkin et al., 2011).

La consommation d'alcool a également été très étudiée. Ainsi, la consommation de plus de trois verres d'alcool par jour est associée à une augmentation de 20% du risque de développement d'un cancer pancréatique. La combinaison de la consommation de tabac et d'alcool, même modérée, est associée à une élévation du risque de développement d'un ADKP (Rahman et al., 2015).

Au niveau alimentaire, la consommation de viande rouge, de produits transformés, ou encore d'aliments hypercaloriques, peut augmenter le risque de survenue d'adénocarcinome pancréatique (Larsson and Wolk, 2012; Lightsey, 2012). Plus largement, le surpoids (IMC>25), l'obésité (IMC>30), le diabète et la sédentarité sont également associés à la survenue de cette maladie (Bao and Michaud, 2008; Berrington de Gonzalez et al., 2003; Li et al., 2009; Maisonneuve and Lowenfels, 2015).

L'apparition des ADKP peut également être liée à une infection gastrique par la bactérie *Helicobacter pylori* (Risch et al., 2010). En effet, cette bactérie est connue pour être un pathogène carcinogénique gastrique. Plusieurs études ont montré son implication dans les processus d'auto-immunité et d'inflammation pancréatique (Franceschi et al., 2014). Cependant, les mécanismes associés restent peu connus, et ce lien reste encore débattu. D'autres facteurs environnementaux comme l'exposition à certains pesticides et métaux lourds sont suspectés d'être des facteurs de risque d'apparition des cancers pancréatiques (Rawla et al., 2019).

Compte-tenu de son incidence en augmentation et de son taux de mortalité élevé, l'ADKP est donc un enjeu de santé publique majeur. L'amélioration de sa prise en charge thérapeutique passe par l'amélioration de la compréhension de son étiologie, des mécanismes d'initiation et de progression associés, pour identifier de nouvelles thérapies efficaces contre ce cancer particulièrement agressif. Le diagnostic précoce est également un enjeu majeur sur le plan clinique.

ii./ Diagnostic

Le diagnostic tardif est en effet l'une des causes du mauvais pronostic des cancers pancréatiques. En effet, l'absence de douleur et de symptôme caractéristique de cette pathologie avant des stades avancés ne permet pas un diagnostic précoce. La maladie évoluant très rapidement, il n'est pas rare de constater que le diagnostic est trop tardif pour la prise en charge de la maladie, notamment sur le plan chirurgical.

Un ADKP au niveau de la tête du pancréas (70 à 80%) est souvent plus symptomatique que celui du corps ou de la queue du pancréas (20 à 30%). Ces derniers sont souvent diagnostiqués plus tardivement, et de ce fait, moins résécables (Neuzillet et al., 2011). Bien que non spécifiques des AKDP, des symptômes peuvent être associés à ce cancer. Fréquemment, le patient est atteint de grande fatigue, d'amaigrissement et de douleurs abdominales intenses (Neuzillet et al., 2018).

Lors de la manifestation de ces symptômes ou de suspicion de cancer pancréatique suite à la découverte d'une masse pancréatique lors d'une échographie, des examens morphologiques complémentaires sont prescrits (McGuigan et al., 2018). Actuellement, la tomodensitométrie, couramment appelée scanner, est l'examen de référence pour confirmer ou non la présence d'une tumeur, sa localisation précise, ses rapports vasculaires, sa résécabilité et la présence de métastases le cas échéant (Al-Hawary et al., 2014). L'imagerie par résonance magnétique (IRM) peut être recommandée pour un bilan diagnostic des petites tumeurs ou pour évaluer l'éventuelle extension hépatique de la tumeur pancréatique (Raman et al., 2012). Lorsque l'ADKP n'a pas été diagnostiqué ou qu'il persiste un doute suite aux différentes méthodes d'imagerie de première ligne, l'écho-endoscopie associée à la biopsie peut alors être indiquée pour imager avec précision l'aspect du pancréas et éventuellement effectuer des prélèvements pour des études cytopathologiques complémentaires. Cet examen est souvent associé à la recherche du statut du gène *KRAS*, considéré comme un événement très fréquent et plutôt précoce dans le développement des adénocarcinomes pancréatiques (Bournet et al., 2016; Gonzalo-Marin et al., 2014; Kikuyama et al., 2018).

Depuis quelques années, des biomarqueurs sont testés pour améliorer le diagnostic des cancers pancréatiques (Mehta et al., 2021). L'un des biomarqueurs les plus étudiés et utilisés est le CA19-9 (Carboxyhydrate Antigen 19-9), sécrété par certaines cellules cancéreuses pancréatiques. Cependant, ce marqueur reste peu fiable pour le dépistage de l'ADKP car sa valeur prédictive est insuffisante chez les patients asymptomatiques et n'est pas forcément spécifique des cancers pancréatiques (Ballehaninna and Chamberlain, 2012). En revanche, il peut être utilisé pour déterminer la résécabilité de la tumeur ou pour le suivi du patient après une chirurgie et/ou chimiothérapie (Heger et al., 2020). D'autres marqueurs sériques comme les cellules tumorales circulantes (ou leur ADN), des microARNs, des

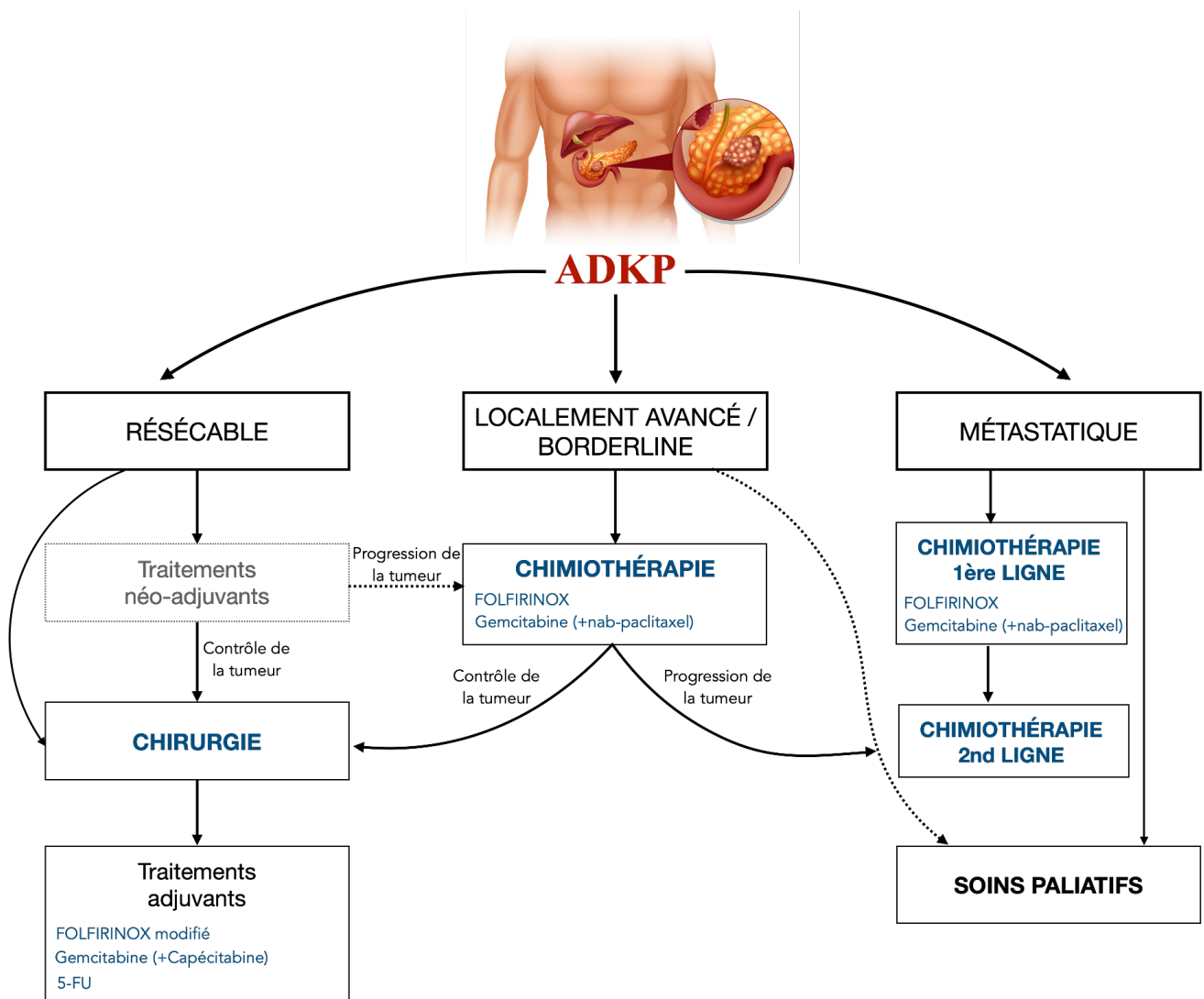


Figure 6 – Prise en charge thérapeutique des patients atteints d’un adénocarcinome canalaire pancréatique
Adapté de Neuzillet et al. , Digestive and Liver Disease ; 2018

vésicules extracellulaires ou encore la thrombospondine 2 (TSP2) sont à l'étude, mais ne sont pas encore validés à ce jour en clinique (Buscail et al., 2019; Hasan et al., 2019; Mehta et al., 2021).

Outre le recours à ces biomarqueurs, une surveillance accrue des personnes à risque (*e.g.* patients diabétiques, historique familial défavorable, pancréatite chronique) est fortement conseillée, l'objectif étant de dépister les lésions précancéreuses avant même l'apparition de tumeurs malignes.

iii./ **Prise en charge thérapeutique**

Le diagnostic tardif évoqué dans la partie précédente ne permet pas une prise en charge thérapeutique précoce des ADKP. La survie à 5 ans des cancers pancréatiques a évolué positivement ces dernières années, mais reste parmi les plus basses des cancers digestifs (environ 10%). Le pronostic peut cependant varier de façon très significative, selon si la tumeur est opérable ou non. La prise en charge des ADKP se fait en effet via un arsenal thérapeutique, incluant éventuellement une chirurgie (avec ou sans chimiothérapies néo-adjuvantes), des chimiothérapies ou des soins palliatifs (Neuzillet et al., 2018). Dans tous les cas, ces thérapies sont accompagnées de soins de supports afin de lutter contre les complications suite à la résection et/ou les chimiothérapies, et ainsi, améliorer la qualité de vie du patient (Védie and Neuzillet, 2021).

1. Chirurgie

L'indication chirurgicale est posée en fonction de l'avancée et de la classification de la tumeur pancréatique, avec une distinction majeure entre les tumeurs résécables, les tumeurs dites « *borderline* », les tumeurs localement avancées et les tumeurs métastatiques (Tempero et al., 2017).

Les tumeurs résécables sont celles localisées strictement au niveau du pancréas, plutôt bien délimitées et ne portant pas atteinte aux vaisseaux adjacents. Elles représentent environ 15% des tumeurs pancréatiques. La résection est curative, mais il est estimé que 80% de ces patients subiront une récurrence locale et/ou un développement métastatique de la tumeur (Hishinuma et al., 2006).

Les tumeurs dites « *borderline* » ne présentent pas de métastases distantes mais des atteintes locales et limitées peuvent être observées au niveau des organes ou des vaisseaux adjacents. Ces tumeurs ne sont pas résécables en première intention et nécessitent une chimiothérapie dite « *d'induction* » avant que la résection ne soit envisagée dans la majorité des cas (Isaji et al., 2018).

Les tumeurs localement avancées ne présentent pas d'expansion métastatique. Cependant, la résection est rarement envisagée à cause d'une extension tumorale locale, mais importante, au niveau des vaisseaux adjacents. Tout comme les tumeurs *borderline*, une chimiothérapie d'induction peut être

administrée afin d'envisager leur exérèse chirurgicale (dans 10 à 35% des cas) (van Veldhuisen et al., 2019).

Les tumeurs métastatiques sont caractérisées par des extensions locales et distantes établies. Ce type de tumeurs ne peut être opéré, et des traitements chimio-thérapeutiques sont proposés en première intention (Neuzillet et al., 2018).

Au final, la part de tumeurs résécables se situe entre 10 et 20% (Hidalgo et al., 2015). La décision de pratiquer une chirurgie est prise en fonction de critères tels que la taille de la tumeur, sa localisation, la différenciation des cellules cancéreuses, ou encore selon le stade d'envahissement vasculaire des vaisseaux adjacents (Isaji et al., 2018).

Les tumeurs sans envahissement vasculaire sont directement réséquées. Les tumeurs borderline et localement avancées le sont si la néoplasie ne progresse pas et que les chimiothérapies, dites « d'induction », les rendent opérables (Janssen et al., 2020; Versteijne et al., 2020). Les mêmes critères s'appliquent pour l'envahissement ganglionnaire, qui n'est pas synonyme de non-résection si l'atteinte est locale (Tempero et al., 2017). La chirurgie est en revanche contre-indiquée dans le cas des tumeurs métastatiques (Isaji et al., 2018; Neuzillet et al., 2018).

Dans le cas où la résection est possible, la médiane de survie des patients est augmentée et s'établit entre 20,1 et 23,5 mois - contre 5 à 11 mois pour les tumeurs non-opérables - (Gillen et al., 2010).

Suite à la chirurgie, des thérapies adjuvantes sont indiquées et permettent également une augmentation de la médiane de survie (Conroy et al., 2018).

2. Chimiothérapies

Dans tous les types de tumeurs pancréatiques, des chimiothérapies sont envisagées, principalement la gemcitabine et la combinaison FOLFIRINOX (comprenant de l'acide FOLinique, du 5-Fluoro-uracile, de l'IRInotecan et de l'OXaliplatine).

Les chimiothérapies pourront être administrées en première ligne pour les cancers pancréatiques borderline, localement avancés ou métastatiques, ou en amont et/ou en aval d'une chirurgie pour les tumeurs résécables (Neuzillet et al., 2018; Yang et al., 2021a). Les chimiothérapies dites « d'induction » - généralement FOLFIRINOX ou gemcitabine en monothérapie ou en combinaison avec le paclitaxel combiné à des nanoparticules d'albumine (nab-paclitaxel) - sont administrées avant la résection d'une tumeur borderline ou localement avancée, et permettent de rendre opérable ces dernières par la réduction de leur taille et de leur rapport aux vaisseaux sanguins. Les thérapies d'induction sont associées à une

diminution de l'invasion ganglionnaire et à une augmentation de la survie globale des patients (Cloyd et al., 2020; Mokdad et al., 2017; Sugimoto et al., 2019).

Les chimiothérapies adjuvantes sont quant à elles indiquées suite à la résection de la tumeur, afin d'éviter une rechute locale ou métastatique de la tumeur pancréatique (Conroy et al., 2018). Plusieurs protocoles existent, mais la plupart utilisent soit une version modifiée de la combinaison FOLFIRINOX (protocole de référence), soit la gemcitabine seule ou en association avec la capécitabine ou encore le 5-Fluorouracile (Conroy et al., 2018).

Pour les tumeurs métastatiques, localement avancées et borderline non opérables, le FOLFIRINOX ou la gemcitabine seule ou en association avec le nab-paclitaxel sont les références en première intention. En cas d'échec ou d'intolérance, d'autres associations peuvent être recommandées en seconde ligne, comme la combinaison 5-Fluorouracile (5-FU) / irinotecan par exemple (Wang-Gillam et al., 2019).

3. Radiothérapie

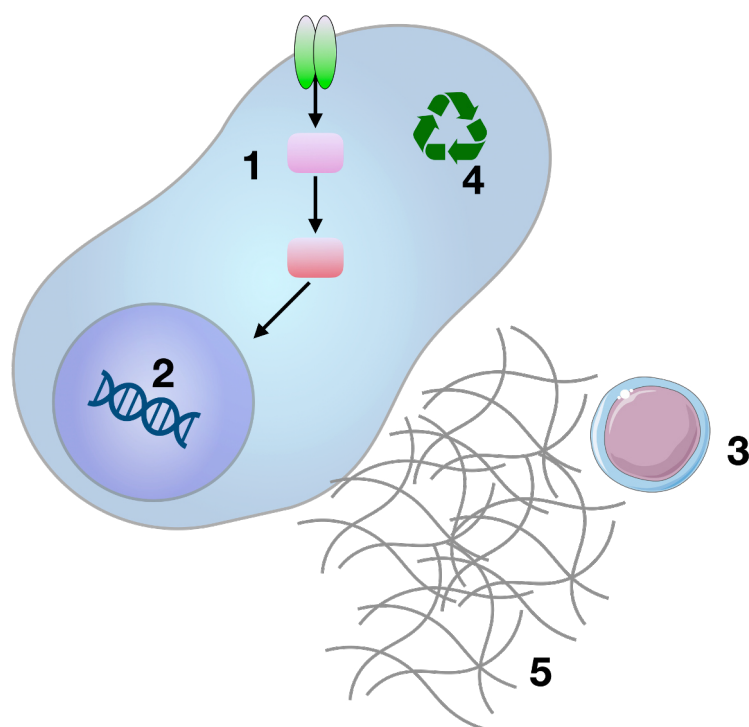
Plusieurs études ont évalué le gain apporté par la radiothérapie dans ce type de cancer, mais restent discordantes quant à la recommandation de la radiothérapie en traitement (néo)-adjuvant. Elle peut cependant être proposée en fin de traitement d'induction, avant la résection tumorale, mais son utilisation reste particulièrement peu fréquente (Neuzillet et al., 2018).

Malgré la diversité des chimiothérapies et des combinaisons testées, l'efficacité des traitements reste faible. L'enjeu des essais cliniques est donc de trouver d'autres thérapies plus efficaces, associées ou non, aux thérapies existantes.

4. Autres thérapies et essais cliniques

Le tableau clinique complexe, le diagnostic tardif et l'échec des thérapies conventionnelles soulignent la nécessité de repenser les protocoles actuels. De nombreux essais cliniques sont en cours, impliquant de nouveaux principes actifs, l'association de plusieurs thérapies conventionnelles ou encore l'extension d'indication d'un protocole existant aux tumeurs pancréatiques.

Parmi les nouvelles thérapies en cours d'investigation, on peut distinguer cinq types d'approches, basées sur la médecine de précision, avec l'inhibition de voies de signalisation cellulaire oncogéniques, les immunothérapies, des inhibiteurs de la réparation de l'ADN, les inhibiteurs du métabolisme cellulaire et les stratégies ciblant le microenvironnement tumoral (Nevala-Plagemann et al., 2020).



Catégorie / Ciblage	Exemples de stratégies thérapeutiques
1. Voies de signalisation cellulaire	Inhibiteurs des récepteurs du TGF- β , inhibiteurs de MEK/ERK...
2. Réparation de l'ADN	Inhibiteurs de PARP
3. Immunothérapies	Inhibiteurs des checkpoints immunitaires
4. Métabolisme	Inhibiteurs de l'autophagie
5. Matrice extracellulaire	Hyaluronidase PEGPH20

Figure 7 – Vers de nouvelles thérapies ciblées

Adapté de Nevala-Plagemann et al. , Nature Reviews Clinical Oncology ; 2019

Concernant l'inhibition des voies de signalisation cellulaire, une grande majorité des travaux de ces dernières années porte sur les effecteurs des voies en aval de KRAS, retrouvé muté dans plus de 90% des cancers pancréatiques. Cette mutation oncogénique aboutit à l'activation permanente de cette protéine, dérégulant l'ensemble des effecteurs sous-jacents (*e.g.* MEK/ERK). Parmi les thérapies les plus avancées, on peut citer le Trametinib, un inhibiteur de la protéine MEK. Dans la plupart des cas, ces inhibiteurs sont administrés en combinaison avec la Gemcitabine ou le FOLFIRINOX, et potentialiseraient les effets des chimiothérapies conventionnelles (Nevala-Plagemann et al., 2020).

D'autres thérapies s'intéressent aux dommages à l'ADN associés aux mutations BRCA2 de certains adénocarcinomes pancréatiques métastatiques. BRCA2, impliqué dans la réparation des cassures double brin de l'ADN, est inactivé dans certains cancers. Cette inactivation est compensée par la protéine PARP (Poly-ADP ribose Polymérase) capable de réparer les cassures double brins. L'Olaparib, un inhibiteur de PARP, induit de fait la mort des cellules cancéreuses, devenues incapables de réparer leurs cassures doubles brins. Cette thérapie est testée en traitement de maintenance post-FOLFIRINOX. Un gain de survie sans maladie a été décrit chez les patients ayant suivi ce protocole (7,4 mois contre 3,8 mois), mais aucune différence n'a été constatée dans la survie globale et la qualité de vie (Golan et al., 2019).

Comme dans de nombreux cancers, les immunothérapies semblent être des thérapies candidates de choix, puisque l'échappement tumoral reste une cause majeure de la progression tumorale. De nombreux essais cliniques sont en cours, notamment avec les inhibiteurs de checkpoint immunitaires (PD-1/PDL-1, CTLA-4), les vaccins thérapeutiques, ou encore les virus oncolytiques (Bear et al., 2020; Principe et al., 2021). Cependant, il n'est pas rare que ces thérapies se heurtent à une importante résistance des carcinomes pancréatiques, que ce soit en monothérapie ou en combinaison, notamment à cause de l'important stroma riche en cellules immunosuppressives et en molécules anti-inflammatoires telles que le TGF- β (Hilmi et al., 2018).

Afin d'améliorer l'accès des thérapies au cœur de la tumeur, le ciblage du stroma en complément des thérapies existantes, fait l'objet d'un intérêt grandissant. Les premiers essais cliniques portaient sur la déplétion des composants du stroma, avec par exemple la dégradation de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase PEGPH20, sans augmentation de la survie globale en monothérapie (Ho et al., 2020). Les essais cliniques en cours combinent le ciblage du stroma avec d'autres thérapies dans le but de cibler la tumeur dans son ensemble (Huang et al., 2021b; Nevala-Plagemann et al., 2020). En effet, la hyaluronidase PEGPH20 est testée en combinaison avec des chimiothérapies conventionnelles (*e.g.* Gemcitabine, Nab-paclitaxel) ou des thérapies ciblées telles que les immunothérapies ou les thérapies dirigées contre des voies de signalisation cellulaire. On peut notamment citer l'exemple de l'étude *MORPHEUS-pancreatic cancer* (NCT03193190) qui teste en phase II, l'association de l'anti-PD-L1

atezolizumab avec la hyaluronidase PEGPH20, chez des patients avec un ADKP métastatique (Oh et al., 2018).

Le TGF- β , présent en très grande quantité dans le microenvironnement tumoral, fait l'objet de nombreux essais cliniques. En effet, les rôles immunosuppresseurs, pro-migratoire, pro-angiogénique ou en faveur de la survie des cellules tumorales, font de cette cytokine une cible thérapeutique de premier choix (Neuzillet et al., 2015). Les thérapies candidates ciblent aussi bien la cytokine en elle-même (par des ligands ou des anticorps) que les récepteurs (par des anticorps ou des petites molécules inhibitrices). Les études montrent des résultats très limités, que ce soit en terme de réponse aux traitements ou d'amélioration de la survie globale (Ciardiello et al., 2020; Kim et al., 2021).

Quoique multiples, les stratégies actuelles restent donc majoritairement inefficaces pour améliorer la prise en charge des patients. L'amélioration des connaissances des mécanismes d'initiation et de progression de l'ADKP est donc un enjeu majeur pour faire face au double challenge associé au traitement de ces cancers, à savoir *i*) améliorer le diagnostic précoce et *ii*) booster l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses.

iv. Étiologie de l'ADKP

Afin d'améliorer le pronostic des adénocarcinomes pancréatiques, il est nécessaire de s'intéresser notamment aux événements précoces de la carcinogenèse.

1. Lésions pré-néoplasiques

Les lésions pré-néoplasiques peuvent être définies comme des altérations tissulaires bénignes pouvant progresser en tumeur maligne au cours de leur évolution. Dans les cancers pancréatiques, les lésions pré-néoplasiques comprennent les néoplasies intra-épithéliales (PanIN, Pancreatic Intra-epithelial Neoplasia), les Tumeurs Intra-canaliaires Papillaires et Mucineuses (TIPMP ou IPMN, Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms), mais aussi les cystadénomes mucineux/séreux (MCN, Mucinous Cystic Neoplasms). Ces trois atteintes précancéreuses non invasives peuvent aboutir au développement d'une tumeur maligne. Cependant, elles présentent des caractéristiques morphologiques, cellulaires et cliniques propres à chacune (Basturk et al., 2015; Distler et al., 2014; Hruban et al., 2004; Riva et al., 2018).

Les néoplasies intra-épithéliales (PanIN) sont les précurseurs néoplasiques les plus communs des adénocarcinomes pancréatiques. Ces lésions microscopiques (inférieures à 5 mm), difficilement

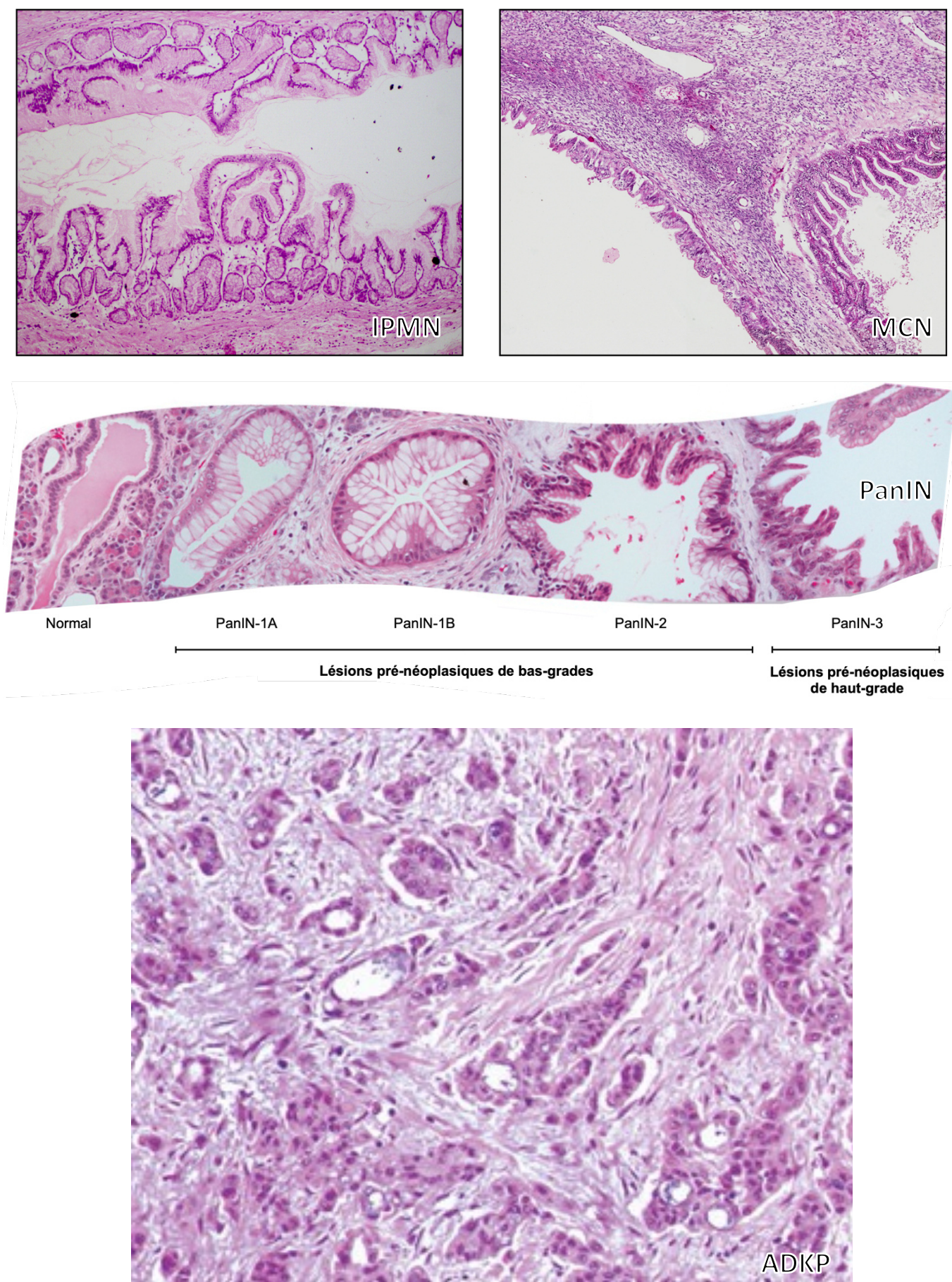


Figure 8 – Histologie des lésions prénéoplasiques et des adénocarcinomes canauxaires pancréatiques
Adapté de Noë et Brossens, Surgical Pathology Clinics ; 2016
Hackeng et al. Diagnostic Pathology ; 2016
Hezel et al., Genes & Development ; 2006

observables et généralement asymptomatiques, affectent les cellules épithéliales canalaire pancréatiques. Elles sont classées en trois catégories suivant le grade d'avancement néoplasique. Les PanIN-1A/PanIN-1B sont des lésions dites de « bas grades » avec une atteinte cytologique et architecturale faible. Les PanIN-1A constituent des lésions plates, alors que pour les PanIN-1B, légèrement plus dysplasiques, on parle de lésions papillaires. Les PanIN-2, de bas grade également, sont caractérisées par une augmentation des formes papillaires. Enfin, les PanIN-3, également appelées carcinome in-situ, sont des lésions de haut grade, avec d'importantes anomalies d'organisation architecturale : les cellules présentent une perte de polarité et de nombreuses anomalies nucléaires, sans être pour autant encore invasives (Delpu et al., 2011; Distler et al., 2014; Riva et al., 2018). Contrairement aux lésions de haut grade (PanIN-3), les lésions de bas grades (PanIN-1/2) ne donnent pas forcément lieu à un développement tumoral (Andea et al., 2003; Hruban et al., 2008). L'évolution d'une lésion pré-néoplasique vers un statut de carcinome invasif est favorisée par l'accumulation d'altérations génétiques. Un des facteurs les plus étudiés pour son rôle dans la mise en place des PanIN est la métaplasie acino-canaulaire. Ce processus de plasticité cellulaire, permettant la différenciation des cellules acinaires en cellules canalaire, peut favoriser la mise en place de PanIN de bas grade, susceptible de se développer en PanIN de haut grade, puis en ADKP (Storz, 2017; Wang et al., 2019).

Les tumeurs intracanaire papillaires et mucineuses du pancréas (TIPMP, ou IPMN pour Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms), de taille plus importante par rapport au PanIN, sont localisées principalement au niveau du canal pancréatique principal (Main Duct – IMPN, MD-IPMN) ou des ramifications canalaire (Branch Duct IPMN, BD-IPMN) (Distler et al., 2014; Fonseca et al., 2018). Au même titre que les PanIN, les TIPMP affectent l'épithélium canalaire en faveur d'une architecture papillaire, sécrétrice de mucines, allant jusqu'à former une dilatation kystique des canaux pancréatiques concernés. Ces lésions intra-canaire non invasives peuvent elles-aussi évoluer en lésions de plus haut grade (carcinomes mucineux papillaire intra-canaire), et à terme, devenir invasives (Basturk et al., 2015; Distler et al., 2014). Le risque de développer un cancer invasif est plus élevé avec les MD-IPMN (40 à 60%) par rapport aux BD-IPMN (20 à 30%) (Fonseca et al., 2018). Les TIPMP sont facilement observables en imagerie médicale et peuvent faire l'objet d'une résection (Basturk et al., 2015).

Les cystadénomes mucineux (ou MCN) sont plus rares mais plus larges que les deux lésions précédentes. Ils sont localisés principalement dans le corps et la queue du pancréas et sont la plupart du temps asymptomatiques (Distler et al., 2014). Ils peuvent être de bas ou de haut grade en fonction de leur progression néoplasique. Les MCN peuvent être observés en imagerie médicale et être réséqués avant leur progression en carcinome invasif mucineux (Delpu et al., 2011; Distler et al., 2014; Riva et al., 2018).

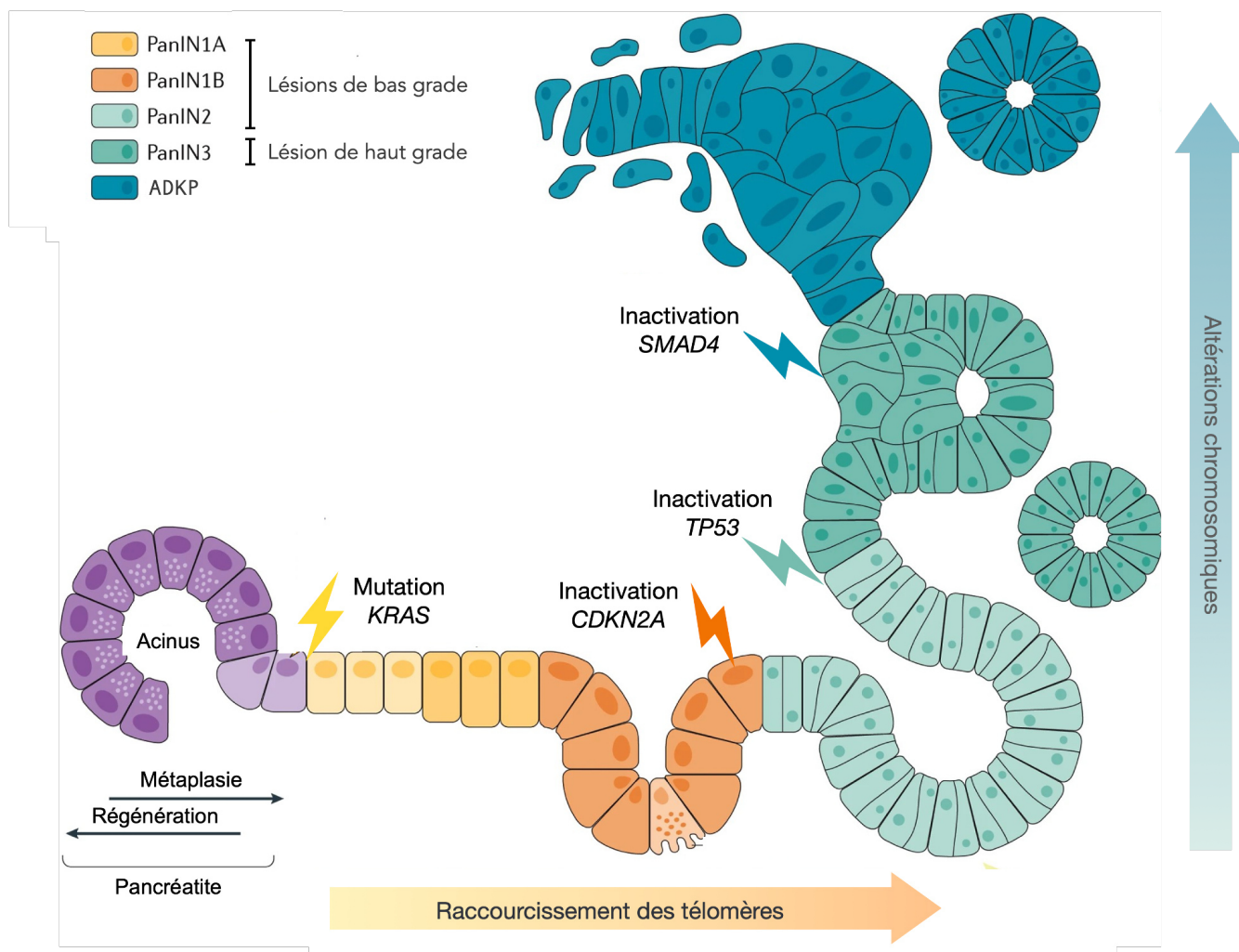


Figure 9 – Mutations récurrentes au cours du développement des adénocarcinomes canauxaux pancréatiques

Adapté de Storz, Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology ;2017

Les lésions pré-néoplasiques peuvent, si elles progressent vers des stades de haut grade, évoluer en carcinome. La mise en place et la progression de ces lésions s'accompagnent, de manière séquentielle, de multiples altérations génétiques au niveau des cellules canalaire pancréatiques. Ces mutations sont particulièrement étudiées pour les PanIN et seront détaillées dans le point suivant.

La progression des lésions en tumeurs malignes est associée à des dérégulations majeures de la physiologie pancréatique. En effet, le système canalaire va se retrouver totalement envahi par le développement tumoral provoquant l'obstruction des canaux pancréatiques. Cette obstruction est à l'origine de larges dilatations du système canalaire en amont de la tumeur et d'anomalies majeures du transport du suc digestif jusqu'au duodénum. Cette accumulation du suc au niveau des canaux pancréatiques est responsable de la dégradation des tissus acinaires, qui perdent alors leur fonction de sécrétions des enzymes digestives. On parle alors d'insuffisance pancréatique exocrine, responsable de symptômes tels que des troubles alimentaires et digestifs par exemple.

2. Bases moléculaires des ADKP

a. Altérations génétiques

Les altérations génétiques qui s'accumulent de manière séquentielle au cours de la progression des lésions pré-néoplasiques sont responsables de l'initiation et du maintien de l'adénocarcinome pancréatique. De nombreuses études se sont intéressées à l'identification des mutations en elles-mêmes, mais aussi à leur apparition séquentielle (Delpu et al., 2011; Jones et al., 2008; Wood et al., 2019). Ces études ont permis la mise en évidence de gènes dits « drivers » de l'émergence tumoral pancréatique, que nous détaillerons dans cette partie.

La mutation du gène *KRAS* (Kirsten RAt Sarcoma), codant pour la protéine p21-RAS, est l'un des événements génétiques majeurs dans l'initiation des ADKP, retrouvé dans près de 90% des adénocarcinomes canaux pancréatiques (Delpu et al., 2011; Haigis, 2017). Les mutations ponctuelles activatrices les plus courantes (70 à 95% des ADKP) touchent le codon 12 de *KRAS*, dans lequel la glycine est remplacée par l'acide aspartique ($KRAS^{G12D}$, 50% des cas), ou la valine ($KRAS^{G12V}$, environ 30% des mutations) ou encore par l'arginine ($KRAS^{G12R}$, environ 15%) dans la plupart des cas (Haigis, 2017; Magliano and Logsdon, 2013; Timar and Kashofer, 2020). D'autres codons peuvent être affectés, tels que les codons 11, 13, 61 ou 146, mais moins fréquemment que le codon 12 (Haigis, 2017; Timar and Kashofer, 2020). Au niveau moléculaire, ces mutations altèrent l'activité GTPase de RAS, et, empêchent la conversion du GTP (forme active) en GDP (forme inactive). *KRAS* est alors constitutivement activée, favorisant la prolifération, la survie et l'invasion par l'activation de nombreuses voies de signalisations interconnectées, impliquant les MAPKinases, PI3K ou encore NF-

κB (Feldmann et al., 2007; Jonckheere et al., 2017; Magliano and Logsdon, 2013). Les signaux mitogènes, de migration, d'invasion et d'angiogenèse sont donc activés en permanence, sans activation préalable induite par la fixation d'un facteur de croissance à son récepteur. De nombreux essais cliniques sont en cours pour le développement de thérapies ciblant KRAS et/ou ses effecteurs (Buscail et al., 2020).

Ces mutations ponctuelles sont très précoces dans la carcinogénèse pancréatique et sont retrouvées dans les PanIN, les TPIMP et les MCN (Delpu et al., 2011; Kleeff et al., 2016; Löhr et al., 2005). De nombreux modèles murins ont été développés pour permettre l'expression constitutive de la forme active de l'oncogène *Kras* spécifiquement dans le pancréas (*Pdx1-Cre* ; *LSL-Kras^{G12D}* ou *p48-Cre* ; *LSL-Kras^{G12D}*), permettant de confirmer que la mutation de cet oncogène suffit à induire le développement de lésions pré-néoplasiques de type PanIN (Hingorani et al., 2003). Ces modèles génétiquement modifiés miment fidèlement la pathologie humaine puisque la totalité des souris développent des PanIN. Ces lésions pré-néoplasiques peuvent évoluer, dans 10% des cas, en carcinomes invasifs avec le vieillissement des animaux, suggérant que la mutation de *KRAS* n'est pas suffisante pour l'émergence de cancers invasifs. En effet, il apparaît que des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *CDKN2A*, *TRP53* ou encore *SMAD4* sont nécessaires pour la carcinogénèse pancréatique.

La mutation du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A, également nommé p16/INK4A) touche également la très grande majorité (environ 90%) des patients atteints d'ADKP (Delpu et al., 2011; Wood et al., 2019). Dans des conditions physiologiques, *CDKN2A* code pour la protéine P16, responsable de l'arrêt du cycle cellulaire au cours de la transition G1-S, par l'inactivation des kinases dépendantes des CDK4 et CDK6 (Russo et al., 1998; Serrano et al., 1993). La perte d'activité de ces gènes médiée par des mutations homozygotes ou hétérozygotes, favorise la prolifération incontrôlée des cellules (Wood et al., 2019). Ces mutations apparaissent également lors de la progression des lésions pré-néoplasiques, puisque la quasi-totalité des PanIN de haut grade sont mutées pour *CDKN2A* (Delpu et al., 2011; Wood et al., 2019). Par ailleurs, les modèles murins présentant la mutation *Kras^{G12D}* et l'inactivation concomitante de *Cdkn2a* (*Pdx1-Cre* ; *LSL-Kras^{G12D}* ; *Cdkn2a^{flox/flox}*) développent des PanIN de haut grade ou des ADKP, pouvant même devenir métastatiques (Aguirre et al., 2003).

Une autre mutation très fréquente, quoique non spécifique des ADKP, est celle du gène suppresseur de tumeur *TP53* (Tumor Protein 53). Ce gatekeeper majeur du génome participe à la réparation de l'ADN, de régulation du cycle et de la mort cellulaire (Kastenhuber and Lowe, 2017). Les tumeurs mutées pour *TP53* présentent des aberrations génétiques nombreuses et croissantes au cours de la carcinogénèse, participant ainsi à l'instabilité génomique, et donc, à l'acquisition progressive de leur caractère hétérogène, agressif et résistant aux traitements (Rivlin et al., 2011). Les mutations de *TP53*, non-sens

dans la plupart de cas, apparaissent plus tardivement que les mutations de *KRAS* et de *CDKN2A* (Feldmann et al., 2007; Wood et al., 2019). En effet, les lésions pré-néoplasiques sont peu affectées par cette mutation, et il apparaît que seulement 12% des PanIN de haut grade en présentent contre 50 à 75% des adénocarcinomes canaux pancréatiques (Yonezawa et al., 2008). De même que les modèles murins présentant la mutation *Kras*^{G12D} et *Cdkn2a* (*Pdx1-Cre* ; *LSL-Kras*^{G12D} ; *Cdkn2a*^{lox/lox}), les souris exprimant à la fois *Kras*^{G12D} et l'inactivation de *TP53* (*Pdx1-Cre* ; *LSL-Kras*^{G12D} ; *LSL-Trp53*^{R172H/+}) développent des ADKP avancés et souvent métastatiques (Hingorani et al., 2005).

Le gène suppresseur de tumeur *SMAD4* (ou *DPC4*, Deleted in Pancreatic Cancer 4) est également fréquemment muté dans les cancers pancréatiques. Si 90% des ADKP présentent une perte d'hétérozygotie (LOH, Loss Of Heterozygosity) au locus *SMAD4*, 50% de ces cas subissent aussi des mutations inactivatrices du deuxième allèle, conduisant à la perte totale d'expression de *SMAD4* (Hezel et al., 2006). Tout comme la mutation de *TP53*, l'inactivation de *SMAD4* est tardive dans la carcinogenèse pancréatique, et n'intervient pas avant les PanIN de haut grade, dans environ 30% des cas (Yonezawa et al., 2008). Le gène *SMAD4* code pour une protéine du même nom qui est impliquée notamment dans la voie de signalisation du TGF-β, et plus précisément dans l'activité cytotatique induite par cette voie. La perte d'expression de *SMAD4* participerait donc à une prolifération aberrante des cellules cancéreuses (Massague, 2008; Truty and Urrutia, 2007). Les modèles murins mutés pour *Kras*^{G12D} et *Smad4* (*Pdx1-Cre* ; *LSL-Kras*^{G12D} ; *Smad4*^{lox/lox}) développent également des lésions pré-néoplasiques de haut grade qui peuvent évoluer en ADKP invasif (Bardeesy et al., 2006). Par ailleurs, l'inactivation de *Smad4* chez les souris mutées *Kras*^{G12D} et pour *Cdkn2a* (*Ptfla* ou *Pdx1-Cre* ; *LSL-Kras*^{G12D} ; *Smad4*^{lox/lox} ; *Ink4a/Arf*^{lox/+}), accélère le développement d'ADKP et diminue sensiblement la moyenne de survie de ces souris - 14 semaines vs. 38 semaines - (Bardeesy et al., 2006). Le rôle de la voie TGF-β dans les ADKP ayant fait l'objet de mon travail de thèse, il sera détaillé de manière plus exhaustive dans l'axe 2 de cette introduction.

Les altérations génétiques de ces gènes majeurs dans le processus d'initiation et de transformation tumorale peuvent également être accompagnées d'autres mutations. C'est notamment le cas du gène *GNAS*, codant pour une sous unité des protéines G hétérotrimériques, mais aussi du gène *RNF43*, fréquemment mutés dans les IPMN mais peu dans les PanIN et les MCN (Wood et al., 2019). D'autres mutations, moins fréquentes mais souvent associées aux adénocarcinomes pancréatique familiaux, touchant *BRCA1/2*, *ATM*, *PALB2* ou encore *PRSS1* ont été répertoriées (Diaz and Lucas, 2019; Wood et al., 2019).

L'émergence des études -omiques a permis la mise évidence de groupes de gènes mutés, permettant la classification des ADKP en sous types moléculaires (Jones et al., 2008; Pishvaian et al., 2018; Raphael

et al., 2017). En effet, outre les quatre gènes drivers identifiés par l'étude de *Jones et al.* (Jones et al., 2008), des gènes impliqués dans la réparation à l'ADN (*e.g. BRCA, ATM*), dans les voies de signalisation cellulaire (*e.g. TGFβR2, FGFR4*) des oncogènes (*e.g. MYC, GATA6*), ou encore des gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine (*MLL3/4* par exemple) sont altérés dans les adénocarcinomes pancréatiques (Raphael et al., 2017). Ces études ont également déterminé d'autres gènes « drivers » tels que *BRAF* (dénommé « drivers alternatifs ») dans les ADKP *KRAS*^{WT}. Aussi, l'étude de *Nicolle et al.* proposent une nouvelle classification des adénocarcinomes pancréatiques en différents groupes moléculaires permettant notamment de prédire la réponse des patients au FOLFIRINOX, et ainsi, d'orienter les patients vers d'autres protocoles ou d'autres thérapies personnalisées/ciblées (Nicolle et al., 2020; Pishvaian et al., 2018).

Enfin, l'intégrité génomique peut aussi être affectée par le raccourcissement des télomères, observé principalement dans les PanIN, favorisant l'accumulation d'anomalies chromosomiques et donc, le développement de l'hétérogénéité et de l'agressivité tumorale (van Heek et al., 2002; Hong et al., 2011).

Les ADKP résultent donc de l'accumulation progressive de mutations, plus ou moins fréquentes, créant de fait, une hétérogénéité inter-tumorale entre patients.

b. Modulation de la signalisation cellulaire

Les altérations génétiques qui s'accumulent au cours de la progression tumorale affectent les voies de signalisation cellulaire. Parmi les plus dérégulées et les plus étudiées, on retrouve l'ensemble des voies liées aux facteurs de croissance mais aussi des voies de régulation développementales majeures, telles que Hedgehog, Wnt/β-catenine ou encore la voie Notch (Javadrashid et al., 2021; Jones et al., 2008; McCleary-Wheeler et al., 2012).

A titre d'exemple, la voie de signalisation Hedgehog, classiquement associée à l'embryogenèse et la morphogenèse (McMahon et al., 2003), se trouve dérégulée dès les stades précoces de la carcinogenèse pancréatique – *e.g.* PanIN de bas grade - (Morton et al., 2007; Thayer et al., 2003). En effet, la mutation activatrice de *KRAS*, dans les stades précoces de la carcinogenèse pancréatique, est notamment impliquée dans l'activation de la voie Hedgehog, favorisant la prolifération et la survie des cellules tumorales pancréatiques (Ji et al., 2007; Morton et al., 2007). Par ailleurs, dans les stades plus tardifs de la carcinogenèse, la dérégulation de la voie Hedgehog est associée à la stimulation de l'angiogenèse et du caractère invasif des ADKP (Bailey et al., 2009; Bausch et al., 2020). Cette dérégulation de signalisation peut également activer la voie Wnt/β-catenine, également impliquée dans le développement. Dans ce contexte tumoral, la voie Wnt est impliquée dans la prolifération et la survie

des cellules cancéreuses (Pasca di Magliano et al., 2007). D'autres études ont également montré l'implication de cette voie dans la métaplasie acino-canalaire induite par la mutation de *KRAS* (Zhang et al., 2013b).

D'autres voies sont caractérisées par leur ambivalence fonctionnelle dans les adénocarcinomes pancréatiques. C'est notamment le cas de la voie du facteur de croissance TGF- β , qui est l'une des voies la plus affectée par les mutations dans l'adénocarcinome pancréatique. En effet, la quasi-totalité des tumeurs possède une mutation d'un des acteurs de la voie du TGF- β (Jones et al., 2008; Truty and Urrutia, 2007). Les mutations les plus communes sont celles du récepteur 2 (TGF β RII) et de la protéine SMAD4 (co-SMAD).

Les caractéristiques de cette voie complexe et son implication fonctionnelle dans les ADKP sont décrites dans la seconde partie de cette introduction, afin de fixer le cadre de mon travail de thèse.
--

II- Le TGF- β : signalisation et rôles physiologiques

La superfamille du TGF- β (Transforming Growth Factor Beta) comprend plus de 30 membres, classés en deux grands groupes fonctionnels : les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) et le TGF- β . Le groupe des BMPs comprend les neuf BMPs, quelques GDFs (Growth and Differentiation Factors) et l'hormone anti-müllérienne (AMH). Le groupe du TGF- β comprend les trois isoformes du TGF- β , les activines, la protéine Nodal et d'autres GDFs. Bien qu'elles possèdent un panel d'action très large, avec plus ou moins de redondance, les protéines de cette superfamille présentent des structures similaires et conservées (Hinck et al., 2016; Weiss and Attisano, 2013).

Le TGF- β est une cytokine hautement conservée, ubiquitaire et aux rôles multiples. En effet, le TGF- β possède un large spectre d'actions physiologiques, tant au niveau développemental que lors de la vie adulte. Cependant, les dérégulations des voies de signalisation de cette cytokine sont associées à de nombreux processus pathologiques, notamment dans les cancers.

a. Synthèse, sécrétion & biodisponibilité du TGF- β

Chez les mammifères, trois isoformes du TGF- β sont décrits, le TGF- β 1, majoritaire, le TGF- β 2 et le TGF- β 3, chacun codés par un gène différent, respectivement localisés sur les chromosomes 19, 1 et 14 (Barton et al., 1988; Fujii et al., 1986). Ils possèdent les mêmes récepteurs, contiennent des régions hautement conservées (plus de 70% d'homologie) mais divergent de quelques acides aminés (Hinck, 2012; Kubiczko et al., 2012). Si on observe une redondance fonctionnelle des isoformes du TGF- β *in vitro*, l'invalidation de chacune d'entre elles conduit à des phénotypes différents dans des modèles murins, suggérant une spécificité fonctionnelle du TGF- β 1, TGF- β 2, et TGF- β 3, dans des tissus donnés (Brunet et al., 1995; Sanford et al., 1997; Shull et al., 1992).

Les trois isoformes sont traduits en précurseurs d'environ 50-kDa, appelés pré-pro-protéines, composés d'un peptide signal (N-Terminal), du LAP (Latency-Associated Peptide) et du TGF- β mature (C-Terminal). Les précurseurs subissent de nombreuses étapes de maturation intracellulaire avant d'être sécrétés, toujours sous une forme inactive (Derynck and Budi, 2019; Travis and Sheppard, 2014).

Tout d'abord, le peptide signal est excisé. Le pro-peptide restant transloque dans le lumen du réticulum endoplasmique pour être assemblé en dimère, relié par des ponts disulfures. Clivés par une furine au niveau de l'appareil de Golgi, le LAP et le TGF- β se trouvent alors liés par des liaisons non covalentes, formant le Small Latent Complex (SLC). Le SLC représente la forme mature mais inactive du TGF- β . En effet, la conformation acquise par le SLC masque le site de fixation du TGF- β à ses récepteurs, permettant donc de réguler sa biodisponibilité (Herpin et al., 2004; Khalil, 1999). Le SLC est ensuite

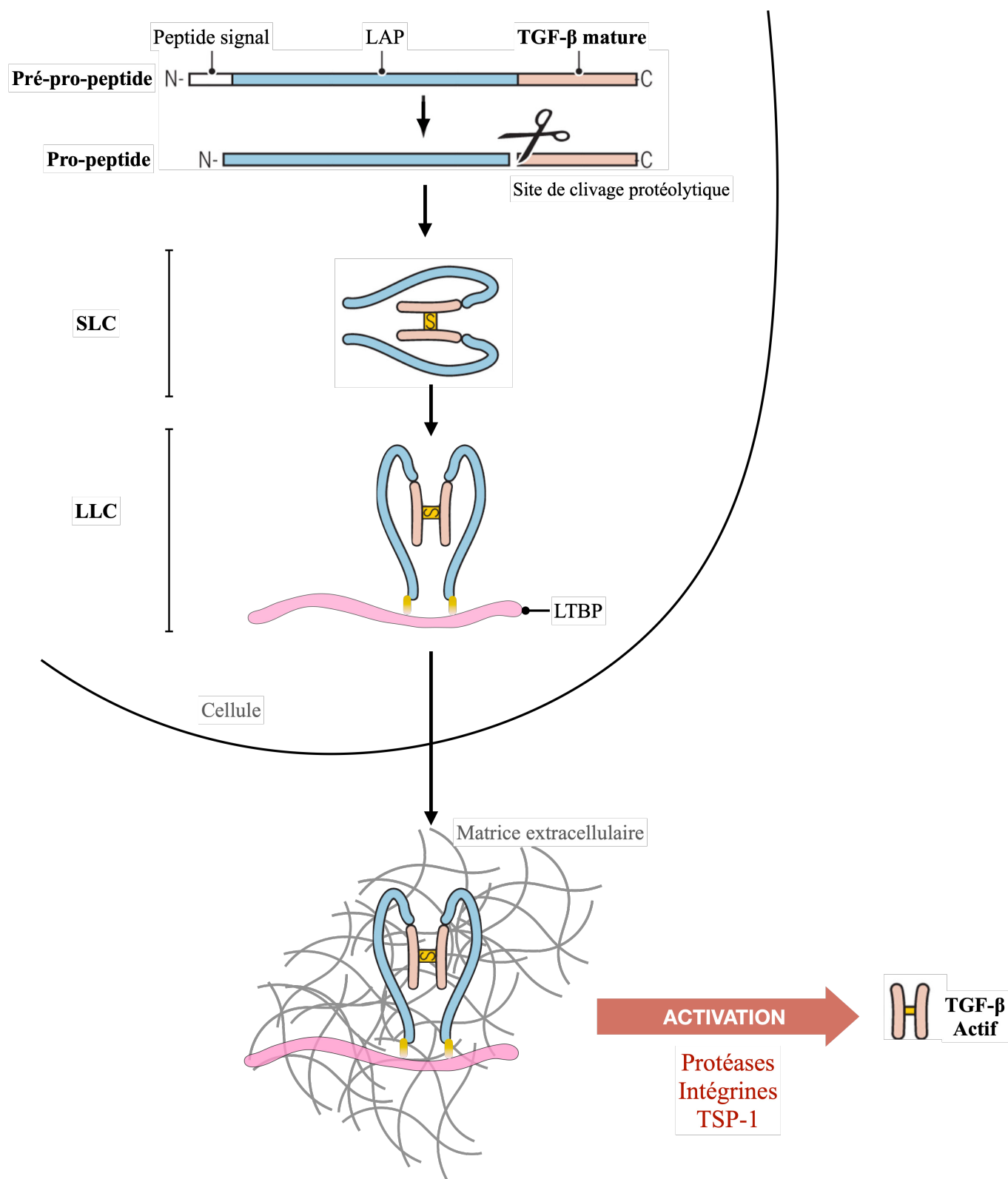


Figure 10 – Synthèse et activation du TGF-β
Adapté de Derynck et Budi, Science Signaling ; 2019

sécrété et séquestré dans la matrice jusqu'à son activation. Cette séquestration est orchestrée par la protéine matricielle LTBP (Latent TGF- β Binding Protein), qui se lie au SLC pour former le LLC (Large Latent Complex). Le LLC s'associe aux protéines de la matrice extracellulaire (*e.g.* fibronectine, fibrilline) par le biais du LTBP qui possède des sites de liaisons à ces protéines (Fontana et al., 2005; Isogai et al., 2003; Kantola et al., 2008; Robertson et al., 2015), piégeant de fait le TGF- β et empêchant son association à ses récepteurs. Des études ont montré que le SLC pouvait s'assembler directement avec le LTBP au moment de sa synthèse intracellulaire, et ainsi, être sécrété directement sous la forme LLC (Miyazono et al., 1991; Robertson and Rifkin, 2016). Le TGF- β latent peut aussi être séquestré à la membrane plasmique de certaines cellules en se liant au GARP - Glycoprotein A Repetition Predominant Protein - (Wang et al., 2012), protéine membranaire exprimée à la surface de certaines cellules tumorales, des lymphocytes T régulateurs, des cellules de l'endothélium ou encore des plaquettes (Metelli et al., 2016; Stockis et al., 2009, 2017; Tran et al., 2009).

La séquestration du TGF- β latent permet la régulation de sa biodisponibilité, et fait notamment de la matrice extracellulaire, un véritable réservoir rapidement mobilisable (Moustakas and Heldin, 2009; Robertson et al., 2015).

b. Activation du TGF- β

Le TGF- β sécrété sous une forme inactive, masqué par le LAP et associé ou non au LTBP (ou à GARP dans certain cas), doit subir un processus d'activation pour se lier à ses récepteurs et ainsi, activer ses cascades de signalisation intracellulaires. Divers processus d'activation, de nature physico-chimiques ou protéiques, peuvent permettre le démasquage du TGF- β actif. Cette étape d'activation, par élimination du LAP, constitue la seconde phase de régulation de la biodisponibilité du TGF- β (Robertson and Rifkin, 2016).

Tout d'abord, différents facteurs physico-chimiques peuvent participer à l'activation du TGF- β latent. C'est notamment le cas des hautes températures et des variations de pH, qui déclenchent la dégradation du LAP (Brown et al., 1990; Lyons et al., 1988). Cependant, la pertinence *in vivo* de ce processus d'activation reste très limitée. Les études de *Barcellos-Hoff et al.* ont permis de montrer l'implication des radiations ionisantes dans l'activation du TGF- β , par la stimulation de la production de ROS (Reactive Oxygen Species) (Barcellos-Hoff and Dix, 1996; Barcellos-Hoff et al., 1994). Ce phénomène a été confirmé *in vivo*, puisqu'une exposition aux ultra-violets suffit à stimuler la production de ROS, permettant l'activation du TGF- β latent (Wang and Kochevar, 2005). Les contraintes de cisaillement appliquées au sang ont également été identifiées comme facteur d'activation d'une partie du TGF- β latent lié au LTBP (Ahamed et al., 2008; Kouzbari et al., 2019; Walshe et al., 2013). Enfin, il a été

montré que les forces induites par la contraction des myofibroblastes potentialisaient l'activation du TGF- β latent (Klingberg et al., 2014; Wipff et al., 2007). Cependant, les mécanismes exacts de ces contraintes biophysiques restent encore mal décrits.

Au-delà de son rôle de réservoir du TGF- β latent, des modifications de l'organisation de la matrice extracellulaire sont également impliquées dans l'activation du TGF- β . En effet, certaines protéines de la matrice peuvent modifier la structure du SLC et ainsi libérer le TGF- β actif.

Ainsi, la thrombospondine-1 (TSP-1), sécrétée par les fibroblastes, les plaquettes et les cellules endothéliales notamment, fait partie des protéines de la matrice capables de se lier au LAP. TSP-1 possède une séquence peptidique - KRFK - susceptible de se lier à une séquence spécifique du LAP (LSKL), permettant la dissociation entre le LAP et le TGF- β actif, rendant ce dernier accessible à son récepteur (Crawford et al., 1998; Ribeiro et al., 1999). Les souris déficientes en TSP-1 présentent des pathologies similaires (*e.g.* inflammation hyperplasie), mais moins sévères que les souris déficientes pour le TGF- β 1, qui ne survivent pas au-delà de quatre semaines (Crawford et al., 1998; Lawler et al., 1998). Plus récemment, notre laboratoire a démontré que la protéine matricielle Tenascine-X (TNX), et plus précisément son domaine C-Terminal FBG (Fibrinogen-like) était capable d'induire l'activation du TGF- β latent (Alcaraz et al., 2014). De plus, nous avons montré que l'intégrine α 1 β 1 interagit avec le domaine FBG de la TNX et joue donc un rôle majeur dans l'activation du TGF- β (Alcaraz et al., 2014).

Par ailleurs, la structure du SLC est composée de sites protéolytiques accessibles aux enzymes de la matrice. L'implication de protéases dans l'activation du TGF- β a de fait été largement étudiée. La plasmine, une enzyme résultant de l'activation du plasminogène, peut cliver le LAP permettant la libération du TGF- β actif (Lyons et al., 1990). Les métallo-protéinases matricielles (MMP) sont des enzymes spécialisées dans la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. Certaines MMP, telles que MMP2, MMP9, MMP13 et MMP14, sont également retrouvées dans les processus d'activation du TGF- β de manière directe, et même parfois indirectement par l'action synergique des intégrines (Jenkins, 2008; Wang et al., 2006; Wipff and Hinz, 2008; Yu and Stamenkovic, 2000).

Les intégrines constituent en effet le dernier groupe de facteurs capable d'activer le TGF- β . Certaines intégrines ont la capacité de se lier au motif RGD - Arginine-Glycine-Aspartate - exprimé par certaines protéines dont le LAP : il s'agit des intégrines α v β 1, α v β 6 et α v β 8 (Laine et al., 2021; Robertson and Rifkin, 2016; Shi et al., 2011; Wipff and Hinz, 2008). Ces trois intégrines sont alors capables d'interagir directement avec le domaine RGD du LAP-TGF- β 1 et du LAP-TGF- β 3, puisque le LAP-TGF- β 2 ne possède pas de motif RGD complet (Hinck et al., 2016). Dans la plupart des cas, la sous-unité α v de l'intégrine se lie au motif RGD du LAP, alors que la sous-unité β interagit avec le cytosquelette d'actine de la cellule, qui exerce la force de traction pour la libération du TGF- β . Il est à noter que certaines

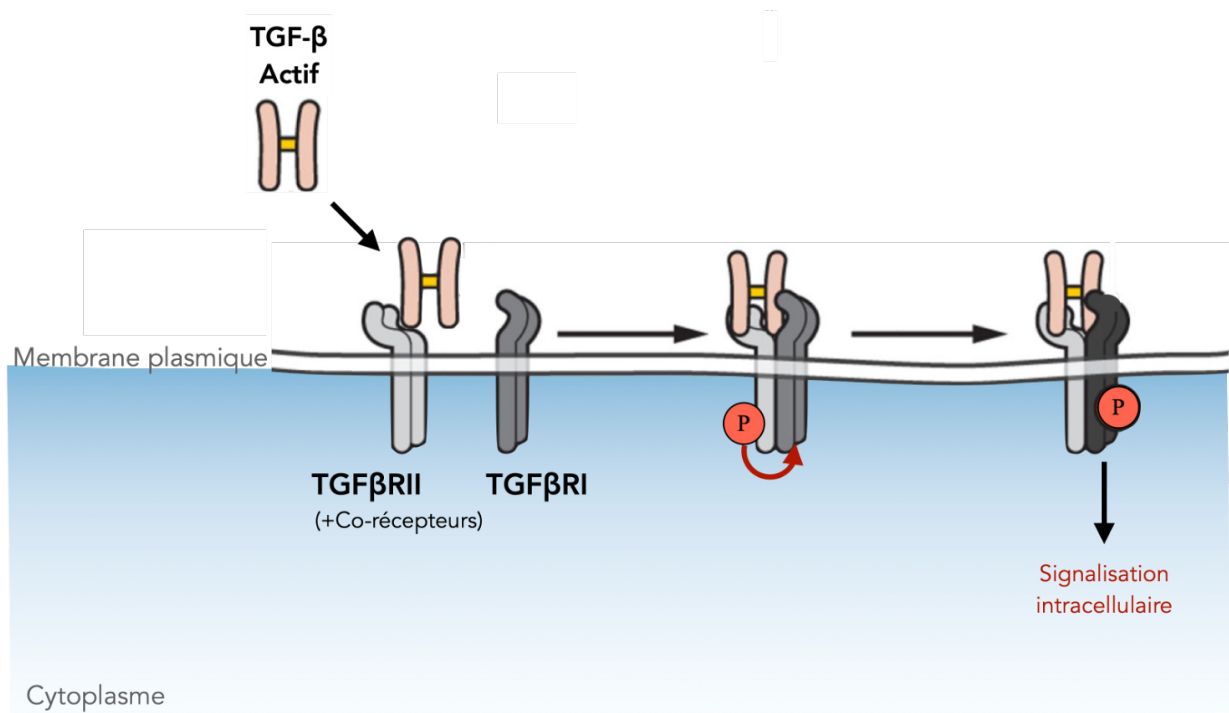


Figure 11 – Fixation du TGF-β avec ses récepteurs membranaires
Adapté de Derynck et Budi, Science Signaling ; 2019

interactions LAP-intégrines nécessitent l'intervention d'une protéase (*e.g.* MMP14) pour que le TGF- β soit libéré du LAP (Mu et al., 2002). En 2011, l'étude de Glinka et al. a mis en évidence, *in vitro*, le rôle de la neuropiline 1 (NRP-1) dans l'activation du TGF- β , lorsque ce dernier est associé à l'intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$ dans un contexte tumoral (Glinka et al., 2011).

L'ensemble de ces mécanismes d'activation ajoutent un niveau supplémentaire à la régulation fine de la biodisponibilité du TGF- β , et donc à la modulation de la transduction des voies de signalisation régulées par cette cytokine.

c. Signalisation intracellulaire du TGF- β

In vivo, le TGF- β actif possède une demi-vie très courte, de l'ordre de deux à trois minutes. Une fois libéré de son LAP, le TGF- β a donc un laps de temps réduit pour se lier à ses récepteurs afin d'initier l'activation de voies de signalisation. On distingue deux groupes de voies de signalisation induites par le TGF- β , les voies dites canoniques (ou SMAD-dépendantes) et les voies non-canoniques (ou SMAD-indépendantes). Ces voies, aux fonctions multiples et parfois redondantes, impliquent de nombreux acteurs cellulaires et sont finement régulées.

i. Les récepteurs au TGF- β

Il existe deux types de récepteurs principaux au TGF- β , les récepteurs de type I (TGF β R1) et les récepteurs de type II (TGF β R2). Ces récepteurs transmembranaires possèdent des rôles bien définis dans la liaison et l'activation des voies de signalisation. Le TGF- β -récepteur de type I (TGF β R1 ou ALK5) doit être phosphorylé pour être actif, alors que le TGF- β -récepteur de type II (TGF β R2) possède une activité kinase constitutivement activée (Lin et al., 1992). Néanmoins, ils partagent des similitudes de structure, avec une région extracellulaire riche en cystéines, une région transmembranaire, et une région intracellulaire à activité Sérine/Thréonine kinase (Heldin and Moustakas, 2016; Hinck, 2012; Weiss and Attisano, 2013).

Une fois sous leur forme active, les trois isoformes du TGF- β partagent le même complexe hétérotétramérique de récepteurs, composé d'un homodimère TGF β R1 et d'un homodimère TGF β R2 (Ehrlich et al., 2012; Gilboa et al., 1998; Heldin and Moustakas, 2016). Les ligand TGF- β 1 et 3 possèdent une affinité supérieure pour le TGF β R2 par rapport au TGF β R1 (Groppe et al., 2008). En revanche, le ligand TGF- β 2 possède une moins forte affinité pour les récepteurs et sa liaison nécessite la contribution d'un co-récepteur, le TGF- β -récepteur de type III (TGF β R3, ou récepteur accessoire au TGF- β). Le TGF β R3 facilite également la liaison du ligand TGF- β 1 avec ses récepteurs (Esparza-Lopez

et al., 2001). D'autres co-récepteurs au TGF- β ont été décrits dans un contexte tumoral, notamment l'endogline ou la neuropiline 1 (Barbara et al., 1999; Glinka et al., 2011; Pérez-Gómez et al., 2010).

La liaison du ligand TGF- β avec l'homodimère TGF β R2 déclenche le recrutement de l'homodimère TGF β R1 et ainsi, induit la formation d'un complexe hétérotétramérique stable. Ce recrutement s'accompagne d'une phosphorylation du TGF β R1, et plus précisément de son domaine GS (riche en glycines et sérines), par le TGF β R2 constitutivement actif (Groppe et al., 2008; Wrana et al., 1994). Une fois phosphorylé, le TGF β R1 transduit une cascade intracellulaire via son activité kinase, en phosphorylant les acteurs protéiques intracellulaires de la voie du TGF- β .

Les délétions hétérozygotes de *TGF β R1* ou du *TGF β R2* chez la souris n'induisent pas de phénotype particulier, alors que la délétion homozygote d'un des deux récepteurs n'est pas viable (*e.g.* défauts cardio-vasculaires majeurs), attestant de l'importance fonctionnelle des 2 récepteurs dans la transduction des signaux TGF- β (Dickson et al., 1995; Larsson et al., 2001; Oshima et al., 1996).

Au-delà des régulations de la biodisponibilité du TGF- β latent et mature, la disponibilité des récepteurs peut également être modifiée. C'est notamment le cas avec le récepteur TrkC qui est décrit, dans les cancers, comme pouvant s'associer au récepteur TGF β R2, bloquant ainsi le recrutement de TGF β R1, et donc l'activation de la voie du TGF- β (Jin et al., 2007). Par ailleurs, la protéine BAMBI, un inhibiteur des BMP et activines, a également été identifié comme perturbateur de la formation du complexe hétérotétramérique en se liant avec le TGF β R1 (Onichtchouk et al., 1999). D'autres protéines membranaires (*e.g.* cadhérines, occludines, intégrines) peuvent également interagir avec les récepteurs, et ainsi, potentialiser ou moduler le signal en aval de ces derniers (Heldin and Moustakas, 2016). Par ailleurs, suite à la fixation du TGF- β , l'internalisation par endocytose des récepteurs - clathrine ou cavéoline-dépendante - permet également une régulation de leur disponibilité à la membrane. Les endosomes déclenchent alors la dégradation lysosomale des complexes ligand-récepteurs ou le recyclage des récepteurs à la membrane pour la liaison d'un éventuel autre ligand (Chen, 2009; Di Guglielmo et al., 2003; Vander Ark et al., 2018).

Un autre type de régulation, médié par l'ubiquitylation, est également décrit dans le cas des récepteurs au TGF- β . L'ubiquitylation nécessite la présence de la protéine SMAD7 (I-SMAD, Inhibitory SMAD), qui peut interagir directement avec le TGF β R1 et recruter les ubiquitines ligases pour stopper la signalisation induite par la fixation du TGF- β à ses récepteurs (Yan and Chen, 2011). Différentes ubiquitines ligases sont impliquées dans ce processus. Les plus étudiées sont SMURF1 et SMURF2, mais l'implication de NEDD4-2 et de WWP1 a également été démontrée. L'ubiquitylation du récepteur de type I permettra la dégradation du complexe ligand récepteur par le protéasome ou le lysosome (Ebisawa et al., 2001; Huang and Chen, 2012; Kavsak et al., 2000). Enfin, SMAD7 est également indirectement impliquée dans les processus de déphosphorylation du TGF β R1 par le

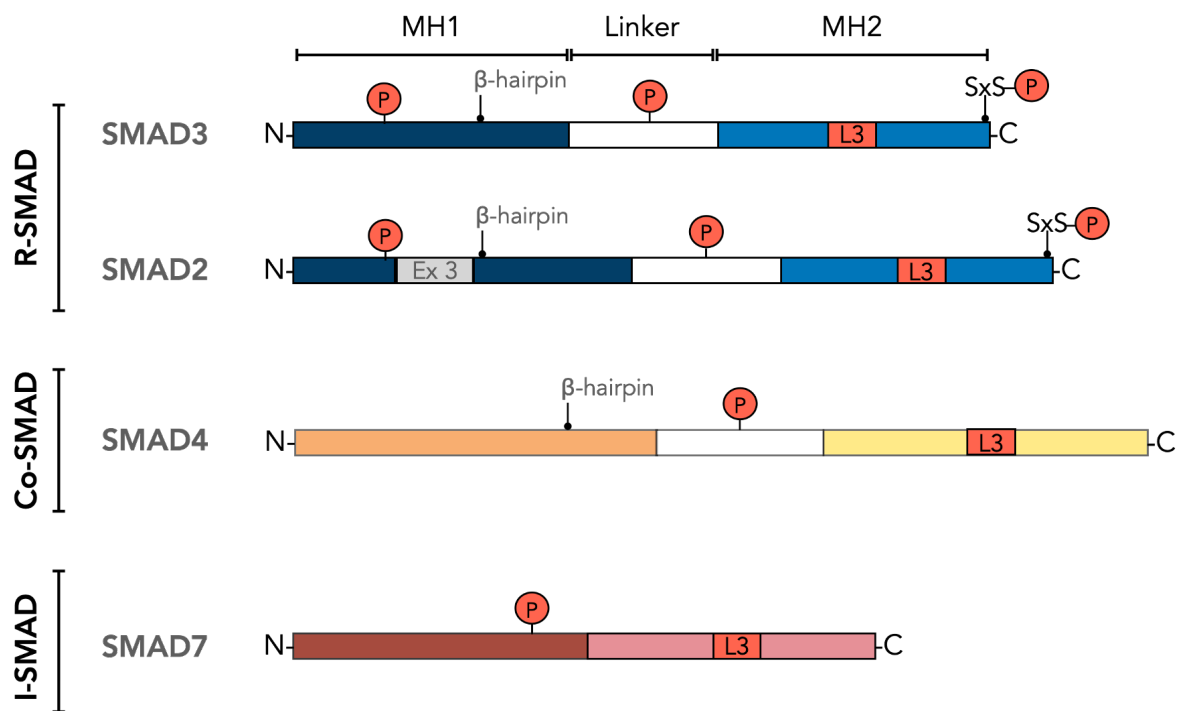


Figure 12 – Les protéines SMAD impliquées dans la voie canonique du TGF- β
Adapté de Derynck et Budi, Science Signaling ; 2019

recrutement de GADD34 et de la protéine phosphatase 1 (PP1), inhibant l'activation des effecteurs de la voie (Shi et al., 2004).

Les récepteurs au TGF- β , point de départ de la signalisation, sont donc soumis à de nombreuses régulations. L'ensemble de ces signaux potentialisent ou inhibent les cascades de signalisations du TGF- β , divisées en deux groupes : la voie canonique et les voies non-canoniques.

ii./ La voie canonique du TGF- β

1. Les SMAD, effecteurs centraux de la voie canonique

La liaison du ligand et l'activation des récepteurs permet le recrutement et la phosphorylation des effecteurs cytoplasmiques de la voie canonique du TGF- β , appartenant à la famille des facteurs de transcription SMAD (Sma and Mothers Against Decapentaplegic related proteins). La famille des SMAD est également phosphorylée en réponse aux BMP, à l'AMH, aux activines et à nodal.

Il existe huit protéines SMAD, divisées en trois groupes distincts :

- R-SMADs, correspondant aux acteurs immédiatement régulés par les récepteurs
- co-SMAD, relatif au facteur commun aux R-SMAD
- I-SMAD, pour les SMAD dits inhibiteurs des voies de signalisation

Il existe cinq R-SMAD, SMAD2 et SMAD3 étant phosphorylées en réponse au TGF- β , aux activines et à Nodal, alors que SMAD1, SMAD5 et SMAD9 (aussi connues sous le nom de SMAD8) sont phosphorylées en réponse aux BMP ou à l'AMH. De manière générale, les R-SMAD ont la capacité de se lier directement aux récepteurs pour être phosphorylées par leurs sous-unités kinases. Une fois les R-SMAD phosphorylées, elles pourront former un complexe avec l'unique co-SMAD (SMAD4), et ainsi, être transloquées dans le noyau pour exercer leur rôle de facteurs de transcription. Les I-SMAD, au nombre de deux (SMAD6 et SMAD7), sont impliquées dans les processus de régulations et de rétrocontrôles des voies (Derynck and Budi, 2019; Massague and Wotton, 2000).

Il est important de mentionner que ce modèle n'est pas si cloisonné, puisque le TGF- β peut induire la phosphorylation des SMAD1, 5 et 9 dans des cellules endothéliales ou tumorales (Daly et al., 2008). Cependant, cette partie abordera les mécanismes spécifiques aux protéines de la voie canonique du TGF- β , à savoir SMAD2, SMAD3 et SMAD4.

SMAD2, SMAD3 et SMAD4 présentent une homologie de structure avec un domaine MH1 (Mad Homology 1) en N-Terminal, un domaine linker central et un domaine MH2 (Mad Homology 2) en C-

Terminal. Les I-SMAD diffèrent principalement par l'absence du domaine MH1 (Hata and Chen, 2016; Weiss and Attisano, 2013).

Le domaine MH1 est responsable de la liaison des SMAD à l'ADN. En effet, cette région protéique porte une séquence de localisation nucléaire (NLS), permettant aux R-SMAD et à SMAD4 d'être transloquées dans le noyau afin d'exercer leur rôle de facteurs de transcription. C'est également cette région qui dispose d'un domaine de liaison à l'ADN, organisé en structure dite « épingle à cheveux » (β -haripin), qui se lie au niveau de l'ADN aux séquences nucléotidiques spécifiques aux SMAD (SBE, SMAD Binding Element), également dénommées boîtes CAGA. Cependant, bien que SMAD2 possède cette séquence de fixation à l'ADN, il s'avère que cette protéine n'est pas retrouvée directement liée à la chromatine. Des analyses cristallographiques ont montré qu'une insertion de trente acides aminés – correspondant à l'exon 3 - immédiatement en aval de la séquence de fixation à l'ADN, perturbe la reconnaissance et la liaison de SMAD2 à la chromatine (Heldin and Moustakas, 2012; Massagué et al., 2005; Shi et al., 1998; Weiss and Attisano, 2013). Par ailleurs, les R-SMAD peuvent être phosphorylées sur plusieurs résidus Sérine et Thréonine localisées dans le domaine MH1. Ces phosphorylations, médiées par les CDK ou les voies non-canoniques du TGF- β , sont pour la plupart responsables de l'inhibition du signal SMAD-dépendant (*e.g.* ubiquitinylation, régulation de l'activité) (Wrighton et al., 2009).

Le domaine MH2, positionné en C-Terminal, est associé à la formation des complexes SMAD. Pour les R-SMAD seulement, ce domaine est également impliqué dans les processus de fixation et de phosphorylation par les récepteurs de type I. En effet, une région du domaine MH2 est composée d'une suite de 17 acides aminés formant une structure appelée « L3 loop ». Cette structure permet l'interaction des R-SMAD avec leur récepteur, entraînant leur phosphorylation (Chacko et al., 2001; Lo et al., 1998). SMAD2 et SMAD3 possèdent des sites qui peuvent être phosphorylés par le domaine kinase de TGF β R1. Ces sites sont caractérisés par la présence de deux résidus sérines au sein de motifs de type (S)SXS - (Sérine)-Sérine-Autre-Sérine - (Wrighton et al., 2009). Ces phosphorylations ont pour conséquences *i)* la formation de dimères de R-SMAD phosphorylés, *ii)* l'association de ces dimères avec SMAD4, formant ainsi des hétérotrimères. Il existe trois types d'hétérotrimères : SMAD2-SMAD2-SMAD4, SMAD2-SMAD3-SMAD4 et SMAD3-SMAD3-SMAD4. Sous cette forme hétérotrimérique, le complexe SMAD peut s'associer à d'autres facteurs protéiques (Chacko et al., 2001, 2004; Massagué et al., 2005). Le domaine MH2 est également caractérisé par la présence d'une séquence signal d'export nucléaire (NES, Nuclear Export Signal), participant à l'export des R-SMAD et Co-SMAD hors du noyau. En alternance avec l'action du NLS, cette région supportera la fonction de navette entre le noyau et le cytoplasme, essentielle aux fonctions des SMAD (Chen and Xu, 2011).

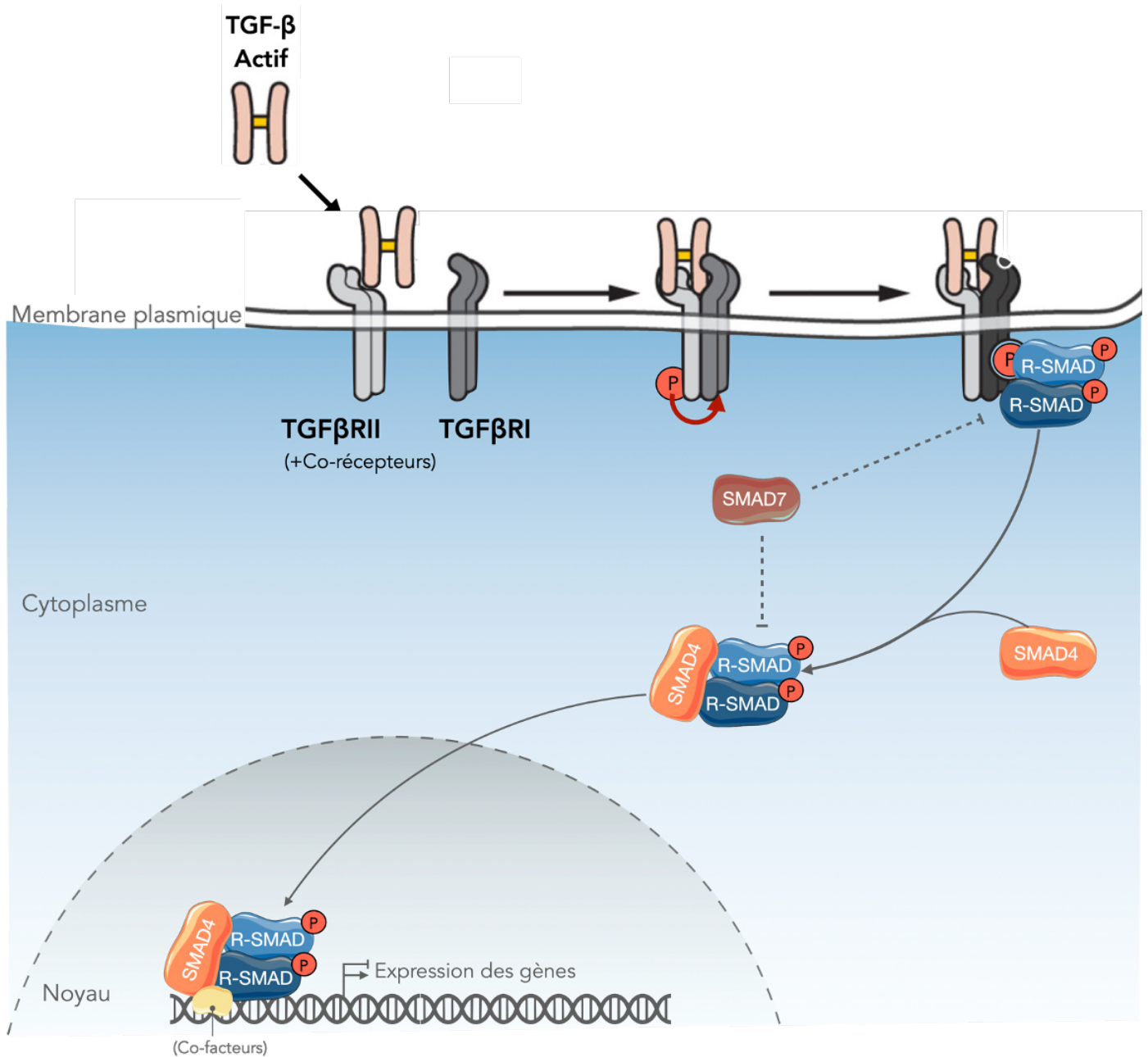


Figure 13 – La voie canonique du TGF- β
Adapté de Derynck et Budi, Science Signaling ; 2019

Le Linker, région centrale entre les deux domaines Mad Homology, est riche en résidus sérines et thréonines phosphorylables par les kinases des voies non canoniques du TGF- β ou encore les kinases dépendantes des cyclines (CDK). La plupart du temps, ces phosphorylations conduisent à la régulation négative de la voie canonique du TGF- β (Massagué, 2003; Wrighton et al., 2009). Cependant, des études ont montré que les phosphorylations du linker des R-SMAD étaient à l'origine de mécanismes complexes, notamment dans les cancers, indépendamment de la phosphorylation C-Terminal induit par le récepteur au TGF- β (Kamato et al., 2020; Murata et al., 2014; Sekimoto et al., 2007). Par ailleurs, la région linker est également la cible des ubiquitines ligases telles que SMURF2 ou NEDD4L, conduisant à la dégradation des SMAD par le protéasome (Gao et al., 2009; Zhang et al., 2001).

Comme mentionné dans la partie précédente, l'endocytose clathrine-dépendante des récepteurs est un mécanisme de régulation des voies du TGF- β . Cependant, il a été montré que l'endocytose pouvait également potentialiser la propagation intracellulaire du signal du TGF- β , médiée par les SMAD (Penheiter et al., 2002).

En résumé, une fois phosphorylées par TGF β R1 au niveau des sérines du domaine MH2, SMAD2 et SMAD3 forment alors un hétérotrimère avec SMAD4, déclenchant leur translocation dans le noyau et le recrutement d'autres co-facteurs (*e.g.* facteurs de transcription, histones acétyltransférases, méthyltransférases) afin de réguler l'expression des gènes cibles (Derynck and Budi, 2019). La structure en épingle à cheveux du domaine MH1 permet la liaison à l'ADN de SMAD3 et de SMAD4. SMAD2 ne pourra pas se lier à l'ADN du fait d'un insert, correspondant à l'exon 3 de SMAD2, qui interfère avec la structure en épingle à cheveux (Shi et al., 1998). Une séquence spécifique, appelée CAGA ou SMAD Binding Element (SBE), permet la fixation à la chromatine du domaine MH1 de SMAD3 et de SMAD4 (Shi et al., 1998; Zawel et al., 1998). La spécificité de la réponse cellulaire au TGF- β est contexte-dépendant puisqu'elle varie en fonction des différents partenaires protéiques du complexe SMAD (Massague and Wotton, 2000; Massagué, 2000; Seoane et al., 2004).

Il existe en effet une compétition entre SMAD4 et d'autres facteurs à même de se lier aux protéines SMAD2 et SMAD3. Par exemple, le Facteur Transcriptionnel Intermédiaire 1 γ (TIF1 γ), ou encore IKK α , lorsqu'ils forment un complexe avec SMAD2 et/ou SMAD3, régulent respectivement, la différenciation des cellules progénitrices hématopoïétiques ou la prolifération et la différenciation des kératinocytes (Descargues et al., 2008; He et al., 2006).

Outre ses rôles dans la transcription des gènes, la voie de signalisation SMAD-dépendante est également impliquée dans des processus de régulations des ARN. En effet, les R-SMAD peuvent s'associer à divers cofacteurs capables de réguler l'épissage des ARN, la maturation des micro-ARN ou encore la

méthylation des ARN messagers (Bertero et al., 2018; Davis et al., 2008; Derynck and Budi, 2019; Tripathi et al., 2016).

2. Régulation de la voie canonique

La voie canonique du TGF- β est finement régulée.

Certains facteurs peuvent la potentialiser. C'est notamment le cas de la protéine liée à la membrane SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation), qui facilite et stabilise l'association de SMAD2 et SMAD3 avec TGF β R1, et favorise de fait la phosphorylation de ces R-SMAD (Miura et al., 2000; Tsukazaki et al., 1998). C'est aussi le cas de certains corécepteurs du TGF- β décrits dans la partie II-c-i. D'autres facteurs protéiques (*e.g.* p300, CREB) appelés co-activateurs des SMAD, peuvent se lier au complexe hétérotrimérique pour favoriser la liaison à la chromatine et la régulation des gènes cibles (Derynck and Zhang, 2003).

De nombreux mécanismes de régulations négatives de la voie canonique du TGF- β sont également décrits dans la littérature. L'un des plus étudiés est l'action de la protéine SMAD7, qui est d'ailleurs codé par un gène cible de la voie canonique du TGF- β . Cette protéine SMAD inhibitrice (I-SMAD) peut réguler l'action des R-SMAD par compétition à la fixation au domaine kinase du récepteur TGF β R1. La fixation de SMAD7 au niveau de TGF β R1 favorise le recrutement des ubiquitines ligases SMURF1/2, contrôlant la dégradation - par le protéasome et le lysosome - des récepteurs et des R-SMAD. D'autres études ont montré que SMAD7 pouvait réguler la fixation des complexes SMAD au niveau de la chromatine, empêchant ces facteurs de transcription d'agir sur leurs gènes cibles (Massagué and Chen, 2000; Miyazawa and Miyazono, 2017). Les SMAD peuvent aussi s'associer avec des co-répresseurs transcriptionnels tels que SKI ou SNON, dont l'expression est également régulée par le TGF- β , qui empêchent la formation du complexe hétérotrimérique ou qui permettent le recrutement d'autres co-répresseurs et histones déacétylases s'opposant à la régulation des gènes cibles (Deheuninck and Luo, 2009; Luo et al., 1999).

Comme mentionné auparavant, les SMAD possèdent des sites de phosphorylation au niveau de la région linker, pouvant conduire à leur inhibition. Ainsi, la kinase ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) fait partie des acteurs pouvant phosphoryler le linker des SMAD. Cette phosphorylation conduit à leur séquestration cytoplasmique, et les empêche ainsi d'exercer leur rôle de facteurs de transcription (Kretschmar et al., 1999; Wrighton et al., 2009). Par ailleurs, l'interaction des R-SMAD avec la protéine FoxH1 déclenche la séquestration nucléaire des R-SMAD, même sous leur forme inactive (Xu et al., 2002). SMAD4 peut également être phosphorylée (Thréonine 276) par la protéine ERK conduisant à sa séquestration dans le noyau (Roelen et al., 2003). Enfin, la régulation du signal par les phosphatases permet de mettre fin au signal induit par le TGF- β . En effet, il a été montré que l'export des SMAD hors

du noyau était dépendant de la déphosphorylation des R-SMAD. Plusieurs phosphatases sont impliquées dans ce processus : on peut notamment citer la protéine phosphatase 1A (PPM1A). Cette déphosphorylation permet la dissociation du complexe hétérotrimérique, le transfert nucléocytoplasmique, mais favorise également la dégradation des R-SMAD (Bruce and Sapkota, 2012; Lin et al., 2006; Wrighton et al., 2009).

Enfin, des modifications post-traductionnelles régulent l'activité des SMAD. C'est le cas des ubiquitylations sur les résidus lysines des R-SMAD, par des ubiquitines ligases de type SMURF ou NEDD4, par exemple. Ces ubiquitylations sont responsables de l'inhibition de la liaison à l'ADN ou de la dégradation des R-SMAD, mettant fin à la signalisation intracellulaire du TGF- β (Soond and Chantry, 2011; Xu et al., 2016). D'autres modifications, telles que les sumoylations ou l'acétylation, peuvent également affecter les lysines des SMAD. Généralement, ces deux processus ne sont pas responsables de la dégradation des SMAD, mais sont impliqués dans la régulation de leur localisation cellulaire et de leur association avec d'autres facteurs protéiques (Khodzhigorova et al., 2012; Tu and Luo, 2007; Xu et al., 2016).

La voie canonique du TGF- β repose donc sur l'activité des SMAD, capables de s'associer à de multiples co-facteurs pour réguler la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans des processus multiples.

iii. Les voies non-canoniques du TGF- β

Des voies de signalisation indépendantes des SMAD sont également induites par le TGF- β . Ces voies, dites "non-canoniques", peuvent aussi être stimulées en réponse à d'autres facteurs de croissance, tels que le FGF, le PDGF ou encore le VEGF. Les nombreux effecteurs de ses voies, ainsi que leurs nombreuses interactions, participent au large spectre de gènes régulés par le TGF- β (Derynck and Budi, 2019; Massagué, 2012; Moustakas and Heldin, 2005).

Le TGF β R2, en plus de sa capacité à recruter et à activer le TGF β R1 par phosphorylation, peut également recruter et phosphoryler directement des acteurs de la signalisation intracellulaire, à même d'initier des voies de signalisation (Zhang, 2009).

Généralement, on distingue trois groupes de voies de signalisations non-canoniques avec i) les voies dépendantes des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), telles que ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), p38 ou encore JNK (c-Jun N-terminal Kinase), ii) la voie de la kinase phosphatidylinositol 3 (PI3K)-AKT, et iii) les voies liées aux petites GTPases (Derynck and Budi, 2019; Zhang, 2017).

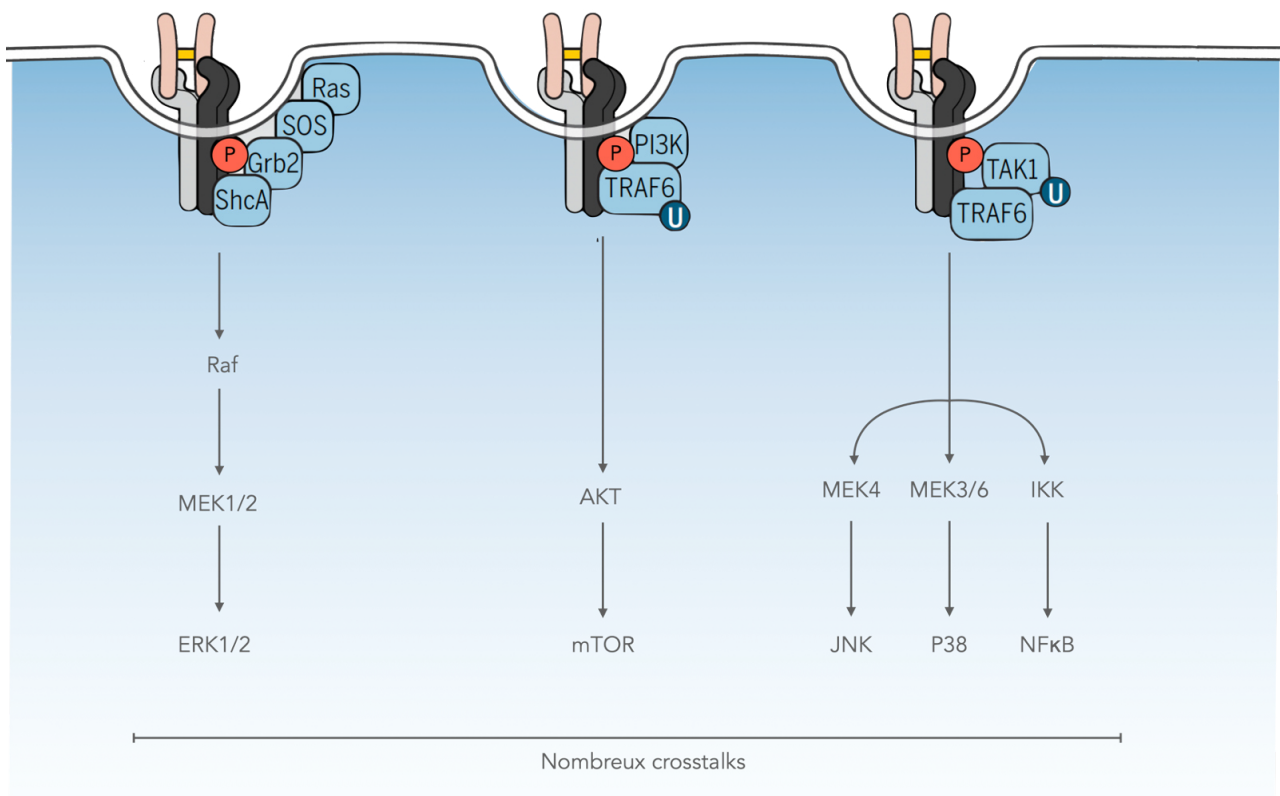


Figure 14 – Les voies non-canoniques du TGF- β
Adapté de Derynck et Budi, Science Signaling ; 2019

1. Voie ERK-MAPK

Tout d'abord, à l'instar d'autres récepteurs à tyrosine kinase, le récepteur au TGF- β peut recruter et activer très rapidement la protéine RAS, aboutissant à l'activation par phosphorylation des MAPK nommées ERK1/2 (Hartsough and Mulder, 1995; Zhang, 2017). L'activation de RAS est dépendante du recrutement et de la phosphorylation de la protéine SHC1 (Src Homolog domain Containing transforming protein 1) par le récepteur au TGF- β , qui forme un complexe avec GRB2 (Growth factor Receptor Bound protein 2) et SOS (Son Of Sevenless) au niveau du récepteur (Lee et al., 2007). Une fois RAS activé, la cascade de signalisation des MAPK est initiée, en passant par RAF et MEK1/2, pour activer les protéines ERK1/2, déclenchant la régulation de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la motilité, et plus particulièrement l'EMT - Transition Epithélio-Mésenchymateuse - (Lee et al., 2007; Mulder, 2000; Zhang, 2009). La phosphorylation des récepteurs au TGF- β permet également le recrutement de l'ubiquitine ligase TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factor 6) capable de jouer le rôle de plateforme pour le recrutement et l'activation de la kinase TAK1 (TGF- β Activated Kinase 1) par ubiquitinylation (Yamashita et al., 2008). D'autres études ont montré un rôle similaire pour l'ubiquitine ligase TRAF4 (Zhang et al., 2013a). L'activation de TAK1 permet l'initiation de la voie des MAPK, notamment par l'activation de MEK4 et MEK3/6 qui permettront l'activation respective de JNK et p38. Ces MAPK sont particulièrement décrites dans l'activation de gènes impliqués dans les processus d'apoptose, de migration et d'invasion (Koul et al., 2013; Wagner and Nebreda, 2009; Zhang, 2017).

2. Voie PI3K-AKT

D'autre part, la voie PI3K/AKT est également activée par la fixation du ligand TGF- β sur son récepteur. AKT est une kinase impliquée dans de nombreux processus, notamment, la survie cellulaire, la prolifération ou encore le métabolisme (Zhang, 2017). PI3K peut se fixer de manière constitutive au récepteur de type 2 du TGF- β . Dans le cas de la liaison du TGF- β à son récepteur, PI3K pourra également lier le TGF β R1 (Yi et al., 2005). Les interactions avec le récepteur au TGF- β sont indirectes et nécessitent la présence de protéines telles que TRAF6 (Yang et al., 2009). PI3K génère alors du PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) qui module l'activité de plusieurs molécules dont AKT. Une fois activée, AKT peut réguler de nombreux facteurs de transcription, impliqués notamment dans l'EMT (*e.g.* *SNAIL* ou *TWIST*) (Xue et al., 2012; Zhang, 2017; Zhou et al., 2004). En réponse au TGF- β , la protéine AKT activée régule de nombreux facteurs protéiques tels que GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 Beta) ou les complexes mTOR (mammalian Target of Rapamycin) pour promouvoir l'augmentation de la taille cellulaire, la synthèse protéique, ou encore l'EMT (Lamouille and Derynck, 2007; Lamouille et al., 2012; Zhang, 2017). Dans les cancers, cette voie est très souvent dérégulée

conduisant à une reprogrammation du métabolisme, l'inhibition de l'apoptose, la prolifération et la migration des cellules cancéreuses (Fresno Vara et al., 2004; Hennessy et al., 2005; Hoxhaj and Manning, 2020). Dans les cancers pancréatiques, l'activation constitutive de KRAS ou l'inactivation de l'inhibiteur de PI3K nommé PTEN, participent à la dérégulation de la voie PI3K-AKT, contribuant ainsi à la métaplasie acino-canalaire, la prolifération et la survie des cellules cancéreuses et à la résistance aux traitements (Baer et al., 2015).

3. Voie des Rho-GTPases

Enfin, l'activation du récepteur au TGF- β est associée à la régulation des Rho-GTPases, connues pour contrôler la motilité cellulaire, notamment en régulant la dynamique du cytosquelette. Dans les cellules épithéliales, le TGF- β , indépendamment des SMAD, permet le passage de la GTPase RhoA de sa forme inactive, liée au GDP, à sa forme active, liée au GTP : ceci favorise la transition épithélio-mésenchymateuse par remodelage du cytosquelette d'actine (Bhowmick et al., 2001; Edlund et al., 2002). Par ailleurs, RhoA-GTP peut activer la voie des MAPK, en phosphorylant directement p38 ou JNK (Coso et al., 1995; Javelaud and Mauviel, 2005). De manière surprenante, l'étude d'Ozdamar *et al.* a montré qu'en réponse au TGF- β , le TGF β R2 régule négativement la voie RhoA en se localisant près des jonctions serrées. Plus précisément, suite à la liaison du ligand, le TGF β R2 recrute et phosphoryle la protéine PAR6, qui recrute à son tour l'ubiquitine ligase SMURF1. Ce complexe désactive la protéine RhoA (sous sa forme GDP), ce qui permet la dissolution des jonctions serrées, un processus indispensable à l'EMT (Ozdamar et al., 2005). D'autres protéines de la famille des petites GTPases, comme CDC42 (Cell Division Cycle 42) ou RAC1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) sont régulées par les récepteurs au TGF- β indépendamment des SMAD. Ces GTPases pourront, à leur tour, réguler les voies des MAPK (Barrios-Rodiles et al., 2005; Melzer et al., 2017; Wilkes et al., 2003).

4. Régulation et interaction des voies non-canoniques

Au même titre que la voie canonique, les voies non-canoniques sont également finement régulées. On peut citer, par exemple, l'endocytose des récepteurs au TGF- β , qui est cette fois-ci, cavéoline-dépendante et qui favorise la propagation intracellulaire du signal. Les modulations de ces voies sont nombreuses, complexes et agissent au niveau des récepteurs et des acteurs intracellulaires des voies concernées (Hodge and Ridley, 2016; Huang et al., 2009; Ramos, 2008).

Enfin, il s'avère qu'il existe de nombreuses interactions avec d'autres voies de signalisation. Les plus connues impliquent la voie des MAPK, qui interagit avec la voie canonique en phosphorylant les SMAD

au niveau du linker ou en se liant avec le complexe SMAD hétérotrimérique, afin de réguler négativement leur activité (Javelaud and Mauviel, 2005; Massagué, 2003; Verrecchia et al., 2001). Les phosphorylations des SMAD par les MAPK et/ou les protéines kinases associées à Rho (ROCK) ne se limitent pas à leur modulation, puisque certaines phosphorylations (en N-Terminal ou au linker) confèrent un gain d'activité des SMAD qui coopèrent alors avec les voies non-canoniques (Funaba et al., 2002; Kamaraju and Roberts, 2005; Mori et al., 2004; Wrighton et al., 2009).

La voie du TGF- β , par ses récepteurs ou ses acteurs intracellulaires, qui interagit également avec des acteurs des voies JAK/STAT, NF κ B ou encore YAP/TAZ, dans des contextes fibrotiques ou oncogéniques par exemple (Derynck and Budi, 2019; Di-Luoffo et al., 2021; Freudlsperger et al., 2013; Gingery et al., 2008; Tang et al., 2017).

Cette liste (non exhaustive) des interactions entre les voies du TGF- β et d'autres voies de signalisation montre les régulations nombreuses et complexes qui règnent au sein de la cellule.

En résumé, la fixation du TGF- β sur ses récepteurs induit l'activation de nombreux facteurs intracellulaires, initiant des voies de signalisation impliquées dans des mécanismes - parfois antinomiques - de prolifération, de migration, d'invasion, de survie ou encore d'apoptose. L'ensemble de ces voies et des interactions participe à la diversité des gènes régulés et renforce donc le caractère pléiotropique du TGF- β .

d. Les rôles physiologiques du TGF- β

La diversité et la complexité des voies de signalisation initiées par le TGF- β permettent d'expliquer la multiplicité des processus régulés par cette cytokine. Cette partie - non exhaustive - est dédiée à la description des principales fonctions biologiques du TGF- β , allant du développement à la mort cellulaire.

i./ TGF- β et développement

Au cours du développement et de l'organogenèse, le TGF- β est particulièrement décrit pour ses capacités à induire des mécanismes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse, la migration, la différenciation ou l'apoptose (Wu and Hill, 2009). Ces mécanismes sont très finement régulés temporellement et spatialement. L'élaboration de multiples modèles murins génétiquement modifiés a permis d'étudier les rôles de la voie du TGF- β dans le développement (Dunker and Kriegstein, 2000).

Les délétions hétérozygotes de TGF β R1 ou de TGF β R2 chez la souris ne déclenchent pas de phénotype particulier, alors que la délétion homozygote d'un des deux récepteurs conduit à la mort prématurée des souris (défauts cardio-vasculaires majeurs entre autres) (Dickson et al., 1995; Larsson et al., 2001; Oshima et al., 1996; Wurdak et al., 2005). Dès les stades précoces du développement, le TGF- β joue notamment un rôle important dans la migration et la différenciation des cellules des crêtes neurales (Le Douarin and Dupin, 2003). L'étude de *Wurdak et al.* montre en effet que l'inactivation de TGF β R2 chez la souris empêche la différenciation des cellules des crêtes neurales, contribuant à des malformations cardiaques et à diverses anomalies non-viables (Wurdak et al., 2005).

Au même titre que les délétions des récepteurs, les mutations germinales des gènes *TGF- β 2* ou *TGF- β 3* sont associées à des anomalies du développement et à une mortalité périnatale (Dunker and Krieglstein, 2000; Kaartinen et al., 1997; Sanford et al., 1997). Par ailleurs, la délétion du ligand TGF- β 1 est caractérisée par une inflammation excessive liée à une infiltration lymphocytaire et macrophagique très importante dans le cœur et les poumons, causant la mort prématurée des souris (Dunker and Krieglstein, 2000; Kulkarni et al., 1993; Shull et al., 1992). Enfin, SMAD2 et SMAD4 sont impliquées dans l'établissement et le maintien de la polarité dorso-ventrale de l'embryon. Les souris déficientes pour une de ces protéines ne sont pas viables et les embryons sont caractérisés par des anomalies et des retards de développement des structures embryonnaires (Dunker and Krieglstein, 2000; Sirard et al., 1998; Waldrip et al., 1998; Weinstein et al., 1998). Cependant, les souris mutées pour SMAD3 sont viables mais développent assez rapidement des carcinomes colorectaux (Zhu et al., 1998).

L'ensemble de ces modèles murins montrent l'importance des ligands et des effecteurs de la voie du TGF- β dans la régulation de la structuration de l'organisme, dès les stades primitifs du développement embryonnaire.

ii./ Implication du TGF- β dans l'homéostasie tissulaire

Un des rôles physiologiques majeurs du TGF- β est le maintien d'une prolifération cellulaire raisonnée, appelée cytotase. Un dysfonctionnement de ce contrôle peut conduire à une prolifération cellulaire incontrôlée, fréquemment observée dans les cancers.

Tout d'abord, la voie canonique (SMAD-dépendante) du TGF- β régule l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Parmi ces gènes cibles, on retrouve des médiateurs de la prolifération cellulaire comme le gène *c-MYC* et les trois membres de la famille de gène *ID* (Inhibitor of DNA binding), tous réprimés par le complexe SMAD2/3/4 (Kang et al., 2003; Pietenpol et al., 1990;

Siegel and Massague, 2003). La répression de *c-MYC* est directement dépendante de la protéine SMAD3, qui se fixe sur une région spécifique de son promoteur, appelée TIE - TGF- β Inhibitor Element - (Frederick et al., 2004). D'autres gènes cibles, tels que *CDKN1A* (P21) et *CDKN2B* (P15), sont stimulés par le TGF- β et codent pour deux protéines inhibitrices des kinases cyclines-dépendantes. P21^{CIP1/WAF1} et P15^{INK4B} arrêteront la progression du cycle cellulaire en phase G1 (Datto et al., 1995; Grau et al., 1997; Hannon and Beach, 1994). Il est intéressant de noter que la répression de *c-MYC* permet également l'augmentation de la transcription des gènes *CDKN1A* et *CDKN2B* (Seoane et al., 2001, 2002).

D'autre part, le rôle cytostatique du TGF- β met en avant une autre fonction de cette cytokine : l'initiation des mécanismes d'apoptose. En effet, l'arrêt du cycle cellulaire peut être accompagné par l'induction d'un programme transcriptionnel apoptotique (Siegel and Massague, 2003). Cependant, les mécanismes exacts restent à éclaircir et dépendent du contexte transcriptionnel, du contexte micro-environnemental et du type cellulaire concerné. On peut citer trois gènes stimulés par le TGF- β et impliqués dans les processus de mort cellulaire : *TIEG*, *SHIP* et *BIM* (Zhang et al., 2017). Le TGF- β stimule l'expression de *TIEG* (TGF- β Inducible Early-response Gene), un facteur de transcription qui réprime l'expression de l'inhibiteur de l'apoptose *BCL2* (B-Cell Lymphoma 2) et de la kinase DAP (Death-Associated Protein), conduisant à l'augmentation de l'activité des caspases et donc à une induction de l'apoptose. De plus, la voie canonique du TGF- β induit l'expression des gènes pro-apoptotiques *BIM* (Bcl2-Interacting Mediator of cell death) et *BMF* (Bcl2-Modifying Factor), qui interagissent avec *BCL2* et l'inactive (Ramesh et al., 2008; Tachibana et al., 1997). Par ailleurs, il a été démontré que l'expression du gène pro-apoptotique *SHIP* (SH2-domain containing Inositol-5-Phosphatase) est induite par le TGF- β de manière SMAD-dépendante dans les cellules hématopoïétiques (Valderrama-Carvajal et al., 2002).

En résumé, le TGF- β est une cytokine cytostatique pouvant initier des processus impliqués dans la mort cellulaire par apoptose. Cependant, en fonction du type cellulaire et du contexte micro-environnemental, les réponses cellulaires peuvent se révéler ambivalentes (David and Massagué, 2018; Siegel and Massague, 2003; Zhang et al., 2017).

iii./ Régulation de l'activité du système immunitaire par le TGF- β

Il est également important de mentionner le rôle prédominant du TGF- β dans la régulation des fonctions immunitaires. En effet, le TGF- β module le comportement de nombreuses cellules impliquées dans les réponses immunitaires innées et adaptatives, participant ainsi, à l'immunotolérance (David and Massagué, 2018). Ainsi, les souris totalement déficientes en TGF- β 1 subissent une inflammation

excessive de plusieurs organes (*e.g.* cœur, poumons) provoquant leur mort prématurée (Kulkarni et al., 1993).

Dans l'immunité innée, le TGF- β est notamment décrit pour limiter l'action des macrophages, des neutrophiles ou encore des cellules NK (Ashcroft, 1999; Batlle and Massagué, 2019; Sanjabi et al., 2017; Viel et al., 2016).

Au cours de l'immunité adaptative, la fonction majeure du TGF- β est l'inhibition des fonctions des cellules dendritiques et des lymphocytes T-effecteurs. En effet, cette cytokine inhibe les signaux de prolifération et d'activation des lymphocytes T-effecteurs, mais surtout, contribue au développement des lymphocytes T-régulateurs et de leurs fonctions immunosuppressives (Batlle and Massagué, 2019; Budhu et al., 2017; Ghiringhelli et al., 2005; Thomas and Massagué, 2005). Les modèles murins portant une mutation du ligand TGF- β 1 ou de l'un de ses deux récepteurs, spécifiquement sur les lymphocytes T, développent une hyper-activation des lymphocytes T effecteurs jusqu'à atteindre une auto-immunité sévère (Li et al., 2006, 2007b; Liu et al., 2008; Marie et al., 2006). Le TGF- β régule également la prolifération, l'activation et la différenciation des lymphocytes B, les cellules spécialisées dans la sécrétion des immunoglobulines (Cazac and Roes, 2000; Kehrl et al., 1986; Sanjabi et al., 2017). Les souris déficientes pour l'un des acteurs de la voie du TGF- β , spécifiquement au niveau des lymphocytes B, sont quasiment dépourvues d'immunoglobulines (Borsutzky et al., 2004; Klein et al., 2006). D'autres acteurs de l'immunité, tels que les cellules myéloïdes, sont régulées négativement par le TGF- β (Sanjabi et al., 2017). Néanmoins, il apparaît que le TGF- β participe à la différenciation et aux fonctions immunosuppressives d'une sous-population de cellules myéloïdes, les MDSC - Myeloid-Derived Suppressor Cells - (Lee et al., 2018).

Ces observations soulignent le rôle primordial du TGF- β et de ses effecteurs dans la prolifération et la différenciation de nombreux acteurs immunitaires tout en maintenant une certaine tolérance immunitaire en modulant les réactions inflammatoires.

iv./ Impact du TGF- β au cours de la cicatrisation

Au cours de la cicatrisation, le TGF- β stimule la réparation et la régénération des tissus altérés. Ce rôle de réparation est profondément associé à sa capacité de régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), comme lors du développement embryonnaire. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle prépondérant du TGF- β dans l'induction de ce processus d'EMT (Kalluri and Weinberg, 2009; Xu et al., 2009). En effet, le TGF- β initie un programme transcriptionnel contribuant à l'expression de gènes impliqués notamment dans la régulation des jonctions entre les cellules, la dynamique du cytosquelette et la formation de protrusions cellulaires (Xu et al., 2009). Durant la

cicatrisation, outre son rôle dans la ré-épithélialisation associée à l'EMT, le TGF- β est impliqué dans les processus de néo-angiogenèse en favorisant la prolifération des cellules endothéliales (Li et al., 2007a; Pakyari et al., 2013). Les mécanismes de cicatrisation sont également étroitement liés à ceux de la fibrose, dans lesquels le TGF- β est engagé (Biernacka et al., 2011). Ainsi, le TGF- β favorise la prolifération et la différenciation des fibroblastes, mais aussi la production et la sécrétion des composants de la matrice extracellulaire (*e.g.* collagènes, fibronectine) par ces mêmes fibroblastes (Barrientos et al., 2008; Krummel et al., 1988; Morikawa et al., 2016; O'Kane and Ferguson, 1997).

En conclusion, le TGF- β est une cytokine ubiquitaire et pléiotropique, impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires au cours du développement, et jouant également un rôle dans le maintien de l'homéostasie, de la réparation tissulaire ou dans le contrôle de l'activité immunitaire. Logiquement, le corollaire est que les dérégulations de cette voie ont des conséquences importantes et multiples. C'est notamment le cas dans les cancers, et tout particulièrement dans les cancers pancréatiques, dans lesquels cette la voie fait partie des plus dérégulées.

III- La dualité fonctionnelle du TGF- β dans l'ADKP

Le TGF- β est une cytokine impliquée dans de nombreux processus physiologiques complexes, via la transduction de nombreuses cascades de signalisation. Les dérégulations de la voie du TGF- β ont donc réciproquement des répercussions importantes sur l'homéostasie cellulaire et tissulaire, occasionnant des dysfonctionnements majeurs, notamment impliqués dans la survenue de cancers. Compte-tenu de la multiplicité des processus cellulaires régulés par le TGF- β , notamment en fonction du contexte cellulaire, les conséquences de ces dysfonctionnements sont multiples et parfois ambivalentes. Ainsi, dans les adénocarcinomes canaux pancréatiques, la perte de fonction de la voie TGF- β a un effet oncogénique dans les phases précoces du développement tumoral, alors que, au cours de l'échappement tumoral, c'est au contraire un gain de fonction qui joue ce rôle, en favorisant par exemple l'EMT ou la dissémination métastatique.

L'objectif de cette 3^{ème} partie est donc de décrire l'évolution des fonctions du TGF- β au cours de la progression tumorale et les mécanismes oncogéniques associés, en s'appuyant sur le modèle des adénocarcinomes pancréatiques.

a. Mutations de la voie TGF- β dans les ADKP

Dans les phases précoces de la carcinogenèse, au même titre que dans un tissu sain, le TGF- β reste un puissant initiateur des activités cytotatiques et pro-apoptotiques de la cellule, comme abordé dans la partie II-d-ii (Akhurst and Derynck, 2001; Principe et al., 2014). En clinique, dans les stades précoces, le niveau de TGF- β est corrélé positivement au pronostic (Glazer et al., 2017). En revanche, dans les stades tardifs, via son action sur l'EMT notamment, il est associé à l'invasion, au maintien de l'état souche des cellules cancéreuses et à la résistance thérapeutique (Langenskiöld et al., 2008; Padua and Massague, 2009; Shariat et al., 2001).

Cette dualité fonctionnelle du TGF- β au cours de la progression tumorale peut s'expliquer en partie par les altérations de la voie du TGF- β , majoritairement liées aux mutations des acteurs des voies de signalisation induites par cette cytokine.

En s'appuyant sur les données issues de TCGA (The Cancer Genome Atlas), l'étude de Korkut et al. a ainsi montré qu'au moins un des membres de la voie du TGF- β est altéré dans 39% des 9 125 tumeurs référencées (Korkut et al., 2018). Pour les adénocarcinomes pancréatiques, l'analyse met en évidence une corrélation positive entre l'atteinte de la voie du TGF- β et la diminution de la survie des patients (Korkut et al., 2018). Les altérations génétiques de la voie du TGF- β les plus observées dans les ADKP sont des mutations inactivatrices des gènes *TGF β R2* (4 à 7% des ADKP) et de *SMAD4* (près de 50% des ADKP) (Goggins et al., 1998; Riggins et al., 1997; Truty and Urrutia, 2007).

Par ailleurs, il a été montré que SMAD7, la protéine SMAD-inhibitrice de la voie canonique, est fréquemment surexprimée dans les cancers pancréatiques (Kleeff et al., 1999). En ce sens et même si cette vision dichotomique doit être nuancée, il est traditionnellement admis que la voie canonique est associée aux fonctions anti-tumorales du TGF- β , via son action cytotatique et pro-apoptotique, alors que les voies non-canoniques exerceraient plutôt les propriétés oncogéniques du TGF- β .

La voie du TGF- β est donc altérée dans les ADKP par des mutations affectant différents effecteurs, avec des conséquences fonctionnelles logiquement différentes en fonction du niveau d'altération des cascades de signalisation induites par le TGF- β .

b. La perte de SMAD4 : cause centrale du « switch » oncogénique

Au cours de la carcinogenèse, avec l'accumulation des mutations, et particulièrement celles affectant la voie du TGF- β , les cellules cancéreuses auront la capacité de contourner l'effet cytotatique induit par la voie canonique et de tirer profit de l'activation des voies non-canoniques (Seoane, 2006). Ce switch de fonction du TGF- β , passant du statut de suppresseur de tumeur à celui d'oncogène, est notamment orchestré par l'inactivation de *SMAD4* (ou *DPC4*, Deleted in Pancreatic Cancer) dans près la moitié des cancers pancréatiques. En effet, l'absence de SMAD4 aura pour principale conséquence la perte de la fonction de régulation de la prolifération associée à cette protéine (Furukawa et al., 2006; Grau et al., 1997; Hansel et al., 2003; Seoane, 2006; Waddell et al., 2015).

Cet évènement est d'ailleurs décrit comme un des évènements oncogéniques majeurs de la carcinogenèse pancréatique. L'inactivation de *SMAD4* correspond à la délétion homozygote du locus 18q21.1 portant le gène *SMAD4* (environ 30% des ADKP) ou à des mutations inactivatrices (20% des cas) (Fukushige et al., 1998; Furukawa et al., 2006; Hahn et al., 1996; Schlegel et al., 2000). Les mutations faux-sens (37% des cas), non-sens (25% des ADKP) ou les insertions-délétions (7% et 5% respectivement) de *SMAD4* sont particulièrement décrites et touchent parfois le domaine MH1, mais surtout le domaine MH2 de la protéine (Dardare et al., 2020; Hahn et al., 1996; Iacobuzio-Donahue et al., 2004). Ces mutations aboutissent à la synthèse d'une protéine SMAD4 non fonctionnelle ou tronquée, favorisant la dégradation par le protéasome après ubiquitinylation (Demagny and De Robertis, 2016; Xu and Attisano, 2000). Le gène *SMAD4* est principalement perdu dans les stades tardifs de la carcinogenèse pancréatique, les lésions pré-néoplasiques de haut grade n'étant que très peu affectées par cette mutation (Hosoda et al., 2017; Wilentz et al., 2000). La perte de SMAD4 dans les cellules leur confère un avantage sélectif non négligeable, puisqu'elles deviennent résistantes à la cytostase induite par la voie canonique (SMAD-dépendante) (Seoane, 2006). Chez la souris, l'inactivation du gène *Smad4* spécifiquement dans le pancréas durant l'embryogenèse (*Ptf1a* ou *Pdx1-Cre* ; *Smad4^{fl/fl}*) n'entraîne

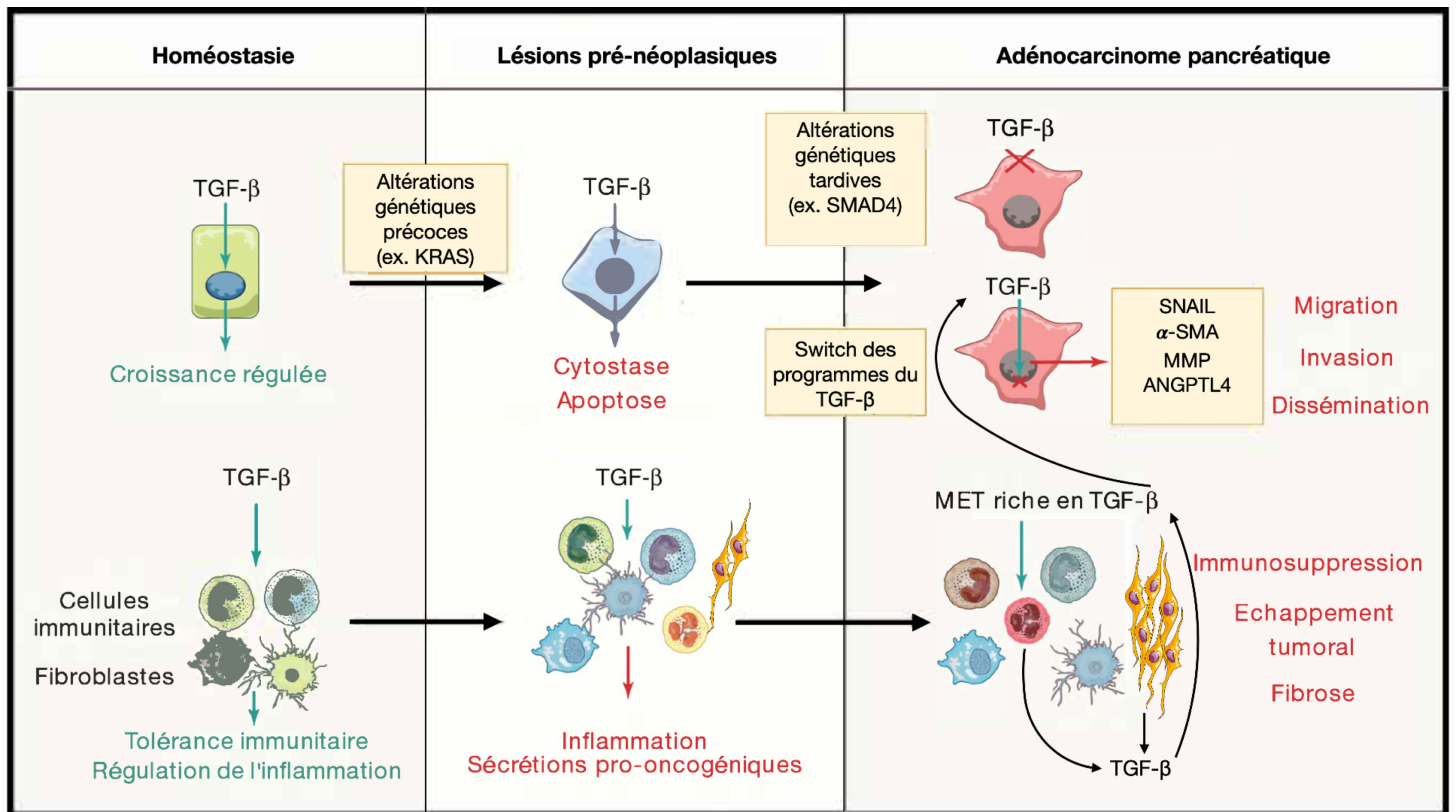


Figure 15 - Le switch oncogénique du TGF- β
Adapté de Batlle and Massagué, Immunity ; 2019

aucune anomalie développementale ou pathologique (Bardeesy et al., 2006). Cependant, lorsque cette mutation est associée à la mutation $Kras^{G12D}$ (*Ptfla* ou *Pdx1-Cre LSL-Kras^{G12D} ; Smad4^{fl/fl}*), les souris développent des lésions pancréatiques pré-néoplasiques de haut grade particulièrement prolifératives par rapport au modèle murin *Kras^{G12D}* (Bardeesy et al., 2006).

Ces travaux démontrent ainsi le rôle de SMAD4 dans la cytotase induite par le TGF- β dans les phases précoces de la carcinogenèse. Dans la même lignée, les travaux de *Levy et Hill* ont permis de classer les cibles transcriptionnelles du TGF- β , en fonction de leur dépendance à la protéine SMAD4 (Levy and Hill, 2005). Il s'avère que les gènes SMAD4-dépendants sont notamment impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, alors que les gènes SMAD4-indépendants sont impliqués dans les mécanismes d'EMT, généralement considéré comme un événement pro-tumorigénique.

SMAD4 joue donc bien le rôle de suppresseur de tumeur dans la tumorigenèse pancréatique, et sa délétion fait basculer l'action du TGF- β vers un rôle oncogénique.

c. Mécanismes d'action oncogéniques du TGF- β dans les ADKP

Rapidement, le TGF- β joue donc un rôle oncogénique au cours de la transformation tumorale. En ce sens, le TGF- β est ainsi surexprimé dans les tumeurs du tube digestif et de ses annexes (Achyut and Yang, 2011; Ebert et al., 2000; Luo et al., 2019), et son niveau d'expression augmente au cours de la carcinogenèse pancréatique (Friess et al., 1993; Levy and Hill, 2006). Cette fonction oncogénique s'explique par différentes actions de cette cytokine au niveau cellulaire. Parmi ses multiples rôles, le TGF- β est notamment un puissant inducteur de la transition épithélio-mésenchymateuse, souvent décrite comme point d'initiation des processus de migration et d'invasion. Les voies du TGF- β sont également souvent associées aux mécanismes de survie cellulaire. Enfin, au niveau du microenvironnement tumoral, le TGF- β est clairement identifié comme un acteur participant à la fibrose, la néo-angiogenèse et l'immunosuppression (Meulmeester and Ten Dijke, 2011).

i./ Au niveau de la cellule tumorale

1. Migration et invasion : de l'EMT au « homing » métastatique

Le TGF- β est un acteur majeur de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).

L'EMT est un programme cellulaire crucial durant les phases de développement embryonnaire ou la cicatrisation, mais délétère dans la progression tumorale. Au cours de l'EMT, les adhésions cellules-cellules (*e.g.* E-Cadhérine, Occludines) et les interactions avec la matrice sont fortement remaniées, contribuant au détachement des cellules épithéliales. Par ailleurs, cette perte du phénotype épithéliale s'accompagne d'un programme de transcription en faveur de l'acquisition de marqueurs

mésenchymateux (*e.g.* N-Cadhérine, Vimentine). Les facteurs de transcription ZEB, SNAIL/SLUG et TWIST ont été identifiés comme gènes drivers de cette transition phénotypique (Dongre and Weinberg, 2019; Kalluri and Weinberg, 2009).

L'EMT a initialement été identifiée au cours du développement, par exemple lors de la différenciation des cellules des crêtes neurales. Mais l'EMT est également activée au cours des processus pathologiques, et notamment dans les cancers, où cette transition phénotypique peut être le point d'initiation de la dissémination métastatique (Massagué, 2008; Yang and Weinberg, 2008).

En effet, la migration des cellules épithéliales requiert la perte des contacts cellule-cellule et l'acquisition de caractéristiques fibroblastiques, deux procédés amorcés durant l'EMT (Dongre and Weinberg, 2019; Etienne-Manneville, 2008).

Le TGF- β est clairement associé aux mécanismes d'initiation de l'EMT, par des régulations transcriptionnelles dépendantes des SMAD et des voies non-canoniques (Derynck and Akhurst, 2007; Heldin et al., 2012; Padua and Massagué, 2009; Thiery, 2003). Par exemple, la voie canonique est impliquée dans l'expression du gène *HMG2*, qui, à son tour, induit l'expression des facteurs de transcription SNAIL et SLUG, impliqués dans la perte d'expression de l'E-cadhérine (Thuault et al., 2008; Vincent et al., 2009; Xu et al., 2009). Les voies non-canoniques régulent également de très nombreux gènes pro-EMT, tels que la fibronectine ou l'actine caractéristique du muscle lisse (α -SMA) (Bakin, 2000; Bhowmick et al., 2001; Ellenrieder et al., 2001; Taylor et al., 2010; Wendt et al., 2012). L'étude -omique de *Korkut et al.* a montré une corrélation entre l'atteinte des effecteurs de la voie du TGF- β (dont SMAD4) et l'expression des gènes associés à l'EMT et aux métastases (Korkut et al., 2018). D'autre part, les travaux de *Iacobuzio-Donahue et al.* ont montré que la perte de SMAD4 dans les ADKP était fortement associée à une augmentation des métastases (Iacobuzio-Donahue et al., 2009). Ces observations sont étayées par les travaux de *Levy and Hill*, qui ont démontré qu'en absence de SMAD4, les cibles du TGF- β qui restent exprimés sont majoritairement impliqués dans les processus d'EMT (Levy and Hill, 2005).

La migration des cellules au cours de la dissémination métastatique nécessite également une réorganisation dynamique du cytosquelette d'actine notamment. Le TGF- β est une nouvelle fois impliqué dans ces processus, en particulier par l'activation des Rho-like GTPases (Ungefroren et al., 2018). L'un des acteurs les plus étudiés est la protéine RAC1, particulièrement impliquée dans la restructuration du cytosquelette d'actine, en permettant la formation de prolongements cellulaires - *e.g.* filopodes et lamellipodes - (Hall, 1998; Jaffe and Hall, 2002; Vial et al., 2003). L'hyper-activation de RAC1 est d'ailleurs observée dans de nombreux cancers, dont les cancers pancréatiques, notamment à cause de la mutation de KRAS (Heid et al., 2011; Melzer et al., 2017; Ungefroren et al., 2018). L'étude de *Ungefroren et al.* révèle *in vitro* que l'expression d'une version mutante inactivatrice de RAC1 inhibe

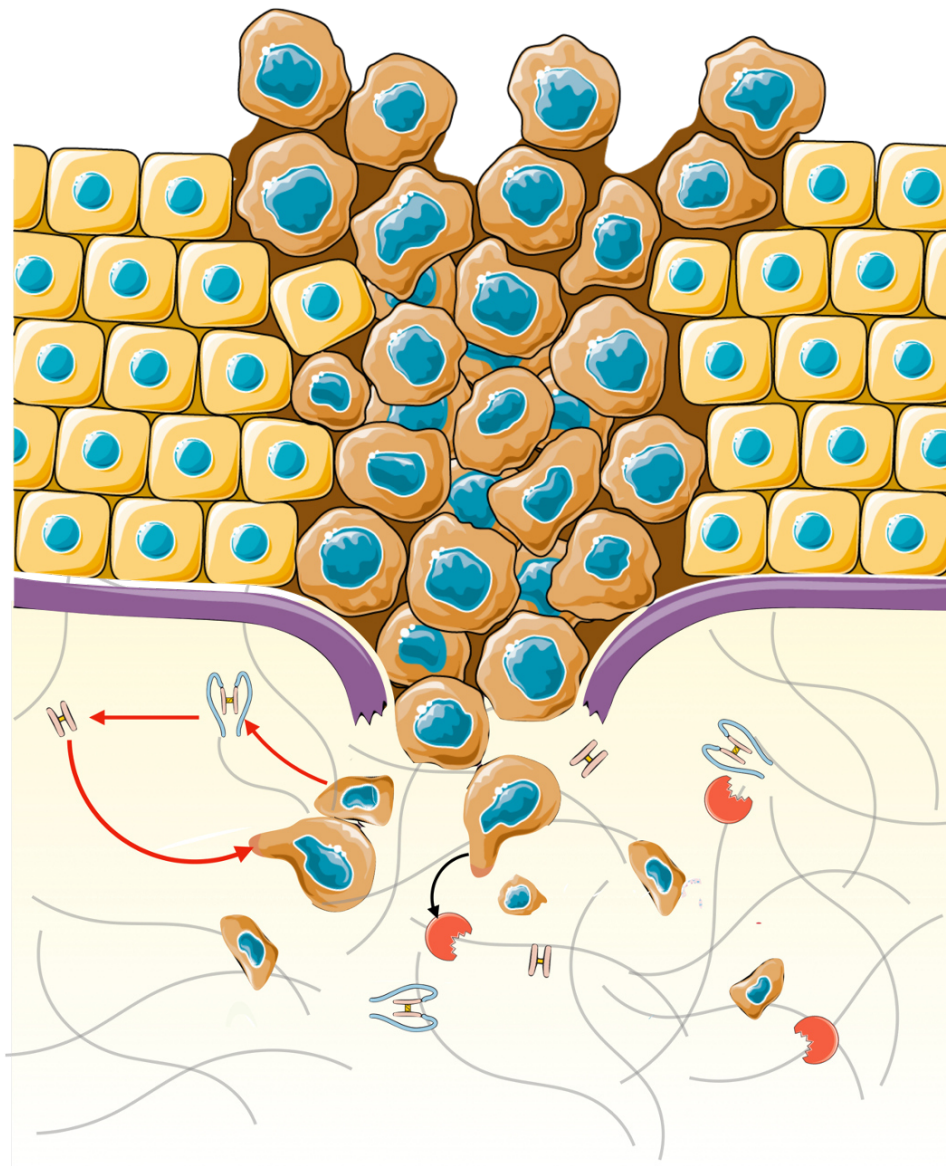
la migration des cellules cancéreuses pancréatiques, au même titre que la déplétion de SMAD2, suggérant un lien fonctionnel entre ces deux protéines. En effet, RAC1 semble également réguler la phosphorylation C-Terminale de SMAD2, et ainsi, moduler son action (Ungefroren et al., 2011).

Enfin, la migration cellulaire nécessite également des interactions dynamiques entre la cellule et son environnement, notamment relayées par les intégrines qui assurent le lien entre le cytosquelette et les composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, les collagènes, ou encore la laminine (Huttenlocher and Horwitz, 2011). Ces modifications dynamiques de l'adhésion permettront aux cellules de s'ancrer à la matrice, d'exercer des forces de traction pour se déplacer, avant de se désassembler vers un autre point d'ancrage. On parle alors du turnover des adhésions, mécanismes complexe impliquant de très nombreux acteurs intra et extracellulaires (Nagano et al., 2012; Webb et al., 2002). Le TGF- β est impliqué dans l'expression de bon nombre de ces acteurs, dont la protéine sécrétée β IG-H3 par exemple. *In-vitro*, l'étude de Costanza et al. démontre que la protéine matricielle β IG-H3 permet l'activation des intégrines, conduisant à un phénotype invasif des cellules cancéreuses pancréatiques (Costanza et al., 2019).

Cette capacité migratoire s'accompagne d'une capacité d'invasion par le remodelage de la matrice extracellulaire entourant la tumeur. Le TGF- β est en effet un puissant inducteur de l'expression des métallo-protéases de la matrice (MMP), notamment MMP2 et MMP9 (Hagedorn et al., 2001; Wiercinska et al., 2011). Par ailleurs, le TGF- β , via l'activation des MAPK, inhibe l'expression des gènes *TIMP* et *RECK*, deux inhibiteurs de l'activité des MMP (Gomes et al., 2012).

De ce fait, le TGF- β participe à la mise en place des métastases. Les travaux de Whittle et al. ont mis en évidence l'implication de *RUNX3*, gène cible du TGF- β , dans la mise en œuvre des processus métastatiques des cancers pancréatiques. En effet, *RUNX3* est à même d'induire l'inhibition de la prolifération, et en même temps, l'expression de gènes impliqués dans la migration, l'invasion, mais aussi, la sécrétion des composants de la matrice extracellulaire et de facteurs supportant la formation de métastases (e.g. *SPP1*, *COL6A1*) (Whittle et al., 2015).

Par ailleurs, dans le cancer du sein, le TGF- β a été identifié comme un facteur de détermination du futur site d'attache des cellules métastatiques. On parle d'effet « priming » du TGF- β . En effet, le TGF- β induit par exemple l'expression du gène *ANGPTL4* de manière SMAD-dépendante, favorisant la perméabilité des capillaires pulmonaires, et permettant ainsi la rétention des cellules métastatiques dans les poumons. Un phénomène similaire a récemment été démontré pour les adénocarcinomes pancréatiques avec les travaux de Zhong et al. En effet, le TGF- β , en synergie avec la mutation de *p53*, permet la sécrétion de nombreux médiateurs des métastases, notamment *COL6A1* et *LCN2*, favorisant la colonisation du foie par les cellules pancréatiques métastatiques (Zhong et al., 2017).



- Prolifération

Perte de l'effet cyostatique
Survie cellulaire

- Migration & Invasion

Programme EMT
Perte des adhésions cellulaires
Activation des RhoGTPases
Adhésions dynamiques avec la MEC
Remodelage de la MEC
Dormance / Autophagie



TGF-β latent



TGF-β actif



Matrice extracellulaire



MMP

Figure 16 - TGF-β, migration, invasion et survie cellulaire

2. *Survie cellulaire médiée par le TGF- β*

Comme abordé précédemment, le TGF- β est identifié comme un facteur régulant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Or, dans les phases tardives, les tumeurs échappent à ces effets cytostatiques et pro-apoptotiques (Seoane, 2006). Cette résistance à l'apoptose participe à la survie des cellules cancéreuses. D'autres mécanismes, nombreux et complexes, viennent compléter ces processus de résistance. Par exemple, il est décrit que l'activation TGF- β -dépendante de la voie PI3K-AKT peut augmenter la survie des cellules (Horowitz et al., 2004; Shin et al., 2001). Enfin, les travaux de *David et al.* ont montré que le TGF- β pouvait induire l'apoptose des cellules en synergie avec l'expression de certains gènes impliqués dans l'EMT induite par cette même cytokine. Ce processus est SMAD4-dépendant, suggérant que la perte de cette protéine permettra au contraire le contournement de l'apoptose, et donc la survie et la progression des cellules cancéreuses pancréatiques (David et al., 2016).

Par ailleurs, le TGF- β est identifié comme un des facteurs d'initiation du processus d'autophagie, un mécanisme cellulaire catabolique, permettant de recycler les composants cellulaires à des fins énergétiques (Jiang and Mizushima, 2014; Zhang et al., 2017). Les dérégulations de ces mécanismes peuvent-être associées aux cancers et plusieurs études démontrent que l'autophagie potentialise la survie et le potentiel tumoral des cellules cancéreuses (Buchser et al., 2012; Maiti and Hait, 2021; Zhang et al., 2017).

D'autre part, le TGF- β est décrit comme un facteur permettant l'initiation et la maintenance de l'état de dormance des cellules souches et des cellules cancéreuses (Prunier et al., 2019; Zhang et al., 2017). Cet état permet de cesser la division et la croissance cellulaire en maintenant les cellules dans un état de quiescence (Aguirre-Ghiso, 2007). Le rôle du TGF- β et de ses récepteurs dans l'induction de cet état de dormance des cellules cancéreuses a notamment été établi dans la chimiorésistance et leur propagation dans l'organisme (Brown et al., 2017; Dudgeon et al., 2020; Yumoto et al., 2016).

ii./ **Au niveau du stroma / microenvironnement**

Le TGF- β n'agit pas uniquement sur les cellules tumorales, mais modifie également le stroma et le microenvironnement tumoral. En effet, le TGF- β est capable d'induire la fibrose, l'angiogenèse et l'immunosuppression, facilitant ainsi la tumorigenèse et la dissémination des cellules cancéreuses pancréatiques (Pickup et al., 2013; Principe et al., 2016).

1. Fibrose péri-tumorale, dissémination et résistance thérapeutique

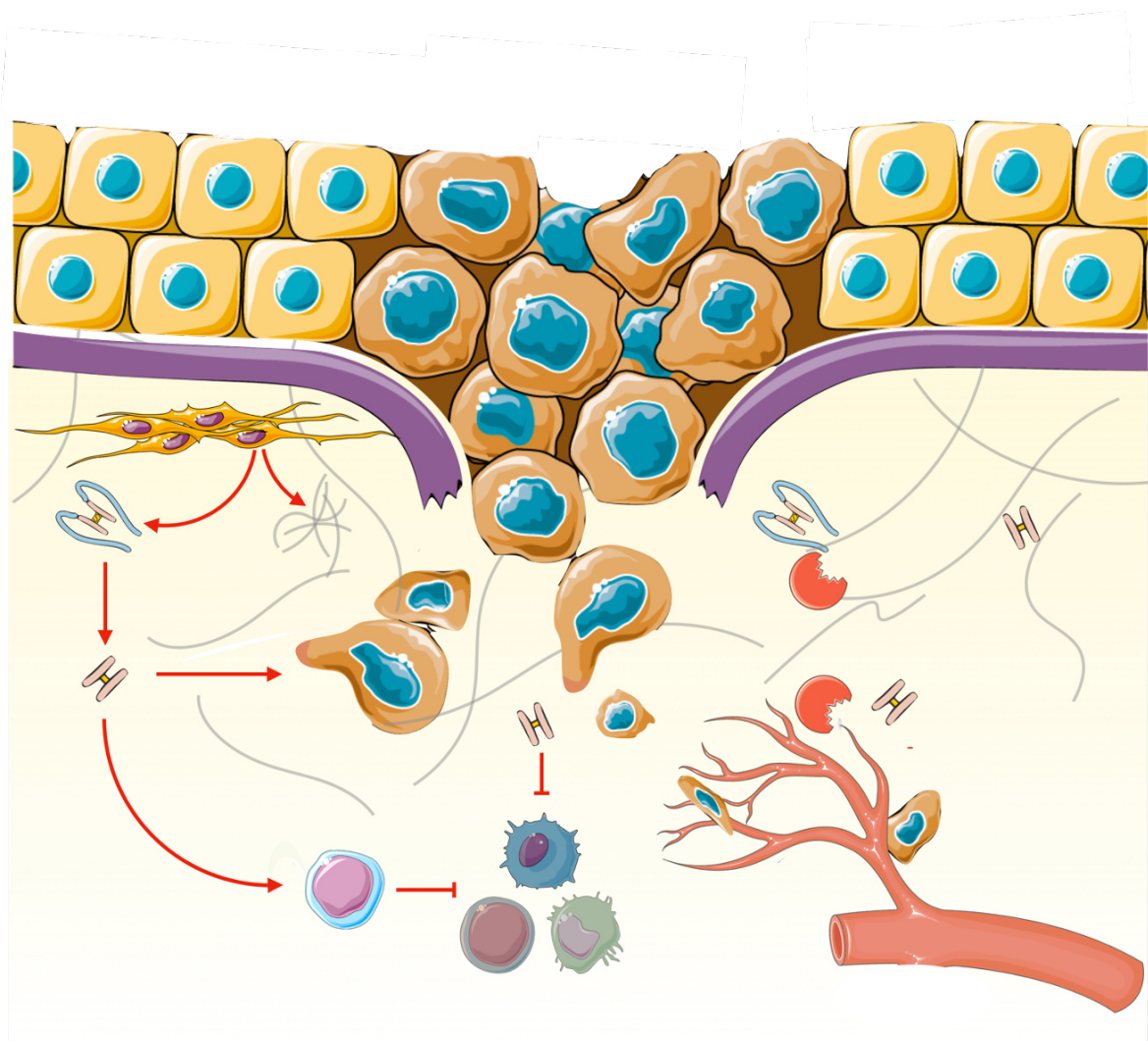
Les cancers pancréatiques se caractérisent par un stroma imposant entourant la tumeur, appelée réaction desmoplasiq. Ce stroma est composé en très grande partie par des composés de la matrice extracellulaire associés à une multiplication des fibroblastes, appelés CAF (Cancer Associated Fibroblasts), qui jouent un rôle majeur dans la progression tumorale.

Une nouvelle fois, le TGF- β prend part à l'activation de ce processus en stimulant la génération des CAF à partir de précurseurs. Dans les cancers pancréatiques, les fibroblastes, les cellules stellaires pancréatiques (PSC) et les cellules souches mésenchymateuses (MSC) peuvent ainsi être à l'origine des CAF pancréatiques (Manoukian et al., 2021). Ce processus de différenciation induit en retour la sécrétion massive par les CAF des protéines matricielles, telles que les collagènes, la fibronectine ou encore l'élastine. Ce remodelage matriciel contribue à une importante réaction fibrotique (von Ahrens et al., 2017; Apte et al., 1999; Desmouliere et al., 1993).

Le stroma tumoral est une importante source de facteurs pro-migratoires, pro-invasifs, pro-angiogéniques et immunosuppresseurs, favorisant l'échappement tumoral et la dissémination des cellules cancéreuses (Glentis et al., 2017; Kalluri, 2016; Manoukian et al., 2021). Le stroma tumoral est donc une véritable niche fibrotique et cytokinique qui supporte la survie et l'expansion des cellules cancéreuses (Brodt, 2016; Houg and Bijlsma, 2018; Jungwirth et al., 2021).

Il existe donc une boucle de sécrétion exacerbée, puisque les cellules tumorales vont sécréter du TGF- β , capable de déclencher l'activation des fibroblastes en CAF, qui sécrètent alors en retour de nombreux facteurs dont le TGF- β , potentialisant la croissance et l'invasion tumorale, ainsi que l'échappement immunitaire (Sperb et al., 2020).

Enfin, de nombreuses études s'intéressent au rôle du microenvironnement tumoral dans la chimiorésistance des cancers pancréatiques. En effet, en plus de sécréter des composants de la matrice extracellulaire, les cellules tumorales et stromales sécrètent de nombreux facteurs de croissance et des facteurs pro-inflammatoires, capables d'engager des voies de signalisation en faveur de la chimiorésistance des cellules tumorales. En ce sens, l'étude d'Olive et al. démontre que l'inhibition de la voie Hedgehog augmente la sensibilité à la gemcitabine des cellules cancéreuses pancréatiques dans un modèle murin (Olive et al., 2009). Cependant, les mécanismes exacts de la chimiorésistance restent peu compris et controversés. Certaines études suspectent le rôle de la compression exercée par le stroma sur les vaisseaux sanguins, empêchant la distribution des chimiothérapies, alors que d'autres soutiennent que l'échappement tumoral aux chimiothérapies est potentialisé par des mécanismes oncogéniques tel que l'EMT (Jiang et al., 2020; Thomas and Radhakrishnan, 2019; Xelwa et al., 2021).



- Fibrose

Différenciation en CAF
Sécrétion des protéines matricielles
Sécrétions pro-oncogéniques

- Immunosuppression

Activation des LT-régulateurs,
des MDSC et des TAM
Inactivation des cellules
immunitaires effectrices
Sécrétions pro-oncogéniques

- Angiogenèse

Environnement pro-angiogénique
Facilite la dissémination des cellules

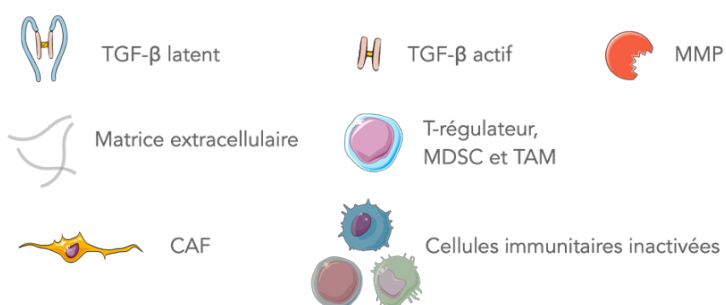


Figure 17 - TGF-β, microenvironnement tumoral et stroma

2. Angiogenèse, croissance tumorale et dissémination métastatique

L'angiogenèse est un processus critique pour la croissance et la dissémination des cellules tumorales.

Le TGF- β est capable d'induire un environnement pro-angiogénique en stimulant l'expression de nombreux facteurs dont le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Pardali and ten Dijke, 2009; Sanchez-Elsner et al., 2001). D'autre part, l'inhibition des voies du TGF- β dans les cancers réduit la vascularisation intra-tumorale et la taille de la tumeur. Dans les cancers pancréatiques en particulier, l'activité de la voie du TGF- β corrèle avec une signature transcriptomique pro-angiogénique (Craven et al., 2016). Par ailleurs, les travaux de *Schwarte-Waldhoff et al.* ont démontré que la restauration de SMAD4 dans une lignée pancréatique humaine réprimait l'expression du VEGF tout en augmentant l'expression de l'inhibiteur de l'angiogenèse TSP-1, suggérant que la perte de SMAD4 dans les adénocarcinomes canaux pancréatiques favorise l'angiogenèse et donc la dissémination des cellules cancéreuses (Schwarte-Waldhoff et al., 2000). Une étude récente de *Budi et al.* a également montré que le TGF- β agissait en synergie avec l'insuline pour promouvoir l'expression de gènes associés à la migration et l'invasion des cellules endothéliales (Budi et al., 2019).

Outre cet impact pro-angiogénique direct, l'expression des MMP induite par le TGF- β favorise également, en dégradant la matrice extracellulaire, la libération de facteurs pro-angiogéniques dans le microenvironnement tumoral (Deryugina and Quigley, 2015; Quintero-Fabián et al., 2019).

Cependant cette promotion de l'angiogenèse induite par le TGF- β reste controversée puisque la pression exercée par le stroma tumoral est telle que les vaisseaux sanguins se retrouvent comprimés au sein de la tumeur, empêchant l'apparition de vaisseaux majeurs, expliquant en partie l'échec des chimiothérapies. Il semble tout de même que les tumeurs pancréatiques soient irriguées par des micro-vaisseaux (<10 μ m) et des microvillosités basales (<2 μ m) répartis de manière hétérogène dans la tumeur (Hexige et al., 2015; Li et al., 2019; Ma et al., 2020)

3. Immunosuppression

Enfin, comme nous l'avons abordé dans la partie II-d-iii, le TGF- β joue un rôle crucial dans la régulation de l'activité du système immunitaire. Dans les cancers, ce phénomène est exacerbé du fait de la grande quantité de TGF- β dans le microenvironnement tumoral, le rendant immunosuppresseur pour la quasi-totalité des cellules immunitaires.

D'une manière générale, le TGF- β inhibe l'action du système immunitaire, directement ou indirectement par l'activation des lymphocyte T régulateurs (Batlle and Massagué, 2019). Dans les cancers pancréatiques, le TGF- β permet également la conversion des précurseurs des lymphocytes T régulateurs en lymphocytes T régulateurs actifs (CD4⁺/FoxP3⁺), qui inhibent la prolifération et l'action des lymphocyte T effecteurs (Fu et al., 2004). Ces lymphocytes T régulateurs sont accompagnés de cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC), à même de supprimer la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Clark et al., 2007). De plus, les lymphocytes T régulateurs sécrètent une multitude de facteurs pro-oncogéniques dans le microenvironnement tumoral, avec notamment le TGF- β , l'IL10 ou le TNF- α (Byrne et al., 2011). Le TGF- β inhibe l'activation des lymphocytes T en modulant la fonction des cellules présentatrices de l'antigène telles que les cellules dendritiques par exemple (Geissmann et al., 1999). Il en est de même pour les neutrophiles ou encore les cellules NK (Fridlender et al., 2009; Gao et al., 2017). Dans les lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺), la voie canonique du TGF- β réprime la production des facteurs cytolytiques (perforine/granzyme), de l'interféron gamma (IFN γ) et du ligand Fas pro-apoptotique (Thomas and Massagué, 2005). D'autre part, une autre grande fonction du TGF- β réside dans la polarisation des macrophages associés à la tumeur (TAM), qui sécrètent alors des facteurs immunosuppresseurs, pro-angiogéniques et pro-métastatiques, rendant le microenvironnement tumoral encore plus immunodéprimé et favorable à la dissémination des cellules cancéreuses (Condeelis and Pollard, 2006; Cui et al., 2016; Yang et al., 2021b). Enfin, le TGF- β sécrété par les lymphocytes T régulateurs et les macrophages associés à la tumeur pourra être activé par les acteurs du stroma tumoral ou les cellules immunitaires elles-mêmes (Batlle and Massagué, 2019; Travis and Sheppard, 2014).

En conclusion, le TGF- β présente tout à la fois une dualité fonctionnelle dans les adénocarcinomes pancréatiques, avec un effet suppresseur de tumeur puis oncogénique, et un effet pléiotropique sur les cellules tumorales et le microenvironnement. En effet, le TGF- β est capable d'induire l'apoptose dans les stades pré-néoplasiques, puis de favoriser au contraire de multiples processus tels que la transition épithélio-mésenchymateuse, la migration, l'invasion et la survie cellulaire dès les stades précoces, développant ainsi le potentiel métastatique des cellules cancéreuses pancréatiques. Cette multiplicité d'effet résulte conjointement de la nature des altérations dans la voie de signalisation du TGF- β et de la diversité des cascades de signalisation induites par cette cytokine.

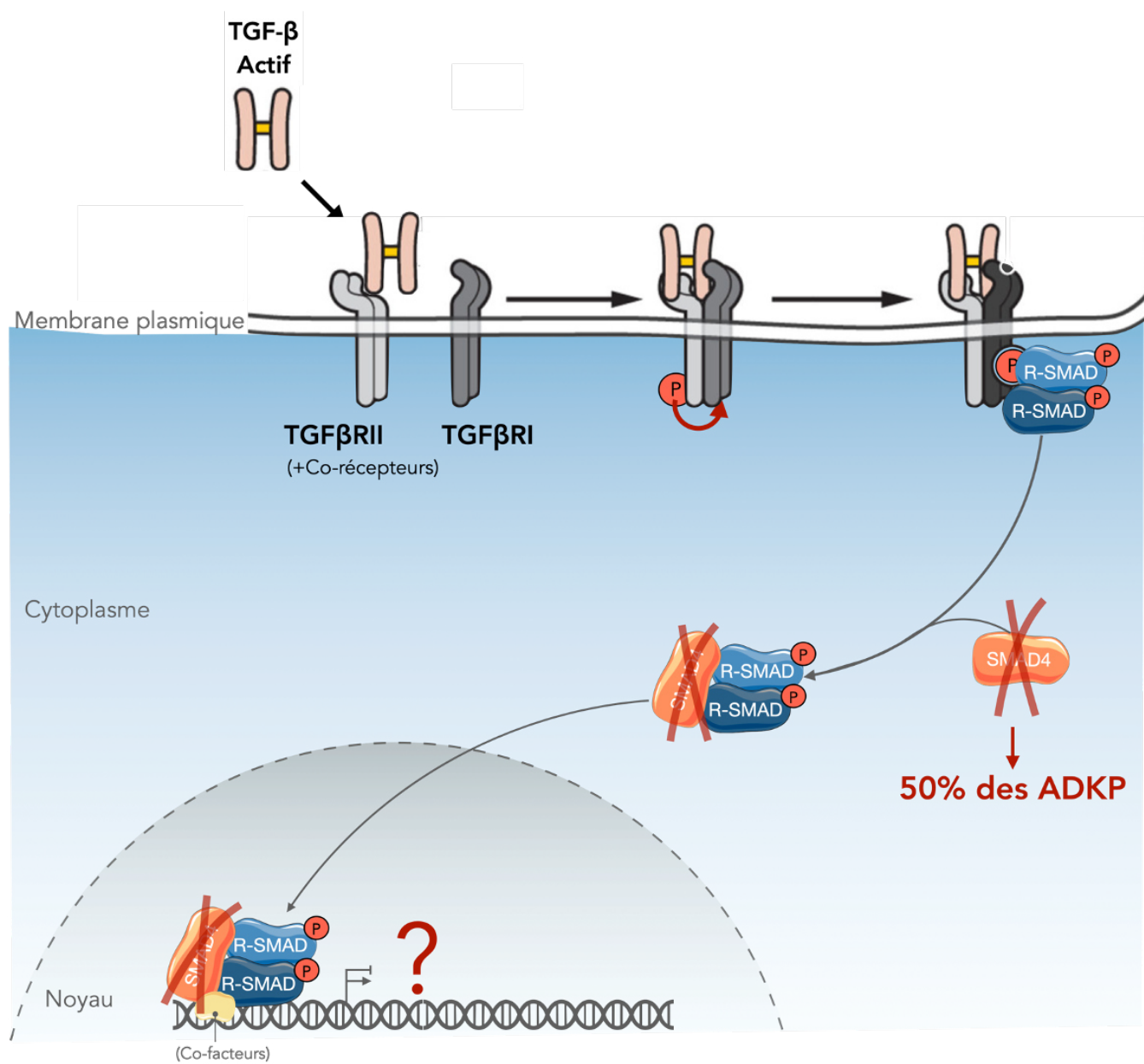


Figure 18 – Objectif principal de la thèse

OBJECTIF GENERAL DU PROJET DE THESE

Les ADKP sont des atteintes néoplasiques très agressives, caractérisées par un fort potentiel métastatique acquis au cours de la progression tumorale. L'échec des thérapies conventionnelles souligne la nécessité de comprendre les mécanismes moléculaires de la carcinogénèse et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le TGF- β est une cytokine impliquée dans de nombreux processus physiologiques (*e.g.* développement embryonnaire, cicatrisation, cytotase) et pathologiques (*e.g.* cancers, fibrose). Cette cytokine possède une dualité de fonction dans les cancers, puisqu'elle est décrite comme ayant des rôles suppresseurs de tumeurs dans les stades précoces de la maladie et des rôles oncogéniques dans les stades avancés.

La voie de signalisation du TGF- β est régulièrement altérée dans les cancers, et notamment dans les adénocarcinomes canalaux pancréatiques (ADKP). L'une des mutations les plus fréquentes – retrouvée dans la moitié des ADKP de stade avancé - altère le gène suppresseur de tumeur *SMAD4*, qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la transduction de la voie canonique du TGF- β . Cette mutation est un facteur de mauvais pronostic puisqu'elle est associée à la progression tumorale (*e.g.* prolifération, migration, invasion, échappement immunitaire). Cette mutation expliquerait en partie le switch oncogénique du TGF- β au cours de la tumorigénèse pancréatique.

Il est intéressant de noter que les inactivations de SMAD2 et/ou de SMAD3, deux cofacteurs de transcription de SMAD4, sont peu observées dans les cancers pancréatiques. Par ailleurs, la majorité des études antérieures suggéraient que les effets délétères du TGF- β étaient liés à la perte de SMAD4, sans analyser un éventuel gain de fonction de SMAD2/3 en son absence, bien qu'il soit proposé que de nombreux autres facteurs puissent se lier à SMAD2/3.

Dans un contexte SMAD4-négatif, des travaux antérieurs ont démontré que les protéines SMAD2/3 pouvaient se localiser dans le noyau des cellules en réponse au TGF- β , laissant supposer que SMAD2/3 pourraient exercer leur rôle de facteur de transcription de manière SMAD4-indépendante.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été d'identifier les fonctions moléculaires et cellulaires dépendantes de SMAD2 et de SMAD3 dans les adénocarcinomes pancréatiques SMAD4-négatif.

RESULTATS

RESULTATS

Introduction et approches expérimentales

Les voies de signalisation du TGF- β sont fortement associées à la régulation des mécanismes de migration et d'invasion des cellules cancéreuses. De fait, les adénocarcinomes pancréatiques, dans lesquels le TGF- β est fortement exprimé, sont des tumeurs particulièrement invasives.

Notre objectif était de définir le rôle spécifique du complexe SMAD2/3 dans l'acquisition de ce phénotype migratoire et invasif, dans un contexte de déficience en SMAD4.

Par l'utilisation de deux lignées cancéreuses pancréatiques SMAD4-négative, nous avons testé le rôle de SMAD2/3 dans les mécanismes migratoires et invasifs médiés par le TGF- β . Pour cela, deux approches génétiques ont été utilisées pour générer des lignées SMAD2/3/4-négatives :

- L'inactivation totale de SMAD2 et de SMAD3 par CRISPR/Cas9 ;
- La diminution d'expression de SMAD2 et de SMAD3 par shRNA.

In vitro, l'utilisation de chambre de Boyden 2D et 3D (avec Matrigel) nous a permis de comparer la migration et l'invasion des différentes lignées en réponse au TGF- β . Des analyses moléculaires ont également été entreprises pour apprécier l'expression des gènes et la présence et/ou l'activation de protéines impliquées dans les processus de motilité cellulaire.

Ces expériences ont été complétées par la mise en place d'un modèle de xénogreffe chez l'embryon de poisson-zèbre, afin d'évaluer le potentiel de dissémination induit par SMAD2/3 en l'absence de SMAD4.

Une étude transcriptomique a permis de mettre en évidence un programme de transcription médié par SMAD2/3 indépendamment de SMAD4.

Enfin, des marquages immuno-histo-chimiques d'une cohorte de plus de 500 adénocarcinomes pancréatiques humains ont permis de tester l'hypothèse selon laquelle l'activation des R-SMAD couplée à la mutation de SMAD4 est associée à un plus mauvais pronostic.

Résumé des résultats obtenus

Mes travaux de doctorat ont permis de mettre en évidence le rôle oncogénique des protéines SMAD2/3 en l'absence de SMAD4 dans l'ADKP.

In vitro, à l'aide de deux lignées cancéreuses pancréatiques humaines - BxPC-3 et Capan-1 - nous avons montré qu'en réponse au TGF- β , les protéines SMAD2 et SMAD3 sont phosphorylées et transloquent dans le noyau. L'inactivation des gènes SMAD2 et SMAD3 par deux stratégies d'invalidation (*e.g.* CRISPR/Cas9 et interférences à l'ARN) a permis de montrer que les protéines SMAD2 et SMAD3 étaient nécessaires à la migration et à l'invasion induite par le TGF- β , en absence et indépendamment de SMAD4.

La restauration de l'expression des protéines SMAD2 et SMAD3 dans les cellules SMAD2/3/4-négatives suffit à rétablir la migration et l'invasion induite par le TGF- β .

Le phénotype migratoire induit par le complexe SMAD2/3 présente les caractéristiques d'une migration cellulaire de type collective, caractérisée par le maintien des interactions entre les cellules, par opposition à l'EMT classique, connue pour être induite par le TGF- β .

Plus précisément, nous avons montré qu'en l'absence de SMAD4, les protéines SMAD2/3 étaient capables de potentialiser l'activation de RAC1, la formation de prolongements cellulaires (*e.g.* lamellipodes) et la maturation des adhésions focales. Dans les cellules SMAD2/3/4-négatives, l'ensemble de ces mécanismes est fortement compromis.

Des analyses transcriptomiques ont confirmé que les protéines SMAD2/3 étaient à l'origine d'un programme transcriptionnel soutenant l'enrichissement des gènes impliqués dans la régulation de la motilité cellulaire (*e.g.* remodelage de la matrice extracellulaire, locomotion, angiogenèse) en l'absence de SMAD4.

Enfin, l'analyse d'une cohorte d'adénocarcinomes pancréatiques a permis d'associer l'inactivation de SMAD4 et un haut niveau de phospho-SMAD2 à une augmentation de l'invasion péri-neurale et une diminution de la survie globale des patients.

Publication originale

“SMAD2/3 mediate oncogenic effects of TGF- β in the absence of SMAD4”

Adrien Bertrand-Chapel, Cassandre Caligaris, Tanguy Fenouil, Clara Savary, Sophie Aires, Sylvie Martel, Paul Huchedé, Christelle Chassot, Véronique Chauvet, Victoire Cardot-Ruffino, Anne-Pierre Morel, Fabien Subtil, Kayvan Mohkam, Jean-Yves Mabrut, Laurie Tonon, Alain Viari, Philippe Cassier, Valérie Hervieu, Marie Castets, Alain Mauviel, Stéphanie Sentis, Laurent Bartholin

communications biology

nature portfolio

Papier soumis pour publication dans la revue à comité de lecture - *Communications Biology* -

Actuellement en révisions

SMAD2/3 mediate oncogenic effects of TGF- β in the absence of SMAD4

Adrien Bertrand-Chapel^{1,†}, Cassandre Caligaris^{1,†}, Tanguy Fenouil^{2,10\$}, Clara Savary^{3,\$}, Sophie Aires^{1,\$}, Sylvie Martel¹, Paul Huchedé³, Christelle Chassot⁴, Véronique Chauvet¹, Victoire Cardot-Ruffino¹, Anne-Pierre Morel⁴, Fabien Subtil⁵, Kayvan Mohkam⁶, Jean-Yves Mabrut⁶, Laurie Tonon⁷, Alain Viari⁷, Philippe Cassier^{1,8}, Valérie Hervieu², Marie Castets^{3,*}, Alain Mauviel^{9,#}, Stéphanie Sentis^{1,#}, Laurent Bartholin^{1,#,*}

¹ « TGF- β & Pancreatic Cancer » lab, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Centre Léon Bérard, INSERM 1052, CNRS 5286, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

² Hospices Civils de Lyon, Institute of Pathology, Groupement Hospitalier Est, Bron, France

³ « Cell Death and Childhood Cancers » lab, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Centre Léon Bérard, INSERM 1052, CNRS 5286, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

⁴ « EMT and cancer cell plasticity » lab, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Centre Léon Bérard, INSERM 1052, CNRS 5286, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

⁵ Service de Biostatistiques, Hospices Civils de Lyon, Lyon France; Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive UMR 5558, Villeurbanne

⁶ Hospices Civils de Lyon, Croix-Rousse University Hospital, Claude Bernard Lyon 1 University, Department of General Surgery & Liver Transplantation, Lyon

⁷ Plateforme de bioinformatique Gilles Thomas, Fondation Lyon Synergie Cancer, Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁸ Département d'oncologie médicale, unité de phase 1, Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁹ Team “TGF- β and Oncogenesis”, Institut Curie, PSL Research University, INSERM U1021, CNRS UMR3347, Equipe Labellisée LIGUE 2016, F-91400, Orsay, France

¹⁰ « Ribosome, Translation and Cancer » lab, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Centre Léon Bérard, INSERM 1052, CNRS 5286, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

[†] equal contribution

^{\$} equal contribution

[#] equal contribution

^{*} co-corresponding authors

Email: laurent.bartholin@lyon.unicancer.fr ; marie.castets@lyon.unicancer.fr

Abstract

TGF- β signaling is involved in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) tumorigenesis, representing one of the four major pathways genetically altered in 100% of PDAC cases. TGF- β exerts complex and pleiotropic effects in cancers, notably *via* the activation of SMAD pathways, predominantly SMAD2/3/4. Though SMAD2 and 3 are rarely mutated in cancers, SMAD4 is lost in about 50% of PDAC, and the role of SMAD2/3 in a SMAD4-null context remains understudied. We herein provide evidence of a SMAD2/3 oncogenic effect in response to TGF- β in SMAD4-null PDAC cancer cells. We report that inactivation of SMAD2/3 in SMAD4-negative PDAC cells compromises TGF- β -driven collective migration mediated by FAK and Rho/Rac signaling. Moreover, RNA-sequencing analyses highlighted a TGF- β gene signature related to aggressiveness mediated by SMAD2/3 in the absence of SMAD4. Using a PDAC patient cohort, we reveal that SMAD4-negative tumors with high levels of phospho-SMAD2 are more aggressive and have a poorer prognosis. Thus, loss of SMAD4 tumor suppressive activity in PDAC leads to an oncogenic gain-of-function of SMAD2/3, and to the onset of associated deleterious effects.

Keywords: TGF- β - SMAD2/3 - pancreatic cancer - collective migration - focal adhesion

Main Text

Introduction

TGF- β is a secreted pleiotropic cytokine involved in several physiological and pathological processes. The “canonical” TGF- β signaling pathway is mediated by SMAD transcription factors. Upon binding of TGF- β to its serine/threonine kinase receptors (T β R I and II), R-SMADs, *i.e.* SMAD2 and SMAD3, are phosphorylated and interact with the co-SMAD (common SMAD), namely SMAD4. The SMAD2/3/4 complex accumulates inside the nucleus and binds to the promoter of target genes to regulate their transcription ¹. TGF- β also activates “non-canonical” pathways independently of SMAD proteins such as mitogen-activated protein kinases (MAP kinases) ², phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)/AKT ³, small G-proteins such as Rac and Rho, and reactive oxygen species (ROS) ⁴.

TGF- β was shown to have both tumor suppressive properties, in the early stages of transformation, and a tumor promoting role in more advanced stages of the disease ⁵⁻⁷. Tumor suppressive effects are classically associated with the activation of the “canonical” pathway in cancer cells by inducing the transcription of genes involved in cytostasis (p21, p15) and apoptosis (Bim), and by inhibiting the transcription of oncogenes (c-myc)⁸. But the “canonical” pathway is also involved in TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition (EMT), invasiveness and proliferation of cancer cells *in vitro* ^{7,9,10} and *in vivo* ¹¹. TGF- β exerts further oncogenic effects via the induction of “non-canonical pathways”, such as the ERK or PI3K-Akt pathways. TGF- β oncogenic effects notably result in the activation of genes involved in EMT ^{12,13}, or in

matrix remodeling¹⁴. In addition, TGF- β also affects stromal cells leading to immunosuppression, increased angiogenesis and activation of cancer-associated fibroblasts (CAFs)^{5,15–17}. Moreover, as an illustration of a higher level of complexity, the crosstalk between SMAD and non-SMAD signaling is particularly important in the control of cell migration and invasion¹⁶.

In the context of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), the TGF- β pathway is one of only four signaling pathways that is genetically altered (with at least one mutation) in 100% of PDAC¹⁸. TGF- β ligands are commonly overexpressed in PDAC, and the hyperactivation of TGF- β signaling is correlated with poor prognosis^{19,20}. Interestingly, SMAD2/3 inactivating mutations are scarce in cancers, notably in PDAC^{15,21,22}. Conversely, SMAD4 deficiency is observed in ~50% of PDAC and is associated with a poor overall survival^{10,23}. These observations suggest that in the absence of SMAD4, SMAD2/3 may have deleterious effects, yet uncharacterized. In response to TGF- β , SMAD2 and SMAD3 can accumulate inside the nucleus in the absence of SMAD4, suggesting that they may regulate specific SMAD4-independent transcriptional programs^{24–27}, possibly by interacting with nuclear factors such as IKK and TIF1 γ ^{28,29}. Besides, a study by David *et al.* showed that R-SMAD induces Sox4 expression in a SMAD4-independent fashion in SMAD4-null PDAC cells, and cooperates with Klf5, leading to tumor promotion³⁰.

Taking these elements into account, we speculated that SMAD2 and SMAD3 may behave as oncogenic factors in a SMAD4-negative context. Since PDAC represents a valuable model to characterize SMAD2 and SMAD3 functions after SMAD4 inactivation during the natural course of the disease, we generated a canonical-deficient SMAD2/3 double knockout BxPC-3 cell line (also naturally devoid of SMAD4) to test this hypothesis. Functional *in vitro* and *in vivo* experiments and RNA sequencing were performed to explore the aggressiveness of these cells, prior to correlating SMAD2 activation level and SMAD4 status with the clinical status of patient in a large PDAC cohort.

Results

Generation of double SMAD2/SMAD3 negative pancreatic cancer cell in a SMAD4-negative context

We initially sought to confirm previous findings on the effect of TGF- β on the subcellular localization of SMAD2/3 in SMAD4-positive (PANC-1) and SMAD4-negative (BxPC-3 and Capan-1) human PDAC cell lines^{24,27}. Immunoblot analysis of the nuclear and cytoplasmic cell fractions demonstrated that in response to TGF- β (1 h or 24 h), phosphorylated SMAD2/3 (pSMAD2/pSMAD3) accumulate in the nucleus of both SMAD4-positive (PANC-1) and SMAD4-negative cells (BxPC-3 and Capan-1), this nuclear location being prevented by adding the selective inhibitor of T β RI kinase, RepSox (**Figure 1A and S1A-B**). Hence, SMAD2/3 phosphorylation and their nuclear accumulation in the presence of TGF- β occurs despite the absence of SMAD4 and is directly dependent on T β RI kinase activity.

To investigate the role of SMAD2/3 in the absence of SMAD4 in response to TGF- β , a double SMAD2/3 knockout BxPC-3 cell line, which is naturally devoid of SMAD4, was established by CRISPR/Cas9 gene editing of SMAD2 and SMAD3. This cell line will hereafter be referred to as S2/3-KO BxPC3 cells. Loss of SMAD2/3 expression was validated by immunoblot analysis (**Figure 1B**) and by flow cytometry (**Figure 1C**). FACS analysis detected 98.9% of SMAD2/3-positive cells in control-BxPC-3 and 0.8% of SMAD2/3-positive cells in S2/3-KO BxPC3 cells. Immunofluorescence (IF) experiments confirmed both the capacity of TGF- β to induce SMAD2/3 nuclear accumulation in WT BxPC-3 cells, and the absence of both cytoplasmic and nuclear SMAD2/3 in S2/3-KO BxPC-3 cells treated with TGF- β (**Figure 1D**). Sequencing unveiled a specific deletion of SMAD2/3 in S2/3-KO BxPC3 cells (data not shown).

Importantly, TGF- β -receptors I/II levels were not affected by the knockout of SMAD2/3 (**Figure S1C**), ruling out a possible downregulation of the receptors as a basis for altered signaling upon SMAD2/3 knockout. Consistently, activation of non-canonical TGF- β pathways was slightly delayed but was not significantly affected after 1 h and 24 h incubation with TGF- β in S2/3-KO BxPC3 cells (**Figure S1D**). TGF- β was shown to activate not only SMAD2/3-mediated signaling, but also, to a less extent, SMAD1/5-mediated BMP (bone morphogenetic proteins) signaling^{31–33}. Here however, SMAD1/5/9 was similarly phosphorylated in response to TGF- β , in control-BxPC-3 and S2/3-KO BxPC3 cells (**Figure S1E**). No significant differences were observed in terms of proliferation and apoptosis after TGF- β treatment between control and S2/3-KO BxPC-3 cells (**Figure S1F-G**).

To strengthen our characterization of SMAD2/3 impact in a SMAD4-negative context, we also use a RNA interference (shRNA) strategy in SMAD4-negative pancreatic BxPC-3 and Capan-1 cells (**Figures S1H-I**, thereafter referred to as S2/3-KD cells).

Thus, using both CRISPR/Cas9 gene editing and RNA interference strategies, we created genuine pancreatic cell line models to study the impact of SMAD2/3 inactivation in a SMAD4-negative context.

Figure 1

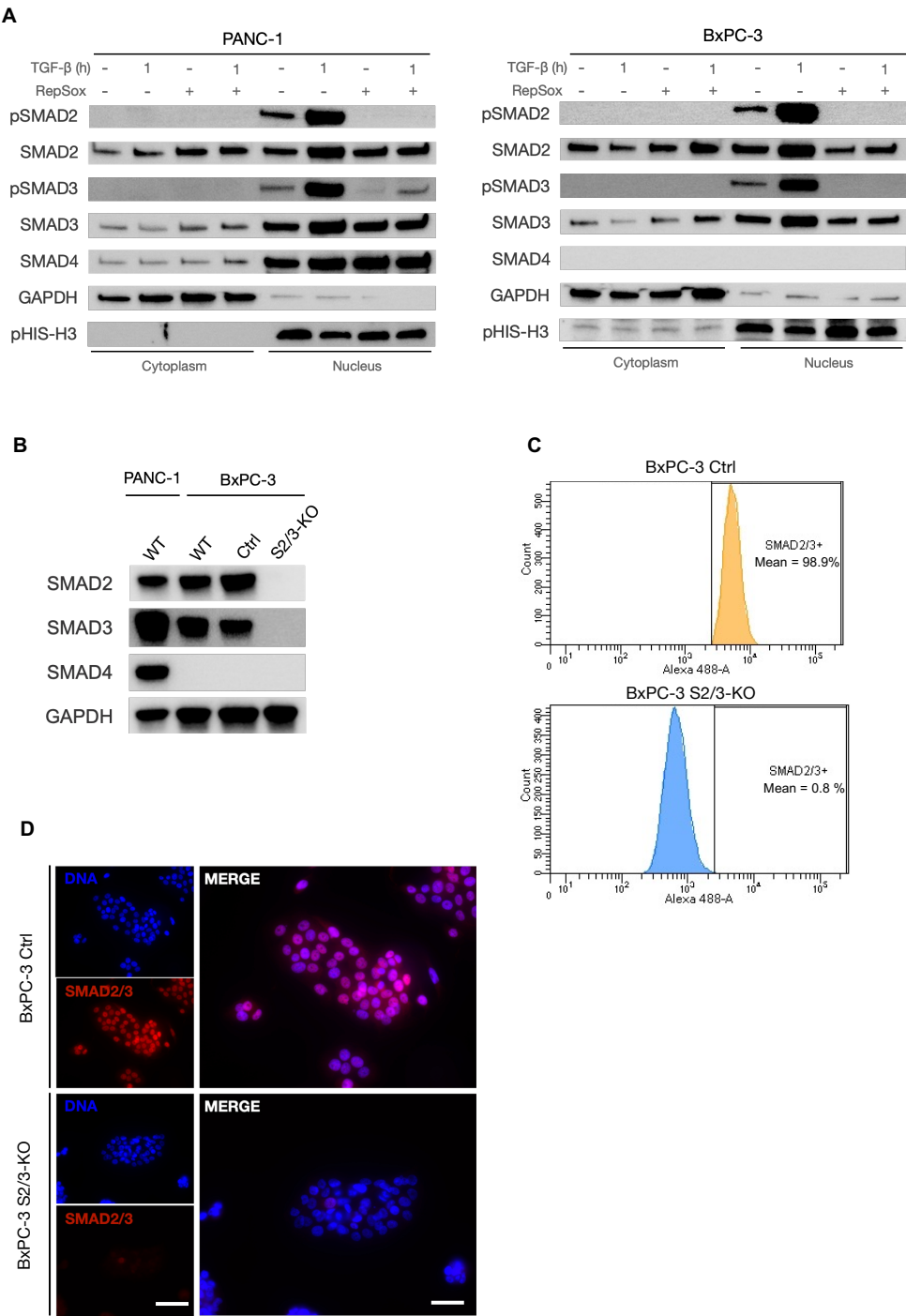


Figure 1. Generation of a double SMAD2/SMAD3 knockout BxPC-3 (SMAD4-negative) pancreatic cancer cell line

(A) Immunoblot of phospho-SMAD2 (pSMAD2), SMAD2, phospho-SMAD3 (pSMAD3), SMAD3 and SMAD4 after treatment with TGF- β and/or TGF- β R1 kinase activity inhibitor (RepSox) for 1 h on cytoplasmic (GAPDH as control) and nuclear fractions (phospho-histone H3 (pHIS-H3) as control) prepared from SMAD4-positive PANC-1 cells and SMAD4-negative BxPC-3 cells.

(B) Immunoblot of SMAD2, SMAD3, SMAD4 and GAPDH on PANC-1 (SMAD4⁺), BxPC-3 (SMAD4⁻) wild-type (WT), control (Ctrl) and SMAD2/SMAD3-knockout (S2/3-KO) cells obtained by CRISPR/Cas9 genome editing technique.

(C) Flow cytometric analysis of SMAD2/3 performed on control and S2/3-KO BxPC-3 cells. SMAD2/3 *ratio* was determined as the mean value of three independent experiments.

(D) Immunofluorescent micrographs of SMAD2 / SMAD3 staining on control and S2/3-KO BxPC-3 cells treated with TGF- β (1 h). Nuclei were counterstained in blue with DAPI. Scale bar (left-hand images) = 50 μ m. Scale bar (right-hand images) = 20 μ m.

Dual invalidation of SMAD2/3 impairs pancreatic cell migration and invasion potential in response to TGF- β in a SMAD4-negative context

Since TGF- β is known to facilitate tumor progression and aggressiveness, notably by stimulating cell migration, we analyzed the migratory potential of control and S2/3-KO BxPC-3 cells in the presence or absence of TGF- β in a transwell migration assay (**Figure 2A**). Control BxPC-3 cells displayed significant migratory properties, which were potentiated by TGF- β (1.95-fold), compared to S2/3-KO, which showed negligible motility both in the presence and absence of TGF- β . RepSox completely abolished TGF- β -induced migration of control BxPC-3 cells, showing that this phenotype relies on T β RI activation. Similar results were obtained using S2/3-KD BxPC-3 and S2/3-KD Capan-1 cells (**Figure S2A-B**). Thus, loss of SMAD2/3 expression in a cellular context devoid of SMAD4 alters their migration propensity in response to TGF- β . Invasive potential, a hallmark of malignant cell aggressiveness, contributes to their dissemination. Along this line, we observed that SMAD2/3 depletion reduced the spreading of engrafted tumor cells over chicken chorioallantoic membranes (CAMs) (**Figure S2C**). TGF- β promotes invasion via a complex transcriptional reprogramming that leads to cytoskeletal rearrangements and extracellular matrix (ECM) degradation. *In vitro*, the role played by SMAD2/3 in the invasive properties of BxPC-3 cells in response to TGF- β was then investigated using a MatrigelTM-coated transwell assay (**Figure 2B**). Following 72 h of TGF- β treatment, control BxPC-3 cells showed a 5.5-fold increase in cell invasion compared to untreated cells. Inversely, no increase was observed upon TGF- β treatment in S2/3-KO BxPC-3 cells, which retained a very low invasive potential (**Figure 2B**). Similar results were obtained with S2/3-KD BxPC-3 cells (**Figure S2D**) and S2/3-KD Capan-1 cells (**Figure S2E**). We confirmed those *in vitro* results using a zebrafish embryo model that was previously reported to be suitable for determining invasive properties of tumor cells³⁴. Control and S2/3-KO BxPC-3 cells pre-stained with a fluorescent lipophilic dye (DiD) were injected into the yolk sac of (fli:GFP) Casper zebrafish embryos. Migratory potential was assessed 24 h post-injection, by quantifying the number of tumor cells that reached the tail through the circulatory system, mimicking metastases spreading (**Figure 2C**). S2/3-KO BxPC-3 cells displayed a lower migratory rate compared to control BxPC-3 cells, since we observed 1.6-times more cells in embryo tails engrafted with control versus S2/3-KO BxPC-3 cells.

To investigate whether the acquisition of migratory and invasive properties in a SMAD4-negative context relied on SMAD2/3, we stably rescued SMAD2 and SMAD3 expression in S2/3-KO BxPC-3 cells (BxPC-3 S2/3-Rescue). SMAD2/3 re-expression and activation (phosphorylation induced by TGF- β treatment) were assessed by immunoblot analysis (**Figure S2F**). As expected, SMAD2/3 re-expression was sufficient to significantly increase both basal and TGF- β -induced migration (**Figure 2D**) and invasion (**Figure 2E**), as illustrated by a 7-fold increase in migration and invasion, compared to S2/3-KO BxPC-3 cells.

Collectively, these results demonstrate that in a cellular context devoid of SMAD4, SMAD2/3 are necessary and sufficient to transduce TGF- β -driven cell migratory, and invasive properties.

Figure 2

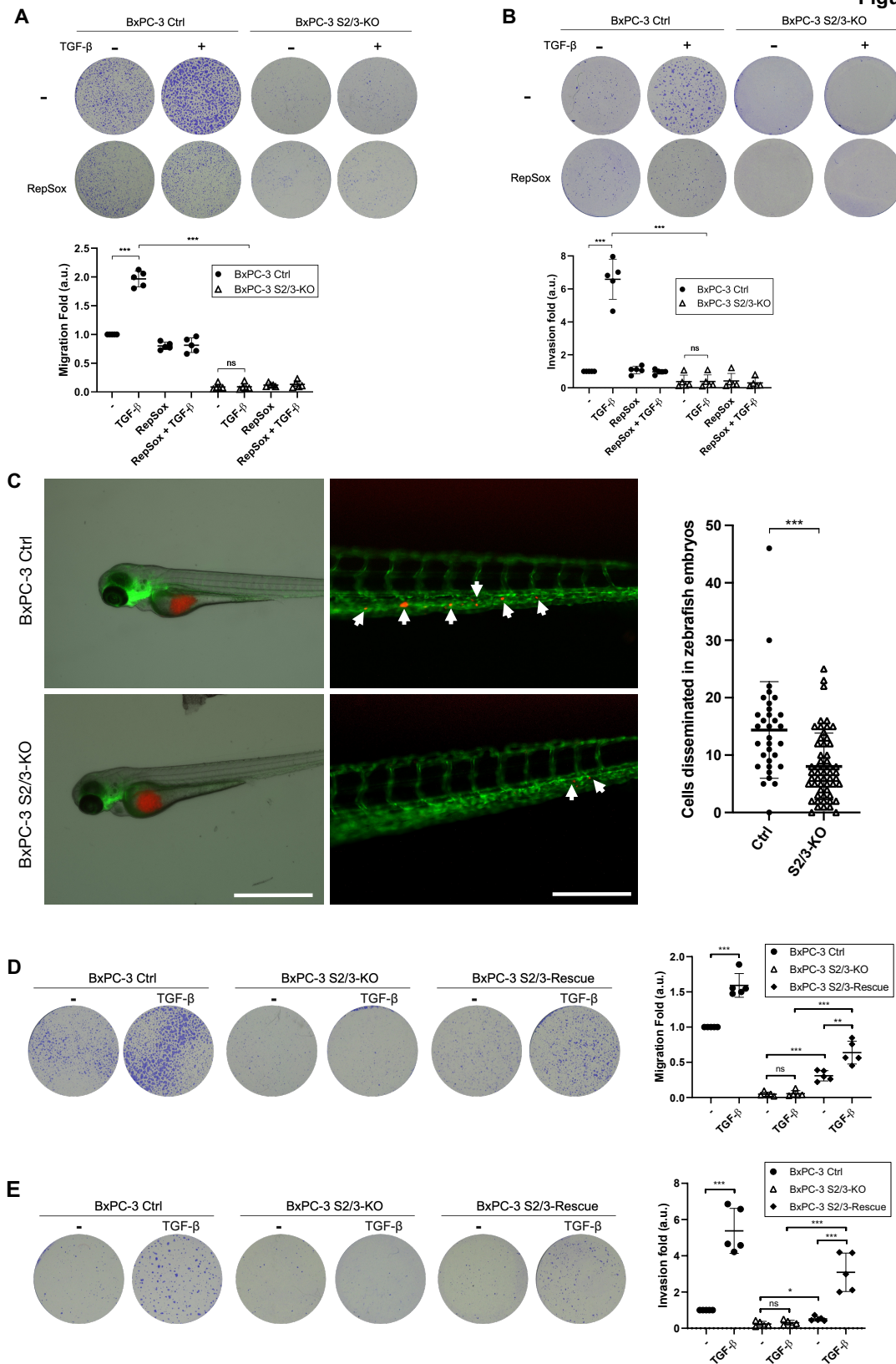


Figure 2. SMAD2 and SMAD3 are crucial in the migratory and invasive potential of BxPC3 (Smad4-) cells in response to TGF- β

(A) Images of a transwell migration assay with control and S2/3-KO BxPC-3 cells cultured for 24 h in the presence or absence of TGF- β and/or RepSox, the TGF- β R1 kinase activity inhibitor. Migration was quantified as the mean value of five independent experiments and represented as a graph. t-test, ***, p-value < 0.001; *ns*, not significant.

(B) Images of transwell invasion assay in matrigel with control and S2/3-KO BxPC-3 cells cultured for 72 h in the presence or absence of TGF- β and/or RepSox. Cell invasion was quantified as the mean value of five independent experiments and represented as a graph. t-test, ***, p-value < 0.001; *ns*, not significant.

(C) Images (left panel) of zebrafish embryos (fli:GFP) grafted with pre-stained control or S2/3-KO BxPC3 cells (in red). Zebrafish embryos were incubated at 28°C for 24 h after engraftment, and then imaged on an EVOS Cell Imaging System microscope. White arrows point toward disseminated cells (in red). Scale bar (left-hand images) = 1 mm. Scale bar (right-hand images) = 0.25 mm. Right panel: quantification of invaded metastatic cells per embryo, performed 24 h post-engraftment. Means are indicated by horizontal bar. t-test, ***, p value <0.001.

(D) Images of a transwell migration assay with control, S2/3-KO, and S2/3-Rescue BxPC-3 cells cultured for 24 h in the presence or absence of TGF- β . Migration was quantified as the mean value of five independent experiments and represented as a graph. t-test, ***, p-value < 0.001; **, p value <0.01; *ns*, not significant.

(E) Images of a transwell invasion assay with control, S2/3-KO, and S2/3-Rescue BxPC-3 cells cultured for 72h in the presence or absence of TGF- β . Invasion was quantified as the mean value of five independent experiments and represented as a graph. t-test, ***, p-value < 0.001; *, p-value < 0.05; *ns*, not significant.

TGF- β induces a SMAD2/SMAD3-dependent pro-migratory transcriptional program leading to collective migration phenotype in SMAD4-negative pancreatic cancer cells.

To define whether phenotypic differences between control and S2/3-KO BxPC-3 cells resulted from the activation of a peculiar transcriptional program by SMAD2/3 in the absence of SMAD4, we performed RNA sequencing analysis (RNASeq). Triplicate RNAseq raw data from control and S2/3-KO BxPC-3 cells, treated or not with TGF- β (1 h and 24 h) were normalized using a standard pipeline.

We first use differential analyses and Venn diagram (**Figure S3A**) to define the subset of genes differentially expressed in control and S2/3-KO BxPC-3 cells solely upon TGF- β treatment: 199 genes were identified as specifically differentially expressed 1 h post-treatment, and this number reached 964 at 24 h (**Figure S3B and Table S1**). We confirmed these RNA-seq results by RT-qPCR and immunoblot for some SMAD2/3 putative targets identified randomly chosen, and showed that *FGF1*, *ITGB6*, *LPXN* and *TGF β I* expressions were indeed upregulated after 24 h of TGF- β treatment in control BxPC-3, but not in S2/3-KO BxPC-3 cells (**Figure S3C-D**). Importantly, re-expression of SMAD2/3 in S2/3-rescue BxPC-3 cells was sufficient to restore TGF- β -induced regulation of these genes (**Figure S3E**). Thus, SMAD2/3 likely drive the expression of a specific transcriptional program in the absence of SMAD4.

Non-canonical pathways induced by TGF- β can also induce transcriptomic changes. Then, to delineate precisely SMAD2/3 target genes in absence of SMAD4, we decided to focus -among the 964 genes described above-, on the 144 genes differentially expressed after 24 h exposure to TGF- β in control BxPC-3 cells, but not in S2/3-KO BxPC3 cells (**Table S2**). Indeed, these genes likely correspond to SMAD2/3-specific targets in a SMAD4-deficient context and could also reflect the different phenotypic responses between control and S2/3-KO BxPC3 cells observed upon TGF- β treatment. We performed Gene Set Enrichment Analyses using pathways from GO on this panel of 144 genes. Interestingly, we identified an over-representation of genes involved in the induction of migration and motility (**Figure 3A**), which may explain the phenotypic migratory differences observed in the context of SMAD2/3 expression.

Of note, among the genes that were inactivated in control cells upon TGF- β treatment, we identified several epithelial cell adhesion/junction molecules, such as KRT13 and 15, but not E-Cadherin or β -Catenin, the expression of which remained unchanged upon TGF- β stimulation. Reciprocally, we observed a gain of some mesenchymal markers such as FN1. Such persistence in epithelial and cell/cell junction markers (E-Cadherin, β -Catenin), with the simultaneous extinction of others (KRT) and induction of mesenchymal markers (FN1) is one of the characteristics of collective migration^{35–37}. Collective migration is a process whereby cells move as a cohesive multicellular unit and retain strong cell-cell interactions with specialized “leader cells” located at the invasive front³⁸. In those leader cells, migratory properties were shown to rely on actin cytoskeleton remodeling through activation of a FAK (focal adhesion kinase)-Rac1 signalling axis. Interestingly, using KEGG pathway analysis, we identified a specific enrichment in genes involved in the regulation of focal

adhesions (FA, hsa04510), which are complex membrane structures playing a major role in cell spreading, lamellipodia extension and cell migration ³⁹. More precisely, the expression of molecules acting upstream of FAK, such as COL1A1, FN1, ITGB6, FGF1, LAMC2 or EFNA2 were all significantly upregulated in control BxPC-3 cells 24 h after TGF- β treatment, but not in S2/3-KO BxPC3 cells.

Such an increase in the expression of FAK activating molecules provides a credible scenario to explain how TGF- β could confer pro-migratory and pro-invasive properties to SMAD4-deficient cells *via* the activation of a SMAD2/3-dependent transcriptional program modulating notably cell adhesion properties and cytoskeleton dynamics.

We then wondered whether migratory properties observed in control but not in S2/3-KO BxPC-3 cells upon TGF- β treatment could result from the induction of collective migration. Since TGF- β is a well-known EMT-promoting factor, we first exclude that decreased motility of S2/3-KO BxPC-3 cells could be due to a failure to engage in such a process in response to TGF β . As shown in **Figure S3F**, we did not observe a global switch towards the expression of EMT-mesenchymal markers such as Fibronectin, N-Cadherin, Vimentin, ZEB1 or Snail/Slug in response to TGF- β . Then, upon TGF- β treatment, control BxPC-3 cells remain in a rather epithelial state, with only discrete changes of few epithelial markers, while others remain expressed together with mesenchymal ones ^(38,40). We then assessed morphological changes in both control BxPC-3 and S2/3-KO BxPC3 cells cultured for 5 days in the presence or absence of TGF- β (**Figure 3B**). In the presence of TGF- β , control cells remained cohesive with an epithelial shape, without clear morphological evidence of EMT. However, we observed slight changes at the leading cells localized at the migration front, with the emergence of large lamellipodia, which were absent in S2/3-KO BxPC3 cells.

Small GTPases, such as Rac1 and Rho-A are well described as mediators of migration through cytoskeletal remodeling and have critical roles in the invasive and metastatic behavior of cancer cells ⁴¹. Rac1-GTP is notably involved in lamellipodia extension and focal adhesions during collective migration ⁴². We thus investigated the activation of Rac-1 in both cell lines treated or not with TGF- β (**Figure 3C**). Total Rac1 levels remained unchanged in both cell lines, whereas activated Rac1-GTP-bound levels increased only in control BxPC-3 cells treated with TGF- β (1.8-fold). Thus, Rac1 activation upon TGF- β treatment relies on SMAD2/3 expression in a SMAD4-deficient context.

To further determine whether the protrusive cells with enlarged lamellipodia were effectively “leader cells” and considering our RNAseq data, we used immunofluorescence microscopy to evaluate the expression of FA mediators and components. During cell migration, vinculin, an actin-binding cytoskeletal protein, is recruited to FA and co-localizes with other critical effectors of cell migration such as phosphorylated active FAK (pFAK^{Y397}) or Paxillin (PXN) to control FA turnover ^{43–46}. We performed co-IF experiments to detect vinculin and pFAK^{Y397} in control and S2/3-KO BxPC-3 cells treated with TGF- β (**Figure 3D**). In control cells, vinculin and pFAK^{Y397} co-localized in FA at the edge of the cell monolayer. The staining pattern switched from a dotted pattern in the absence of TGF- β to a “claw-like” pattern in the enlarged lamellipodia

in response to TGF- β treatment, indicative of FA maturation, whereas it remained unchanged in S2/3-KO BxPC3 cells, maintaining FA in a nascent state. Immunoblot analysis of Paxillin and p-FAK^{Y397} showed that TGF- β potentiated the expression of Paxillin and the phosphorylation of FAK in control but not in S2/3-KO BxPC3 cells (**Figure 3E**), strengthening the involvement of SMAD2/3 in TGF- β -induced focal adhesion maturation in the absence of SMAD4. We thus investigated whether a Rho-A inhibitor (Rhosin), a Rac1 inhibitor (NSC 23766), a pFAK^{Y397} inhibitor (Defactinib) or the calcium-chelating agent EGTA, which interferes with cell-cell junctions by disrupting cadherin-cadherin homotypic interactions, affected BxPC-3 cell migration in response to TGF- β . As shown in **Figure 3F**, all four inhibitors significantly blocked TGF- β -induced migration in BxPC-3 cells.

Hence, TGF- β -induced SMAD2/SMAD3-dependent migration in SMAD4-negative PDAC cells requires the activation of FAK, the Rho GTPases/Rac cascade, as well as intact cell-cell adhesions, which are hallmarks of collective cell migration.

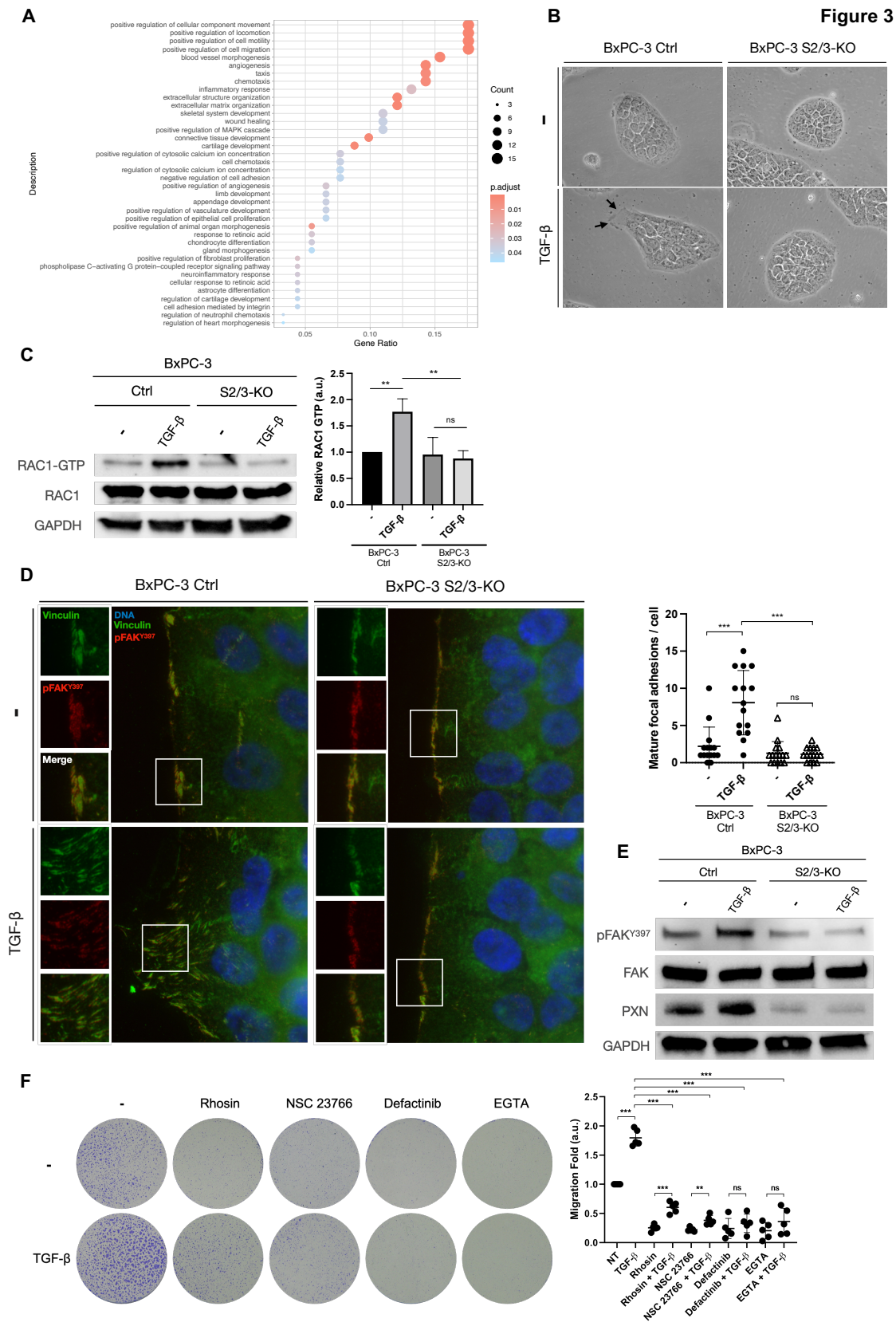


Figure 3. SMAD2/3 initiate a collective migration transcriptional program in response of TGF- β in a SMAD4-null PDAC context.

(A) Scatterplot showing the top 25 enriched biological pathways using Gene Ontology (GO) database based on a list of 144 differentially expressed genes between control and S2/3-KO that are specific to the TGF- β treatment response at 24h. Dots are colored according to the adjusted statistical probabilities (FDR) and sized by the count number of genes matching the biological process. Gene *ratio* corresponds to the relative number of input genes and known associated genes of the tested biological pathway.

(B) Bright field microscopy images of control and S2/3-KO BxPC3 cells after 5 days of TGF- β treatment. Black arrows indicate the presence of large lamellipodia detectable only in control cells in the presence of TGF- β . Scale bar = 30 μ m.

(C) Immunoblot of Rac-1, GAPDH and Rac-1 GTP on control and S2/3-KO BxPC-3 cells treated or not with TGF- β for 15 min. Rac1-GTP was quantified as the mean value of three independent experiments and represented as a graph. t-test, **, p value <0.01.

(D) Images of Vinculin and phospho-Focal Adhesion Kinase (pFAK^{Y397}) immunofluorescence performed on control and S2/3-KO BxPC-3 cells treated or not with TGF- β for 8 hours. Insets represent enlarged views of regions to visualize focal adhesion (FA) in leader cells. Nuclei were counterstained in blue with DAPI. Scale bar (left-hand images) = 2.5 μ m. Scale bar (enlarged merge images) = 5 μ m. Mature focal adhesions per cell were quantified as the mean value of three independent experiments and represented as a graph. t-test, ***, p-value < 0.001; *ns*, not significant.

(E) Immunoblot of Paxillin (PXN), phospho-Focal Adhesion Kinase (pFAK^{Y397}), Focal Adhesion Kinase (FAK) and GAPDH on control and S2/3-KO BxPC-3 cells treated or not with TGF- β for 24 hours.

(F) Images of a transwell migration assay with control BxPC-3 cells cultured for 24 h in the presence or absence RhoA inhibitor (Rhosin), Rac-1 inhibitor (NSC 23766), phospho-FAK inhibitor (Defactinib), the calcium-chelator (EGTA) and TGF- β . Migration was quantified as the mean value of five independent experiments and represented as a graph. t-test, ***, p-value < 0.001; **, p value <0.01; *ns*, not significant.

In human SMAD4-negative-PDAC patients, activation of SMAD2 is a marker of aggressiveness

To assess the clinical relevance of SMAD2/3 oncogenic role in settings of SMAD4 absence, we analyzed 506 proprietary resected primary human PDAC samples that we clinically and morphologically annotated. Loss of SMAD4 occurs in 50% of the PDAC cases⁴⁷ but the status of SMAD2/3 phosphorylation *-i.e.* of their activation status- has never been explored *in situ*. No antibody specifically recognizes pSMAD3 in immunohistochemistry (IHC), both in literature and the multiple tests we realized. However, we successfully succeed in setting up a robust and reproducible protocol to assess pSMAD2 and SMAD4 status by IHC. We verified the specificity of these antibodies on placenta (positive control) and lymph node (negative control) (**Figure S4A**). We analyzed the expression of pSMAD2 and SMAD4 on serial sections of 506 primary human PDACs and classified these tumors into 4 groups (SMAD4⁺/pSMAD2^{high}, SMAD4⁺/pSMAD2^{low}, SMAD4⁻/pSMAD2^{high}, SMAD4⁻/pSMAD2^{low}) (**Figure 4A and S4B**). Consistent with the literature, 253 samples (50% of all samples) stained negative for SMAD4. Importantly, both SMAD4 (when positive) and pSMAD2 were clearly nuclear. Among these, 240 cases (47.4% of all samples) showed high pSMAD2 expression and stained negative for Smad4 (SMAD4⁻/pSMAD2^{high} tumors), while the rest of the cases were split into SMAD4⁺/pSMAD2^{high} (n = 241, 47.6%), SMAD4⁺/pSMAD2^{low} (n = 12, 2.4%) and SMAD4⁻/pSMAD2^{low} (n = 13, 2.6%) tumors (**Figure S4B-C**).

When we explored the overall survival based only on SMAD4 expression, no statistical difference between the SMAD4⁻ and SMAD4⁺ groups was unveiled (1.9 [1.6, 2.3] versus 2.4 [1.9, 2.7], p = 0.14) (**Figure S4C**, right upper panel). Similarly, pSMAD2 expression alone did not discriminate groups (2.4 [2.1, NA] versus 2.0 [1.8, 2.4], p = 0.23) (**Figure S4C**, right lower panel). On the contrary, SMAD4⁻/pSMAD2^{high} tumors show a trend towards a worse prognosis, and SMAD4⁻/pSMAD2^{low} towards a better prognosis (**Figure S4C**, left upper panel). The prognostic value of SMAD2 activation in settings of SMAD4 deficiency was confirmed in univariate analysis, since patients with SMAD4⁻/pSMAD2^{high} tumors had a poorer overall survival than the patients with other patterns of expression (p = 0.047) (**Figure 4B**). The patients with SMAD4⁻/pSMAD2^{high} tumors displayed a reduction of their overall survival of 0.7 years, corresponding to approximately 8 months (**Figure 4B**). This analysis is consistent with our hypothesis that prognosis is not driven solely by SMAD4, but that the combination of SMAD4⁻ and pSMAD2 protein expression may be considered of prognostic value.

To better characterize the SMAD4⁻/pSMAD2^{high} group of tumors vs pooled other groups and explain the worse overall survival, we analyzed the correlation between pSMAD2/SMAD4 expression (by IHC) and other known and validated histo-prognostic factors. In univariate analyses, SMAD4⁻/pSMAD2^{high} was associated with increased perineural invasion, a higher *ratio* of invaded/analyzed lymph nodes and higher TNM stage (p < 0.001, p < 0.005 and p < 0.001, respectively), whereas only perineural invasion and higher TNM stage remained statistically associated with SMAD4⁻/pSMAD2^{high} in multivariate analysis (**Figure 4C and 4D**). As higher TNM stages correspond to more aggressive tumors, we investigated whether SMAD4⁻

/pSMAD2^{high} tumors displayed more advanced local (T stage) or regional (N stage) aggressiveness. The distribution of tumors according to the T and N stages shows that the aggressiveness of these tumors could be driven by two different mechanisms. The first one is perineural invasion, which is twice as frequent in the SMAD4-/pSMAD2^{high} tumors (2.463 [1.486; 4.082], $p < 0.001$, **Figure 4C**) and is consistent with higher T stages (**Figure 4E**), reflecting the local invasion along the nerve sheet. The second mechanism corresponds to regional lymph node metastasis with a higher *ratio* of invaded/analyzed lymph nodes (OR: 4.424 [1.552; 12.613], $p = 0.005$, **Figure 4C**), consistent with a higher number of N2 stage in SMAD4-/pSMAD2^{high} tumors (**Figure S4D and 4E**). Taken together, our data show that SMAD2/3 TGF- β pathway activation is detectable in the absence of SMAD4 in human PDAC and is correlated with poorer survival, associated with the presence of aggressive features such as perineural invasion and lymph node metastasis.

This analysis is consistent with our hypothesis that prognosis is not driven solely by SMAD4, but that the combination of SMAD4- and pSMAD2 protein expression may be considered of prognostic value.

Figure 4

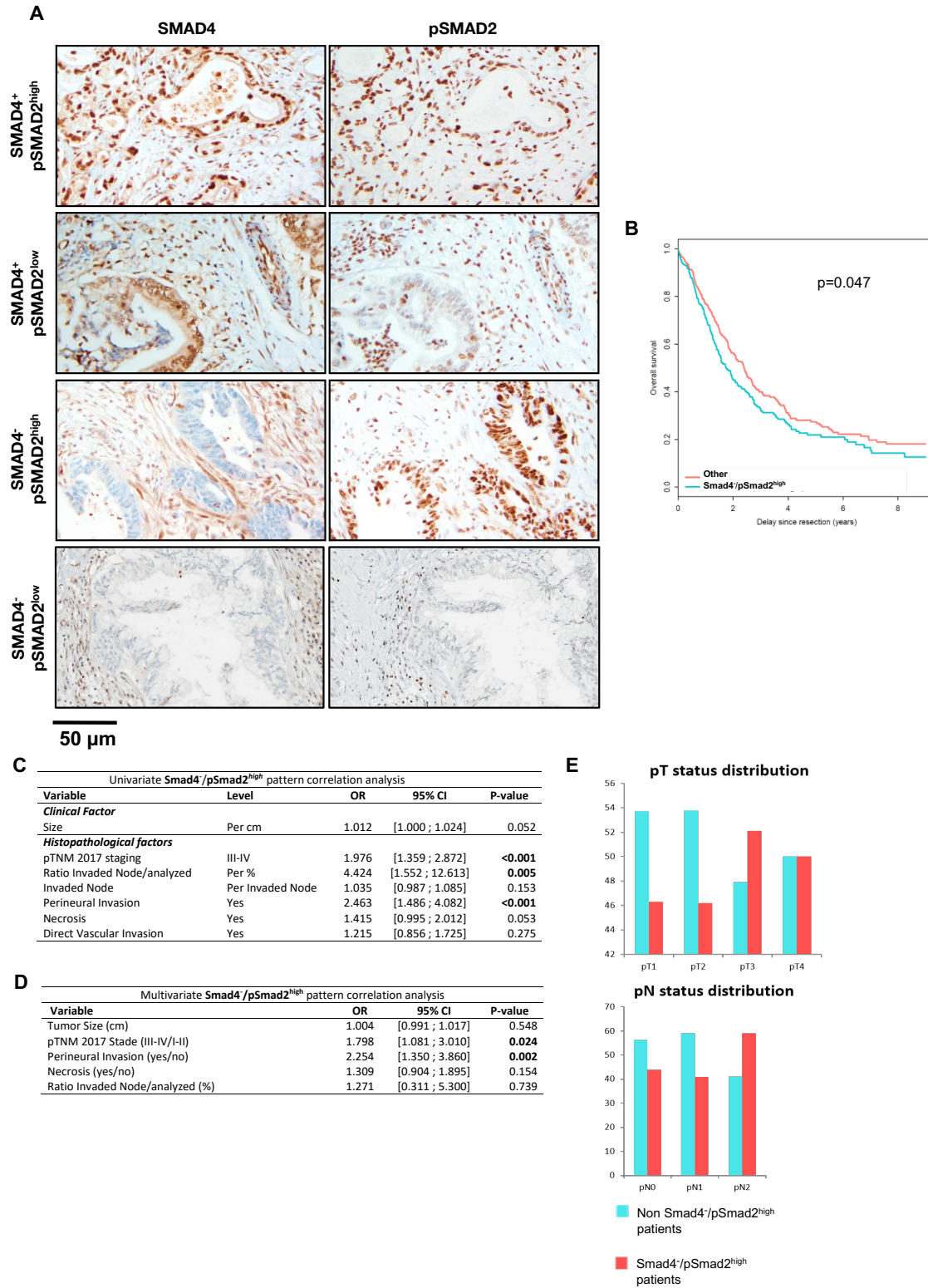


Figure 4. pSMAD2^{high}/SMAD4⁻ pancreatic tumors are correlated with increased aggressiveness *in vivo*

(A) Immunohistochemistry for SMAD4 and pSMAD2 on 506 clinically annotated resected primary human PDAC. The tumors were separated (sorted?) into 4 groups according to SMAD4 and pSMAD2 status (SMAD4⁺/pSMAD2^{high}, SMAD4⁺/pSMAD2^{low}, SMAD4⁻/pSMAD2^{high}, SMAD4⁻/pSMAD2^{low}).

(B) Survival curve of patients with Smad4⁻/pSmad2^{high} PDAC compared to pooled three other groups.

(C) Univariate analysis of the correlation between the SMAD4⁻/pSMAD2^{high} tumor pattern and aggressiveness / histopathological features.

(D) Multivariate SMAD4⁻/pSMAD2^{high} pattern correlation analysis.

(E) pT and pN status distribution for SMAD4⁻/pSMAD2^{high} tumors and non-SMAD4⁻/pSMAD2^{high} tumors.

Discussion

In the present study, we provide evidence that the oncogenic properties of TGF- β in SMAD4-negative BxPC-3 cells is associated with the activation of a transcriptional program triggered by SMAD2 and SMAD3. This transcriptional program supports the activation of a Rho/Rac-dependent invasive migratory program related to “collective migration” involving vinculin and FAK. Finally, we explored *in vivo* the physiological relevance of SMAD2 activation in 506 human PDAC samples and evidenced that SMAD4-negative tumors with high levels of pSMAD2 were more aggressive and had a poorer prognosis.

Mechanistically, we demonstrated that control BxPC-3 cells migrate in clusters in response to TGF- β , only in presence of SMAD2/3, with no obvious morphological features of EMT and no or few changes in classical EMT molecular markers. TGF- β -driven tumor migration is generally associated with the capacity of TGF- β to induce EMT-associated single cell migration. However, it has been previously reported that cancer cells do not rely on the EMT process to gain in aggressiveness, and that EMT and migration can occur independently^{16,26,48,49}. A recent study by David *et al.*³⁰ even showed that TGF- β -induced EMT in SMAD4-positive PDAC is lethal by ultimately leading to cell apoptosis. In the present study, we observed that SMAD2/3 expression in a SMAD4-deficient context is associated to morphological, sub-cellular and genetic changes reminiscent to collective migration, which is an alternative migratory process in both development and cancer^{40,50,51}.

Collective migration is an orchestrated cell movement relying on the dynamic assembly of complex multiproteic membrane structures known as focal adhesions (FA)^{46,52}. FA, are large macromolecular assemblies that form at the leading edge of the cell in lamellipodia, and consist of integrins, kinases (such as FAK) and adapter/cytoskeletal proteins (such as vinculin)⁵³. Also, vinculin binds FAK, which is in turn able to regulate the activity of Rac, promoting the formation of new adhesions at the leading edge⁵⁴. Previous studies have shown a crucial role for Rac1 in TGF- β /SMAD and non SMAD-mediated cellular responses^{55–57}. Here, our findings support that SMAD2/3 mediate oncogenic properties of TGF β in the absence of SMAD4 in pancreatic tumor cells, via conferring them collective migration ability through modulation of Rho/Rac and FAK activities to form FA. As non-canonical TGF- β signaling and SMAD-dependent BMP pathway were not affected, also slightly delayed, after TGF- β treatment in S2/3-KO BxPC3 cells, we cannot exclude a synergistic role for these pathways with SMAD2/3 in the absence of SMAD4. Of note, beside their interest to study SMAD2/3 independently of SMAD4, our cellular models will then also be useful to further characterize the non-canonical pathways and associated crosstalks.

Gene set enrichment analyses performed on SMAD2/3-dependent target genes at 24h of TGF- β treatment uncovered a biological signature reinforcing the crucial role of SMAD2/3 in migration and motility (*e.g.* locomotion, cell motility, cell migration, ECM organization...) such as *COL1A1*, *FNI*, *ITGB6*, *FGF1*, *LAMC2*, *EFNA2*, *MYL9* or *ABLIM2*. Recently, an integrated transcriptome meta-analysis of pancreatic ductal

adenocarcinoma identified 28 upregulated genes in PDAC compared to both adjacent and normal pancreatic tissues that may be used as promising prognostic and diagnostic biomarkers for PDAC ⁵⁸. Our results identified 3 of these 28 genes that were upregulated 24 h after exposure to TGF- β in control BxPC-3 cells, but not in S2/3-KO BxPC3 cells (*e.g.* *ITGB6*, *LAMC2*, and *TGM2*). Interestingly, Zhuang *et al.* recently demonstrated that *ITGB6* overexpression is significantly associated with upregulation of FA signaling pathways in pancreatic cancer ⁵⁹, and this gene was also recently included in a prognostic signature (comprising 9 genes) of pancreatic cancers by Wu and colleagues ⁶⁰. In addition, we observed that the transcriptional changes in the expression of genes such as *COL1A1*, *FN1*, *ITGB6*, *FGF1*, *MYL9* or *ABLIM2*, which are known to modulate Rac1 activity or the organization of cytoskeleton, are all SMAD2/3-dependent (**Table S2**). Then, we assume that a SMAD2/3-dependent transcriptional switch upon TGF- β treatment is responsible for increased migratory properties of PDAC cells in absence of SMAD4.

In human tumors, our findings show that activation of the SMAD2/3 TGF- β pathway persists in the absence of SMAD4 in a subset of patients. Persistence of pSMAD2 in the absence of SMAD4 (*i.e.* SMAD4-/pSMAD2^{high} tumors) is associated with increased perineural invasion, lymph node metastasis, necrosis and poor prognosis. Persistent pSMAD2 expression in the vast majority of PDAC (95%) is highly evocative of a positive selection pressure for this factor associated with oncogenic effects. Our results are consistent with the association of perineural invasion and loss of SMAD4 reported previously ^{61,62}. The difference in overall survival of more than 8 months between Smad4-/pSmad2^{high} and other patients, corresponds to an approximate reduction of one third in post-resection overall survival, which is non-negligible for patients.

Then, our findings that SMAD4-/pSMAD2^{high} human PDAC are more aggressive, suggest that combined immunohistochemistry for SMAD4 and pSMAD2 may improve PDAC patient stratification and identify a poor prognostic subgroup. To go further on a clinical point of view, several FAK inhibitors have entered clinical development, but so far, the use of these agents as monotherapy has been limited ^{63,64}. Our results show that FAK activation in PDAC is at least partly mediated by perverted SMAD2/3-TGF- β signaling in PDAC cells that have lost SMAD4. Then, concomitant inhibition of FAK and TGF- β signaling using either TGF- β -RI kinase inhibitors (such as galunisertib) or monoclonal antibodies (such as frezolizumab) may act synergistically in pancreatic cancer. Finally, the identification of SMAD2/3-induced genes by RNAseq may provide new therapeutic targets for PDAC.

In conclusion, this work reveals that SMAD4 inactivation in PDAC not only results in a loss of SMAD4 tumor suppressive function but is concomitant to the oncogenic gain-of-function of SMAD2 and SMAD3. Further investigations are required to determine whether SMAD4-positive cancer cells, in which SMAD4 cytostatic and pro-apoptotic functions are active, also use SMAD2 and 3 as oncogenic factors. This could broaden the potential therapeutic options for SMAD2- and 3-dependent TGF β target genes.

Materials and Methods

Cell lines culture and treatment

The BxPC-3 (SMAD4 negative, ATCC CRL-1687, C.Sun et al. 2001) human pancreatic adenocarcinoma cell line was maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S). BxPC-3 cells with targeted disruption of *SMAD2* and *SMAD3* genes (S2/3-KO) were established using the CRISPR/Cas9 system. Plasmid construct for *SMAD2* CRISPR/Cas9, bearing the specific single-guide RNA targeting the exon 2 of *SMAD2* (GATGGAAGAAGTCAGCTGGT), the puromycin resistance and the hCas9 were stably transfected in the BxPC-3 cell line (2 μ g). Plasmid construct for *SMAD3* CRISPR/Cas9 gene knockout, bearing the specific single guide RNA targeting the exon 6 of *SMAD3* (GGAATGTCTCCCCGACGCGC) and the hygromycin resistance cassette were stably inserted in HEK293LTV cells to produce lentiviral particles. LV suspension was added in BxPC-3 medium during 24 h. Transfected cells were selected with the antibiotic puromycin (1 μ g/mL) and hygromycin (250 μ g/mL) and tested for efficient gene knockout (KO) by immunoblot, immunofluorescence and flow-cytometry with specific SMAD2 and SMAD3 antibodies.

Plasmid construct for SMAD2/3-rescue was inserted into HEK293LTV cells to produce lentiviral particles. LV suspension was added in S2/3-KO BxPC-3 cell medium and cells selected with blasticidine (5 μ g/mL).

Plasmids constructs for SMAD2 and SMAD3-knockdown (shRNA, sequences available upon request), harboring shRNA sequences designed against SMAD2 or SMAD3 antibiotic resistance cassette for selection, were inserted into HEK293LTV cells to produce lentiviral particles. LV suspension was added in BxPC-3 and Capan-1. Sh-S2/3-cells were selected with blasticidine (5 μ g/mL) and hygromycin (250 μ g/mL).

For all experiments, BxPC-3 and Capan-1 cells were seeded in RPMI or IMDM medium, respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% P/S (without puromycin), and they were serum-starved for 12 h prior to each experiment.

PANC-1 (SMAD4 positive, ATCC CRL-146) human pancreatic adenocarcinoma cell line were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S. MCF 10A (ATCC CRL-10317) human breast cell line was maintained in MEMB supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% P/S. All cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Reagents

Recombinant human TGF- β 1 (TGF- β 1) was purchased from PeproTech (#100-21 B). RepSox (T β RI kinase activity inhibitor, #S7223) was from Selleckchem. 5-Fluorouracil (5-FU, #F6627) was from Sigma. The Rho inhibitor (Rhosin #5003) and the RAC1 inhibitor (NSC23766 #2161) were from Biotechne. Antibodies against SMAD2 (#5339), SMAD3 (#9523), phospho-SMAD2 (Ser465/467) (#3108), phospho-SMAD3

(Ser423/425) (#9520), SMAD2/3 (#8685), SMAD4 (#46535), RAC1 (#4651), β IG-H3 (#5601) and Leupaxin (#59309) were purchased from Cell Signaling. The anti-GAPDH antibody (#8245), anti-phospho histone H3 (#14955), anti-Snail/Slug (#85936), SMAD1/5/9 (#80255) were from Abcam. Anti-Paxilin (PXN) (PA5-111334) and anti-pFAK^{Y397} (44-625G) were from Invitrogen. Anti-vinculin (V9131), anti-FAK (#05-537) and anti-ZEB1 (#HPA027524) were from Sigma. ZO-1 (# 610966), E-cadherin (#610405), β -Catenin (#610154), Fibronectin (#610077) and N-Cadherin (#610920) primary antibodies were from BD Biosciences. Antibody against vimentin was from DAKO (#GA63061). HRP-coupled anti-rabbit secondary antibody were from Immuno Reagents (GtxRb-003-DHPRX). HRP-coupled anti-mouse secondary antibody were from Dako Cytomation (P0260). Culture media were obtained from GIBCO-Invitrogen. Nuclear and cytoplasmic extraction reagent (ThermoFischer NE/PER kit #78833) was used for cell fractionation assay before immunoblots. PAK1 PBD Anti-RAC1-GTP agarose beads (# STA-411) were from Cell Biolabs.

Immunoblot analysis

For protein analysis, cells were washed once with cold phosphate-buffered saline (PBS), and lysed with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Nonidet) containing a protease and phosphatase inhibitor cocktail. After protein quantification, 10 to 50 μ g of protein was used for total lysate samples. Samples were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and detected by immunoblot (WB) using Amersham ECL Prime Detection Reagent (GE Healthcare).

Immunofluorescence

To visualize the collective migration, cells were seeded in Ibidi 3 well removable chambers slides (#80381) at 1.5×10^5 cells per well, in which a 2 wells culture-insert (Ibidi #80209) was added, defining a cell-free gap (wound). Upon confluency, cells were serum starved. The next day the culture-insert was removed, and the cells were treated or not with TGF- β (10 ng/mL) for 8h.

Cells were fixed with 4% PFA (paraformaldehyde solution, Thermo Scientific) for 30 min, washed (PBS 1X), permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min, and blocked with PBS-5% FBS for 1 h. Labeling was performed by incubating cells for 1 h with specific antibodies for SMAD2/3, vinculin and phospho-FAK^{Y397}. After three PBS 1X washes, cells were incubated with the specific secondary antibodies Alexa488-conjugated goat anti-mouse antibody (Life Technologies, A-11001), or Alexa594-conjugated goat anti-rabbit antibody (Life Technologies, A-11012). All antibodies were diluted in DakoReal Antibody Diluent (#S2022). Cells were washed three times with PBS 1X, and incubated with DAPI (Sigma d9542) for 5 min. Samples

were mounted on microscope slides with DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium. Images were acquired on an Upright epifluorescence microscope Zeiss AxioImager and treated with ImageJ Software.

Flow cytometry

The proportion of SMAD2/3 positive cells in control and S2/3-KO BxPC-3 cells was assessed by flow cytometry. Control and S2/3-KO BxPC-3 cells were detached (trypsin or scratch?), washed and resuspended with Flow Cytometry Staining Buffer (eBioscience #00-4222-26). To assess cell viability, cells were stained with LIVE/DEAD Far Red Dead Cell solution (Invitrogen #L10120). Cells were fixed and permeabilized for 30 min with 1X FoxP3 Fixation/Permeabilization Buffer (eBioscience #00-5523-00), washed, resuspended in 1X Permeabilization Buffer (eBioscience #00-8333-56), then blocked with 5%-FBS Permeabilization Buffer for 30 min. Cells were then incubated with anti-SMAD2/3 antibody for 45 min, washed twice with 1X Permeabilization Buffer, incubated with anti-rabbit Alexa Fluor 488-conjugated antibody (Invitrogen A32731) for 30 min and washed twice with 1X Permeabilization Buffer. Samples were resuspended in Flow Cytometry Staining Buffer before analysis with BD Canto II flow cytometer. Results were interpreted with BD DIVA Software.

Migration assays

Transwell migration assay was used to assess the migration capacity of the cells (transwell assay, Corning #353097) followed by an immunofluorescence (IF) assay. 5×10^4 cells were seeded in the insert chamber (8 μ m pore size) and allowed to attach for at least 3 h in 0% FBS medium. Cells were then pre-treated with the anti-proliferative compound 5-Fluorouracil (5-FU, 8 μ M) for one hour and stimulated or not (Untreated) with TGF- β (10 ng/mL) for 24 h. If indicated, cells were also pre-treated 1 h either with RepSox (T β R1 kinase activity inhibitor), Rac Inhibitor (50 μ M), Rho inhibitor (30 μ M), phosphor-FAK inhibitor (1 μ M) and EGTA (0.3 mM), then treated or not (untreated) with TGF- β (10 ng/mL) for 24 hours.

Cells were then washed with PBS1X, methanol-fixed for 15 min and stained with crystal violet (0.1%) for 20 min. The quantification of cell migration was determined using ImageJ software.

Invasion assays

Boyden Chambers with inserts coated with growth factor-reduced Matrigel (ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma, Corning #354230) were used to assess cell invasion. Briefly, 5×10^4 cells per insert were resuspended in 100 μ L of matrigel (5 mg/mL) and carefully seeded on top of each insert. Matrigel was left at 37°C one hour in order to allow solidification. Next, 700 μ L of 10% FBS medium was added to

the lower chamber and 300 μ L of 0% FBS medium was added to the insert. The specific treatments were then applied to the insert upper chamber (5-Fluorouracil 8 μ M to all wells, and TGF- β 10 ng/mL only to treated conditions). After 72 h, cells were washed with PBS 1X, methanol-fixed for 15 min and stained with crystal violet (0.1%) for 20 min. The quantification of cell invasion was determined using ImageJ software.

RT-qPCR

TGF- β target gene mRNA expression in BxPC-3 cells was assessed by RT-qPCR. Briefly, total RNA was isolated from cells treated or not (Untreated) with TGF- β (10 ng/mL) using RNAeasy Plus Mini Kit (Qiagen #74136), according to the manufacturer's instructions. 1 μ g of total RNA were used for cDNA synthesis using random primers (Invitrogen #48190011), and Superscript RT (Invitrogen #18064014). qPCR was performed using the SYBR Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems #4385612) and the specific human primers listed in the **Supplemental Table 3**. Data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method to gene examine relative expression, presented as the fold change over control and normalized to GAPDH.

RNA Sequencing

Material for RNA sequencing (RNASeq) was generated from control and S2/3-KO BxPC-3 cells treated or not with TGF- β (10 ng/mL) for either 1 h or 24 h. RNA was isolated, quantified and integrity was measured using an RNA assay kit on a 2100 BioAnalyzer (Agilent, RIN>7). The samples were then subjected to RNA sequencing (Illumina Novaseq™6000, Paired End). RNASeq data have been deposited in Gene Expression Omnibus (GEO).

Alignment and quantification. After careful quality controls, gene expression was quantified using Salmon (v1.1.0) (Patro et al, 2017) and the annotation of known genes from Gencode v33 (Frankish et al, 2021).

Quality controls. Using the raw expression matrix, we estimated the number of detected genes as the number of genes with at least 5 counts. Principal component analysis (PCA) was done with the plotPCA function of the DESeq2 R package (Wickham H (2016)).

Gene expression and normalization. Unless otherwise specified, the analyses were performed using R (v 3.6.1) and illustrations produced with the ggplot2 (Love et al., 2014) and ggpubr packages. Raw expression data were normalized to their log transcripts per million (logTPM) values before clustering and visualization.

Differential expression analysis. Starting from raw counts, we used the R package DESeq2 (v1.26) to perform the differential expression analysis. We performed four sets of differential analyses to compare gene expression levels between conditions (WT or S2/3-KO) with or without treatment after 1h or 24h. The design was set as ~replicate+condition. Differential expression was tested using the Wald test, and *p*-values were

corrected with the Benjamini-Hochberg method. Genes were considered as significantly differentially expressed if their absolute log2 fold-change was above 1 with an adjusted p-value < 0.05.

Heatmap visualization. The top 50 genes were selected from the differential analyses based on their adjusted p-value < 0.05 after 1 h or 24 h TGF- β treatment between conditions. Their expression value was then retrieved from the normalized matrix described before. Samples and genes were clustered using a Euclidean distance metric and complete linkage. Data were scaled by genes and heatmaps were then produced using GraphPad Software 8.0 (Love et al., 2014).

Pathway enrichment analysis. To test the pathway enrichment of a list of genes, we used the entrez IDs as input and the R packages clusterProfiler (Gu et al., 2016) (v 3.8.1) and org.Hs.eg.db (Yu et al., 2012) (v 3.5.0). org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for Human) (v 1.24). We tested the list of genes against pathways from msigdb GO. We selected pathways with an adjusted p-value < 0.01 (Benjamini-Hochberg method) and a q-value < 0.05.

Raw data repository. The raw RNA-seq data for this manuscript are available at GEO (GSE178714).

Chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay

On day 1 of embryonic development, fertilized chick eggs (*Gallus gallus domesticus*, EARL Morizeau) were incubated at 38°C and a relative humidity of 80%. After 3 days, a window was cut in the shell. On day 11, 2x10⁶ of control or S2/3-KO BxPC-3 cells, resuspended in 100 μ l of growth factor-reduced Matrigel, were inoculated on chorioallantoic membrane. Finally, after 17 days of development, chicken embryos were euthanized, and tumors were imaged. Their surfaces were determined using ImageJ software.

Zebrafish embryos xenografts

(Fli:gf) CASPER zebrafish (*danio rerio*) embryos were raised at the Zebrafish Facility (IGFL, ENS Lyon). Prior to injection, 2x10⁶ control and S2/3-KO BxPC3 cells (pre-stained with lipophilic DiD (ThermoFisher Scientific, V22889) for 20 min at 37°C) were resuspended in 30 μ l of PBS. 48 h post-fecundation, zebrafish embryos were dechorionated, anaesthetized with tricaine (Sigma-Aldrich, E10521) and injected with approximately 20 nL of either DiD-stained control or S2/3-KO BxPC3 cells in the yolk sac. Embryos were further incubated at 28°C for 24 h in E3 medium. In order to quantify cells that disseminated from the tumors to the tail, embryos were anaesthetized with tricaine with EVOS Cell Imaging System.

Proliferation and apoptosis analysis

Control and S2/3-KO BxPC-3 cells were infected with the Nuclight lentivirus reagents (Sartorius #4625) in order to stained nucleus in red. 5×10^4 cells were seeded in 48 wells plate. The next day, cells were serum-starved, treated or not with TGF- β and cleaved-Caspase 3/7 Green dye (Sartorius #4440) was added in the culture medium to follow apoptosis. Images were acquired and analyzed for 72 h with an Incucyte ZOOM Imaging System (Essen Bioscience).

Human PDAC cohort

All the samples from patients who had undergone surgery in the Hospices Civils de Lyon between the 1st of January 2004 and the 31st of December 2017 for a pancreatic ductal adenocarcinoma were included in the cohort. The clinical data were retrieved from the common medical files of each patient. The histopathological slides were reviewed by two pathologists including one expert in pancreatic diseases, blindfolded to the clinical and immunohistochemical data, to assess aggressiveness features. The review also allowed clinicians to select the most representative FFPE sample in order to carry out immunohistochemical analyses.

Immunohistochemical analysis of human PDAC samples

Two histological slides were selected to perform immunohistochemical staining (Ventana Ultra Benchmark) for SMAD4 (clone SP306, ab228205, prediluted kit) and pSMAD2 (clone 138 d4, S465/467, dilution: 1/100). The two antibodies were revealed with peroxidase reaction (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE, #RPN2236). A positive control was present on each slide for SMAD4 and pSMAD2 (stroma reaction and native acinar pancreatic tissue). For SMAD4, an external negative control was part of the batch for each immunohistochemical analysis. SMAD4 and pSMAD2 staining was reviewed by two pathologists including one expert in pancreatic diseases, blindfolded to the clinical and morphological data. SMAD4 status was lost or conserved. SMAD4 loss was defined by the absence of nuclear staining, while its conservation was assessed based on the presence of nuclear staining. If in the same tumor, two clones, one with loss and one with conservation of SMAD4 expression, were present, the tumor was to present a loss of SMAD4. pSMAD2 status was high or low. To determine the pSMAD2 status, the signal intensity was compared to the signal intensity observed in the fibroblastic cells and the acinar pancreatic tissue (lower or higher).

Statistical analysis

For *in vitro* experiments, a Student t-test was used to calculate statistical significance. A p-value < 0.05 was considered to be significant (*). The survival curve for human resected samples was established based on the

entire human PDAC cohort diagnosed following the WHO Classification of the digestive system (Bosman, 2010, book, ISBN: 9789283224327) and the log rank test was used, and the mean overall survival was given with a 95% confidence interval. A p-value < 0.05 was considered to be significant. For human overall survival analysis, the Cox model was used. For correlation with SMAD4⁻/pSMAD2^{high} pattern analysis, the odds *ratio* was calculated with logistic regression using a 95% confidence interval. A p-value < 0.05 was considered to be significant.

Competing Interest Statement: The authors declare no competing interest.

Author Contributions: Study concept and design were performed by ABC, CC, MC, AM, SS and LB. Acquisition of data was performed by ABC, CC, SA, TF, CC, SM, KM and JYM. Analysis and interpretation of data were performed by ABC, CC, SA, CS, TF, SA, VC, LT, MC, SS and LB. Drafting of the manuscript was performed by ABC, CC, SA, CS, TF, MC, SS and LB. Critical revisions of the manuscript for important intellectual content was performed by ABC, CC, SA, CS, TF, VC, VCR, SM, APM, PC, VH, AM, MC, SS and LB. AM, SS and LB obtained funding. MC, SS and LB supervised the study.

Acknowledgments

We thank Christophe Vanbelle from the cellular imaging facility at the CRCL for expert analyses in microscopy, Priscillia Battiston-Montagne from the flow cytometry facility at the CRCL for expert advice and Brigitte Manship for proofreading the manuscript. We thank Mustapha Adham for providing human pancreatic tumor samples. We thank Alain Puisieux, Patrick Mehlen, Roxane Pommier and Elodie Roger for helpful discussions. This work was supported by the « Comité de l'Ain and the Comité de l'Ardèche of the LNCC, the Centre Léon Bérard. ABC was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation (MESRI). VCR was supported by a fellowship from the LNCC. VC was supported by a fellowship from l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

References

1. Massagué, J., Seoane, J. & Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**, 2783–2810 (2005).
2. Javelaud, D. & Mauviel, A. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene* **24**, 5742–50. (2005).
3. Moustakas, A. & Heldin, C. H. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* **118**, 3573–84 (2005).
4. Jiang, Z. *et al.* Reactive oxygen species mediate TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 upregulation in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **309**, 961–966 (2003).
5. Akhurst, R. J. & Derynck, R. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol* **11**, S44–51. (2001).
6. Truty, M. J. & Urrutia, R. Basics of TGF-beta and pancreatic cancer. *Pancreatology* **7**, 423–35 (2007).
7. Zavadil, J., Cermak, L., Soto-Nieves, N. & Böttinger, E. P. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J* **23**, 1155–1165 (2004).
8. Seoane, J. & Gomis, R. R. TGF- β Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, a022277 (2017).
9. Bruna, A. *et al.* High TGF β -Smad Activity Confers Poor Prognosis in Glioma Patients and Promotes Cell Proliferation Depending on the Methylation of the PDGF-B Gene. *Cancer Cell* **11**, 147–160 (2007).
10. Valcourt, U. TGF- and the Smad Signaling Pathway Support Transcriptomic Reprogramming during Epithelial-Mesenchymal Cell Transition. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 1987–2002 (2005).
11. Petersen, M. *et al.* Smad2 and Smad3 have opposing roles in breast cancer bone metastasis by differentially affecting tumor angiogenesis. *Oncogene* **29**, 1351–1361 (2010).
12. Xie, L. *et al.* Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* **6**, 603–10 (2004).
13. Zavadil, J. *et al.* Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6686–91 (2001).
14. Verrecchia, F. & Mauviel, A. Transforming Growth Factor-beta Signaling Through the Smad Pathway: Role in Extracellular Matrix Gene Expression and Regulation. *J Invest Dermatol* **118**, 211–5. (2002).

15. Ahmed, S., Bradshaw, A. D., Gera, S., Dewan, M. Z. & Xu, R. The TGF-beta/Smad4 Signaling Pathway in Pancreatic Carcinogenesis and Its Clinical Significance. *J Clin Med* **6**, (2017).
16. Giehl, K., Imamichi, Y. & Menke, A. Smad4-independent TGF-beta signaling in tumor cell migration. *Cells Tissues Organs* **185**, 123–30 (2007).
17. Massagué, J. TGFbeta in Cancer. *Cell* **134**, 215–230 (2008).
18. Jones, S. *et al.* Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**, 1801–6 (2008).
19. Wagner, M., Kleeff, J., Friess, H., Büchler, M. W. & Korc, M. Enhanced expression of the type II transforming growth factor-beta receptor is associated with decreased survival in human pancreatic cancer. *Pancreas* **19**, 370–376 (1999).
20. Zhao, J. *et al.* Clinical and prognostic significance of serum transforming growth factor-beta1 levels in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Braz J Med Biol Res* **49**, (2016).
21. Jonson, T. *et al.* Molecular analyses of the 15q and 18q SMAD genes in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **24**, 62–71. (1999).
22. Fleming, N. I. *et al.* SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Res* **73**, 725–735 (2013).
23. Wang, J. D., Jin, K., Chen, X. Y., Lv, J. Q. & Ji, K. W. Clinicopathological significance of SMAD4 loss in pancreatic ductal adenocarcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 16704–16711 (2017).
24. Fink, S. P., Mikkola, D., Willson, J. K. & Markowitz, S. TGF-beta-induced nuclear localization of Smad2 and Smad3 in Smad4 null cancer cell lines. *Oncogene* **22**, 1317–23 (2003).
25. Ijichi, H. *et al.* Smad4-independent regulation of p21/WAF1 by transforming growth factor- β . *Oncogene* **23**, 1043–1051 (2004).
26. Levy, L. & Hill, C. S. Smad4 Dependency Defines Two Classes of Transforming Growth Factor (TGF-) Target Genes and Distinguishes TGF- -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition from Its Antiproliferative and Migratory Responses. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 8108–8125 (2005).

27. Yasutome, M., Gunn, J. & Korc, M. Restoration of Smad4 in BxPC3 Pancreatic Cancer Cells Attenuates Proliferation without Altering Angiogenesis. *Clinical & Experimental Metastasis* **22**, 461–473 (2005).
28. Descargues, P. *et al.* IKK α is a critical coregulator of a Smad4-independent TGF β -Smad2/3 signaling pathway that controls keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2487–92 (2008).
29. He, W. *et al.* Hematopoiesis Controlled by Distinct TIF1 γ and Smad4 Branches of the TGF β Pathway. *Cell* **125**, 929–941 (2006).
30. David, C. J. *et al.* TGF- β Tumor Suppression through a Lethal EMT. *Cell* **164**, 1015–30 (2016).
31. Daly, A. C., Randall, R. A. & Hill, C. S. Transforming growth factor β -induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol* **28**, 6889–6902 (2008).
32. Liu, X., Yue, J., Frey, R. S., Zhu, Q. & Mulder, K. M. Transforming growth factor β signaling through Smad1 in human breast cancer cells. *Cancer Res* **58**, 4752–7. (1998).
33. Wrighton, K. H., Lin, X., Yu, P. B. & Feng, X.-H. Transforming Growth Factor { β } Can Stimulate Smad1 Phosphorylation Independently of Bone Morphogenic Protein Receptors. *J Biol Chem* **284**, 9755–9763 (2009).
34. Berens, E. B., Sharif, G. M., Wellstein, A. & Glasgow, E. Testing the Vascular Invasive Ability of Cancer Cells in Zebrafish (Danio Rerio). *J Vis Exp* (2016) doi:10.3791/55007.
35. Jolly, M. K. *et al.* Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Oncotarget* **7**, 27067–27084 (2016).
36. Aiello, N. M. *et al.* EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Dev Cell* **45**, 681-695.e4 (2018).
37. Saxena, K., Jolly, M. K. & Balamurugan, K. Hypoxia, partial EMT and collective migration: Emerging culprits in metastasis. *Transl Oncol* **13**, 100845 (2020).
38. Kröger, C. *et al.* Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 7353–7362 (2019).
39. DeMali, K. A., Barlow, C. A. & Burridge, K. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol* **159**, 881–91 (2002).

40. Pastushenko, I. & Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol* **29**, 212–226 (2019).
41. Machacek, M. *et al.* Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* **461**, 99–103 (2009).
42. Parri, M. & Chiarugi, P. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal* **8**, 23 (2010).
43. Humphries, J. D. *et al.* Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* **179**, 1043–57 (2007).
44. Bjerke, M. A., Dzamba, B. J., Wang, C. & DeSimone, D. W. FAK is required for tension-dependent organization of collective cell movements in Xenopus mesendoderm. *Dev Biol* **394**, 340–56 (2014).
45. Yamaguchi, N., Mizutani, T., Kawabata, K. & Haga, H. Leader cells regulate collective cell migration via Rac activation in the downstream signaling of integrin beta1 and PI3K. *Sci Rep* **5**, 7656 (2015).
46. Matsuzawa, K., Himoto, T., Mochizuki, Y. & Ikenouchi, J. alpha-Catenin Controls the Anisotropy of Force Distribution at Cell-Cell Junctions during Collective Cell Migration. *Cell Rep* **23**, 3447–3456 (2018).
47. Shin, S. H. *et al.* The DPC4/SMAD4 genetic status determines recurrence patterns and treatment outcomes in resected pancreatic ductal adenocarcinoma: A prospective cohort study. *Oncotarget* **8**, 17945–17959 (2017).
48. Jolly, M. K. *et al.* Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Front Oncol* **5**, 155 (2015).
49. Zheng, X. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* **527**, 525–530 (2015).
50. Cheung, K. J., Gabrielson, E., Werb, Z. & Ewald, A. J. Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell* **155**, 1639–51 (2013).
51. Lintz, M., Munoz, A. & Reinhart-King, C. A. The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells. *J Biomech Eng* **139**, (2017).
52. Cai, D. *et al.* Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell* **157**, 1146–59 (2014).

53. Wehrle-Haller, B. Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr Opin Cell Biol* **24**, 569–81 (2012).
54. Atherton, P., Stutchbury, B., Jethwa, D. & Ballestrem, C. Mechanosensitive components of integrin adhesions: Role of vinculin. *Exp Cell Res* **343**, 21–27 (2016).
55. Ungefroren, H. *et al.* Rac1b negatively regulates TGF- β 1-induced cell motility in pancreatic ductal epithelial cells by suppressing Smad signalling. *Oncotarget* **5**, 277–290 (2014).
56. Witte, D. *et al.* TGF- β 1-induced cell migration in pancreatic carcinoma cells is RAC1 and NOX4-dependent and requires RAC1 and NOX4-dependent activation of p38 MAPK. *Oncol Rep* **38**, 3693–3701 (2017).
57. Ungefroren, H. *et al.* Differential roles of Smad2 and Smad3 in the regulation of TGF- β 1-mediated growth inhibition and cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma cells: control by Rac1. *Mol Cancer* **10**, 67 (2011).
58. Atay, S. Integrated transcriptome meta-analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma and matched adjacent pancreatic tissues. *PeerJ* **8**, e10141 (2020).
59. Zhuang, H. *et al.* Characterization of the prognostic and oncologic values of ITGB superfamily members in pancreatic cancer. *J Cell Mol Med* **24**, 13481–13493 (2020).
60. Wu, M., Li, X., Zhang, T., Liu, Z. & Zhao, Y. Identification of a Nine-Gene Signature and Establishment of a Prognostic Nomogram Predicting Overall Survival of Pancreatic Cancer. *Front Oncol* **9**, 996 (2019).
61. Yamada, S. *et al.* SMAD4 expression predicts local spread and treatment failure in resected pancreatic cancer. *Pancreas* **44**, 660–664 (2015).
62. Roger, E. *et al.* Schwann cells support oncogenic potential of pancreatic cancer cells through TGF β signaling. *Cell Death Dis* **10**, 886 (2019).
63. Fennell, D. A. *et al.* Maintenance Defactinib Versus Placebo After First-Line Chemotherapy in Patients With Merlin-Stratified Pleural Mesothelioma: COMMAND-A Double-Blind, Randomized, Phase II Study. *J Clin Oncol* **37**, 790–798 (2019).
64. Soria, J. C. *et al.* A phase I, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of GSK2256098, a focal adhesion kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol* **27**, 2268–2274 (2016).

Supplemental figures

Figure S1

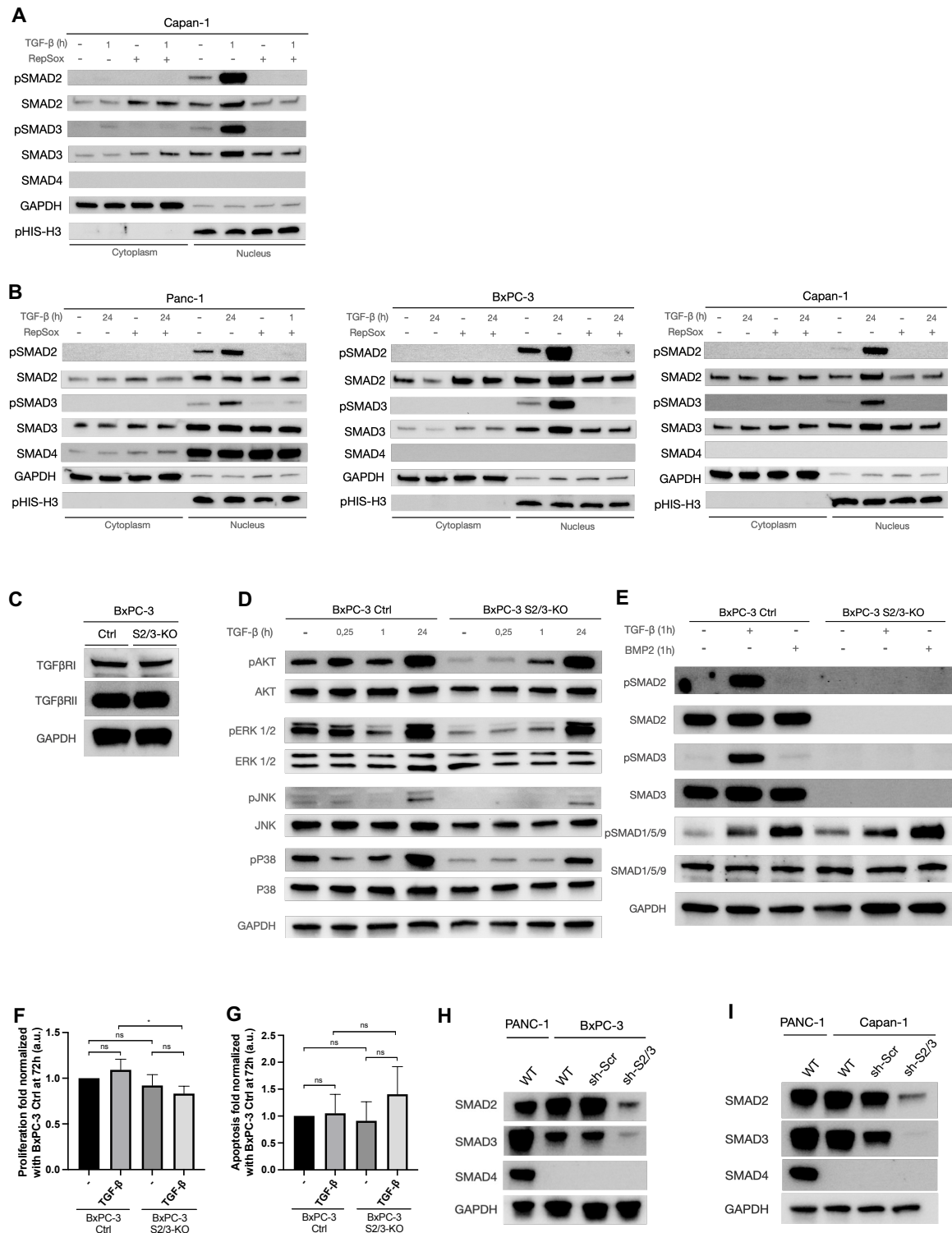


Figure S1

(A) Immunoblot of phospho-SMAD2 (pSMAD2), SMAD2, phospho-SMAD3 (pSMAD3), SMAD3 and SMAD4 after treatment with TGF- β and/or TGF- β R1 kinase activity inhibitor (RepSox) for 1 h on cytoplasmic (GAPDH as control) and nuclear fractions (phospho-histone H3 (pHIS-H3) as control) prepared from SMAD4-negative Capan-1 cells.

(B) Immunoblot of phospho-SMAD2 (pSMAD2), SMAD2, phospho-SMAD3 (pSMAD3), SMAD3 and SMAD4 after treatment with TGF- β and/or TGF- β R1 kinase activity inhibitor (RepSox) for 24 h on cytoplasmic (GAPDH as control) and nuclear fractions (phospho-histone H3 (pHIS-H3) as control) prepared from SMAD4-positive PANC-1 cells and SMAD4-negative BxPC-3 and Capan-1 cells.

(C) Immunoblot of TGF- β receptors I and II and GAPDH on control and S2/3-KO BxPC-3 cells.

(D) Immunoblot of pAKT, AKT, pERK1/2, ERK1/2, pJNK, JNK, pP38 and p38 and GAPDH on control and S2/3-KO BxPC-3 cells treated with TGF- β for 15 min, 1 h or 24 h.

(E) Immunoblot of pSMAD2, SMAD2, pSMAD3, SMAD3, pSMAD1/5/9 and SMAD1/5/9 and GAPDH on control and S2/3-KO BxPC3 cells treated or not with TGF- β or BMP2 for 1 h.

(F) Proliferation analysis of control and S2/3-KO BxPC-3 cells treated or not with TGF- β for 72 h.

(G) Apoptosis rate analysis of BxPC-3 control and S2/3-KO BxPC3 cells treated or not with TGF- β for 72 h.

(H) Immunoblot of SMAD2, SMAD3, SMAD4 and GAPDH on PANC-1 (SMAD4⁺), BxPC-3 (SMAD4⁻) wild-type (WT), control (sh-Scr) and SMAD2/SMAD3-knockdown (sh-S2/3) cells.

(I) Immunoblot of SMAD2, SMAD3, SMAD4 and GAPDH on PANC-1 (SMAD4⁺), Capan-1 (SMAD4⁻) wild-type (WT), control (sh-Scr) and SMAD2/SMAD3-knockdown (sh-S2/3) cells.

Figure S2

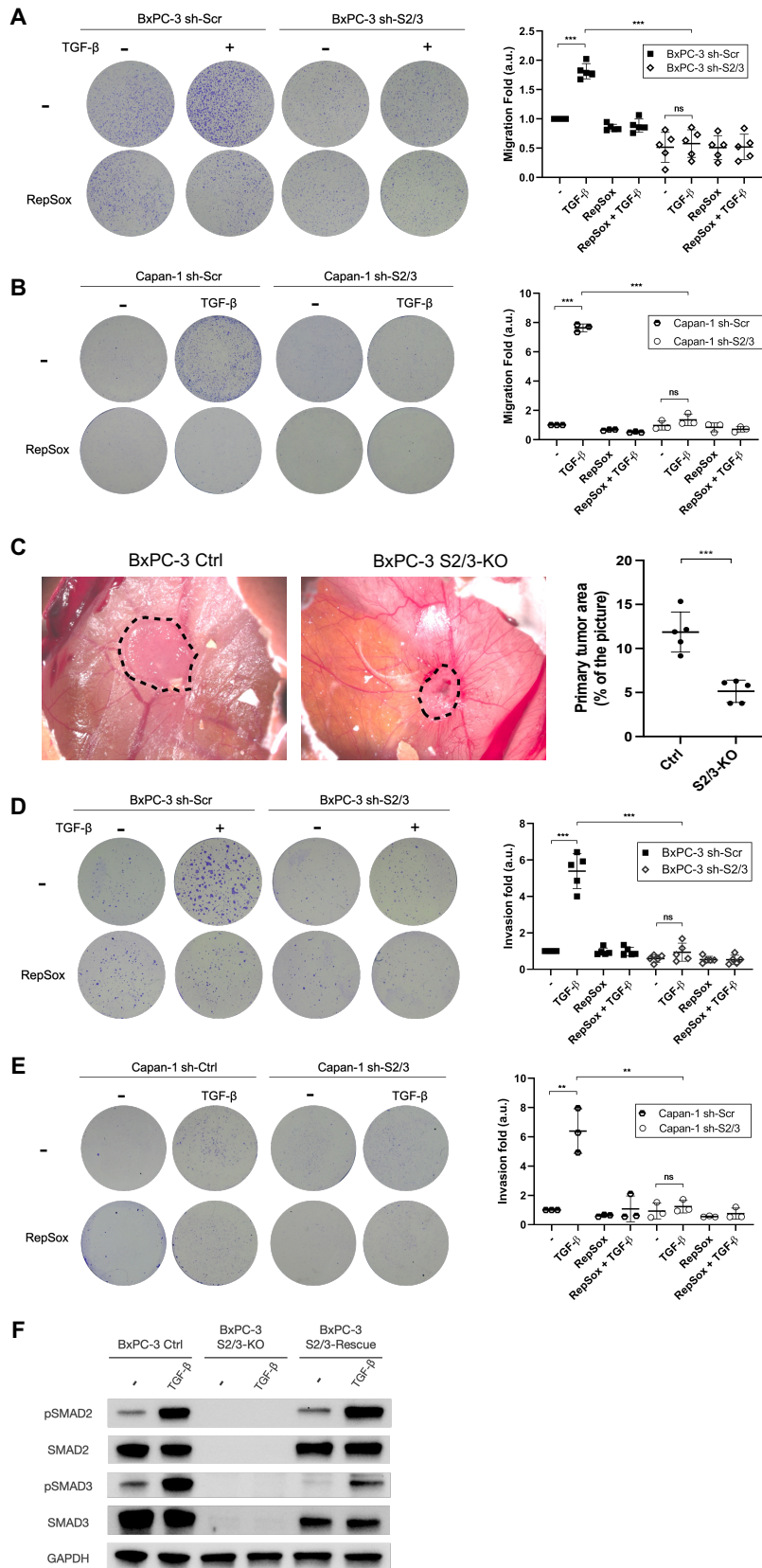


Figure S2

(A) Images of a transwell migration assay with control (sh-Scr) and S2/3-KD (sh-S2/3) BxPC-3 cells cultured for 24 h in the presence or absence of TGF- β . Migration was quantified as the mean value of five independent experiments and represented as a graph. t-test, ***, p-value < 0.001; ns, not significant.

(B) Images of a transwell migration assay with control (sh-Scr) and S2/3-KD (sh-S2/3) Capan-1 cells cultured for 72h in the presence or absence of TGF- β and/or RepSox, the TGF- β R1 kinase activity inhibitor. Migration was quantified as the mean value of five independent experiments and represented as a graph. t-test, ***, p-value < 0.001; ns, not significant.

(C) Images of control or S2/3-KO tumors, 7 days after engraftment on chicken embryo chorioallantoic membranes. Tumor area was measured and represented as a graph. t-test, ***, p-value < 0.001.

(D) Images of transwell invasion assay in matrigel with control (sh-Scr) and S2/3-KD (sh-S2/3) BxPC-3 cells cultured for 72 h in the presence or absence of TGF- β and/or RepSox. Cell invasion was quantified as the mean value of five independent experiments and represented as a graph. t-test, ***, p-value < 0.001; ns, not significant.

(E) Images of a transwell invasion assay with control and S2/3-KD Capan-1 cells cultured for 96 h in the presence or absence of TGF- β and/or RepSox, the TGF- β R1 kinase activity inhibitor. Invasion was quantified as the mean value of five independent experiments and represented as a graph. t-test, **, p-value < 0.01; ns, not significant.

(F) Immunoblot of phospho-SMAD2 (pSMAD2), SMAD2, phospho-SMAD3 (pSMAD3), SMAD3 and GAPDH on control (BxPC-3 Ctrl), S2/3-knockout (BxPC-3 S2/3-KO) and S2/3-Rescue (BxPC-3 S2/3-Rescue) cells treated or not with TGF- β for 1 h.

Figure S3

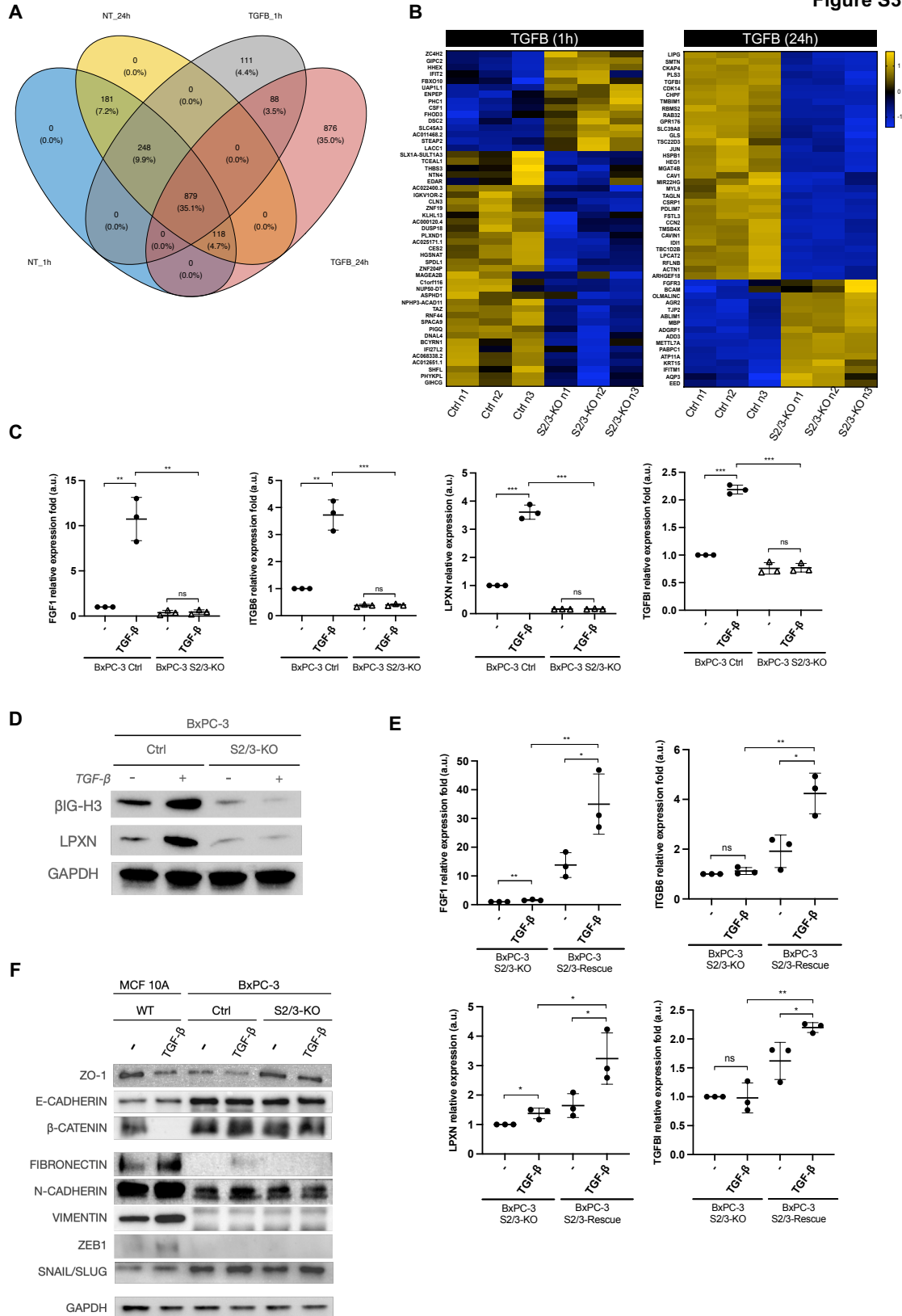


Figure S3

(A) Venn diagram showing the intersection of genes with significant differential expression levels (absolute log₂ fold change > 1 and adjusted p-value < 0.05) between conditions (control vs S2/3-KO) in four sets of experimental design: BxPC-3 cells untreated (after 1 h or 24 h) or treated with TGF- β (after 1 h or 24 h).

(B) Heatmaps showing the top 50 differentially expressed genes, ranked according to their adjusted p-value, between control and S2/3-KO BxPC-3 cells after 1 h or 24 h of TGF- β treatment. Clustering method: Complete; distance: Euclidean.

(C) RT-qPCR of FGF1, ITGB6, LPXN and TGFBI gene expression in control and S2/3-KO BxPC3 cells, treated or not with TGF- β for 24 h. RT-qPCR were quantified as the mean value of three independent experiments and represented as a graph. t-test, ***, p-value < 0.001; **, p-value < 0.01; ns, not significant.

(D) Immunoblot analysis of β IG-H3 and LPXN on control and S2/3-KO BxPC-3 cells treated or not with TGF- β for 24 h.

(E) RT-qPCR of FGF1, ITGB6, LPXN and TGFBI genes expression in S2/3-KO and S2/3-Rescue cells, treated or not with TGF- β for 24 h. RT-qPCR were quantified as the mean value of three independent experiments and represented as a graph. t-test, **, p-value < 0.01; *, p-value < 0.05; ns, not significant.

(F) Immunoblot of Zonula-occludens-1 (ZO-1), E-CADHERIN, β -CATENIN, FIBRONECTIN, N-CADHERIN, VIMENTIN, ZEB1, SNAIL/SLUG, and GAPDH on MCF 10A (SMAD4⁺ breast cancer cell line), control and S2/3-KO BxPC-3 (SMAD4⁻) cell lines treated or not with TGF- β for 5 days.

Figure S4

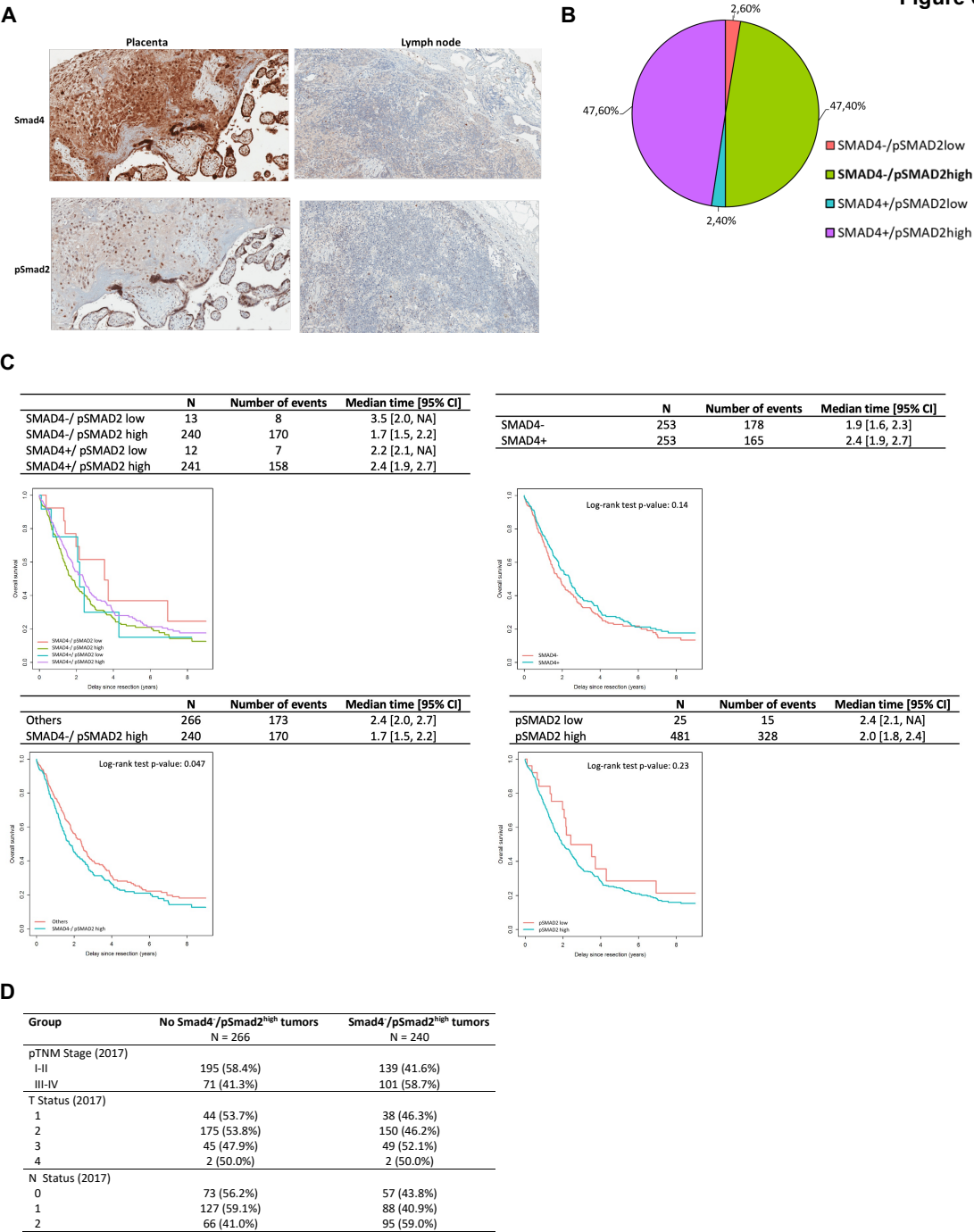


Figure S4. Distribution and multivariate analyses of clinical data from 506 PDAC patients

(A) Immunohistochemistry for SMAD4 and pSMAD2 in Negative (lymphocytes in the lymph node) and positive (trophoblastic cells of the placenta) control tissues.

(B) Graphic representation of the percentage of each group of human PDAC according to SMAD4 and pSMAD2 status.

(C) Survival curves of patient cohort considering each group of human PDAC according to SMAD4 and pSMAD2 status or only SMAD4 expression, or only pSMAD2 level, or the SMAD4/pSMAD2^{high} tumors *versus* the other group.

(D) Tumor distribution according to the pTNM stage, the T status and the N status are correlated with the SMAD4/pSMAD2^{high}.

Tables

Table S1

Differentially expressed genes between control and S2/3-KO BxPC3 cells after TGF treatment.

TGF β 1_H1(111)	
ACD11468.2	AL109976.1
PAGE1	DNXL4
CCSAS	PNXND1
CAB3	CTF12
LINC02015	TF127
OCX2	TF127B
AGZP1	RNR44
AL596214.1	LRRC37A3
AC104083.1	ZNFI9
THAP5	THAP7-AS1
BEST1	HNFG
AC091390.5	SHL
FKBP2	SPAC9
RAET1K	SRPCL
STK19	SHAP
ARHGFG37	EDAR
GIPC2	ZNK443.1
L313RA	DNF034P
ENP38	MAGEB28
FKBP10	INPPI5
SLC3A5A	TGML1
STEAP2	MAST1
CDYL2	MR68338.2
UAPL1	AC08267.5
LAC1	SLX1A-SLX1TA3
ZC4H2	AC092720.3
PC12	AS1327274.1
PHXK	AC104695.2
DSF2	AC022826.2
CSF1	HLA-A*51
MAPS01	WHAMMP3
FHOD3	FAM229A
IL7R	COL5A5
ITP7	AC000120.4
ASPO1	LINC02009
DUSP18	SH3BG8
ZNFS9	LMP1
CES2	GPRI1
AC025171.1	MTTP
BCWNI	AC022400.3
CH10	GINC
CL11P16	OR2A20
AL137212.2	ADORA2A
BX284668.5	AC123768.2
LBDH1	AC093010.3
SPD1	AC074141.1
NTN4	AC114267.1
TMEM4A-AS1	AC012651.1
HGSNAT	AC075954.2
CH10	TR13860.6
TCF4L1	IGLV129.1
TAZ	NHPH3-AC0811
NUPS2-DT	

TGFβ, 24h (876)													
RCSD1	COBL	TMPS55	ZNF165	PHLAD1	FLRT3	COXCS		SULT1A3					
NAA22	CYP3A5	HPG16	PPARGC1B	GICP1	MALIC13B	GCGA64615P		LAG3B78					
AC020015.5	AL190708.1	SLC12A1	PCD1	SCD1	GPX2	SLC11A2		CHRNA9					
HSN522	UNC5B-AS1	HCPS	PRKG2	BICR5P	NR1B33HG	WNT710-AS1		ROSL					
CBP4	AC100860.1	TGM255A	AC008014.1	GABARAP1	ELK3	HIS2		DPN2					
AC106196.1	Cbor152	FGFR3	LNCO08018.1	RANK1	IF2O2	DI1C		LYOX					
EL1251.5	LZV	PPM1H	PABPC1	TRABZDA	UBLP1C	FAM166B		G1B2					
FAM64P42	MET17A	BAGALMT3	ADRF	EPK12	ME3B	COL1A3		ZNF365					
AC136475.3	DM2	AD22	ADAP1	PCP1	CD42	TSRAN5		FABP4					
AC136475.3	DM2	SNA3	CCMD80	ILDR1	TBR2	ENR6		KPNAT					
AC136475.3	CC122	MAP3B	MWS1	PHL2	SLC22A4	CYP26B1		KNAI75					
BCAT1	RALGSP1	TRXG	ABLUM1	KHLH25	ADMY	NOP							
RAB34	RNLS2	ARHGAP30	AKR1C3	TDCY7	RNF130	GLI2P2		AC114501.2					
AL13885.4	SDX2-AS1	RAB3A	LNCO0811	SLC3A1	MYADM	SLC14A		NDG9A					
SLC6A20	SLC6A20	S441	ITIM1	ZP17	ITP7	ITP7		ESAM					
AC1021377	G06145	H2AC19	LRDMT	PCP1	SLC5A12	MR22HG		POLIM3					
AC016682.1	MMNRN2	SLF6	SVTL5	CLTB	LROR6C	ACTN1		TIEB					
STR46	CYP4B1	TMEM363	RAD9A	RAB11FP3	AP00076.1	AC00994.1		NID1					
CC17	ERP27	CLC4A	CEMP1	TBM7L1	ZNF513	MSF2A		AC012645					
SLC26A11	KCNJ2-AS1	LNCO1186	G56-AS1	TCR11	SNA2	RABGP1L-DT		HTF16					
AC02257	KCTD15	DM2	PCP1	SIRP1	SLC12A1	SLC12A1		SLC12A1					
AC02257	AC027020.2	ITGA9-AS1	PER2	GWG2	STAR09	FLIP1		MAF					
PRR15L	MCPIH-AS1	TPR2L1	NUITMD2	KL7	AC006877.2	CDC47A		PLPRA					
OFPC1	AC188616.1	KCNH3	CTSC	AP382	LAMC2	LPAR5		IL2RB					
AC097709.1	ER18	HOXB1	DNAAF3	PRDM8	NDRG1	PIK3P1		CRBB5					
AC102263	PCP1	POF18	ADOS	INP512	SMTN	FMFAP1		NCKG-1					
BK02011.1	CAPN8	CCP1	LG1G	LIPO	PS32	SH3P4		ACTP1					
AC102733.4	ALMD479.7	EVXDC6	ANK1	RBMS2	RAB27	MSH5A		MYC71					
BMPS	CAB	PRODH	AC005083.1	VGLL3	NHPH1	LACB2		CTSD3C2					
FAM183A	CL50662	NEAT1	CHEK2	TPM4	CCD92	PLEKHG1		NOG					
F5	QMALINC	AC008771.1	AC009005.1	RAB2A	EMC3	SOX9		TAGLN					
AC048877.3	BCAAS1	RABH3	TNRAP1	PIG3	PIG3	PIG3		TM6H8					
FUT9	PLAC8	SLC25A21	RCCD1	FAM177A1	STAT5A	FSDV		AC013738.1					
FM01	LCN2	AP001273.1	LRR5	UBEDZ5	ANTX2	MR181A2HG		NDYF					
LYNIP-SLURP2	TGFB3	C11orf54	ERK1	ZFBLN3	MYO2P2	SERPINE2		KIFS1					
CC542	AC068896.3	AC008860.2	PCBP2A1.1	MVL17	PA4A2	AC13995.2		ML7					
SLC15A5	ALDH1A1	PLD6	IKZF2	PLK3	MSGL	AC011462.5		AC037198.1					
AC039811.1	STDPK9.1	CLT3	PLDH3	PCP1	PCP1	PCP1		CHRNA9					
LNCO0513	FGFR3	AC007342.5	H2ACD	CSRP1	SLC6A3	TNFRSF19		AC027682.6					
AC039811.1	STDPK9.1	CLT3	PLDH3	PCP1	PCP1	PCP1		CHRNA9					
ADAH	PRICKLE4	PARD6B	AC015660.1	KL6	DMBT1	HTOC		PMP24					
PLEKH15	AC02066.1	AL603750.1	NOTCH3	DISP8	MICAL1	PRODR		ACTP21P					
B3GALT5	AC006054.7	ITIM1	ADON	TC7B	FRMD6	POLK1F		DK12					
SLC2A	SLC2A	MCN2	AC001353.5	SLC2A	HSP91A	SLC2A2		SLC2A2					
AC02154.2	AL35512.1	ARGH16	SPITLC3	CANV9	V5G61	POLIM7		SPIRBL1					
CD93	CRCC	CYP47A2P	TPP2	TKM4	CLIC3	AKP42		SLC8A2					
VSIG2	HGGD	KIAM13A2	GAIP1	STGAL5	TSC2D13	LCPA2		ADAM19					
TMK1	DFB1	ALDH3B1	GSMDC	MEK3A	RTN4	ADAM58		AC018978.1					
TMEM169	AP002478.1	GVQV3	IQANK1	TMEM45A	SL34593.1	FAM166B		NPA3					
BPFR1	AC130603.2	ALB00767.2	WDR82	AC00913.1	NDR3	SANC8		CHN1					
YL1	TNFR2	CTF1A	CDC2	CSK2	NCX	BRAD		AC007748.1					
SNK31	AL157829.1	ETP8	CPVL	DGKA	PPP2R5B	ITGAS		PCOON741					
HOKAS	TENTSC	PH1-2	IL4R	CCM2	COROL1A	SRLM3		CHST11					
USHBP1	FAAH2	CNTNAP3B	TBR28A	CAD1	RG33	F0X81		EFNA2					
FAM9A9	SECTM1	ICATL	CCG1	CCG1P1	AMPD1	ARGHAP24		CBP1					
FAM9B1	ELL3	CCG1	CCG1P1	SMPY1	ARGHAP19	BAG46B1		PORCNL1					
LNCO1747	FOSL5	HOKA1	TRNP1	PAMP1	SLC12A1	GBF1		INSL4					
MMEL1	SOX2-OT	CEP126	MT1X	PWWP2A	PLTRC	SPOCD1		FLBN2					
FFR48	IGSF10	LRRATD1	EFNB1	ZFPM1	APBB2	MNR10HG		ADAM57					
AL132227.1	AL596202.1	SLC25A5	LN1045	RNAV1	SLC39A8	ALB13		HMCN1					
TFB3	MASTE-AS1	TM6M	IC11P2	CANE7	EDL3	TGM2		FOLR3					
BMW1A	TPRG1	C15orf41	S177	STOML1	TUN	PPP1R36		AC00105.3					
FACH	HPD	CHST14	NBP14	FEBP14	CHP1	SLC14A2		ITF1					
AC078587.2	AC04860.1	MBP	PINK1	KLK1	CHFP	SEMA3C		FGF5					
EVRLT	RAS5F	KCNJ2	LAMTOR3	DNASE11	CAVIN1	ASGR1		AC13894.1					
B3GALT5-AS1	LNCO12617	SPINK5	SLC12A4	NIP4L4	FNPA1	NMN		HEG1					
CBP2	CD3A	WNT3	WNT3	ULBP1	CSX	CKB		CT6					
MSFDA4	FM617B1	NEODP1	AC001	AP1	ACKR3	LNCO0933		AGMD					
PIGY	NR6A1	DNAJC5-OT	FAXC	ST20-MTHFS	SLC16A2	CPH2		CALM3					
MYO3B	AC039873.1	AP002495.1	DFB	MLT11	BAGALNT1	DM22		RHOI					
AC102704.1	SCN9A	RNFS13	STC1	AC05877.1	CLC2	POU3F1		TCB8					
AC006460.1	AP0BEC3B	BCAM	AD1	PLK2	QDQ1	PDU3F1		TCB8					
ATP9B1	AC10714.1	IL10RA	AC04	SCN4A4	CPG1716	RIFNB		BEANI					
FZXL1	AC007242.8	ASBP	TPSND3	OSTC	SNAI-AS1	CEB2		ANK2					
SOD3	ELFN-AS1	TP12	NRGN	CDN	LARGE1	PDE7A		PCMGCS					
ADH7	LNCO1233	ULPH	PTPR	HOCX13	PTPRB	AC002456.1		AC006867.6					
CEBA2T3	C21orf59-TP10L1	DERB3	ZNF319	FL3	MAMLD1	C10L1		C101f04					
KL121A	H4-6	G8B7	FBLM1	WACHS4	ALDH11L2	HB		AC024901.1					
PP565360.3	AC00103.2	MARGA2	RNF43	ATP1	ATP1	ATP1		SHRPL1					
MLB21A	CATR3	PBF1	KLK12	GRPN1	PTPN21	LTB19		AC029407.1					
CELP	H2C818	GULP1	CUB3904.2	TEAD2	CD274	KIF268		AC119044.1					
AC104024.3	STRB9	RAB49	GAD65A	PMG124B	PHL3	GRM132		MSC					
AC090023.2	AC10655.4	GLS2	MEAK7	RNF217-AS1	FAM244.1	CMT3		TRNDH					
NALVALD2	TMEM139	AC007342.9	LRP12	MGAT4B	STGAL1	PADM3		QD04111					
AC111149.2	AC111149.2	AC111149.2	AC111149.2	AC111149.2	AC111149.2	AC111149.2		AC111149.2					
LNCO1559	ALDH1A2	PRR15	VKORC1	ADSL1	JAK3	NKILA		LNCO1934					
CYP1A1	AC035661.1	ZDHHC23	VEGFC	ST20-AS1	TRAM1	ALAS1123.1		C03D04					
UBRS-AS1	LNCO1977	PKIB	CDKN1A	SLC12orf75	SPHK3	LNCO1137		AC016582.1					
H19	LYPD6B	KIAA1958	SERINC2	ARGHFE18	CDK14	AC074143.1		RGS12					
LNCO589	LYG6-OT	DMC1	STX11	GANT1	CSMR1	CDC74B		CK5B					
AC1121304.1	GAB1	AC001	AC001	AC001	AC001	AC001		AC001					
FNTR3	ANKRD33B	LMG07	TMSB4X	STAN	MSR155HG	TMEM121		AC016813.1					
ANNT2	AC007342.4	WPKD1	CEP112	C2orf27A	TBC1D218	HOCX13-AS1		HOCX5					
ZBTB32	AC006677.4	ZNLF2	WIP1	BPGM	AC020613.1	STOK2		STK32A					
AL118508.2	BC16	LCN1	APH1B	PPR118	LNCO12381	SH2D3C		DAZL					
LY1	SPHR16	LY1	SPHR16	LY1	SPHR16	LY1		PCDTH					
FAT1	RPS10P	EBD	PCP1	PCP1	PCP1	PCP1		AC103433.1					
CYP4K1	SPAG17	SLC16A12	FAM2	PCDH8	MATN3	GFP2		CEU39417.3					
AC048070.2	TC123	RNA5-8S2	CLYD	KIF21B	GRN157	AC111149.2		COG1847					
LNCO1958	KLK15	SMPLD3A	LCAT	CYP4K1	PLS3	AMTN		TNFAIP6					
GCN3	TMEM52	IL1RN	ZYX	CAPA1	MOCS1	GRN157		AC006867.1					
LNCO15948	PRAG1	MOCS3	MOCS3	MOCS3	MOCS3	MOCS3		PCPD162					
AC011268.1	ATP11A	ATP11A	ATP11A	ATP11A	ATP11A	ATP11A		AC011268.1					
COL2A2	H2BU1	FL072	IL3LR1	GRM17B	AC006867.4	MYH16		HCRA					
COLEC10	TMEM170B	H6S51	POU2F2	UBD2	AC091673.1	FAM131C		WSCD2					
SLC04C1	CLTN	FLVCR2	ADA	CCD88B	CARM3L2	CN2							
AC132123.1	AC068580.2	SAPD02	ITGAV	B3GNT9	AL59082.3	KCNH4							
AGR2	AC007261	SLC25A3-AS1	SLC25A3	SLC25A3	SLC25A3	SLC25A3		ITGB6					
SLC11	SLC11	SLC11	SLC11	SLC11	SLC11	SLC11		SLC11					

TG68_1h(TG68_24h) (8)	
ZNF516-ZNF321P	NXJ1
MGAM2	KCNJ15
COLC11	F3
CH25H	AMIGO2
MUC5B	ZSWIM4
CPUL2	ROBO1
PRAD14448	TMEM1892
CP2	PPP1R14B-AS1
LAMB3	MSK2
NMBP2L1	CAMK1N3
LINC00342	LHD5
SLC15A6	STXBP1
AC016588.2	SCN1B
AC090517.5	SLC43A
AC005054.5	KIAA1191
EPAK3	TRIM7
ZSCAN12P1	PRG1
CALCR1	BHLHE40
DYNCH12	FAM1748
H2BC6	SIK1
H2B4	ENK1
MIR6008	CRADD
DEPTOR	PPP1R3F
REG10	TM25-2451
OSCN	RIPK3
TCN2	RTNMR2
RTKN2	GIB4
ZPMF-AS1	ANKRD14
ANKRD46	MEPEP1
GRHL1	LINC1258.1
ZSCAN31	L602028.1
LINC1H	LINC02551
NFKB2	LINC01762
C20orf179	MBE8B1
AD10919.1	AC104479.1
DDN	IGF2I
PFKP	PCQD10
TMEM231	APDH18
ZNF688	KMOA2
FAF2	MYB1
NKX6	CSAFB
ATP2C2	MSC-AS1
SFN	ABCD1D1

Table S2

SMAD2/3 putative targets in response to TGF, in the absence of SMAD4.

AC020915.5	FILIP1L	NLRP1
ABLIM2	FLG	NOG
AC004870.2	FN1	ODF3L1
AC008687.4	FOXL1	PCDHGC5
AC010343.3	GCNT3	PDLIM7
AC011294.1	GDPD5	PIK3IP1
AC037198.1	GFPT2	PLEKHG1
AC090994.1	GJB2	PODXL
AC114501.2	GOLGA8G	POU2F2
ACKR3	GPR132	PROC
ADAM19	GPR157	PRODH
ADAMTS6	H19	PTGS2
ADH7	HAPLN3	PTPRB
AGR2	HIC1	PTPRE
AKAP12	HOXC13	PTPRK
AKR1B10	HOXC13-AS	RHOV
AL358334.2	IL20RA	RNASE7
AL451123.1	ITGB6	RRAD
AMTN	KCNJ15	SEMA3C
ANKRD33B	KCNJ2	SERPINE1
APCDD1L-DT	KLF7	SERPINE2
AQP1	KLHL25	SH2D3C
ATP6V1B1	KPNA7	SIAH3
C5AR1	KRT13	SLC26A2
C5AR2	KRT15	SLC46A3
CASZ1	LAMC2	SOX9
CCDC74A	LARGE1	SPHK1
CCDC80	LARGE2	SPOCD1
CDKN1A	LGALS7B	STAT4
CGB5	LINC00313	STEAP4
CGB7	LINC00589	SYNPO
CGB8	LINC00862	TAGLN
CHST11	LINC02551	TFEB
CLCA4	LIPG	TGFBI
CLIC3	LNCOG	TGM2
COL1A1	LOXL2	TLR6
CORO1A	LPAR5	TMEM45A
CRIP2	LPCAT2	TMEM92
CSPG4	LPXN	TNFRSF19
CYP26B1	MAF	TUBA1A
DAZL	MATN3	TXK
DEFB1	MICAL1	VGLL1
DISP2	MIR100HG	VGLL3
DYSF	MIR22HG	WNT4
EFNA2	MUC1	
ELFN1	MYADM	
ESAM	MYH16	
FAM214B	MYL9	
FBXO39	NDRG4	
FGF1	NKILA	

Table S3

Gene target (human)	Primer sequence (5'-3')
<i>FGF1</i>	F : TACTCTGAGAAGAAGACACC R : GCGCTTCAAGACTAAAGAG
<i>ITGB6</i>	F : TGATCCTTAAGTTGAGACCAG R : CTCCTTTATTGTGTGAGGTC
<i>LPXN</i>	F : GTTAGATGCCTTATTGGAGG R : GGACTTGTGTTATCCTGAATAG
<i>TGFB1</i>	F : GGATTGTAAGTGTGAAGTGTG R : CAATGATCTGCTGGATGTTG
<i>GAPDH</i>	F : CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT R : AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC

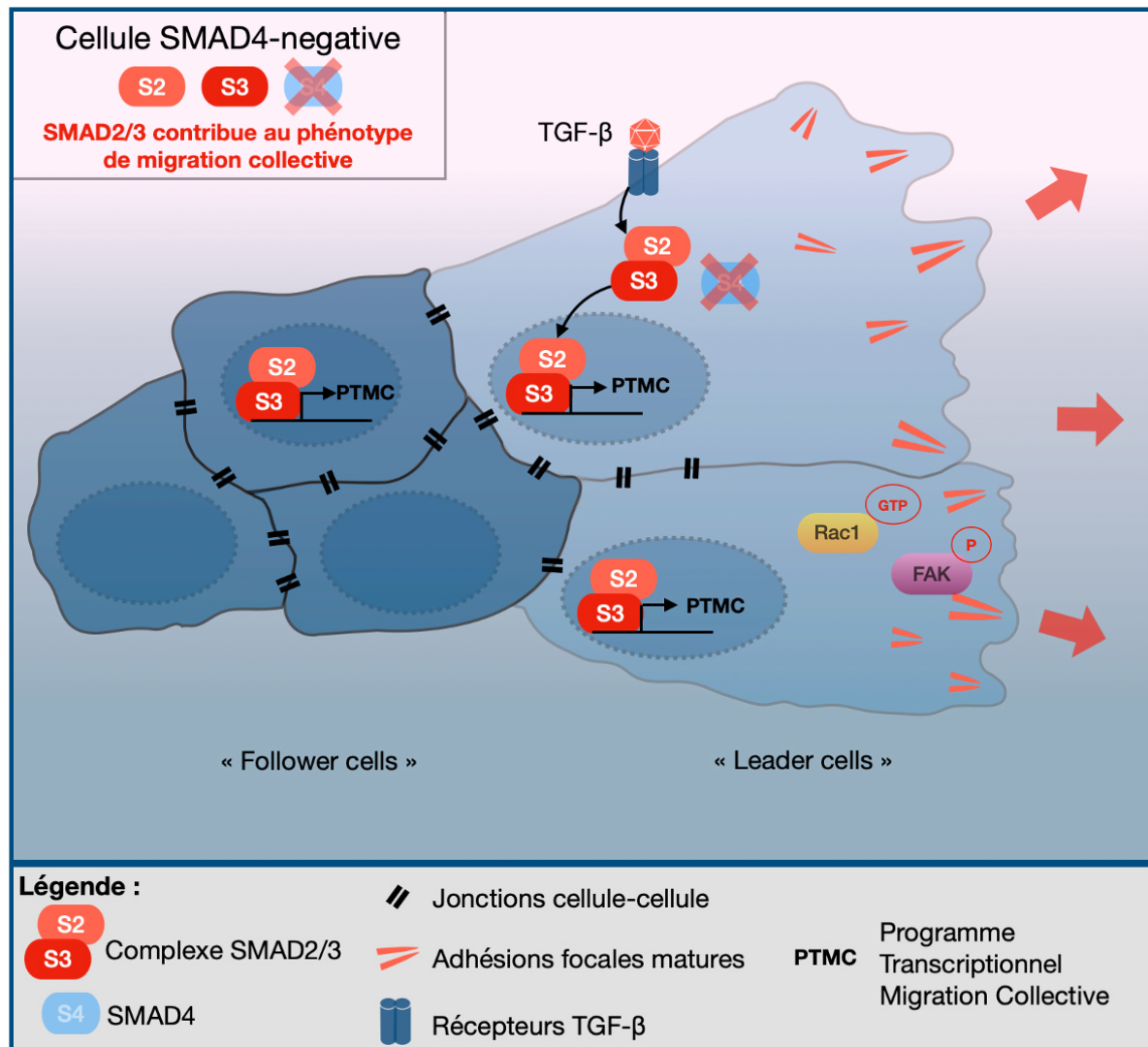


Figure 19 – Schéma récapitulatif des résultats obtenus

DISCUSSION & PERSPECTIVES

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Malgré de nombreuses avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires et génétiques associés à la carcinogenèse et à l'échappement tumoral, les adénocarcinomes canaux pancréatiques (ADKP) restent associés à un très mauvais pronostic en raison d'un diagnostic tardif, d'un potentiel métastatique élevé et de l'échec des stratégies thérapeutiques actuelles.

La carcinogénèse pancréatique est associée à des mutations récurrentes, plus ou moins précoces, favorisant le caractère agressif de ces tumeurs. Or, la voie de signalisation du TGF- β est l'une des plus altérées dans les cancers pancréatiques. Le TGF- β est une cytokine impliquée dans de nombreux processus homéostatiques, mais jouant également un rôle complexe dans l'initiation et la progression tumorale. Cette complexité s'explique par sa dualité fonctionnelle, puisque l'activation de cette voie de signalisation est supposée avoir un effet suppresseur de tumeurs au moment de l'initiation, alors que le TGF- β joue plutôt un rôle oncogénique dans les phases plus tardives de la progression tumorale. A cette complexité fonctionnelle, s'ajoute une complexité moléculaire, puisque cette cytokine est susceptible de déclencher un large panel de voies de signalisation aux effets variés, en fonction du contexte cellulaire et du microenvironnement. Le TGF- β est fortement exprimé dans les adénocarcinomes pancréatiques, et notamment par le stroma entourant la tumeur. **La compréhension fine et l'intégration des dérégulations affectant les voies de signalisation du TGF- β sont donc extrêmement importantes pour comprendre l'impact de cette cytokine sur la genèse, la transformation et l'évolution des ADKP.**

La mutation inactivatrice du gène *SMAD4*, codant pour un facteur de transcription impliqué dans la voie de signalisation canonique du TGF- β , est observée dans la moitié des adénocarcinomes pancréatiques de stades avancés. Cette mutation est associée à la progression de la maladie, et notamment à la taille de la tumeur, à la dissémination ganglionnaire, ou encore à la présence de métastases à distance. Cette mutation est donc identifiée comme un facteur de plus mauvais pronostic. La plupart des travaux précédents associaient ces observations à la perte de fonction de SMAD4 et aux voies non-canoniques. Cependant, il était possible d'envisager que SMAD2 et SMAD3 puissent acquérir des fonctions oncogéniques en absence de SMAD4, compte-tenu de leur capacité de liaison à nombreux autres cofacteurs et/ou corégulateurs.

Les travaux réalisés dans le cadre de mon projet de thèse ont effectivement permis de mettre en évidence un niveau additionnel de complexité, en montrant que la persistance des protéines SMAD2/3 dans un contexte de déficience en SMAD4 favorisait probablement directement l'échappement tumoral, via l'activation d'un programme transcriptionnel SMAD2/3-dépendant mais SMAD4 indépendant. Nous

avons également corrélé l'expression des gènes cibles de ce programme spécifique de SMAD2/3 à l'acquisition d'un phénotype migratoire et invasif, *in vitro*, en utilisant deux lignées cancéreuses pancréatiques humaines SMAD4-négatives, mais également *in vivo* chez le poisson zèbre.

Ces données incitent à la caractérisation précise des mécanismes SMAD2/3-dépendants associés à l'activation de la voie TGF- β dans les ADKP, afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de ciblage de cette voie.

SMAD4 : au cœur de la voie canonique du TGF- β ?

Jusque récemment, SMAD4 était considéré comme un effecteur central de la voie canonique du TGF- β , notamment du fait de son rôle de régulateur de la relocalisation du complexe SMAD2/3 vers le noyau lorsque la voie était activée par la liaison ligand/récepteur. Réciproquement, il était donc admis qu'en l'absence de SMAD4, la voie canonique soit non-fonctionnelle, expliquant de fait sa catégorisation en tant que suppresseur de tumeurs dans les ADKP.

Cependant, plusieurs études antérieures ont montré que SMAD4 n'était pas nécessaire à la translocation nucléaire et à la liaison à l'ADN des R-SMAD, mais que SMAD4 était essentiel pour l'activité transcriptionnelle de SMAD2/3 (Fink et al., 2003; Liu et al., 1997). Nos analyses transcriptomiques suggèrent au contraire que SMAD2/3 régulent des gènes indépendamment de SMAD4. SMAD4 ne serait donc pas nécessaire à la fonctionnalité du complexe SMAD2/3, réinterrogeant de fait la classification de SMAD4 en tant que co-SMAD, indispensable à l'activité transcriptionnelle de la voie canonique. La dissection fine de la composition des complexes SMAD, et de leur capacité respective de translocation nucléaire et de régulation transcriptionnelle, doivent donc être précisées avec soin pour améliorer notre compréhension de l'impact de leur altération dans les ADKP.

Une ou des voies canoniques ?

Historiquement, c'est d'abord par sa capacité à activer les facteurs de transcription SMAD que le TGF- β a été impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Cette vision a été revisitée avec l'identification de sa capacité à transduire d'autres cascades intracellulaires, aboutissant in fine à la distinction entre une voie canonique, SMAD-dépendante, et des voies non-canoniques, SMAD-indépendantes.

Les résultats obtenus au cours de mon doctorat suggèrent qu'il puisse exister non pas une, mais des voies canoniques, avec la formation de différents complexes SMAD, en fonction de la présence de ces effecteurs au sein de la cellule.

Dans ce contexte, il apparaît pertinent d'analyser les rôles propres à chaque R-SMAD, notamment en l'absence de SMAD4.

Dans un contexte SMAD4-positif, SMAD2 et SMAD3 ont été décrits comme ayant des rôles parfois opposés et parfois redondants (Petersen et al., 2010; Takimoto et al., 2010; Ungefroren et al., 2011). Or, il est démontré que SMAD2 ne peut pas lier directement l'ADN du fait de son exon 3, qui masque le motif de liaison à la double hélice. Ceci suggère que dans notre modèle, seule la protéine SMAD3 puisse se lier directement dans les régions promotrices des gènes. Cependant, il existe de très nombreux cofacteurs, autres que SMAD4, capables de lier les protéines SMAD2/3, et de s'associer à l'ADN, avec un ciblage de régions génomiques différentes, et donc un impact phénotypique spécifique (David and Massagué, 2018; Massagué, 2000). Dans un contexte tumoral, on peut notamment citer c-MYC, qui peut directement lier SMAD2 et SMAD3 pour se fixer sur le promoteur du gène *CDKN2B* et inhiber sa transcription induite par les SMAD (Feng et al., 2002). Il apparaît alors judicieux d'identifier précisément les cofacteurs liés à SMAD2/3 (en absence de SMAD4), responsables du phénotype invasif observé dans nos modèles par exemple. Il est également indispensable de déterminer si SMAD2/3 peuvent induire leurs effets oncogéniques dans un contexte SMAD4-positif. Plusieurs études montrent que la restauration de SMAD4 dans des cellules cancéreuses pancréatiques SMAD4-négatives permet de supprimer les phénotypes migratoires, prolifératifs et pro-angiogéniques de ces cellules (Duda et al., 2003; Ramachandra et al., 2002; Schwarte-Waldhoff et al., 2000).

De manière plus globale, une approche intégrative précisant l'identité des complexes SMAD observés notamment dans un contexte de déficience en SMAD4 est un enjeu majeur pour mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'expression des gènes médiée par le TGF- β en fonction du contexte cellulaire (David and Massagué, 2018; Mullen et al., 2011). Ces travaux pourraient permettre de préciser l'existence de plusieurs voies canoniques ou SMAD-dépendantes, et de définir leur impact dans la survenue et l'aggravation des ADKP.

Le modèle SMAD-triple KO : vers la définition du rôle exact des voies non-canoniques dans les ADKP ?

L'inactivation de l'ensemble des SMAD de la voie canonique du TGF- β (SMAD2/3/4-KO) dans les cellules cancéreuses pancréatiques, nous a permis d'obtenir un modèle intéressant pour l'étude des voies non-canoniques et de leurs interactions. En effet, les voies de signalisation du TGF- β ont des interactions nombreuses, et constituent fréquemment des carrefours de signalisation, complexifiant l'étude de leurs rôles. Par ailleurs, ces voies sont également activées par de nombreux autres facteurs. L'inactivation totale des acteurs cellulaires de la voie canonique permet de fait, de disposer d'un modèle permettant

d'étudier précisément les actions des voies non canoniques dans la tumorigenèse, et les éventuelles interactions existantes entre les voies non-canoniques et la voie SMAD-dépendante.

L'implication des voies non-canoniques du TGF- β dans la carcinogenèse n'est plus à démontrer. Cependant, de nombreuses études font encore état de nouveaux niveaux de complexité suite à l'activation de ces voies par le TGF- β (e.g. Hippo, Wnt/ β -catenin, Hedgehog) créant un maillage de signalisation toujours plus dense (Abuammah et al., 2018; Ben Mimoun and Mauviel, 2018; Pelullo et al., 2019). Si la dissection de l'implication de chacune de ces voies dans la survenue des ADKP est une première étape essentielle, l'intégration de leurs effets combinatoires est à présent indispensable pour comprendre précisément les mécanismes oncogéniques associés aux ADKP et les points de ciblage thérapeutique pertinents. En ce sens, nos modèles pourraient constituer des outils intéressants.

Régulation de la motilité cellulaire par le TGF- β : place de la migration collective ?

Dans notre étude, la plupart des gènes identifiés comme dérégulés suite à l'inactivation de SMAD2/3 en l'absence de SMAD4 sont impliqués dans la régulation des processus de motilité et d'invasion cellulaire.

L'un des mécanismes d'initiation de la migration cellulaire le plus décrit est la transition épithélio-mésenchymateuse, ou EMT (Brabletz et al., 2018; Zhang and Weinberg, 2018). Ce programme cellulaire où les adhésions cellules-cellules et les interactions avec la matrice sont fortement remodelées, contribue au détachement des cellules épithéliales, à leur migration par l'acquisition de marqueurs mésenchymateux et au remaniement du cytosquelette.

Cependant, ce concept de plasticité épithélio-mésenchymateuse fait l'objet de controverses, et il semble qu'il existe un certain gradient de transition entre une EMT classique et certains états transitoires, suivant le contexte cellulaire et environnemental (Williams et al., 2019). De nombreuses études ont montré que des cellules en cours de migration pouvaient conserver un phénotype plus ou moins épithélial (Pastushenko and Blanpain, 2019). On parle notamment « d'EMT-hybride » ou « d'EMT-partielle », décrivant des cellules sans polarité apico-basale mais avec des adhésions cellules-cellules conservées, et possédant un fort potentiel migratoire (Jolly et al., 2018; Pastushenko and Blanpain, 2019). Les travaux de Pastushenko et al. mettent en évidence ces différents états de transition et démontrent une certaine plasticité entre eux lors de la migration des cellules cancéreuses. Ils décrivent notamment l'implication du TGF- β et des SMAD2/3 dans la progression des cellules vers un état épithélio-mésenchymateux hybride (Pastushenko et al., 2018).

Quoiqu'il en soit, durant la dernière décennie, de nombreuses études ont montré qu'une EMT totale n'était pas indispensable au développement de métastases (Whittle and Hingorani, 2015). En effet, des agrégats de plusieurs cellules cancéreuses circulantes originaires de différents types de tumeurs épithéliales ont été identifiés, suggérant une activation seulement partielle des programmes de l'EMT et la possibilité de mécanismes alternatifs de migration, voire de mécanismes hybrides (Aceto et al., 2014; Cho et al., 2012). Dans les adénocarcinomes pancréatiques murins, l'inactivation de gènes drivers de l'EMT (*Twist1* et *Snail*), n'altère pas la capacité d'invasion locale et à distance - foie ou poumons - malgré la perte significative de l'expression de ces gènes clés de l'EMT (Zheng et al., 2015). Nos résultats semblent se rapprocher de ce qui est observé dans ces études puisque la migration induite par le TGF- β via SMAD2/3 et indépendamment de SMAD4, n'est pas liée à la mise en place d'une EMT au sens strict du terme, mais passerait plutôt par des phénomènes de migration collective. En effet, les cellules SMAD4-négatives restent particulièrement cohésives et les gènes de l'EMT ne sont que modérément exprimés en présence de TGF- β .

La migration collective a d'abord été décrite dans les mécanismes de morphogénèse et de réparation tissulaire, processus dans lesquels le TGF- β est fortement impliqué. Par définition, ce type de migration est caractérisé par le déplacement d'un groupe de cellules capable de maintenir de fortes liaisons intercellulaires et une polarité collective (Campbell and Casanova, 2016; Friedl and Gilmour, 2009; Iliina and Friedl, 2009). De récentes études ont montré que les processus de migration collective étaient associés à des phénotypes particulièrement agressifs dans les cancers, et notamment dans les adénocarcinomes pancréatiques. *Carstens et al.* ont récemment démontré que la migration collective des cellules cancéreuses pancréatiques conduisait à l'augmentation des métastases dans le foie (Carstens et al., 2021). Par ailleurs, les récents travaux d'*Huang et al.* ont démontré que la perte de SMAD4 était associée à l'invasion collective des organoïdes dérivés d'adénocarcinomes pancréatiques de patients. Enfin, la réexpression de SMAD4 dans ces organoïdes altère l'invasion collective, suggérant le rôle prépondérant de la mutation de SMAD4 dans la mise en place de ces mécanismes migratoires (Huang et al., 2020).

Nos travaux apportent alors un peu plus de complexité dans les processus de migration induits par le TGF- β puisque ce n'est pas seulement la perte de fonction de SMAD4 qui est responsable de ce phénotype de migration collective, mais bien le gain de fonction de SMAD2/3 en l'absence de SMAD4. L'inactivation des jonctions cellule-cellule (*e.g.* interférence à l'ARN, CRISPR/Cas9) ou des analyses sur cellule unique permettraient d'étudier si la migration collective est indispensable au processus de motilité de ces cellules, dans un contexte de déficience en SMAD4.

D'un switch transcriptionnel SMAD2/3-dépendant à l'accroissement de la migration cellulaire : quel lien de cause à effet ?

L'analyse des gènes régulés par SMAD2/3 en l'absence de SMAD4 montre un enrichissement des gènes impliqués dans la migration et l'invasion cellulaire (*e.g.* remodelage de la matrice extracellulaire, motilité cellulaire, locomotion...). Récemment, des analyses ont similairement mis en évidence une signature oncogénique de 28 gènes enrichis dans les adénocarcinomes pancréatiques par rapport au tissu sain (Atay, 2020). Nos analyses ont permis de confirmer l'enrichissement de 3 de ces gènes (*e.g.* *ITGB6*, *LAMC2* et *TGM2*) dans les cellules SMAD4-négatives par rapport aux cellules SMAD2/3/4-négatives.

Dans notre étude, nous avons établi un parallèle entre l'activation de ce programme transcriptionnel promigratoire avec le phénotype observé lors du traitement des cellules SMAD4-déficientes avec le TGF- β . Il sera néanmoins nécessaire de démontrer le lien de causalité entre ces résultats, *i.e.* de définir si l'activation de gènes précis par le complexe SMAD2/3 est effectivement responsable de la mise en mouvement des cellules, afin de préciser les mécanismes moléculaires associés. Ceci pourra notamment se faire via l'inactivation des gènes identifiés comme différentiellement exprimés dans notre étude transcriptomique, susceptibles d'être impliqués dans l'acquisition du phénotype migratoire induit par le TGF- β par l'intermédiaire de SMAD2/3, et de manière SMAD4-indépendante.

En particulier, lors des phénomènes de motilité cellulaire, des structures transmembranaires multi-protéiques, appelées adhésions focales, sont capables de déclencher la formation de protrusions cellulaires et de potentialiser des forces de tractions cellulaires (De Pascalis and Etienne-Manneville, 2017; Mayor and Etienne-Manneville, 2016). Nos résultats soulignent l'implication de ces structures complexes dans la migration collective des cellules SMAD4-négatives. Bien que les adhésions focales soient présentes dans les lignées SMAD4-négatives et SMAD2/3/4-négatives, nous avons montré qu'elles n'étaient pas fonctionnelles dans les cellules SMAD2/3/4-négatives, expliquant en partie l'absence de migration de ces cellules. Il semble que la maturation des adhésions focales, nécessaire à la mise en place des forces de traction, ne soit pas amorcée dans les cellules SMAD2/3/4-négatives, où les adhésions focales restent dans un état naissant au niveau du front de migration cellulaire. Ces différences pourraient s'expliquer par le différentiel d'activation de la voie RhoA/Rac, identifiée comme l'un des régulateurs clé de la maturation des adhésions focales (Vicente-Manzanares and Horwitz, 2011). Nos résultats montrent en effet que la protéine RAC1 est activée dans les cellules SMAD4-négative, caractérisées par des adhésions focales matures et une migration collective marquée. En revanche, RAC1 n'est pas activée en présence de TGF- β dans les cellules SMAD2/3/4-négatives, suggérant un rôle de SMAD2/3 dans l'activation, directe ou indirecte, de cette protéine. Il est intéressant

de noter que l'étude d'*Ungefroren et al.* a déjà mis en évidence le rôle de SMAD2/3 dans l'activation de RAC1 dans les cellules cancéreuses pancréatiques, mais en présence de SMAD4 (Ungefroren et al., 2011). Ces données renforcent nos résultats, tout en soulignant à nouveau la nécessité de définir exactement le rôle précis et spécifique des complexes SMAD.

En parallèle, nous avons identifié une surexpression de plusieurs gènes connus pour moduler l'activité de RAC1 (*e.g.* ITGB6, FGF1, COL1A1, FN1, ABLIM2, MYL9) dans les cellules SMAD4-négatives, renforçant l'hypothèse d'une activation de RAC1 médiée indirectement par SMAD2/3 en l'absence de SMAD4. Des expériences d'inactivation de gènes (*e.g.* CRISPR/Cas9, interférences à l'ARN) sont cependant requises pour définir si SMAD2/3 régule effectivement la dynamique des complexes d'adhésion focales, en modulant l'expression de gènes impliqués dans la régulation de RAC1.

Vers le développement de modèles cellulaires plus complexes pour appréhender la complexité moléculaire des voies induites par le TGF- β dans les ADKP ?

La culture de cellules cancéreuses en 2D a permis de faire des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes oncogéniques. Cependant, la culture 2D de lignées cellulaires possède des limites, en particulier pour étudier les interactions des cellules cancéreuses avec les cellules stromales et la matrice extracellulaire, analyser la polarité ou la dynamique des contacts cellulaires. L'émergence de modèles plus complexes (*e.g.* co-culture, sphéroïdes, organoïdes) permet de disséquer plus finement certains mécanismes oncogéniques et d'avoir des outils plus représentatifs des conditions observées *in vivo*, notamment pour tester les interactions des cellules tumorales avec leur environnement (Baker et al., 2016; Driehuis et al., 2019). En ce sens, par des expériences de co-culture de cellules nerveuses - fréquemment rencontrées dans le stroma tumoral - avec des cellules cancéreuses pancréatiques, notre laboratoire a mis en évidence un dialogue neuro-épithélial favorisant l'agressivité des cellules cancéreuses pancréatiques (Roger et al., 2019).

D'autre part, les organoïdes sont des amas cellulaires 3D cultivés *in vitro*, dérivés de cellules souches pluripotentes, ou de cellules souches spécifiques de tissus, dans lesquels les cellules s'auto-organisent spontanément en types cellulaires différenciés, qui récapitulent au moins certaines fonctions de l'organe de départ (Clevers, 2016; Drost and Clevers, 2018). L'établissement d'organoïdes dérivés d'échantillons de tumeurs (également appelés tumoroides) est apparu comme un outil clé pour améliorer notre compréhension des cancers humains. En effet, les tumoroides préservent (i) l'architecture histologique, (ii) le profil d'expression génique, (iii) le profil génomique et épigénomique, (iv) l'hétérogénéité génétique et cellulaire intra-tumorale, et (v) le potentiel métastatique, de la tumeur d'origine même après une expansion à long terme en culture, ce qui en fait des outils précis et puissants pour la recherche fondamentale et clinique (Drost and Clevers, 2018). Dernièrement, l'étude d'organoïdes générés à partir

de biopsies de patients atteints d'ADKP a ainsi permis de mettre en évidence une importante hétérogénéité intra et inter-tumorale des cancers pancréatiques et la présence importante des cellules de type «basal», caractéristiques de tumeurs particulièrement agressives, dédifférenciées et de plus mauvais pronostic (Juiz et al., 2020).

Dans le cadre de notre étude, l'utilisation de modèles organoïdes serait particulièrement intéressante à deux niveaux :

- / d'une part pour définir de manière fine comment le complexe SMAD2/3 modifie les interactions cellulaires sous l'effet du TGF- β , et analyser de manière plus précise et fiable les modalités de mise en mouvement des cellules d'adénocarcinomes pancréatiques
- / d'autre part, pour intégrer la dimension d'hétérogénéité intra-tumorale dans nos analyses. Il est en effet tout à fait possible d'imaginer que le niveau d'expression des effecteurs des voies du TGF- β ne soit pas similaire dans toutes les cellules au sein de la tumeur. En conséquence, l'impact du TGF- β pourrait varier entre les cellules tumorales, du fait de l'activation de voies de signalisation intracellulaires différentes. L'utilisation d'organoïdes permettrait d'intégrer ce paramètre en combinant des analyses de single-cell RNAseq et le développement de modèles modifiés génétiquement pour suivre l'impact phénotypique du TGF- β sur les différentes populations cellulaires tumorales (par exemple, souches vs différenciées) à l'aide de rapporteurs fluorescents.

Disséquer les voies moléculaires induites par le TGF- β : quel apport en clinique ?

Les analyses immuno-histochimiques d'une cohorte d'adénocarcinomes pancréatiques humains nous ont permis de démontrer que les tumeurs SMAD4-négatives avec un haut niveau d'activation de SMAD2 sont de plus mauvais pronostic (baisse de la survie globale après résection) et associées à une augmentation de l'invasion péri-neurale. Quoique ces données ne permettent pas d'améliorer significativement la prise en charge des patients, il souligne le potentiel clinique associé à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires associés à la transduction du signal du TGF- β .

En particulier, nos données RNAseq ont permis d'identifier un certain nombre de cibles transcriptionnelles potentielles du complexe SMAD2/3. Il apparaît alors essentiel de valider l'implication fonctionnelle de certaines de ces cibles dans les modifications phénotypiques observées en réponse au TGF- β et, le cas échéant, de corrélér leur expression avec le statut de SMAD4, l'activation de la voie du TGF- β (pSMAD) dans les tumeurs, et surtout des paramètres cliniques.

Ces travaux pourraient d'ailleurs être transposables à d'autres types de cancers (*e.g.* cancers colorectaux, du sein, des poumons) où SMAD4 est parfois retrouvée inactivée alors que le TGF- β est retrouvé en

grande quantité dans le micro-environnement tumoral, et aider de fait à optimiser la stratification des patients en groupes de risque (Alazzouzi et al., 2005; Deckers, 2006; Tan et al., 2021).

Surtout, si l'inactivation pharmacologique globale de la voie TGF- β paraît hasardeuse compte-tenu de la complexité et de la diversité des mécanismes moléculaires transduits par cette cytokine, la compréhension fine des voies de signalisation oncogéniques induites selon le contexte cellulaire, et notamment selon la présence de SMAD4, pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, le ciblage de gènes identifiés comme cibles potentielles de SMAD2/3 en l'absence de SMAD4, et caractérisés pour leur rôle causal dans l'acquisition du phénotype migratoire observé dans nos expériences pourrait constituer de nouvelles opportunités thérapeutiques pour limiter la dissémination des adénocarcinomes pancréatiques.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de mon doctorat a donc permis d'identifier un nouveau mécanisme oncogénique associé à la présence de TGF- β dans le microenvironnement des cellules tumorales d'ADKP, consistant en l'activation d'un programme transcriptionnel dépendant de SMAD2/3 dans les cellules pancréatiques SMAD4-négatives. Ce programme est associé à l'expression de gènes régulant l'organisation de la matrice ou du cytosquelette, à même d'expliquer l'acquisition d'un phénotype de migration/invasion collective en réponse au TGF- β . Malgré la complexité des mécanismes d'action de cette cytokine dans l'ADKP, ces données ouvrent de nouvelles perspectives en clinique, en permettant d'améliorer la stratification des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique, et d'identifier potentiellement de nouvelles cibles dans le cadre d'approche de médecine personnalisée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abuammah, A., Maimari, N., Towhidi, L., Frueh, J., Chooi, K.Y., Warboys, C., and Krams, R. (2018). New developments in mechanotransduction: Cross talk of the Wnt, TGF- β and Notch signalling pathways in reaction to shear stress. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* 5, 96–104.
- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D.T., Donaldson, M.C., Wittner, B.S., Spencer, J.A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., et al. (2014). Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 158, 1110–1122.
- Achyut, B.R., and Yang, L. (2011). Transforming Growth Factor- β in the Gastrointestinal and Hepatic Tumor Microenvironment. *Gastroenterology* 141, 1167–1178.
- Aguirre, A.J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D.A., Horner, J., Redston, M.S., and DePinho, R.A. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 17, 3112–3126.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* 7, 834–846.
- Ahamed, J., Burg, N., Yoshinaga, K., Janczak, C.A., Rifkin, D.B., and Collier, B.S. (2008). In vitro and in vivo evidence for shear-induced activation of latent transforming growth factor-beta1. *Blood* 112, 3650–3660.
- von Ahrens, D., Bhagat, T.D., Nagrath, D., Maitra, A., and Verma, A. (2017). The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *J. Hematol. Oncol.* J Hematol Oncol 10, 76.
- Akhurst, R.J., and Derynck, R. (2001). TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 11, S44-51.
- Alazzouzi, H., Alhopuro, P., Salovaara, R., Sammalkorpi, H., Järvinen, H., Mecklin, J.-P., Hemminki, A., Schwartz, S., Aaltonen, L.A., and Arango, D. (2005). SMAD4 as a Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 2606–2611.
- Alcaraz, L.B., Exposito, J.Y., Chuvp, N., Pommier, R.M., Cluzel, C., Martel, S., Sentis, S., Bartholin, L., Lethias, C., and Valcourt, U. (2014). Tenascin-X promotes epithelial-to-mesenchymal transition by activating latent TGF-beta. *J Cell Biol* 205, 409–428.
- Al-Hawary, M.M., Francis, I.R., Chari, S.T., Fishman, E.K., Hough, D.M., Lu, D.S., Macari, M., Megibow, A.J., Miller, F.H., Morteale, K.J., et al. (2014). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Radiology Reporting Template: Consensus Statement of the Society of Abdominal Radiology and the American Pancreatic Association. *Radiology* 270, 248–260.
- Andea, A., Sarkar, F., and Adsay, V.N. (2003). Clinicopathological Correlates of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: A Comparative Analysis of 82 Cases With and 152 Cases Without Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mod. Pathol.* 16, 996–1006.
- Ando, H. (2016). Chapter 5 - Somatostatin. In *Handbook of Hormones*, Y. Takei, H. Ando, and K. Tsutsui, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 36-e5-4.
- Apte, M.V., Haber, P.S., Darby, S.J., Rodgers, S.C., McCaughan, G.W., Korsten, M.A., Pirola, R.C., and Wilson, J.S. (1999). Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 44, 534–541.

- Aragón, F., Karaca, M., Novials, A., Maldonado, R., Maechler, P., and Rubí, B. (2015). Pancreatic polypeptide regulates glucagon release through PPYR1 receptors expressed in mouse and human alpha-cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 343–351.
- Asakawa, A., Inui, A., Yuzuriha, H., Ueno, N., Katsuura, G., Fujimiya, M., Fujino, M.A., Nijima, A., Meguid, M.M., and Kasuga, M. (2003). Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology* 124, 1325–1336.
- Ashcroft, G.S. (1999). Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes Infect* 1, 1275-82.
- Atay, S. (2020). Integrated transcriptome meta-analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma and matched adjacent pancreatic tissues. *PeerJ* 8, e10141.
- Aune, D., Mahamat-Saleh, Y., Norat, T., and Riboli, E. (2020). Diabetes mellitus and the risk of pancreatitis: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP* 20, 602–607.
- Baer, R., Cintas, C., Therville, N., and Guillermet-Guibert, J. (2015). Implication of PI3K/Akt pathway in pancreatic cancer: When PI3K isoforms matter? *Adv. Biol. Regul.* 59, 19–35.
- Bailey, J.M., Mohr, A.M., and Hollingsworth, M.A. (2009). Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene* 28, 3513–3525.
- Baker, L.A., Tiriach, H., Clevers, H., and Tuveson, D.A. (2016). Modeling pancreatic cancer with organoids. *Trends Cancer* 2, 176–190.
- Bakin, A.V. (2000). Phosphatidylinositol 3-Kinase Function Is Required for Transforming Growth Factor beta -mediated Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Migration. *J. Biol. Chem.* 275, 36803–36810.
- Ballehaninna, U.K., and Chamberlain, R.S. (2012). The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J. Gastrointest. Oncol.* 3, 105–119.
- Bao, Y., and Michaud, D.S. (2008). Physical activity and pancreatic cancer risk: a systematic review. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 17, 2671–2682.
- Barbara, N.P., Wrana, J.L., and Letarte, M. (1999). Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- beta superfamily. *J Biol Chem* 274, 584-94.
- Barcellos-Hoff, M.H., and Dix, T.A. (1996). Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol* 10, 1077-83.
- Barcellos-Hoff, M.H., Derynck, R., Tsang, M.L., and Weatherbee, J.A. (1994). Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest* 93, 892-9.
- Bardeesy, N., Cheng, K.-H., Berger, J.H., Chu, G.C., Pahler, J., Olson, P., Hezel, A.F., Horner, J., Lauwers, G.Y., Hanahan, D., et al. (2006). Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev.* 20, 3130–3146.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 16, 585–601.

- Barrios-Rodiles, M., Brown, K.R., Ozdamar, B., Bose, R., Liu, Z., Donovan, R.S., Shinjo, F., Liu, Y., Dembowy, J., Taylor, I.W., et al. (2005). High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* 307, 1621–1625.
- Barton, D.E., Foellmer, B.E., Du, J., Tamm, J., Derynck, R., and Francke, U. (1988). Chromosomal mapping of genes for transforming growth factors beta 2 and beta 3 in man and mouse: dispersion of TGF-beta gene family. *Oncogene Res.* 3, 323–331.
- Basturk, O., Hong, S.-M., Wood, L.D., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A.V., Brosens, L.A.A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R.H., et al. (2015). A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am. J. Surg. Pathol.* 39, 1730–1741.
- Batlle, E., and Massagué, J. (2019). Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* 50, 924–940.
- Batterham, R.L., Le Roux, C.W., Cohen, M.A., Park, A.J., Ellis, S.M., Patterson, M., Frost, G.S., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2003). Pancreatic Polypeptide Reduces Appetite and Food Intake in Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3989–3992.
- Bausch, D., Fritz, S., Bolm, L., Wellner, U.F., Fernandez-del-Castillo, C., Warshaw, A.L., Thayer, S.P., and Liss, A.S. (2020). Hedgehog signaling promotes angiogenesis directly and indirectly in pancreatic cancer. *Angiogenesis* 23, 479–492.
- Bear, A.S., Vonderheide, R.H., and O'Hara, M.H. (2020). Challenges and Opportunities for Pancreatic Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell* 38, 788–802.
- Ben Mimoun, S., and Mauviel, A. (2018). Molecular mechanisms underlying TGF- β /Hippo signaling crosstalks – Role of baso-apical epithelial cell polarity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 98, 75–81.
- Berrington de Gonzalez, A., Sweetland, S., and Spencer, E. (2003). A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 89, 519–523.
- Bertero, A., Brown, S., Madrigal, P., Osnato, A., Ortmann, D., Yiangou, L., Kadiwala, J., Hubner, N.C., de los Mozos, I.R., Sadée, C., et al. (2018). The SMAD2/3 interactome reveals that TGF β controls m6A mRNA methylation in pluripotency. *Nature* 555, 256–259.
- Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C.A., Engel, M.E., Arteaga, C.L., and Moses, H.L. (2001). Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12, 27–36.
- Biernacka, A., Dobaczewski, M., and Frangogiannis, N.G. (2011). TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors Chur Switz.* 29, 196–202.
- Borsutzky, S., Cazac, B.B., Roes, J., and Guzmán, C.A. (2004). TGF- β Receptor Signaling Is Critical for Mucosal IgA Responses. *J. Immunol.* 173, 3305–3309.
- Bournet, B., Muscari, F., Buscail, C., Assenat, E., Barthet, M., Hammel, P., Selves, J., Guimbaud, R., Cordelier, P., and Buscail, L. (2016). KRAS G12D Mutation Subtype Is A Prognostic Factor for Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 7, e157.
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M.A., and Weinberg, R.A. (2018). EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 18, 128–134.
- Braganza, J.M., Lee, S.H., McCloy, R.F., and McMahon, M.J. (2011). Chronic pancreatitis. *The Lancet* 377, 1184–1197.

- Brodt, P. (2016). Role of the Microenvironment in Liver Metastasis: From Pre- to Prometastatic Niches. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 5971–5982.
- Brown, J.A., Yonekubo, Y., Hanson, N., Sastre-Perona, A., Basin, A., Rytlewski, J.A., Dolgalev, I., Meehan, S., Tsirogos, A., Beronja, S., et al. (2017). TGF- β -Induced Quiescence Mediates Chemoresistance of Tumor-Propagating Cells in Squamous Cell Carcinoma. *Cell Stem Cell* 21, 650-664.e8.
- Brownh, P.D., Wakefiel, L.M., Levinson, A.D., and Sporn, M.B. (1990). Physicochemical Activation of Recombinant Latent Transforming Growth Factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors* 3, 35–43.
- Bruce, D.L., and Sapkota, G.P. (2012). Phosphatases in SMAD regulation. *FEBS Lett.* 586, 1897–1905.
- Brunet, C.L., Sharpe, P.M., and Ferguson, M.W. (1995). Inhibition of TGF-beta 3 (but not TGF-beta 1 or TGF-beta 2) activity prevents normal mouse embryonic palate fusion. *Int J Dev Biol* 39, 345-55.
- Buchser, W.J., Laskow, T.C., Pavlik, P.J., Lin, H.-M., and Lotze, M.T. (2012). Cell-Mediated Autophagy Promotes Cancer Cell Survival. *Cancer Res.* 72, 2970–2979.
- Budhu, S., Schaer, D.A., Li, Y., Toledo-Crow, R., Panageas, K., Yang, X., Zhong, H., Houghton, A.N., Silverstein, S.C., Merghoub, T., et al. (2017). Blockade of surface-bound TGF- β on regulatory T cells abrogates suppression of effector T cell function in the tumor microenvironment. *Sci. Signal.* 10, eaak9702.
- Budi, E.H., Mamai, O., Hoffman, S., Akhurst, R.J., and Derynck, R. (2019). Enhanced TGF- β Signaling Contributes to the Insulin-Induced Angiogenic Responses of Endothelial Cells. *IScience* 11, 474–491.
- Buscail, E., Maulat, C., Muscari, F., Chiche, L., Cordelier, P., Dabernat, S., Alix-Panabières, C., and Buscail, L. (2019). Liquid Biopsy Approach for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers* 11, 852.
- Buscail, L., Bournet, B., and Cordelier, P. (2020). Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 153–168.
- Byrne, W.L., Mills, K.H.G., Lederer, J.A., and O'Sullivan, G.C. (2011). Targeting regulatory T cells in cancer. *Cancer Res.* 71, 6915–6920.
- Campbell, K., and Casanova, J. (2016). A common framework for EMT and collective cell migration. *Dev. Camb. Engl.* 143, 4291–4300.
- Carstens, J.L., Yang, S., Correa de Sampaio, P., Zheng, X., Barua, S., McAndrews, K.M., Rao, A., Burks, J.K., Rhim, A.D., and Kalluri, R. (2021). Stabilized epithelial phenotype of cancer cells in primary tumors leads to increased colonization of liver metastasis in pancreatic cancer. *Cell Rep.* 35, 108990.
- Cazac, B.B., and Roes, J. (2000). TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* 13, 443-51.
- Chacko, B.M., Qin, B., Correia, J.J., Lam, S.S., de Caestecker, M.P., and Lin, K. (2001). The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nat Struct Biol* 8, 248-53.
- Chacko, B.M., Qin, B.Y., Tiwari, A., Shi, G., Lam, S., Hayward, L.J., De Caestecker, M., and Lin, K. (2004). Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Mol. Cell* 15, 813–823.
- Chandra, R., and Liddle, R.A. (2009). Neural and hormonal regulation of pancreatic secretion. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25, 441–446.
- Chen, Y.-G. (2009). Endocytic regulation of TGF- β signaling. *Cell Res.* 19, 58–70.
- Chen, X., and Xu, L. (2011). Mechanism and Regulation of Nucleocytoplasmic Trafficking of Smad. *Cell Biosci.* 1, 40.

- Cho, E.H., Wendel, M., Luttgen, M., Yoshioka, C., Marrinucci, D., Lazar, D., Schram, E., Nieva, J., Bazhenova, L., Morgan, A., et al. (2012). Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors. *Phys. Biol.* 9, 016001.
- Ciardiello, D., Elez, E., Tabernero, J., and Seoane, J. (2020). Clinical development of therapies targeting TGF β : current knowledge and future perspectives. *Ann. Oncol.* 31, 1336–1349.
- Clark, C.E., Hingorani, S.R., Mick, R., Combs, C., Tuveson, D.A., and Vonderheide, R.H. (2007). Dynamics of the Immune Reaction to Pancreatic Cancer from Inception to Invasion. *Cancer Res.* 67, 9518–9527.
- Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 165, 1586–1597.
- Cloyd, J.M., Heh, V., Pawlik, T.M., Ejaz, A., Dillhoff, M., Tsung, A., Williams, T., Abushahin, L., Bridges, J.F.P., and Santry, H. (2020). Neoadjuvant Therapy for Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Clin. Med.* 9, 1129.
- Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263–266.
- Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Abdelghani, M.B., Wei, A.C., Raoul, J.-L., Choné, L., Francois, E., Artru, P., Biagi, J.J., et al. (2018). FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.*
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, J.S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81, 1137–1146.
- Costanza, B., Rademaker, G., Tiamiou, A., De Tullio, P., Leenders, J., Blomme, A., Bellier, J., Bianchi, E., Turtoi, A., Delvenne, P., et al. (2019). Transforming growth factor beta-induced, an extracellular matrix interacting protein, enhances glycolysis and promotes pancreatic cancer cell migration. *Int. J. Cancer* 145, 1570–1584.
- Craven, K.E., Gore, J., Wilson, J.L., and Korc, M. (2016). Angiogenic gene signature in human pancreatic cancer correlates with TGF-beta and inflammatory transcriptomes. *Oncotarget* 7, 323–341.
- Crawford, S.E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J.E., Ribeiro, S.M., Lawler, J., Hynes, R.O., Boivin, G.P., and Bouck, N. (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93, 1159-70.
- Cui, R., Yue, W., Lattime, E.C., Stein, M.N., Xu, Q., and Tan, X.-L. (2016). Targeting tumor-associated macrophages to combat pancreatic cancer. *Oncotarget* 7, 50735–50754.
- Da Silva Xavier, G. (2018). The Cells of the Islets of Langerhans. *J. Clin. Med.* 7, E54.
- Daly, A.C., Randall, R.A., and Hill, C.S. (2008). Transforming growth factor beta-induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Mol. Cell. Biol.* 28, 6889–6902.
- Dardare, J., Witz, A., Merlin, J.-L., Gilson, P., and Harlé, A. (2020). SMAD4 and the TGF β Pathway in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3534.
- Datto, M.B., Li, Y., Panus, J.F., Howe, D.J., Xiong, Y., and Wang, X.F. (1995). Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5545–5549.
- David, C.J., and Massagué, J. (2018). Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 419–435.

- David, C.J., Huang, Y.H., Chen, M., Su, J., Zou, Y., Bardeesy, N., Iacobuzio-Donahue, C.A., and Massague, J. (2016). TGF-beta Tumor Suppression through a Lethal EMT. *Cell* 164, 1015–1030.
- Davies, and Conlon (2009). Neuroendocrine tumors of the pancreas. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 11.
- Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G., and Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454, 56–61.
- De Pascalis, C., and Etienne-Manneville, S. (2017). Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Mol. Biol. Cell* 28, 1833–1846.
- Deckers, M. (2006). The Tumor Suppressor Smad4 Is Required for Transforming Growth Factor -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition and Bone Metastasis of Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 66, 2202–2209.
- Defossez, Sandra Le Guyader-Peyrou, Zoé Uhry, Pascale Grosclaude, Marc Colonna, Emmanuelle Dantony, Patricia Delafosse, Florence Molinié, Anne-Sophie Woronoff, Anne-Marie Bouvier, et al. (2019). Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Volume 1 - Tumeurs solides.
- Deheuninck, J., and Luo, K. (2009). Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- β signaling. *Cell Res.* 19, 47–57.
- Delpu, Y., Hanoun, N., Lulka, H., Sicard, F., Selves, J., Buscail, L., Torrisani, J., and Cordelier, P. (2011). Genetic and Epigenetic Alterations in Pancreatic Carcinogenesis. *Curr. Genomics* 12, 15–24.
- Demagny, H., and De Robertis, E.M. (2016). Point mutations in the tumor suppressor Smad4/DPC4 enhance its phosphorylation by GSK3 and reversibly inactivate TGF- β signaling. *Mol. Cell. Oncol.* 3, e1025181.
- Derynck, R., and Akhurst, R.J. (2007). Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol* 9, 1000–1004.
- Derynck, R., and Budi, E.H. (2019). Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Sci. Signal.* 12, eaav5183.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577–584.
- Deryugina, E.I., and Quigley, J.P. (2015). Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix Biol.* 44–46, 94–112.
- Descargues, P., Sil, A.K., Sano, Y., Korchynskyi, O., Han, G., Owens, P., Wang, X.J., and Karin, M. (2008). IKK is a critical coregulator of a Smad4-independent TGF- β -Smad2/3 signaling pathway that controls keratinocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 2487–2492.
- Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., and Gabbiani, G. (1993). Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122, 103–111.
- Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F., and Wrana, J.L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* 5, 410–421.
- Diaz, K.E., and Lucas, A.L. (2019). Familial Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* 189, 36–43.
- Dickson, M.C., Martin, J.S., Cousins, F.M., Kulkarni, A.B., Karlsson, S., and Akhurst, R.J. (1995). Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121, 1845–54.

- Di-Luoffo, M., Ben-Meriem, Z., Lefebvre, P., Delarue, M., and Guillermet-Guibert, J. (2021). PI3K functions as a hub in mechanotransduction. *Trends Biochem. Sci.*
- Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C., and Grützmann, R. (2014). Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed Res. Int.* 2014, 474905.
- Dongre, A., and Weinberg, R.A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 69–84.
- Driehuis, E., Hoeck, A. van, Moore, K., Kolders, S., Francies, H.E., Gulersonmez, M.C., Stigter, E.C.A., Burgering, B., Geurts, V., Gracanin, A., et al. (2019). Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 26580–26590.
- Drost, J., and Clevers, H. (2018). Organoids in cancer research. *Nat. Rev. Cancer* 18, 407–418.
- Drouillard, A., Manfredi, S., Lepage, C., and Bouvier, A.-M. (2018). Épidémiologie du cancer du pancréas. *Bull. Cancer (Paris)* 105, 63–69.
- Duda, D.G., Sunamura, M., Lefter, L.P., Furukawa, T., Yokoyama, T., Yatsuoka, T., Abe, T., Inoue, H., Motoi, F., Egawa, S., et al. (2003). Restoration of SMAD4 by gene therapy reverses the invasive phenotype in pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* 22, 6857–6864.
- Dudgeon, C., Harris, C.R., Chen, Y., Ghaddar, B., Sharma, A., Shah, M.M., Roberts, A.I., Casabianca, A., Collisson, E.A., Balachandran, V.P., et al. (2020). A Novel Model of Pancreatic Cancer Dormancy Reveals Mechanistic Insights and a Dormancy Gene Signature with Human Relevance.
- Dufresne, M. (2012). Physiologie du pancréas exocrine. *Wwwem-Premiumcomdatatraitesfo07-59709*.
- Dunker, N., and Kriegstein, K. (2000). Targeted mutations of transforming growth factor-beta genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis. *Eur J Biochem* 267, 6982-8.
- Ebert, M.P., Yu, J., Michlke, S., Fei, G., Lendeckel, U., Ridwelski, K., Stolte, M., Bayerdorffer, E., and Malfertheiner, P. (2000). Expression of transforming growth factor beta-1 in gastric cancer and in the gastric mucosa of first-degree relatives of patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 82, 1795-800.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001). Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 276, 12477-80.
- Edlund, S., Landström, M., Heldin, C.-H., and Aspenström, P. (2002). Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol. Biol. Cell* 13, 902–914.
- Ehrlich, M., Gutman, O., Knaus, P., and Henis, Y.I. (2012). Oligomeric interactions of TGF- β and BMP receptors. *FEBS Lett.* 586, 1885–1896.
- Ellenrieder, V., Hendler, S.F., Boeck, W., Seufferlein, T., Menke, A., Ruhland, C., Adler, G., and Gress, T.M. (2001). Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial- mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 61, 4222-8.
- Encha-Razavi, F., and Escudier, E. (2010). Embryologie. *Wwwem-Premiumcomdatatraitesob05-52456*.
- Erkan, M., Hausmann, S., Michalski, C.W., Fingerle, A.A., Dobritz, M., Kleeff, J., and Friess, H. (2012). The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 454–467.

- Esparza-Lopez, J., Montiel, J.L., Vilchis-Landeros, M.M., Okadome, T., Miyazono, K., and Lopez-Casillas, F. (2001). Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J Biol Chem* 276, 14588-96.
- Etienne-Manneville, S. (2008). Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene* 27, 6970–6980.
- Feldmann, G., Beaty, R., Hruban, R.H., and Maitra, A. (2007). Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* 14, 224–232.
- Feng, X.H., Liang, Y.Y., Liang, M., Zhai, W., and Lin, X. (2002). Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta- mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). *Mol Cell* 9, 133-43.
- Fink, S.P., Mikkola, D., Willson, J.K., and Markowitz, S. (2003). TGF-beta-induced nuclear localization of Smad2 and Smad3 in Smad4 null cancer cell lines. *Oncogene* 22, 1317–1323.
- Finkelberg, D.L., Sahani, D., Deshpande, V., and Brugge, W.R. (2006). Autoimmune pancreatitis. *N. Engl. J. Med.* 355, 2670–2676.
- Fonseca, A.L., Kirkwood, K., Kim, M.P., Maitra, A., and Koay, E.J. (2018). Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas: Current Understanding and Future Directions for Stratification of Malignancy Risk. *Pancreas* 47, 272–279.
- Fontana, L., Chen, Y., Prijatelj, P., Sakai, T., Fässler, R., Sakai, L.Y., and Rifkin, D.B. (2005). Fibronectin is required for integrin alphavbeta6-mediated activation of latent TGF-beta complexes containing LTBP-1. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 1798–1808.
- Forsmark, C.E., Vege, S.S., and Wilcox, C.M. (2016). Acute Pancreatitis. *N. Engl. J. Med.* 375, 1972–1981.
- Franceschi, F., Zuccalà, G., Roccarina, D., and Gasbarrini, A. (2014). Clinical effects of *Helicobacter pylori* outside the stomach. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 234–242.
- Frederick, J.P., Liberati, N.T., Waddell, D.S., Shi, Y., and Wang, X.-F. (2004). Transforming growth factor beta-mediated transcriptional repression of c-myc is dependent on direct binding of Smad3 to a novel repressive Smad binding element. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2546–2559.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* 30, 193–204.
- Freudlsperger, C., Bian, Y., Contag Wise, S., Burnett, J., Coupar, J., Yang, X., Chen, Z., and Van Waes, C. (2013). TGF- β and NF- κ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene* 32, 1549–1559.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194.
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 445–457.
- Friess, H., Yamanaka, Y., Buchler, M., Berger, H.G., Kobrin, M.S., Baldwin, R.L., and Korc, M. (1993). Enhanced expression of the type II transforming growth factor beta receptor in human pancreatic cancer cells without alteration of type III receptor expression. *Cancer Res* 53, 2704-7.
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A.C., Chen, D., Mao, M., Chen, D., Zhang, H., Ding, Y., and Bromberg, J.S. (2004). TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 4, 1614–1627.

- Fujii, D., Brissenden, J.E., Derynck, R., and Francke, U. (1986). Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet* 12, 281-8.
- Fukushige, S., Furukawa, T., Satoh, K., Sunamura, M., Kobari, M., Koizumi, M., and Horii, A. (1998). Loss of chromosome 18q is an early event in pancreatic ductal tumorigenesis. *Cancer Res.* 58, 4222–4226.
- Funaba, M., Zimmerman, C.M., and Mathews, L.S. (2002). Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 41361–41368.
- Furukawa, T., Sunamura, M., and Horii, A. (2006). Molecular mechanisms of pancreatic carcinogenesis. *Cancer Sci.* 97, 1–7.
- Gao, S., Alarcon, C., Sapkota, G., Rahman, S., Chen, P.Y., Goerner, N., Macias, M.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Massague, J. (2009). Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling. *Mol Cell* 36, 457–468.
- Gao, Y., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Bald, T., Ng, S.S., Young, A., Ngiow, S.F., Rautela, J., Straube, J., Waddell, N., Blake, S.J., et al. (2017). Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 18, 1004–1015.
- Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O., and Durandy, A. (1999). TGF- β 1 Prevents the Noncognate Maturation of Human Dendritic Langerhans Cells. *J. Immunol.* 162, 4567–4575.
- Ghiringhelli, F., Puig, P.E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., and Zitvogel, L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 202, 919–929.
- Gilboa, L., Wells, R.G., Lodish, H.F., and Henis, Y.I. (1998). Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor beta receptors: homodimers form in the ER and persist at the plasma membrane. *J Cell Biol* 140, 767-77.
- Gillen, S., Schuster, T., Meyer Zum Buschenfelde, C., Friess, H., and Kleeff, J. (2010). Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med* 7, e1000267.
- Gingery, A., Bradley, E.W., Pederson, L., Ruan, M., Horwood, N.J., and Oursler, M.J. (2008). TGF-beta coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NFkB and SMAD pathways to promote osteoclast survival. *Exp. Cell Res.* 314, 2725–2738.
- Glazer, Welsh, Jm, P., Jk, T., and Mp, M. (2017). TGF β 1 overexpression is associated with improved survival and low tumor cell proliferation in patients with early-stage pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 8.
- Glentis, A., Oertle, P., Mariani, P., Chikina, A., El Marjou, F., Attieh, Y., Zaccarini, F., Lae, M., Loew, D., Dingli, F., et al. (2017). Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane. *Nat. Commun.* 8, 924.
- Glinka, Y., Stoilova, S., Mohammed, N., and Prud'homme, G.J. (2011). Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis* 32, 613–621.
- Goggins, M., Shekher, M., Turnacioglu, K., Yeo, C.J., Hruban, R.H., and Kern, S.E. (1998). Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res* 58, 5329-32.

- Golan, T., Hammel, P., Reni, M., Van Cutsem, E., Macarulla, T., Hall, M.J., Park, J.-O., Hochhauser, D., Arnold, D., Oh, D.-Y., et al. (2019). Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* *381*, 317–327.
- Gomes, L.R., Terra, L.F., Wailemann, R.A., Labriola, L., and Sogayar, M.C. (2012). TGF- β 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC Cancer* *12*, 26.
- Gonzalo-Marin, J., Vila, J.J., and Perez-Miranda, M. (2014). Role of endoscopic ultrasound in the diagnosis of pancreatic cancer. *World J. Gastrointest. Oncol.* *6*, 360–368.
- Grau, A.M., Zhang, L., Wang, W., Ruan, S., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Zhang, W., and Chiao, P.J. (1997). Induction of p21waf1 expression and growth inhibition by transforming growth factor beta involve the tumor suppressor gene DPC4 in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Res* *57*, 3929–34.
- Groppe, J., Hinck, C.S., Samavarchi-Tehrani, P., Zubieta, C., Schuermann, J.P., Taylor, A.B., Schwarz, P.M., Wrana, J.L., and Hinck, A.P. (2008). Cooperative Assembly of TGF- β Superfamily Signaling Complexes Is Mediated by Two Disparate Mechanisms and Distinct Modes of Receptor Binding. *Mol. Cell* *29*, 157–168.
- Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Cañamero, M., Grippo, P.J., Verdager, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E.P., and Barbacid, M. (2007). Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell* *11*, 291–302.
- Guerra, C., Collado, M., Navas, C., Schuhmacher, A.J., Hernandez-Porras, I., Canamero, M., Rodriguez-Justo, M., Serrano, M., and Barbacid, M. (2011). Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* *19*, 728–739.
- Hagedorn, H.G., Bachmeier, B.E., and Nerlich, A.G. (2001). Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review). *Int J Oncol* *18*, 669–81.
- Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluk, C.A., da Costa, L.T., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Fischer, A., Yeo, C.J., Hruban, R.H., et al. (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1.[see comment]. *Science* *271*, 350–353.
- Haigis, K.M. (2017). KRAS Alleles: The Devil Is in the Detail. *Trends Cancer* *3*, 686–697.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* *279*, 509–514.
- Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). p15ink4b is a potential effector of Tgf-beta-induced cell cycle arrest [see comments]. *Nature* *371*, 257–261.
- Hansel, D.E., Kern, S.E., and Hruban, R.H. (2003). Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* *4*, 237–256.
- Hartsough, M.T., and Mulder, K.M. (1995). Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem* *270*, 7117–24.
- Hasan, S., Jacob, R., Manne, U., and Paluri, R. (2019). Advances in pancreatic cancer biomarkers. *Oncol. Rev.* *13*, 410.
- Hata, A., and Chen, Y.-G. (2016). TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *8*, a022061.
- He, W., Dorn, D., Erdjumentbromage, H., Tempst, P., Moore, M., and Massague, J. (2006). Hematopoiesis Controlled by Distinct TIF1 γ and Smad4 Branches of the TGF β Pathway. *Cell* *125*, 929–941.

van Heek, N.T., Meeker, A.K., Kern, S.E., Yeo, C.J., Lillemoe, K.D., Cameron, J.L., Offerhaus, G.J.A., Hicks, J.L., Wilentz, R.E., Goggins, M.G., et al. (2002). Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am. J. Pathol.* 161, 1541–1547.

Heger, U., Sun, H., Hinz, U., Klaiber, U., Tanaka, M., Liu, B., Sachsenmaier, M., Springfield, C., Michalski, C.W., Büchler, M.W., et al. (2020). Induction chemotherapy in pancreatic cancer: CA 19-9 may predict resectability and survival. *HPB* 22, 224–232.

Heid, I., Lubeseder-Martellato, C., Sipos, B., Mazur, P.K., Lesina, M., Schmid, R.M., and Siveke, J.T. (2011). Early requirement of Rac1 in a mouse model of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 141, 719–730, 730.e1-7.

Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2012). Role of Smads in TGF β signaling. *Cell Tissue Res.* 347, 21–36.

Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2016). Signaling Receptors for TGF- β Family Members. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a022053.

Heldin, C.-H., Vanlandewijck, M., and Moustakas, A. (2012). Regulation of EMT by TGF β in cancer. *FEBS Lett.* 586, 1959–1970.

Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., and Mills, G.B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 988–1004.

Herpin, A., Lelong, C., and Favrel, P. (2004). Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 461–485.

Hexige, Cm, A.-A., Y, W., Y, W., Y, F., X, H., J, L., P, Z., Q, Y., A, M., et al. (2015). Identification of novel vascular projections with cellular trafficking abilities on the microvasculature of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Pathol.* 236.

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

Hidalgo, M., Cascinu, S., Kleeff, J., Labianca, R., Löhr, J.-M., Neoptolemos, J., Real, F.X., Van Laethem, J.-L., and Heinemann, V. (2015). Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* 15, 8–18.

Hilmi, M., Bartholin, L., and Neuzillet, C. (2018). Immune therapies in pancreatic ductal adenocarcinoma: Where are we now? *World J Gastroenterol* 24, 2137–2151.

Hinck, A.P. (2012). Structural studies of the TGF- β s and their receptors – insights into evolution of the TGF- β superfamily. *FEBS Lett.* 586, 1860–1870.

Hinck, A.P., Mueller, T.D., and Springer, T.A. (2016). Structural Biology and Evolution of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a022103.

Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., et al. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437–450.

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

Hishinuma, S., Ogata, Y., Tomikawa, M., Ozawa, I., Hirabayashi, K., and Igarashi, S. (2006). Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* 10, 511–518.

- Ho, W.J., Jaffee, E.M., and Zheng, L. (2020). The tumour microenvironment in pancreatic cancer — clinical challenges and opportunities. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *17*, 527–540.
- Hodge, R.G., and Ridley, A.J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 496–510.
- Hong, S.-M., Heaphy, C.M., Shi, C., Eo, S.-H., Cho, H., Meeker, A.K., Eshleman, J.R., Hruban, R.H., and Goggins, M. (2011). Telomeres are shortened in acinar-to-ductal metaplasia lesions associated with pancreatic intraepithelial neoplasia but not in isolated acinar-to-ductal metaplasias. *Mod. Pathol.* *24*, 256–266.
- Horowitz, J.C., Lee, D.Y., Waghray, M., Keshamouni, V.G., Thomas, P.E., Zhang, H., Cui, Z., and Thannickal, V.J. (2004). Activation of the Pro-survival Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway by Transforming Growth Factor- β 1 in Mesenchymal Cells Is Mediated by p38 MAPK-dependent Induction of an Autocrine Growth Factor *. *J. Biol. Chem.* *279*, 1359–1367.
- Hosoda, W., Chianchiano, P., Griffin, J.F., Pittman, M.E., Brosens, L.A., Noë, M., Yu, J., Shindo, K., Suenaga, M., Rezaee, N., et al. (2017). Genetic analyses of isolated high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (HG-PanIN) reveal paucity of alterations in TP53 and SMAD4. *J. Pathol.* *242*, 16–23.
- Houg, D.S., and Bijlsma, M.F. (2018). The hepatic pre-metastatic niche in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol. Cancer* *17*, 95.
- Hoxhaj, G., and Manning, B.D. (2020). The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* *20*, 74–88.
- Hruban, R.H., Takaori, K., Klimstra, D.S., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A.V., Biankin, S.A., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., et al. (2004). An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am. J. Surg. Pathol.* *28*, 977–987.
- Hruban, R.H., Maitra, A., and Goggins, M. (2008). Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol* *1*, 306–316.
- Huang, F., and Chen, Y.-G. (2012). Regulation of TGF- β receptor activity. *Cell Biosci.* *2*, 9.
- Huang, C., Iovanna, J., and Santofimia-Castaño, P. (2021a). Targeting Fibrosis: The Bridge That Connects Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, 4970.
- Huang, G., Shi, L.Z., and Chi, H. (2009). Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. *Cytokine* *48*, 161–169.
- Huang, W., Navarro-Serer, B., Jeong, Y.J., Chianchiano, P., Xia, L., Luchini, C., Veronese, N., Dowiak, C., Ng, T., Trujillo, M.A., et al. (2020). Pattern of Invasion in Human Pancreatic Cancer Organoids Is Associated with Loss of SMAD4 and Clinical Outcome. *Cancer Res.* *80*, 2804–2817.
- Huang, X., Ding, L., Liu, X., Tong, R., Ding, J., Qian, Z., Cai, L., Zhang, P., and Li, D. (2021b). Regulation of tumor microenvironment for pancreatic cancer therapy. *Biomaterials* *270*, 120680.
- Huttenlocher, A., and Horwitz, A.R. (2011). Integrins in Cell Migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a005074.
- Iacobuzio-Donahue, C.A., Song, J., Parmigiani, G., Yeo, C.J., Hruban, R.H., and Kern, S.E. (2004). Missense mutations of MADH4: characterization of the mutational hot spot and functional consequences in human tumors. *Clin Cancer Res* *10*, 1597–1604.

- Iacobuzio-Donahue, C.A., Fu, B., Yachida, S., Luo, M., Abe, H., Henderson, C.M., Vilardell, F., Wang, Z., Keller, J.W., Banerjee, P., et al. (2009). DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 1806–1813.
- Ilina, O., and Friedl, P. (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3203–3208.
- Inman, K.S., Francis, A.A., and Murray, N.R. (2014). Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 11160–11181.
- Isaji, S., Mizuno, S., Windsor, J.A., Bassi, C., Fernández-Del Castillo, C., Hackert, T., Hayasaki, A., Katz, M.H.G., Kim, S.-W., Kishiwada, M., et al. (2018). International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* 18, 2–11.
- Ishiguro, H., Steward, M.C., Naruse, S., Ko, S.B.H., Goto, H., Case, R.M., Kondo, T., and Yamamoto, A. (2009). CFTR functions as a bicarbonate channel in pancreatic duct cells. *J. Gen. Physiol.* 133, 315–326.
- Isogai, Z., Ono, R.N., Ushiro, S., Keene, D.R., Chen, Y., Mazzei, R., Charbonneau, N.L., Reinhardt, D.P., Rifkin, D.B., and Sakai, L.Y. (2003). Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J. Biol. Chem.* 278, 2750–2757.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in transformation and metastasis. In *Advances in Cancer Research*, (Academic Press), pp. 57–80.
- Janssen, Q.P., O'Reilly, E.M., van Eijck, C.H.J., and Groot Koerkamp, B. (2020). Neoadjuvant Treatment in Patients With Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer. *Front. Oncol.* 10, 41.
- Javadrashid, D., Baghbanzadeh, A., Derakhshani, A., Leone, P., Silvestris, N., Racanelli, V., Solimando, A.G., and Baradaran, B. (2021). Pancreatic Cancer Signaling Pathways, Genetic Alterations, and Tumor Microenvironment: The Barriers Affecting the Method of Treatment. *Biomedicines* 9, 373.
- Javelaud, D., and Mauviel, A. (2005). Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene* 24, 5742–50.
- Jenkins, G. (2008). The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1068–1078.
- Ji, Z., Mei, F.C., Xie, J., and Cheng, X. (2007). Oncogenic KRAS Activates Hedgehog Signaling Pathway in Pancreatic Cancer Cells *. *J. Biol. Chem.* 282, 14048–14055.
- Jiang, P., and Mizushima, N. (2014). Autophagy and human diseases. *Cell Res.* 24, 69–79.
- Jiang, B., Zhou, L., Lu, J., Wang, Y., Liu, C., You, L., and Guo, J. (2020). Stroma-Targeting Therapy in Pancreatic Cancer: One Coin With Two Sides? *Front. Oncol.* 10, 2272.
- Jin, W., Yun, C., Kwak, M.K., Kim, T.A., and Kim, S.J. (2007). TrkC binds to the type II TGF-beta receptor to suppress TGF-beta signaling. *Oncogene* 26, 7684–7691.
- Jolly, M.K., Mani, S.A., and Levine, H. (2018). Hybrid epithelial/mesenchymal phenotype(s): The “fittest” for metastasis? *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1870, 151–157.
- Jonckheere, N., Vasseur, R., and Van Seuningen, I. (2017). The cornerstone K-RAS mutation in pancreatic adenocarcinoma: From cell signaling network, target genes, biological processes to therapeutic targeting. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 111, 7–19.

- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., et al. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321, 1801–1806.
- Juiz, N., Elkaoutari, A., Bigonnet, M., Gayet, O., Roques, J., Nicolle, R., Iovanna, J., and Dusetti, N. (2020). Basal-like and classical cells coexist in pancreatic cancer revealed by single-cell analysis on biopsy-derived pancreatic cancer organoids from the classical subtype. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 34, 12214–12228.
- Jungwirth, U., van Weverwijk, A., Evans, R.J., Jenkins, L., Vicente, D., Alexander, J., Gao, Q., Haider, S., Irvani, M., and Isacke, C.M. (2021). Impairment of a distinct cancer-associated fibroblast population limits tumour growth and metastasis. *Nat. Commun.* 12, 3516.
- Kaartinen, V., Cui, X.M., Heisterkamp, N., Groffen, J., and Shuler, C.F. (1997). Transforming growth factor-beta3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Dev Dyn* 209, 255–60.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 16, 582–598.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428.
- Kamaraju, A.K., and Roberts, A.B. (2005). Role of Rho/ROCK and p38 MAP Kinase Pathways in Transforming Growth Factor- β -mediated Smad-dependent Growth Inhibition of Human Breast Carcinoma Cells in Vivo*. *J. Biol. Chem.* 280, 1024–1036.
- Kamato, D., Do, B.H., Osman, N., Ross, B.P., Mohamed, R., Xu, S., and Little, P.J. (2020). Smad linker region phosphorylation is a signalling pathway in its own right and not only a modulator of canonical TGF- β signalling. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 77, 243–251.
- Kang, Y., Chen, C.R., and Massague, J. (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 11, 915–926.
- Kantola, A.K., Keski-Oja, J., and Koli, K. (2008). Fibronectin and heparin binding domains of latent TGF-beta binding protein (LTBP)-4 mediate matrix targeting and cell adhesion. *Exp. Cell Res.* 314, 2488–2500.
- Kastenhuber, E.R., and Lowe, S.W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell* 170, 1062–1078.
- Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 6, 1365–75.
- Kehrl, J.H., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., Jakowlew, S., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. (1986). Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol* 137, 3855–60.
- Khalil, N. (1999). TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1, 1255–63.
- Khan, A.H., and Pessin, J.E. (2002). Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45, 1475–1483.
- Kharroubi, A.T., and Darwish, H.M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J. Diabetes* 6, 850–867.

- Khodzhigorova, A., Distler, A., Lang, V., Dees, C., Schneider, H., Beyer, C., Gelse, K., Distler, O., Schett, G., and Distler, J.H.W. (2012). Inhibition of sumoylation prevents experimental fibrosis. *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 1904–1908.
- Kikuyama, M., Kamisawa, T., Kuruma, S., Chiba, K., Kawaguchi, S., Terada, S., and Satoh, T. (2018). Early Diagnosis to Improve the Poor Prognosis of Pancreatic Cancer. *Cancers* *10*, 48.
- Kim, B.-G., Malek, E., Choi, S.H., Ignatz-Hoover, J.J., and Driscoll, J.J. (2021). Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- β pathway. *J. Hematol. Oncol.* *14*, 55.
- Kirkegård, J., Mortensen, F.V., and Cronin-Fenton, D. (2017). Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* *112*, 1366–1372.
- Kleeff, J., Ishiwata, T., Maruyama, H., Friess, H., Truong, P., Büchler, M.W., Falb, D., and Korc, M. (1999). The TGF- β signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. *Oncogene* *18*, 5363–5372.
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C.D., Biankin, A.V., Neale, R.E., Tempero, M., Tuveson, D.A., Hruban, R.H., et al. (2016). Pancreatic cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* *2*, 16022.
- Kleeff, J., Whitcomb, D.C., Shimosegawa, T., Esposito, I., Lerch, M.M., Gress, T., Mayerle, J., Drewes, A.M., Rebours, V., Akisik, F., et al. (2017). Chronic pancreatitis. *Nat. Rev. Dis. Primer* *3*, 17060.
- Klein, A.P., Brune, K.A., Petersen, G.M., Goggins, M., Tersmette, A.C., Offerhaus, G.J.A., Griffin, C., Cameron, J.L., Yeo, C.J., Kern, S., et al. (2004). Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res.* *64*, 2634–2638.
- Klein, J., Ju, W., Heyer, J., Wittek, B., Haneke, T., Knaus, P., Kucherlapati, R., Böttlinger, E.P., Nitschke, L., and Kneitz, B. (2006). B Cell-Specific Deficiency for Smad2 In Vivo Leads to Defects in TGF- β -Directed IgA Switching and Changes in B Cell Fate. *J. Immunol.* *176*, 2389–2396.
- Klingberg, F., Chow, M.L., Koehler, A., Boo, S., Buscemi, L., Quinn, T.M., Costell, M., Alman, B.A., Genot, E., and Hinz, B. (2014). Prestress in the extracellular matrix sensitizes latent TGF- β 1 for activation. *J. Cell Biol.* *207*, 283–297.
- Korkut, A., Zaidi, S., Kanchi, R.S., Rao, S., Gough, N.R., Schultz, A., Li, X., Lorenzi, P.L., Berger, A.C., Robertson, G., et al. (2018). A Pan-Cancer Analysis Reveals High-Frequency Genetic Alterations in Mediators of Signaling by the TGF- β Superfamily. *Cell Syst.* *7*, 422–437.e7.
- Koul, H.K., Pal, M., and Koul, S. (2013). Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer* *4*, 342–359.
- Kouzbari, K., Hossan, M.R., Arrizabalaga, J.H., Varshney, R., Simmons, A.D., Gostynska, S., Nollert, M.U., and Ahamed, J. (2019). Oscillatory shear potentiates latent TGF- β 1 activation more than steady shear as demonstrated by a novel force generator. *Sci. Rep.* *9*, 6065.
- Kretschmar, M., Doody, J., Timokhina, I., and Massague, J. (1999). A mechanism of repression of TGF β /Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* *13*, 804–816.
- Krummel, T.M., Michna, B.A., Thomas, B.L., Sporn, M.B., Nelson, J.M., Salzberg, A.M., Cohen, I.K., and Diegelmann, R.F. (1988). Transforming growth factor beta (TGF-beta) induces fibrosis in a fetal wound model. *J. Pediatr. Surg.* *23*, 647–52.
- Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., and Sevcikova, S. (2012). TGF- β – an excellent servant but a bad master. *J. Transl. Med.* *10*, 183.

- Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M., and Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U A* 90, 770–4.
- Kylänpää, M.-L., Repo, H., and Puolakkainen, P.A. (2010). Inflammation and immunosuppression in severe acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol. WJG* 16, 2867–2872.
- Laine, A., Labiad, O., Hernandez-Vargas, H., This, S., Sanlaville, A., Leon, S., Dalle, S., Sheppard, D., Travis, M., Paidassi, H., et al. (2021). Cooperation between Cancer Cells and Regulatory T Cells to Promote Immune-escape through Integrin $\alpha\beta 8$ -Mediated TGF- β Activation. *Nat. Commun.*
- Lamouille, S., and Derynck, R. (2007). Cell size and invasion in TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J. Cell Biol.* 178, 437–451.
- Lamouille, S., Connolly, E., Smyth, J.W., Akhurst, R.J., and Derynck, R. (2012). TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *J. Cell Sci.* 125, 1259–1273.
- Langenskiöld, M., Holmdahl, L., Falk, P., Angenete, E., and Ivarsson, M.-L. (2008). Increased TGF-beta 1 protein expression in patients with advanced colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* 97, 409–415.
- Lankisch, P.G., Apte, M., and Banks, P.A. (2015). Acute pancreatitis. *Lancet Lond. Engl.* 386, 85–96.
- Larsson, S.C., and Wolk, A. (2012). Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies. *Br. J. Cancer* 106, 603–607.
- Larsson, J., Goumans, M.J., Sjostrand, L.J., van Rooijen, M.A., Ward, D., Leveen, P., Xu, X., ten Dijke, P., Mummery, C.L., and Karlsson, S. (2001). Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *Embo J* 20, 1663–73.
- Lawler, J., Sunday, M., Thibert, V., Duquette, M., George, E.L., Rayburn, H., and Hynes, R.O. (1998). Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J. Clin. Invest.* 101, 982–992.
- Le Douarin, N.M., and Dupin, E. (2003). Multipotentiality of the neural crest. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 529–536.
- Lee, C.-R., Lee, W., Cho, S.K., and Park, S.-G. (2018). Characterization of Multiple Cytokine Combinations and TGF- β on Differentiation and Functions of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19, E869.
- Lee, M.K., Pardoux, C., Hall, M.C., Lee, P.S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S.M., and Derynck, R. (2007). TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J* 26, 3957–3967.
- Levy, L., and Hill, C. (2006). Alterations in components of the TGF- β superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 41–58.
- Levy, L., and Hill, C.S. (2005). Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF-{beta}) target genes and distinguishes TGF-{beta}-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. *Mol Cell Biol* 25, 8108–8125.
- Li, D., Morris, J.S., Liu, J., Hassan, M.M., Day, R.S., Bondy, M.L., and Abbruzzese, J.L. (2009). Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA* 301, 2553–2562.
- Li, J., Chen, J., and Kirsner, R. (2007a). Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol.* 25, 9–18.

- Li, M.O., Sanjabi, S., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25, 455–471.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007b). T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 26, 579–591.
- Li, S., Hx, X., Ct, W., Wq, W., W, J., Hl, G., H, L., Sr, Z., Jz, X., Zh, Q., et al. (2019). Angiogenesis in pancreatic cancer: current research status and clinical implications. *Angiogenesis* 22.
- Lightsey, D. (2012). Comment on ‘Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies’. *Br. J. Cancer* 107, 754–755.
- Lin, H.Y., Wang, X.-F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R.A., and Lodish, H.F. (1992). Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 68, 775–785.
- Lin, X., Duan, X., Liang, Y., Su, Y., Wrighton, K., Long, J., Hu, M., Davis, C., Wang, J., and Brunicaudi, F. (2006). PPM1A Functions as a Smad Phosphatase to Terminate TGF β Signaling. *Cell* 125, 915–928.
- Lindkvist, B. (2013). Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency. *World J. Gastroenterol.* 19, 7258–7266.
- Liu, F., Pouponnot, C., and Massagué, J. (1997). Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev.* 11, 3157–3167.
- Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A.B., Perruche, S., and Chen, W. (2008). A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 9, 632–640.
- Lo, R.S., Chen, Y.G., Shi, Y., Pavletich, N.P., and Massague, J. (1998). The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *Embo J* 17, 996–1005.
- Löhr, M., Klöppel, G., Maisonneuve, P., Lowenfels, A.B., and Lüttges, J. (2005). Frequency of K-ras Mutations in Pancreatic Intraductal Neoplasias Associated with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis: A Meta-Analysis. *Neoplasia* 7, 17–23.
- Luo, J., Chen, X.-Q., and Li, P. (2019). The Role of TGF- β and Its Receptors in Gastrointestinal Cancers. *Transl. Oncol.* 12, 475–484.
- Luo, K., Stroschein, S.L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S., and Zhou, Q. (1999). The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signaling. *Genes Dev.* 13, 2196–2206.
- Lutz, T.A. (2010). The role of amylin in the control of energy homeostasis. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R1475–R1484.
- Lynch, H.T., Brand, R.E., Deters, C.A., Shaw, T.G., and Lynch, J.F. (2001). Hereditary pancreatic cancer. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* 1, 466–471.
- Lyons, R.M., Keski-Oja, J., and Moses, H.L. (1988). Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 106, 1659–65.
- Lyons, R.M., Gentry, L.E., Purchio, A.F., and Moses, H.L. (1990). Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol* 110, 1361–7.
- Ma, L., Han, X., Gu, J., Li, J., Lou, W., Jin, C., and Saiyin, H. (2020). The physiological characteristics of the basal microvilli microvessels in pancreatic cancers. *Cancer Med.* 9, 5535–5545.

- Magliano, M.P. di, and Logsdon, C.D. (2013). Roles for KRAS in Pancreatic Tumor Development and Progression. *Gastroenterology* *144*, 1220–1229.
- Maisonneuve, P., and Lowenfels, A.B. (2015). Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int. J. Epidemiol.* *44*, 186–198.
- Maiti, A., and Hait, N.C. (2021). Autophagy-mediated tumor cell survival and progression of breast cancer metastasis to the brain. *J. Cancer* *12*, 954–964.
- Manohar, M., Verma, A.K., Venkateshaiah, S.U., Sanders, N.L., and Mishra, A. (2017). Pathogenic mechanisms of pancreatitis. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* *8*, 10–25.
- Manoukian, P., Bijlsma, M., and van Laarhoven, H. (2021). The Cellular Origins of Cancer-Associated Fibroblasts and Their Opposing Contributions to Pancreatic Cancer Growth. *Front. Cell Dev. Biol.* *9*, 2586.
- Marie, J.C., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2006). Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* *25*, 441–454.
- Massagué, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 169–178.
- Massagué, J. (2003). Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited. *Genes Dev.* *17*, 2993–2997.
- Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* *134*, 215–230.
- Massagué, J. (2012). TGFβ signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 616–630.
- Massagué, J., and Chen, Y.-G. (2000). Controlling TGF-β signaling. *Genes Dev.* *14*, 627–644.
- Massague, J., and Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J* *19*, 1745–54.
- Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* *19*, 2783–2810.
- Mayor, R., and Etienne-Manneville, S. (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 97–109.
- McCleary-Wheeler, A.L., McWilliams, R., and Fernandez-Zapico, M.E. (2012). Aberrant signaling pathways in pancreatic cancer: A two compartment view. *Mol. Carcinog.* *51*, 25–39.
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R.C., Jones, C., Coleman, H.G., and McCain, R.S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J. Gastroenterol.* *24*, 4846–4861.
- McMahon, A.P., Ingham, P.W., and Tabin, C.J. (2003). 1 Developmental roles and clinical significance of Hedgehog signaling. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Academic Press), pp. 1–114.
- Mehta, S., Bhimani, N., Gill, A.J., Samra, J.S., Sahni, S., and Mittal, A. (2021). Serum Biomarker Panel for Diagnosis and Prognosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas. *Front. Oncol.* *11*, 2448.
- Melzer, C., Hass, R., von der Ohe, J., Lehnert, H., and Ungefroren, H. (2017). The role of TGF-β and its crosstalk with RAC1/RAC1b signaling in breast and pancreas carcinoma. *Cell Commun. Signal.* *15*, 19.
- Metelli, A., Wu, B.X., Fugle, C.W., Rachidi, S., Sun, S., Zhang, Y., Wu, J., Tomlinson, S., Howe, P.H., Yang, Y., et al. (2016). Surface Expression of TGFβ Docking Receptor GARP Promotes Oncogenesis and Immune Tolerance in Breast Cancer. *Cancer Res.* *76*, 7106–7117.

- Meulmeester, E., and Ten Dijke, P. (2011). The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J. Pathol.* 223, 205–218.
- Miura, S., Takeshita, T., Asao, H., Kimura, Y., Murata, K., Sasaki, Y., Hanai, J.I., Beppu, H., Tsukazaki, T., Wrana, J.L., et al. (2000). Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Mol Cell Biol* 20, 9346–55.
- Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2017). Regulation of TGF- β Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a022095.
- Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P., and Heldin, C.H. (1991). A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J.* 10, 1091–1101.
- Mizrahi, J.D., Surana, R., Valle, J.W., and Shroff, R.T. (2020). Pancreatic cancer. *The Lancet* 395, 2008–2020.
- Mokdad, A.A., Minter, R.M., Zhu, H., Augustine, M.M., Porembka, M.R., Wang, S.C., Yopp, A.C., Mansour, J.C., Choti, M.A., and Polanco, P.M. (2017). Neoadjuvant Therapy Followed by Resection Versus Upfront Resection for Resectable Pancreatic Cancer: A Propensity Score Matched Analysis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 35, 515–522.
- Mori, S., Matsuzaki, K., Yoshida, K., Furukawa, F., Tahashi, Y., Yamagata, H., Sekimoto, G., Seki, T., Matsui, H., Nishizawa, M., et al. (2004). TGF- β and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* 23, 7416–7429.
- Morikawa, M., Derynck, R., and Miyazono, K. (2016). TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.
- Morton, J.P., Mongeau, M.E., Klimstra, D.S., Morris, J.P., Lee, Y.C., Kawaguchi, Y., Wright, C.V., Hebrok, M., and Lewis, B.C. (2007). Sonic hedgehog acts at multiple stages during pancreatic tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5103–5108.
- Moustakas, A., and Heldin, C.H. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 118, 3573–3584.
- Moustakas, A., and Heldin, C.H. (2009). The regulation of TGF signal transduction. *Development* 136, 3699–3714.
- Mu, D., Cambier, S., Fjellbirkeland, L., Baron, J.L., Munger, J.S., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Broaddus, V.C., and Nishimura, S.L. (2002). The integrin $\alpha(v)\beta 8$ mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J Cell Biol* 157, 493–507.
- Mulder, K.M. (2000). Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 23–35.
- Mullen, A.C., Orlando, D.A., Newman, J.J., Lovén, J., Kumar, R.M., Bilodeau, S., Reddy, J., Guenther, M.G., DeKoter, R., and Young, R.A. (2011). Master Transcription Factors Determine Cell-Type-Specific Responses to TGF- β Signaling. *Cell* 147, 565–576.
- Murata, M., Yoshida, K., Yamaguchi, T., and Matsuzaki, K. (2014). Linker phosphorylation of Smad3 promotes fibro-carcinogenesis in chronic viral hepatitis of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 15018–15027.
- Nagano, M., Hoshino, D., Koshikawa, N., Akizawa, T., and Seiki, M. (2012). Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 310616.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., and Matsukura, S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194–198.

- Neuzillet, C., Sauvanet, A., and Hammel, P. (2011). Prognostic factors for resectable pancreatic adenocarcinoma. *J. Visc. Surg.* *148*, e232-243.
- Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., and de Gramont, A. (2015). Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther* *147*, 22–31.
- Neuzillet, C., Gaujoux, S., Williet, N., Bachet, J.-B., Bauguion, L., Colson Durand, L., Conroy, T., Dahan, L., Gilabert, M., Huguet, F., et al. (2018). Pancreatic cancer: French clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, ACHBT, AFC). *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* *50*, 1257–1271.
- Nevala-Plagemann, C., Hidalgo, M., and Garrido-Laguna, I. (2020). From state-of-the-art treatments to novel therapies for advanced-stage pancreatic cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *17*, 108–123.
- Nicolle, R., Blum, Y., Duconseil, P., Vanbrugghe, C., Brandone, N., Poizat, F., Roques, J., Bigonnet, M., Gayet, O., Rubis, M., et al. (2020). Establishment of a pancreatic adenocarcinoma molecular gradient (PAMG) that predicts the clinical outcome of pancreatic cancer. *EBioMedicine* *57*, 102858.
- Oh, D.-Y., Al-Batran, S.-E., Chung, H.C., Hollebecque, A., Iqbal, S., Kim, K.-P., Lacy, J., Manji, G.A., O'Reilly, E.M., Rahma, O.E., et al. (2018). MORPHEUS: A phase Ib/II trial platform evaluating the safety and efficacy of multiple cancer immunotherapy (CIT) combinations in patients (pts) with gastric or pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* *36*, TPS4134–TPS4134.
- Ohmoto, A., Yachida, S., and Morizane, C. (2019). Genomic Features and Clinical Management of Patients with Hereditary Pancreatic Cancer Syndromes and Familial Pancreatic Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 561.
- O’Kane, S., and Ferguson, M.W. (1997). Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* *29*, 63-78.
- Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., et al. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* *324*, 1457–1461.
- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J., and Niehrs, C. (1999). Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* *401*, 480-5.
- Oshima, M., Oshima, H., and Taketo, M.M. (1996). TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* *179*, 297–302.
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.R., Zhang, Y., and Wrana, J.L. (2005). Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* *307*, 1603–1609.
- Padua, D., and Massague, J. (2009). Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res* *19*, 89–102.
- Padua, D., and Massagué, J. (2009). Roles of TGFβ in metastasis. *Cell Res.* *19*, 89–102.
- Pakyari, M., Farrokhi, A., Maharlooei, M.K., and Ghahary, A. (2013). Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Adv. Wound Care* *2*, 215–224.
- Pandol, S.J. (2010a). Pancreatic Embryology and Development (Morgan & Claypool Life Sciences).
- Pandol, S.J. (2010b). Water and Ion Secretion from the Pancreatic Ductal System (Morgan & Claypool Life Sciences).
- Pardali, E., and ten Dijke, P. (2009). Transforming growth factor-beta signaling and tumor angiogenesis. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *14*, 4848–4861.

- Parkin, D.M., Boyd, L., and Walker, L.C. (2011). 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br. J. Cancer* *105*, S77–S81.
- Pasca di Magliano, M., Biankin, A.V., Heiser, P.W., Cano, D.A., Gutierrez, P.J.A., Deramaudt, T., Segara, D., Dawson, A.C., Kench, J.G., Henshall, S.M., et al. (2007). Common Activation of Canonical Wnt Signaling in Pancreatic Adenocarcinoma. *PLoS ONE* *2*, e1155.
- Pastushenko, I., and Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* *29*, 212–226.
- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Van Keymeulen, A., Brown, D., Moers, V., Lemaire, S., et al. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* *556*, 463–468.
- Pelullo, M., Zema, S., Nardoza, F., Checquolo, S., Screpanti, I., and Bellavia, D. (2019). Wnt, Notch, and TGF- β Pathways Impinge on Hedgehog Signaling Complexity: An Open Window on Cancer. *Front. Genet.* *10*, 711.
- Penheiter, S.G., Mitchell, H., Garamszegi, N., Edens, M., Doré, J.J.E., and Leof, E.B. (2002). Internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signaling via the Smad pathway. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 4750–4759.
- Pérez-Gómez, E., del Castillo, G., Santibáñez, J.F., Lêpez-Novoa, J.M., Bernabéu, C., and Quintanilla, M. (2010). The Role of the TGF- β Coreceptor Endoglin in Cancer. *ScientificWorldJournal* *10*, 2367–2384.
- Petersen, G.M. (2016). Familial Pancreatic Cancer. *Semin. Oncol.* *43*, 548–553.
- Petersen, M., Pardali, E., van der Horst, G., Cheung, H., van den Hoogen, C., van der Pluijm, G., and Ten Dijke, P. (2010). Smad2 and Smad3 have opposing roles in breast cancer bone metastasis by differentially affecting tumor angiogenesis. *Oncogene* *29*, 1351–1361.
- Pham, A., and Forsmark, C. (2018). Chronic pancreatitis: review and update of etiology, risk factors, and management. *F1000Research* *7*, F1000 Faculty Rev-607.
- Pickup, M., Novitskiy, S., and Moses, H.L. (2013). The roles of TGF β in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 788–799.
- Pietenpol, J.A., Holt, J.T., Stein, R.W., and Moses, H.L. (1990). Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U A* *87*, 3758–62.
- Pishvaian, M.J., Bender, R.J., Halverson, D., Rahib, L., Hendifar, A.E., Mikhail, S., Chung, V., Picozzi, V.J., Sohal, D., Blais, E.M., et al. (2018). Molecular Profiling of Patients with Pancreatic Cancer: Initial Results from the Know Your Tumor Initiative. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *24*, 5018–5027.
- Principe, D.R., Doll, J.A., Bauer, J., Jung, B., Munshi, H.G., Bartholin, L., Pasche, B., Lee, C., and Grippo, P.J. (2014). TGF- β : Duality of Function Between Tumor Prevention and Carcinogenesis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *106*, djt369.
- Principe, D.R., DeCant, B., Mascarinas, E., Wayne, E.A., Diaz, A.M., Akagi, N., Hwang, R., Pasche, B., Dawson, D.W., Fang, D., et al. (2016). TGFbeta Signaling in the Pancreatic Tumor Microenvironment Promotes Fibrosis and Immune Evasion to Facilitate Tumorigenesis. *Cancer Res* *76*, 2525–2539.
- Principe, D.R., Korc, M., Kamath, S.D., Munshi, H.G., and Rana, A. (2021). Trials and tribulations of pancreatic cancer immunotherapy. *Cancer Lett.* *504*, 1–14.

- Prunier, C., Baker, D., Dijke, P. ten, and Ritsma, L. (2019). TGF- β Family Signaling Pathways in Cellular Dormancy. *Trends Cancer* 5, 66–78.
- Quintero-Fabián, S., Arreola, R., Becerril-Villanueva, E., Torres-Romero, J.C., Arana-Argáez, V., Lara-Riegos, J., Ramírez-Camacho, M.A., and Alvarez-Sánchez, M.E. (2019). Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Front. Oncol.* 9, 1370.
- Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., and Matrisian, L.M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 74, 2913–2921.
- Rahman, F., Cotterchio, M., Cleary, S.P., and Gallinger, S. (2015). Association between alcohol consumption and pancreatic cancer risk: a case-control study. *PloS One* 10, e0124489.
- Ramachandra, M., Atencio, I., Rahman, A., Vaillancourt, M., Zou, A., Avanzini, J., Wills, K., Bookstein, R., and Shabram, P. (2002). Restoration of Transforming Growth Factor β Signaling by Functional Expression of Smad4 Induces Anoikis. *Cancer Res.* 62, 6045–6051.
- Raman, S.P., Horton, K.M., and Fishman, E.K. (2012). Multimodality imaging of pancreatic cancer-computed tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography. *Cancer J. Sudbury Mass* 18, 511–522.
- Ramesh, S., Qi, X.-J., Wildey, G.M., Robinson, J., Molkentin, J., Letterio, J., and Howe, P.H. (2008). TGF β -mediated BIM expression and apoptosis are regulated through SMAD3-dependent expression of the MAPK phosphatase MKP2. *EMBO Rep.* 9, 990–997.
- Ramos, J.W. (2008). The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2707–2719.
- Raphael, B.J., Hruban, R.H., Aguirre, A.J., Moffitt, R.A., Yeh, J.J., Stewart, C., Robertson, A.G., Cherniack, A.D., Gupta, M., Getz, G., et al. (2017). Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 32, 185-203.e13.
- Rawla, P., Sunkara, T., and Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J. Oncol.* 10, 10–27.
- Rebours, V., Lévy, P., and Ruszniewski, P. (2012). An overview of hereditary pancreatitis. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 44, 8–15.
- Ribeiro, S.M., Poczatek, M., Schultz-Cherry, S., Villain, M., and Murphy-Ullrich, J.E. (1999). The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency- associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 274, 13586-93.
- Riggins, G.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Thiagalingam, S. (1997). Frequency of Smad gene mutations in human cancers. *Cancer Res* 57, 2578–2580.
- Risch, H.A., Yu, H., Lu, L., and Kidd, M.S. (2010). ABO blood group, *Helicobacter pylori* seropositivity, and risk of pancreatic cancer: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 502–505.
- Riva, G., Pea, A., Pilati, C., Fiadone, G., Lawlor, R.T., Scarpa, A., and Luchini, C. (2018). Histo-molecular oncogenesis of pancreatic cancer: From precancerous lesions to invasive ductal adenocarcinoma. *World J. Gastrointest. Oncol.* 10, 317–327.
- Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., and Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene. *Genes Cancer* 2, 466–474.

- Roberts, N.J., Norris, A.L., Petersen, G.M., Bondy, M.L., Brand, R., Gallinger, S., Kurtz, R.C., Olson, S.H., Rustgi, A.K., Schwartz, A.G., et al. (2016). Whole Genome Sequencing Defines the Genetic Heterogeneity of Familial Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* 6, 166–175.
- Robertson, I.B., and Rifkin, D.B. (2016). Regulation of the Bioavailability of TGF- β and TGF- β -Related Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a021907.
- Robertson, I.B., Horiguchi, M., Zilberberg, L., Dabovic, B., Hadjiolova, K., and Rifkin, D.B. (2015). Latent TGF- β -binding proteins. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 47, 44–53.
- Röder, P.V., Wu, B., Liu, Y., and Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp. Mol. Med.* 48, e219.
- Roelen, B.A.J., Cohen, O.S., Raychowdhury, M.K., Chadee, D.N., Zhang, Y., Kyriakis, J.M., Alessandrini, A.A., and Lin, H.Y. (2003). Phosphorylation of threonine 276 in Smad4 is involved in transforming growth factor-beta-induced nuclear accumulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285, C823–830.
- Roger, E., Martel, S., Bertrand-Chapel, A., Depollier, A., Chuvain, N., Pommier, R.M., Yacoub, K., Caligaris, C., Cardot-Ruffino, V., Chauvet, V., et al. (2019). Schwann cells support oncogenic potential of pancreatic cancer cells through TGFbeta signaling. *Cell Death Dis* 10, 886.
- Rorsman, P., and Huising, M.O. (2018). The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 404–414.
- Rushing, P.A., Hagan, M.M., Seeley, R.J., Lutz, T.A., and Woods, S.C. (2000). Amylin: a novel action in the brain to reduce body weight. *Endocrinology* 141, 850–853.
- Russo, A.A., Tong, L., Lee, J.-O., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1998). Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* 395, 237–243.
- Sakata, N., Yoshimatsu, G., and Kodama, S. (2019). Development and Characteristics of Pancreatic Epsilon Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1867.
- Sanchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Corbi, A., Attisano, L., and Bernabeu, C. (2001). Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* 276, 38527–35.
- Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., and Doetschman, T. (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124, 2659–70.
- Sanjabi, S., Oh, S.A., and Li, M.O. (2017). Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a022236.
- Schleger, C., Arens, N., Zentgraf, H., Bleyl, U., and Verbeke, C. (2000). Identification of frequent chromosomal aberrations in ductal adenocarcinoma of the pancreas by comparative genomic hybridization (CGH). *J. Pathol.* 191, 27–32.
- Schwarte-Waldhoff, I., Volpert, O.V., Bouck, N.P., Sipos, B., Hahn, S.A., Klein-Scory, S., Lüttges, J., Klöppel, G., Graeven, U., Eilert-Micus, C., et al. (2000). Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 9624–9629.
- Sekimoto, G., Matsuzaki, K., Yoshida, K., Mori, S., Murata, M., Seki, T., Matsui, H., Fujisawa, J., and Okazaki, K. (2007). Reversible Smad-dependent signaling between tumor suppression and oncogenesis. *Cancer Res.* 67, 5090–5096.
- Seoane, J. (2006). Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control. *Carcinogenesis* 27, 2148–2156.

- Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., and Massague, J. (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol* 3, 400-8.
- Seoane, J., Le, H.V., and Massague, J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419, 729–734.
- Seoane, J., Le, H.V., Shen, L., Anderson, S.A., and Massague, J. (2004). Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117, 211–223.
- Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704–707.
- Shariat, S.F., Shalev, M., Menesses-Diaz, A., Kim, I.Y., Kattan, M.W., Wheeler, T.M., and Slawin, K.M. (2001). Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) (TGF- beta(1)) strongly predict progression in patients undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 19, 2856-64.
- Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., and Springer, T.A. (2011). Latent TGF-β structure and activation. *Nature* 474, 343–349.
- Shi, W., Sun, C., He, B., Xiong, W., Shi, X., Yao, D., and Cao, X. (2004). GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J. Cell Biol.* 164, 291–300.
- Shi, Y., Wang, Y.F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1998). Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 94, 585–594.
- Shin, I., Bakin, A.V., Rodeck, U., Brunet, A., and Arteaga, C.L. (2001). Transforming growth factor beta enhances epithelial cell survival via Akt-dependent regulation of FKHRL1. *Mol Biol Cell* 12, 3328–3339.
- Shrivastava, P., and Bhatia, M. (2010). Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 16, 3995–4002.
- Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., et al. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693-9.
- Siegel, P.M., and Massague, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 807–821.
- Sirard, C., de la Pompa, J.L., Elia, A., Itie, A., Mirtsos, C., Cheung, A., Hahn, S., Wakeham, A., Schwartz, L., Kern, S.E., et al. (1998). The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev.* 12, 107–119.
- Sonbol, M.B., Mazza, G.L., Starr, J.S., Hobday, T.J., and Halfdanarson, T.R. (2020). Incidence and survival patterns of pancreatic neuroendocrine tumors over the last two decades: A SEER database analysis. *J. Clin. Oncol.* 38, 629–629.
- Soond, S.M., and Chantry, A. (2011). How ubiquitination regulates the TGF-β signalling pathway: new insights and new players: new isoforms of ubiquitin-activating enzymes in the E1-E3 families join the game. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 33, 749–758.
- Sperb, N., Tsesmelis, M., and Wirth, T. (2020). Crosstalk between Tumor and Stromal Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5486.
- Stockis, J., Colau, D., Coulie, P.G., and Lucas, S. (2009). Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *Eur. J. Immunol.* 39, 3315–3322.

- Stockis, J., Dedobbeleer, O., and Lucas, S. (2017). Role of GARP in the activation of latent TGF- β 1. *Mol. Biosyst.* *13*, 1925–1935.
- Storz, P. (2017). Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *14*, 296–304.
- Sugimoto, M., Takahashi, N., Farnell, M.B., Smyrk, T.C., Truty, M.J., Nagorney, D.M., Smoot, R.L., Chari, S.T., Carter, R.E., and Kendrick, M.L. (2019). Survival benefit of neoadjuvant therapy in patients with non-metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: A propensity matching and intention-to-treat analysis. *J. Surg. Oncol.* *120*, 976–984.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* *71*, 209–249.
- Tachibana, I., Imoto, M., Adjei, P.N., Gores, G.J., Subramaniam, M., Spelsberg, T.C., and Urrutia, R. (1997). Overexpression of the TGF β -regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J Clin Invest* *99*, 2365–2374.
- Takimoto, T., Wakabayashi, Y., Sekiya, T., Inoue, N., Morita, R., Ichiyama, K., Takahashi, R., Asakawa, M., Muto, G., Mori, T., et al. (2010). Smad2 and Smad3 Are Redundantly Essential for the TGF- β -Mediated Regulation of Regulatory T Plasticity and Th1 Development. *J. Immunol.* *185*, 842–855.
- Tan, X., Tong, L., Li, L., Xu, J., Xie, S., Ji, L., Fu, J., Liu, Q., Shen, S., Liu, Y., et al. (2021). Loss of Smad4 promotes aggressive lung cancer metastasis by de-repression of PAK3 via miRNA regulation. *Nat. Commun.* *12*, 4853.
- Tang, L.-Y., Heller, M., Meng, Z., Yu, L.-R., Tang, Y., Zhou, M., and Zhang, Y.E. (2017). Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Directly Activates the JAK1-STAT3 Axis to Induce Hepatic Fibrosis in Coordination with the SMAD Pathway*. *J. Biol. Chem.* *292*, 4302–4312.
- Taylor, M.A., Parvani, J.G., and Schiemann, W.P. (2010). The Pathophysiology of Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor- β in Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *15*, 169–190.
- Tempero, M.A., Malafa, M.P., Al-Hawary, M., Asbun, H., Bain, A., Behrman, S.W., Benson, A.B., Binder, E., Cardin, D.B., Cha, C., et al. (2017). Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* *15*, 1028–1061.
- Thayer, S.P., di Magliano, M.P., Heiser, P.W., Nielsen, C.M., Roberts, D.J., Lauwers, G.Y., Qi, Y.P., Gysin, S., Fernandez-del Castillo, C., Yajnik, V., et al. (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* *425*, 851–856.
- Thiery, J. (2003). Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 740–746.
- Thomas, D., and Radhakrishnan, P. (2019). Tumor-stromal crosstalk in pancreatic cancer and tissue fibrosis. *Mol. Cancer* *18*, 1–15.
- Thomas, D.A., and Massagué, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* *8*, 369–380.
- Thuault, S., Tan, E.-J., Peinado, H., Cano, A., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2008). HMGA2 and Smads Co-regulate SNAIL1 Expression during Induction of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *J. Biol. Chem.* *283*, 33437–33446.

- Timar, J., and Kashofer, K. (2020). Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 39, 1029–1038.
- Tran, D.Q., Andersson, J., Wang, R., Ramsey, H., Unutmaz, D., and Shevach, E.M. (2009). GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF- β on platelets and activated FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 13445–13450.
- Travis, M.A., and Sheppard, D. (2014). TGF- β activation and function in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 51–82.
- Tripathi, V., Sixt, K.M., Gao, S., Xu, X., Huang, J., Weigert, R., Zhou, M., and Zhang, Y.E. (2016). Direct Regulation of Alternative Splicing by SMAD3 through PCBP1 Is Essential to the Tumor-Promoting Role of TGF- β . *Mol. Cell* 64, 549–564.
- Truty, M.J., and Urrutia, R. (2007). Basics of TGF-beta and pancreatic cancer. *Pancreatology* 7, 423–435.
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L., and Wrana, J.L. (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95, 779–791.
- Tu, A.W., and Luo, K. (2007). Acetylation of Smad2 by the co-activator p300 regulates activin and transforming growth factor beta response. *J. Biol. Chem.* 282, 21187–21196.
- Ungefroren, H., Groth, S., Sebens, S., Lehnert, H., Gieseler, F., and Fändrich, F. (2011). Differential roles of Smad2 and Smad3 in the regulation of TGF- β 1-mediated growth inhibition and cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma cells: control by Rac1. *Mol. Cancer* 10, 67.
- Ungefroren, H., Witte, D., and Lehnert, H. (2018). The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- β -induced EMT and cell motility in cancer. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 247, 451–461.
- Valderrama-Carvajal, H., Cocolakis, E., Lacerte, A., Lee, E.H., Krystal, G., Ali, S., and Lebrun, J.J. (2002). Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat Cell Biol* 4, 963–969.
- Vander Ark, A., Cao, J., and Li, X. (2018). TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cell. Signal.* 52, 112–120.
- Védie, A.-L., and Neuzillet, C. (2021). Best Supportive Care in Advanced Pancreatic Cancer. In *Textbook of Pancreatic Cancer: Principles and Practice of Surgical Oncology*, K. Søreide, and S. Stättner, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1293–1307.
- van Veldhuisen, E., van den Oord, C., Brada, L.J., Walma, M.S., Vogel, J.A., Wilmink, J.W., del Chiaro, M., van Lienden, K.P., Meijerink, M.R., van Tienhoven, G., et al. (2019). Locally Advanced Pancreatic Cancer: Work-Up, Staging, and Local Intervention Strategies. *Cancers* 11, 976.
- Verrecchia, F., Tacheau, C., Schorpp-Kistner, M., Angel, P., and Mauviel, A. (2001). Induction of the AP-1 members c-Jun and JunB by TGF-beta/Smad suppresses early Smad-driven gene activation. *Oncogene* 20, 2205–11.
- Versteijne, E., Suker, M., Groothuis, K., Akkermans-Vogelaar, J.M., Besselink, M.G., Bonsing, B.A., Buijsen, J., Busch, O.R., Creemers, G.-J.M., van Dam, R.M., et al. (2020). Preoperative Chemoradiotherapy Versus Immediate Surgery for Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Results of the Dutch Randomized Phase III PREOPANC Trial. *J. Clin. Oncol.* 38, 1763–1773.
- Vial, E., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2003). ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell* 4, 67–79.

- Vicente-Manzanares, M., and Horwitz, A.R. (2011). Adhesion dynamics at a glance. *J. Cell Sci.* 124, 3923–3927.
- Viel, S., Marcais, A., Guimaraes, F.S., Loftus, R., Rabilloud, J., Grau, M., Degouve, S., Djebali, S., Sanlaville, A., Charrier, E., et al. (2016). TGF-beta inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci Signal* 9, ra19.
- Vincent, T., Neve, E.P., Johnson, J.R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P.L., et al. (2009). A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 11, 943–950.
- Vrieling, A., Bueno-de-Mesquita, H.B., Boshuizen, H.C., Michaud, D.S., Severinsen, M.T., Overvad, K., Olsen, A., Tjønneland, A., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C., et al. (2010). Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int. J. Cancer* 126, 2394–2403.
- Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.M., Chang, D.K., Kassahn, K.S., Bailey, P., Johns, A.L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., et al. (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 518, 495–501.
- Wagner, E.F., and Nebreda, Á.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 9, 537–549.
- Waldrip, W.R., Bikoff, E.K., Hoodless, P.A., Wrana, J.L., and Robertson, E.J. (1998). Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell* 92, 797–808.
- Walshe, T.E., dela Paz, N.G., and D'Amore, P.A. (2013). The role of shear-induced TGF-β signaling in the endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2608–2617.
- Wang, H., and Kochevar, I.E. (2005). Involvement of UVB-induced reactive oxygen species in TGF-β biosynthesis and activation in keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 890–897.
- Wang, L., Xie, D., and Wei, D. (2019). Pancreatic Acinar-to-Ductal Metaplasia and Pancreatic Cancer. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1882, 299–308.
- Wang, M., Zhao, D., Spinetti, G., Zhang, J., Jiang, L.-Q., Pintus, G., Monticone, R., and Lakatta, E.G. (2006). Matrix Metalloproteinase 2 Activation of Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1) and TGF-β1–Type II Receptor Signaling Within the Aged Arterial Wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1503–1509.
- Wang, R., Zhu, J., Dong, X., Shi, M., Lu, C., and Springer, T.A. (2012). GARP regulates the bioavailability and activation of TGFβ. *Mol. Biol. Cell* 23, 1129–1139.
- Wang-Gillam, A., Hubner, R.A., Siveke, J.T., Von Hoff, D.D., Belanger, B., de Jong, F.A., Mirakhur, B., and Chen, L.-T. (2019). NAPOLI-1 phase 3 study of liposomal irinotecan in metastatic pancreatic cancer: Final overall survival analysis and characteristics of long-term survivors. *Eur. J. Cancer* 108, 78–87.
- Webb, D.J., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells – over and over and over again. *Nat. Cell Biol.* 4, E97–E100.
- Weinstein, M., Yang, X., Li, C., Xu, X., Gotay, J., and Deng, C.X. (1998). Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor smad2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9378–9383.
- Weiss, A., and Attisano, L. (2013). The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2, 47–63.

- Wendt, M.K., Tian, M., and Schiemann, W.P. (2012). Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF- β -induced EMT during cancer progression. *Cell Tissue Res.* 347, 85–101.
- Whitcomb, D.C., and Lowe, M.E. (2007). Human pancreatic digestive enzymes. *Dig. Dis. Sci.* 52, 1–17.
- Whittle, M.C., and Hingorani, S.R. (2015). Disconnect between EMT and metastasis in pancreas cancer. *Oncotarget* 6, 30445–30446.
- Whittle, M.C., Izeradjene, K., Rani, P.G., Feng, L., Carlson, M.A., DelGiorno, K.E., Wood, L.D., Goggins, M., Hruban, R.H., Chang, A.E., et al. (2015). RUNX3 Controls a Metastatic Switch in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cell* 161, 1345–1360.
- Wiercinska, E., Naber, H.P.H., Pardali, E., van der Pluijm, G., van Dam, H., and ten Dijke, P. (2011). The TGF- β /Smad pathway induces breast cancer cell invasion through the up-regulation of matrix metalloproteinase 2 and 9 in a spheroid invasion model system. *Breast Cancer Res. Treat.* 128, 657–666.
- Wilentz, R.E., Iacobuzio-Donahue, C.A., Argani, P., McCarthy, D.M., Parsons, J.L., Yeo, C.J., Kern, S.E., and Hruban, R.H. (2000). Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* 60, 2002–2006.
- Wilkes, M.C., Murphy, S.J., Garamszegi, N., and Leof, E.B. (2003). Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8878–8889.
- Williams, J.A. (2010). Regulation of acinar cell function in the pancreas. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 478–483.
- Williams, E.D., Gao, D., Redfern, A., and Thompson, E.W. (2019). Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 19, 716–732.
- Wipff, P.J., and Hinz, B. (2008). Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship. *Eur J Cell Biol* 87, 601–615.
- Wipff, P.-J., Rifkin, D.B., Meister, J.-J., and Hinz, B. (2007). Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 179, 1311–1323.
- Wood, L.D., Yurgelun, M.B., and Goggins, M.G. (2019). Genetics of Familial and Sporadic Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 156, 2041–2055.
- Woods, S.C., Lutz, T.A., Geary, N., and Langhans, W. (2006). Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 1219–1235.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massague, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370, 341–7.
- Wrighton, K.H., Lin, X., and Feng, X.H. (2009). Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling. *Cell Res* 19, 8–20.
- Wu, M.Y., and Hill, C.S. (2009). Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell* 16, 329–343.
- Wurdak, H., Ittner, L.M., Lang, K.S., Leveen, P., Suter, U., Fischer, J.A., Karlsson, S., Born, W., and Sommer, L. (2005). Inactivation of TGF β signaling in neural crest stem cells leads to multiple defects reminiscent of DiGeorge syndrome. *Genes Dev.* 19, 530–535.
- Xelwa, N., Candy, G.P., Devar, J., Omoshoro-Jones, J., Smith, M., and Nweke, E.E. (2021). Targeting Growth Factor Signaling Pathways in Pancreatic Cancer: Towards Inhibiting Chemoresistance. *Front. Oncol.* 11, 2206.

- Xu, J., and Attisano, L. (2000). Mutations in the tumor suppressors smad2 and smad4 inactivate transforming growth factor beta signaling by targeting smads to the ubiquitin-proteasome pathway [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U A* 97, 4820–4825.
- Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 19, 156–172.
- Xu, L., Kang, Y., Col, S., and Massague, J. (2002). Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell* 10, 271–282.
- Xu, P., Lin, X., and Feng, X.-H. (2016). Posttranslational Regulation of Smads. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a022087.
- Xue, G., Restuccia, D.F., Lan, Q., Hynx, D., Dirnhofer, S., Hess, D., Rüegg, C., and Hemmings, B.A. (2012). Akt/PKB-mediated phosphorylation of Twist1 promotes tumor metastasis via mediating cross-talk between PI3K/Akt and TGF- β signaling axes. *Cancer Discov.* 2, 248–259.
- Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., and Zhang, Y.E. (2008). TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell* 31, 918–924.
- Yan, X., and Chen, Y.-G. (2011). Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- β signalling. *Biochem. J.* 434, 1–10.
- Yang, J., and Weinberg, R.A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* 14, 818–829.
- Yang, L., Bai, Y., Li, Q., Chen, J., Liu, F., Weng, X., and Xu, F. (2021a). Analysis of the Curative Effect of Neoadjuvant Therapy on Pancreatic Cancer. *Front. Oncol.* 11, 695645.
- Yang, S., Liu, Q., and Liao, Q. (2021b). Tumor-Associated Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Origin, Polarization, Function, and Reprogramming. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 607209.
- Yang, W.-L., Wang, J., Chan, C.-H., Lee, S.-W., Campos, A.D., Hur, L., Grabiner, B., Lin, X., Darnay, B.G., and Lin, H.-K. (2009). The E3 Ligase TRAF6 Regulates Akt Ubiquitination and Activation. *Science* 325, 1134–1138.
- Yi, J.Y., Shin, I., and Arteaga, C.L. (2005). Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 10870–10876.
- Yonezawa, S., Higashi, M., Yamada, N., and Goto, M. (2008). Precursor lesions of pancreatic cancer. *Gut Liver* 2, 137–154.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14, 163–176.
- Yumoto, K., Eber, M.R., Wang, J., Cackowski, F.C., Decker, A.M., Lee, E., Nobre, A.R., Aguirre-Ghiso, J.A., Jung, Y., and Taichman, R.S. (2016). Axl is required for TGF- β 2-induced dormancy of prostate cancer cells in the bone marrow. *Sci. Rep.* 6, 36520.
- Zawel, L., Dai, J.L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Kern, S.E. (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1, 611–617.
- Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res.* 19, 128–139.
- Zhang, Y.E. (2017). Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a022129.

- Zhang, Y., and Weinberg, R.A. (2018). Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front. Med.* 12, 361–373.
- Zhang, L., Zhou, F., García de Vinuesa, A., de Kruijf, E.M., Mesker, W.E., Hui, L., Drabsch, Y., Li, Y., Bauer, A., Rousseau, A., et al. (2013a). TRAF4 promotes TGF- β receptor signaling and drives breast cancer metastasis. *Mol. Cell* 51, 559–572.
- Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D.J., Hemmati-Brivanlou, A., and Derynck, R. (2001). Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U A* 98, 974-9.
- Zhang, Y., Morris, J.P., Yan, W., Schofield, H.K., Gurney, A., Simeone, D.M., Millar, S.E., Hoey, T., Hebrok, M., and Magliano, M.P. di (2013b). Canonical Wnt Signaling Is Required for Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Res.* 73, 4909–4922.
- Zhang, Y., Alexander, P.B., and Wang, X.F. (2017). TGF-beta Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9.
- Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.-C., LeBleu, V.S., and Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 527, 525–530.
- Zhong, Y., Macgregor-Das, A., Saunders, T., Whittle, M.C., Makohon-Moore, A., Kohutek, Z.A., Poling, J., Herbst, B.T., Javier, B.M., Cope, L., et al. (2017). Mutant p53 Together with TGF β Signaling Influence Organ-Specific Hematogenous Colonization Patterns of Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 1607–1620.
- Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., and Hung, M.-C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 6, 931–940.
- Zhu, Y., Richardson, J.A., Parada, L.F., and Graff, J.M. (1998). Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* 94, 703–714.

ANNEXES

Article

“Schwann cells support oncogenic potential of pancreatic cancer cells through TGF β signaling”

Roger et al., Cell Death & Disease; 2019

Elodie Roger, Sylvie Martel, **Adrien Bertrand-Chapel**, Arnaud Depollier, Nicolas Chuvin, Roxane M. Pommier, Karam Yacoub, Cassandre Caligaris, Victoire Cardot-Ruffino, Véronique Chauvet, Sophie Aires, Kayvan Mohkam, Jean-Yves Mabrut, Mustapha Adham, Tanguy Fenouil, Valérie Hervieu, Laura Broutier, Marie Castets, Cindy Neuzillet, Philippe A. Cassier, Richard Tomasini, Stéphanie Sentis, Laurent Bartholin

Cell Death & Disease

nature portfolio

Résumé

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (ADKP) est l'une des tumeurs solides avec le pronostic le plus sombre. L'abondant stroma de cette tumeur est composé de la matrice extracellulaire et de cellules stromales (*e.g.* fibroblastes, cellules immunitaires). Les fibres nerveuses envahissant le stroma représentent une caractéristique des ADKP, et sont impliquées dans le remodelage neural, favorisant les douleurs neuropathiques, la dissémination des cellules cancéreuses et la rechute tumorale après chirurgie. Le remodelage neuronal associé au cancer du pancréas est régulé par des interactions fonctionnelles, physiques et moléculaires entre les cellules cancéreuses, les cellules nerveuses et les cellules de Schwann environnantes. Dans cette étude, nous montrons que les cellules de Schwann (cellules gliales soutenant les neurones périphériques) peuvent augmenter l'agressivité (*e.g.* migration, invasion, tumorigénicité) des cellules cancéreuses pancréatiques de manière TGF- β -dépendante. En effet, nous révélons que le milieu conditionné des cellules de Schwann contient des quantités élevées de TGF- β capable d'activer la voie de signalisation dépendante des SMAD dans les cellules cancéreuses. Nous avons également observé dans des échantillons d'ADKP humains, qu'un niveau élevé d'activation de la voie du TGF- β était positivement corrélé à l'invasion péri-neurale. Les analyses du sécrétome des cellules de Schwann et des cellules cancéreuses pancréatiques, cultivées seules ou en association, ont mis en évidence le rôle central du TGF- β dans les interactions neuro-épithéliales, comme l'illustrent les signatures protéomiques liées à l'adhésion et à la motilité cellulaire. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que dans les ADKP, les cellules de Schwann sont une source significative de TGF- β , qui joue un rôle crucial dans l'acquisition de propriétés agressives par les cellules cancéreuses pancréatiques.

ARTICLE

Open Access

Schwann cells support oncogenic potential of pancreatic cancer cells through TGF β signaling

Elodie Roger¹, Sylvie Martel¹, Adrien Bertrand-Chapel¹, Arnaud Depollier¹, Nicolas Chuvin^{1,8}, Roxane M. Pommier¹, Karam Yacoub¹, Cassandre Caligaris¹, Victoire Cardot-Ruffino¹, Véronique Chauvet¹, Sophie Aires¹, Kayvan Mohkam², Jean-Yves Mabrut², Mustapha Adham³, Tanguy Fenouil⁴, Valérie Hervieu⁴, Laura Broutier¹, Marie Castets¹, Cindy Neuzillet⁵, Philippe A. Cassier^{1,6}, Richard Tomasini⁷, Stéphanie Sentis¹ and Laurent Bartholin¹

Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the solid tumors with the poorest prognosis. The stroma of this tumor is abundant and composed of extracellular matrix and stromal cells (including cancer-associated fibroblasts and immune cells). Nerve fibers invading this stroma represent a hallmark of PDAC, involved in neural remodeling, which participates in neuropathic pain, cancer cell dissemination and tumor relapse after surgery. Pancreatic cancer-associated neural remodeling is regulated through functional interplays mediated by physical and molecular interactions between cancer cells, nerve cells and surrounding Schwann cells, and other stromal cells. In the present study, we show that Schwann cells (glial cells supporting peripheral neurons) can enhance aggressiveness (migration, invasion, tumorigenicity) of pancreatic cancer cells in a transforming growth factor beta (TGF β)-dependent manner. Indeed, we reveal that conditioned medium from Schwann cells contains high amounts of TGF β able to activate the TGF β -SMAD signaling pathway in cancer cells. We also observed in human PDAC samples that high levels of TGF β signaling activation were positively correlated with perineural invasion. Secretome analyses by mass spectrometry of Schwann cells and pancreatic cancer cells cultured alone or in combination highlighted the central role of TGF β in neuro-epithelial interactions, as illustrated by proteomic signatures related to cell adhesion and motility. Altogether, these results demonstrate that Schwann cells are a meaningful source of TGF β in PDAC, which plays a crucial role in the acquisition of aggressive properties by pancreatic cancer cells.

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most aggressive malignant diseases with a 5-year median overall survival rate lower than 8%¹. By 2030, PDAC will be the second leading cause of cancer-related deaths in Western countries^{2,3}. Late diagnosis, high metastatic potential of PDAC cells and low efficacy of currently

available therapies are responsible for this poor prognosis⁴.

PDAC is characterized by an abundant stroma that can represent over 80% of the tumor volume. This desmoplastic stroma is composed of extracellular matrix (ECM) components (such as collagens, hyaluronic acid, fibronectin) and various cell types including cancer-associated fibroblasts (CAFs)⁵ and immunosuppressive immune cells (regulatory T cells, M2 macrophages, myeloid-derived suppressor cells)⁶. More surprisingly, many nerve fibers are systematically observed by pathologists within the PDAC tumor, whereas nerve fibers in normal pancreas are confined to fat pads surrounding the organ. This observation is part of a more general concept termed pancreatic cancer-associated neural remodeling (PANR)^{7–10}. This

Correspondence: Laurent Bartholin (laurent.bartholin@lyon.univcancer.fr)

¹Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon (CRCL), Lyon 69373, France

²Hospices Civils de Lyon, Croix Rousse hospital, Claude-Bernard Lyon 1 University, Department of General Surgery & Liver Transplantation, Lyon, France
Full list of author information is available at the end of the article.

Edited by B. Joseph

© The Author(s) 2019



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

PDAC hallmark is closely related to multiple clinicopathological features¹¹ and probably linked to genomic alterations in axon guidance signaling genes that have been reported in PDAC¹². PANR consists on the one hand in a phenomenon called neural remodeling (NR) characterized by an increase in the size and density of nerve fibers within tumors compared to nerves present around a healthy pancreas, as well as changes in signal transmission abilities¹³. NR is thought to be responsible for the intense neuropathic pain that is frequently experienced by patients with PDAC¹⁴. On the other hand, tumor cells infiltrating nerve fibers are detectable in 95% of PDAC patients. This phenomenon called perineural invasion (PNI) is correlated with pain, local recurrence and distant metastasis in PDAC¹⁴.

The molecular dialog between cancer cells, nerves and surrounding Schwann cells, and other stromal cells remains scarcely documented. However, it has been shown that (i) cancer cells secrete chemo attracting factors for Schwann cells, such as NGF and ARTN¹⁵, CXCL12/SDF-1¹⁶, and IL6¹⁷, (ii) stromal cells such as CAFs and immune cells then produce secreted factors such as SLIT2¹⁸ or LIF¹⁹, which stimulate proliferation and migration of Schwann cells, and finally (iii) Schwann cells reciprocally induce tumor cell migration through the secretion of GDNF²⁰, as well as via the NCAM1-mediated cell–cell interaction²¹. Functionally, it was shown in a genetic PDAC model that sensory neuron ablation results in a slower cancer initiation and progression associated with decreased PANR, highlighting that nerve fibers actively support tumor growth²².

Among the other secreted factors potentially involved in neural remodeling, the transforming growth factor beta (TGF β) represents an attractive candidate^{23,24}. TGF β was shown to stimulate the expression of some factors involved in neural development, homeostasis or remodeling such as NGF²⁵, ARTN^{15,26}, CX3CR1^{27–29}, and ROBO1³⁰. Interestingly, it has recently been shown that a low ROBO2/ROBO1 ratio in pancreatic cancer cells is correlated with TGF β signaling activation in myofibroblasts and associated with a poorer prognosis³¹. TGF β is also described for its neuroprotective activities^{32–35}, and as being involved in the perception of pain^{36–38}.

Hence, it is tempting to speculate that TGF β may play a direct role in PANR. To that end, we herein explored the potential role of TGF β as a direct modulator of cancer-nerve cell interactions, using co-cultures and conditioned media from PDAC (Capan-2) and Schwann (sNF96.2) cell lines in migration and invasion assays. Owing to the abundance of secreted factors within the PDAC desmoplastic stroma, we also characterized in a large-scale screening (mass spectrometry) the secretomes of the Schwann cells cultured alone or in combination with pancreatic cancer cells.

Material and methods

Cell culture

The human pancreatic cancer cell line, Capan-2, was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), and Schwann cells (sNF96.2) were kindly provided by Dr. Richard Tomasini (Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille, France). sNF96.2 Schwann cells were derived from neurofibromatosis type-1 disease. Capan-2 and sNF96.2 cell lines were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and 1% of penicillin/streptomycin (Gibco). These two cell lines had recently been tested negative for mycoplasma.

Human Schwann cells (HSwC) were obtained from iXcells Biotechnologies (Cat#10HU-188), isolated from human spinal nerve and cryopreserved at P1. HSwC were cultured in Schwann Cell Basal Medium (Cat#MD-0055B), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Cat#MD-0094), Schwann Cell Growth Supplement (SCGS, Cat#MD-0055S), and 1% antibiotic-antimycotic (Cat#MD-0095).

The human hTERT NF1 ipn02.3 2 λ cell line³⁹ was obtained from the ATCC (Cat#CRL-3392) from a healthy sural nerve (sciatic nerve) in a case of plexiform neurofibroma. ipn02.3 2 λ cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 2 mM L-glutamine (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco).

Conditioned medium production

Conditioned medium (CM) was collected from cell cultures of Capan-2 cells (Capan-2 CM) and sNF96.2 cells (sNF96.2 CM) cultured alone or in combination (Capan-2/sNF96.2 CM). For CM production of Capan-2 and sNF96.2 cells cultured alone, 300,000 cells of each cellular type were seeded onto a six-well tissue culture plate in complete DMEM. Following overnight culture for cell attachment, the medium was replaced by DMEM containing 0.5% FBS. In all experiments, except for Fig. S5 (in which conditioned medium was harvested at 72 h), conditioned media were collected after 24 h of culture, centrifuged at 1,200 rpm and cell supernatants were harvested and stored at -80°C .

For CM production from Capan-2 cells co-cultured with sNF96.2 cells, 300,000 cells of each cell line were seeded into co-culture plates, pores size 0.4 μm (300,000 Capan-2 cancer cells into the lower compartment and 300,000 sNF96.2 cells into the upper compartment) and processed in the same conditions as conditioned medium produced with Capan-2 and sNF96.2 cells cultured alone.

3D migration assay

The 3D migration assay was performed with Capan-2 cells and sNF96.2 cells. 2,000,000 cells/mL of each cell line

were resuspended in cold ECM gel (Sigma-Aldrich), and drops of 20,000 cells/10 μ l were placed in a 12-well tissue culture plate at a 1-mm distance from each other and connected via an ECM bridge. An empty ECM gel drop in front of the ECM drop containing Capan-2 cells was used as a negative control. After 15 min of ECM gel hardening at 37 °C, DMEM medium supplemented with 1% FBS was added in each well, and cells were treated or not with 10 μ M SB-431542 T β RI inhibitor. The migration of Capan-2 cells onto the ECM bridge toward sNF96.2 cells was monitored for 15 days. The 3D cultures were monitored using an inverted microscope (Zeiss Axiovert 200 M) at different timepoints (0, 5, 7, and 15 days). These experiments were repeated three times.

Cell migration and invasion assays

Cell migration and invasion assays were performed using 24-well transwell chambers (Boyden chambers, Corning). These experiments were performed using co-cultures of Capan-2 cells and sNF96.2 cells or using CM from these cell lines. For co-culture experiments, 50,000 Capan-2 cells were seeded into the upper chamber of an 8- μ m pore size insert in the 24-well plate, with (invasion assay) or without (migration assay) ECM gel (cells were resuspended in matrigel, diluted in DMEM FBS-free at a concentration of 5 mg/mL; Sigma-Aldrich) and 100,000 sNF96.2 cells or 100,000 Capan-2 cancer cells (used as a control condition) were seeded into the lower compartment. For CM experiments, sNF96.2 cells were replaced by sNF96.2 CM or by Capan-2 CM (used as a control condition) in the lower compartment.

Capan-2 cells were treated or not with 10 ng/mL TGF β and 10 μ M SB-431542 T β RI inhibitor in indicated wells. In addition, each well was treated with 8 μ M of 5-fluorouracil to avoid cell proliferation and 5% FBS chemoattractant was placed in the well below. Capan-2 cells were left to migrate or invade the bottom chamber containing cells for 72 h. Wells were fixed with cold methanol and stained with a 0.1% crystal violet solution. The cells on the surface of the upper membrane which had not migrated were removed with a cotton tip. Each well was photographed and subsequently analyzed using the ImageJ software (area calculation of migratory and invasive Capan-2 cells attached to the lower membrane surface). Migration experiments were repeated at least four times and invasion experiments were repeated at least three times.

Cell proliferation assay

Cell proliferation was determined using an IncuCyte® ZOOM Imaging System (Essen Bioscience). Capan-2 cells were transduced using the NuLight Lentivirus Reagent, according to the manufacturer's instructions, and providing homogeneous expression of a nuclear-restricted

mKate protein (far-red fluorescent protein). The Capan-2-nRFP⁺ stable cell line was then established by 1 μ g/mL puromycin selection.

For proliferation assays, 50,000 Capan-2-nRFP⁺ cells were seeded onto 48-well culture plates in complete DMEM. Following their overnight culture for cell attachment, serum deprivation was performed for 1 h. Serum-free medium was replaced by CM from sNF96.2 cells, CM from Capan-2 cancer cells. Capan-2-nRFP⁺ cells were automatically counted during 72 h. For the quantification of the relative rate of cell proliferation, the number of Capan-2-nRFP⁺ cells was normalized against the T0 Capan-2-nRFP⁺ cell count of the respective well. These experiments were performed in triplicate and repeated three times.

Wound healing assay

For wound healing assays, 120,000 Capan-2 cells were seeded onto 48-well tissue culture plates in complete medium. Following their overnight culture for cell attachment, serum deprivation was performed for 1 h and cells were pre-treated with 10 μ M SB-431542 T β RI inhibitor in the indicated wells for 1 h. Capan-2 cells were then wounded using a 200 μ l pipette tip and washed with serum-free DMEM. Gently, sNF96.2 CM, Capan-2 CM, or FBS 0.5% DMEM (used as internal control) were added, and Capan-2 cells were treated or not with 10 ng/mL TGF β and 10 μ M SB-431542 T β RI inhibitor. In addition, each well was treated with 8 μ M of 5-fluorouracil to avoid cell proliferation. Using an IncuCyte® ZOOM Imaging System (Essen Bioscience), cells were monitored for at least 24 h. For quantification of wound areas, three fields per well/per experiment, were visualized at different timepoints (0 and 12 h) using the ImageJ software. Percentages of wound closure were determined using the following equation: % of wound closure = ((wound area at time X – initial wound area) $\times$ 100)/initial wound area. These experiments were performed in triplicate and repeated at least three times.

Immunofluorescence

Cells were treated and grown on 48-well plates (conditioned medium experiments) or on glass coverslips in the bottom compartment of 6-well co-culture plates (co-cultures experiments, pore size 0.4 μ m) and fixed with 4% paraformaldehyde. Cells were then permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 20 min and blocked with 5% FBS in PBS for 30 min at room temperature (RT). The primary antibodies used were: mouse monoclonal antibodies against β -CATENIN (1:100; BD Biosciences #610153), E-CADHERIN (1:300; BD Biosciences #610181) and rabbit monoclonal antibody SMAD2 (1:100; Cell signaling D43B4). Secondary labeled antibodies were goat antibody against mouse IgG, Alexa Fluor 488 dye-

conjugated (1:500; Invitrogen) and goat antibody against rabbit IgG, Alexa Fluor 594 dye-conjugated (1:500; Invitrogen). F-ACTIN was stained with phalloidin-TRITC (1:500; Sigma-Aldrich). DNA was stained with DAPI (1 µg/mL; Sigma-Aldrich). Fluorescent images were taken with the Zeiss Axio Imager M2 upright microscope (for co-culture experiments) or with the Axio Observer inverted microscope (for conditioned medium experiments). Images were processed using Zeiss Zen and ImageJ software.

ELISA

Protein levels of TGFβ1 were measured in CM from Capan-2 and sNF96.2 cells using the human TGFβ1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) according to the manufacturer’s instructions.

Protein extraction and Western blotting

Total protein extracts (30 µg) were prepared using RIPA lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and commercial protease and phosphatase inhibitor cocktail tablets (Roche)) and were subjected to electrophoresis on SDS–PAGE. The separated proteins were transferred onto PVDF membranes (Millipore) by electroblotting. Western blots were visualized using the ECL Western detection system (GE Healthcare). Images were acquired using a ChemiDoc gel imager (BioRad, Universal Hood III). The primary and secondary antibodies used were:

P-SMAD2,	Rabbit	(Cell
	monoclonal, 1:1000	Signalling, 138D4)
SMAD2,	Rabbit	(Cell Signalling,
	monoclonal, 1:1000	D43B4))
GAPDH,	Mouse monoclonal,	(Abcam, #8245)
	1:20 000	
Rabbit IgG secondary	Goat, 1:10 000	(Immuno
antibody,		Reagents Inc.)
Mouse IgG secondary	Goat, 1:10 000	(DakoCytomation)
antibody,		

Proteomic analyses - LFQ mass spectrometry

Sample preparation for LFQ mass spectrometry

For mass spectrometry experiments, CM from Capan-2 and sNF96.2 cells, cultured alone or in combination (see Conditioned medium production section), were collected after 24 h of growth in FBS-free DMEM. Three 12 mL CM aliquots were used for each condition, centrifuged at 1 200 rpm for 3 min (for cell debris removal), and concentrated using Amicon Ultra-4 centrifugal filter devices (3,000 MWCO cutoff) (Millipore) by successive spinning

(4 mL of CM per spinning) at 5,976 rpm for 25 min. Protein concentrations were determined by Bradford assay and 50 µg of proteins were used for mass spectrometry sample preparation. Following the protein precipitation step (using trichlororoacetic acid 20% in volume, overnight at 4 °C), samples were washed in acetone and solubilized in 8 M urea. Samples were then reduced (Tris(2-CarboxyEthyl)Phosphine, 5 mM, 57 °C, 1 h), alkylated (iodoacetamide, 10 mM, RT, 45 min), and digested (5 h at 37 °C with LysC and overnight at 37 °C with trypsin). Peptides were next desalted using C18 spin columns (Harvard Apparatus), dried and resuspended in 100 µL H₂O/ACN-98/2-0.1% AF. Ten microliters of each sample were used to determine peptide concentration (Pierce™ Quantitative Fluorometric Peptide Assay, ThermoFisher). Five micrograms were collected, dried and diluted in 18 µL H₂O/ACN-98/2-0.1% AF. In total 2 µL of a 2 pmol/µL Cytochrome C solution used as an internal control, were added to each sample. Hence, 250 ng of peptides and 200 fmol of Cytochrome C, per sample, were injected into the mass spectrometer (Q Exactive HF, Thermo Scientific, Protein Science Facility UMS3444, Lyon, France).

Mass spectrometry analysis

Samples were analyzed in a Label Free quantitation strategy using an Ultimate 3000 nano-RSLC (Thermo Scientific, San Jose California) coupled online with a Q Exactive HF mass spectrometer via a nano-electrospray ionization source (Thermo Scientific, San Jose California). The proteomics results are representative of three biological replicates per sample, subdivided into three technical replicates (*i.e.* 9 technical replicates experiment for each sample) (see Fig. S8). The samples were loaded onto a C18 Acclaim PepMap100 trap-column 75 µm ID × 2 cm, 3 µm, 100 Å, (Thermo Scientific) for 3 min at 5 µL/min with 2% ACN, 0.05% TFA in H₂O and then separated on a C18 Acclaim Pepmap100 nano-column, 50 cm × 75 µm i.d, 2 µm, 100 Å (Thermo Scientific) with a 120 min gradient at a flow rate of 300 nL/min: 100 min from 4% to 20% buffer B (A: 0.1% FA in H₂O, B: 0.1% FA in 100% AcN), 20 min from 20% to 32% of B and then from 32% to 95% of B in 2 min, maintained for 10 min and back to the initial conditions in 1 min for 14 min. The oven temperature was kept constant at 40 °C.

Samples were analyzed with a TOP20 HCD method. Briefly, MS data were acquired using a data-dependent strategy selecting the fragmentation events based on the 20 most abundant precursor ions in the survey scan (375–1,800 Th). The resolution of the survey scan was 60,000 at m/z 200 Th and for MS/MS scan the resolution was set to 15,000 at m/z 200 Th. The Ion Target Value for the survey scans in the Orbitrap and the MS/MS scan were set

at 3E6 and 1E5 respectively and the maximum injection time was set at 60 ms for both MS and MS/MS scan. Parameters for acquiring HCD MS/MS spectra were as follows; normalized collision energy = 27 and an isolation window width of 2 m/z. The precursors with unknown charge state, charge state of 1 and 8 or greater than 8 were excluded. Peptides selected for MS/MS acquisition were then placed on an exclusion list for 30 s using the dynamic exclusion mode to limit spectrum duplication.

Data analysis

Protein identification was performed using the SEQUEST HT algorithm integrated in Proteome Discover 2.2 (Thermo Scientific) and MS/MS scans were examined against a human dataset (SwissProt_ juillet 2018). Precursor mass tolerance was set at 10 ppm and fragment mass tolerance was set at 0.02 Da, and up to 2 missed cleavages were allowed. Oxidation (M), acetylation (Protein N-terminus) were set as a variable modification, and Carbamidomethylation (C) as a fixed modification. False discovery rate (FDR) of peptide identification was calculated by the Percolator algorithm method, and a cut-off FDR value of 1% was used. Protein quantification was conducted by Label Free Quantification (LFQ) approach, and LFQ abundance values were obtained for each sample, normalized against the total amount of peptides and were transformed into log10 scale. Samples were grouped according to the CM type (i.e., 3 groups: Capan-2 CM, sNF96.2 CM, and Capan-2/sNF96.2 CM). Log10 LFQ abundance values were used to generate heatmaps (Morpheus, Broad Institute, USA).

Differential protein abundance was analyzed using ratio calculations (pairwise ratios were calculated as median of all possible pairwise ratios calculated between replicates of all connected peptides) and validated using an ANOVA (background based) statistical analysis.

In these settings, we performed the following ratio calculations: ratio sNF96.2/Capan-2/sNF96.2 CM; ratio sNF96.2/Capan-2 CM/Capan-2 CM; and ratio Capan-2 CM/sNF96.2 CM. Note that the value 100 is used as the maximum allowed fold change. Significant differences between conditions were defined by an adjusted p -value < 0.05.

Gene ontology (GO) enrichment analysis of biological processes of the significantly different proteins were performed using the PANTHER (protein annotation through evolutionary relationship) classification system (i.e. web site: <http://geneontology.org>). PANTHER overrepresentation tests were performed against the GO Ontology database (reference list: Homo sapiens) and significance was assessed with Fisher's exact test (using the Bonferroni correction for multiple hypothesis testing). Protein-protein interactions were explored using STRING analysis (reference database:

Homo sapiens database; i.e., web site: string-db.org), with a minimum required interaction score set at a high confidence level of 0.700. Protein clusters were defined using the MCL algorithm with an inflation parameter set at 3.

Clonogenic survival assay

For clonogenic survival assays, 1000 Capan-2 cells were seeded onto 12-well tissue culture plates in 1 mL of complete DMEM. Following their overnight culture for cell attachment, medium was replaced with Capan-2 CM, sNF96.2 CM or with DMEM supplemented with 0.5% FBS. Cells were treated or not with 10 μ M of SB-431542 T β RI inhibitor. After 11 days of culture at 37 °C under 5% (v/v) CO₂ atmosphere, cells were fixed with cold methanol and stained with a 0.1% crystal violet solution. After several washes, plates were dried and imaged. Each well was photographed and subsequently analyzed using the ImageJ software (area calculation of Capan-2 cells colonies). These experiments were repeated at least four times.

Soft agar assay

Capan-2 cells were harvested by trypsinization and diluted to a density of 40,000 cells per mL. Each mL was then suspended in 1 mL of 0.45% melted agarose (Lonza) in culture medium supplemented with FBS 5%, containing antibiotics, and plated onto 6-well plates overlaid with 0.75% agarose in the same medium. The following day, 500 μ L of Capan-2 CM (used as control condition) or sNF96.2 CM were added to each well, and cells were treated or not with 10 μ M SB-431542 T β RI inhibitor. Cells were then incubated for 3 weeks at 37 °C under 5% (v/v) CO₂ atmosphere. Renewal of CM and treatments was performed once a week. These experiments were repeated at least three times in triplicate, and twenty fields per condition/per experiment were acquired and subsequently analyzed using the ImageJ software (calculation of the number of Capan-2 cells colonies).

Statistical analysis

Prism 6.0 (Graphpad) was used for statistics and to create graphs. All data are representative of at least three independent repeats if not otherwise stated. The letter n refers to the number of independently performed experiments representative of the data shown in the figures. The statistical significance in this study was determined by two-tailed Student's t -test at * P < 0.05, ** P < 0.01, and *** P < 0.001. The error bars represent the standard deviation of the mean (SD). To perform the correlation analysis between pSMAD2 pattern and the perineural invasion in human PDAC, a Chi² test was used with a 95% confidence interval. A p -value < 0.05 was considered to be significant. A risk increase was corrected using the Holm–Bonferroni method.

Human PDAC cohort

All of the samples from patients having undergone surgery in the Hospices Civils de Lyon between the 1st of January 2004 and the 31st of December 2017 for pancreatic ductal adenocarcinoma were included in the cohort. The histopathological slides were reviewed by two pathologists including one expert in pancreatic diseases, blinded to the immunohistochemical data, to assess the presence of perineural invasion. The presence of perineural invasion was defined as either a direct infiltration of the nerves by tumor cells, or when >75% of the nerve was surrounded by tumor cells. These criteria were used to distinguish tumors with perineural invasion (at least one) from those without. This reviewing process also allowed us to select the most representative formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples in order to conduct immunohistochemical analyses.

Immunohistochemical analysis of human PDAC samples

FFPE histological sections were obtained following standard protocols to perform immunohistochemical staining (Ventana Ultra Benchmark) for pSMAD2 (1:100; clone 138 d4, S465/467). Antibody was detected using a peroxidase reaction. A positive control was present on each slide for pSMAD2 (stroma reaction and native acinar pancreatic tissue). pSMAD2 nuclear staining was reviewed by two pathologists including one expert in pancreatic diseases, blinded to the morphological data. pSMAD2 status was considered to be high or low in comparison with fibroblastic cells and acinar pancreatic tissue when the expression was at least equal to or less intense than the controls, respectively.

Ethics

Human data were obtained from a certified database (MR004 certification no. 19-088), having received a favorable review from the Committee for the protection of persons (CPP) of the Hospices Civils de Lyon (no. 19-109).

Genetic analyses

For copy number variation analysis (CNV), copy number abnormalities were assessed in the three Schwann cell lines using a high resolution Cytoscan HD single-nucleotide polymorphism array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). The hybridization, amplification and labeling protocols were performed according to the manufacturer's recommendations (Affymetrix).

For Next Generation Sequencing (NGS), the Illumina MiSeq technology was used for *NF1* mutation screening, alongside the AmpliSeq for Illumina Library Prep (Illumina) for library construction. Paired-end sequencing was performed on the Illumina MiSeq (Illumina) using 300 cycle (MiSeq Reagent Nano v2) kit format. Raw signal data

were analyzed using in-house bioinformatics pipeline and visualized with the Integrative Genomics Viewer (IGV).

Results

Schwann cells induce TGF β -dependent migration of pancreatic cancer cells

We first investigated whether Schwann cells could stimulate the motility of pancreatic cancer cells. To achieve this, we performed 3D migration assays to evaluate the orientated migration of Capan-2 pancreatic cancer cells towards sNF96.2 Schwann cells. Capan-2 cells were cultured in a 3D extracellular matrix (ECM) gel drop connected by an ECM gel bridge either to an sNF96.2 cell-containing gel drop or to an empty gel drop (Fig. 1a). Under these conditions, the two cell lines were distinguishable by their shape, Capan-2 cells exhibiting a spherical morphology, while sNF96.2 cells were elongated (Fig. S1). In the presence of sNF96.2 cells, Capan-2 cells clearly migrated further, they entered the ECM gel bridge after 7 days of co-culture with sNF96.2, and had totally invaded the ECM gel after 15 days. Conversely, in the absence of sNF96.2 cells, Capan-2 cells hardly migrated. Of note, sNF96.2 cells also presented unchanged inherent motility properties both in the absence of Capan-2 cells (Fig. S2). We then assessed whether this sNF96.2-induced effect was TGF β -dependent, and showed that SB-431542, a potent cell-permeable and selective inhibitor of the TGF β type I-receptor (T β RI), abrogated Capan-2 cancer cell migration towards sNF96.2 cells (Fig. 1a).

Next, using a transwell migration assay (Boyden chamber assay) (Fig. 1b), we observed a significant increase in the migration of Capan-2 cells (upper chamber) co-cultured with sNF96.2 cells (lower chamber) rather than with Capan-2 cells (fold change: 18.85). We then confirmed that Capan-2 cell migration was TGF β -dependent, as the addition of SB-431542 significantly decreased their migration towards sNF96.2 cells (fold change: 8.45) in co-culture experiments (Fig. 1b). As a control, we observed that TGF β added to the Capan-2 culture induced the migration of these cells, which was compromised by SB-431542 (Fig. S3a).

In addition, fluorescent detection of cytoskeletal actin (Fig. 1c) revealed that Capan-2 cells co-cultured with sNF96.2 cells (i.e., sNF96.2/Capan-2 condition) acquired an elongated shape, displaying actin reorganization compared to the control condition (i.e., Capan-2/Capan-2 condition), in which Capan-2 cells formed compact and cohesive colonies. This plasticity in the shape of Capan-2 cells, enhanced by the co-culture with sNF96.2 cells, was lost upon exposure to SB-431542 (Fig. 1c).

sNF96.2 cells are derived from a patient with type 1 neurofibromatosis (NF1). It is widely recognized that neurofibroma development in NF1 depends on a somatic *NF1* mutation in a Schwann cell, rendering the cell

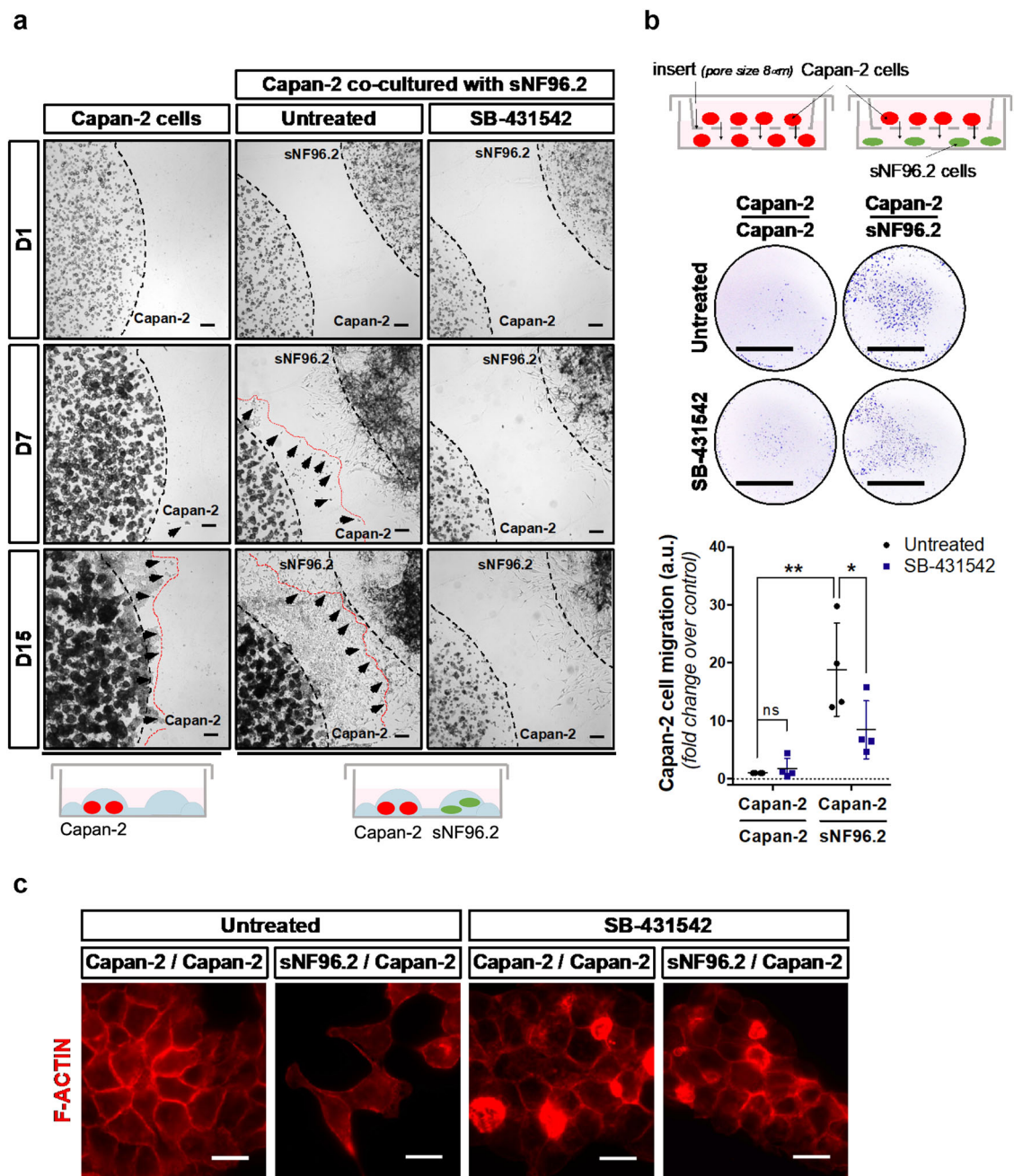


Fig. 1 sNF96.2 Schwann cells promote TGF β -dependent motility of Capan-2 pancreatic cancer cells. **a** Three-dimensional motility assay of Capan-2 cells cultured in matrigel drops alone or in combination with sNF96.2 cells (see schematic diagram below the right field panels), treated or not with TGF β type I-receptor (T β RI) inhibitor SB-431542 for 15 days. The black dotted lines indicate the cell localization at the beginning of the experiment. The red dotted lines and the black arrows represent the Capan-2 cell migration front. Bright field images at days 1 (D1), 7 (D7) and 15 (D15) are representative of one experiment performed three times. Scale bars, 200 μ m. **b** Boyden chamber migration assay of Capan-2 cells cultured for 72 h alone (Capan-2/Capan-2 condition) or with sNF96.2 cells (Capan-2/sNF96.2 condition), treated or not with SB-431542, and stained with a 0.1% Crystal violet solution. For each condition, an image from one experiment representative of four independent experiments is shown (left panel) and Capan-2 cells migration quantification is represented as mean $\pm$ SD (right panel, $n = 4$ independent experiments, $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; ns: not significant). Scale bars, 0.5 cm. **c** Direct fluorescence detection of cytoskeletal F-ACTIN by phalloidin-TRITC staining (red) in Capan-2 cells cultured for 24 h, alone (Capan-2/Capan-2 condition) or with sNF96.2 cells (sNF96.2/Capan-2 condition) and treated or not with SB-431542. Representative areas of the images (white frames) are enlarged in the upper right-hand corner of each image. Scale bars, 15 μ m.

deficient in *NF1*-encoded tumor suppressor protein neurofibromin function. *NF1*-null peripheral nerve sheath tumors have been demonstrated to express elevated levels of TGF β ⁴⁰. Loss of *NF1* was also reported to increase TGF β expression in mastocysts⁴¹. Furthermore, mouse *Nf1*^{-/-} nerves contain increased levels of TGF β ⁴². Whether the loss of *NF1* is actually driving TGF β secretion in sNF96.2 cells is unknown. Since sNF96.2 cells have been reported to be mutated for *NF1*, we designed experiments using two other types of Schwann cells not previously reported to be mutated for *NF1*, namely HSwC (human primary Schwann cells isolated from human spinal nerve) and ipn02.3 2 λ (immortalized patient derived plexiform neurofibroma Schwann cells). We first determined the genetic status of these cells. Copy number variation (CNV) and next generation sequencing (NGS) analyses showed that HSwC and ipn02.3 2 λ display an unmutated status for *NF1* (Fig. S4). Conversely, and as expected from the literature, sNF96.2 cells presented an allele deleted for *NF1* and a mutation on the other allele (Fig. S4). We further observed using a transwell migration assay, a significant increase in the migration of Capan-2 cells (upper chamber) co-cultured with HSwC and ipn02.3 2 λ cells (lower chamber) rather than with Capan-2 cells in the same proportion to that observed with sNF96.2 cells (Fig. S5a). In all co-culture conditions, migration was compromised by SB-431542 treatment. These results indicate that the TGF β -dependent increase in migration of Capan-2 cells cultured in the presence of sNF96.2 cells does not result from the loss of *NF1*.

Collectively, these results demonstrate that sNF96.2 cells promote the motility and reshaping of Capan-2 cells through a TGF β -dependent mechanism.

Schwann cells activate the TGF β -SMAD signaling pathway in Capan-2 cancer cells

To test the hypothesis that sNF96.2 cells represent a source of TGF β , we performed ELISA tests, measuring the amounts of TGF β secreted into the conditioned medium (CM) of both Capan-2 cells and Schwann cells. sNF96.2 cells secreted significantly higher amounts of TGF β 1 compared to Capan-2 cells (sNF96.2 CM ~850 pg/mL vs. Capan-2 CM ~50 pg/mL) (Fig. 2a). We also observed that *NF1*-positive HSwC and ipn02.3 2 λ cells secreted higher amounts of TGF β (Fig. S5b). TGF β is a secreted polypeptide that belongs to a large family encompassing cytokines and growth factors including TGF β s, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) and Activins. TGF β signals through heterodimeric serine/threonine-kinase receptor complexes, constituted of T β RII and T β RI proteins^{43,44}. After binding to its receptor complex, TGF β induces the phosphorylation of T β RI, which phosphorylates SMAD2 and SMAD3 proteins in their C-terminal regions (P-SMAD2/3), leading to their

interaction with the SMAD4 protein. P-SMAD2/3-SMAD4 complexes accumulate within the nucleus, bind to DNA and enhance the transcription of target genes. We thus investigated whether this TGF β -enriched CM from sNF96.2 cells could promote TGF β -SMAD signaling pathway activation in Capan-2 cells. We performed Western blot experiments, which revealed a clear increase in the phosphorylated form of SMAD2 in Capan-2 cells treated for 1 h or 2 h with sNF96.2 CM (Fig. 2b), as well as a complete impairment in SMAD2 phosphorylation in the presence of SB-431542. Finally, we showed by immunofluorescence a significant nuclear accumulation of SMAD2 in Capan-2 cells co-cultured with sNF96.2 cells (Fig. 2c).

Altogether, these results highlight that sNF96.2 cells secrete TGF β , leading to the activation of the SMAD signaling pathway in Capan-2 cells.

Conditioned medium from Schwann cells is sufficient to induce pancreatic cancer cell migration

To test whether factors, including TGF β , secreted by Schwann cells were sufficient to enhance the migration of Capan-2 cells, we performed Capan-2 cell migration assays in Boyden chambers, using either conditioned medium from sNF96.2 (sNF96.2 CM) or Capan-2 (Capan-2 CM) cells in the lower compartment (Fig. 3a). We observed that CM from Capan-2 cells used as a control, had no significant effect, whereas CM from sNF96.2 cells significantly stimulated Capan-2 cell migration (fold change: 8.85). In addition, we observed that TGF β -signaling inhibition by SB-431542 significantly abrogated this effect (fold change: 1.95). Wound healing assays further confirmed the ability of sNF96.2 CM to promote Capan-2 cell migration (24 h wound closure, sNF96.2 CM: 56.48% vs. Capan-2 CM: 25.35%), as well as the involvement of TGF β activation in this process as demonstrated by the significant decrease in the sNF96.2 CM-induced effect, upon exposure to SB-431542 (24 h wound closure, sNF96.2 CM + SB-431542: 28.73% vs. sNF96.2 CM: 56.48%) (Fig. 3b). As a control, we validated the ability of SB-431542 to abrogate TGF β -enhanced wound closure in Capan-2 cells (Fig. S3b). This result was validated using CM from *NF1*-positive HSwC and ipn02.3 2 λ cells that also induced TGF β -dependent migration of Capan-2 cells (Fig. S5c). These data reveal that conditioned medium from sNF96.2 cells is sufficient to promote the migration of Capan-2 cells in a TGF β -dependent manner.

We next sought to characterize the cancer cell phenotype associated with Schwann cell-mediated migratory functions. We generated a stable Capan-2 cell line expressing the mKate nuclear Red Fluorescent Protein (*i.e.* Capan-2-nRFP⁺ cells). Using fluorescent live cell imaging (Incucyte® system), we observed that, in

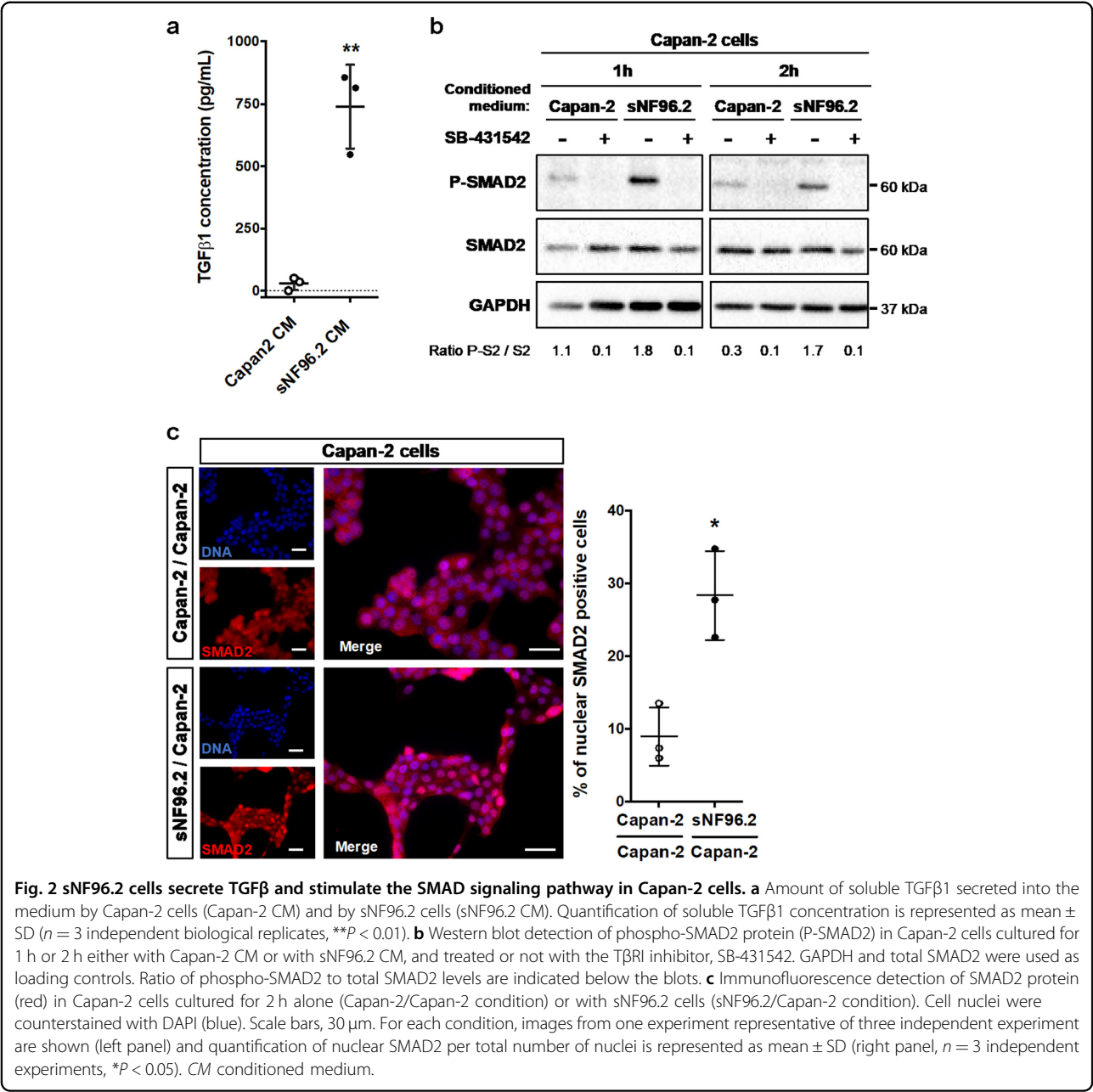
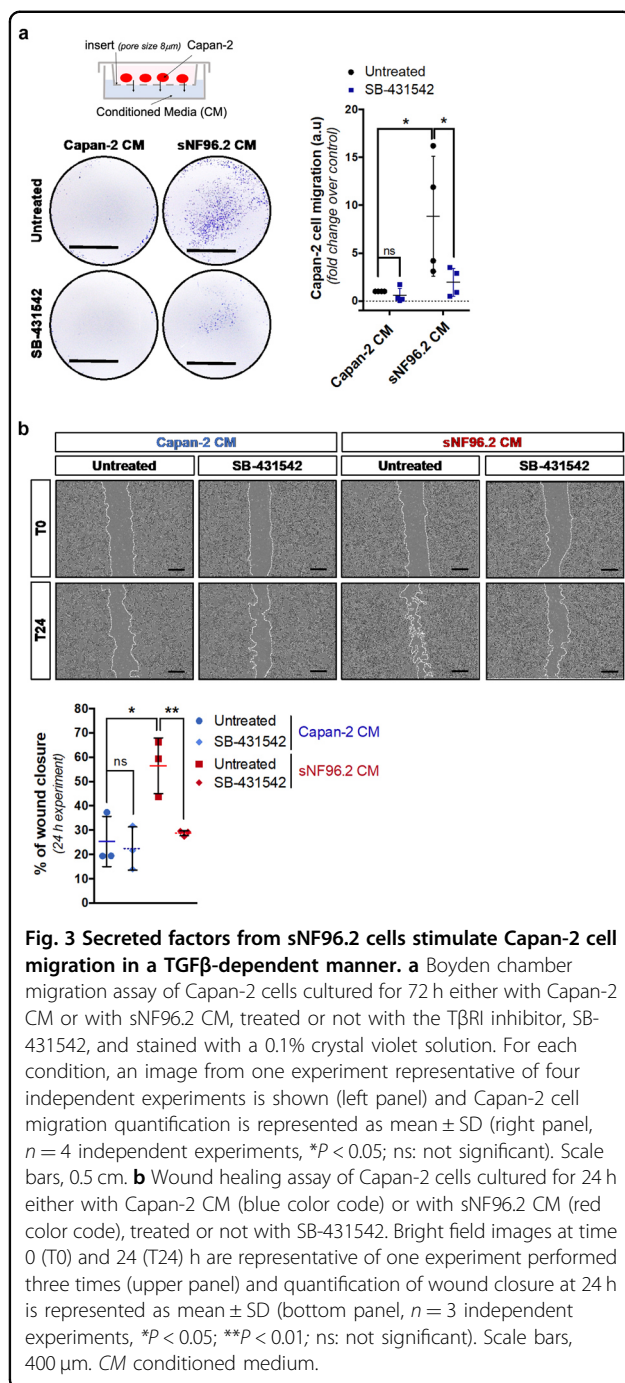


Fig. 2 sNF96.2 cells secrete TGFβ and stimulate the SMAD signaling pathway in Capan-2 cells. **a** Amount of soluble TGFβ1 secreted into the medium by Capan-2 cells (Capan-2 CM) and by sNF96.2 cells (sNF96.2 CM). Quantification of soluble TGFβ1 concentration is represented as mean ± SD ($n = 3$ independent biological replicates, $**P < 0.01$). **b** Western blot detection of phospho-SMAD2 protein (P-SMAD2) in Capan-2 cells cultured for 1 h or 2 h either with Capan-2 CM or with sNF96.2 CM, and treated or not with the TβRI inhibitor, SB-431542. GAPDH and total SMAD2 were used as loading controls. Ratio of phospho-SMAD2 to total SMAD2 levels are indicated below the blots. **c** Immunofluorescence detection of SMAD2 protein (red) in Capan-2 cells cultured for 2 h alone (Capan-2/Capan-2 condition) or with sNF96.2 cells (sNF96.2/Capan-2 condition). Cell nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bars, 30 μm. For each condition, images from one experiment representative of three independent experiment are shown (left panel) and quantification of nuclear SMAD2 per total number of nuclei is represented as mean ± SD (right panel, $n = 3$ independent experiments, $*P < 0.05$). CM conditioned medium.

comparison with control Capan-2 CM, sNF96.2 CM enhanced Capan-2-nRFP⁺ cell spreading and dispersion (Fig. 4a). Indeed, the Capan-2 cells treated with sNF96.2 CM, grew as individualized and non-cohesive cells, exhibiting an elongated shape as initially observed in co-culture experiments (Fig. 1c). Once again, the addition of SB-431542 decreased this sNF96.2 cell-induced effect, supporting the active role of TGFβ in the regulation of Capan-2 cell behavior (Fig. 4a). We also observed that proliferative properties of Capan-2 cells were unchanged in both conditions (with sNF96.2 CM or with Capan-2 CM) (Fig. 4b), ruling out the possibility that the increased

dispersion of the Capan-2-nRFP⁺ cells treated with the sNF96.2 CM resulted from an increased number of cells. Hence, these results demonstrate that Capan-2 cells undergo a TGFβ-dependent cell-shape remodeling in response to factors secreted by Schwann cells. In order to better characterize these morphological changes, we analyzed two cell–cell junction markers, β-CATENIN and F-ACTIN, in Capan-2 cells subjected to wound healing assays in the presence of sNF96.2 CM (Fig. 4c). We observed that sNF96.2 CM induces a decrease in β-CATENIN and F-ACTIN membrane staining in Capan-2 cells which were at the edge of the wound, illustrating a



reduction in their cell–cell cohesion. Furthermore, addition of SB-431542 was correlated with a better conservation of these membrane markers, validating the involvement of TGF β in this sNF96.2 CM-induced effect. We obtained similar results in co-culture experiments (β -CATENIN and E-CADHERIN relocalization) (Fig. S6), reinforcing our previous observation with F-ACTIN (Fig. 1c), and confirming that Capan-2 cell dispersion is promoted by Schwann cells.

Hence, the TGF β -dependent migratory properties bestowed to Capan-2 cells by Schwann cells are associated with impaired cell–cell junctions.

Schwann cells stimulate the oncogenic potential of pancreatic cancer cells

Since such migratory properties are associated with aggressive tumor cells, we wondered whether this modulation of cellular behavior, induced by Schwann cells, was correlated with increased tumorigenesis of pancreatic cancer cells. We first investigated the invasive properties of Capan-2 cells, as a feature of their tumorigenic potential. Capan-2 cells displayed a greater ability to migrate and invade the ECM gel in a transwell assay when co-cultured with sNF96.2 cells rather than Capan-2 cells (fold change: 16.66) (Fig. 5a). Furthermore, the addition of SB-431542 induced a five-fold decrease in the invasive abilities of Capan-2 cells (fold change: 3.38). Of note, we also showed the ability of SB-431542 to abrogate TGF β -enhanced invasive abilities of Capan-2 cells (Fig. S7). These observations demonstrate that Schwann cells stimulate TGF β -dependent invasion of pancreatic cancer cells.

In order to determine whether conditioned medium from sNF96.2 cells modulates Capan-2 cell survival, another hallmark of aggressive cancer cells, we performed 2D colony formation assays over an 11-day experimental time course. We observed that CM from sNF96.2 cells supports the survival of Capan-2 cells seeded at a low density with a two-fold increase in the final colony area (fold change vs. control: 2.22). Moreover, colony formation in the presence of both CM from Capan-2 and sNF96.2 cells, was blocked after the addition of SB-431542 (fold change, Capan-2 CM + SB-431542: 0.2; sNF96.2 CM + SB-431542: 0.1) (Fig. 5b). Finally, using soft agar assays we observed an increase in the ability of Capan-2 cells to grow as anchorage-independent colonies when treated with sNF96.2 CM (compared to Capan-2 CM) for 3 weeks (fold change: 1.98), highlighting their oncogenic potential (Fig. 5c). This effect was reduced by adding the T β RI inhibitor (fold change vs. control: 0.7). These results thus indicate the *in vitro* ability of Schwann cells to enhance invasive properties of Capan-2 cells, as well as their ability to survive and grow as transformed cells.

We next explored TGF β signaling activation in 320 moderately differentiated human PDAC tumors (Supplementary data 1). We analyzed by IHC the pSMAD2 expression (used as a readout of TGF β signaling activation) and explored the relationship between tumor cells and nerves. *In vivo*, pathologists define the perineural invasion as the penetration of tumor cells within nerve sheaths. Inversely, when no perineural invasion occurs, tumor cells remain at a distance from nerves (Fig. 6a upper right-hand panel). Our analysis revealed two

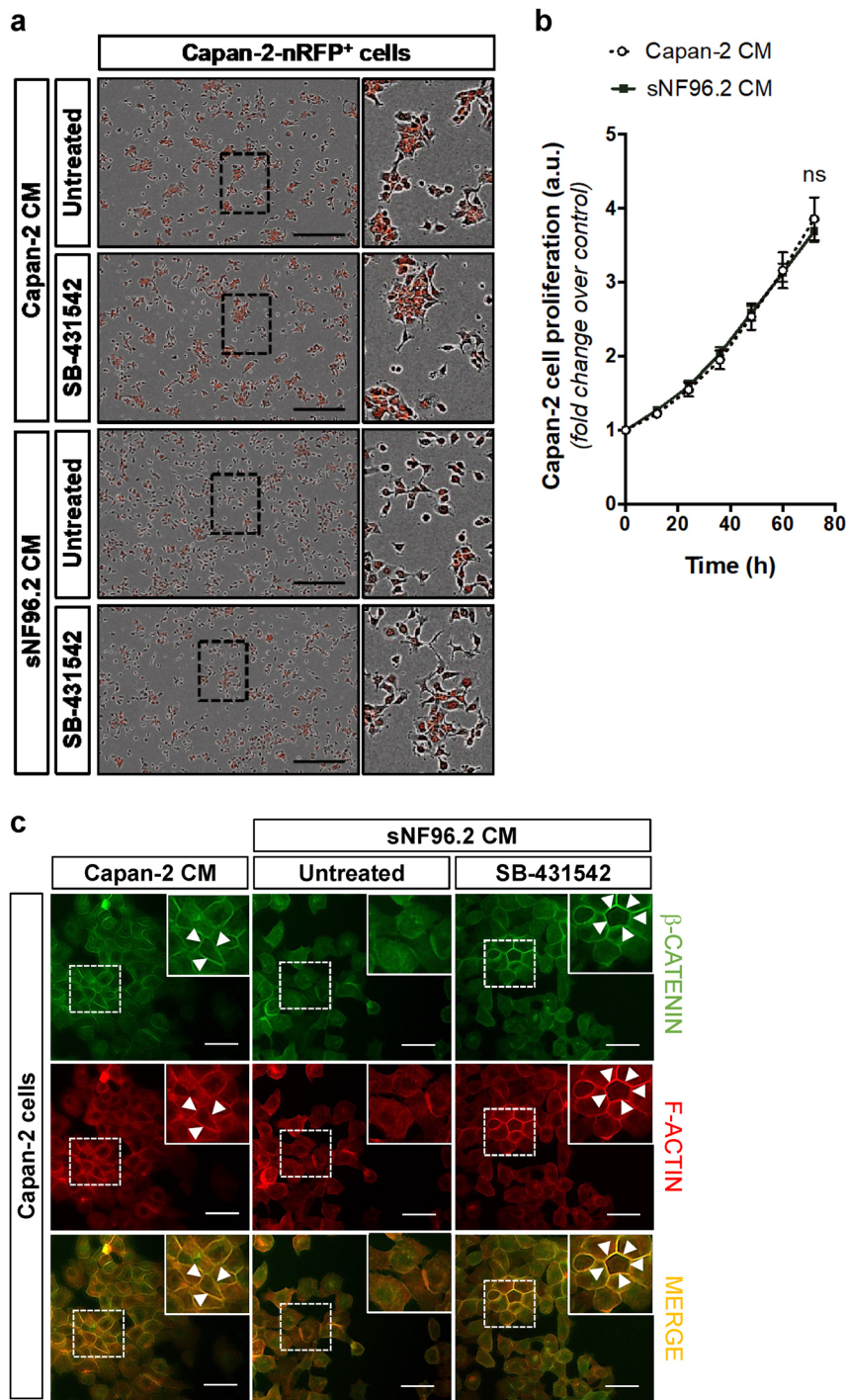


Fig. 4 Secreted factors from sNF96.2 cells modulate Capan-2 cell-cell interactions in a TGFβ-dependent manner. **a** Images of fluorescent Capan-2-nRFP⁺ cells cultured for 48 h either with Capan-2 CM or with sNF96.2 CM, and treated or not with SB-431542 TβRI inhibitor (IncuCyte™ Zoom imaging system). The black frames show representative areas of Capan-2 cells enlarged in the right-hand side of each image. Scale bars, 400 μm. **b** Proliferation assay of Capan-2-nRFP⁺ cells cultured for 72 h either with Capan-2 CM (white dot) or with sNF96.2 CM (black square) (automated live cell time-lapse counting using an IncuCyte™ Zoom imaging system). Quantification of Capan-2 cell proliferation is represented as mean ± SD (*n* = 3 independent experiments, significance is shown for the 72-h timepoint, ns: not significant). **c** Immunofluorescence detection of F-ACTIN (red) and β-CATENIN (green) proteins in Capan-2 cells located at the migratory front in a wound healing assay after 24 h, cultured either with Capan-2 CM or with sNF96.2 CM and treated or not with SB-431542. The white frames show representative areas that are enlarged in the upper right-hand corner of each image. White arrowheads in the insets show the plasmic membrane. Scale bars, 15 μm. CM conditioned medium.

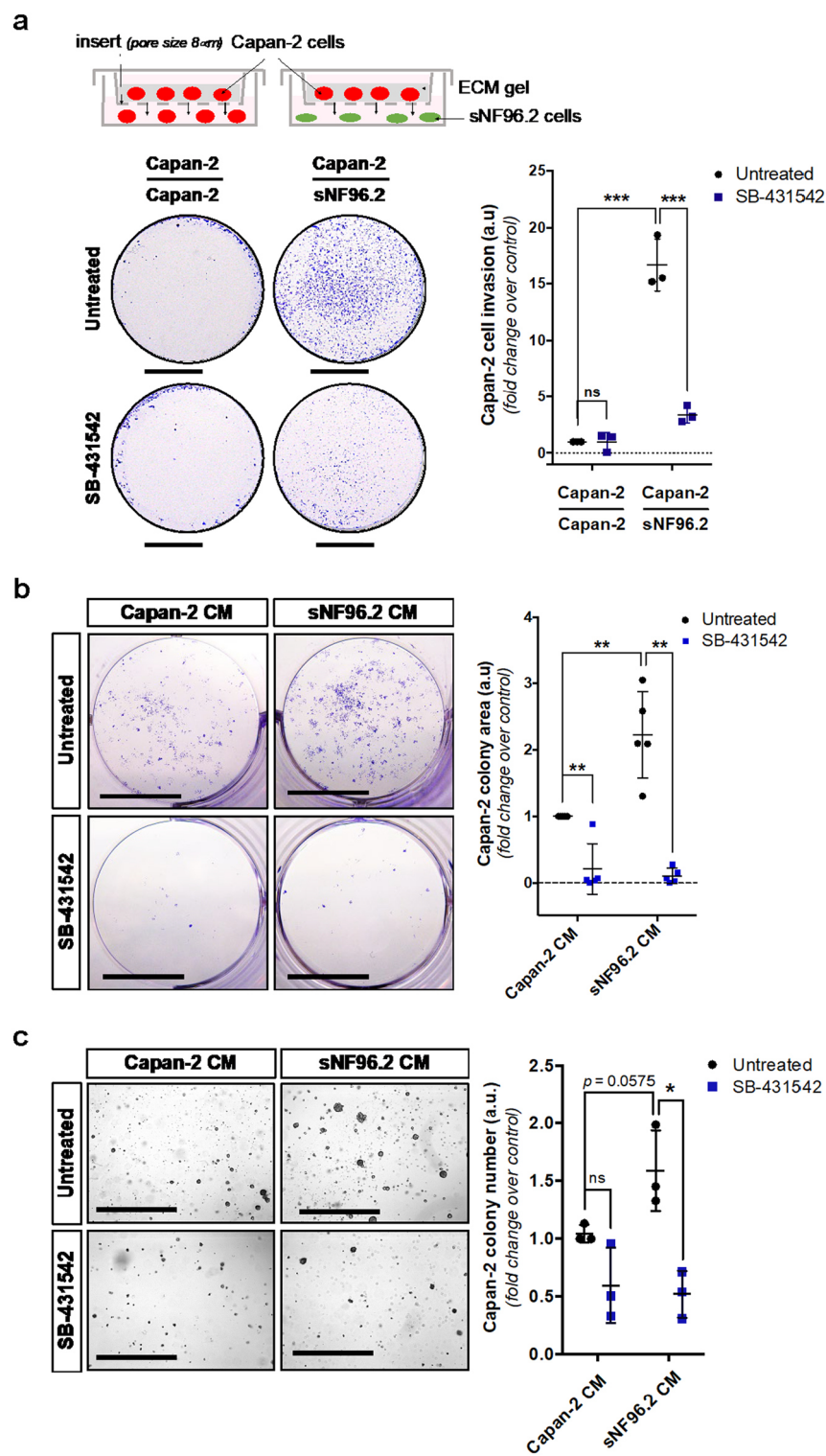


Fig. 5 (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

Fig. 5 sNF96.2 cells promote TGFβ-dependent oncogenic properties of Capan-2 cells. **a** Boyden chamber invasion assay in matrigel of Capan-2 cells cultured for 72 h alone (Capan-2/Capan-2 condition) or with sNF96.2 cells (Capan-2/sNF96.2 condition), treated or not with the TβRI inhibitor, SB-431542, and stained with a 0.1% crystal violet solution. For each condition, an image from one experiment representative of three independent experiments is shown (left panel) and Capan-2 cell invasion quantification is represented as mean ± SD (right panel, *n* = 3 independent experiments, ****P* < 0.001; ns: not significant). Scale bars, 0.5 cm. **b** Two-dimensional clonogenic survival assay of Capan-2 cells seeded at low density and cultured for 11 days either with Capan-2 CM or with sNF96.2 CM, treated or not with SB-431542 and stained with a 0.1% crystal violet solution. For each condition, an image from one experiment representative of five independent experiments is shown (left panel) and Capan-2 colony area quantification is represented as mean ± SD (right panel, *n* = 5 independent experiments, ***P* < 0.01). Scale bars, 0.5 cm. **c** Anchorage-independent cell proliferation by soft agar assay of Capan-2 cells cultured for 3 weeks either with Capan-2 CM or with sNF96.2 CM and treated or not with SB-431542. For each condition, an image from one experiment representative of three independent experiments is shown (left panel) and Capan-2 colony number quantification is represented as mean ± SD (right panel, *n* = 3 independent experiment, **P* < 0.05; ns: not significant). *CM* conditioned medium. Scale bars, 0.1 cm.

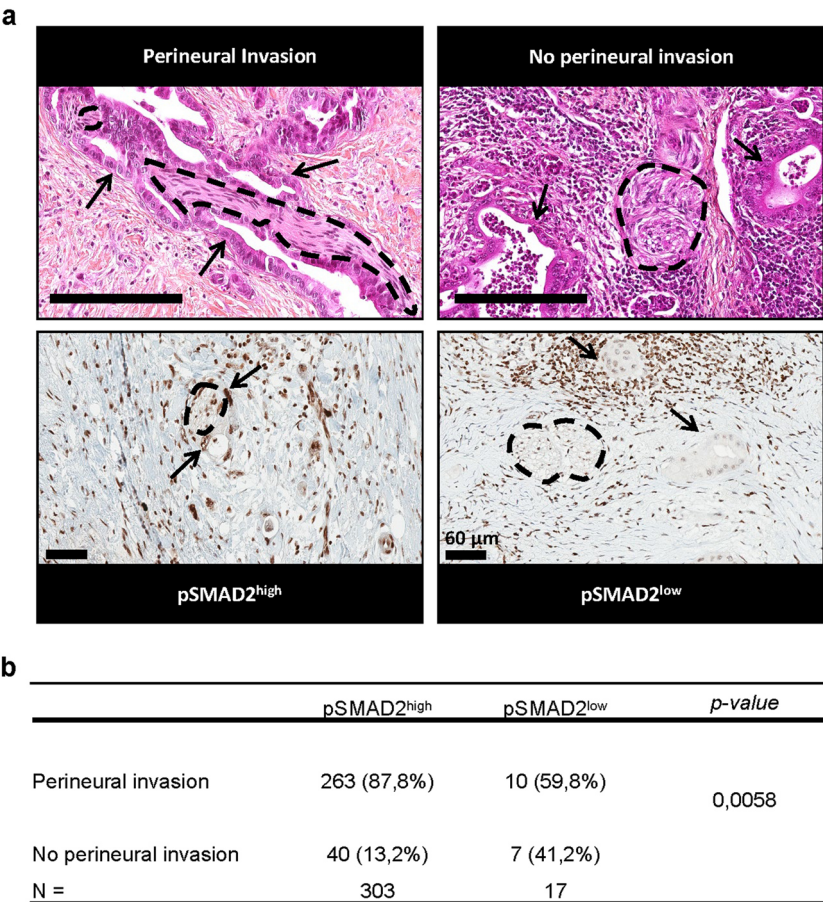


Fig. 6 pSMAD2 expression in human moderately differentiated PDAC and its association with perineural invasion. **a** Hematoxylin and eosin (top images; scale bars, 200 μm) and pSMAD2 immuno histochemistry (bottom images; scale bars, 60 μm) of a representative patient with perineural invasion and a patient with no perineural invasion. Nerves are highlighted with dotted lines and tumor cells with arrows. **b** Distribution of tumors depending on the presence of perineural invasion and the pSMAD2 level.

pSMAD2 expression patterns (Fig. 6a lower panels): pSMAD2^{high}, corresponding to a staining intensity at least equal or superior to that of the surrounding stromal and acinar cells; pSMAD2^{low}, corresponding to a staining intensity less intense than that of the surrounding stromal

and acinar cells. Among the 320 PDAC samples, 303 were identified as pSMAD2^{high}, and 17 as pSMAD2^{low} (Fig. 6b). Importantly, we found a significant statistical association between the presence of perineural invasion and the pSMAD2^{high} status (Fig. 6b; *P* = 0.0058). This result

strongly suggests that high activation of the SMAD TGF β -signaling pathway is positively correlated with perineural invasion in PDAC.

Identification of secreted proteins involved in pancreatic cancer cell motility by mass spectrometry

In our effort to obtain a comprehensive picture of the signaling networks between pancreatic cancer cells and Schwann cells, we then determined the proteomic profiles of secretomes from Capan-2 and sNF96.2 cells, cultured alone or in combination (Capan-2 CM, sNF96.2 CM and sNF96.2/Capan-2 CM). Three biological CM replicates were produced and were further analyzed using a label-free quantitative (LFQ) workflow, in three technical replicates (Fig. S8). Raw data were processed with Proteome Discover 2.2, a false discovery rate (FDR) of less than 1% was applied, and a group of 39 proteins close to the detection limit was excluded, allowing the final identification of 1,380 proteins secreted by Capan-2 and sNF96.2 cells cultured alone or in combination (Supplementary data 2). Of these, 1,230, 1,342 and 1,306 were identified in Capan-2 CM, sNF96.2 CM, or Capan-2 /sNF96.2 co-culture CM, respectively (Fig. 7a; Supplementary data 2). A group of 1,178 proteins was secreted in all CM, whereas 7 and 53 proteins were exclusively found in Capan-2 and sNF96.2 CM samples, respectively. No proteins were exclusively found in sNF96.2/Capan-2 CM. Regarding their relative LFQ abundance, the three secretomes exhibited distinct profiles. Indeed, principal component analysis (Fig. 7b) and hierarchical clustering (Fig. 7c) revealed that biological and technical replicates of each CM clustered together and distinctly from other CM. We then examined the relative abundance of TGF β family members identified within the three secretomes. Of note, the TGF β -induced protein (TGF β I), the latent forms of the three TGF β isoforms (LTBP1, LTBP2 and LTBP3), and the active form of TGF β 1 were more abundant in CM from sNF96.2 cells and from co-cultures, in comparison with CM from Capan-2 cells alone, as illustrated in the hierarchical clustering heatmap (Fig. 7d). Altogether, these mass spectrometry results reveal that Capan-2 and sNF96.2 cells, cultured alone or in combination exhibit distinct secretome patterns.

In order to better understand the effects of Schwann cells on Capan-2 cells, we identified 156 and 128 differentially enriched proteins (fold change > 2; adjusted p -value < 0.05) in sNF96.2 CM and sNF96.2/Capan-2 co-culture CM, compared to Capan-2 CM (Fig. 8a; Supplementary data 3). Of these, 54 were specific to sNF96.2 CM, 26 to sNF96.2/Capan-2 CM compared to Capan-2 CM, and 102 were common to secretomes from both sNF96.2 cells and sNF96.2/Capan-2 co-cultures. These groups of enriched secreted factors (i.e., 156 and 128 enriched proteins groups) were further subjected to gene ontology (GO) enrichment analysis (Supplementary data

4). We observed that the proteins upregulated in CM from sNF96.2 cells were involved in cell motility biological processes, including positive regulation of locomotion, regulation of cellular component and regulation of cell motility (Fig. 8b; Supplementary data 4). Interestingly, these cell motility features were also found in CM from sNF96.2/Capan-2 co-culture, along with cell adhesion and extracellular matrix organization processes (Fig. 8c; Supplementary Data 4). We then isolated a group of 47 proteins overrepresented in sNF96.2 and sNF96.2/Capan-2 co-culture secretomes, compared to Capan-2 CM, which were associated with cell motility mechanisms (i.e. “motility” GO group) and regulation of cell adhesion properties (i.e. “adhesion” and “ECM” GO groups; Fig. 8d). Hence, these results demonstrate that Schwann cells are a source of numerous proteins involved in both cell motility mechanisms and regulation of cell adhesion properties, further strengthening our previous *in vitro* data. To gain further insight into the integrated protein-protein interactions of these Schwann cell-secreted signaling proteins, we next established a protein interaction network using the STRING database (Fig. 8e). Of note, in order to demonstrate the important involvement of TGF β signaling within this predicted network, the TGF β 1 factor was added to the 47 previously identified proteins. As such, we identified a total of 63 protein-protein predicted functional associations between 33 assessed proteins, including the TGF β 1 cytokine (protein-protein interaction enrichment p -value < $1.0e^{-16}$). Results highlighted that these proteins were highly inter-connected, and that the TGF β 1 factor exhibited four potential interactions with SERPINE1, FN1, MMP2, and ACTN1 proteins.

Altogether, these data reveal that TGF β may be connected to the protein network identified as a motility/adhesion pattern resulting from the dialog between Schwann cells and pancreatic cancer cells.

Discussion

Pancreatic cancer-associated neural remodeling (PANR) is a hallmark of PDAC involved in neuropathic pain, cancer cell dissemination, and local relapse after surgery^{9,14}. Identification of molecular factors responsible for PANR represents a major challenge for patient management. Neuroplastic changes occurring during PDAC development are controlled by a multi-directional dialog between cancer cells, nerves and Schwann cells, and other stromal cells. The molecular bases of this intercellular communication network remain largely unknown. In particular, our understanding of the impact of Schwann cells on tumor cells is very poor. In the present study, we demonstrated that sNF96.2 Schwann cells have the ability to enhance aggressiveness of Capan-2 cancer cells (migration, invasion and tumorigenicity) through TGF β signaling. Indeed, we showed that these effects relied on

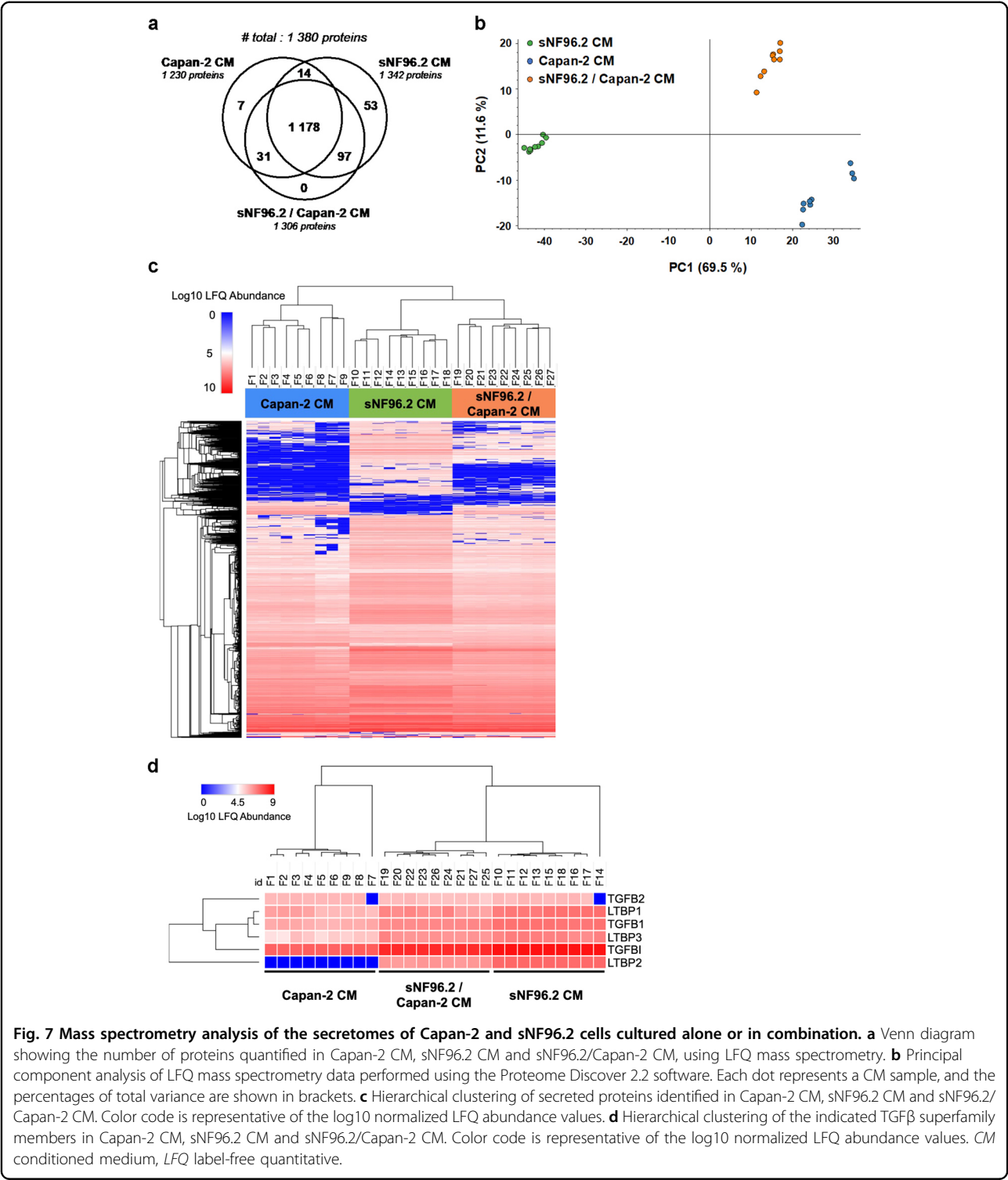


Fig. 7 Mass spectrometry analysis of the secretomes of Capan-2 and sNF96.2 cells cultured alone or in combination. **a** Venn diagram showing the number of proteins quantified in Capan-2 CM, sNF96.2 CM and sNF96.2/Capan-2 CM, using LFQ mass spectrometry. **b** Principal component analysis of LFQ mass spectrometry data performed using the Proteome Discover 2.2 software. Each dot represents a CM sample, and the percentages of total variance are shown in brackets. **c** Hierarchical clustering of secreted proteins identified in Capan-2 CM, sNF96.2 CM and sNF96.2/Capan-2 CM. Color code is representative of the log10 normalized LFQ abundance values. **d** Hierarchical clustering of the indicated TGFβ superfamily members in Capan-2 CM, sNF96.2 CM and sNF96.2/Capan-2 CM. Color code is representative of the log10 normalized LFQ abundance values. CM conditioned medium, LFQ label-free quantitative.

the activation of the TGFβ-SMAD signaling pathway in cancer cells. We analyzed a set of 320 human PDAC samples by IHC, and reported that high levels of pSMAD2 (an effector downstream of TGFβ) were positively correlated with perineural invasion. More specifically, we

showed by mass spectrometry that Schwann cells were a source of various secreted factors (including the TGFβ) involved in cell plasticity, migration, ECM remodeling, and potentially in the PNI process. Our results are summarized in the model presented in Fig. S9.

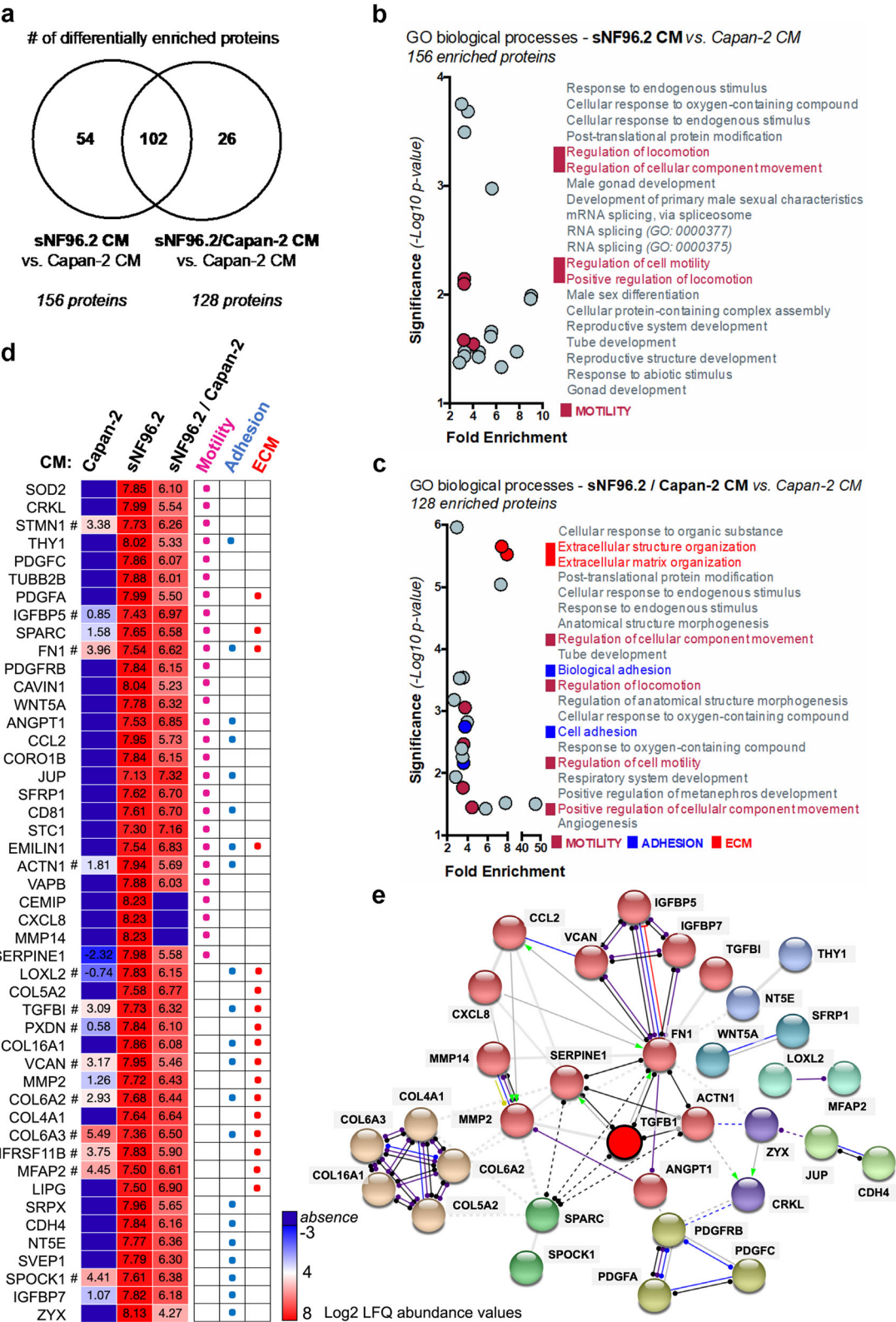


Fig. 8 (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

Fig. 8 Biological processes correlated with proteins more abundant in conditioned medium of sNF96.2 cells and Capan-2 cells cultured alone or in combination. **a** Venn diagram showing the number of significantly differentially enriched proteins quantified (fold change >2; adjusted *p*-value < 0.05) in sNF96.2 CM and sNF96.2/Capan-2 CM compared to Capan-2 CM. **b, c** GO enrichment analysis of differentially secreted proteins in sNF96.2 CM (156 proteins) and in sNF96.2/Capan-2 CM (128 proteins), compared to Capan-2 CM. The figures show the top 20 GO biological processes grouped by enrichment (>2-fold) and *p*-value (<0.05). Motility, adhesion and ECM related-groups are represented in different colors. **d** Heatmap depicting the abundance levels (log10 normalized LFQ abundance values) of 47 individual proteins identified within motility, adhesion and ECM related-GO biological processes, in the three sNF96.2, Capan-2 and sNF96.2/Capan-2 CM. # are representative of a non-significant difference between sNF96.2 CM and Capan-2 CM. **e** Protein–protein predicted functional associations between 33 proteins enriched in sNF96.2 CM and sNF96.2/Capan-2 CM compared to Capan-2 CM and associated with motility, adhesion and ECM GO groups, are represented by a protein-protein network graph (STRING database analysis). The protein network is separated into 9 clusters (see node colors), in which inter-cluster edges are represented as dashed lines. Inter-node edges are representative both of types of action (color code: red, inhibition; blue, binding; purple, catalysis; black, reaction; green, activation; yellow, transcriptional regulation; gray, unspecified) and effects (unspecified, positive or negative) for predicted interactions between proteins. CM conditioned medium, ECM extracellular matrix, GO gene ontology, STRING search tool for the retrieval of interacting genes/proteins.

TGF β is a pleiotropic cytokine implicated in wound healing, fibrosis, ECM remodeling, immune response and transformation^{45,46}. TGF β has a dual role in cancer acting either as a tumor suppressor or a tumor promoter^{24,47,48}. In a previous work, we demonstrated that TGF β pathway activation in pancreatic acinar cells facilitated PDAC initiation through its capacity to induce acinar-to-ductal cell metaplasia, providing a favorable environment for KRAS^{G12D}-dependent carcinogenesis⁴⁹. In the present study, we show that Schwann cells foster Capan-2 pancreatic cancer cell aggressiveness through TGF β signaling, including increased migratory and invasive processes. We report that these TGF β -induced properties of Capan-2 cells were associated with defects in epithelial and cell–cell interaction markers such as F-ACTIN, β -CATENIN and E-CADHERIN, suggesting a mechanism of epithelial-to-mesenchymal transition, known as an oncogenic process induced by TGF β ^{50–52}. More generally, our results clearly demonstrate a stimulating effect of Schwann cells on PDAC cell plasticity not only to favor cancer cell migration and invasion but also to support the oncogenic properties of transformed cells such as their ability to form colonies in a harsh environment, as evidenced from survival assays and soft agar experiments. One could envision that in vivo, invaded nerves may constitute a niche for cancer cells owing to the presence of TGF β .

Hence, in an effort to understand more precisely the functional and molecular dialog between pancreatic cancer cells and Schwann cells, we performed an original experimental approach relying on the mass spectrometry characterization of secreted factors from PDAC cells (Capan-2) and Schwann cells (sNF96.2) cultured alone or in combination. The protein signatures we identify herein match molecular networks and biological processes associated with tumor progression. More specifically, we revealed that the secretome of Schwann cells was enriched in proteins involved in biological processes related to cellular motility. This observation can be interpreted by the ability of Schwann cells to secrete

factors that will potentially drive the migration of cancer cells.

We herein demonstrated that Schwann cells were a crucial driver of PDAC cancer cell aggressiveness in vitro. In our model, we used sNF96.2 Schwann cells which spontaneously express high levels of TGF β . Previous studies reported that loss of NF1 could be responsible for increased TGF β secretion. We then used two NF1-positive schwann cells (HSwC and ipn02.3 2 λ). We observed that these two cell lines (co cultures or CM experiments) could induce the migration of cancer cells through a TGF β -dependent mechanism, and, that they were a major source of TGF β . These observations rule out the possibility that increased TGF β secretion that might occur in sNF96.2 cells result from the loss of NF1. How relevant these two cell models are to Schwann cells in the in vivo PDAC microenvironment remains to be evaluated. In an attempt to address this issue, we analyzed a set of 320 human PDAC samples by IHC, and reported that high levels of pSMAD2 were positively correlated with perineural invasion. This observation strengthened a causal role for TGF β in perineural invasion. However, we were unable to discriminate the exact member of the TGF β superfamily involved in vivo in SMAD signaling activation, since activin and GDNFs are also known to signal through SMAD2. Finally, whether or not Schwann cells are a significant source of TGF β in human PDAC tumors remains an open question.

Interestingly, the secretome of co-cultured Schwann cells/cancer cells, beyond its higher content in motility proteins, was also enriched in ECM proteins and adhesion molecules. Hence, it is interesting to note that these proteins are found in the stromal compartment in corroboration with previous studies. For instance, we identified proteins such as FN1, SPARC, VCAN, or WNT5A which were previously reported of poor prognosis in a PDAC stromal signature following microarray analyses on virtual microdissections⁵³. In addition, SPARC⁵⁴, SPOCK1⁵⁵ and FN1⁵⁶ proteins, are known to be positively correlated with

PDAC invasion and progression. Our screening revealed various collagens, a large family of ECM deposition proteins known to be aberrantly expressed in cancer, activated by TGF β ⁴⁷ and associated with metastasis and poor-prognosis in ovarian⁵⁷ and pancreatic cancer progression⁵⁸. Moreover, our STRING analysis revealed that TGF β 1 could strongly interact with MMP2, SERPIN1, FN1 et ACTN1 proteins. MMPs are matrix metalloproteinases that are involved in carcinogenesis and positively regulated by TGF β ⁵⁹. SERPIN1, also known as PAI-1, is the archetype of the SMAD-induced TGF β target genes and widely described as a marker of poor prognosis, positively involved in acquisition of aggressive properties in many tumors, including PDAC⁶⁰. FN1, a transcriptional target of TGF β ⁶¹ abundantly found in PDAC stroma, is a matrix glycoprotein that supports metastatic spread and chemoresistance⁶². Finally, ACTN1 expression can be induced by TGF β ⁶³ and was shown to impair E-cadherin-dependent cellular adhesion and is associated with poor prognosis in breast cancer⁶⁴. The proteomic analysis identified several potential factors that might be important in the crosstalk between cancer cells and Schwann cells, such as PDGFs (platelet-derived growth factor), IGFs (insulin-like growth factor-binding proteins) and CCL/CXCRs (chemokine receptors). These factors are largely documented for their role in cancer. It will be of particular interest to investigate in future studies their possible involvement in perineural invasion, as well as with their functional interaction with TGF β signaling.

In conclusion, our work demonstrates that Schwann cells, surrounding nerve fibers during PANR, have the capacity to foster cancer cell migration and survival through different factors including TGF β signaling. They may represent a protective and nurturing environment in vivo, promoting local relapse or distant metastases. This study paves the way for targeting new factors involved in PANR, the inhibition of which may be beneficial for improving patient quality of life and survival.

Acknowledgements

Laurent Bartholin's lab was granted funding from la Ligue nationale contre le cancer (comité de l'Ardèche and comité de l'Ain). We thank Adeline Page and Frédéric Delolme from the Protein Science Facility of the SFR Biosciences Lyon (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL) with the financial support of ITMO Cancer AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Sciences and Health) within the framework of the cancer program for the founding of the Orbitrap mass spectrometer. We thank Christophe Vanbelle from the cellular imaging facility at the CRCL for expert analyses in microscopy. We thank Valéry Attignon, Sandrine Boyault and Cancer Genomic Platform (Centre Léon Bérard, Lyon, France) for identifying *NF1* gene alteration. We thank Brigitte Manship for proofreading the manuscript. E.R. and A.B.C. were supported by a fellowship from the ministère de l'enseignement supérieur de la recherche et de l'innovation (MERI). V.C.R. was supported by a fellowship from the ligue nationale contre le cancer (LNCC). V.C. was supported by a fellowship from l'agence nationale pour la recherche (ANR).

Author details

¹Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon (CRCL), Lyon 69373, France. ²Hospices Civils de Lyon, Croix Rousse hospital, Claude-Bernard Lyon 1 University, Department of General Surgery & Liver Transplantation, Lyon, France. ³Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot hospital, Claude-Bernard Lyon 1 University, Department of General Surgery & Liver Transplantation, Lyon, France. ⁴Hospices Civils de Lyon Institute of Pathology EST, CRCL INSERM U1052, University Lyon 1, Lyon, France. ⁵Medical Oncology Department, Curie Institute, Versailles Saint-Quentin University, 35 rue Dailly, 92210 Saint Cloud, France. ⁶Département d'Oncologie Médicale, Centre Léon Bérard, Lyon 69008, France. ⁷Aix-Marseille Université, Institut Paoli-Calmettes, INSERM U1068, CNRS UMR 7258, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille, France. ⁸Present address: Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary Information accompanies this paper at (<https://doi.org/10.1038/s41419-019-2116-x>).

Received: 3 June 2019 Revised: 9 October 2019 Accepted: 5 November 2019

Published online: 25 November 2019

References

- Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* **68**, 7–30 (2018).
- Rahib, L. et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* **74**, 2913–2921 (2014).
- Ferlay, J., Partensky, C. & Bray, F. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta Oncol.* **55**, 1158–1160 (2016).
- Neuzillet, C. et al. State of the art and future directions of pancreatic ductal adenocarcinoma therapy. *Pharm. Ther.* **155**, 80–104 (2015).
- Apte, M. V. et al. Pancreatic cancer: The microenvironment needs attention too! *Pancreatol.* **15**(4 Suppl), S32–S38 (2015).
- Hilmi, M., Bartholin, L. & Neuzillet, C. Immune therapies in pancreatic ductal adenocarcinoma: where are we now? *World J. Gastroenterol.* **24**, 2137–2151 (2018).
- Neesse, A., Algul, H., Tuveson, D. A. & Gress, T. M. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm. *Gut* **64**, 1476–1484 (2015).
- Provenzano, P. P. et al. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* **21**, 418–429 (2012).
- Demir, I. E., Friess, H. & Ceyhan, G. O. Neural plasticity in pancreatitis and pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 649–659 (2015).
- Demir, I. E. et al. The microenvironment in chronic pancreatitis and pancreatic cancer induces neuronal plasticity. *Neurogastroenterol. Motil.* **22**, 480–490 (2010). e112–3.
- Wang, Q., Keutmann, H. T., Schneyer, A. L. & Sluss, P. M. Analysis of human follistatin structure: identification of two discontinuous N-terminal sequences coding for activin A binding and structural consequences of activin binding to native proteins. *Endocrinology* **141**, 3183–3193 (2000).
- Biankin, A. V. et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* **491**, 399–405 (2012).
- Ceyhan, G. O. et al. Pancreatic neuropathy results in “neural remodeling” and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am. J. Gastroenterol.* **104**, 2555–2565 (2009).
- Bapat, A. A., Hostetter, G., Von Hoff, D. D. & Han, H. Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 695–707 (2011).

15. Ceyhan, G. O. et al. Nerve growth factor and artemin are paracrine mediators of pancreatic neuropathy in pancreatic adenocarcinoma. *Ann. Surg.* **251**, 923–931 (2010).
16. Demir, I. E. et al. Early pancreatic cancer lesions suppress pain through CXCL12-mediated chemoattraction of Schwann cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, E85–E94 (2017).
17. Demir, I. E. et al. Activated Schwann cells in pancreatic cancer are linked to analgesia via suppression of spinal astroglia and microglia. *Gut* **65**, 1001–1014 (2016).
18. Secq, V. et al. Stromal SLIT2 impacts on pancreatic cancer-associated neural remodeling. *Cell Death Dis.* **6**, e1592 (2015).
19. Bressy, C. et al. LIF Drives Neural Remodeling in Pancreatic Cancer and Offers a New Candidate Biomarker. *Cancer Res.* **78**, 909–921 (2018).
20. Gil, Z. et al. Paracrine regulation of pancreatic cancer cell invasion by peripheral nerves. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 107–118 (2010).
21. Deborde, S. et al. Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion. *J. Clin. Invest.* **126**, 1538–1554 (2016).
22. Saloman, J. L. et al. Ablation of sensory neurons in a genetic model of pancreatic ductal adenocarcinoma slows initiation and progression of cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, 3078–3083 (2016).
23. Jones, S. et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**, 1801–1806 (2008).
24. Principe, D. R. et al. TGFbeta signaling in the pancreatic tumor micro-environment promotes fibrosis and immune evasion to facilitate tumorigenesis. *Cancer Res.* **76**, 2525–2539 (2016).
25. Haas, S. L. et al. Transforming growth factor-beta induces nerve growth factor expression in pancreatic stellate cells by activation of the ALK-5 pathway. *Growth Factors* **27**, 289–299 (2009).
26. Ceyhan, G. O. et al. The neurotrophic factor artemin influences the extent of neural damage and growth in chronic pancreatitis. *Gut* **56**, 534–544 (2007).
27. Chen, S., Luo, D., Streit, W. J. & Harrison, J. K. TGF-beta1 upregulates CX3CR1 expression and inhibits fractalkine-stimulated signaling in rat microglia. *J. Neuroimmunol.* **133**, 46–55 (2002).
28. Marchesi, F. et al. The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.* **68**, 9060–9069 (2008).
29. Celesti, G. et al. Early expression of the fractalkine receptor CX3CR1 in pancreatic carcinogenesis. *Br. J. Cancer.* **109**, 2424–2433 (2013).
30. Macias, H. et al. SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number. *Dev. Cell.* **20**, 827–840 (2011).
31. Pinho, A. V. et al. ROBO2 is a stroma suppressor gene in the pancreas and acts via TGF-beta signalling. *Nat. Commun.* **9**, 5083 (2018).
32. Dobolyi, A., Vincze, C., Pal, G. & Lovas, G. The neuroprotective functions of transforming growth factor Beta proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 8219–8258 (2012).
33. Li, S., Gu, X. & Yi, S. The regulatory effects of transforming growth factor-beta on nerve regeneration. *Cell Transplant.* **26**, 381–394 (2017).
34. Sulaiman, W. & Nguyen, D. H. Transforming growth factor beta 1, a cytokine with regenerative functions. *Neural Regen. Res.* **11**, 1549–1552 (2016).
35. Parkinson, D. B. et al. Transforming growth factor beta (TGFbeta) mediates Schwann cell death in vitro and in vivo: examination of c-Jun activation, interactions with survival signals, and the relationship of TGFbeta-mediated death to Schwann cell differentiation. *J. Neurosci.* **21**, 8572–8585 (2001).
36. Zhang, X. et al. Acute effects of transforming growth factor-beta1 on neuronal excitability and involvement in the pain of rats with chronic pancreatitis. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **22**, 333–343 (2016).
37. Zhu, Y. et al. Transforming growth factor beta induces sensory neuronal hyperexcitability, and contributes to pancreatic pain and hyperalgesia in rats with chronic pancreatitis. *Mol. Pain.* **8**, 65 (2012).
38. Liu, L., Zhu, Y., Noe, M., Li, Q. & Pasricha, P. J. Neuronal transforming growth factor beta signaling via SMAD3 contributes to pain in animal models of chronic pancreatitis. *Gastroenterology* **154**, 2252–65 e2 (2018).
39. Li, H., Chang, L. J., Neubauer, D. R., Muir, D. F. & Wallace, M. R. Immortalization of human normal and NF1 neurofibroma Schwann cells. *Lab Invest.* **96**, 1105–1115 (2016).
40. Watanabe, T., Oda, Y., Tamiya, S., Masuda, K. & Tsuneyoshi, M. Malignant peripheral nerve sheath tumour arising within neurofibroma. An immunohistochemical analysis in the comparison between benign and malignant components. *J. Clin. Pathol.* **54**, 631–636 (2001).
41. Yang, F. C. et al. NF1+/- mast cells induce neurofibroma like phenotypes through secreted TGF-beta signaling. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2421–2437 (2006).
42. Patmore, D. M. et al. In vivo regulation of TGF-beta by R-Ras2 revealed through loss of the RasGAP protein NF1. *Cancer Res.* **72**, 5317–5327 (2012).
43. Massague, J. TGFbeta signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 616–630 (2012).
44. Principe, D. R. et al. TGF-beta: duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J. Natl Cancer Inst.* **106**, djt369 (2014).
45. Achyut, B. R. & Yang, L. Transforming growth factor-beta in the gastrointestinal and hepatic tumor microenvironment. *Gastroenterology* **141**, 1167–1178 (2011).
46. Ahmed, S., Bradshaw, A. D., Gera, S., Dewan, M. Z. & Xu, R. The TGF-beta/Smad4 signaling pathway in pancreatic carcinogenesis and its clinical significance. *J. Clin. Med.* **6**, E5 (2017).
47. Pickup, M., Novitskiy, S. & Moses, H. L. The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 788–799 (2013).
48. Caja, L. et al. TGF-beta and the tissue microenvironment: relevance in fibrosis and cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, E1294 (2018).
49. Chuvin, N. et al. Acinar-to-ductal metaplasia induced by transforming growth factor beta facilitates KRAS(G12D)-driven pancreatic tumorigenesis. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 263–282 (2017).
50. Moustakas, A. & Heldin, C. H. Mechanisms of TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Med.* **5**, E63 (2016).
51. Yu, Y. & Elble, R. C. Homeostatic signaling by cell-cell junctions and its dysregulation during cancer progression. *J. Clin. Med.* **5**, E26 (2016).
52. Polette, M. et al. Beta-catenin and ZO-1: shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes. *Cells Tissues Organs* **185**, 61–65 (2007).
53. Moffitt, R. A. et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Genet.* **47**, 1168–1178 (2015).
54. Tanaka, H. Y. et al. Pancreatic stellate cells derived from human pancreatic cancer demonstrate aberrant SPARC-dependent ECM remodeling in 3D engineered fibrotic tissue of clinically relevant thickness. *Biomaterials* **192**, 355–367 (2019).
55. Veenstra, V. L. et al. Stromal SPOCK1 supports invasive pancreatic cancer growth. *Mol. Oncol.* **11**, 1050–1064 (2017).
56. Hu, D. et al. Stromal fibronectin expression in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J. Surg. Oncol.* **17**, 29 (2019).
57. Cheon, D. J. et al. A collagen-remodeling gene signature regulated by TGF-beta signaling is associated with metastasis and poor survival in serous ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **20**, 711–723 (2014).
58. Shields, M. A., Dangi-Garimella, S., Redig, A. J. & Munshi, H. G. Biochemical role of the collagen-rich tumour microenvironment in pancreatic cancer progression. *Biochem. J.* **441**, 541–552 (2012).
59. Knapinska, A. M., Estrada, C. A. & Fields, G. B. The roles of matrix metalloproteinases in pancreatic cancer. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **148**, 339–354 (2017).
60. Lupu-Meiri, M. et al. Knock-down of plasminogen-activator inhibitor-1 enhances expression of E-cadherin and promotes epithelial differentiation of human pancreatic adenocarcinoma cells. *J. Cell Physiol.* **227**, 3621–3628 (2012).
61. Hocevar, B. A., Brown, T. L. & Howe, P. H. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J.* **18**, 1345–1356 (1999).
62. Topalovski, M. & Brekken, R. A. Matrix control of pancreatic cancer: New insights into fibronectin signaling. *Cancer Lett.* **381**, 252–258 (2016).
63. Yang, C. & Glass, W. F. 2nd Expression of alpha-actinin-1 in human glomerular mesangial cells in vivo and in vitro. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **233**, 689–693 (2008).
64. Kovac, B., Makela, T. P. & Vallenius, T. Increased alpha-actinin-1 destabilizes E-cadherin-based adhesions and associates with poor prognosis in basal-like breast cancer. *PLoS ONE* **13**, e0196986 (2018).

Encadrement – Présentations – Séminaires - Formations transversales

Encadrement

- Valentin Rougane, DFGSM 2^{ème} année, Stage de découverte en laboratoire, Juin 2019
- Agathe Cohendet, Master 2 Innovations Thérapeutiques en Cancérologie, Juin-Septembre 2020

Présentations orales

- Retraite du CRCL – Techniques et outils : « Crispr/CAS9 for cancer research » - Aussois - Septembre 2018
- Tumor Escape & Signaling department seminar – “SMAD2/3 mediate migration and invasion of SMAD4-negative pancreatic cancer cells – Lyon – Juin 2019
- Tumor Escape, Resistance & Immunity department seminar – “SMAD2/3 oncogenic properties in SMAD4-négative PDAC”- Lyon – Avril 2021

Posters

- 4th International Cancer Symposium of the CRCL – “SMAD2/3 mediate migration and invasion of SMAD4-negative pancreatic cancer cells” - Lyon - 2-4 Octobre 2019
- Journée scientifique de l'école doctorale BMIC - “SMAD2/3 mediate migration and invasion of SMAD4-negative pancreatic cancer cells” – Lyon – 26 & 27 Novembre 2019

Séminaires

- Journée Scientifique de l'Association Française de la Recherche sur le Cancer Pancréatique (AFRCP) – Clichy – 20 Novembre 2018
- Journées Scientifiques de l'école doctorale BMIC – Lyon - 27 & 28 Novembre 2018
- XXXIVème Réunion du Club Français du Pancréas (CFP) – Lyon - 12 & 13 Septembre 2019
- 4th International Cancer Symposium of the CRCL - Lyon - 2-4 Octobre 2019
- Pancreatic Cancer Symposium – Toulouse – 23 & 24 Octobre 2019
- Journées Scientifiques de l'école doctorale BMIC – Lyon – 26 & 27 Novembre 2019
- Workshop du GERCOR – Essais cliniques, bioinformatique – Paris - 29 Novembre 2019
- Journées Scientifiques de l'école doctorale BMIC – Visioconférence – 9 & 10 Novembre 2020
- Retraite Scientifique du CRCL – Montrichet-Albanne – 8-10 Septembre 2021
- Journées Scientifiques de l'école doctorale BMIC – Lyon – 18 & 19 Novembre 2021

Formations transversales

- Éthique de la recherche
- Intégrité de la recherche
- Financement de l'innovation
- Protection de la vie privée dans le monde du numérique
- L'intelligence artificielle pour tous
- Organisation de la retraite scientifique du CRCL 2021

Implications oncogéniques des protéines SMAD2 & SMAD3 dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique SMAD4-négatif

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (ADKP) est l'une des tumeurs solides les plus agressives en raison de son diagnostic tardif, de son potentiel métastatique élevé et de sa résistance aux traitements conventionnels. La voie du TGF- β (Transforming Growth Factor beta) est l'une des seules cascades de signalisation altérées dans la quasi-totalité de ces tumeurs pancréatiques. L'une des mutations les plus fréquentes touche le gène *SMAD4*, qui code un facteur de transcription impliqué dans la transduction de la voie du TGF- β . Sa mutation est un facteur de mauvais pronostic. L'induction de la voie du TGF- β induit l'association de SMAD4 aux deux autres effecteurs de la voie, SMAD2 et/ou SMAD3, qui subissent ensemble, une translocation nucléaire afin d'exercer leurs fonctions de facteurs de transcription. L'impact oncogénique de la mutation de *SMAD4* est donc largement supposé résulter de la perte de fonction de cette protéine. Cependant, le rôle de SMAD2 et SMAD3 en l'absence de SMAD4 reste peu étudié.

Au cours de ma thèse, j'ai montré qu'en l'absence de SMAD4, les protéines SMAD2 et SMAD3 agissent de manière indépendante et déclenchent l'expression de gènes impliqués dans des processus oncogéniques tels que la migration et l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques. J'ai pu caractériser l'impact phénotypique de l'activité oncogénique de SMAD2/3 en l'absence de SMAD4 à l'aide de modèles cellulaires originaux. Enfin, la pertinence de ces observations réalisées *in vitro* a été confirmée par l'étude d'une cohorte d'adénocarcinomes pancréatiques. Nous avons en effet établi que les tumeurs associant l'absence de SMAD4 et un haut niveau d'activation de SMAD2 étaient plus agressives et de moins bon pronostic.

L'impact phénotypique des altérations de la voie du TGF- β est complexe, compte-tenu de la dualité fonctionnelle de cette cytokine au cours de la tumorigenèse. Dans son ensemble, ma thèse a permis de révéler un niveau additionnel de complexité, en montrant l'impact oncogénique du complexe SMAD2/3 sur l'échappement tumoral en l'absence de SMAD4.

Mots clés : Adénocarcinome Canalaire Pancréatique ; Métastases ; TGF- β ; SMAD ; Migration ; Invasion

Oncogenic roles of SMAD2 and SMAD3 proteins in SMAD4-negative pancreatic ductal adenocarcinoma

Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma (PDAC) is one of the most aggressive solid tumors due to late diagnosis, high-metastatic potential, and resistance to conventional treatments. The TGF- β (Transforming Growth Factor beta) signaling pathway is genetically altered in almost all PDAC cases. One of the most frequent mutations affects the gene *SMAD4*, which encodes for an effector of the so-called canonical TGF- β signaling pathway, and loss of SMAD4 is a poor prognostic factor. The activation of TGF- β signaling induces the association of SMAD4 with two other transcription factors, SMAD2 and/or SMAD3, which then undergo a translocation as a complex to exert their transcriptional activities in the nucleus. The oncogenic impact of *SMAD4* mutation is therefore largely assumed to result from the loss of function of this protein. However, the role of SMAD2 and SMAD3, in SMAD4 negative context, remains understudied.

During my PhD, I showed that, in the absence of SMAD4, SMAD2 and SMAD3 act independently and trigger the expression of genes involved in oncogenic processes such as cancer cell migration and invasion. I characterized the phenotypic impact of SMAD2/3 oncogenic activity in the absence of SMAD4 using original cell models. Finally, the relevance of these *in vitro* observations was confirmed in a human pancreatic tumor cohort. We indeed established that SMAD4-negative tumors with high level of active SMAD2 are more aggressive and have a poorer prognosis.

The phenotypic impact of alterations in the TGF- β pathway is complex, given the functional duality of this cytokine during tumorigenesis. Overall, my thesis revealed an additional level of complexity, showing the oncogenic impact of the SMAD2/3 complex on tumor escape in the absence of SMAD4.

Key words : Pancreatic Ductal Adenocarcinoma ; Metastasis ; TGF- β ; SMAD ; Migration ; Invasion