



HAL
open science

Elucidation du rôle de la Ténascine-X dans la progression tumorale : focus sur la carcinogenèse pancréatique

Sophie Liot

► **To cite this version:**

Sophie Liot. Elucidation du rôle de la Ténascine-X dans la progression tumorale : focus sur la carcinogenèse pancréatique. Biologie moléculaire. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1088 . tel-03895806

HAL Id: tel-03895806

<https://theses.hal.science/tel-03895806v1>

Submitted on 13 Dec 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 : 2021LYSE1088

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N°ED 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat :
Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Soutenue publiquement le 17/05/2021, par :
Sophie, Claire, Marie-Paule LIOT

**Elucidation du rôle de la Ténascine-X
dans la progression tumorale – focus
sur la carcinogenèse pancréatique**

Devant le jury composé de :

LE GUELLEC Dominique, PU, Université Claude Bernard Lyon 1

Président du Jury

TOMASINI Richard, DR INSERM, Université d'Aix-Marseille

Rapporteur

GUILLERMET Julie, CR INSERM, Université Toulouse III Paul Sabatié

Rapporteuse

LEROY-DUDAL Johanne, MCU, Université Cergy-Pontoise

Examinatrice

VALCOURT Ulrich, PU, Université Claude Bernard Lyon 1

Directeur de thèse

LAMBERT Elise, MCU, Université Claude Bernard Lyon 1

Co-directrice de thèse

« Que votre parole soit impeccable.

Parlez avec intégrité, ne dites que ce que vous pensez vraiment. N'utilisez pas la parole contre vous-même, ni pour médire d'autrui. Utilisez la puissance de la parole dans le sens de la vérité et de l'amour. La parole est un outil qui peut détruire. Prenez conscience de sa puissance et maîtrisez-la. Pas de mensonge ni de calomnie.

Quoi qu'il arrive, n'en faites pas une affaire personnelle.

Vous n'êtes pas la cause des actes d'autrui. Ce que les autres disent et font n'est qu'une projection de leur propre réalité, de leurs rêves, de leurs peurs, de leurs colères, de leurs fantasmes. Lorsque vous êtes immunisé contre cela, vous n'êtes plus victime de souffrances inutiles.

Ne faites pas de suppositions.

Ne commencez pas à élaborer des hypothèses de probabilités négatives, pour finir par y croire, comme s'il s'agissait de certitudes. Ayez le courage de poser des questions et d'exprimer vos vrais désirs. Communiquez clairement avec les autres pour éviter tristesse, malentendus et drames.

Faites toujours de votre mieux.

Il n'y a pas d'obligation de réussir, il n'existe qu'une obligation de faire au mieux. Votre "mieux" change d'instant en instant. Quelles que soient les circonstances faites simplement de votre mieux et vous éviterez de vous juger, de vous culpabiliser et d'avoir des regrets. Tentez, entreprenez, essayez d'utiliser de manière optimale vos capacités personnelles. Soyez indulgent avec vous-même. Acceptez de ne pas être parfait, ni toujours victorieux. »

Don Miguel Ruiz (*Les quatre accords toltèque*, 1997)

« La plus grande gloire n'est pas de ne jamais tomber, mais de se relever à chaque chute. »

Confucius

REMERCIEMENTS

Avant tout, j'aimerais remercier mes encadrants de thèse, Elise Lambert et Ulrich Valcourt, qui m'ont suivi au cours de ces 4 ans. Merci à tous les deux pour votre soutien et votre confiance, qui m'ont permis de grandir un peu plus chaque jour.

Ulrich, merci de m'avoir proposé ce sujet lorsque j'avais besoin de changement. Ça n'a pas toujours été facile, avec des résultats parfois décevants, mais nous avons fini par en faire une jolie histoire ! Merci pour ton accompagnement, ton soutien et ta confiance, alors que je prenais peu à peu mon autonomie. Tu m'as laissé la liberté dont j'avais besoin, merci pour cela.

Elise, je ne sais par où commencer. Voici 9 ans que nous nous connaissons, je nous décrirais comme des boomerangs. Tu es la seule à avoir laissé sa chance à une petite L1 qui voulait juste faire un stage. Tu m'as préparée pour l'oral du concours de l'ENS, puis m'as proposé un nouveau stage en M1. Et finalement, alors que nous pensions que nous ne ferions pas cette thèse ensemble, les événements en ont décidé autrement ! Merci de m'avoir permis d'avoir une nouvelle chance en recherche, de m'avoir accompagnée au jour le jour tout au long de ces 4 ans. Mention spéciale à tous nos messages, des blagues aux photos diverses, et surtout à nos captures d'écran de photos floues ! Je ne te remercierai jamais assez.

Je remercie aussi le Dr Bernard Verrier de m'avoir accueillie au sein du LGBTI et dans son équipe alors que j'étais dans une situation inconfortable. Merci aux membres de son équipe, pour leur aide lors de mes premiers moments au sein du LGBTI.

Merci au Pr Sylvie Ricard-Blum et au Dr Laurent Bartholin d'avoir participé à ces travaux de recherche pendant mes Comités de Suivi de Thèse. Merci pour vos retours positifs, vos remarques toujours pertinentes et vos conseils. Un merci tout particulier à Sylvie Ricard-Blum, directrice de l'EDISS, d'avoir été compréhensive et de nous avoir épaulé.e.s ces derniers temps.

Je voudrais aussi remercier les membres de mon jury de thèse, les Dr Richard Tomasini, Julie Guillermet, Johanne Leroy-Dudal et le Pr Dominique Le Guellec, d'avoir accepté de juger et de faire des retours sur ces travaux de thèse. Un remerciement tout particulier à Julie Guillermet, pour sa lecture du manuscrit de thèse en un temps record.

Ce projet n'aurait pas été ce qu'il est sans l'aide de nos différent.e.s collaborateur.trice.s. Merci à Valérie Hervieu, pour son œil expert de clinicienne. J'ai parfois eu du mal à te suivre, mais nos échanges ont toujours été extrêmement enrichissants. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi, et nos séances au microscope multi-têtes me resteront en mémoire ! Merci aussi à Philippe Bertolino, pour nos échanges, ses remarques toujours pertinentes et ses précieux conseils, et à Anca Hennino pour son aide, notamment dans les récentes avancées du projet.

Je souhaite également remercier les différentes plateformes avec lesquelles j'ai travaillé. Merci à l'animalerie ALECS module SPF, et notamment à Jean-Michel Vicat et Julie Pajot pour le suivi de mes cohortes. Mention spéciale à Bruno Chapuis, au CIQLE, qui m'a épaulé à chaque session de scanner de lames, et il y en a eu ! Enfin, à Naïma, de PrImaTiss, sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. Merci pour ta bonne humeur quotidienne, ton soutien et tous tes précieux conseils.

Merci aussi à l'équipe pédagogique de Biologie Cellulaire de l'Université Claude Bernard Lyon 1. Ces TDs et TP m'ont permis de grandir, de me sentir capable. Merci pour votre gentillesse et votre accompagnement.

Un énorme merci à la l'équipe MatriPath, ou plutôt Team'Nascine-X. A mes co-thésard.e.s préféré.e.s, Alex et Laura, devenu.e.s mes ami.e.s. A nos apéros, nos « interventioooooons », nos accords et désaccords musicaux, nos discussions animées et tout ce qui a fait de cette thèse, un moment agréable à vos côtés. Alex, mon co-thésard de toujours (arrête de le nier, je suis ta co-thésarde préférée, désolé Laura 😊), merci d'avoir été là dès les débuts, lorsque je ne connaissais personne. Laura, bébé co-thésarde devenue grande, merci pour ta présence si agréable au quotidien ! Merci Perrine pour ta gentillesse, ta disponibilité et tes conseils. Nous n'avons pas beaucoup manipulé ensemble, mais j'ai toujours su que je pouvais compter sur toi si j'en ressentais le besoin. Merci aussi aux deux stagiaires que j'ai encadré.e.s, Jonathan et Céline. Bravo pour votre travail, qui a fait avancer à grand pas ces travaux de recherche. Merci pour votre confiance, et pour votre bonne humeur.

Merci également aux membres du LGBTI que j'ai croisé.e.s au quotidien et qui ont égayé cette thèse. Mention spéciale à Marie, qui rejoint parfois notre pièce manip et nos apéros !

Tous ces souvenirs au labo en votre présence à tous.tes resteront à jamais.

A tous.tes mes ami.e.s de l'ENS. Ces années furent parmi les meilleures ! Des soirées à la vie associatives, des TP éprouvants aux WEI endiablés. A tous les copain.ine.s de la promo, celles et ceux de l'AS, du BDE et des pompoms, et bien sûr du Bouli ! Mention spéciale à Nono, Tessou Bouli, Lezlaï et Kevinou. J'espère que notre « Fontaine Monod » et toutes nos

conversations Messenger aux noms variés perdureront ! Merci à toutes les personnes rencontrées, aussi enrichissantes les unes que les autres. Je ne retiendrai que du bon.

De l'ENS, je remercie également chaleureusement Nathalie Alazard et Éric Freyssingeas, qui ont été là et m'ont soutenue lorsque j'en ai eu besoin. Je n'en serais pas là sans elle et lui, je ne l'oublierai pas.

Aux coupines du lycée, Lucile et Coline, mes 2 « mamies » adorées, et Cécile, la meilleure acolyte pour endiabler le dancefloor et prendre un verre. Bien sûr vous n'êtes pas que cela ! Notre amitié n'a jamais été aussi forte, malgré les 10 ans depuis le bac. Malgré la distance, les études et boulots de chacune, nous avons grandi et muri ensemble, nous continuons à évoluer ensemble. A nos week-ends toujours si drôles et enrichissants, à nos discussions enflammées, à nos conseils, donnés les unes aux autres, toujours utiles et réconfortants. Je vous aime, et compte bien que nous restions amies pour toujours.

Merci à ma famille pour leurs conseils, leur soutien et leur amour au quotidien. Papa, merci pour ton courage, pour garder le cap. Malgré les doutes, j'ai fini par y arriver ! Merci de m'avoir soutenue malgré tes inquiétudes. Maman, malgré la maladie, merci de m'avoir poussée vers ces études, merci de m'avoir aidée à devenir celle que je suis. Pilou (oui, j'étais obligée !) et Cécile, merci pour votre soutien, dans les bons et les mauvais moments. Je suis la chouineuse de la famille, vous ne cesserez jamais de vous moquer, mais nous restons uni.e.s dans nos différences. Plus soudé.e.s que jamais. Merci. Je vous aime.

Clément. Merci pour ton amour. Tu es mon pilier, quelle que soit la situation. Mon meilleur ami, mon confident, celui qui me supporte au quotidien (et ce n'est pas rien !) et qui me fait rire chaque jour. Merci d'être présent quoi qu'il arrive. Je n'en serai pas là sans toi, et je ne conçois pas la vie future sans toi. Je t'aime.

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau de macromolécules ayant un rôle architectural et pouvant influencer sur le comportement cellulaire. Parmi les glycoprotéines matricielles, la famille des Ténascines (TN) comporte 4 membres (TNC, TNW, TNR et TNX) partageant une structure modulaire commune, mais présentant des patrons d'expression et des rôles très différents. La Ténascine-X (TNX), objet principal de cette thèse, est le membre le plus largement exprimé, puisque retrouvé dans la grande majorité des tissus conjonctifs sains adultes. Elle possède (1) un rôle architectural, par la régulation de l'espacement entre les fibres de collagène, et (2) des fonctions de signalisation grâce à son interaction avec plusieurs facteurs de croissance. L'implication des Ténascines en cancérologie a été inégalement étudiée et le statut et le rôle de la TNX restaient à élucider.

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (ADKP), qui représente 90% des cas de cancer du pancréas, est extrêmement agressif. En effet, les patients atteints de ce cancer présentent un taux de survie à 5 ans inférieur à 10%, du fait d'un diagnostic tardif et d'un arsenal thérapeutique encore inefficace. Ce type de tumeur se développe lentement, à partir de lésions pré-tumorales, dont les principales sont les PanINs (Pancreatic Intraepithelial Neoplasias). L'ADKP est également caractérisé par un important microenvironnement tumoral, aussi appelé stroma tumoral, résultant notamment d'un dépôt abondant de matrice extracellulaire (réaction desmoplastique).

Mon objectif au cours de cette thèse était donc de comprendre le rôle de la TNX au cours de la progression tumorale en focalisant essentiellement mon étude sur la carcinogenèse pancréatique.

Notre première étude fut d'analyser le statut de la TNX dans les 6 cancers les plus incidents et mortels au monde. Dans cette étude, nous avons observé une diminution drastique de la TNX dans la plupart des cancers, à l'exception des tumeurs cérébrales. En outre, nous avons mis en évidence qu'une expression faible du gène *TNXB* était associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs mammaires et pulmonaires.

Par la suite, nous avons montré que la TNX était également perdue dans des échantillons humains d'ADKP, phénomène associé à une survie diminuée des patients. Dans cette deuxième étude, nous avons aussi décrit un dépôt dynamique de TNX au cours de la carcinogenèse pancréatique. En effet, celui-ci est renforcé et forme une gaine autour des lésions pré-tumorales de bas grade, qui s'amointrit puis semble disparaître dans les stades les plus avancés. Une analyse plus fine de la localisation de la TNX a montré qu'elle était absente du stroma situé à proximité directe des lésions et positif pour α SMA (marqueur des fibroblastes activés).

Enfin, nous avons montré *in silico*, par une approche de *Gene Ontology*, qu'une faible expression de TNX dans des échantillons d'ADKP humains était associée à une forte prolifération et une dérégulation du système immunitaire notamment lié à l'inflammation. Dans les étapes précoces de la carcinogenèse pancréatique, nous supposons donc l'existence de 2 stromas, (1) l'un pro-tumoral et localisé en contact direct avec les cellules tumorales et (2) l'autre potentiellement anti-tumoral, ne participant pas à la réaction desmoplasique, mais renfermant la TNX qui régulerait la prolifération tumorale et l'inflammation.

Mes travaux de recherche m'ont conduit à utiliser différents modèles dont un modèle murin prédisposé au cancer du pancréas. Cependant, nous avons pu observer, dans 10% des souris, le développement d'une tumeur thymique associée à une accélération de la carcinogenèse pancréatique et à une dérégulation du système immunitaire. L'analyse en profondeur de ce biais expérimental a conduit à la rédaction d'un troisième article.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence l'implication de la TNX dans le processus tumoral, et souligne les limites de l'utilisation des modèles murins en biologie fondamentale.

Mots clés : Ténascine-X, cancers, pancréas, adénocarcinome canalaire pancréatique, microenvironnement tumoral, modèles murins.

SUMMARY AND KEY WORDS

The extracellular matrix (ECM) is a network of macromolecules having an architectural role and which can influence cellular behavior. Among the matrix glycoproteins, the tenascin (TN) family is composed of 4 members (TNC, TNW, TNR and TNX) sharing a common modular structure, but exhibiting very different expression patterns and roles. Tenascin-X (TNX), the main subject of this thesis, is the most widely expressed member, since it is found in the vast majority of adult healthy connective tissues. It has (1) an architectural role, by regulating the spacing between collagen fibers, and (2) signaling functions through its interaction with several growth factors. The implication of tenascins in oncology has been unequally studied and the status and role of TNX remained to be elucidated.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), which accounts for 90% of pancreatic cancer cases, is extremely aggressive. Indeed, patients suffering from PDAC have a 5-year survival rate less than 10%, due to late diagnosis and a still ineffective therapeutic arsenal. This type of tumor evolves slowly, from pre-tumor lesions, the main ones being PanINs (Pancreatic Intraepithelial Neoplasias). PDAC is also characterized by an important tumor microenvironment, also called tumor stroma, notably resulting from an abundant deposition of extracellular matrix (desmoplastic reaction).

My objective during this thesis was therefore to understand the role of TNX during tumor progression by mainly focusing my study on pancreatic carcinogenesis.

Our first study was to analyze the status of TNX in the 6 most common and lethal cancers in the world. In this work, we observed a drastic decrease of TNX in most cancers, except brain tumors. In addition, we have shown that low expression of the *TNXB* gene was associated with a poor prognosis in breast and lung tumors.

Subsequently, we showed that TNX was also lost in human PDAC samples, a phenomenon associated with decreased patient survival. In this second study, we also described a dynamic deposition of TNX during pancreatic carcinogenesis. Indeed, it is reinforced and forms a sheath around low-grade pre-tumor lesions, which diminishes and then seems to disappear in the most advanced stages. A more detailed analysis of the location of TNX showed that it was absent from the stroma located in close proximity of the lesions and positive for α SMA (marker of activated fibroblasts). Finally, we have shown, *in silico*, thanks to a *Gene Ontology* approach, that a low expression of *TNXB* in human PDAC samples was associated with a strong proliferation and deregulation of the immune system, particularly linked to inflammation. In the early stages of pancreatic carcinogenesis, we therefore assume the existence of 2 stroma, (1) one pro-tumor and localized in direct contact with tumor cells and (2) the other potentially

anti-tumor, not participating to the desmoplastic reaction, but containing TNX, which would regulate tumor proliferation and inflammation.

My research has led me to use different models including a mouse model predisposed to pancreatic cancer. However, we observed, in 10% of the mice, the development of thymic tumor associated with an acceleration of pancreatic carcinogenesis and dysregulation of the immune system. The in-depth analysis of this experimental bias led us to the writing of a third article.

In conclusion, this thesis work highlighted the involvement of TNX in the tumor process, and underlines the limits of the use of murine models in fundamental biology.

Key words: Tenascin-X, cancers, pancreas, pancreatic ductal adenocarcinoma, tumoral microenvironment tumoral, mouse models.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	9
Liste des figures	11
Préambule	13
Revue de la littérature	15
Chapitre 1 : Tissus conjonctifs et matrice extracellulaire	17
I. Description des tissus conjonctifs adultes	17
A. Différents types de tissus conjonctifs et fonctions associées	17
B. Composition des tissus conjonctifs	19
1. Cellules des tissus conjonctifs	19
2. La matrice extracellulaire et ses protéines structurales	19
a. Collagènes	20
b. Fibres élastiques	22
c. Protéoglycanes	22
d. Glycoprotéines	23
i. Fibronectine et laminines	23
ii. Ténascines	25
II. Fonctions cellulaires de la MEC	25
A. Les intégrines, à l'interface cellule – matrice	27
B. Effets des molécules de la MEC sur le comportement cellulaire	27
1. Support d'ancrage pour l'adhérence et la migration cellulaire	27
2. Importance des propriétés biomécaniques de la MEC	28
3. Protéines de la MEC : des molécules informatives et régulatrices de signaux	28
III. Implication de la MEC dans l'homéostasie tissulaire	29
A. Importance physiologique de la MEC	29
1. Plasticité de la MEC : un compartiment dynamique	29
2. Implications physiologiques et pathologiques de la MEC	30
a. Implication de la MEC au cours du développement et de la réparation tissulaire	31
b. Altérations de la MEC et pathologies associées	31
B. Implications des protéines de la MEC dans la tumorigenèse	32
1. Mise en place du microenvironnement tumoral	33
2. Influence de la MEC sur la progression tumorale	37
IV. Focus sur les Ténascines	38
A. Structure des TNs	39
B. Des patrons d'expression différents... ..	39

C.	... pour des fonctions spécifiques	43
1.	Une fonction anti-adhésive commune	44
2.	La TNC : de nombreuses fonctions montrées chez l'Homme et la souris	44
3.	La TNW et son rôle dans le développement	45
4.	Rôles de la TNR dans le système nerveux	46
5.	Architecture et signalisation, le rôle double de la TNX	46
D.	Implication des Ténascines dans la tumorigenèse	49
 <u>Chapitre 2 : Pancréas physiologique et pathologique</u>		53
I.	Le pancréas sain : développement, structure et fonctions	53
A.	Organogenèse du pancréas	53
B.	Structure et fonction du pancréas exocrine	57
C.	Description du microenvironnement pancréatique sain	58
II.	Le cancer du pancréas - Focus sur l'adénocarcinome canalaire pancréatique	61
A.	L'ADKP - Généralités	62
1.	Facteurs de risque	62
2.	Symptômes et diagnostic	63
3.	Traitements et limites actuelles	66
4.	Stades cliniques et classification des tumeurs	67
a.	Classification anatomique : les stades pathologiques (TNM)	67
b.	Classification morphologique : grades	69
B.	Initiation et progression de l'ADKP	69
1.	Initiation de l'ADKP : lésions pré-néoplasiques	69
a.	Diversité et histologie des lésions pré-néoplasiques	69
b.	Modifications génétiques en jeu	73
c.	La question de l'origine des cellules cancéreuses	76
d.	Métaplasie acino-canalaire, de la plasticité pancréatique à la carcinogenèse	77
2.	Progression et métastases	81
a.	Evolution des lésions pré-néoplasiques	81
b.	L'ADKP, une tumeur infiltrante	83
c.	Processus métastatique	85
C.	Microenvironnement tumoral et réaction desmoplasique	86
1.	Présentation du microenvironnement tumoral pancréatique	86
2.	Les CAFs, à l'origine de la réaction desmoplasique	87
a.	Origine(s) et activation des CAFs	89
b.	Rôle dans la progression tumorale : une interaction bidirectionnelle	90
3.	La MEC, composante principale de la réaction desmoplasique	93
a.	Evolution de la MEC au cours de la carcinogenèse pancréatique	93
b.	Rôle de la MEC dans la progression tumorale	94
4.	Implications cliniques	99
a.	Stroma et résistance aux chimiothérapies	99
b.	Cibler le stroma : bonne ou mauvaise idée ?	101

D.	Modèles d'étude de l'ADKP, de la lignée cellulaire à la tumeur humaine	102
1.	Modèles <i>in vitro</i>	102
2.	Modèles <i>in vivo</i>	104
a.	Modèles de métaplasie acino-canalaire et de pancréatite	104
b.	Modèles de transplantation	105
c.	Modèles murins génétiquement modifiés	107
Résultats	111
I.	<u>Premier article</u>	113
	Préambule	113
	<i>Article 1 inséré entre les pages 114 et 115</i>	
II.	<u>Deuxième article et revue</u>	115
	Préambule	115
	<i>Revue et Article 2 insérés à la suite entre les pages 120 et 121</i>	
III.	<u>Troisième article</u>	121
	Préambule	121
	<i>Article 3 inséré entre les pages 122 et 123</i>	
Discussion générale	123
I.	Diminution de l'expression de TNX dans les tumeurs solides et impact sur la survie des patients	124
A.	Perte de la TNX dans l'ADKP et de nombreuses tumeurs solides	124
B.	Conséquence de la perte de TNX sur la survie des patients	126
II.	Implication de la TNX dans la carcinogenèse pancréatique	126
A.	Un dépôt dynamique pour un rôle protecteur ?	127
1.	Dépôt dynamique de la TNX au cours de la carcinogenèse pancréatique	127
2.	Compartimentation du stroma de l'ADKP, vers un rôle double ?	129
a.	Sous-populations fibroblastiques	129
b.	Une MEC compartimentée ?	133
B.	Conséquences biologiques de la perte de TNX	139
1.	Une prolifération augmentée	139
2.	Perturbation de l'inflammation	141
C.	Etude <i>in vivo</i> du rôle oncosuppressif de la TNX	141
III.	L'importance du choix du modèles	153
A.	Observation d'un effet indésirable dans le modèle génétiquement modifié utilisé	153
1.	10% des souris KC développent une masse thymique	153
2.	Hypothèses sur le(s) mécanisme(s) pouvant mener aux tumeurs thymiques	154
3.	Les tumeurs thymiques observées sont associées à une accélération de la carcinogenèse pancréatique	157
B.	Un modèle adapté ?	158
C.	Mise en place d'un modèle organotypique <i>in vitro</i> pour l'étude en 3D du rôle de la TNX sur des cellules tumorales pancréatiques	161
IV.	Conclusions	164

Annexes	167
Annexe 1 : Protocole de culture organotypique	169
Annexe 2 : Publications et communications	173
<i>Posters insérés entre les pages 174 et 175</i>	
Annexe 3 : Activités d'enseignement et d'encadrement	175
 Bibliographie	 176

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2D : 2 dimensions	GEO : Gene Expression Omnibus
3D : 3 dimensions	H&E : Hematoxylin and Eosin
5-FU : 5-FluoroUracile	HA : Hyaluronic Acid
ACTA2 : Gène codant α SMA	HCL : Hospices Civils de Lyon
ADAMs : A Disintegrin And Metalloproteinase	HIF1 α : Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha
ADAMTS : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs	IL : Interleukins
ADKP : Adénocarcinome Canalaire Pancréatique	IPMN : Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm
ADM : Acinar-to-Ductal Metaplasia	JNK : c-Jun N-terminal Kinase
AJCC : American Joint Committee on Cancer	KC : Souris Pdx1- ^{CRE} ; LSL:Kras ^{+/G12D}
ATRA : All Trans-Retinoic Acid	KGD : Séquence Lysine-Glycine-Arginine
BMP : Bone Morphogenetic Protein	KGF : Keratinocyte Growth Factor
CAF : Cancer-Associated Fibroblast	KO : Knock-Out
CK19 : Cytokeratin 19	Kras : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
CPA1 : Carboxypeptidase A1	LAP : Latency-Associated Peptide
CRCL : Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon	LOX : Lysyl Oxidase
CSC : Cancer Stem Cell	LSL : Lox-STOP-Lox
CTGF : Connective Tissue Growth Factor	LTBP : Latent TGF β Binding Protein
CXCL : Chemokine (C-X-C motif) Ligand	MACITs : Membrane-associated Collagens with interrupted triple helices
DDR2 : Discoidin domain-containing receptor 2	MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
ECM : Extracellular Matrix	MCN : Mucinous Cystic Neoplasm
EDS : Ehlers Danlos Syndrome	MEC : Matrice Extracellulaire
EGF : Epidermal Growth Factor	MMP : Matrix Metalloproteinases
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor	MPC : Multipotent Progenitor Cells
EMT : Epithelial to Mesenchymal Transition	NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
FACITs : Fibrils-associated Collagens with interrupted triple helices	NGF : Nerve Growth Factor
FAK : Focal Adhesion Kinase	PanIN : Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
FAP : Fibroblast Activation Protein	PCC : Pancreatic Cancer Cell
FBG : Fibrinogen	PDAC : Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma
FGF : Fibroblast Growth Factor	PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
FNIII : Fibronectine de type III	PDGFR α : Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha
GAG : Glycosaminoglycane	PDX : Patient-Derived Xenograft
	PDX1 : Pancreatic and Duodenal homeobox 1
	PG : Protéoglycane

PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PSCs : Pancreatic Stellate Cells
PTF1A : Pancreas Transcription Factor 1 subunit Alpha
RGD : séquence Arginine-Glycine-Arginine
SERPIN : Serine Protease Inhibitor
SHh : Sonic Hedgehog
SNC : Système Nerveux Central
SOX9 : SRY-Box Transcription Factor 9
Sp1 : Specificity protein 1
SPARC : Secreted protein, acidic, cysteine-rich (ostéonectine)
TC : Tissu Conjonctif
TCGA : The Cancer Genome Atlas
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF α : Transforming Growth Factor α
TGF β : Transforming Growth Factor β
TGF β i : Transforming Growth Factor, beta-induced

TIMPs : Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TLR4 : Toll-Like Receptor
TMA : Tissue MicroArray
TME : Tumoral MicroEnvironment
TN : Ténascine (ou Tenascin)
TNC : Ténascine-C (ou Tenascin-C)
TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
TNM : score permettant d'évaluer l'avancement anatomique de la tumeur
TNN : Ténascine-N, autre nom de la TNW
TNR : Ténascine-R (ou Tenascin-R)
TNW : Ténascine-W (ou Tenascin-W)
TNX : Ténascine-X (ou Tenascin-X)
TNXB : gène codant la TNX
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
WHO : World Health Organization
WT : Wild-type
 α Amy : Alpha Amylase
 α SMA : alpha Smooth Muscle Actin

LISTE DES FIGURES

Les figures des articles ne sont pas recensées ici.

Revue de la littérature :

Figure 1 (p.18) : Représentation schématique de la lame basale et de la MEC interstitielle sous-jacente

Figure 2 (p.26) : Propriétés de la MEC impliquées dans la modulation du comportement cellulaire

Figure 3 (p.34) : Représentation schématique du microenvironnement sain et tumoral

Figure 4 (p.36) : Evolution et implication de la MEC dans les processus biologiques liés à la tumorigenèse

Figure 5 (p.40) : Structure des différents membres de la famille des Ténascines

Figure 6 (p.48) : Implication de la TNC et de la TNW dans les processus biologiques liés à la progression tumorale

Figure 7 (p.52) : Représentation anatomique et organisation cellulaire du pancréas

Figure 8 (p.54-55) : Mécanismes impliqués dans le développement du pancréas

Figure 9 (p.58) : Structure du pancréas exocrine

Figure 10 (p.61) : Taux de mortalité de différents cancers au regard de leur incidence

Figure 11 (p.64) : Approches cliniques de l'ADKP (symptômes et outils de diagnostic)

Figure 12 (p.65) : Arbre de décision thérapeutique et bénéfices apportés par les différents traitements chimiothérapeutiques existants

Figure 13 (p.68) : Classification clinique et histologique de l'ADKP

Figure 14 (p.72) : Mécanismes de carcinogénèse pancréatique et mutations impliquées

Figure 15 (p.74) : Mutations et voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse pancréatique

Figure 16 (p.78) : Plasticité des cellules pancréatiques

Figure 17 (p.82) : Processus cellulaires mis en œuvre dans la progression des PanINs vers l'ADKP invasif

Figure 18 (p.84) : Localisation des métastases issues de l'ADKP

Figure 19 (p.88) : Biologie des CAFs

Figure 20 (p.90) : Interactions tumeur-stroma dans l'ADKP

Figure 21 (p.100) : Cibles et stratégies thérapeutiques dans le stroma de l'ADKP

Tableau 1 (p.16) : Description des caractéristiques des différents types de tissus conjonctifs

Tableau 2 (p.21) : Représentation schématique et classification des 4 grands types de macromolécules matricielles

Tableau 3 (p.24) : Historique des découvertes concomitantes des différentes TNs, et noms associés

Tableau 4 (p.42) : Patrons d'expression et fonctions associées des 4 membres de la famille des Ténascines ainsi que leur implication dans les processus pathologiques

Tableau 5 (p.70) : Caractéristiques cliniques et histologiques des 3 grands types de lésions pancréatiques pré-néoplasiques

Tableau 6 (p.96-97) : Implication des protéines de la MEC dans la carcinogénèse pancréatique

Tableau 7 (p.106) : Modèles murins génétiquement modifiés permettant l'étude des lésions pré-néoplasiques et de l'ADKP

Tableau 8 (p.109) : Comparaison des modèles d'étude de l'ADKP, *in vitro* et *in vivo*.

Préambule de l'article 2 :

Figure 22 (p.116) : Résultats préliminaires de l'étude du rôle de la TNX dans la carcinogénèse pancréatique

Discussion générale :

Figure 23 (p.130) : Différentes compartimentations stromales proposées dans la littérature

Figure 24 (p.132) : Marquages de la TNC par immunohistochimie recensés dans la littérature

Figure 25 (p.134) : Marquages de différentes molécules de la MEC par immunohistochimie trouvés dans la littérature

Figure 26 (p.140) : Modèle murin utilisé au cours de cette étude et cinétique d'analyse

Figure 27 (p.142) : Analyse de l'étendue des lésions rencontrées dans les souris KC;Tnxb^{+/+} vs KC;Tnxb^{-/-}

Figure 28 (p.144) : Gradation des lésions rencontrées dans les souris KC;Tnxb^{+/+} vs KC;Tnxb^{-/-}

Figure 29 (p.146) : Analyse de la fibrose des lésions rencontrées dans les souris KC;Tnxb^{+/+} vs KC;Tnxb^{-/-}

Figure 30 (p.148) : Analyse de l'activation des fibroblastes autour des lésions rencontrées dans les souris KC;Tnxb^{+/+} vs KC;Tnxb^{-/-}

Figure 31 (p.150) : Analyse de la prolifération des lésions rencontrées dans les souris KC;Tnxb^{+/+} vs KC;Tnxb^{-/-}

Figure 32 (p.155) : Schéma explicatif des recombinaisons intrachromosomiques

Figure 33 (p.160) : Mise au point d'un modèle organotypique pour l'étude *in vitro* du rôle de la TNX sur des cellules tumorales pancréatiques

Figure 34 (p.163) : Protocole de production et purification de la TNX entière recombinante (bovine)

Tableau 9 (p.154) : Calcul de l'incidence des souris présentant une masse thymique à la dissection, avec inclusion ou non des animaux développés au PBES, et selon le génotype des souris.

PRÉAMBULE

Ce manuscrit de thèse présente 3 articles originaux et une revue, basés sur mes travaux de recherche menés entre Janvier 2018 et Mars 2021. Chacun des articles sera remis dans son contexte puis présenté sous sa forme soumise ou publiée (en anglais).

A la frontière entre biologie du cancer et biologie de la matrice extracellulaire, mon projet princeps de thèse avait pour but d'élucider le rôle de la TNX au cours de la carcinogenèse pancréatique. L'hypothèse d'un rôle oncosuppresseur avait été émise sur la base de certaines données de la littérature et de résultats préliminaires obtenus avant mon arrivée au laboratoire. Ces travaux, présentés en préambule du deuxième article de ce manuscrit, suggéraient un rôle protecteur de la TNX sur le développement du cancer du pancréas, dans un modèle de souris possédant une prédisposition au cancer du pancréas. Trois axes ont donc été définis : (1) la description du statut de la TNX dans des échantillons d'ADKP humains, (2) l'analyse *in vivo* de l'impact de l'absence de TNX dans la carcinogenèse pancréatique et (3) l'élucidation *in vitro* des effets cellulaires de la TNX sur des cellules tumorales pancréatiques. Au fil du temps et des résultats, ces axes ont évolué, et deux projets « annexes » ont été menés, et se concluent aujourd'hui par deux articles supplémentaires décrit ci-après.

Après avoir étudié le statut de la TNX dans des échantillons d'ADKP humains au travers de l'analyse *in silico* de bases de données et par immunohistochimie, nous avons élargi l'étude de l'expression de la TNX dans les 6 cancers les plus incidents et mortels au monde, ainsi que sur les quelques cancers pour lesquels des données éparses étaient pré-existantes dans la littérature. Ainsi, nous avons pu montrer que la TNX est significativement diminuée dans la plupart des cancers étudiés, à l'exception des tumeurs cérébrales, dans lesquelles elle semble augmentée. Ce travail parallèle au projet princeps a fait l'objet d'une publication dans le journal *Matrix Biology Plus* en Janvier 2020 (Liot *et al.*, 2020).

Afin de montrer *in vivo* l'impact de l'absence de TNX dans la carcinogenèse pancréatique, le modèle murin « KC », développant des lésions pré-tumorales pancréatiques, a été choisi. Lors de la génération de la cohorte de souris, nous avons mis en évidence un biais dans ce modèle, qu'il nous est paru essentiel de présenter. En effet, de manière inattendue, environ 10% des souris générées ont atteint précocement un ou plusieurs points limites, indépendamment de leur génotype au regard de la TNX (*Tnxb*^{+/+} ou *Tnxb*^{-/-}), ce qui a conduit à la mise à mort des animaux concernés. Après analyse de ces animaux, nous avons montré que l'atteinte de ces points limites était liée au développement d'une masse tumorale thymique qui influe grandement sur le développement des lésions pancréatiques. Ces travaux font l'objet du troisième article présenté dans cette thèse.

Dans mon étude princeps, j'ai donc pu montrer que la TNX était significativement dérégulée dans les tumeurs humaines d'ADKP comparativement aux tissus adjacents à la tumeur. Comme présenté ci-dessus, l'établissement de la cohorte de souris prédisposées au cancer du pancréas a mis en lumière un artéfact expérimental, et les souris concernées ont été écartées de la cohorte. Les souris restantes ont été analysées à différents temps, ce qui ne nous a pas permis de mettre en évidence la formation de véritables tumeurs pancréatiques, mais seulement des lésions pré-tumorales de bas et haut grades. Dans ce modèle, nous n'avons pas observé de disparition de TNX au cours de la carcinogénèse pancréatique, mais avons mis en évidence un dépôt de TNX autour des lésions de bas grade qui disparaissait ensuite dans les stades plus avancés, ce qui suggère un rôle plus fin de la TNX au cours de la carcinogénèse. Ces résultats mis en forme dans le deuxième article de ce manuscrit de thèse, une fois complétés avec des résultats en cours d'obtention (1) sur des coupes de patients et (2) sur des coupes de pancréas de souris à des stades plus avancés, feront l'objet d'une publication majeure.

La comparaison des souris prédisposées au cancer du pancréas et déficientes ou non en TNX, n'a pas permis de mettre en évidence un effet de l'absence de la TNX sur le développement et le phénotype des lésions pancréatiques. Ces résultats, ne pouvant faire l'objet d'une publication, seront présentés en discussion générale. Mes travaux sur le rôle de la TNX dans le cancer du pancréas ouvrent la porte à de nombreuses perspectives, et laissent à penser que la TNX pourrait être impliquée dans une réaction du tissu au développement de cellules (pré)tumorales, et/ou dans l'agressivité de ces cellules.

Comme exposé ci-dessus, plusieurs études, initialement non planifiées, ont émergé et ont été valorisées au cours de ma thèse, ce qui a grandement modifié la physionomie de celle-ci. Je n'ai donc pas pu développer le troisième axe d'étude *in vitro* des effets cellulaires de la TNX malgré la mise en place d'un modèle organotypique en 3 dimensions qui sera tout de même présenté dans la discussion générale.

Bien que semés d'embuches, ces travaux de thèse permettent finalement de souligner que la TNX est impliquée dans la biologie du cancer, mais son rôle précis reste à déterminer. Ces études ouvrent la porte à de nombreuses perspectives qui seront longuement abordées dans la discussion de ce manuscrit de thèse.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Tissu	Localisation	Fonctions	Cellules	Composants matriciels majoritaires
TC lâche	Sous les épithéliums, autour des vaisseaux,	Soutien aux autres tissus	Fibroblastes, adipocytes, mastocytes, cellules immunitaires	<u>Aréolaire</u> : collagène de types I et III, fibres élastiques <u>Réticulé</u> : collagène de type III
TC dense	<u>Régulier</u> : tendons, ligaments <u>Irrégulier</u> : derme	Soutien, protection, résistance, conduction des forces mécaniques	<u>Régulier</u> : cellules progénitrices, fibroblastes, cellules spécialisées <u>Irrégulier</u> : Fibroblastes, macrophages	<u>Régulier</u> : collagène de type I <u>Irrégulier</u> : collagène de type I, fibres élastiques, protéoglycanes, glycoprotéines
Cartilage	Oreilles, nez, os fœtaux, disques intervertébraux, etc.	Protection et soutien	Chondrocytes, chondroblastes	Fibres de collagènes et protéoglycanes, proportion variable selon le type de cartilage
Os	Squelette	Soutien de l'organisme, résistance, métabolisme du calcium, stockage d'ions minéraux	Ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes, cellules du revêtement osseux	Collagène de type I, protéines non collagéniques, hydroxyapatite
Tissu adipeux	Gras sous-cutané ou viscéral	Stockage d'énergie, protection, isolation, fonction endocrine	Adipocytes, pré-adipocytes	Collagènes fibrillaires et associés à des protéoglycanes, laminine, fibronectine
Sang	Organisme entier (circulation sanguine)	Transport (nutriments, gaz, déchets, hormones, etc), fonction immunitaire	Globules rouges, leucocytes, plaquettes	Matrice « liquide » (plasma) : eau, ions, protéines, hormones, nutriments, etc

Tableau 1 : Description des caractéristiques des différents types de tissus conjonctifs.

CHAPITRE 1 : Tissus conjonctifs et matrice extracellulaire

I. Description des tissus conjonctifs adultes

Les tissus conjonctifs (TCs) sont les tissus les plus abondants du corps humain par leur masse et sont présents à l'interface entre les tissus épithéliaux, nerveux et musculaires (Van Lommel, 2003). Les TCs sont dérivés du mésenchyme, tissu de soutien embryonnaire dérivé du mésoderme, et se distinguent des autres tissus par leur composition particulière (Nezwek and Varacallo, 2020). En effet, ils sont formés de cellules non jointives dispersées dans une matrice extracellulaire (MEC) dite « interstitielle », produite par ces dernières.

Les TCs partagent de grandes fonctions communes de structure, soutien et/ou protection des autres tissus et organes, et participent au développement et à la réparation tissulaire. Ils constituent donc un élément indispensable à l'homéostasie tissulaire (Shekhter, 1986).

A. Différents types de tissus conjonctifs et fonctions associées

Les TCs sont une famille de tissus présentant une grande diversité. En effet, selon les protéines structurales présentes dans la MEC (qui seront abordées plus en détails par la suite) et leur organisation, plusieurs types de TCs existent, dont les caractéristiques sont résumées dans le **Tableau 1**.

Les TCs dits « à proprement parler » sont les plus répandus et les moins spécialisés. Parmi ceux-ci, les TCs lâches sont les TCs majoritaires, présents à l'interface entre les tissus de nombreux organes. Ils peuvent être réticulés ou aréolaires selon l'organisation ou non, respectivement, des fibres de collagène qui les composent, et exercent une fonction de cohésion tissulaire, ainsi qu'un rôle de communication, puisqu'ils contiennent nerfs et vaisseaux sanguins (Ragan, 1952).

Les TCs denses présentent plus de fibres et moins de substance fondamentale, structures qui seront détaillées ci-après. Selon l'organisation des fibres, on en distingue 2 types : réguliers (fibres alignées, dans les tendons et ligaments) ou irréguliers (entrelacement complexe des fibres, dans le derme et la capsule de certains organes) (Jiang and Lu, 2013; Jiang, Tong and Lu, 2014). La composante cellulaire de ces TCs est majoritairement composée (1) de cellules progénitrices ou souches (ténoblastes par exemple dans le tendon) nécessaires à la plasticité et à la capacité de réparation de ces tissus (Leong *et al.*, 2020), (2) d'une population hétérogène de fibroblastes (TCs denses irréguliers) (Sorrell and Caplan, 2004) qui produisent une matrice hétérogène et participent à la plasticité et la réparation tissulaire, lorsque nécessaire, et (3) de cellules spécialisées (ténocytes par exemple dans le tendon). Par l'organisation de la MEC, les TCs denses possèdent une fonction de résistance à l'étirement (réguliers) (Aparecida de Aro, de Campos Vidal and Pimentel, 2012) et de soutien (irréguliers).

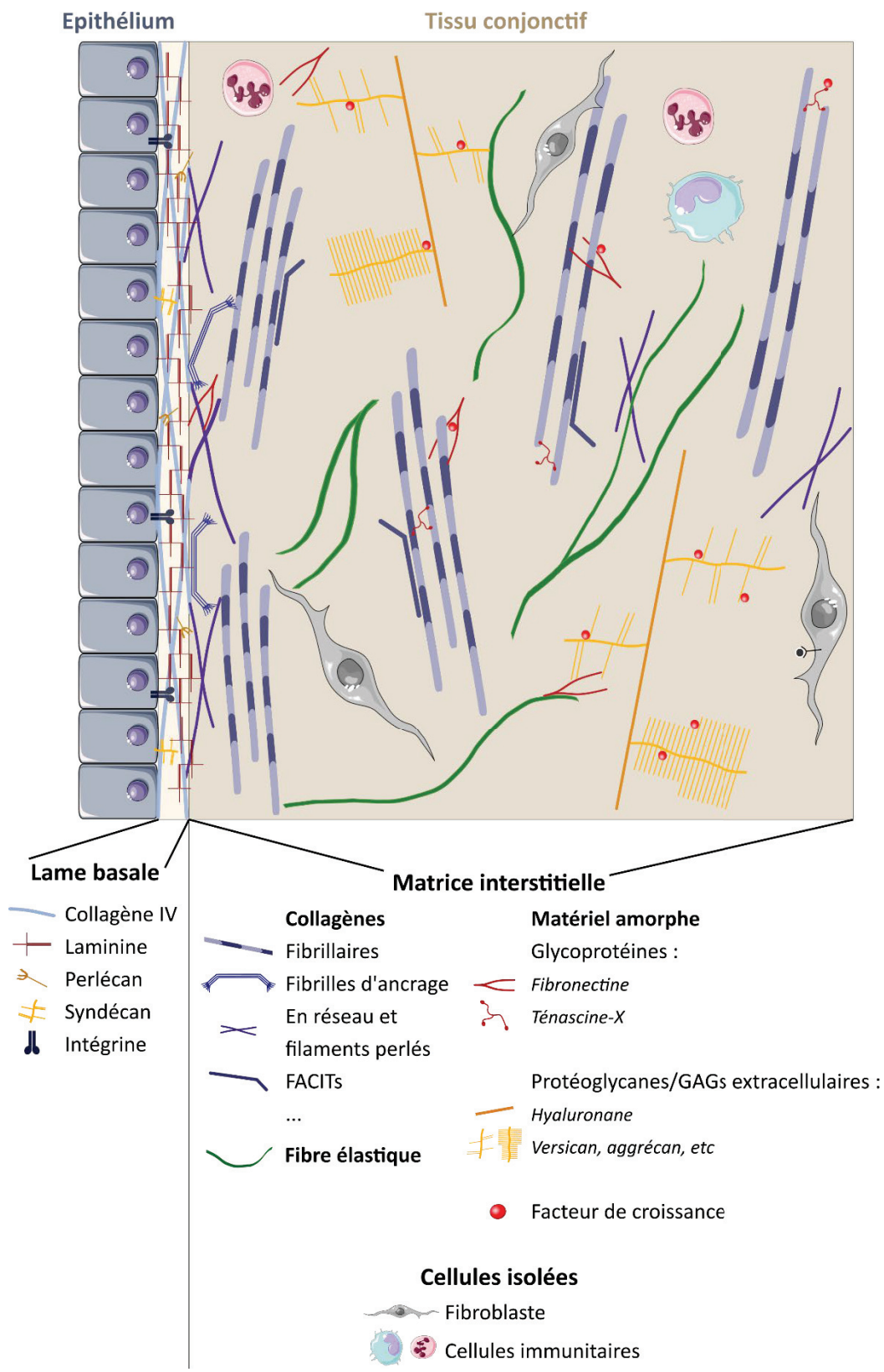


Figure 1 : Représentation schématique simplifiée de la composition et de l'organisation de la lame basale et de la MEC interstitielle sous-jacente (tissu conjonctif sous-épithélial) (inspiré de (Theocharis, Manou and Karamanos, 2019) ainsi que du manuscrit de thèse d'A. Aubert)

Enfin, certains TCs présentent une composition et des propriétés très particulières, leur donnant une fonction spécifique, dont le cartilage, l'os, le tissu adipeux et le sang, ce dernier étant considéré comme un TC liquide (**Tableau 1**).

B. Composition des tissus conjonctifs

1. Cellules des tissus conjonctifs

Les cellules des TCs sont peu nombreuses et se présentent en deux grands sous-types : les cellules résidentes et les cellules dérivées du sang ([Van Lommel, 2003](#)).

Les cellules résidentes les plus communes sont les fibroblastes, une population hétérogène de cellules dont le rôle principal est la production de la MEC environnante ([Dick, Miao and Limaïem, 2020](#)). En plus d'assurer sa production, les fibroblastes régulent la tension de la MEC, ayant ainsi un rôle biomécanique ([Langevin, Nedergaard and Howe, 2013](#)). Dans les TCs spécialisés, ces fonctions peuvent être assurées par des cellules spécialisées, présentées dans le **Tableau 1**. Les TCs peuvent aussi comporter des cellules adipeuses, ayant un rôle de stockage d'énergie ainsi que des cellules progénitrices qui assurent aux TCs une plasticité en cas de dommage ([Muschler and Midura, 2002](#)).

Les cellules dérivées du sang retrouvées dans les TCs sont des cellules de l'immunité. Elles comprennent des macrophages, des granulocytes et des mastocytes, en faible quantité dans un contexte homéostatique. En cas de dommage ou d'infection, un fort recrutement se fait depuis le sang, menant à l'infiltration d'un plus grand nombre de ces cellules, ainsi que d'autres types cellulaires tels que des lymphocytes.

2. La matrice extracellulaire et ses protéines structurales

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau de macromolécules structurales composé de fibres insolubles (fibres de collagènes et fibres élastiques) et d'une substance fondamentale amorphe formée par des protéoglycanes et des glycoprotéines (**Figure 1**) ([Yue, 2014](#); [Theocharis et al., 2016](#)). La composition de la MEC est spécifique de chaque tissu et adaptée à sa fonction. Le matrisome, ensemble des protéines de la MEC et des protéines associées à la MEC, comporte près de 1100 protéines ([Hynes and Naba, 2012](#); [Naba et al., 2016](#)), avec environ 300 protéines structurales (« core matrisome »), dont les grandes familles seront présentées dans le **Tableau 2**. Dans ce réseau, les fibres permettent de donner à la MEC, sa structure, sa résistance et son élasticité. La substance fondamentale le stabilise, le remplit et permet son hydratation. La MEC assure ainsi une structure et un support aux cellules pour leur adhérence et leur migration. En outre, c'est un réservoir de facteurs solubles tels que des facteurs de croissance ou cytokines.

La lame basale est quant à elle une fine couche de MEC spécialisée acellulaire séparant les TCs des autres types de tissus. Elle est principalement constituée de collagène IV et de laminines, ainsi que d'autres collagènes (de type VII, XVIII et XV), de protéoglycanes à sulfate d'héparane (perlécan, agrine), de glycoprotéines (nidogène, fibronectine) et de protéines solubles (Pozzi, Yurchenco and Iozzo, 2017; Randles, Humphries and Lennon, 2017). Déposée au cours du développement, elle représente un espace asymétrique d'ancrage et d'échanges à l'interface entre un tissu et le TC sous-jacent (**Figure 1**).

a. Collagènes

Les collagènes sont les composants majoritaires des TCs et représentent près de 30% de la masse totale de protéines de l'organisme. La superfamille des collagènes comporte 28 membres (Gelse, Pöschl and Aigner, 2003; Ricard-Blum, 2011), dont la structure commune est formée d'une triple hélice composée par l'association homo- ou hétérotypique de chaînes α parmi 46 existantes. Cette triple hélice est sécrétée sous forme de « pro-collagène » s'associant directement, ou dont les extrémités N- et C-terminales devront être clivées, afin de permettre l'association des collagènes en divers assemblages supramoléculaires (**Tableau 2**) (Arseni, Lombardi and Orioli, 2018). En outre, les collagènes peuvent comporter un ou plusieurs domaines supplémentaires, parmi lesquels des domaines thrombospondine (TSP), fibronectine de type III, facteur von Willebrand A, etc.

Les collagènes fibrillaires représentent 70% des collagènes totaux et sont structurellement majoritaires. Leurs triples hélices s'associent par liaison covalente en quinconce afin de former des fibrilles, qui s'agrègeront pour donner les fibres pouvant comporter différents types de collagène. Parmi les autres classes de collagène, on distingue (1) les FACITs (Fibrils-Associated Collagens with Interrupted Triple helices), associés à la surface des fibres de collagène ; (2) les collagènes formant des réseaux (hexagonaux ou en maille) ; (3) les collagènes transmembranaires ; (4) les fibrilles d'ancrage ; (5) les filaments perlés et (6) les MULTIPLEXINS (multiple triple-helix domains and interruptions).

Au regard des diverses conséquences pathologiques dues à une altération dans différents types de collagène, il apparaît que ces molécules ont un rôle prépondérant dans l'homéostasie tissulaire (Arseni, Lombardi and Orioli, 2018; Karsdal *et al.*, 2020).

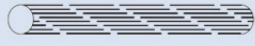


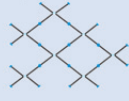

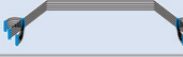

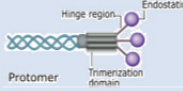
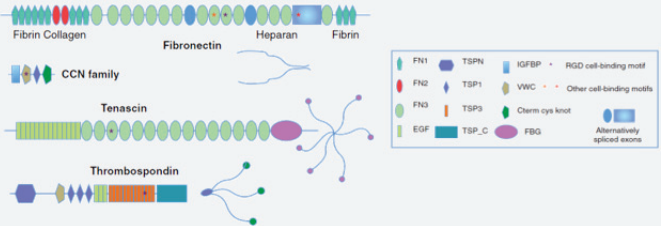

	Sous-familles	Types	Assemblage
COLLAGÈNES	Collagènes fibrillaires	I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII	
	FACITs	IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII	
	Collagènes formant des réseaux	Réseaux hexagonaux (1) : VIII et X En maille (2) : IV	(1)  (2) 
	Collagènes transmembranaires (ou MACITs)	XIII, XVII, XXIII et XXV	
	Fibrilles d'ancrage	VII	
	Filaments perlés	VI, XXVI, XXVIII	
	MULTIPLEXINs	XV et XVIII	
FIBRES ÉLASTIQUES	Fibrillin 1 Fibrillin 2 MAGP 1 Decorin Fibulin 5	Other molecules: MAGP 2 LTBPs MFAPs Fibulins Emilins LOXs	Elastin Forming elastic fibers EBP Tropoelastin
PROTÉOGLYCANES	Extracellulaires	Péricellulaires	De surface et intracellulaires
	Hyalectans Aggrecan Versican (V ₁ , V ₂ , V ₃ , V ₄) Neurocan Brevican	Perlecan Agrin Collagen XV Collagen XVIII	Cell surface Syndecans 1-4 Glypicans 1-6 Betaglycan CSPG4 Phosphacan
	SLRPs KS Fibromodulin or Lumican Biglycan N-linked glycans Decorin CS/DS	Collagen XVIII Interrupted triple-helical domain	Intracellular Seryglycin HS/Hep CS/DS Seryglycin Secretory granules
GLYCOPROTÉINES	Exemples de structure modulaire		Laminines (hétérotrimères)
			

Tableau 2 : Représentation schématique et classification des 4 grands types de macromolécules matricielles (Ricard-Blum, 2011; Hynes and Naba, 2012; Theocharis et al., 2016; Weihermann et al., 2017; Karamanos et al., 2018; Hohenester, 2019).

b. Fibres élastiques

Les fibres élastiques sont des assemblages supramoléculaires comprenant différents partenaires (**Tableau 2**), mais dont la synthèse reste mal comprise. L'élastine, leur composant principal, est un monomère codé par un gène unique, pouvant être alternativement épissé et donner lieu à plusieurs variants ([Weihermann et al., 2017](#)). Elle est produite et sécrétée sous forme de tropoélastine, monomère précurseur soluble. Ces monomères se « pré-assemblent » entre eux avant de s'agréger à des microfibrilles, assemblage de diverses protéines (fibrillines, fibulines, décorine, etc) servant de guide au bon alignement des tropoélastines ([Mithieux and Weiss, 2005](#)). Une fois formées, ces fibres assurent l'élasticité des tissus conjonctifs qui dépend de l'abondance en fibres élastiques et du type de variant de tropoélastine qui les composent.

c. Protéoglycanes

Les protéoglycanes (PGs) sont l'assemblage d'un cœur protéique et d'une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) ([Karamanos et al., 2018](#)). Le cœur protéique est composé d'une glycoprotéine spécifique à chaque PG, parmi 33 existantes. Les GAGs sont des polysaccharides linéaires composés de répétitions de disaccharides ([Gandhi and Mancera, 2008](#)). Les plus connus sont de 4 types : sulfate d'héparane, sulfate de chondroïtine/dermatane, sulfate de kératane et hyaluronane (ou acide hyaluronique), ce dernier étant le seul GAG non sulfaté et non attaché à un cœur protéique. Les GAGs sont chargés négativement, ce qui leur permet d'attirer les ions positifs et de retenir l'eau autour d'eux. Il existe plusieurs types de PGs, classés selon leur localisation (intracellulaire, membranaire, péricellulaire ou extracellulaire) (**Tableau 2**) ([Couchman and Pataki, 2012](#); [Iozzo and Schaefer, 2015](#)), ou selon leur capacité d'agrégation. A un niveau d'assemblage supérieur, les PGs agrégants (*ex* : agrécane) sont capables de se lier de manière non covalente en plus ou moins grande quantité sur une molécule d'acide hyaluronique.

Ainsi, les PGs assurent une fonction d'hydratation et de « remplissage » au sein de la MEC. Certains peuvent également interagir avec les fibres de collagène afin de former un réseau et stabiliser la structure de la MEC ([Scott, 1988](#)).

d. Glycoprotéines

Les glycoprotéines sont des protéines glycosylées, présentes en plus faible proportion au sein de la MEC, mais tout aussi importantes au niveau fonctionnel. Ces protéines sont une famille de près de 200 macromolécules solubles présentant une structure modulaire (glycoprotéines multi-domaines) (**Tableau 2**) (Hynes and Naba, 2012). Certaines possèdent un rôle architectural au sein de la MEC, dont notamment les 2 types de glycoprotéines les plus connues : les laminines et la fibronectine, qui seront détaillées ci-après. En outre, cette grande famille comporte un groupe de protéines extracellulaires nommées protéines matricielles, qui ne présentent, pour la plupart, pas de rôle structural mais plutôt un rôle de modulation du comportement cellulaire (Bornstein and Sage, 2002; Murphy-Ullrich and Sage, 2014). Ce groupe d'une vingtaine de protéines comprend notamment l'ostéopontine, l'ostéonectine (SPARC), la périostine ou encore les ténaïscines, qui seront présentées plus amplement dans ce manuscrit (Mecham, 2012) et dont l'appartenance à cette sous-famille de protéines reste à discuter.

Certaines glycoprotéines peuvent être ubiquitaires, tandis que d'autres sont spécifiques à un tissu ou une structure particulière (lame basale, système nerveux, système vasculaire, os/cartilage/dents). Par leur diversité, elles exercent donc de nombreuses fonctions structurales et cellulaires, dont la capacité à lier et à réguler la biodisponibilité de facteurs de croissance.

i. Fibronectine et laminines

La fibronectine est un dimère de glycoprotéines pouvant s'assembler en multimères, sous forme de microfibrilles. Chaque monomère est composé de 3 types de domaines répétés (FNI, FNII et FNIII), chacun possédant une structure secondaire différente (Singh, Carraher and Schwarzbauer, 2010). La fibronectine est sécrétée de manière ubiquitaire dans la MEC, par différents types cellulaires. Elle serait une « colle » au sein de la matrice, par sa capacité à interagir avec un grand nombre de protéines matricielles, notamment avec les fibres de collagène (Zollinger and Smith, 2017). De plus, elle se lie à des récepteurs cellulaires de surface et peut interagir avec des facteurs de croissance, ayant ainsi des rôles multiples au sein de la MEC (Theocharis *et al.*, 2016).

Les laminines sont quant à elles une famille de 20 glycoprotéines s'associant en hétérotrimères formés des sous-unités α , β et γ , chacune ayant 3 à 5 isoformes (Theocharis *et al.*, 2016; Hohenester, 2019). Elles peuvent interagir entre elles pour former un réseau, ainsi que s'associer avec d'autres protéines de la MEC, comme certains PGs (agrine, perlécan, etc), le collagène de type IV dans la lame basale et des récepteurs cellulaires de surface (Durbeej, 2009). Les laminines sont considérées comme des protéines d'adhérence cellulaire, fortement associées aux cellules et majoritairement présentes dans les lames basales.

	Découverte et synonymes	Références
Ténascine-C	Glioma mesenchymal extracellular matrix antigen (GMEM) Myotendinous antigen Cytotactin J1 glycoprotein Tenascin	Bourdon et al, 1983 Chiquet et Fambrough, 1984 Grumet et al, 1985 Kruse et al, 1985
Ténascine-R	J1 160 / J1 180 Restrictin	Pesheva et al, 1989, Fuss et al, 1993 Rathjen et al, 1991, Noremborg et al, 1992, Brummendorf et al, 1993
Ténascine-X	Human gene X Tenascin-Y Tenascin-X	Morel et al, 1989 Hagos et al, 1996 Bristow et al, 1993
Ténascine-W	Tenascin-W Tenascin-N	Weber et al, 1998, Scherberich et al, 2004, Degen et al, 2007 Neidhardt et al, 2003

Tableau 3 : Historique des découvertes concomitantes des différentes TNs, et noms associés (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2011)

ii. Ténascines

Les ténascines (TNs) sont une famille de 4 glycoprotéines matricielles (Ténascine-C, -R, -X, -W) (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2011). La Ténascine-C (TNC, pour « cytotactin ») a été mise en évidence au début des années 1980, suivie de la Ténascine-R (TNR, pour « restrictin ») en 1985, puis de la Ténascine-X (TNX), qui tient son nom du gène inconnu « gène X » découvert au sein dans la région du MHC de classe III dans les années 1990. Enfin, la Ténascine-W (TNW) fut la dernière découverte, chez le poisson zèbre à la fin des années 1990. Plusieurs laboratoires ont décrit les TNs de manière concomitante, leur donnant des noms spécifiques avant d'aboutir à la nomenclature actuelle, c'est pourquoi la littérature présente ces mêmes protéines sous différents noms (**Tableau 3**). Les quatre TNs possèdent une structure modulaire commune qui sera détaillée dans une partie dédiée.

Ainsi, la MEC est composée d'un grand nombre de protéines qui lui confèrent une structure complexe faite de réseaux et d'interactions nécessaires à ses diverses fonctions.

II. Fonctions cellulaires de la MEC

Historiquement, la MEC a d'abord été considérée comme une structure inerte, servant uniquement de support aux cellules et tissus, et n'ayant donc qu'un rôle architectural. Les molécules matricielles précédemment présentées forment un réseau complexe de macromolécules en trois dimensions (3D) (Theocharis *et al.*, 2016). Ainsi, les fibres de collagène sont les « rails » du réseau, entrecroisées et liées par d'autres collagènes et des molécules telles que des glycoprotéines (fibronectine, laminines, TNX) ou certains PGs. Les fibres élastiques apportent de plus à ce réseau l'élasticité nécessaire au tissu qu'il soutient. La MEC forme donc un squelette architectural sous de nombreux tissus et autour des cellules présentes en son sein.

Cependant, les fonctions de la MEC se sont considérablement étendues au cours de la découverte de ses constituants et de leurs interactions (Bosman and Stamenkovic, 2003), et il est maintenant clair que ses rôles vont bien au-delà d'une simple architecture (**Figure 2**) (Hynes, 2009; Yue, 2014). Au cours de cette partie, ces différentes fonctions seront abordées de manière générale dans un contexte physiologique. Plus de détails et d'exemples seront donnés par la suite dans l'implication de la MEC dans différents processus physiopathologiques, dont la tumorigenèse.

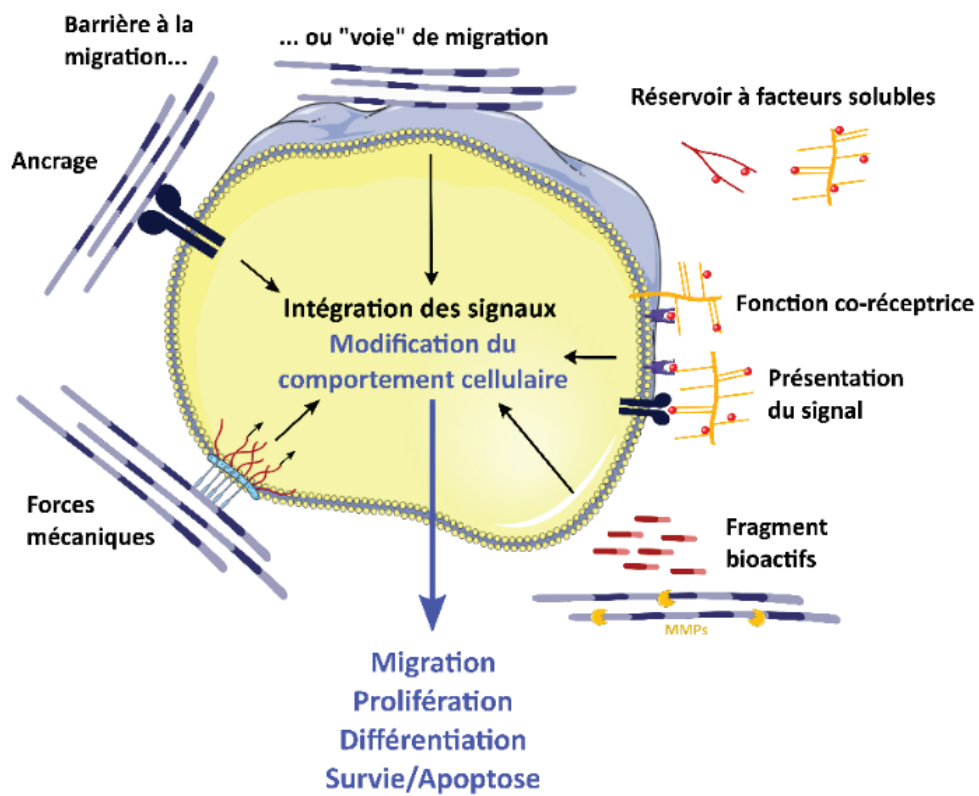


Figure 2 : Propriétés de la MEC impliquées dans la modulation du comportement cellulaire (inspiré de (Rozario and DeSimone, 2010; Kular, Basu and Sharma, 2014; Wang et al., 2020))

A. Les intégrines, à l'interface cellule – matrice

Les intégrines sont des récepteurs cellulaires de surface hétérodimériques, formés d'une chaîne α et d'une chaîne β , de nature variable selon le type cellulaire (Bachmann *et al.*, 2019). Du côté intracellulaire, elles sont liées au cytosquelette, ainsi qu'à des protéines impliquées dans la transduction du signal. Du côté extracellulaire, elles interagissent avec plusieurs types de protéines de la MEC, dont les laminines, la fibronectine et certains types de collagène. Elles participent ainsi à différentes structures d'adhérence telles que les hémidesmosomes et les complexes d'adhérence focale et sont nécessaires à l'adhérence cellulaire (Kadry and Calderwood, 2020).

D'un point de vue fonctionnel, les intégrines représentent une plateforme d'échanges bidirectionnels entre cellule et matrice. En effet, la cellule conditionne sa capacité à interagir avec la MEC par la nature des intégrines qu'elle présente à sa surface, modulant ainsi son adhérence et sa réponse aux signaux extracellulaires. De plus, par leur interaction avec les protéines de la MEC, les intégrines sont impliquées dans l'assemblage et l'organisation de la MEC (Bachmann *et al.*, 2019), processus ainsi contrôlé par les cellules. D'autre part, les intégrines sont des biosenseurs environnementaux des propriétés biomécaniques de la MEC (Kechagia, Ivaska and Roca-Cusachs, 2019), modulant les réponses cellulaires en lien direct avec le cytosquelette cellulaire. Elles sont aussi des récepteurs aux protéines structurales de la MEC, activant des voies de signalisation telles que NF- κ B, AKT ou Ras (Kadry and Calderwood, 2020), et peuvent avoir une fonction de corécepteur pour la signalisation de facteurs solubles. Sans oublier l'existence d'autres récepteurs aux protéines de la MEC (syndécan, par exemple) (van Dijk, Göransson and Strömblad, 2013), les intégrines sont donc des médiateurs clés dans le dialogue MEC–cellule et les effets cellulaires des protéines de la MEC.

B. Effets des molécules de la MEC sur le comportement cellulaire

1. Support d'ancrage pour l'adhérence et la migration cellulaire

Outre un rôle architectural et de soutien, la MEC a une fonction de support pour l'ancrage, et la migration des cellules. En effet, elle permet l'adhérence cellulaire, mécanisme bidirectionnel dynamique impliquant des structures liant cellule et MEC (Geiger *et al.*, 2001; Geiger and Yamada, 2011). D'une part, l'adhérence cellulaire est régulée par la cellule, qui module le type de points de contact et de récepteurs qu'elle met en place à sa surface. D'autre part, la composition et les propriétés mécaniques de la MEC jouent un rôle dans les capacités d'adhérence des cellules. Certaines protéines matricielles (thrombospondine, TNs, SPARC) sont d'ailleurs connues pour réguler cette capacité d'adhérence (Orend and Chiquet-Ehrismann, 2000). En outre, la modulation de l'adhérence cellulaire permet à la MEC d'influencer indirectement d'autres processus cellulaires tels que la prolifération et la survie

cellulaire (Katz and Streuli, 2007), ainsi que les capacités migratoires des cellules. En effet, la migration cellulaire est un processus dynamique dépendant de la topologie de la MEC. Au cours de ce processus, la cellule se « tracte » sur la MEC en alternant les cycles d'adhérence – détachement (migration mésenchymateuse, protéolytique) (Heisenberg and Fässler, 2012), ou s'adapte/se « faufile » entre les protéines matricielles (migration amiboïde) (Wolf and Friedl, 2011).

2. Importance des propriétés biomécaniques de la MEC

Le réseau que forme la MEC possède des propriétés biomécaniques dépendantes de sa composition. En effet, la proportion en fibres élastiques, fibres de collagène et PGs influence ses caractéristiques élastiques, de rigidité et de résistance. Le cytosquelette des cellules, via les intégrines, est en lien direct avec la MEC, et est donc influencé par les forces en présence. La manifestation majeure de ce lien est le contrôle de la forme cellulaire par la rigidité matricielle (Muncie and Weaver, 2018). De plus, ces mêmes forces peuvent jouer le rôle de signaux extracellulaires (« stress » mécanique) interprétés par les cellules par mécano-transduction (Humphrey, Dufresne and Schwartz, 2014). Les cellules sont donc capables d'adapter leur comportement aux propriétés biomécaniques de la MEC environnante, qui lui sont apportées par les propriétés intrinsèques de chaque composant matriciel et par leur organisation. De nombreuses études ont ainsi démontré l'effet de ces propriétés dans les grandes fonctions cellulaires (Janson and Putnam, 2015) telles que la différenciation des cellules souches (Reilly and Engler, 2010), la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Scott, Weinberg and Lemmon, 2019), ainsi que sur leur prolifération, apoptose, migration et organisation au sein des tissus (Wang *et al.*, 2020). Ceci montre donc la nécessité de prendre en compte non seulement la composition moléculaire, mais aussi l'aspect tri-dimensionnel et physique de la MEC.

3. Protéines de la MEC : des molécules informatives et régulatrices de signaux

Par interaction avec des récepteurs cellulaires, les molécules de la MEC peuvent également influencer directement sur le comportement cellulaire (Hynes, 2009), en activant de nombreuses voies de signalisation (van Dijk, Göransson and Strömblad, 2013). Cette capacité à moduler le comportement cellulaire est partagée par un grand nombre de protéines matricielles (Kular, Basu and Sharma, 2014; Theocharis *et al.*, 2016), y compris les protéines structurales telles que les collagènes (Ricard-Blum, 2011), les PGs (qui possèdent de grandes capacités d'interaction) (Karamanos *et al.*, 2018) ou encore la fibronectine (connue comme l'un des ligands principaux des intégrines). En outre, les protéines matricielles, définies comme telles, agissent directement sur les cellules afin de modifier un grand nombre de processus cellulaires clés (Adams, 2018).

La MEC peut ainsi modifier directement la prolifération et la survie cellulaire (Rodeck, 2004), la migration et l'invasion cellulaire, les propriétés des cellules souches (Brizzi, Tarone and Defilippi, 2012; Chermnykh, Kalabusheva and Vorotelyak, 2018), ainsi que la différenciation et la morphologie cellulaire (Reilly and Engler, 2010; Scott, Weinberg and Lemmon, 2019).

Les effets cellulaires de la matrice s'expliquent également par son rôle de réservoir à cytokines et facteurs de croissances (Tran, Griffith and Wells, 2004; Hynes, 2009). En effet, la MEC a été identifiée comme un centre de régulation des signaux extracellulaires, par sa capacité à séquestrer les facteurs solubles, et à ne les relarguer et/ou les activer qu'en réponse à un stimulus afin qu'ils puissent se fixer à leurs récepteurs cellulaires (Kim, Turnbull and Guimond, 2011). Ainsi, les protéines matricielles influencent indirectement de nombreux processus cellulaires (Wilgus, 2012). La régulation du TGF β (Transforming Growth Factor β) en est l'exemple le plus parlant. Le TGF β est un facteur de croissance sécrété sous forme inactive TGF β -LAP (« small latent complex ») couplé à la protéine LTBP (Latent TGF β Binding Protein), formant ainsi le « large latent complex ». Le small ou le large latent complex peuvent interagir avec certaines protéines matricielles telles que la TNX, la thrombospondine-1 (TSP-1) ou la fibronectine et être ainsi séquestrés dans la MEC. Un relargage impliquant une activation sera alors possible par protéolyse du LAP ou changement conformationnel en réponse à un stimulus (Annes, 2003; Munger and Sheppard, 2011; Murphy-Ullrich and Sage, 2014).

III. Implication de la MEC dans l'homéostasie tissulaire

A. Importance physiologique de la MEC

1. Plasticité de la MEC : un compartiment dynamique

La MEC est une structure dynamique pouvant être remodelée de manière contrôlée, en réponse à un stimulus ou en cas de dommage tissulaire. Au cours du développement, de la réparation tissulaire ou de processus physiopathologiques, l'environnement cellulaire doit en effet être modifié afin que les cellules puissent adapter leur comportement. Le remodelage de la MEC comprend plusieurs procédés, dont la dégradation des protéines structurales d'une part, et leur réorganisation d'autre part (Karamanos, 2019).

La dégradation des protéines de la MEC est assurée par différents types de protéases (Ricard-Blum and Vallet, 2016), dont les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont les principales enzymes (Mauch, Krieg and Bauer, 1994). Les MMPs forment une famille de 28 endopeptidases réparties en plusieurs sous-familles selon le substrat qu'elles sont capables de cliver (collagénases, gélatinases, matrilysines, stromélysines et MMPs à motif furine) (Cui,

Hu and Khalil, 2017). Parmi les MMPs à motif furine, certaines sont associées à la membrane par un domaine transmembranaire ou une séquence d'ancrage, ce qui leur permet d'assurer la dégradation de la MEC péri-cellulaire. Les MMPs peuvent être produites par de nombreux types cellulaires, principalement des cellules des TCs et du système immunitaire, et dans de nombreux tissus et organes.

En outre, plusieurs autres types de protéases sont impliqués dans le remodelage de la matrice (Bonnans, Chou and Werb, 2014; Theocharis *et al.*, 2016). Les adamalysines – comprenant les ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) et ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) – et les méprines sont des métalloprotéases ciblant des protéines de la MEC, impliquées dans le dépôt de la MEC ou dans l'activation d'autres protéases. Le système plasminogène est quant à lui composé d'enzymes de type protéase à sérine, comprenant notamment les furines. Enfin, les cathepsines forment une grande famille d'endo- et exopeptidases de trois types : protéases à sérine, protéases à acide aspartique et protéases à cystéine.

D'une manière générale, ces protéases sont sécrétées par les cellules sous forme inactive (zymogènes), puis sont clivées par d'autres protéases afin d'être activées. L'activité des protéases est un processus hautement régulé (Stamenkovic, 2003), afin d'éviter une dégradation trop importante de la MEC, et ce à différents niveaux : (1) transcriptionnel, (2) lors de l'activation et (3) par inhibition (TIMPs, tissue inhibitor of metalloproteinases, pour les MMPs et ADAM(TS)) (Lambert *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2011).

Le remodelage de la MEC est particulièrement important dans la régulation de processus physiologiques, comme au cours du développement embryonnaire notamment. La mauvaise régulation des protéases, dans un sens ou dans l'autre, peut mener à un déséquilibre de l'homéostasie tissulaire et à l'apparition de diverses situations pathologiques (Bonnans, Chou and Werb, 2014). De plus, la dégradation de la MEC entraîne d'une part la libération de facteurs solubles (Wilgus, 2012), et d'autre part le relargage de fragments de protéines de la MEC, nommés matrikines (Ricard-Blum and Salza, 2014; Ricard-Blum and Vallet, 2016, 2019). Ces facteurs solubles et matrikines agissent directement sur des récepteurs de surface, leur permettant également de moduler le comportement cellulaire (Streuli, 1999; Lu *et al.*, 2011).

2. Implications physiologiques et pathologiques de la MEC

La dynamique régulée de la MEC et la fonctionnalité des protéines qui la composent permettent à la matrice de jouer un rôle important au cours de processus physiologiques et pathologiques. Les pathologies associées à un défaut dans la matrice sont nombreuses (ostéogenèse imparfaite, syndrome d'Ehler-Danlos, *etc*) et sont le témoignage de l'importance de la MEC dans l'homéostasie tissulaire (Bateman, Boot-Handford and Lamandé, 2009).

a. Implication de la MEC au cours du développement et de la réparation tissulaire

La MEC joue un rôle clé dans des processus tissulaires impliquant par exemple la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaire, tels que le développement et la réparation tissulaire.

En effet, de nombreuses protéines matricielles sont impliquées au cours du développement, de l'embryogenèse précoce à l'organogenèse. Par exemple, chez la souris, la déficience en certains collagènes, protéoglycanes, laminines ou même encore en fibronectine, entraîne des défauts de développement (Tsang *et al.*, 2009). Ainsi, l'intégrité de la MEC en termes de composition et de structure est nécessaire au bon développement tissulaire. Dans ce contexte, les interactions cellule-matrice sont particulièrement importantes, notamment pour la fonction de support de la MEC, pour la régulation de la signalisation extracellulaire (facteurs de croissance et morphogénétiques) ainsi que pour la régulation de la TEM ou des niche de cellules souches (Tsang *et al.*, 2009). Les propriétés biomécaniques et biologiques de la MEC, ainsi que leur dynamique (Lu *et al.*, 2011; Bonnans, Chou and Werb, 2014), constituent donc les déterminants nécessaires au cours du développement de l'organisme.

La réparation tissulaire fait généralement appel aux mêmes processus cellulaires que le développement. Il apparaît donc évident de considérer que la composition et la structure physique de la MEC jouent un rôle important dans ce contexte. Dans le cas particulier de la cicatrisation, plusieurs propriétés de la MEC se sont révélées indispensables, dont ses propriétés mécaniques (force et élasticité) (Tomasek *et al.*, 2002) et le relargage de facteurs de croissance (Briquez, Hubbell and Martino, 2015). Les protéines matricielles sont également particulièrement impliquées dans les différentes étapes de la réparation tissulaire (réponse précoce à la blessure, inflammation, ré-épithélialisation) (Midwood, Williams and Schwarzbauer, 2004a). De surcroît, la réparation tissulaire nécessite un fort remodelage de la MEC afin de permettre aux cellules de reconstituer au mieux le tissu endommagé. Il permettra notamment (1) de guider le comportement des cellules (influence des protéines matricielles nouvellement déposées, facteurs relargués, *etc*) (Streuli, 1999; Tomasek *et al.*, 2002; Briquez, Hubbell and Martino, 2015), (2) de mettre en place une matrice « provisoire » favorisant la migration cellulaire et (3) de déposer par la suite une nouvelle matrice adaptée, nécessaire à l'homéostasie du tissu réparé.

b. Altérations de la MEC et pathologies associées

L'altération de protéines de la MEC est observée dans une grande majorité de pathologies humaines, qu'elle en soit une cause (mutations, défaut de remodelage) ou une conséquence (fibrose) (Iozzo and Gubbiotti, 2018).

De nombreuses mutations dans des gènes codant des protéines matricielles ont été rapportées, associées à de nombreuses pathologies telles que différents sous-types du syndrome d'Ehlers-Danlos (*COL5A1*, *COL5A2*, *COL3A1*, *COL1A1*, *COL1A2*, *TNXB*, etc.), l'ostéogenèse imparfaite (*COL1*) ou des dystrophies musculaires congénitales (*LAMA2*), par exemple (Bateman, Boot-Handford and Lamandé, 2009; Theocharis, Manou and Karamanos, 2019). Des altérations de la structure, de l'assemblage ou du remodelage des collagènes sont aussi responsables d'anomalies squelettiques, musculaires, d'ouïe et de vue, de la peau, etc (Arseni, Lombardi and Orioli, 2018). Ainsi, des modèles murins déficients pour diverses protéines de la MEC ont permis de mettre en évidence l'importance physiologique de ces protéines, ainsi que la large palette de leurs fonctions (Gustafsson and Fässler, 2000).

De plus, des changements dans la composition et l'organisation de la MEC ont pu être observés comme une conséquence d'un grand nombre de pathologies telles des maladies pulmonaires, plusieurs cancers, la maladie d'Alzheimer ou en cas d'obésité (Sonbol, 2018), résultat d'un remodelage mal régulé. Une accumulation de matrice (nommée fibrose), due à une dégradation insuffisante ou à un excès de production de protéines matricielles peut également affecter les caractéristiques physiques et biochimiques de la MEC et donc du tissu. Ces lésions fibrotiques peuvent être initiées par des dommages récurrents ou une réparation tissulaire anormale dans une grande majorité d'organes et de tissus, pouvant mener à leur dysfonction (Wight and Potter-Perigo, 2011; Theocharis *et al.*, 2016). Preuve s'il en faut encore que la MEC soit au centre de ces processus pathologiques, il est maintenant accepté qu'elle agit sur le comportement cellulaire pour diriger la progression fibrotique.

Ces altérations peuvent également être observées dans plusieurs cancers, qui développent un microenvironnement matriciel (ou stromal) particulier. En effet, une réaction desmoplastique, *i.e.* dépôt excessif de matrice extracellulaire autour des cellules, a été observée dans de nombreuses tumeurs. L'importance des protéines de la MEC dans ce microenvironnement tumoral et sur la progression tumorale a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années.

B. Implications des protéines de la MEC dans la tumorigenèse

Longtemps, le cancer a été étudié comme une maladie de la cellule tumorale et associé à l'accumulation de mutations. Il est maintenant établi que l'environnement des cellules tumorales joue un rôle prépondérant dans l'initiation, la progression et l'invasion tumorale (Allen and Jones, 2011; Walker, Mojares and Del Río Hernández, 2018).

1. Mise en place du microenvironnement tumoral

Dans la plupart des tumeurs solides, le développement tumoral s'accompagne du développement d'un microenvironnement tumoral, nommé stroma tumoral (Allen and Jones, 2011; Arneth, 2019). Ce stroma est composé d'un compartiment cellulaire et d'un compartiment matriciel pouvant être abondant (Figure 3).

Le compartiment cellulaire stromal comprend notamment des cellules immunitaires, des cellules endothéliales et une population fibroblastique particulière nommés CAFs (*cancer-associated fibroblasts*) (Balkwill, Capasso and Hagemann, 2012; Denton, Roberts and Fearon, 2018), en proportion variable selon le type et la localisation de la tumeur. En effet, selon que la tumeur soit plus ou moins vascularisée, desmoplasique ou infiltrée par des cellules immunitaires, la composition du stroma sera différente. Cependant, ces cellules interagissent toujours entre elles, soit directement, par contact physique, soit indirectement, par des facteurs sécrétés (Denton, Roberts and Fearon, 2018), afin d'établir un microenvironnement pro-tumoral. Les CAFs sont souvent le type cellulaire majeur de la constituante cellulaire stromale. Ils sont la plupart du temps dérivés de fibroblastes résidents activés par le dommage tissulaire que représente le développement de cellules tumorales (Räsänen and Vaheri, 2010). A l'état activé (alors aussi nommés myofibroblastes), ils ont un rôle double dans la progression tumorale en modulant l'activité des cellules tumorales (1) par interaction directe ou par le biais de cytokines, et (2) en produisant une MEC adaptée et pro-tumorale, comme illustré ci-après. En plus de la produire, les CAFs sont responsables de la dynamique de la MEC par la sécrétion d'enzymes de remodelage (Neri *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019), favorisant par conséquent la migration et l'invasion tumorale.

Le compartiment matriciel du stroma tumoral est plus ou moins abondant selon le type de tumeur. Lorsque le dépôt de protéines matricielles est excessif, il est alors qualifié de « réaction desmoplasique ». Cette réaction, d'abord considérée comme un programme de protection contre la prolifération et l'invasion des cellules tumorales, promeut finalement le développement et la progression tumorale et est souvent associée à un mauvais pronostic (DeClerck, 2012; Sainio, 2013). Cette réaction desmoplasique est une caractéristique clé, car particulièrement forte, de l'adénocarcinome pancréatique, qui sera détaillé dans le deuxième chapitre de cette revue de la littérature.

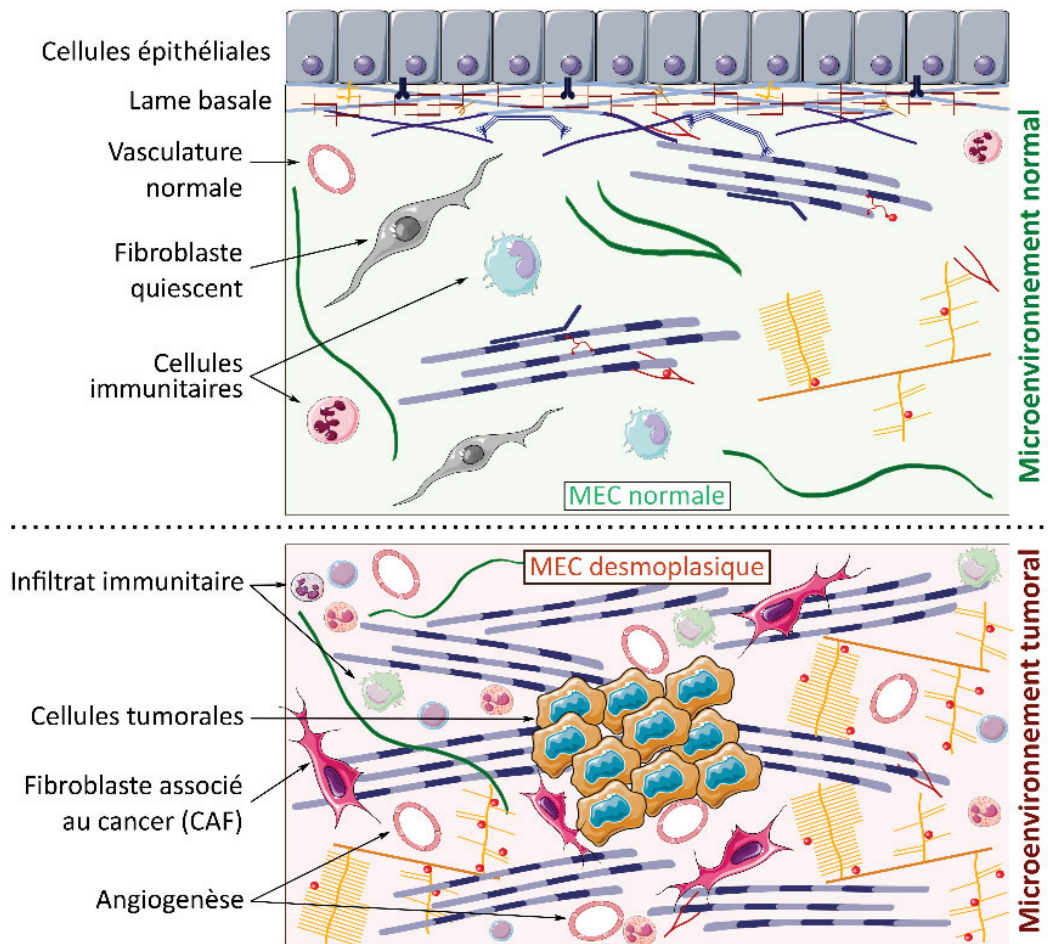


Figure 3 : Représentation schématique simplifiée du microenvironnement sain (TC, partie haute) et tumoral (stroma, partie basse) (inspiré de (Allen and Jones, 2011))

La MEC composant le microenvironnement tumoral est différente de celle existante initialement, tant au niveau qualitatif que quantitatif. La mise en place de ce nouveau microenvironnement stromal nécessite donc une dégradation ainsi qu'un remodelage important (**Figure 4A**) (Lu *et al.*, 2011). La dégradation matricielle se fait principalement par l'intermédiaire des MMPs dont la plupart sont surexprimées dans une majorité de cancers (Stamenkovic, 2003; Gobin *et al.*, 2019). En outre, les protéines structurales déposées par les cellules sont adaptées au contexte, avec un enrichissement en collagène de type I notamment. Ce remodelage est majoritairement guidé par les CAFs (Jodele *et al.*, 2006; Neri *et al.*, 2016), mais également par les cellules tumorales elles-mêmes, capables de sécréter des protéases ainsi que certaines protéines structurales de la MEC.

Ainsi la composition de la MEC est modifiée, accompagnée d'une augmentation de sa rigidité dans la plupart des tumeurs solides (Larsen *et al.*, 2006; Crotti *et al.*, 2017; Brauchle *et al.*, 2018; Najafi, Farhood and Mortezaee, 2019). Au cours de la progression du cancer colorectal, par exemple, une surexpression de collagène de type I et des MMP-2 et -9 est observée et corrélée avec le stade d'avancement de la tumeur. Au contraire, l'expression du collagène de type IV et de TIMP3 diminue (Li *et al.*, 2020). Ces modifications entraînent une réorganisation du réseau collagénique et des molécules associées et modifient ainsi les propriétés biomécaniques de la MEC (Brauchle *et al.*, 2018). Par conséquent, la dégradation de la matrice et la modification des protéines la composant coopèrent afin d'établir une MEC favorisant la progression tumorale et permettant l'invasion et la migration cellulaire (McNiven, 2013; Crotti *et al.*, 2017; Najafi, Farhood and Mortezaee, 2019). Selon certaines hypothèses, ce remodelage pourrait même précéder l'apparition des cellules cancéreuses dans plusieurs types de tumeurs (notamment avec l'âge) et favoriser l'initiation tumorale par la libération et le maintien de signaux pro-tumoraux notamment (Sprenger, Plymate and Reed, 2010; Mohan, Das and Sagi, 2020). Une altération du remodelage nécessaire à l'homéostasie tissulaire est donc un acteur clé dans la progression tumorale.

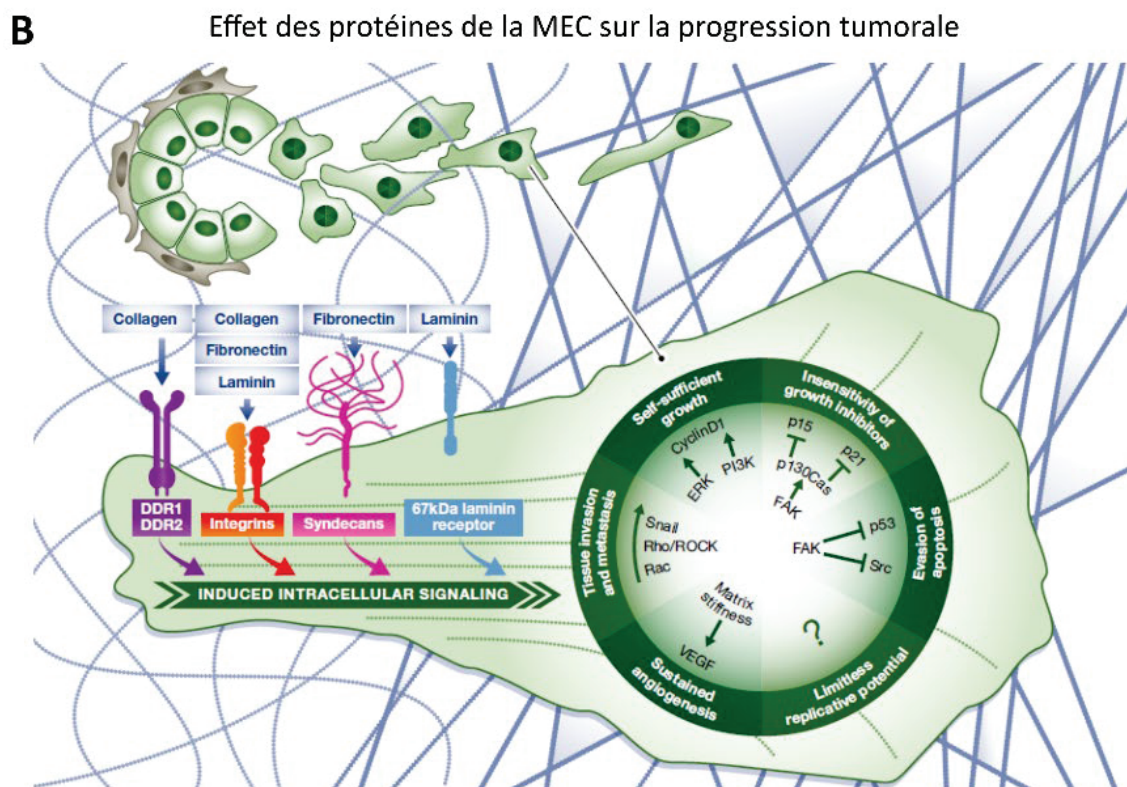
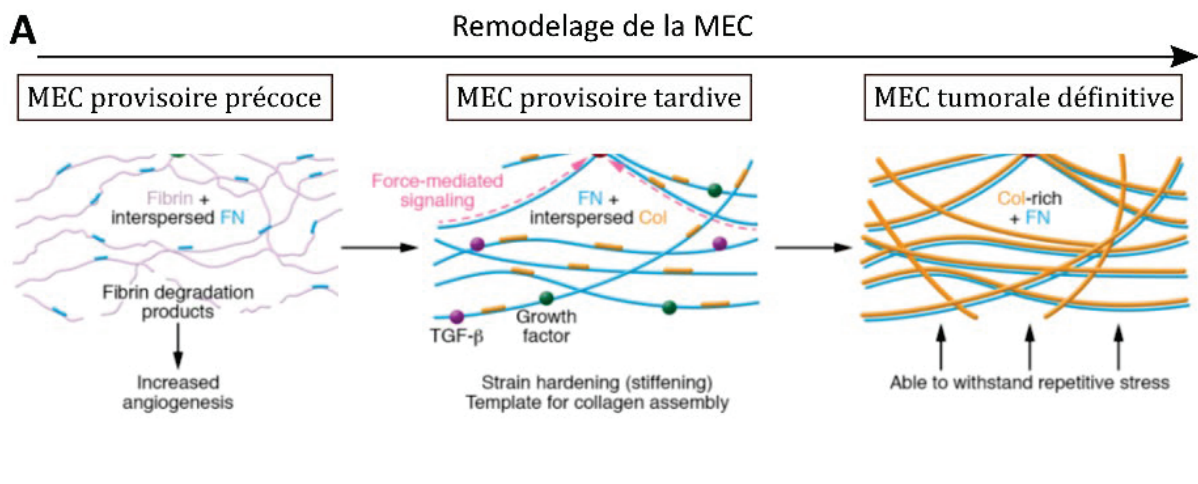


Figure 4 : Evolution et implication de la MEC dans les processus biologiques liés à la tumorigenèse
 A : Evolution de la composition et de l'organisation de la MEC au cours de la tumorigenèse (modifié à partir de (Yamauchi et al., 2018)). B : implication des protéines de la MEC dans les grands processus des cellules tumorales (Pickup, Mouw and Weaver, 2014).

2. Influence de la MEC sur la progression tumorale

Les protéines composant cette nouvelle matrice peuvent également modifier directement ou indirectement les grandes fonctions cellulaires impliquées dans la progression tumorale, que sont la prolifération, la survie, la migration et l'invasion cellulaire (Pickup, Mouw and Weaver, 2014; Socovich and Naba, 2019) (Figure 4B). La MEC est ainsi considérée comme l'un des régulateurs majeurs du comportement et du phénotype des cellules cancéreuses (Walker, Mojares and Del Río Hernández, 2018).

D'une part, le remodelage de la MEC change ses propriétés biomécaniques. Le développement d'une MEC plus rigide dans la plupart des tumeurs solides entraîne une modification de la signalisation au sein des cellules tumorales et stromales (stimulation de l'activité de la protéine kinase FAK et de ses voies en aval), ainsi que des forces influant sur la morphologie cellulaire (Shieh, 2011). Ces nouvelles dimensions biomécaniques modifient ainsi directement ou indirectement les processus biologiques précédemment cités, ayant donc une implication dans les capacités néoangiogéniques et métastatiques de la tumeur, ainsi que sur l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses et sur l'environnement immunitaire (immunosuppression) (Tilghman *et al.*, 2010; Najafi, Farhood and Mortezaee, 2019).

Dans cette nouvelle matrice, les signaux extracellulaires sont également modifiés, menant à une signalisation dérégulée (Multhaupt *et al.*, 2016; Skhinas and Cox, 2018). L'augmentation de la rigidité matricielle entraîne une concentration des facteurs solubles, modifiant leur capacité à activer leurs voies de signalisation cellulaire. De plus, plusieurs protéines matricielles sont sur-exprimées dans de nombreuses tumeurs, participant à ces modifications de signalisation cellulaire (Chong *et al.*, 2012). La MEC reste donc un réservoir à cytokines et facteurs de croissance, et agit dans leur séquestration, leur libération, leur présentation et/ou encore leur activation.

En outre, le remodelage de la MEC lui permet d'adopter un assemblage adapté, dont l'alignement, notamment des fibres de collagène, sert de « voie » de migration pour les cellules (Figure 4A). Enfin, les interactions cellules-matrice évoluent conjointement à la progression tumorale et au remodelage de la MEC (Alexandrova, 2008) et leurs conséquences sur le phénotype cellulaire sont également modifiées. Ces interactions incluent l'interface MEC-cellules tumorales, mais également les échanges MEC-cellules stromales et interviennent dans la régulation du comportement cellulaire des deux compartiments (Runa *et al.*, 2017). En réponse à la MEC environnante, les cellules adaptent les récepteurs de surface qu'elles expriment, et modifient ainsi leurs capacités d'adhérence et de migration (van Dijk, Göransson and Strömblad, 2013).

De nombreux composants matriciels interviennent donc dans les processus nécessaires à l'initiation et à la progression tumorale. Au sein du stroma, les protéines de la MEC agissent également sur les cellules endothéliales, modulant la réponse angiogénique (Langlois *et al.*, 2014; Mongiat *et al.*, 2019), et modifient les propriétés des cellules immunitaires pour mener à un environnement immunosuppresseur (Varol and Sagi, 2018). En outre, elles influent sur l'auto-renouvellement et la survie des cellules souches cancéreuses (Nallanthighal, Heiserman and Cheon, 2019) et participent à la plasticité des cellules tumorales (Henke, Nandigama and Ergün, 2020), (1) en agissant sur leur capacité à entrer en transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), processus impliqué dans l'invasion tumorale (Tzanakakis *et al.*, 2018) et (2) en modulant leur métabolisme afin de favoriser leur résistance (Nazemi and Rainero, 2020).

Enfin, les protéines de la MEC sont fortement impliquées dans le processus métastatique, à différents niveaux (Kai, Drain and Weaver, 2019; Paolillo and Schinelli, 2019). D'une part, la MEC module la migration, l'invasion cellulaire et la TEM (Willis *et al.*, 2013), et est remodelée au-devant des cellules en migration (McNiven, 2013; Neri *et al.*, 2016), favorisant ainsi l'échappement des cellules vers d'autres organes. D'autre part, le microenvironnement de la future métastase est mis en place en amont. Ce dogme, nommé « seed and soil », pour « graine (cellule tumorale) et sol (niche métastatique) », implique la mise en place d'une niche pré-métastatique adaptée et prête à accueillir des cellules tumorales (Langley and Fidler, 2011; Akhtar *et al.*, 2019). Par la suite, les protéines de la MEC maintiendront une niche métastatique favorable à la croissance de la métastase (Oskarsson and Massagué, 2012).

Au niveau clinique, la MEC est impliquée dans la chimiorésistance (Sun, 2016; Hirata and Sahai, 2017) et peut être utilisée comme outil diagnostique (Andriani *et al.*, 2018) ou pronostique (Giussani *et al.*, 2019). Elle est donc une cible thérapeutique très étudiée à ce jour (Lampi and Reinhart-King, 2018; Roma-Rodrigues *et al.*, 2019; Kozlova *et al.*, 2020; Liot *et al.*, 2021).

IV. Focus sur les Ténascines

Tous les membres de la famille des TNs partagent une structure modulaire commune, mais présentent des dynamiques d'expression très spécifiques, voire exclusives, et des fonctions associées différentes. Cette structure et les différents patrons d'expression et fonctions associées à chacune des TNs seront exposés ici, avec une attention particulière portée à la TNX.

A. Structure des TNs

Les quatre TNs possèdent une structure modulaire commune (Chiquet-Ehrismann, 2004) (**Figure 5**), décrite en détail dans un premier temps pour la TNC par homologie avec des domaines existants (Jones *et al.*, 1989; Nies *et al.*, 1991; Siri *et al.*, 1991; Weller, Beck and Ekblom, 1991), puis observée chez les autres membres de la famille des TNs (Erickson, 1993; Schenk and Chiquet-Ehrismann, 1994). De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, elles présentent toutes (1) un domaine d'assemblage permettant leur oligomérisation ; (2) des domaines répétés de type EGF (Epidermal Growth Factor) ; (3) des domaines répétés de type FNIII (Fibronectine III) et (4) un domaine de type Fibrinogène (FBG). Structuralement, les quatre membres de la famille des TNs diffèrent par le nombre de répétitions des domaines EGF et FNIII et leur capacité d'oligomérisation via leur domaine d'assemblage (**Figure 5A**).

La TNC est une glycoprotéine de 220kDa codée par le gène *TNC* chez l'humain et forme des hexamères, nommés « hexabrachion » (**Figure 5B**) (Erickson and Bourdon, 1989; Spring, Beck and Chiquet-Ehrismann, 1989; Nies *et al.*, 1991). La TNR quant à elle, est codée par le gène *TNR* et présente deux variants de 160 et 180kDa. Elle procède principalement à une trimérisation pouvant parfois, par association de 2 trimères, aboutir à des hexamères (**Figure 5B**) (Nörenberg *et al.*, 1992; Nörenberg, Hubert and Rathjen, 1996). La TNX est la plus lourde des TNs (450kDa) et est codée par le gène *TNXB*, gène ayant été partiellement dupliqué et présentant en amont un pseudogène nommé *TNXA* (Gitelman, Bristow and Miller, 1992; Bristow *et al.*, 1993; Elefteriou *et al.*, 1997; Weissensteiner and Lanchbury, 1997; Ikuta *et al.*, 1998; Miller, 2021). Elle forme des trimères, nommés « tribrachions » (**Figure 5B**). Enfin, la TNW, codée par le gène humain *TNN*, est une glycoprotéine de 180kDa (Weber *et al.*, 1998; Neidhardt *et al.*, 2003; Scherberich *et al.*, 2004) qui s'assemble en hexamères (**Figure 5B**). Chacune des TNs présente des domaines d'interaction avec d'autres protéines de la matrice ou des récepteurs cellulaires, leur donnant des spécificités fonctionnelles détaillées par la suite. En outre, les transcrits codant les TNC, TNR et TNW présentent tous trois la possibilité d'être alternativement épissés au niveau des domaines FNIII, donnant lieu à plusieurs variants d'épissage (**Figure 5A**) (Sriramarao and Bourdon, 1993; Carnemolla *et al.*, 1996; Neidhardt *et al.*, 2003). Cette caractéristique n'a pas réellement été démontrée pour la TNX (Speek, Barry and Miller, 1996), bien qu'il semble exister une forme courte cytoplasmique (TNXB-S) (Kato *et al.*, 2008).

B. Des patrons d'expression différents...

La TNC, plus étudiée de toutes les TNs, est dynamiquement régulée dans les étapes précoces du développement. En effet, elle est exprimée dans la plupart des tissus conjonctifs embryonnaires, dans la glie du système nerveux central (SNC) et dans les systèmes squelet-

-tique et cardiovasculaire (Crossin, 1996; Jones and Jones, 2000; Midwood *et al.*, 2011, 2016), ainsi qu'au cours de la morphogenèse (ramification de divers organes comme les poumons) (Chiquet, 1992; Gremlich *et al.*, 2020). Peu exprimée dans les tissus adultes – outre dans certains TCs comme les tendons et les ligaments, sous certains épithéliums et dans certaines niches de cellules souches – elle est réexprimée au cours de processus physiopathologiques comme l'involution tissulaire, l'inflammation, la néovascularisation et au cours de la réparation tissulaire (Jones and Jones, 2000; Midwood, Williams and Schwarzbauer, 2004b; Midwood and Orend, 2009; Jakovcevski *et al.*, 2013). Le promoteur du gène *TNC* a été décrit (Chiovaro, Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2015) et plusieurs mécanismes de régulation ont été identifiés. Ainsi, ce gène serait régulé par (1) des gènes de développement (*EVX1*, *OTX2*, *PRRX1*, etc), (2) des facteurs de croissance (EGF, TGFβ1, TNFα, NGF, KGF, etc, selon le contexte) notamment lors de la réparation tissulaire, et (3) des stimuli mécaniques (Tucker and Chiquet-Ehrismann, 2009).

La TNW présente également une expression restreinte et dynamiquement régulée. Partiellement co-exprimée avec la TNC, elle montre une expression transitoire à des stades de développement plus tardifs, et de manière plus restreinte à certains organes (sites d'ostéogenèse, muscles lisses, tendons et ligaments) (Scherberich *et al.*, 2004; Martina, Chiquet-Ehrismann and Brellier, 2010; Tucker and Degen, 2019). Chez l'adulte, son expression est restreinte à quelques rares TCs (périoste, cornée, rein, valve aortique) (Scherberich *et al.*, 2004) et certaines niches de cellules souches. Le promoteur du gène *TNW* n'a été que peu décrit (Chiovaro, Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2015), mais les facteurs de croissance BMP2 et TGFβ1 pourraient réguler son activité (Tucker and Degen, 2019). Bien que la TNW soit parfois co-exprimée avec la TNC, il est peu probable que les mêmes mécanismes régulent les deux gènes, au vu de l'expression plus restreinte de la TNW.

La TNR présente une expression encore plus restreinte que les deux précédentes. Elle est en effet réduite au seul système nerveux, majoritairement le SNC (Fuss *et al.*, 1993; Carnemolla *et al.*, 1996; Anlar and Gunel-Ozcan, 2012), avec quelques traces d'expression dans le SN périphérique en développement (Probstmeier *et al.*, 2001). La TNR est exprimée par les oligodendrocytes et certaines sous-populations de neurones au cours du développement nerveux, où elle peut être co-exprimée avec la TNC (Deckner *et al.*, 2000). Elle est également retrouvée dans le SNC adulte, à un plus faible niveau (Rathjen, Wolff and Chiquet-Ehrismann, 1991; Derr, McKae and Tucker, 1998; Pesheva and Probstmeier, 2000; Ayachi *et al.*, 2011). Dans les oligodendrocytes, son expression est associée au processus de myélinisation, puis diminue à un taux basal restant autour de la gaine de myéline, tandis que les neurones maintiennent une expression stable de TNR au cours du temps (Woodworth *et al.*, 2004). Deux formes de TNR existent, issues d'un épissage alternatif (180 et 160kDa), la première étant plutôt exprimée en début de développement et laissant sa place à la deuxième ensuite

Sites d'expression	Fonctions connues et pathologies associées
<p>TNC</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Embryogenèse</u> : systèmes nerveux, squelettique, vasculaire • <u>Morphogenèse</u> des organes • <u>Adulte</u> : jonction derme-épiderme (TC dense), certains muscles lisses, niche de cellules souches (cerveau et moëlle épinière) 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Fonctions</u> : anti-adhésive, modification de la prolifération, la croissance et la migration cellulaires, homéostasie des niches de cellules souches, interactions épithélium-mésenchyme (développement), développement du SNC • <u>Processus de réparation</u> : cicatrisation, réparation de nerfs, inflammation • <u>Pathologies</u> : asthme, fibrose, progression tumorale, défauts cardio-vasculaires
<p>TNR</p> <ul style="list-style-type: none"> • Système nerveux central (et périphérique) 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Fonctions</u> : anti- ou pro-adhésive, +/- croissance des neurites, migration cellulaire, synaptogenèse, myélinisation, homéostasie de la niche des cellules souches nerveuses, neuroprotection • <u>Pathologies</u> : pathologies neurodéveloppementales, rôle ambigu dans la réparation des lésions au SNC et les gliomes.
<p>TNW</p> <ul style="list-style-type: none"> • Au cours du développement et chez l'adulte : os, rein, certains muscles lisses 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Fonctions</u> : anti-adhésive, différenciation des cellules souches, angiogenèse, ostéogenèse • <u>Pathologies</u> : progression tumorale
<p>TNX</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adulte : TC lâches, derme, épimysium (autour des muscles squelettiques), certains muscles lisses 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Fonctions</u> : anti- ou pro-adhésive, modulation de l'espacement entre les fibres de collagène, liaison au VEGF (rôle dans l'angiogenèse), activation du TGFβ (TEM), modulation de l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire, intégrité tissulaire • <u>Pathologies</u> : Syndrome d'Ehlers-Danlos (« classical-like »), reflux vésico-utérin

Tableau 4 : Patrons d'expression et fonctions associées des 4 membres de la famille des TNs, ainsi que leur implication dans les processus pathologiques (inspiré de (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2011))

(Woodworth *et al.*, 2004). Enfin, lors d'un dommage au SNC, la TNR peut être surexprimée ou diminuée selon le type de dommage, ce qui montre que la TNR est régulée de manière spatio-temporelle (Ayachi *et al.*, 2011). Le promoteur du gène *TNR* est peu décrit (Putthoff *et al.*, 2003) ; sa régulation serait dépendante de facteurs de croissance dont NGF, PDGF et TNF α (Chiovaro, Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2015).

Enfin, la TNX présente un patron d'expression très différent et plus stable. En effet, elle apparaît plus tardivement que les autres TNs au cours du développement et persiste dans la plupart des TCs adultes (Valcourt *et al.*, 2015). Elle est notamment exprimée dans les tissus fœtaux en cours d'organogenèse, dont le système musculo-squelettique (membres et muscles), le tractus digestif et le cœur (Bristow *et al.*, 1993; Burch *et al.*, 1995).

Dans les tissus adultes, elle est exprimée dans les TCs riches en collagène (Lethias *et al.*, 1996), dont les TCs du cœur, des muscles squelettiques, du système digestif, de certains nerfs et dans le derme (Geffrotin *et al.*, 1995; Elefteriou *et al.*, 1997, 1997; Tuori *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Matsumoto, Sawa, *et al.*, 2002; Imura and Sato, 2009).

De plus, l'expression de la TNX est souvent opposée à celle de la TNC, autant spatialement que temporellement, pendant le développement, ainsi que dans certains processus physiopathologiques (Matsumoto *et al.*, 1994; Fluck, Tunc-Civelek and Chiquet, 2000; Imanaka-Yoshida *et al.*, 2003). Dans la cicatrisation par exemple, l'expression de la TNX diminue dans les premiers temps, laissant place à la TNC, dont l'expression est ensuite négativement régulée et suivie de la réexpression de la TNX dans le tissu réparé (Valcourt *et al.*, 2015). Enfin, dans la peau, la TNC est exprimée à la jonction derme-épiderme, tandis que la TNX est plus largement déposée dans le derme sous-jacent (Matsumoto *et al.*, 1994).

Le promoteur du gène *TNXB* n'a été que peu décrit (Wijesuriya, Bristow and Miller, 2002; Chiovaro, Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2015) et peu d'études se sont intéressées à la régulation de l'expression de la TNX. Parmi les données disponibles, il apparaît que les glucocorticoïdes (Sakai *et al.*, 1996; Fejes-Tóth and Náray-Fejes-Tóth, 2007), l'hypoxie (Kato *et al.*, 2008) et le facteur de transcription Sp1 (Minamitani, Ariga and Matsumoto, 2000) puissent être impliqués dans cette régulation.

C. ... pour des fonctions spécifiques

La distribution spécifique et dynamique des TNs suggère une grande diversité de fonctions. De plus, la structure modulaire des TNs implique qu'elles puissent interagir avec d'autres protéines matricielles d'une part, et avec les cellules d'autre part (Brösicke and Faissner, 2015). Les études cellulaires *in vitro* avec des protéines entières natives ou recombinantes, la détermination des domaines d'interactions et l'analyse des souris Knock-Out (KO) pour les différentes TNs ont permis de mettre en évidence certaines fonctions tissulaires et cellulaires des TNs (Tableau 4).

1. Une fonction anti-adhésive commune

L'une des premières fonctions découvertes, et la seule commune aux quatre TNs, est leur capacité anti-adhésive (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2011), ce qui permettrait aux TNC, TNW et TNR d'inhiber la migration cellulaire en modulant l'adhérence des cellules à la MEC. Ce rôle anti-adhésif est relativement fort pour la TNC, et moindre pour les TNR, TNW et TNX. La TNC est en effet capable d'inhiber l'adhérence cellulaire même en présence des protéines matricielles pro-adhésives comme la fibronectine (Lightner and Erickson, 1990; Orend and Chiquet-Ehrismann, 2000; Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003). Dans le modèle proposé, le domaine FNIII-13 de la TNC interagit avec le syndecan-4, un protéoglycane transmembranaire interagissant lui-même avec la fibronectine. La coopération entre syndecan-4 et intégrine pour transduire le signal d'adhérence de la cellule à la fibronectine est alors perturbée, ce qui entraîne une dé-adhérence de la cellule (Huang *et al.*, 2001). Cette capacité d'inhibition de l'adhérence cellulaire à la fibronectine a également été observée pour la TNR (Pesheva *et al.*, 1994), maintenant connue pour empêcher l'adhérence de la microglie active dans le SNC (Angelov *et al.*, 1998). Cette fonction anti-adhésive a également été observée pour la TNW et la TNX, bien qu'aucun mécanisme moléculaire n'ait été proposé. En effet, plusieurs études ont décrit *in vitro* une réduction de l'adhérence et de la migration cellulaire en présence de TNW (Scherberich *et al.*, 2004; Meloty-Kapella *et al.*, 2006; Brellier, Martina, Chiquet, *et al.*, 2012), et le détachement des cellules à leur support en présence de TNX (Elefteriou *et al.*, 1999; Fujie *et al.*, 2009).

Cependant, ces capacités anti-adhésives ne sont pas strictes. En effet, les TNs possèdent plusieurs domaines, pouvant avoir des rôles de modulation de l'adhérence cellulaire opposés. Ainsi, les domaines de type EGF de la TNC pourraient promouvoir l'adhérence cellulaire, mais la structure 3D de la protéine, et notamment les domaines FNIII, masqueraient ces domaines, ne laissant ainsi opérationnelle que la fonction anti-adhésive du domaine FBG (Fischer *et al.*, 1997). De plus, la TNX a montré différentes capacités pro- ou anti-adhésives, et de modulation de l'étalement des cellules selon le type cellulaire testé (Elefteriou *et al.*, 1999) et la TNR peut se révéler pro-adhésive dans certains contextes (Pesheva and Probstmeier, 2000).

2. La TNC : de nombreuses fonctions montrées chez l'Homme et la souris

Les souris KO TNC sont viables et ne présentent pas de phénotype clairement identifiable (Saga *et al.*, 1992). Cependant, une analyse fine de ces souris a permis de mettre en évidence des anomalies (1) de comportement, (2) de morphogénèse (problèmes de ramification pulmonaire), et (3) de réparation tissulaire. Ainsi, la TNC a été rapportée comme impliquée dans l'homéostasie des niches de plusieurs types de cellules souches (Chiquet-Ehrismann *et al.*, 2014), dans les interactions épithélium-mésenchyme au cours de développement et de la morphogénèse, notamment lors de la ramification dans les poumons (Chiquet, 1992; Obberghen-Schilling *et al.*, 2011; Gremlich *et al.*, 2020) et dans le développement du SNC (Joester and Faissner, 2001). Elle est également fortement impliquée dans toutes les étapes

de la réparation tissulaire (Midwood and Orend, 2009) et dans la cicatrisation, en agissant sur la migration des fibroblastes (Mackie, Halfter and Liverani, 1988; Trebault, Chan and Midwood, 2007) et sur l'inflammation (Midwood *et al.*, 2009). Ainsi, la TNC a de nombreuses fonctions au sein des tissus et accompagne différentes pathologies (Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003; Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2004), dont la fibrose (Bhattacharyya *et al.*, 2016), l'asthme (Brellier, Tucker and Chiquet-Ehrismann, 2009), des pathologies cardio-vasculaires (Franz *et al.*, 2015; Imanaka-Yoshida and Matsumoto, 2018) et plusieurs types de lésions du SNC (Jakovcevski *et al.*, 2013; Roll and Faissner, 2018).

Au niveau cellulaire, la TNC joue un rôle important dans la signalisation, notamment (1) en interagissant avec un grand nombre d'intégrines ($\alpha 2$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 6$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 6$) (Midwood and Orend, 2009; Tucker and Chiquet-Ehrismann, 2015; Roll and Faissner, 2018), (2) par l'activation du récepteur de l'EGF par certains domaines EGF-like (Swindle *et al.*, 2001) et (3) en interagissant avec plusieurs facteurs de croissance, dont le TGF β 1, le PDGF et le FGF-2 (De Laporte *et al.*, 2013). La TNC agit ainsi directement ou indirectement sur des processus cellulaires tels que la prolifération, la croissance cellulaire, la migration cellulaire, *etc.* Une étude de laboratoire, actuellement en révision dans *Frontiers in Immunology*, a également montré que le domaine FBG de la TNC pouvait activer le TGF β et ainsi en réguler la biodisponibilité (Aubert *et al.*, 2021, en révision). Il est à noter que ces effets sont hautement dépendants du contexte tissulaire et des variants d'épissage de la TNC exprimés dans ces différents contextes (Giblin and Midwood, 2015; Midwood *et al.*, 2016).

3. La TNW et son rôle dans le développement

Les fonctions décrites pour la TNW sont beaucoup moins nombreuses, puisqu'il s'agit de la moins caractérisée des TNs, ne possédant d'ailleurs pas de modèles de souris KO décrits dans la littérature. Au vu des similitudes d'expression avec la TNC, il serait possible que la TNW puisse avoir des fonctions cellulaires identiques ou proches. La TNW peut notamment moduler l'angiogenèse, nécessitant la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Martina, Chiquet-Ehrismann and Brellier, 2010). Elle joue aussi un rôle important dans l'ostéogenèse. En effet, elle est impliquée dans la différenciation et la prolifération de certaines cellules souches, et des ostéoblastes, qu'elle pourrait restreindre (Kimura *et al.*, 2007) ou promouvoir (Meloty-Kapella *et al.*, 2008) selon les cas (Martina, Chiquet-Ehrismann and Brellier, 2010; Tucker *et al.*, 2013; Tucker and Degen, 2019). De manière identique à la TNC, il semblerait que le domaine FBG de la TNW soit impliqué dans la régulation de la biodisponibilité du TGF β (Aubert *et al.*, 2021, en révision).

Peu d'interactions ont été montrées entre la TNW et d'autres protéines de la MEC ou récepteurs cellulaires. Par les séquences RGD et KGD présentes dans sa séquence protéique, elle pourrait cependant interagir avec une ou plusieurs intégrines (Roll and Faissner, 2018), dont notamment l'intégrine $\alpha 8$ dans les tumeurs mammaires malignes (Scherberich *et al.*, 2005), mais cela reste peu décrit.

4. Rôles de la TNR dans le système nerveux

Tout comme pour la TNC, les souris KO TNR ne présentent pas, à première vue, de phénotype évident. Une analyse plus précise a cependant permis de mettre en évidence des problèmes de développement du SNC, d'altération du comportement et de réparation de lésions nerveuses (Weber *et al.*, 1999; Freitag, Schachner and Morellini, 2003; Hsia and Schwarzbauer, 2005). Ces observations suggèrent plusieurs fonctions pour la TNR au sein du SNC (Pesheva, Gloor and Probstmeier, 2001; Anlar and Gunel-Ozcan, 2012), en cohérence avec son patron d'expression restreint. Au cours du développement embryonnaire, elle agit sur la croissance des neurites, la migration cellulaire et la synaptogenèse dans les SN central et périphérique (Probstmeier *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2005; Zacharias and Rauch, 2006; Xu *et al.*, 2014). Elle joue également un rôle important au cours de la myélinisation (et donc sur la conductivité neuronale) (Pesheva *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1999; Pesheva, Gloor and Probstmeier, 2001) et dans l'homéostasie de la niche des cellules souches neurales (Huang *et al.*, 2009; Chiquet-Ehrismann *et al.*, 2014). Sa sécrétion par une sous-population de neurones permet de plus la formation d'un réseau matriciel péri-neuronal protecteur (Brückner *et al.*, 2000; Morawski *et al.*, 2014), et, en empêchant l'adhérence des cellules microgliales activées, la TNR possède un rôle neuroprotecteur (Pesheva, Gloor and Probstmeier, 2001; Liao *et al.*, 2005). Cette protéine a donc de multiples fonctions dans le système nerveux, parfois opposés selon le contexte (type cellulaire, récepteurs, partenaires, signalisation, *etc.*). Elle peut ainsi avoir des fonctions anti- et pro-adhésives, promouvoir ou inhiber la croissance des neurites ou le guidage axonal, ceci expliquant peut-être certains effets négatifs de la TNR dans la réparation de lésions du SNC (Apostolova, Irintchev and Schachner, 2006).

Bien que moins étudiée que la TNC, plusieurs partenaires ont pu être trouvés à la TNR, dont notamment des récepteurs de surface (contactine et canal à sodium) et certains protéoglycanes (Brösicke and Faissner, 2015; Roll and Faissner, 2018).

5. Architecture et signalisation, le rôle double de la TNX

Enfin, l'expression de la TNX dans la grande majorité des tissus conjonctifs adultes suggère qu'elle joue un rôle dans l'homéostasie tissulaire. Les souris KO pour la TNX (Mao *et al.*, 2002) miment un syndrome observé chez l'humain en cas de déficience ou mutation sur le gène *TNXB*: une forme de syndrome d'Ehlers-Danlos (EDS) de type « classical-like ». Chez l'Homme, cette pathologie se manifeste entre autres par une hyperlaxité de la peau, une hypermobilité des articulations, une fatigabilité musculaire et des polyneuropathies (Burch *et al.*, 1997; Zweers *et al.*, 2003; Zweers, Hakim, *et al.*, 2004; Voermans *et al.*, 2007), la plupart de ces symptômes étant retrouvés dans les souris KO (Mao *et al.*, 2002).

Au niveau structural, une analyse de la peau des patients a mis en évidence une augmentation de l'espacement entre les fibres de collagène en absence de TNX (Bristow *et al.*, 2005), altération détectable mais qui n'a pas été quantifiée dans les souris KO (Mao *et al.*, 2002). Ces observations suggèrent donc un rôle architectural de la TNX, conforté par plusieurs études montrant l'interaction de la TNX avec différentes protéines structurales de la MEC, dont les collagènes de types I, III et V (Lethias *et al.*, 1996; Lethias Claire *et al.*, 2006), la tropoélastine, la décorine et les collagènes de types XII et XIV (FACITs) (Elefteriou *et al.*, 2001; Lethias Claire *et al.*, 2006; Veit *et al.*, 2006; Egging *et al.*, 2007; Dubost *et al.*, 2016). Ces interactions permettent à la TNX de former des « ponts » entre les fibres de collagènes en interagissant directement ou indirectement avec elles. La question de l'effet de la TNX sur la fibrillogénèse reste en revanche en suspens, les résultats étant contradictoires (Minamitani *et al.*, 2004; Egging *et al.*, 2006; Margaron *et al.*, 2010).

Par ailleurs, la TNX possède dans sa séquence plusieurs motifs d'interaction avec des intégrines, à savoir l'intégrine $\alpha 11\beta 1$ au niveau du domaine FBG (Alcaraz *et al.*, 2014), et l'intégrine $\alpha v\beta 3$ au niveau de la séquence RGD du domaine FNIII-10, dont l'accessibilité reste à déterminer dans la protéine entière (Elefteriou *et al.*, 1999). Ces interactions participent aux propriétés anti-adhésives de la TNX et pourraient également donner lieu à un signal intracellulaire spécifique. De plus, la TNX est capable de lier les VEGF-A et -B (Ishitsuka *et al.*, 2009) et ainsi modifier les capacités prolifératives des cellules endothéliales et influencer l'angiogenèse (Ikuta, Ariga and Matsumoto, 2000, 2001). Il a également été montré *in vivo* que l'absence de TNX altère la néovascularisation, en cohérence avec les résultats précédents (Sumioka *et al.*, 2018). Enfin, mon laboratoire de thèse a démontré en 2014 que le domaine FBG de la TNX était capable de lier et d'activer le TGF β 1 de manière conformationnelle et ainsi d'induire une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) sur des cellules épithéliales mammaires (Alcaraz *et al.*, 2014). Ce mécanisme serait partagé par les quatre TNs (Aubert *et al.*, 2021, en révision). Enfin, la TNX est capable d'influencer le comportement cellulaire, dont l'adhérence, la migration et la prolifération cellulaire, dans des expériences *in vitro* réalisées sur des fibroblastes embryonnaires de souris cultivés en gel de collagène (Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003; Hashimoto *et al.*, 2018). La TNX a donc un rôle primordial dans l'intégrité tissulaire, dans des stades tardifs du développement et dans les tissus adultes comme la peau (Mao *et al.*, 2002; Minamitani *et al.*, 2004; Zweers, van Vlijmen-Willems, *et al.*, 2004; Egging *et al.*, 2006), le tractus digestif (Sakiyama *et al.*, 2015; Aktar *et al.*, 2018, 2019; Browning, 2018), le système musculosquelettique (Voermans *et al.*, 2011; Gerrits *et al.*, 2013; Kajitani *et al.*, 2019), le système cardiovasculaire (Sakai *et al.*, 2017; Imanaka-Yoshida and Matsumoto, 2018) et le système nerveux périphérique (Matsumoto, Sawa, *et al.*, 2002; Aktar *et al.*, 2018, 2019). De plus, elle est dynamiquement régulée et impliquée au cours de processus physiopathologiques tels que la cicatrisation (expression en fin de processus, lors de la maturation de la MEC) (Egging *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2018) ou l'anévrisme aortique (Zweers *et al.*, 2006; Satoh *et al.*, 2010; Matsumoto *et al.*, 2012).

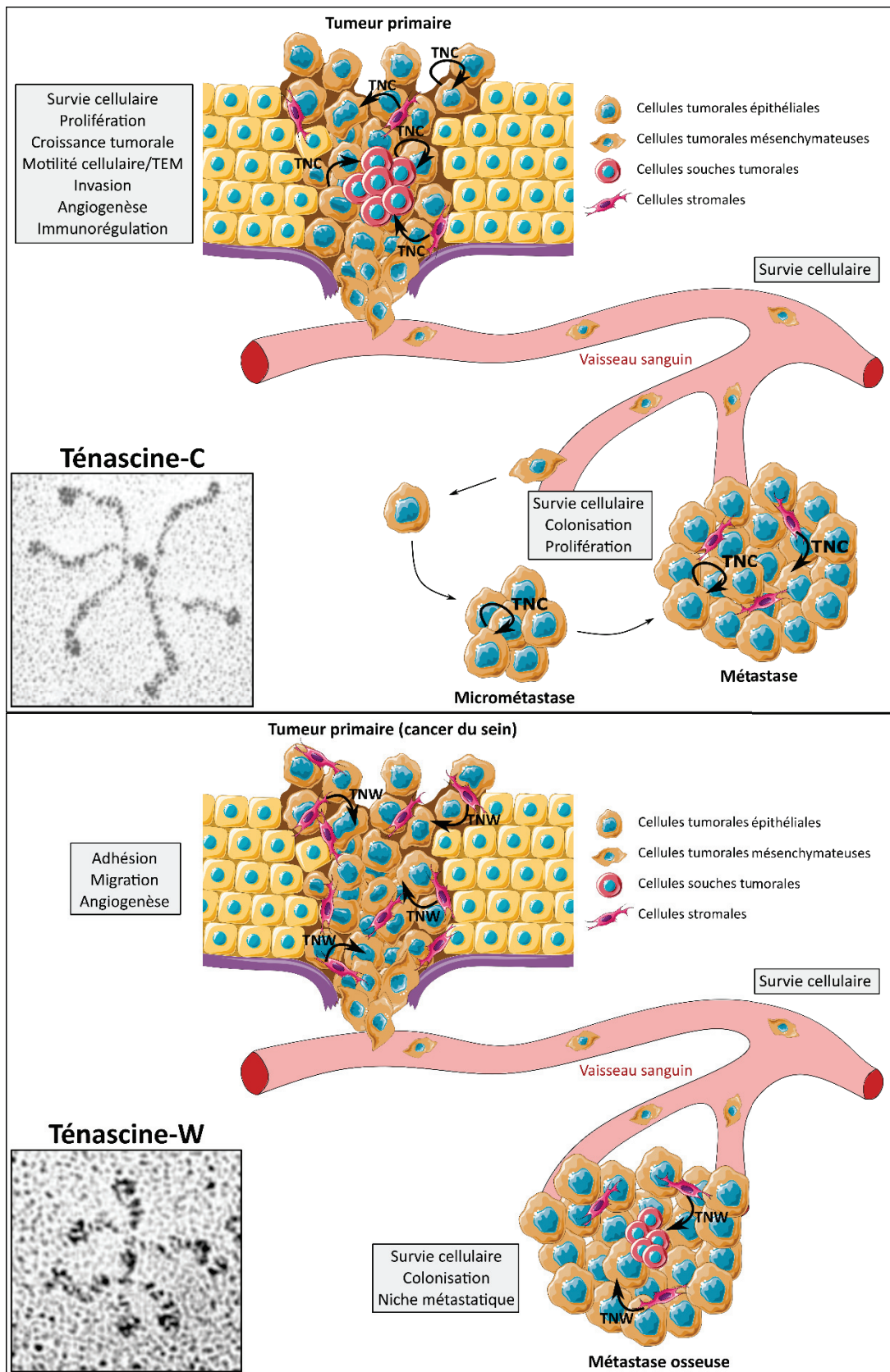


Figure 6 : Implication de la TNC et de la TNW dans les processus biologiques liés à la progression tumorale. Les flèches présentent les cellules sécrétrices de ces 2 protéines (Midwood et al., 2016).

D. Implication des Ténascines dans la tumorigenèse

L'implication des membres de la famille des TNs dans la tumorigenèse a été inégalement étudiée. En effet, alors que l'implication de la TNC et de la TNW dans un grand nombre de tumeurs a été démontrée, le statut et le rôle de la TNR et de la TNX restent controversés.

La TNC et la TNW sont sur-exprimées dans de nombreuses tumeurs (Orend and Chiquet-Ehrismann, 2006; Martina, Degen, Rüegg, *et al.*, 2010; Lowy and Oskarsson, 2015; Tucker and Degen, 2019). Majoritairement détectées dans le stroma des tumeurs épithéliales, elles sont surtout exprimées par les CAFs. Cependant, elles sont soumises à des régulations différentes, et il existe entre elles plusieurs divergences d'expression (Brellier and Chiquet-Ehrismann, 2012).

La TNC est présente en grande quantité dans le stroma de nombreuses tumeurs épithéliales telles que les tumeurs mammaires (Chiquet-Ehrismann *et al.*, 1986; Jähkola *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2017), prostatiques (Ni *et al.*, 2017) ou pulmonaires (Gocheva *et al.*, 2017), dans lesquelles son expression est corrélée au stade d'avancement de la tumeur, à la présence de métastases et à un mauvais pronostic de survie. La TNC est également retrouvée dans le stroma et autour des vaisseaux dans certaines tumeurs mésoenchymateuses (Schnyder *et al.*, 1997; Bogusiewicz *et al.*, 2012) et dans les gliomes, où elle serait sécrétée par les péricytes (Leins *et al.*, 2003). Enfin, la TNC peut être exprimée par les cellules tumorales elles-mêmes, notamment dans les mélanomes (Geffrotin *et al.*, 2000) et le cancer du sein (Oskarsson *et al.*, 2011). La régulation de l'expression de la TNC au sein des tumeurs commence à être mieux connue et comprend plusieurs facteurs, dont PDGF, TNF α , Notch, TGF β , *etc* (Chiovaro, Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2015).

La TNW, quant à elle, est sur-exprimée dans le stroma de nombreuses tumeurs, dont le mélanome et plusieurs tumeurs épithéliales (sein, pancréas, colon, rein, poumons, *etc.*) (Degen *et al.*, 2007, 2008; Brellier, Martina, Degen, *et al.*, 2012; Tucker and Degen, 2019). Elle est principalement sécrétée par les CAFs et contrairement à la TNC, aucune étude n'a mis en évidence une expression de TNW par les cellules tumorales (Martina, Chiquet-Ehrismann and Brellier, 2010). Dans les gliomes, elle peut également être observée autour des vaisseaux, où elle serait produite par les cellules endothéliales (Martina, Degen, Ruegg, *et al.*, 2010). La corrélation entre TNW et progression tumorale est moins claire, et dépend du type de tumeurs. La régulation de l'expression de TNW dans le cancer est également peu connue pour l'instant, bien que le TNF α puisse être impliqué (Tucker and Chiquet-Ehrismann, 2009).

En outre, les TNC et TNW peuvent aussi être détectées dans le sérum de patients atteints de cancer (Schenk *et al.*, 1995; Degen *et al.*, 2008). Cependant, la TNC ne saurait être un biomarqueur spécifique, puisqu'elle est aussi détectable en cas d'infection et d'inflammation. La TNW serait un meilleur biomarqueur dans les tumeurs primaires, car plus spécifique (Brellier, Martina, Degen, *et al.*, 2012).

La réexpression des TN-C et W implique qu'elles puissent avoir un rôle dans les processus de progression tumorale (Gocheva *et al.*, 2017). Concernant la TNC, de très nombreuses études démontrent plusieurs implications au cours de la tumorigenèse, notamment dans la stimulation des cellules tumorales (prolifération, TEM, migration, invasion), dans la néoangiogenèse (Langlois *et al.*, 2014) et dans le processus métastatique (Lowy and Oskarsson, 2015; Sun *et al.*, 2019), et ce dans de nombreux cancers (Figure 6). D'une part, la TNC a un rôle architectural dans le stroma (Spénlé, Gasser, *et al.*, 2015), par la formation de réseaux avec d'autres protéines matricielles, pour la formation d'une niche pour les cellules stromales et métastatiques (Oskarsson *et al.*, 2011), ainsi que pour l'angiogenèse (Obberghen-Schilling *et al.*, 2011). D'autre part, elle a une action directe sur les cellules stromales et tumorales par interaction avec des intégrines. En effet, la TNC est impliquée dans plusieurs voies de signalisation, dont celle du récepteur à l'EGF, celle du TGF β , la voie Wnt ou encore celle du TLR4 (Huang *et al.*, 2001; Orend and Chiquet-Ehrismann, 2006). Cette forte implication de la TNC dans les processus tumoraux en fait une cible thérapeutique privilégiée au sein de stroma (Spénlé, Saupe, *et al.*, 2015).

La TNW, quant à elle, n'a révélé un rôle que dans certains processus, dont la néoangiogenèse (Martina, Degen, Ruegg, *et al.*, 2010) et le processus métastatique (Chiovaro, Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2015) (Figure 6). Les mécanismes sont moins décrits, du fait de la découverte plus tardive de cette protéine. Cependant, des interactions de la TNW avec certaines intégrines ($\alpha 8$ et $\beta 1$ notamment) ont été mises en évidence, et la TNW pourrait ainsi favoriser l'adhérence et la propagation des CAFs, et la migration des cellules tumorales (Scherberich *et al.*, 2005; Degen *et al.*, 2007).

Le statut de la TNR est bien moins déterminé. En effet, du fait de son expression restreinte au système nerveux, elle a majoritairement été étudiée dans les gliomes, dans lesquelles son expression semble être diminuée, en corrélation inverse avec la progression tumorale (Brösicke and Faissner, 2015). Cependant, ces résultats restent controversés car l'expression de TNR pourrait être différente selon le type de cellules tumorales (Anlar and Gunel-Ozcan, 2012), et aucun mécanisme moléculaire n'a été mis en évidence.

Enfin, la TNX a également été peu étudiée dans le domaine de la cancérologie. En effet, son statut n'a été publié que pour des cancers peu répandus. De surcroit, certains résultats restent controversés et tous ne s'accordent pas sur une régulation commune de la TNX, à l'instar des TNC et TNW. En effet, l'expression de la TNX semble être diminuée dans les léiomyomes utérins (tumeurs bénignes du tissu musculaire lisse) (Lee *et al.*, 2008; Bogusiewicz *et al.*, 2012), au cours de la transformation maligne des tumeurs des gaines de myéline périphériques (Lévy *et al.*, 2007), ainsi qu'au cours du développement de gliomes (Hasegawa *et al.*, 1997). Dans ces trois types de tumeurs et dans un type spécifique de mélanome, cette diminution d'expression coïncide avec une augmentation de l'expression de

la TNC (Hasegawa *et al.*, 1997; Geffrotin *et al.*, 2000; Lévy *et al.*, 2007; Bogusiewicz *et al.*, 2012), comme cela est le cas au cours du développement ou dans la cicatrisation (Egging *et al.*, 2007). Cependant, d'autres études ont montré une augmentation d'expression de la TNX dans le cancer ovarien (Kramer *et al.*, 2015) et le mésothéliome pleural (Yuan *et al.*, 2009; Nakayama *et al.*, 2019), résultats pouvant être discutés d'un point de vue méthodologique. La régulation de l'expression de la TNX en contexte tumoral est également mal connue, et les résultats actuels concernant l'effet des glucocorticoïdes restent controversés (Sakai *et al.*, 1996; Vedoy and Sogayar, 2002). Ainsi, il apparaît que le statut de la TNX dans le cancer, et notamment dans les tumeurs à forte incidence et forte mortalité nécessite encore d'être déterminé. Ces travaux ont fait l'objet du premier article présenté dans ce manuscrit de thèse, publié dans *Matrix Biology Plus* en Janvier 2020 (Liot *et al.*, 2020).

De plus, aucun mécanisme cellulaire ou moléculaire n'a pu être mis en évidence pour l'instant quant au rôle de la TNX sur les cellules tumorales, bien que quelques indices épars puissent être trouvés dans la littérature, provenant tous d'une même équipe de recherche. Dans une étude *in vivo*, des souris ont été inoculées au niveau des coussinets avec des cellules de mélanome métastatique. Dans les souris déficientes en TNX, les tumeurs primaires observées sont plus grosses et plus de métastases ont été détectées en comparaison aux souris wild-type (WT), suggérant un rôle protecteur de la TNX (Matsumoto *et al.*, 2001). Ces mêmes résultats ont été retrouvés dans une étude suivante, et comparés au développement tumoral dans des souris déficientes pour la TNC, dans lesquelles la tumeur se développe moins (Matsumoto, Takahashi, *et al.*, 2002). Dans ces deux études, l'expression et l'activité des MMP-2 et -9 ont été appréhendées, sans pouvoir réellement aboutir à un mécanisme concret. Par la suite, l'augmentation de l'expression de MMP-2 en absence de TNX a été confirmée *in vitro* et associée à la voie de signalisation c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Matsumoto *et al.*, 2004) mais sans étude des conséquences cellulaires de cette voie. Enfin, une étude *in vitro* a montré que les capacités adhésives des fibroblastes déficients en TNX sont diminuées, pouvant influencer les propriétés invasives des cellules tumorales (Minamitani, Ariga and Matsumoto, 2002). Ces études suggèrent donc un rôle oncosuppressif de la TNX, pouvant intervenir au cours de la croissance tumorale ou du processus métastatique (migration/invasion). Cependant, ce rôle reste à mettre en évidence, ce qui fut l'objectif premier de ma thèse, dans le contexte particulier de l'adénocarcinome canalaire pancréatique.

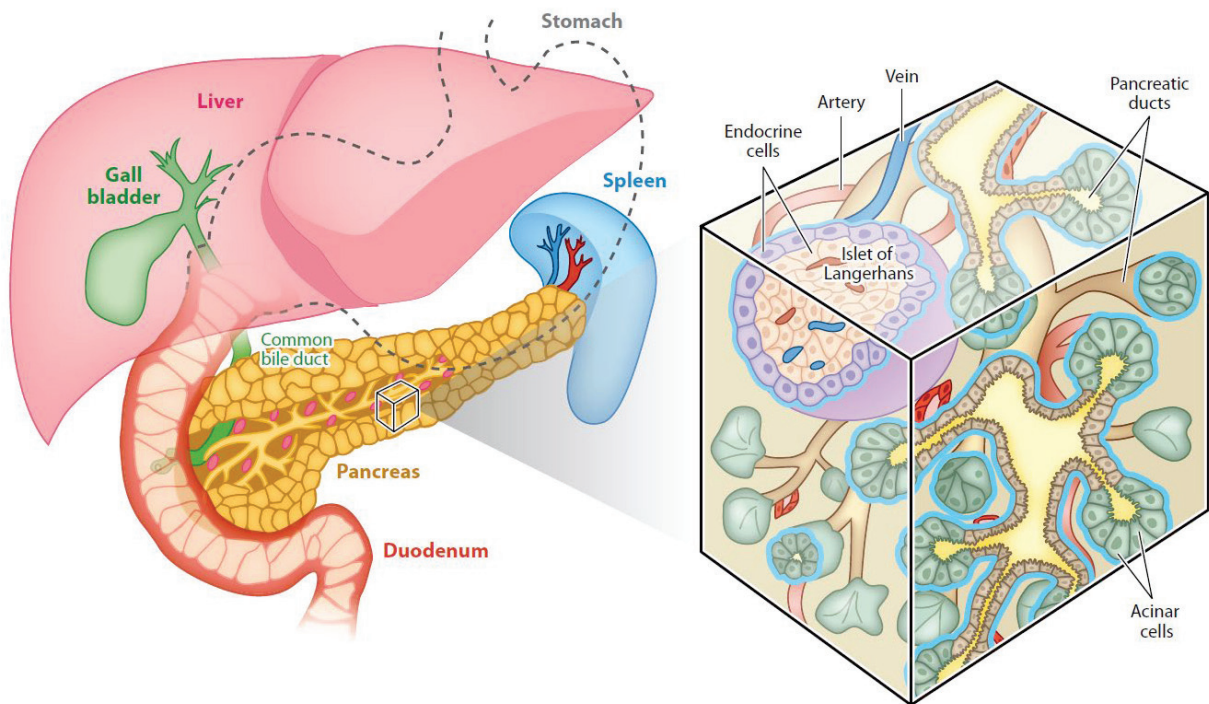


Figure 7 : Représentation anatomique (gauche) et organisation cellulaire (droite) du pancréas (Shih, Wang and Sander, 2013).

CHAPITRE 2 : PANCREAS PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE

I. Le pancréas sain : développement, structure et fonctions

Le pancréas est une glande annexe de l'appareil digestif, mesurant environ 13 cm et située dans l'anse du duodénum, enfouie à l'arrière de l'estomac (**Figure 7**). Il est composé de 3 compartiments communément appelés « tête », « corps » et « queue » chez l'Homme, cette dernière étant orientée horizontalement vers la rate ([Longnecker, 2014](#)). C'est une glande mixte dite amphicrine. Le compartiment exocrine compose la majorité du tissu pancréatique (98%) et excrète les enzymes digestives dans le duodénum au niveau de la « tête ». Le compartiment endocrine est constitué des îlots de Langerhans, dispersés au sein du pancréas exocrine. Ils sont impliqués dans la régulation de la glycémie, par la sécrétion dans la circulation sanguine d'insuline et de glucagon notamment, par les cellules β (plus nombreuses, au centre des îlots) et α (en périphérie), respectivement ([Folli et al., 2018](#)). Malgré une forte différence morphologique (le pancréas de souris est plus diffus), les pancréas humain et murin gardent cette même organisation tissulaire fonctionnelle ([Dolenšek, Rupnik and Stožer, 2015](#)).

A. Organogenèse du pancréas

Le développement du pancréas a été très étudié dans la souris et est similaire à celui de l'Homme ([Shih, Wang and Sander, 2013](#); [Jennings et al., 2015](#)), bien que leurs morphologies divergent en fin d'organogenèse. L'intégralité des événements de l'organogenèse pancréatique sont résumés en **Figure 8**.

Les deux bourgeons pancréatiques à l'origine du développement du pancréas sont spécifiés au niveau de l'endoderme de l'intestin primitif antérieur. Lors de cette étape nommée transition primaire, l'expression de PDX1 (Pancreatic and Duodenal homeoboX) par les progéniteurs endodermiques permet leur spécification en progéniteurs multipotents pancréatiques (MPC) caractérisés par l'expression de plusieurs facteurs de transcription, dont PDX1, PTF1A, SOX9, HNF1 β , NKX6.1/2, HES1 et FOXA1/2 ([Shih, Wang and Sander, 2013](#); [Jennings et al., 2015](#)). Le bourgeon pancréatique dorsal est le premier à apparaître, suivi de près par le bourgeon pancréatique ventral, en aval de l'ébauche hépatique ([Pan and Brissova, 2014](#)). Ces événements requièrent des signaux provenant du mésoderme ([Cozzitorto and Spagnoli, 2019](#); [Seymour and Serup, 2019](#)), dont notamment l'exclusion de Sonic Hedgehog (SHh) qui permet l'expression de PDX1 ([Kim and MacDonald, 2002](#)) (**Figure 8A**).

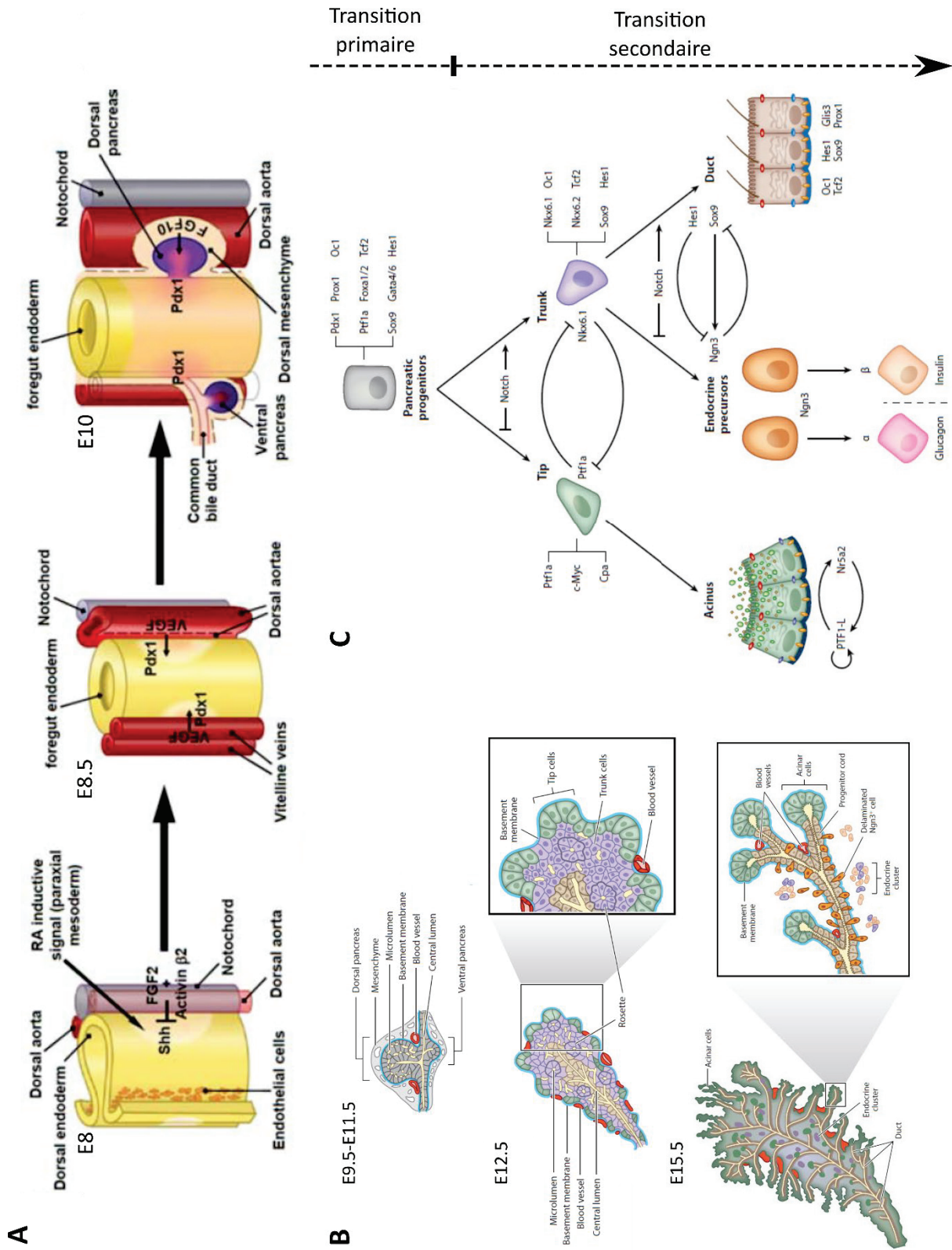


Figure 8 (partie 1) : Mécanismes impliqués dans le développement du pancréas. A : Signaux d'induction de la différenciation pancréatique (Pan and Wright, 2011). B et C : Différenciation cellulaire pancréatique, reprenant la compartimentation fonctionnelle, les étapes de différenciation cellulaire et les facteurs impliqués (Shih, Wang and Sander, 2013).

D

Événements développementaux	Souris (jpc)	Homme (jpc)
Spécification de l'endoderme vers l'identité pancréatique	E8.5 – E10	19-24
Formation des bourgeons pancréatiques (expression de <i>PDX1</i>)	E10.5 – E12	28-36
Prolifération des progéniteurs pancréatiques multipotents		
Ségrégation cellules du tronc – cellules apicales	E12.5-E14	40-48
Fin de la différenciation acineuse		
Maturation du réseau canalaire		
Spécification des cellules endocrines	E15-E17.5	54-70
Rotation de l'estomac, fusion des pancréas ventral et dorsal (humain uniquement)		

The diagram illustrates the developmental stages of the pancreas. It shows the rotation of the stomach and the fusion of the ventral and dorsal buds. Labels include: stomach, galbladder, ventral bud, dorsal bud, rotation, ventral bud adheres to duodenum, fusion, and site of duodenal obstruction.

Figure 8 (partie 2) : Mécanismes impliqués dans le développement du pancréas. D : Stades développementaux des grands événements du développement pancréatique chez l'Homme et la souris (jpc = jours post-conception) (d'après (Pan and Brissova, 2014; Jennings et al., 2015; Henry et al., 2019)).

Vient ensuite la transition secondaire, au cours de laquelle le tissu pancréatique acquiert ses spécificités histologiques et fonctionnelles par prolifération et différenciation des cellules progénitrices (morphogénèse) (**Figure 8B et C**) (Shih, Wang and Sander, 2013; Pan and Brissova, 2014). L'épithélium croît par ramification et est ségrégué en deux parties (Shih, Wang and Sander, 2013; Larsen and Grapin-Botton, 2017). La partie centrale comprend les cellules « du tronc », caractérisées par l'expression des facteurs NKX6.1/2, SOX9 et HES1. La zone périphérique est constituée des cellules « apicales », caractérisées par l'expression des facteurs PTF1A (Pancreas transcription factor 1 subunit alpha), c-MYC et CPA1 (CarboxyPeptidase A1). Les cellules acineuses se développent à partir des cellules apicales, en périphérie du réseau tubulaire, et seront connectées aux canaux pancréatiques une fois matures (MacDonald, Swift and Real, 2010). Les cellules canalaire quant à elles se différencient directement à partir des cellules du tronc au fur et à mesure de leur ramification. Enfin, les lignées endocrines (dont les cellules α et β) se développent à partir de précurseurs endocrines provenant des cellules du « tronc » et qui se détachent des ramifications canalaire afin de former les îlots. En revanche, il n'est pas clair si (1) les MPC se différencient d'abord en cellules apicales multipotentes pouvant elles-mêmes se différencier en cellules du « tronc » et cellules acineuses (hypothèse privilégiée) (Yu *et al.*, 2019), ou si (2) les MPC se différencient de manière concomitante en cellules apicales unipotentes et cellules du « tronc » bipotentes (Shih, Wang and Sander, 2013). Chez l'Homme, les épithéliums ventraux et dorsaux sont ensuite rapprochés par rotation de l'estomac et fusionnent, donnant au pancréas humain sa morphologie particulière (Henry *et al.*, 2019), tandis que dans la souris, ils forment un « continuum » plus diffus (Larsen and Grapin-Botton, 2017). Tous les événements du développement pancréatique sont résumés en **Figure 8D**.

Au cours de ces différenciations, les facteurs de transcription ont un rôle primordial dans la spécification de chaque type cellulaire (Habener, Kemp and Thomas, 2005). Le premier d'entre eux, PDX1, initie et régule le développement pancréatique, et est impliqué dans la ramification canalaire, (Wescott *et al.*, 2009) ainsi que dans la différenciation acineuse (Hale *et al.*, 2005). C'est ainsi un régulateur majeur de la formation du pancréas exocrine, mais il est aussi hautement impliqué dans la régulation du compartiment endocrine. PTF1A (aussi appelé p48), quant à lui, joue un rôle important dans l'expansion des MPCs et participe à la spécification et au maintien des cellules acineuses, dont il régule la proportion (Hoang *et al.*, 2016; Jin and Xiang, 2019). Ces deux facteurs de transcription sont de plus classiquement utilisés dans les modèles murins, permettant l'expression spécifique de modifications génétiques dans le pancréas (Gannon, Herrera and Wright, 2000).

B. Structure et fonction du pancréas exocrine

Le pancréas exocrine est organisé en lobules, constitués d'acini et connectés entre eux par un réseau de canaux convergeant par le canal principal vers le duodénum (**Figure 9**) (Pandol, 2010).

Les acini sont composés de cellules épithéliales jointives excrétrices (cellules acineuses), qui comptent pour 80% des cellules du pancréas. Parmi les enzymes digestives produites par ces cellules, se trouvent des enzymes protéolytiques (trypsinogène, chymotrypsinogène, procarboxypeptidase) qui sont sécrétées sous une forme inactive et qui seront activées dans la lumière duodénale, de l'amylase pour la digestion des glucides et d'autres enzymes telles que la chitinase ou la lipase, permettant la digestion d'une grande variété d'aliments. Les cellules acineuses présentent une polarité fonctionnelle (Yule, 2010). Le pôle basal, où se situe le noyau et une grande quantité de réticulum endoplasmique rugueux, est positionné à l'opposé de la lumière, afin d'être en contact avec la vascularisation et l'innervation présentes autour des acini. Le pôle apical, enrichi en granules de zymogènes (précurseurs d'enzymes) est dirigé vers la lumière centrale de l'acinus connectée au réseau canalaire (Motta *et al.*, 1997; Longnecker, 2014).

Le réseau canalaire (10% des cellules pancréatiques) présente une structure en « arbre ». Les lumières des acini sont en continuité de petits canaux appelés canaux « intercalés ». La fusion de plusieurs de ces canaux au sein d'un lobule pancréatique mène à un canal plus grand nommé canal intralobulaire. Ces canaux fusionnent ensuite pour former les canaux interlobulaires qui convergent tous vers le canal principal. Enfin, le canal principal fusionne avec le canal principal biliaire, déversant son contenu au niveau du duodénum (Egerbacher and Böck, 1997; Motta *et al.*, 1997). Les cellules canalaire sont aussi responsables de l'excrétion d'un fluide aqueux alcalin qui représente la plus grande partie des sucs pancréatiques. En effet, les enzymes digestives fonctionnent dans un milieu plutôt neutre, tandis que le milieu intestinal est très acide. Par l'excrétion de bicarbonate (NaHCO_3) et de mucines, les cellules canalaire forment un fluide neutralisant le pH acide du bol alimentaire, permettant le fonctionnement des enzymes digestives et protégeant la muqueuse duodénale (Grapin-Botton, 2005).

Enfin, la lumière des acini est « tapissée » de cellules centro-acineuses (Motta *et al.*, 1997), cellules canalaire fines et spécialisées ayant également des caractéristiques de cellules progénitrices (Cleveland *et al.*, 2012; Beer, Parsons and Rovira, 2016). Ces cellules, qui sont les moins bien caractérisées des cellules pancréatiques, font le lien entre l'acinus et le canal intercalé (Cleveland *et al.*, 2012).

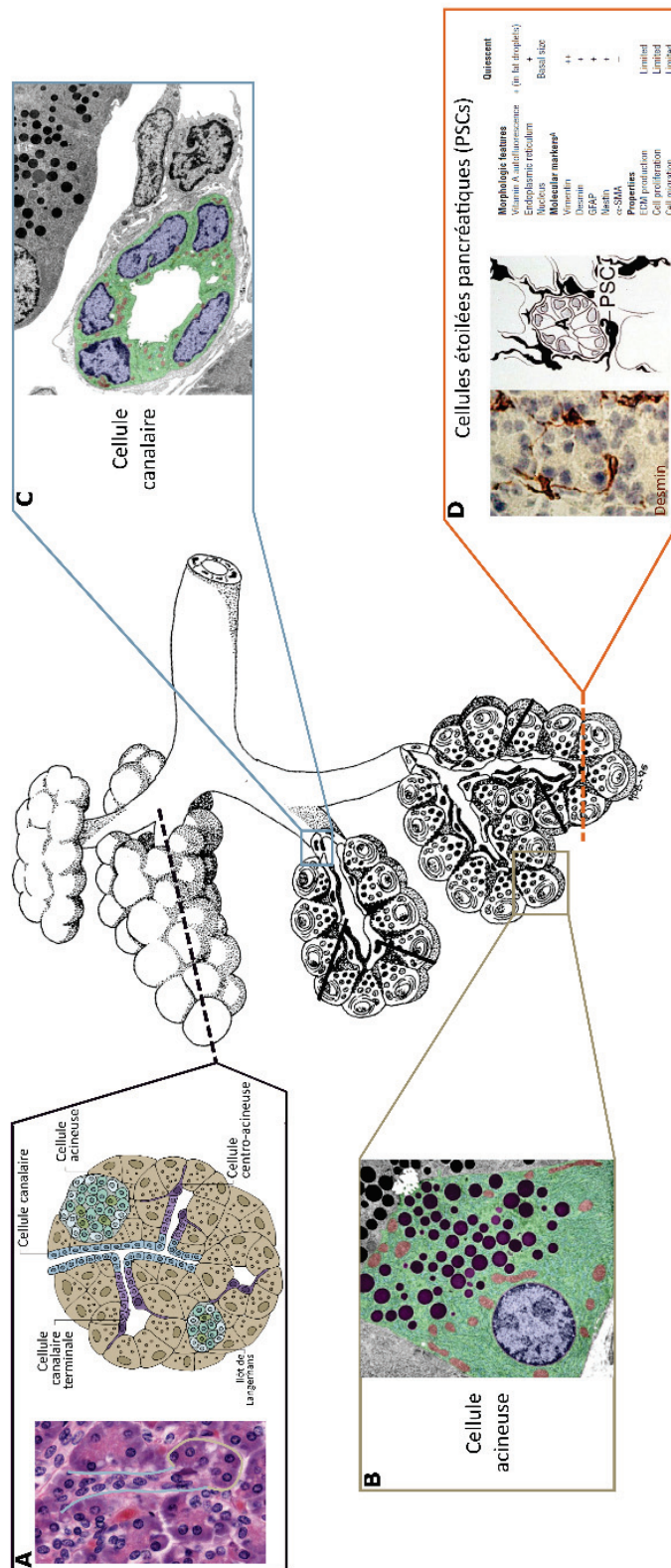


Figure 9 : Structure du pancréas exocrine. A : Coupe d'un lobule acineux, présentant les différents types cellulaires pancréatiques. B et C : Photo en microscopie électronique à transmission d'une cellule acineuse (B) et d'une cellule canalaire (C). D : Observation et caractéristiques des cellules pancréatiques étoilées ((Motta et al., 1997; Omary et al., 2007; Apte, Pirola and Wilson, 2012; Beer, Parsons and Rovira, 2016), <http://www.histologyguide.com>).

Les fonctions exocrines du pancréas sont régulées par le système neuroendocrinien ainsi que par des signaux paracrines (Pandiri, 2014) et cette régulation est fortement liée à la digestion. En effet, la sécrétion des sucs pancréatiques doit être contrôlée, afin d'éviter les dommages pancréatiques. L'axe le plus communément admis pour cela est le relargage d'acétylcholine par les neurones vagues post-ganglionnaires (réflexe entéro-pancréatique vago-vagal), ainsi que la sécrétion de cholécystokinine (CCK, hormone gastro-intestinale) par les cellules endocrines intestinales (Williams, 2010), les deux activant l'excrétion par les cellules acineuses. De plus, l'exocytose des granules de zymogènes nécessite une régulation fine de la signalisation calcique (Ca^{2+}) (Williams, 2010). Les sécrétions des cellules canalaire quant à elles, sont notamment régulées par la sécrétine, hormone intestinale sécrétée en réponse à l'acidité intestinale (Williams, 2010). La CCK pourrait également avoir un effet sur les cellules canalaire mais cela reste à confirmer (Mössner, 2010). Enfin, la communication entre cellules acineuses et canalaire est nécessaire dans cette régulation afin d'assurer la sécrétion contrôlée des sucs pancréatiques (Hegyí and Petersen, 2013).

C. Description du microenvironnement pancréatique sain

Les compartiments épithéliaux pancréatiques sont enveloppés par un tissu conjonctif lâche, fournissant à l'organe un support et une structure. Ce tissu conjonctif, composé de MEC interstitielle et de fibroblastes résidents (Yamamoto *et al.*, 2017), est séparé des cellules épithéliales par une lame basale, aidant à leur ancrage.

La MEC formant le tissu conjonctif lâche pancréatique a pu être observée (Geutskens *et al.*, 2004; Grippo *et al.*, 2011; Vigier *et al.*, 2017), et sa composition a été récemment caractérisée par protéomique (F. Ma *et al.*, 2019; Berger *et al.*, 2020). Parmi les protéines matricielles les plus exprimées sont présents un grand nombre de collagènes, notamment des collagènes dits fibrillaires (de types I, III et V), associés aux fibres (type XIV), d'ancrage (type VII), formant des réseaux (types VI et VIII), ainsi que du collagène de type IV (spécifique de la lame basale). Cette MEC contient également de nombreuses glycoprotéines dont la fibronectine et des laminines, et une plus faible proportion de protéoglycanes. Enfin, les protéines associées à la matrice ont également été identifiées, dont des régulateurs de la matrice, des protéines associées et des facteurs sécrétés.

L'implication du tissu conjonctif, et plus généralement du mésenchyme environnant, dans le développement et le maintien de l'intégrité du pancréas exocrine a été mise en évidence à plusieurs reprises. Au cours du développement d'abord, pendant lequel le mésenchyme (notocorde, aorte dorsale, etc) est impliqué dans l'induction de l'identité pancréatique et la différenciation acineuse, via l'action de nombreuses cytokines (Sanvito *et al.*, 1994; Cozzitorto and Spagnoli, 2019). De plus, les protéines matricielles (fibronectine, protéoglycanes à héparane sulfates, collagène de type IV et laminines) sont elles-mêmes impliquées dans le

contrôle de la morphogenèse canalaire et dans la différenciation cellulaire (Patel, Pineda and Hoffman, 2017; Cozzitorto and Spagnoli, 2019; Berger *et al.*, 2020). L'axe MEC-intégrines est ainsi impliqué dans plusieurs événements cellulaires au cours du développement pancréatique, en régulant la signalisation cellulaire induite par les protéines de la MEC (Shih *et al.*, 2016; Cozzitorto and Spagnoli, 2019). Cet axe aide de plus au maintien de l'architecture et de l'identité du pancréas exocrine (Riopel *et al.*, 2013). Le tissu conjonctif pancréatique permet également une séparation entre les compartiments endocrine et exocrine, nécessaire aux bonnes fonctions pancréatiques, mais assure aussi leur communication (Hughes *et al.*, 2005; Hayden *et al.*, 2008).

Le tissu conjonctif pancréatique exocrine contient des cellules étoilées pancréatiques (PSCs pour Pancreatic Stellate Cells) de « type fibroblastiques » bien que très différentes des fibroblastes résidents (**Figure 9**). Elles ont pu être identifiées dans les années 1980, grâce à leur ressemblance avec les cellules étoilées hépatiques (Watari, Hotta and Mabuchi, 1982; Ikejiri, 1990; Zhao and Burt, 2007). Situées notamment en périphérie des capillaires et de la lame basale (Watari, Hotta and Mabuchi, 1982), leur origine est encore sujet à débat (Bynigeri *et al.*, 2017). Elles pourraient en effet dériver de cellules mésodermiques (comme les cellules étoilées hépatiques) (Asahina *et al.*, 2009) ou de la moëlle osseuse (Sparmann *et al.*, 2010). A l'état quiescent dans le pancréas sain, les PSCs prolifèrent et migrent peu, ainsi qu'elles produisent peu de protéines de la MEC (principalement sécrétées par les fibroblastes résidents) (Apte, Pirola and Wilson, 2012). Elles sont caractérisées (1) par le stockage de vitamine A dans des gouttelettes lipidiques auto-fluorescentes, et (2) par l'expression de marqueurs tels que la desmine ou GFAP (**Figure 9**) (Omary *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2009), mais il reste difficile d'avoir un marqueur cellulaire bien spécifique de ce type de cellules (Nielsen, Mortensen and Detlefsen, 2017). Bien que potentiellement intéressant, le rôle des PSCs quiescentes est peu connu (Ferdek and Jakubowska, 2017). Certaines fonctions leur ont cependant été trouvées, comme la phagocytose de cellules apoptotiques ou nécrotiques (Shimizu *et al.*, 2005) et la régulation de la fonction excrétrice (Phillips *et al.*, 2010). Elles seraient de plus une potentielle source de progéniteurs de cellules épithéliales, notamment endocrines (Mato *et al.*, 2009). Les PSCs sont activées en cas de dommage pancréatique (Sherman, 2018), point qui sera repris par la suite dans le cadre du cancer pancréatique. Cette activation, observée d'abord lors de leur mise en culture (Ikejiri, 1990; Apte *et al.*, 1998; Bachem *et al.*, 1998), leur permet d'acquérir de nouvelles fonctions, dont le remodelage de la MEC environnante (Phillips *et al.*, 2003), mais doit être réversible.

II. Le cancer du pancréas - Focus sur l'adénocarcinome canalaire pancréatique

Le cancer du pancréas est actuellement le 14^{ème} cancer le plus incident au monde selon les chiffres les plus récents de l'Observatoire Global sur le Cancer (2018). Responsable de 4,5% des morts par cancer, il est le 7^{ème} cancer le plus mortel à l'échelle mondiale (Bray *et al.*, 2018; Rawla, Sunkara and Gaduputi, 2019). De plus, avec presque autant d'incidence que de mortalité (Figure 10) et une survie à 5 ans de 6 à 9%, il est l'un des cancers les plus agressifs (Rawla, Sunkara and Gaduputi, 2019).

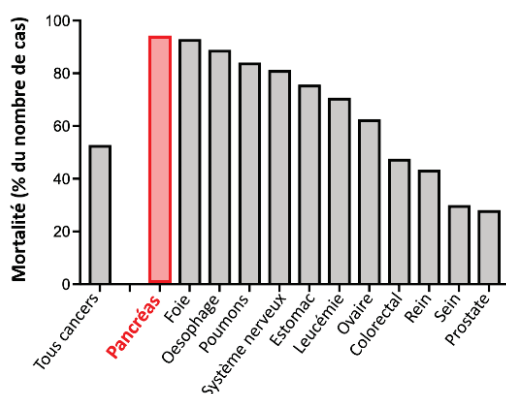


Figure 10 : Taux de mortalité de différents cancers au regard de leur incidence (nombre de décès/nombre de nouveaux cas) (Global Cancer Observatory - 2018)

L'épidémiologie du cancer du pancréas est très dépendante du développement économique. En effet, ce cancer atteint plus durement les pays industrialisés, du fait notamment des facteurs de risques environnementaux qui seront détaillés par la suite. Dans ces pays, le cancer du pancréas fait souvent partie des 5 à 10 cancers les plus incidents (9^{ème} en France et en Europe, 11^{ème} aux Etats-Unis) et les plus mortels (3^{ème} en France, en Europe et aux Etats-Unis) (<https://gco.iarc.fr/>). Aux Etats-Unis, la mortalité due au cancer du pancréas est restée croissante entre 1975 et 2015, à l'inverse de la plupart des autres cancers (Siegel, Miller and Jemal, 2018). Il pourrait d'ailleurs, d'ici 2030, devenir la 2^{ème} cause de mort par cancer aux Etats-Unis et en Allemagne, par exemple, si aucun progrès significatif n'est apporté entre temps (Rahib *et al.*, 2014; Quante *et al.*, 2016).

Le terme « cancer du pancréas » regroupe plusieurs types de tumeurs (Kleeff *et al.*, 2016). Le tissu endocrine peut être affecté, notamment par des tumeurs neuroendocrines qui se développent au sein des îlots de Langerhans (environ 10%). Au niveau du pancréas exocrine, il existe de nombreux types de tumeurs, telles que des carcinomes colloïdes (2% des cas), des tumeurs pseudo-papillaires et solides (2%), des carcinomes à cellules acineuses (1%) ou des pancréatoblastomes (0,5%), qui demeurent peu fréquents. L'adénocarcinome canalaire pancréatique (ADKP) reste le plus courant des cancers du pancréas, avec environ 85% des cas. Ce type de tumeur est caractérisée par une perte des structures acineuses au profit de cellules canalaire se développant de manière anarchique. Ces altérations histologiques, ainsi que la progression cellulaire et moléculaire de l'ADKP ont été bien caractérisées (Fokas *et al.*, 2015), et seront détaillées ci-après. L'implication du microenvironnement tumoral, qui prend une place importante dans la physiopathologie de l'ADKP, sera particulièrement abordée.

A. L'ADKP - Généralités

1. Facteurs de risque

La majorité des cas d'ADKP surviennent de manière sporadique (90%), sans prédisposition génétique (Tsai and Chang, 2019). L'apparition de ce type de cancer est multifactorielle, avec des facteurs de risques nombreux (Rawla, Sunkara and Gaduputi, 2019), à la fois modifiables (environnementaux) et non modifiables, et pouvant interagir (Hassan *et al.*, 2007).

Parmi les facteurs environnementaux les plus connus, le tabagisme est l'un des facteurs à risque les plus forts. En effet, les personnes consommant des cigarettes à long terme et/ou à forte dose présentent un risque 40 à 66% plus élevé de développer un ADKP (Korc *et al.*, 2017; Molina-Montes *et al.*, 2020). Une forte consommation d'alcool, de manière régulière ou non, est de la même manière un comportement à risque en ce qui concerne l'ADKP. Ces deux facteurs de risque, plus forts chez les hommes, sont indépendants, mais peuvent interagir de manière synergique (Gupta *et al.*, 2010). Le mode d'alimentation représente le troisième grand facteur influant sur l'apparition d'un ADKP. Bien que la relation de cause à effet soit complexe à mettre en lumière, une alimentation « de type occidentale », souvent trop grasse, salée et sucrée, augmenterait le risque de développer un cancer du pancréas. De plus, certains types d'aliments ou nutriments (vitamines C, E, sélénium, *etc*) pourraient avoir des effets bénéfiques ou délétères selon leur nature (Salem and Mackenzie, 2018). Les données concernant l'obésité sont quant à elles discordantes (Zhou *et al.*, 2019). En effet, une large méta-analyse portée sur un grand nombre de cancers n'a pas pu mettre en évidence de lien de cause à effet (Renehan *et al.*, 2008), alors que d'autres analyses plus précises ont montré que l'obésité pourrait augmenter le risque de développer un ADKP (Rawla, Thandra and Sunkara, 2019), avec plusieurs mécanismes possibles (inflammation, dérégulations hormonales, *etc.*) (Paternoster and Falasca, 2020). En outre, d'autres facteurs tels que la pollution et autres agents environnementaux pourraient être impliqués dans l'initiation du cancer du pancréas (Barone *et al.*, 2016). Le moyen de prévention à privilégier serait finalement une bonne hygiène de vie (Naudin *et al.*, 2019), évitant la cigarette, l'alcool et les abus de manière générale.

L'apparition de l'ADKP est également soumise à des facteurs non modifiables. En effet, l'ADKP est un cancer plutôt lié à l'âge, avec un âge moyen de 70 ans et un risque qui s'accroît avec le vieillissement. Des changements morphologiques au sein même du pancréas pourraient en être la cause (modification de l'équilibre acineux, apparition et accumulation de lésions pré-cancéreuses) (Matsuda, 2019). En outre, l'apparition de l'ADKP est fortement liée au diabète, notamment de type II (Paternoster and Falasca, 2020). En effet, ce dernier est un facteur de risque, les patients diabétiques de type II ayant un risque de 50% plus élevé de développer un ADKP. D'autre part, le diabète peut être une manifestation clinique de l'ADKP, avec 25% des patients diagnostiqués présentant un diabète, et 40% un pré-diabète (Risch, 2019). Le

développement de l'ADKP peut également être favorisé par un environnement inflammatoire au sein du pancréas. En effet, les pancréatites aiguës ou chroniques peuvent évoluer vers une transformation maligne. En revanche, dans le cas des pancréatites chroniques, ce risque diminue avec le temps (stabilisation de la pancréatite), un ADKP ne se développant que dans 5% des cas (Raimondi *et al.*, 2010; Kirkegård, Mortensen and Cronin-Fenton, 2017; Kirkegård *et al.*, 2018).

Une infection par *Helicobacter pylori* (infection de la muqueuse gastrique) représente également un facteur de risque au développement d'un ADKP (retrouvée dans 4 à 25% des patients). Enfin, 10% des ADKP diagnostiqués sont d'origine familiale ou génétique. En effet, les antécédents familiaux de cancer du pancréas ainsi que plusieurs syndromes génétiques composent une prédisposition au développement de l'ADKP. Dans ces cas particuliers d'individus à haut risque, un dépistage sera effectué (Chhoda *et al.*, 2019).

2. Symptômes et diagnostic

L'ADKP est difficilement détectable puisque ses symptômes peuvent se rapporter à bien d'autres pathologies (Carrato Mena *et al.*, 2018). De plus, il peut rester asymptomatique longtemps, l'apparition des symptômes coïncidant souvent avec un stade avancé de la maladie. Ce diagnostic compliqué retarde la prise en charge thérapeutique et réduit les chances de survie (Porta *et al.*, 2005; Walter *et al.*, 2016). Le symptôme le plus courant (70% des patients) est une douleur abdominale forte, pouvant irradier dans le dos, souvent associée à une perte de poids. 30 à 50% des patients présentent une jaunisse, liée à l'obstruction par la tumeur du canal biliaire. D'autres symptômes tels que des nausées et vomissements, une stéatorrhée (quantité élevée de lipides dans les selles), le développement d'un diabète ou des sensations de malaise peuvent évoquer le développement d'un ADKP (Holly *et al.*, 2004; Pannala *et al.*, 2009). Ces différents symptômes sont souvent corrélés à l'avancement de la maladie (Figure 11A).

Face à l'absence de biomarqueur précoce et spécifique associée à sa « faible » incidence, le dépistage massif de l'ADKP n'est pas préconisé dans la population générale. Un dépistage systématique ne sera envisagé que pour les personnes à haut risque (patients ayant des antécédents familiaux ou des syndromes génétiques associés à l'ADKP) (Greenhalf *et al.*, 2009; Hanada *et al.*, 2015). Dans les années à venir, il apparaît donc important de mettre au point des techniques d'imagerie ou d'identifier des biomarqueurs permettant de mettre en évidence des formes moins avancées de l'ADKP (Shin and Canto, 2012; Pereira *et al.*, 2020). Face aux premiers symptômes et à la confirmation de la présence d'une masse tumorale, plusieurs outils diagnostic peuvent être utilisés, selon les recommandations nationales et internationales (Miura *et al.*, 2006; Ducreux *et al.*, 2015; Neuzillet *et al.*, 2018) (Figure 11B). Un scanner par tomodensitométrie ou une IRM permettra d'abord de constater ou non l'avancement métastatique de la maladie. Selon ces premiers résultats, plusieurs stratégies

A Symptômes et outils de diagnostic

Symptômes liés à l'ADKP	Association à la progression (stade de la tumeur)
Masse abdominale	
• Masse épigastrique	++
• Masse de l'hypocondre droit	++
• Signe de Courvoisier (vésicule biliaire distendue)	+
• Hépatomégalie (foie enflé)	-
Douleur	
• Abdominale	++
• De l'hypocondre droit	-
• De l'hypocondre gauche	++
• Epigastrique	++
• Dorsale	++
Symptômes cholestatiques	
• Jaunisse	+++
• Hypocholie (sécrétion insuffisante de bile)	+++
• Cholorie (éléments de la bile dans les urines)	+++
• Prurit (démangeaisons)	+++
Syndromes généraux	
• Asthénie	-
• Anorexie	-
• Perte de poids	+
• Cachexie	-
Autres symptômes	
• Diarrhées	-
• Stéatorrhées (grande quantité de lipides dans les selles)	-
• Nausées	-
• Vomissements	-

B

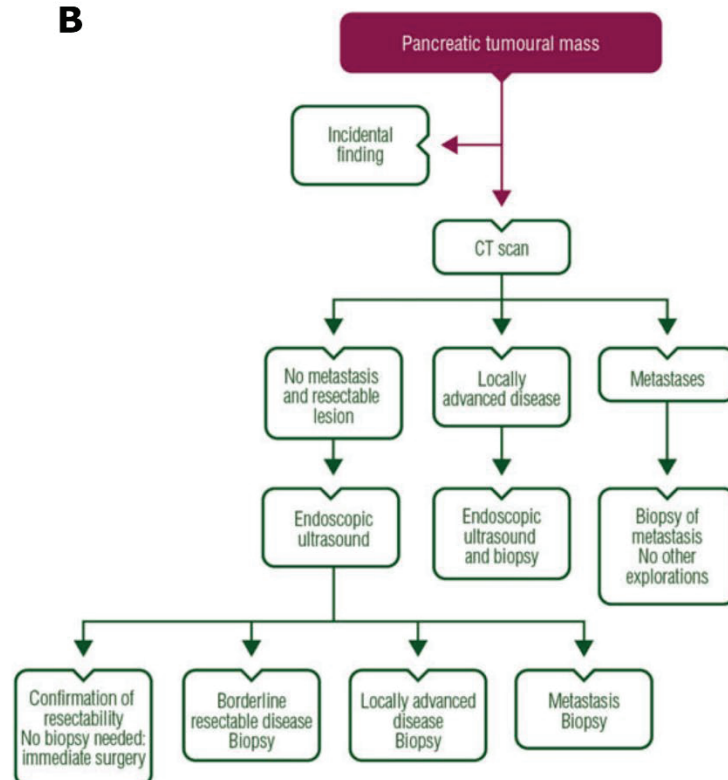


Figure 11 : Approches cliniques de l'ADKP. A et B : Symptômes observés et leur association à la progression de l'ADKP. B : Outils de diagnostic et arbre de décision selon les résultats obtenus (Porta et al., 2005; Ducreux et al., 2015).

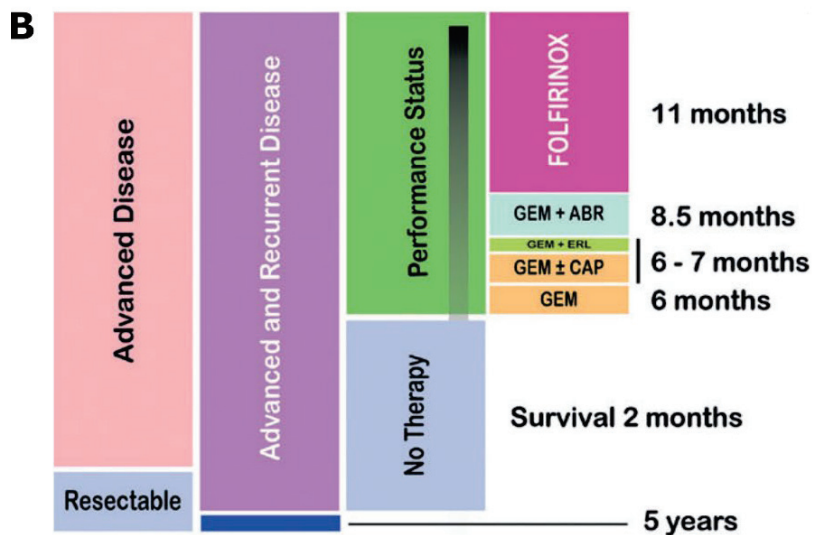
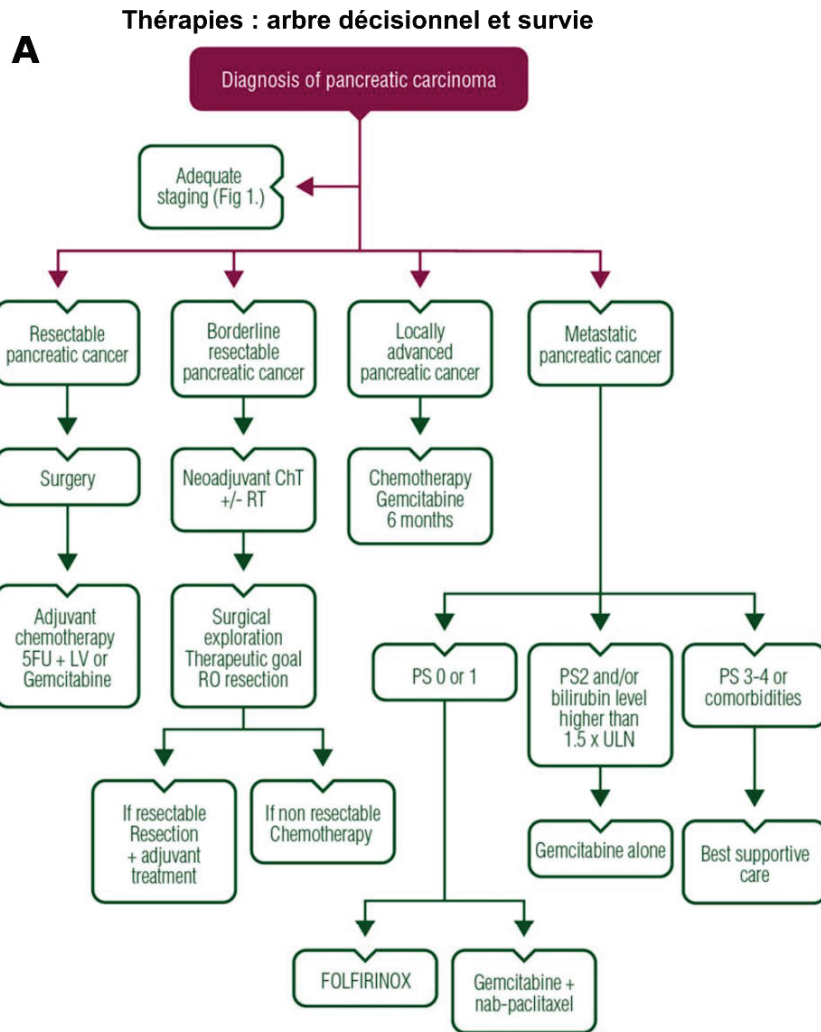


Figure 12 : Arbre de décision thérapeutique et bénéfices apportés par les différents traitements chimiothérapeutiques existants (Ducreux et al., 2015; Graham et al., 2015).

seront alors mises en place afin de déterminer (1) le caractère résécable de la tumeur, dans le cadre d'un cancer non métastasé, et (2) les caractéristiques de la tumeur. Ce cheminement de diagnostic adapté à chaque patient permet ainsi de décider au mieux de la stratégie thérapeutique à adopter.

3. Traitements et limites actuelles

L'agressivité et le diagnostic tardif de l'ADKP en font un des cancers les plus létaux, pour lequel il n'existe aujourd'hui que peu de thérapies, avec une efficacité limitée (Adamska, Domenichini and Falasca, 2017). Le seul traitement réellement bénéfique à ce jour pour les patients est la résection de la tumeur par chirurgie, mais seulement 20% des patients présentent une tumeur résécable. Les critères de non résection comprennent notamment la présence de métastases et les contacts artériels et veineux de la tumeur, témoins de l'invasion tumorale (Ducreux *et al.*, 2015; Isaji *et al.*, 2018). Dans certains cas limites, dits « borderline », (1) un traitement néoadjuvant peut être envisager afin de réduire la tumeur et pouvoir procéder à une résection (Sakaguchi *et al.*, 2020), ou (2) une résection pourra être envisagée avec de larges marges chirurgicales, suivie d'un traitement par chimiothérapie (Figure 12A).

Dans la majorité des cas, la tumeur est localement avancée, voire métastasée, rendant les chances de survie très limitées (environ 3 mois post-diagnostic sans traitement). Les molécules alors utilisées en chimiothérapie permettent un allongement, bien qu'assez restreint, de la durée de vie des patients (Figure 12B) (Vaccaro *et al.*, 2015). La première molécule à avoir été utilisée est le 5-FluoroUracile (5-FU), antimétabolite bloquant la synthèse d'ADN et donc le cycle cellulaire, qui n'allonge que peu la survie des patients, avec une médiane de survie à 4,4 mois. Une première amélioration est arrivée dans les années 1990 avec la gemcitabine, antimétabolite entraînant la mort cellulaire en phase S, qui a permis d'allonger la médiane de survie post-diagnostic à 6 mois (Burris 3rd *et al.*, 2016). Depuis, de nombreux essais ont combiné la gemcitabine à d'autres molécules, avec plus ou moins de succès (Heinemann *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2019). En 2013, la gemcitabine a notamment été associée au nab-paclitaxel, particules de paclitaxel (qui bloque la dynamique des microtubules nécessaire à la prolifération cellulaire) couplées à l'albumine, permettant une meilleure pénétration des agents thérapeutiques. Cette combinaison a permis d'augmenter la moyenne de survie à 8,5 mois (Von Hoff *et al.*, 2013). Enfin, une autre stratégie combinatoire, le FOLFIRINOX, a montré un allongement significatif de la médiane de survie, la menant à 11 mois post-diagnostic (Conroy *et al.*, 2005; Vaccaro, Sperduti and Milella, 2011). Ce traitement est une combinaison de quatre molécules (Oxaliplatine, Leucovorine (acide folinique), Irinotécan et 5-FU), mais qui présente une forte toxicité, avec de nombreux effets secondaires. L'utilisation de la radiothérapie reste quant à elle très discutée dans le traitement de l'ADKP et aucun consensus n'a pour l'instant été trouvé en France.

L'analyse de l'anatomie et de l'histologie de la tumeur permet d'orienter au mieux les choix du traitement, suivant les préconisations françaises et internationales des thérapies actuellement disponibles (Ducreux *et al.*, 2015; Neuzillet *et al.*, 2018; Tempero *et al.*, 2019).

L'ADKP présente de plus une forte chimiorésistance, principalement due à une résistance acquise par les cellules tumorales. En effet, ces dernières, très isolées du fait de la grande quantité de stroma, font face à un manque d'oxygène et de nutriments, et sont donc sélectionnées sur leur résistance, par l'accumulation de mutations favorables à leur survie.

Le besoin de thérapies plus efficaces et moins toxiques est donc plus que jamais présent dans le traitement de l'ADKP. Une meilleure compréhension des bases moléculaires et cellulaires de la tumeur sera la base du développement de nouvelles thérapies (Crippa *et al.*, 2017; Diab *et al.*, 2019). Actuellement, plusieurs pistes sont étudiées (Lai *et al.*, 2019), parmi lesquelles, le ciblage du stroma (Bhaw-Luximon and Jhurry, 2015; Bahrami *et al.*, 2017), les immunothérapies (Elaileh *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2020), les thérapies personnalisées (Tsfaye *et al.*, 2018) et les stratégies anti-angiogéniques (W. Qian *et al.*, 2018).

4. Stades cliniques et classification des tumeurs

Afin d'aborder au mieux le tableau clinique, plusieurs classifications ont été mises en place, visant à décrire l'avancée et le type de tumeur.

a. Classification anatomique : les stades pathologiques (TNM)

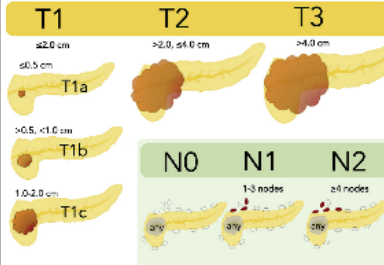
La classification pathologique d'une tumeur permet d'en décrire l'étendue anatomique (et donc son avancée), et est applicable à un grand nombre de tumeurs solides. Mise en place et régulièrement révisée par l'« American Joint Committee on Cancer » (AJCC) (Amin *et al.*, 2017), elle est nécessaire aux décisions thérapeutiques et au pronostic (Chatterjee *et al.*, 2017; Schlitter *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2018).

Cette classification, dite TNM, est basée sur trois scores : (1) le score T, qui traduit la taille de la tumeur primaire, (2) le score N qui relate de l'invasion des ganglions lymphatiques proximaux, et (3) le score M, traduisant la présence ou non de métastases distantes. Chaque score est représenté par un chiffre qui traduit de l'état d'avancement dans chaque compartiment, le chiffre le plus grand relatant l'état le plus avancé. Cette sous-division est spécifique à chaque type de cancer et le stade pathologique, résumé en lettres romaines (stades I, II, III et IV) est la résultante de ces trois scores (Gress *et al.*, 2017).

Les critères de classification TNM spécifiques de l'ADKP sont présentés dans la **Figure 13A** (Neuzillet *et al.*, 2018), et ont été validés par de grands centres de recherches en oncologie (Allen *et al.*, 2017; Kamarajah *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; van Roessel *et al.*, 2018). Il est à noter que la dernière (8^{ème}) édition de l'AJCC (2016) marque un tournant, avec la séparation pour la première fois des tumeurs exocrines et endocrines et la modification des critères de

A

Classification TNM (stades AJCC)

<p>Tumeur primaire (score T)</p> <ul style="list-style-type: none"> • T0 : Pas de preuve de tumeur primaire • Tis : Carcinome <i>in situ</i> • T1a : Tumeur ≤0,5cm (dans la plus grande dimension) • T1b : Tumeur >0,5cm et <1cm • T1c : Tumeur de 1-2cm • T2 : Tumeur >2cm et <4cm • T3 : Tumeur >4cm • T4 : La tumeur primaire envahit l'axe cœliaque, l'artère mésentérique et/ou l'artère hépatique (quelle que soit sa taille) 	 <p>→ Stades TNM :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Stade 0 : Tis, N0, M0 • Stade IA : T1 N0 M0 • Stade IB : T2 N0 M0 • Stade IIA : T3 N0 M0 • Stade IIB : T1-3 N1 M0 • Stade III : T1-3 N2 M0 ou T4 N0-2 M0 • Stade IV : T1-3 N0-2 M1
<p>Ganglions lymphatiques proximaux (score N)</p> <ul style="list-style-type: none"> • N0 : Pas de métastase observée sur les ganglions proximaux • N1 : Métastases dans 1 à 3 ganglions proximaux • N2 : Métastases dans 4 ou plus ganglions proximaux 	
<p>Métastases distantes (score M)</p> <ul style="list-style-type: none"> • M0 : Pas de métastase distante • M1 : Au moins 1 métastase distante 	

B

Grades

- **G1** : Bas grade, tumeur très différenciée, proche de l'histologie tissulaire d'origine
- **G2** : Grade intermédiaire, tumeur moyennement différenciée
- **G3** : Haut grade, tumeur peu différenciée
- **G4** : Haut grade, tumeur non différenciée

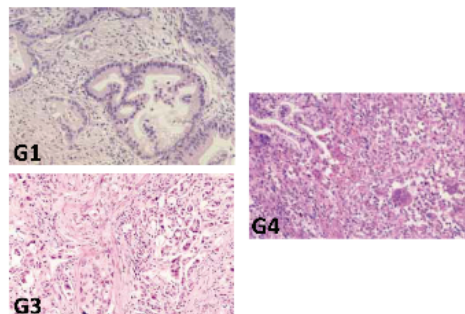


Figure 13 : Classification clinique et histologique de l'ADKP. A : Classification TNM (avancée anatomique de la tumeur). B : Grades (caractéristiques histologiques de différenciation de la tumeur) (d'après (Aaltonen et al., 2000; Neuzillet et al., 2018; Roalsø, Aunan and Søreide, 2020)).

taille de la tumeur primaire (Chun, Pawlik and Vauthey, 2018; Roalsø, Aunan and Søreide, 2020). Depuis 2016, plusieurs modifications ont été proposées pour la classification TNM, basées sur des observations cliniques (Chen *et al.*, 2019; Nagaria and Wang, 2019; Pu *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2019).

b. Classification morphologique : grades

La classification en grades relate du niveau de différenciation de la tumeur. Proposée par l'organisation mondiale de la santé (WHO, World Health Organization), elle traduit la ressemblance morphologique et fonctionnelle des cellules tumorales aux cellules du tissu d'origine (Aaltonen *et al.*, 2000; Nagtegaal *et al.*, 2020). Ainsi, le grade 1 correspond à des cellules tumorales bien différenciées, proches des cellules du tissu d'origine. A l'inverse, le grade 4 (le plus élevé), relate de cellules tumorales non différenciées, proches d'un phénotype de cellules souches (**Figure 13B**). La plupart des ADKP sont moyennement à très différenciés, avec des structures glandulaires bien définies, entourées de stroma (Haeberle and Esposito, 2019). Au sein d'une même tumeur, il peut exister conjointement des cellules de différents grades, souvent proches (G2 et G3, par exemple). De plus, ce grade peut souvent servir de facteur pronostic, un grade élevé étant souvent de mauvais pronostic (Lüttges *et al.*, 2000; Crippa *et al.*, 2012; Karamitopoulou, 2013).

Enfin, afin de n'avoir qu'une seule classification, le regroupement des stades pathologiques et grades a été proposé pour l'ADKP, qui pourrait alors être la classification « TNMG » (Wasif *et al.*, 2010; Rochefort *et al.*, 2013).

B. Initiation et progression de l'ADKP

1. Initiation de l'ADKP : lésions pré-néoplasiques

L'ADKP présente un mode de développement particulier, à partir de lésions pré-cancéreuses pouvant progresser vers une transformation maligne. L'accumulation des mutations au cours du développement de ces lésions est maintenant bien établie, grâce notamment à l'analyse des génomes des patients et à la genèse de modèles murins mimant la pathologie humaine. En revanche, l'origine des cellules (pré)tumorales reste controversée.

a. Diversité et histologie des lésions pré-néoplasiques

L'ADKP est issu de la transformation maligne de lésions pré-cancéreuses, dites précurseurs. D'abord observées chez l'Homme à proximité de carcinomes pancréatiques (Sommers, Murphy and Warren, 1954), elles ont ensuite pu être étudiées dans des modèles murins de développement d'ADKP.

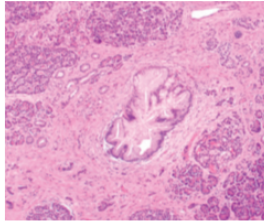
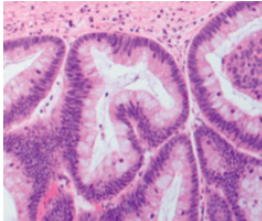
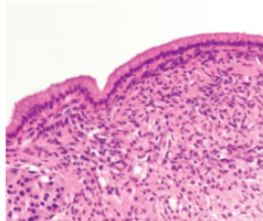
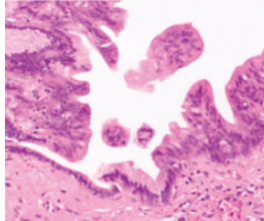
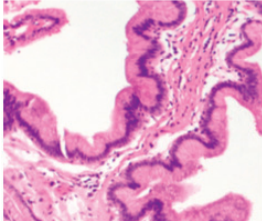
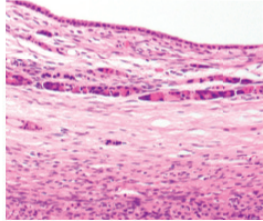
	PanINs	IPMNs	MCNs
Age moyen	Augmentation avec l'âge	60-70 ans	40-50 ans
Genre	homme = femme	homme > femme	Majoritairement chez les femmes
Localisation	Tête > corps/queue	Tête >> corps/queue	Tête et corps du pancréas
Caractéristiques macroscopiques	<ul style="list-style-type: none"> • Non visible macroscopiquement • < 5mm 	<ul style="list-style-type: none"> • Très kystique, papillaire • >10 mm • Contenu mucoïde • Connectés au canal principal ou ses ramifications 	<ul style="list-style-type: none"> • Très kystique • Contenu mucoïde • Pas de connexion aux canaux
Caractéristiques microscopiques	<ul style="list-style-type: none"> • Epithélium mucineux (plat à papillaire, mono à pluristratifié) • Stroma collagénique péri-canaulaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Epithélium mucineux (plusieurs sous-types) • Stroma collagénique 	<ul style="list-style-type: none"> • Epithélium mucineux • Stroma de type ovarien
			
			

Tableau 5 : Caractéristiques cliniques et histologiques des 3 grands types de lésions pancréatiques pré-néoplasiques (d'après (Haug, 2010; Pittman, Rao and Hruban, 2017)).

La notion de lésions précurseurs à un cancer invasif de quel type que ce soit, est basée sur 5 critères : (1) l'augmentation du risque de cancer en présence de ces lésions, (2) la progression des cellules composant ces lésions en cellules tumorales, (3) la différence morphologique avec le tissu sain d'origine, (4) la différence avec l'histologie du cancer que ces lésions précèdent, et (5) la possibilité de les diagnostiquer (Berman *et al.*, 2006). Les lésions observées dans le pancréas y répondent quasi en tous points, le diagnostic n'étant pas toujours évident.

Ces lésions se divisent majoritairement en trois types : les néoplasies intraépithéliales pancréatiques (PanINs), les néoplasmes intra-canaux papillaires et mucineux (IPMN) et les néoplasmes kystiques mucineux (MCN), définis par des caractéristiques morphologiques et cliniques qui leur sont propres (Tableau 5) (Haugk, 2010). En outre, la définition et la classification de ces lésions évoluent avec le temps (Hruban *et al.*, 2004; Hruban, Wilentz and Maitra, 2005; Cooper, O'Toole and Kench, 2013; Basturk *et al.*, 2015).

Les PanINs sont définies comme des lésions non invasives microscopiques (5mm environ) se développant au niveau des canaux intercalés ou des acini et présentant des quantités variables de mucine (Hruban, Maitra and Goggins, 2008; Cornish and Hruban, 2011). Leur petite taille les rend particulièrement difficiles à diagnostiquer, car invisibles à l'imagerie médicale. Ces lésions s'accumulent avec l'âge et sont les précurseurs les plus courants de l'ADKP. Souvent multifocales, leur évolution suit un modèle linéaire bien accepté, bien que parfois remis en question (Figure 14A et B) (Hruban *et al.*, 2000). Les PanIN-1 sont définies comme des épithélia unistratifiés plats (1A) ou papillaires (1B) composées de cellules allongées mais dans lesquelles la polarité est conservée (noyau en position basale et accumulation de mucine au pôle apical). Leurs noyaux restent relativement petits et ronds (ou ovales). Ces PanINs évoluent ensuite vers un stade 2, où les épithéliums sont généralement papillaires et présentent les premières aberrations nucléaires. En effet, ce stade est défini par la perte de polarité cellulaire, menant à un épithélium pseudostratifié, ainsi que par une taille augmentée des noyaux. Enfin, les PanIN-3, aussi appelées « carcinomes *in situ* » et fortement associées au développement de l'ADKP, sont des épithéliums papillaires pluristratifiés de cellules ayant perdu toute polarité et dont les noyaux présentent de nombreuses anomalies. Formant des amas dans la lumière canalaire, ces lésions de stade avancé ressemblent fortement à un ADKP sans invasion de la lame basale sous-jacente (Hruban *et al.*, 2001). Cette classification a récemment été revisitée en PanINs de bas (PanINs-1 et -2) et haut (PanIN-3) grade (Basturk *et al.*, 2015), autant chez l'Homme que dans les modèles murins (Tuveson and Hingorani, 2005; Ottenhof *et al.*, 2009). Au cours de leur développement, les PanINs présentent des expressions géniques différentes et accumulent des mutations, qui seront présentées par la suite (Buchholz *et al.*, 2005; Hruban, Maitra and Goggins, 2008).

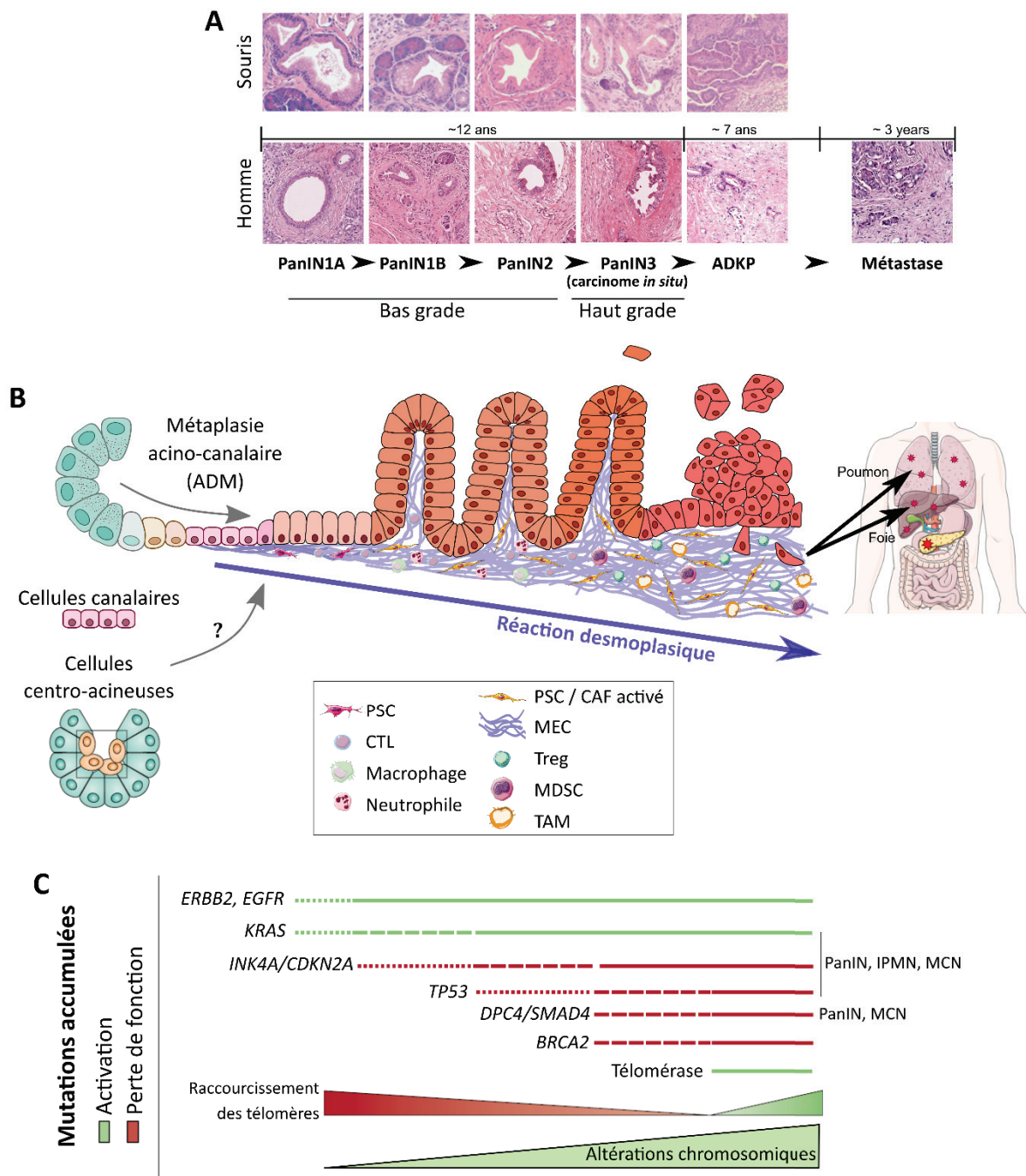


Figure 14 : Mécanismes de carcinogenèse pancréatique et mutations impliquées. A : Comparaison des caractéristiques histologiques des PanINs aux différents grades chez l'Homme et la souris. B : Modèle linéaire et origine(s) possible(s) de développement des PanINs vers l'ADKP. C : Altérations géniques accumulées au cours de la progression des lésions de type PanINs (d'après (Bardeesy and DePinho, 2002; Tuveson and Hingorani, 2005; Morris, Wang and Hebrok, 2010)).

Les IPMNs sont quant à eux des lésions kystiques non invasives macroscopiques, généralement papillaires et produisant de la mucine. Ils se développent généralement au niveau des canaux les plus gros, notamment le canal principal (Basturk *et al.*, 2015). Ces lésions, plus rares, peuvent être diagnostiquées du fait de leur taille. Tout comme les PanINs, les IPMNs présentent trois grades d'évolution (bas, intermédiaire et haut grades) et sont subdivisés en deux sous-types histologiques : (1) le type gastrique, principalement au niveau des canaux ramifiés et (2) le type intestinal, au niveau du canal principal et lui-même divisé en plusieurs sous-types (Ban *et al.*, 2006; Grützmann *et al.*, 2010).

Enfin, les MCNs sont des lésions kystiques plus rares qui ne communiquent pas avec le système canalaire pancréatique. L'épithélium, le plus souvent plat, est formé de cellules cylindriques productrices de mucine, reposant sur un stroma de « type ovarien ». Tout comme les IPMNs, ils peuvent être diagnostiqués grâce aux progrès de l'imagerie médicale.

Toutes ces lésions pré-tumorales présentent un intérêt clinique particulier. En effet, leur détection, pas encore possible dans le cas des PanINs, permettrait de diagnostiquer en amont un risque de développement d'ADKP et leur traitement précoce permettrait d'augmenter drastiquement l'espérance de vie des patients (Hruban *et al.*, 2007; Maitra and Hruban, 2008; Haugk, 2010).

b. Modifications génétiques en jeu

Au cours du développement de ces lésions, et notamment des PanINs, plusieurs mutations et aberrations chromosomiques s'accumulent et coopèrent afin de mener à une transformation maligne des cellules (Khan *et al.*, 2017). Ces altérations, plus ou moins fréquentes chez les patients (Sikdar *et al.*, 2018), comprennent (1) des mutations menant à l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, (2) des modifications épigénétiques, (3) une instabilité chromosomique liée au raccourcissement des télomères et (4) des expressions géniques anormales (dont notamment la réactivation de voies de signalisation développementales, et l'expression de la télomérase dans les stades plus tardifs) (Bardeesy and DePinho, 2002; Maitra, Kern and Hruban, 2006; Guo, Xie and Zheng, 2016). Ces nombreuses altérations (60 par patient en moyenne), mises en évidence par plusieurs analyses génomiques (Cancer Genome Atlas Research Network, 2017), mènent à une dérégulation de plusieurs voies de signalisation et processus cellulaires.

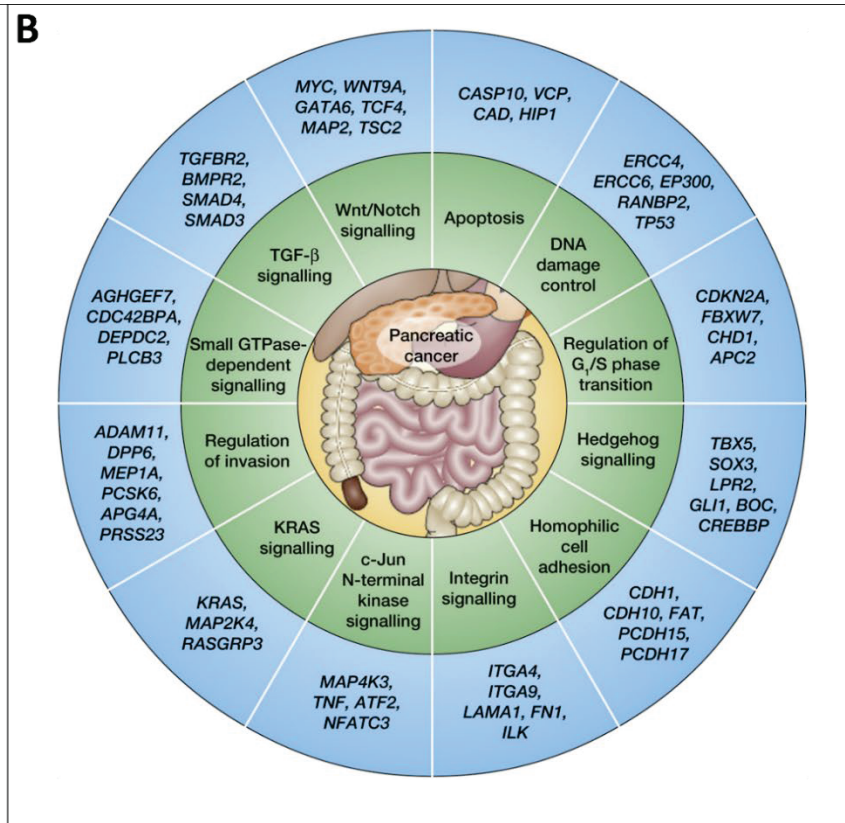
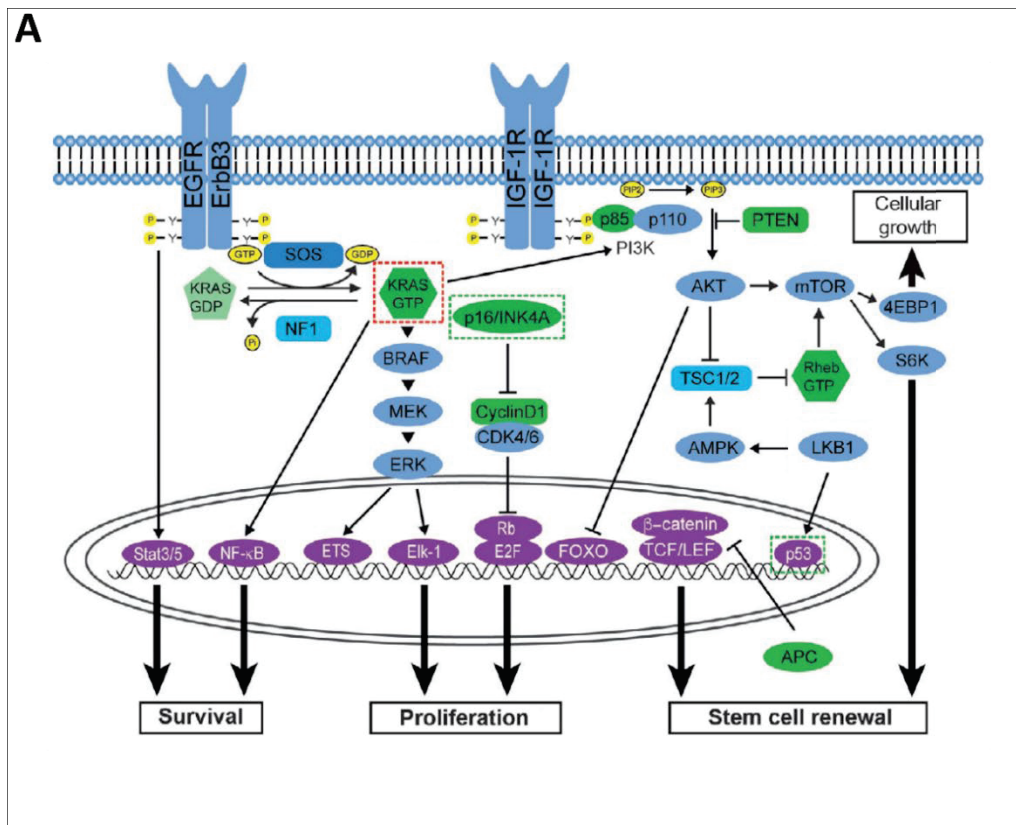


Figure 15 : Mutations et voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse pancréatique. A : Voies de signalisation affectées par les mutations les plus fréquemment retrouvées dans l'ADKP (Grant, Hua and Singh, 2016). B : Différentes mutations retrouvées dans l'ADKP et processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées (Hidalgo et al., 2015).

Au cours de l'évolution des PanINs, quatre gènes clés sont mutés de manière séquentielle (**Figure 14C**) (Cowan and Maitra, 2014; Wood, Yurgelun and Goggins, 2019). L'oncogène *KRAS* est muté le premier, considéré comme moteur de la tumorigenèse (« first hit mutation »). Les mutations de *KRAS* sont retrouvées dans 90 à 95% des tumeurs humaines et touchent majoritairement les codons G12, G13 et Q61. Elles induisent une activation constitutive de *KRAS* (Waters and Der, 2017) qui influe alors sur de nombreuses voies de signalisation, dont notamment les voies MAPK et PI3K/AKT, impliquées dans les processus biologiques liés à la tumorigenèse (**Figure 15A et B**) (Grant, Hua and Singh, 2016; Mann *et al.*, 2016; Buscail, Bournet and Cordelier, 2020). Ces modifications entraînent une sensibilité des cellules à la transformation maligne, en interaction avec le microenvironnement (Buscail, Bournet and Cordelier, 2020), mais ne suffisent pas au développement d'un ADKP invasif (Grant, Hua and Singh, 2016). Ce dernier nécessite la coopération d'autres mutations (**Figures 14C et 15B**) (Gidekel Friedlander *et al.*, 2009), notamment des altérations inactivant les gènes suppresseurs de tumeur *CDKN2A* et *TP53* (retrouvées respectivement chez 95% et 70-75% des patients), qui entraînent notamment une perte de contrôle du cycle cellulaire (Grant, Hua and Singh, 2016). En outre, *SMAD4* (ou *DPC4*), quatrième gène clé dans le développement de l'ADKP, est perdu dans près de 50% des patients. Ce gène, codant la protéine SMAD4, est impliqué dans la voie de signalisation du TGF β , facteur de croissance fortement impliqué dans la carcinogenèse et la progression tumorale pancréatique. Ces mutations ont également été observées dans les lésions de type IPMN et les MCN (Brosens *et al.*, 2015; Fischer and Wood, 2018), et sont fortement liées au tableau clinique car souvent corrélées à une survie réduite, lorsque plusieurs mutations coexistent (Qian *et al.*, 2018).

De nombreuses autres mutations sont présentes à des fréquences plus réduites (<10% des patients) (Pihlak *et al.*, 2018). Ces mutations affectent plusieurs autres oncogènes (*c-Myc*, *MYB*, *GNAS*, *BRAF*, *AKT2*, *NRAS*, *HRAS*), des gènes suppresseurs de tumeur (*LKB1*, *PTEN*, *PRSS1*) et des gènes de maintien du génome (*BRCA1/2*, *hMLH1*, *hMSH2*) et de réparation de l'ADN (*DDR*, *PALB2*, *PARP*). De plus, certaines voies de signalisation (TGF β , Kras, Wnt, Notch, Hedgehog, etc) sont dérégulées, par des mutations dans les gènes *TGFBR1/2*, *ACVR1B/2*, *EGFR*, *RNF43* et *ATM*, notamment (**Figure 15B**). Enfin, une instabilité chromosomique peut être induite par le raccourcissement des télomères (van Heek *et al.*, 2002) et des anomalies épigénétiques, augmentant ainsi le risque d'acquérir de nouvelles mutations. Enfin, des gènes de susceptibilité sont observés dans les formes familiales de l'ADKP. En effet, des mutations dans les gènes *CDKN2A*, *BRCA2*, *PALB2* ou *ATM* augmentent le risque de développer un ADKP (Petersen, 2015; Wood, Yurgelun and Goggins, 2019).

L'occurrence de l'ensemble de ces altérations génétiques et épigénétiques, ainsi que de nombreuses modifications au niveau protéique entraînent une hétérogénéité notable pour l'ADKP, tant au niveau des cellules tumorales que des cellules du microenvironnement (Large *et al.*, 2020).

c. La question de l'origine des cellules cancéreuses

L'origine des cellules (pré)néoplasiques de l'ADKP dans lesquelles s'accumulent ces mutations est une question toujours controversée, mais importante dans la compréhension du développement tumoral et dans l'élaboration de nouvelles thérapies (Rooman and Real, 2012; Stanger and Hebrok, 2013; Yamaguchi *et al.*, 2018). Alors qu'historiquement la caractéristique canalaire de l'ADKP suggérait une origine canalaire des cellules tumorales, il a ensuite été proposé que ces dernières soient dérivées de cellules souches. Ces cellules souches quiescentes seraient activées lors d'un dommage pancréatique et participeraient à la restauration de l'homéostasie tissulaire, processus qui pourrait être altéré et mener au développement de cellules tumorales. Cependant, aucune preuve n'a pu montrer l'implication de cellules souches dans l'ADKP (contrairement à d'autres organes) et l'existence même de cellules souches au sein du pancréas reste controversée (Kong, Michalski and Kleeff, 2009; Kong *et al.*, 2011; Balic *et al.*, 2012). De manière plus anecdotique, une participation (1) des cellules centro-acineuses, qui présentent un potentiel progéniteur (Stanger and Hebrok, 2013), ou (2) des cellules endocrines, a été abordée. Finalement, l'observation la plus souvent relatée est une transition des cellules acineuses en cellules canalaire (ADM, acinar-to-ductal metaplasia), processus qui sera plus amplement décrit par la suite (Stanger and Dor, 2006; Ziv, Glaser and Dor, 2013; Bailey, DelGiorno and Crawford, 2014). Les gènes de maintien de l'identité des cellules acineuses sont notamment des modulateurs clés de la carcinogénèse pancréatique, montrant l'importance de la plasticité cellulaire dans l'initiation de l'ADKP (Rooman and Real, 2012).

En outre, l'origine des cellules tumorales pourrait dépendre du type de lésion pré-néoplasique (Reichert *et al.*, 2016; Yamaguchi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019). En effet, il semblerait que les cellules acineuses soient principalement à l'origine des PanINs (*via* l'ADM), tandis que les IPMNs dériveraient des cellules canalaire. Cependant, plusieurs origines cellulaires pourraient coexister au sein d'une même tumeur, ce qui favoriserait l'hétérogénéité tumorale. De plus, l'activation de l'oncogène *Kras* peut provoquer une transformation des cellules, qu'il soit exprimé dans des cellules canalaire ou acineuses, mais avec des cinétiques différentes. En effet, dans des modèles murins, l'initiation et la progression vers l'ADKP se fait plus rapidement lorsque l'oncogène *Kras* est muté dans les cellules canalaire, avec l'apparition directe de PanINs de haut grade, processus plus lent lorsque *Kras* est muté dans les cellules acineuses (Lee *et al.*, 2018). Ainsi, la détermination des cellules à l'origine des cellules tumorales reste compliquée. En outre, de nombreux modèles murins présentent une activation de *Kras* au moment du développement embryonnaire, empêchant l'identification de ces cellules à l'origine de l'ADKP, barrière qui a pu être levée grâce au développement récent des modèles inductibles (Alison, 2020).

d. Métaplasie acino-canalairre, de la plasticité pancréatique à la carcinogénèse

Au vu des nombreuses observations d'une origine acineuse des PanINs, la plasticité pancréatique et le maintien de l'identité cellulaire sont donc au centre de nombreuses études. Comme dans tout organe, l'homéostasie pancréatique peut se trouver perturbée. Dans le cas du pancréas exocrine, un défaut dans le système d'excrétion (calculs, obstruction, exposition importante à l'alcool, etc) peut rapidement altérer le tissu. Dans ce cadre, il est donc primordial que ce tissu puisse se réparer rapidement et efficacement.

L'un des dommages pancréatiques les plus courants est la pancréatite, inflammation causée par une sécrétion et une accumulation importante d'enzymes digestives (Bockman, 1997; Sato, Shibata and Maeda, 2019). Elle provoque notamment la séparation et la dégénération des lobules et acini, et altère ainsi la fonction exocrine. Elle est causée par des facteurs génétiques et environnementaux (consommation d'alcool, dérégulations métaboliques, pathologies biliaires, etc). Il en existe deux types : la pancréatite aiguë et la pancréatite chronique, différenciées par leurs symptômes et leur évolution. Alors que la pancréatite aiguë peut se résorber après une phase d'inflammation et de nécrose, la pancréatite chronique présente une subsistance au cours de laquelle l'inflammation est remplacée par de la fibrose (Foster, 2014; Murtaugh and Keefe, 2015; Kleeff *et al.*, 2017). La capacité du pancréas à résorber une pancréatite aiguë a notamment pu être observée *in vivo* : l'injection de céruléine entraîne une dégénération du pancréas, réparée en 9 à 12 jours dans le rat, et en 7 jours dans la souris (Adler, Hupp and Kern, 1979; Foster, 2014).

La plasticité cellulaire est définie comme la capacité des cellules à modifier leur identité et leur fonction. Elle comprend plusieurs processus comme (1) la dédifférenciation, pendant laquelle les cellules reprennent des caractéristiques de cellules progénitrices ; et (2) la transdifférenciation, changement direct d'identité sans passer par la phase progéniteur. Dans le pancréas, un dommage modéré entraîne le réenclenchement de la prolifération de cellules existantes pour remplacer le tissu endommagé (Puri, Folias and Hebrok, 2015), alors qu'en cas de dommage plus sévère, des phénomènes de dédifférenciation/redifférenciation et de transdifférenciation ont été observés (Li *et al.*, 2010; Houbracken *et al.*, 2011; Pinho *et al.*, 2011; Puri, Folias and Hebrok, 2015). En effet, les cellules canalairees peuvent donner lieu à des cellules endocrines, et les cellules acineuses peuvent générer de nouvelles cellules acineuses, canalairees et endocrines (**Figure 16A**) (Desai *et al.*, 2007; Baeyens and Bouwens, 2009; Criscimanna *et al.*, 2011; Demcollari, Cujba and Sancho, 2017). Face à la remise en question de l'existence de cellules souches au sein du pancréas exocrine, la réparation du tissu pancréatique grâce à ces cellules reste peu envisagée, excepté dans la réparation du compartiment endocrine (Smukler *et al.*, 2011; Ziv, Glaser and Dor, 2013; Kopp, Grompe and Sander, 2016). Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la plasticité des cellules pancréa-

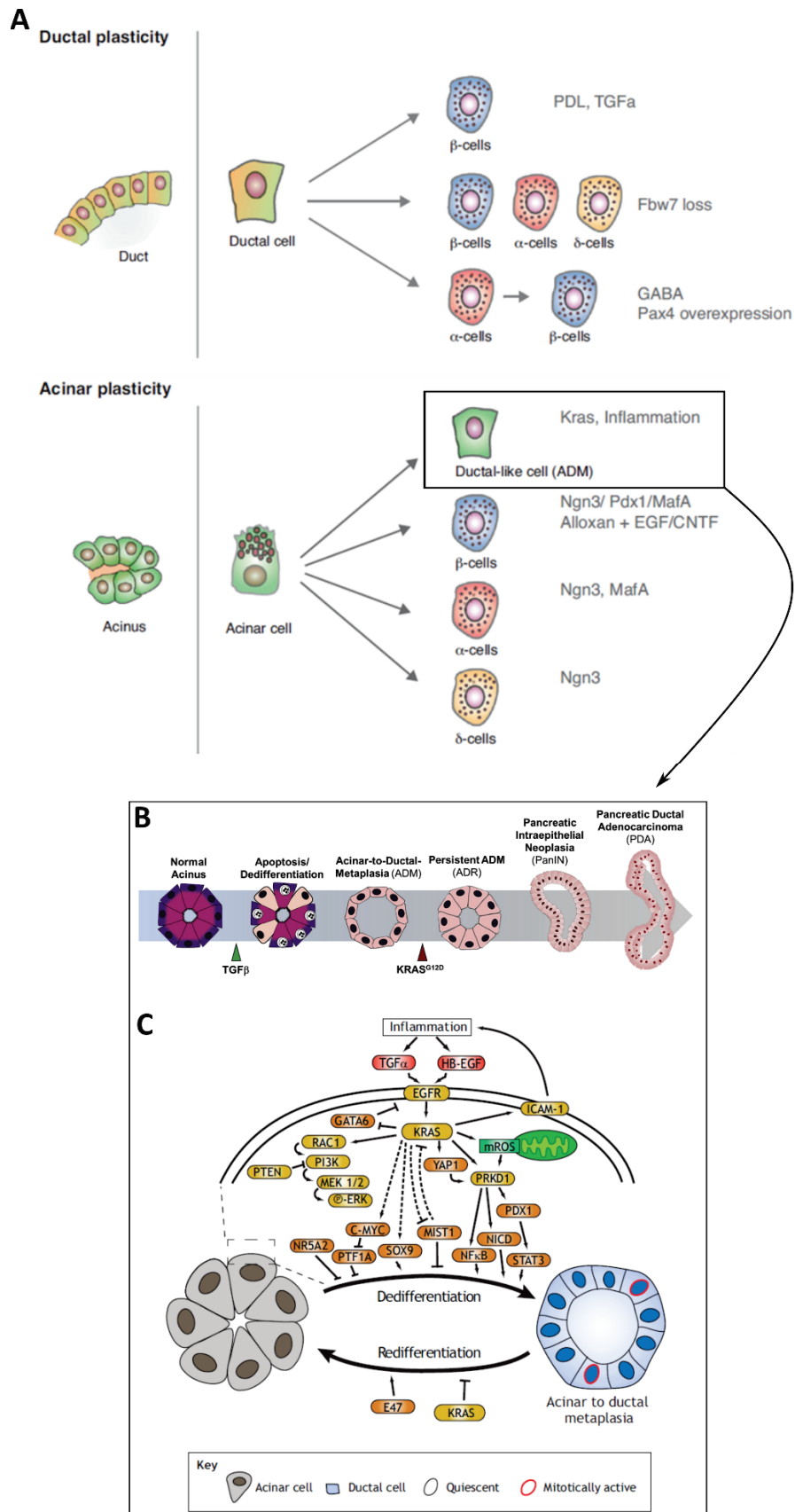


Figure 16 : Plasticité des cellules pancréatiques. A : Trans-différentiations possibles de chaque type cellulaire pancréatique (Demcollari, Cujba and Sancho, 2017). B : Processus cellulaires de l'ADM menant à une transformation maligne (Chuin et al., 2017). C : Voies de signalisation impliquées dans l'ADM (Burclaff and Mills, 2018).

-tiques comprennent des signaux inflammatoires, des facteurs de croissance et la réactivation de voies de signalisation développementales (Sumi and Tamura, 2000; Jensen *et al.*, 2005; Fendrich *et al.*, 2008). Le microenvironnement est également impliqué, avec l'activation des PSCs qui promeuvent notamment le recrutement de cellules inflammatoires et la fibrose, dans un deuxième temps (Zimmermann *et al.*, 2002; Omary *et al.*, 2007; Sherman, 2018).

Au cours de la réparation du tissu pancréatique, la plasticité cellulaire la plus fréquemment observée est la métaplasie acino-canalaire (ADM). La métaplasie est définie comme le remplacement du type cellulaire le plus abondant (dans le pancréas, les cellules acineuses) par un autre type cellulaire (ici des cellules canalaire) et est souvent un facteur de risque important pour le développement de néoplasmes (Giroux and Rustgi, 2017). Les premières observations de l'ADM ont été effectuées dans les années 1980, avec la caractérisation d'anomalies acineuses et l'apparition de structures « de type canalaire » dans le parenchyme à proximité d'ADKP (Longnecker, Shinozuka and Dekker, 1980; Parsa *et al.*, 1985). La nature de la modification phénotypique prenant place au cours de l'ADM est toujours discutée, à la frontière entre une dédifférenciation/redifférenciation (Means *et al.*, 2005) et une transdifférenciation (Houbracken *et al.*, 2011). En effet, les cellules acineuses conduisent à un type cellulaire unique, des cellules à propriétés et structure canalaire, mais possédant des caractéristiques de progéniteurs, et exprimant des marqueurs tels que Sox9 (Blaine *et al.*, 2010).

Pour une réparation pancréatique correcte, l'ADM doit être réversible et transitoire. En effet, mal contrôlée, elle peut être à l'origine du développement des PanINs et conduire à un ADKP (Carrière *et al.*, 2009; Rooman and Real, 2012; Storz, 2017). Une persistance du phénotype canalaire peut engendrer une transformation cellulaire irréversible et maligne (**Figure 16B**), et les cellules issues d'ADM sont plus susceptibles à une dérive en cas de mutation sur l'oncogène *KRAS* (Habbe *et al.*, 2008; Bailey, DelGiorno and Crawford, 2014). En outre, des cellules ayant subi une ADM ont été observées dans le parenchyme sain entourant l'ADKP, au niveau du front invasif, suggérant un rôle de l'ADM non seulement dans l'initiation de la tumorigenèse, mais également dans le caractère invasif de l'ADKP. Ainsi, une étude a défini plusieurs sous-classes d'ADM, comprenant (1) l'ADM associée au cancer, caractérisée par une grande quantité de facteurs de croissance, cytokines et facteurs sécrétés, de l'apoptose et des gènes associés au cancer ; (2) l'ADM associée à la pancréatite chronique, en lien avec la réponse inflammatoire et l'apoptose ; et (3) l'ADM sporadique, exprimant des gènes associés à la carcinogenèse et donc liée à l'initiation tumorale (Kibe *et al.*, 2019).

De nombreux mécanismes moléculaires sont mis en jeu dans l'ADM (**Figure 16C**) (Wong, Li and Chen, 2016; Burclaff and Mills, 2018). L'un des principaux signaux induisant l'ADM est la signalisation du TGF α (et de l'EGF) *via* le récepteur à l'EGF (EGFR). En effet, une augmentation de l'occurrence de l'ADM a pu être observée dans un modèle murin surexprimant le TGF α (Wagner *et al.*, 1998; Garcia-Carracedo *et al.*, 2015). Dans ce cadre, un rôle clé est attribué à l'EGFR, initiant le signal TGF α dans la cellule, et capable d'activer KRAS (Means *et al.*, 2005) et de nombreuses voies de signalisation. Le facteur de croissance TGF β est également impliqué dans l'initiation de l'ADM (Liu *et al.*, 2016; Akanuma *et al.*, 2017; Chuvin *et al.*, 2017), et les 2 voies, TGF α et TGF β , interagissent et agissent en synergie (Garcia-Carracedo *et al.*, 2015; Chuvin *et al.*, 2017). Ces deux stimuli entraînent l'activation de voies de signalisation variées, dont les voies Wnt, Notch, NF- κ B, MAPK et PI3K/AKT, afin de mener à la modification de l'identité cellulaire (Houbracken *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013; Baer *et al.*, 2014; Halbrook *et al.*, 2016). Ces mêmes mécanismes moléculaires ont été identifiés dans le développement des PanINs (Zhu *et al.*, 2007; De La O *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2017), permettant ainsi de faire le lien entre ADM et initiation de la tumorigenèse. Parmi ces voies de signalisation, plusieurs voies développementales, notamment impliquées dans l'identité acineuse (Storz, 2017), sont réactivées, menant à la diminution de certains facteurs de transcription nécessaires au maintien de l'identité acineuse (PD2/PAF1, MIST1, PTF1A), au bénéfice de facteurs dits « de dédifférenciation », ou progéniteurs ainsi que de facteurs canaux (PRRX1, PDX1, SOX9, HNF6) (Zhu *et al.*, 2004; Miyatsuka *et al.*, 2006; Kopp *et al.*, 2012; Prévot *et al.*, 2012; Dey *et al.*, 2014; Krah *et al.*, 2015). Enfin, le microenvironnement joue un rôle important dans l'induction et la progression de l'ADM. En effet, l'inflammation et plusieurs signaux inflammatoires, avec le recrutement de cellules myéloïdes, sont étroitement associés à l'ADM (Liou *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017; Perusina Lanfranca *et al.*, 2020). Le TGF α est de plus sécrété par des cellules inflammatoires, ainsi que par des fibroblastes activés (Liou *et al.*, 2013). En outre, la MEC, et notamment son remodelage par la MMP7, est impliquée dans le changement d'identité des cellules acineuses et le développement de PanINs (Crawford *et al.*, 2002; Schmid, 2002; Sawey, Johnson and Crawford, 2007), avec également un fort dépôt d'acide hyaluronique accompagnant l'ADM (Johnson *et al.*, 2019).

Ces signaux induisant l'ADM ne suffisent cependant pas à la progression vers les PanINs. En effet, ils procèdent à une sensibilisation des cellules, dans lesquelles une activation de l'oncogène *KRAS* sera nécessaire à la persistance des cellules en métaplasie et à leur progression en lésions précurseurs.

2. Progression et métastases

L'accumulation de mutations dites « fondatrices » au cours du développement des PanINs entraîne une progression des lésions précurseurs en cancer invasif, l'ADKP *stricto sensu*. L'ADKP est une tumeur localement infiltrante, initiée par la rupture de la lame basale par les cellules néoplasiques, qui envahissent alors le tissu conjonctif sous-jacent (Ren, Liu and Suriawinata, 2019). Cette tumeur présente deux caractéristiques importantes : une forte réaction desmoplastique et une hypovascularisation, ce qui soumet les cellules tumorales à l'hypoxie et favorise la progression et l'agressivité tumorale (Yuen and Díaz, 2014). De plus, l'ADKP a un fort potentiel métastatique une fois devenu invasif (Keleg *et al.*, 2003).

a. Evolution des lésions pré-néoplasiques

La progression des lésions pré-néoplasiques pancréatiques vers un phénotype invasif fait appel à de nombreux processus cellulaires (Ansari *et al.*, 2016; Makohon-Moore and Iacobuzio-Donahue, 2016), dont (1) une prolifération et une survie améliorées, et (2) l'acquisition d'un phénotype migratoire et invasif. De plus, les cellules acquièrent au cours de cette progression une capacité d'échappement au système immunitaire et adaptent leur métabolisme, ce qui leur confère une forte résistance aux facteurs antitumoraux intrinsèques. Toutes les lésions précurseurs (PanINs à différents stades, IPMNs, MCNs) peuvent évoluer vers une tumeur dite « invasive », cependant, une transformation maligne des PanINs 3 est plus fréquemment observée (Nakajima, Yamada and Sho, 2010; Vincent *et al.*, 2011; Peters *et al.*, 2018). Cette évolution est relativement lente et silencieuse, ce qui explique également le diagnostic tardif de l'ADKP.

Au cours du développement des PanINs, le nombre de cellules en prolifération augmente, pour atteindre son maximum dans l'ADKP (Klein *et al.*, 2002)(Klein *et al.*, 2002). Les capacités prolifératives des cellules cancéreuses pancréatiques ne sont cependant pas plus importantes que dans d'autres cancers, et n'expliquent donc pas à elles seules la forte agressivité de cette tumeur. La résistance à la mort cellulaire en revanche, est une stratégie d'évasion importante des cellules cancéreuses de l'ADKP (Hamacher *et al.*, 2008). Le duo prolifération-survie explique mieux l'agressivité tumorale, bien que pas totalement (Hruban *et al.*, 2019). Ces capacités, couplées à une forte croissance cellulaire, sont acquises au cours de la carcinogenèse par l'accumulation de mutations dites « de progression » en plus des mutations fondatrices (Mihaljevic *et al.*, 2010; Yachida and Iacobuzio-Donahue, 2013). Ces mutations confèrent une résistance supplémentaire aux cellules, qui sont alors sélectionnées et se développent. Ce phénomène, nommé « expansion clonale », prend place au cours du développement des PanINs et entraîne l'accumulation de cellules portant des mutations au sein du tissu, nombre qui augmente avec le grade des lésions puis dans l'ADKP (Figure 17) (Makohon-Moore and Iacobuzio-Donahue, 2016; Felsenstein, Hruban and Wood, 2018). Cette expansion est nécessaire à l'efficacité invasive et métastatique de l'ADKP, et est donc

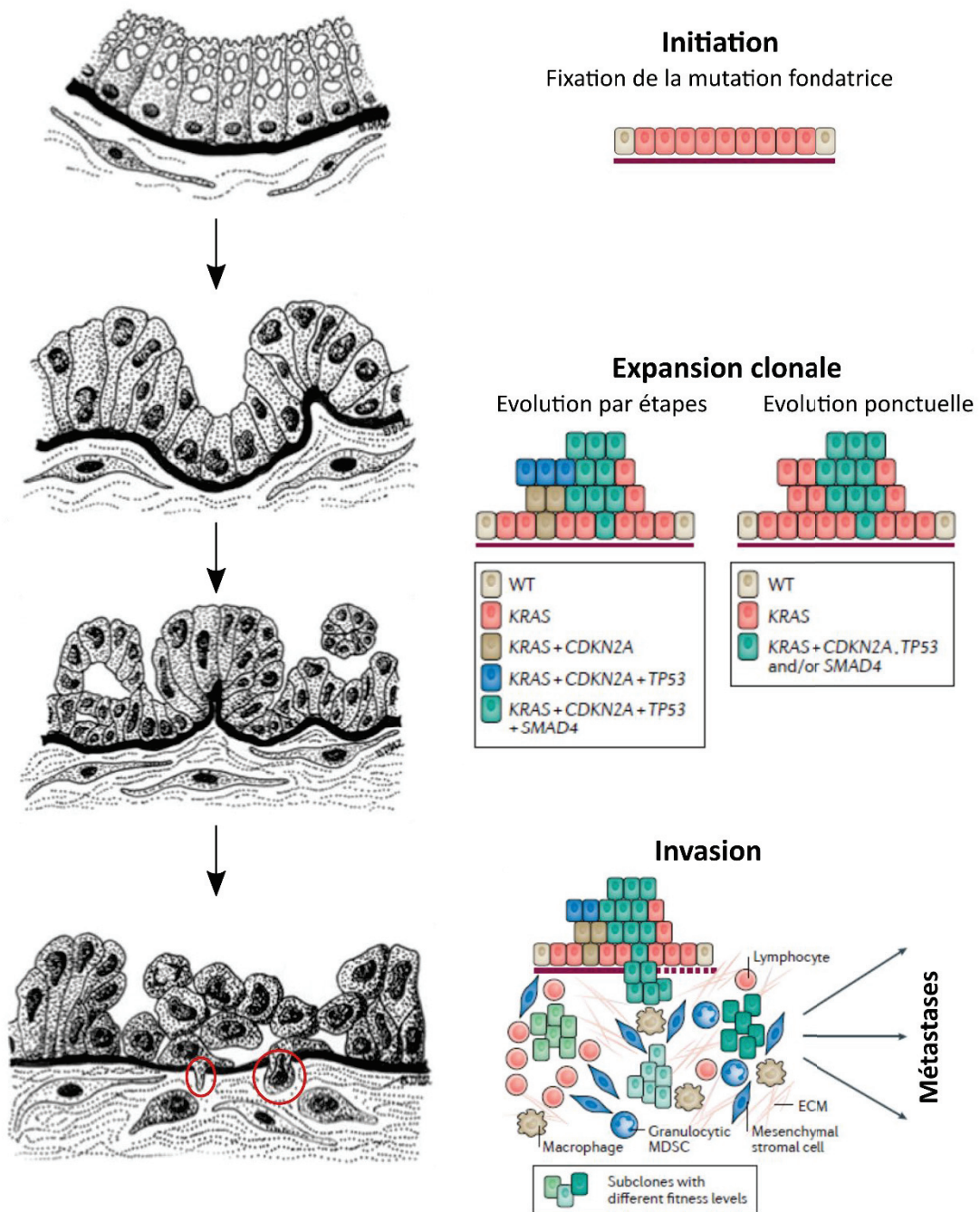


Figure 17 : Processus cellulaires mis en œuvre dans la progression des PanINs vers l'ADKP invasif (d'après (Yuen and Díaz, 2014; Makohon-Moore and Iacobuzio-Donahue, 2016)).

associée à sa forte agressivité. De plus, l'accumulation de diverses mutations au cours de la carcinogenèse entraîne une hétérogénéité intra-tumorale et inter-individuelle, avec des potentiels métastatiques différents (Yachida and Iacobuzio-Donahue, 2013; Cowan and Maitra, 2014).

b. L'ADKP, une tumeur infiltrante

Au cours de leur transformation maligne, les cellules pancréatiques acquièrent un phénotype invasif et migratoire, qui permet aux cellules tumorales de rompre la lame basale entourant les PanINs (Keleg *et al.*, 2003), d'infiltrer le reste du tissu pancréatique, et de se disséminer pour former des métastases. Cela est initié par la TEM des cellules, trans-différenciation des cellules épithéliales jointives en cellules mésenchymateuses moins adhésives et acquérant ainsi des capacités migratoires (Constantin *et al.*, 2015; Satoh, Hamada and Shimosegawa, 2015; Wang, Huang and Sun, 2017). Après rupture de la lame basale, la tumeur croît et progresse au sein de l'organe, par différents processus. Des bourgeonnements de cellules cancéreuses (« tumor budding ») ont été observés en périphérie de l'ADKP (Chouat *et al.*, 2018). Ces cellules bourgeonnantes présentent des capacités infiltrantes fortes, permettant à la tumeur de s'étendre dans le parenchyme environnant. Plusieurs études suggèrent que ce bourgeonnement puisse être un état intermédiaire au cours de la TEM des cellules tumorales (García-Silva, Frias-Aldeguer and Heeschen, 2013; Karamitopoulou, 2013).

D'autre part, un pool de cellules souches cancéreuses (CSCs) permet le renouvellement et l'augmentation du nombre de cellules tumorales au sein de la tumeur (Dorado *et al.*, 2011; Gharibi, Adamian and Kelber, 2016). Les CSCs sont des cellules pluripotentes capables d'auto-renouvellement, autour et à partir desquelles les cellules tumorales se développent (Abel and Simeone, 2013; Castellanos, Merchant and Nagathihalli, 2013). Présentes en faible quantité dans la tumeur (0,5 à 3% des cellules), leur origine reste méconnue. Elles contribuent à l'agressivité de l'ADKP, en assurant le maintien et l'amplification tumorale et en participant aux processus (1) métastatique et (2) de chimiorésistance (Sergeant *et al.*, 2009; Valle *et al.*, 2018). Ainsi, une grande quantité de CSCs au sein de la tumeur est de mauvais pronostic. En outre, ces cellules se présenteraient selon un continuum dynamique de TEM, pouvant passer d'un état plus ou moins épithélial à un état plus ou moins mésenchymateux, ce qui leur conférerait une certaine adaptabilité (Castellanos, Merchant and Nagathihalli, 2013; Pastushenko and Blanpain, 2019). Par leur capacité invasive, les CSCs pourraient de plus être à l'origine de métastases, et impliquées dans la subsistance de celles-ci (Balic *et al.*, 2012; García-Silva, Frias-Aldeguer and Heeschen, 2013).

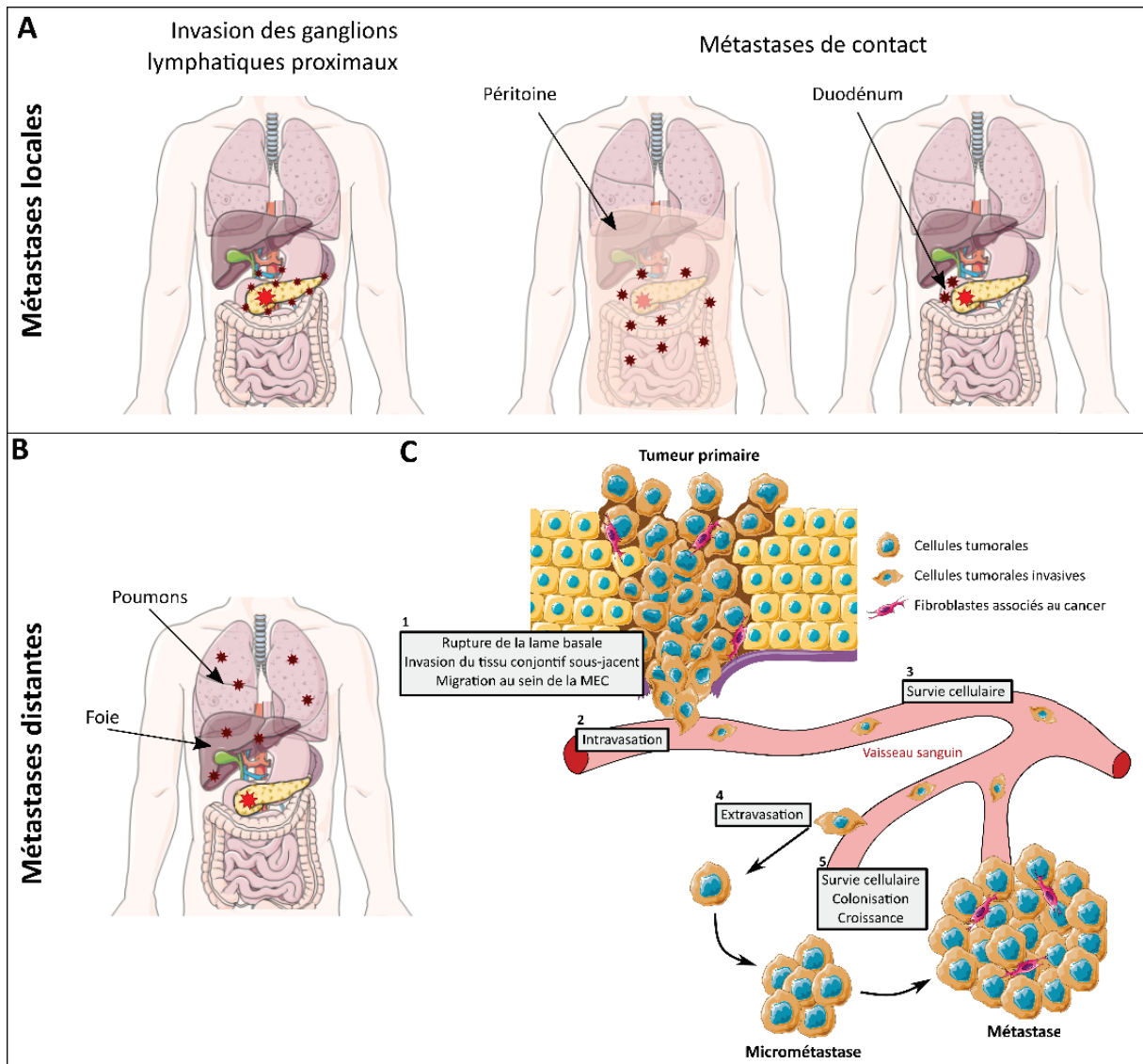


Figure 18 : Localisation des métastases issues de l'ADPK. A et B : Sites de métastases locales (A) et distantes (B) pouvant être observées dans les cas d'ADPK (schémas faits grâce à Servier Smart Art). C : Différentes étapes du processus métastatique empruntant la circulation sanguine.

Enfin, l'ADKP est caractérisé par une faible densité microvasculaire et une angiogénèse limitée. Cela est le résultat d'un duel entre (1) l'hypoxie et les PSCs, d'une part, qui favorisent l'angiogénèse, et (2) la réaction desmoplasique importante d'autre part, qui « écrase » les vaisseaux et limite l'angiogénèse (Whipple and Korc, 2008; Longo *et al.*, 2016). Bien que la présence des facteurs VEGF-A et HIF1 α pro-angiogéniques soit liée à un mauvais tableau clinique, les thérapies anti-angiogéniques testées à ce jour n'ont donné aucun résultat. Cette hypovascularisation et la forte réaction desmoplasique caractéristique de l'ADKP entraînent un isolement des cellules tumorales et des CSCs qui procèdent alors à une reprogrammation métabolique (en réponse à l'hypoxie) caractérisée par l'acquisition d'un phénotype glycolytique (effet Warburg) et une augmentation de l'autophagie (Regel *et al.*, 2012; Kleeff *et al.*, 2016). Cette adaptation à l'environnement confère une meilleure résistance aux cellules tumorales.

c. Processus métastatique

La plupart des décès dus aux cancers, et notamment à l'ADKP, découlent de la formation de métastases, faisant de celles-ci l'objet d'intenses recherches.

Les premières métastases visibles sont les métastases locales (**Figure 18A**), d'invasion des ganglions lymphatiques proximaux. Présentes chez la plupart des patients, elles sont parfois corrélées à la survie des patients, et sont un facteur de mauvais pronostic après chirurgie (Buc *et al.*, 2014; Hruban *et al.*, 2019). Les ganglions lymphatiques peuvent être atteints par les cellules métastatiques par contiguïté (ganglions les plus proches) ou par invasion du système lymphatique, ce deuxième mode de dissémination étant de mauvais pronostic (Buc *et al.*, 2014). En outre, les cellules tumorales peuvent créer des métastases « de contact » dans le duodénum et le péritoine (Nishimori *et al.*, 2001).

L'invasion péri-neurale (locale) est caractéristique de l'ADKP et mène à l'invasion de ganglions nerveux par la progression des cellules tumorales le long des nerfs. Elle est fortement associée aux symptômes de douleurs abdominales et dorsales, peut être une cause de récurrence de la tumeur post-chirurgie (Gasparini *et al.*, 2019) et est liée à un mauvais pronostic (Schorn *et al.*, 2017). Encore méconnue, l'invasion péri-neurale met en jeu un processus complexe alliant cellules cancéreuses, plasticité nerveuse et microenvironnement (Alrawashdeh *et al.*, 2019; Gasparini *et al.*, 2019).

Enfin, les sites métastatiques distants de l'ADKP sont principalement le foie et les poumons (**Figure 18B**). Dans ces deux cas, la dissémination passe par le système vasculaire et nécessite l'établissement d'une niche pré-métastatique en amont (Pitarresi and Rustgi, 2019). Alors que les métastases hépatiques sont plus agressives, les métastases pulmonaires sont associées à une meilleure survie des patients (Decoster *et al.*, 2016). Le processus métastatique classique impliquant la circulation sanguine est composé de plusieurs étapes reprises dans la **Figure 18C** (Giovannetti *et al.*, 2017; Le Large *et al.*, 2017; Ayres Pereira and Chio, 2020; Thomas, Lee and Beatty, 2020). Dans l'ADKP, les cellules tumorales migrent de manière mésenchymateuse,

seules ou en clusters (migration collective), afin de se disséminer (Tuveson and Hingorani, 2005; Beerling *et al.*, 2016). L'implication de la TEM dans ce processus reste discutée, puisqu'elle serait plus associée à la chimiorésistance qu'au phénomène de dissémination métastatique (Zheng *et al.*, 2015).

Dans l'ADKP, les métastases ressemblent de près à la tumeur primaire. Elles présentent en effet les mêmes altérations géniques, une réaction desmoplasique forte et une hypovascularisation (Aiello *et al.*, 2016; Dickson, 2017; Makohon-Moore *et al.*, 2017). Alors que certaines études suggèrent que la dissémination pourrait prendre place très tôt au cours de la carcinogenèse (dès le stade pré-néoplasique), d'autres penchent plutôt vers une persistance longue de la tumeur primaire avant la dissémination métastatique (Rhim *et al.*, 2012). Cette dernière hypothèse semble être favorisée, en accord avec le modèle linéaire de progression : lésions pré-néoplasiques – ADKP invasif – métastases (Vincent *et al.*, 2011).

C. Microenvironnement tumoral et réaction desmoplasique

1. Présentation du microenvironnement tumoral pancréatique

Longtemps considéré comme une maladie de la cellule tumorale, l'ADKP présente pourtant une caractéristique incontournable : la présence d'un stroma tumoral important (Sun *et al.*, 2016; Murakami *et al.*, 2019). En effet, ce dernier peut atteindre jusqu'à 90% de la masse tumorale, du fait d'une très forte réaction desmoplasique. Ce stroma est devenu au fil des années, l'un des domaines de recherche les plus actifs dans la recherche sur l'ADKP.

Le microenvironnement tumoral pancréatique est majoritairement formé de molécules de la MEC, déposées par une grande quantité de fibroblastes activés (CAFs). Cette forte réaction desmoplasique, et l'activation des fibroblastes, prennent place dès l'apparition des premières lésions pré-tumorales, et accompagnent la carcinogenèse (Johnson *et al.*, 2019). Elle peut également se développer en amont, au cours du vieillissement ou lors d'une pancréatite chronique, par exemple. De plus, la desmoplasie associée à l'ADKP joue un rôle dans son agressivité, car un dépôt abondant de matrice et une activation forte des CAFs sont corrélés à une moins bonne survie des patients (Erkan *et al.*, 2008; Olive, 2015). Cette réaction est également retrouvée dans les métastases, montrant son importance au cours de la progression tumorale de ce type de cancer (Whatcott *et al.*, 2015; Cannon *et al.*, 2018; Murakami *et al.*, 2019).

Le stroma mis en place au cours de l'ADKP comporte également des cellules endothéliales, des cellules immunitaires et des nerfs (Luo *et al.*, 2012; Rasheed, Matsui and Maitra, 2012; Nielsen, Mortensen and Detlefsen, 2016). Les cellules endothéliales, qui forment les vaisseaux, sont peu nombreuses et comprimées par la grande quantité de matrice. Cependant, un taux élevé de VEGF, facteur de croissance promouvant l'angiogenèse, a été associé à un mauvais pronostic (Ansari *et al.*, 2017).

Les cellules immunitaires présentes au sein du stroma tumoral participent également à la pathogénèse de l'ADKP. En effet, le recrutement de cellules inflammatoires favorise d'abord le développement des cellules tumorales (Neesse *et al.*, 2015), avant la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur (Murakami *et al.*, 2019) dans lequel des cellules T régulatrices, des macrophages associés à la tumeur (de phénotype « M2 », anti-inflammatoires) et des cellules myéloïdes suppressives réduisent l'action de cellules immunitaires antitumorales telles que les lymphocytes T CD4 et CD8 et les cellules NK (Vonderheide and Bayne, 2013; Stone and Beatty, 2019). Certaines cellules immunitaires comme les macrophages peuvent de plus impacter le comportement des cellules tumorales ou des autres composants du stroma (Deschênes-Simard, Mizukami and Bardeesy, 2013; Foucher *et al.*, 2018).

Enfin, le pancréas est un organe très innervé, nerfs qui persistent dans l'ADKP. Ces nerfs, comme précisé précédemment, jouent un rôle important dans l'agressivité de ce type de tumeur, composant l'une des voies de dissémination.

Ainsi, le stroma tumoral se développe en parallèle de la tumeur et participe à son développement et sa progression (Erkan, 2013; Takahashi *et al.*, 2018). Il est aussi un large espace d'échanges, où chaque compartiment (immunitaire, fibroblastique, endothélial et matriciel) interagit avec les cellules tumorales et avec les autres compartiments du stroma (Kleeff *et al.*, 2007; Apte *et al.*, 2015). Ces interactions, directes ou indirectes, ont pour but de favoriser la tumorigenèse et la progression tumorale, par la modulation du comportement des cellules tumorales pancréatiques (Whatcott *et al.*, 2013; Zhan *et al.*, 2017) et la mise en place d'un environnement fibrotique, hypoxique et immunosuppresseur favorable (Hamada, Masamune and Shimosegawa, 2013). Dans la suite de cette partie, le focus sera porté sur les CAFs et la matrice extracellulaire, acteurs clés de la réaction desmoplasique, qui modèlent les autres compartiments du stroma (angiogenèse et système immunitaire) et modulent l'agressivité des cellules tumorales pancréatiques (Erkan *et al.*, 2012; Tod *et al.*, 2013; Masamune and Shimosegawa, 2015; Fu *et al.*, 2018).

2. Les CAFs, à l'origine de la réaction desmoplasique

Les fibroblastes associés aux cancers (CAFs) sont l'un des composants cellulaires principaux du stroma de l'ADKP. A l'origine du dépôt de protéines de la MEC dans l'espace intercellulaire, ils ont de nombreux rôles dans la carcinogenèse pancréatique et font l'objet de nombreuses études.

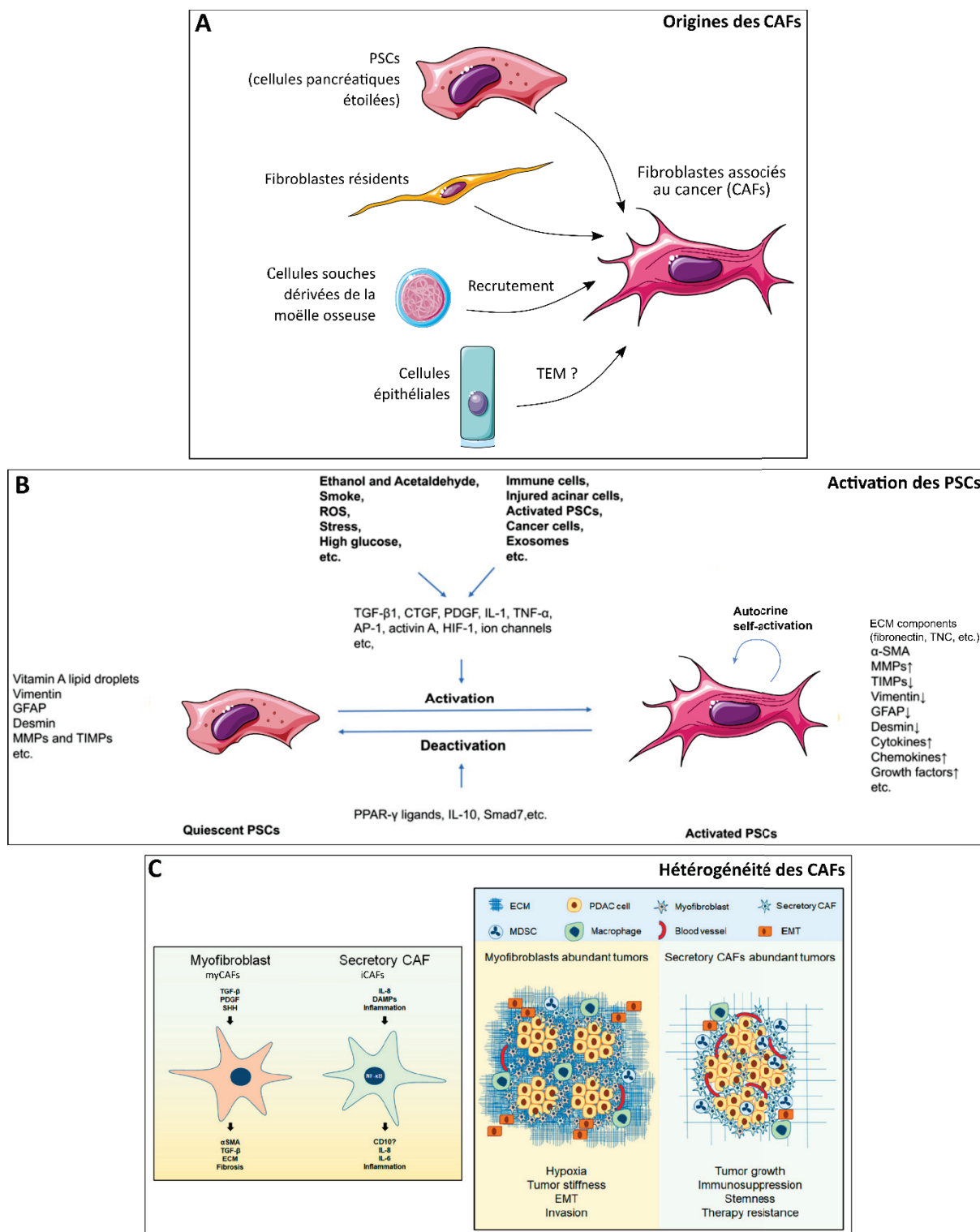


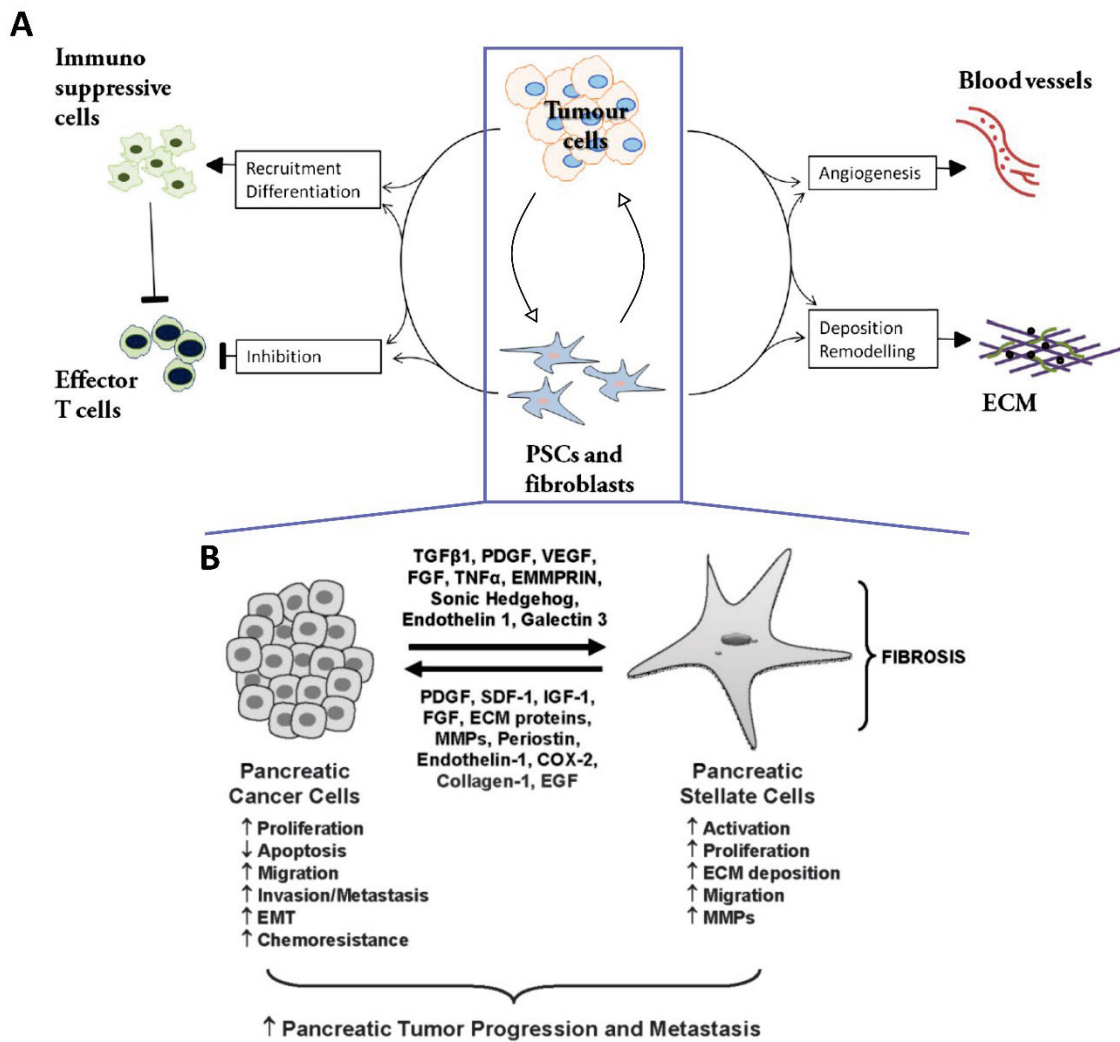
Figure 19 : Biologie des CAFs. A : Origines possibles des CAFs, la plus communément admise étant les PSCs (Sun et al., 2016). B : Caractéristiques des PSCs quiescentes et activées, et signaux d'activation des PSCs (Jin et al., 2020). C : Hétérogénéité des CAFs, avec en particulier les 2 sous-types (myCAFs et iCAFs) les plus décrits dans la littérature (Awaji and Singh, 2019).

a. Origine(s) et activation des CAFs

Les CAFs sont une population hétérogène de fibroblastes pouvant provenir de diverses origines. En effet, dans l'ADKP, l'activation de fibroblastes résidents du pancréas et le recrutement de cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse pourraient être deux des trois origines possibles de CAFs (Sun *et al.*, 2018). Cependant, l'activation des PSCs reste l'origine la plus communément acceptée (Figure 19A).

Les PSCs, présentes à l'état quiescent dans le pancréas sain, peuvent être activées dans plusieurs situations physiopathologiques, comme un dommage tissulaire, une pancréatite ou le développement tumoral, via des facteurs sécrétés par des cellules stromales (inflammatoires ou endothéliales), des cellules endommagées ou des cellules tumorales (Bynigeri *et al.*, 2017). Parmi ces facteurs, des facteurs de croissance (TGF β 1, PDGF, VEGF, HB-EGF, FGF), des cytokines (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10) et d'autres facteurs solubles tels que SHh ou l'angiotensine II ont été identifiés (Schneider *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2018). En outre, d'autres stimuli en lien avec la composition et le remodelage de la MEC, l'hypoxie (Masamune *et al.*, 2008) ou certaines forces mécaniques (Kalli *et al.*, 2018) peuvent entraîner une activation des PSCs. L'ensemble de ces stimuli mettent en jeu de nombreuses voies de signalisation (MAPK, PI3K, Wnt, NF- κ B, *etc*) et mènent à un changement phénotypique des PSCs (Figure 19B) (Jin *et al.*, 2020; Kusiak *et al.*, 2020). En effet, cette activation entraîne la perte des gouttelettes lipidiques de stockage de vitamine-A et l'expression de marqueurs fibroblastiques tels que α SMA (α Smooth Muscle Actin) (Tian *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2018). Ces modifications sont accompagnées par un changement morphologique des PSCs, qui adoptent alors un phénotype myofibroblastique et un noyau de taille plus importante témoignant d'une forte activité transcriptionnelle associée à la synthèse et la sécrétion en grande quantité de protéines de la MEC (Wehr *et al.*, 2011; Bynigeri *et al.*, 2017). En outre, les PSCs activées présentent une migration et une prolifération augmentées et la sécrétion de facteurs solubles autocrines ou paracrines, permettant aux PSCs d'influer sur les compartiments stromal et tumoral (Schneider *et al.*, 2001).

L'activation des PSCs est réversible *in vitro*, par l'utilisation de l'acide rétinoïque (Chronopoulos *et al.*, 2016; Sarper *et al.*, 2016). Cette réversibilité est également observée *in vivo* puisqu'il s'agit d'un processus physiologique nécessaire à la bonne réparation tissulaire, notamment dans le cas de la pancréatite aiguë. Cependant, elle peut persister dans certaines situations pathologiques telles que la pancréatite chronique ou la carcinogenèse pancréatique. Ce maintien d'activation, dirigé par les cellules environnantes ou la sécrétion, par les PSCs elles-mêmes de signaux autocrines, est notamment responsable de la fibrose, visible dans ces deux pathologies.



Les CAFs sont une population possédant une hétérogénéité fonctionnelle (Helms, Onate and Sherman, 2020). D'abord révélée par l'absence de biomarqueur commun à tous les CAFs, cette hétérogénéité est définie selon l'expression concomitante ou non de plusieurs marqueurs, comprenant α SMA, FAP et PDGFR α , ce qui permet d'établir jusqu'à huit sous-types (Pereira *et al.*, 2019; Whittle and Hingorani, 2019). De plus, quatre sous-populations de CAFs ont été mises en évidence par une analyse transcriptomique, pouvant, de manière intéressante, être liées à un pronostic particulier. Cette classification prend en compte (1) l'expression d' α SMA et de la vimentine, (2) la capacité proliférative et de sécrétion de protéines de la MEC des CAFs, ainsi que (3) leur position dans la tumeur (Neuzillet *et al.*, 2019). Finalement, les CAFs de l'ADKP sont communément classés en deux sous-types d'origine différente et présents dans des contextes différents : les CAFs myofibroblastiques (myCAF) et les CAFs inflammatoires (ou sécrétoires) (iCAF) (Figure 19C) (Öhlund *et al.*, 2017; Awaji and Singh, 2019). Les myCAF, qui expriment plus fortement α SMA et sont présents à proximité de la tumeur, sont responsables du dépôt de protéines de la MEC (Yen *et al.*, 2002), tandis que les iCAF sont caractérisés par l'expression et la sécrétion d'IL-4 et de cytokines inflammatoires.

b. Rôle dans la progression tumorale : une interaction bidirectionnelle

Les CAFs jouent un rôle important dans la tumorigenèse et la progression tumorale. En effet, le maintien de leur activation les rend tumorigènes leur permettant ainsi d'entretenir le phénotype malin des cellules tumorales (Phillips, 2012; Tang *et al.*, 2013a; Moir, Mann and White, 2015). En plus de participer activement à la fibrose par le dépôt de protéines de la MEC, ces cellules sécrètent des facteurs solubles et interagissent avec les cellules tumorales. De plus, elles agissent sur le reste du microenvironnement, et notamment sur le compartiment immunitaire et endothélial (angiogenèse) afin de maintenir un microenvironnement permissif au développement de la tumeur (Figure 20A). Dans cette partie, nous aborderons plus particulièrement les effets des PSCs activées, principale source des CAFs dans l'ADKP.

Une interaction bidirectionnelle existe entre CAFs, et notamment les PSCs, et cellules cancéreuses pancréatiques (PCCs) (Figure 20B) (Bynigeri *et al.*, 2017). En effet, dans un modèle de sphéroïdes *in vitro*, il a été montré (1), que les PCCs influent sur l'activation et le remodelage de la MEC par les PSCs, et (2) que les PSCs induisent une plus forte croissance et invasion des PCCs (Hwang *et al.*, 2019). Ces résultats ont été plusieurs fois confirmés dans d'autres modèles *in vitro* et *in vivo*, mettant en évidence le dialogue croisé entre PCCs et PSCs (Wilson, Pirola and Apte, 2014; Pothula *et al.*, 2020). En outre, la co-injection de PCCs et PSCs *in vivo* entraîne une augmentation de la taille de la tumeur alors formée et de la quantité de métastases, en comparaison avec l'injection de PCCs seules. Cela se traduit par un plus grand nombre de cellules tumorales et une réaction desmoplastique plus forte, traduisant la synergie et les effets bidirectionnels entre PCCs et PSCs précisés ci-après (Vonlaufen *et al.*, 2008).

D'une part, les PSCs influent sur l'agressivité des cellules tumorales pancréatiques (Hwang *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2018), à la fois par des interactions physiques et par la sécrétion de facteurs solubles (Marzoq *et al.*, 2019). En effet, de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence une action forte des PSCs sur les capacités migratoires et invasives des PCCs (Kikuta *et al.*, 2010; Lonardo *et al.*, 2012; Karnevi *et al.*, 2016; Shan *et al.*, 2017; Begum *et al.*, 2019). En outre, les PSCs (1) semblent induire la TEM des cellules tumorales (Kikuta *et al.*, 2010; Hamada *et al.*, 2012; Karnevi *et al.*, 2016; Ligorio *et al.*, 2019), (2) favorisent la prolifération des PCCs (Fujita *et al.*, 2009; Ligorio *et al.*, 2019), et (3) sont impliquées dans la niche des cellules souches cancéreuses, favorisant leur auto-renouvellement (Hamada *et al.*, 2012; Lonardo *et al.*, 2012; Begum *et al.*, 2019). Ainsi, les PSCs sont nécessaires au caractère malin des cellules tumorales pancréatiques, et accompagnent leur agressivité et la formation de métastases (Xu *et al.*, 2010). Dans le sens inverse, les cellules tumorales interviennent dans la biologie des PSCs (Pothula *et al.*, 2020), et notamment dans leur recrutement (Roy *et al.*, 2017), leur activation et leur maintien (Dunér *et al.*, 2011; Pothula *et al.*, 2020), ainsi que dans leur prolifération et leur capacité à produire une MEC abondante (Bachem *et al.*, 2005). En outre, les PCCs modulent le type de protéines matricielles déposées par les PSCs, afin qu'elles leur soient favorables (Köninger *et al.*, 2004), et influent sur l'hétérogénéité des CAFs présents dans le microenvironnement (Awaji and Singh, 2019; Pereira *et al.*, 2019).

Enfin, les PSCs ont un rôle crucial dans la régulation des différents compartiments du stroma tumoral afin d'établir un environnement permissif au développement de cellules tumorales (**Figure 20A**) (Apte *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2013a; Farran and Nagaraju, 2019). En effet, les PSCs modifient le compartiment immunitaire afin de le rendre tolérant (Li *et al.*, 2020). Pour cela, les PSCs sécrètent des facteurs permettant de moduler l'identité des cellules immunitaires et de favoriser la présence de cellules myéloïdes suppressives et de macrophages de type anti-inflammatoires (Mace, Bloomston and Lesinski, 2013; Zhang *et al.*, 2017). De plus, les PSCs sont promotrices de l'angiogenèse, notamment dans les tissus entourant la tumeur. Elles favorisent en effet la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Masamune *et al.*, 2008; Di Maggio *et al.*, 2016). Cependant, elles peuvent aussi avoir certains effets anti-angiogéniques, tout comme les cellules tumorales et la desmoplasie, menant à l'hypovascularisation à l'intérieur de la tumeur (Tang *et al.*, 2013b). D'autre part, les PSCs agissent indirectement sur l'invasion et la dissémination des cellules tumorales, (1) en modulant l'invasion péri-neurale (Zhou, Zhou and Chen, 2012) et (2) en organisant la MEC entourant les cellules tumorales (Whittle and Hingorani, 2019). En effet, en plus de les sécréter, les PSCs organisent et alignent les protéines de la MEC (notamment la fibronectine et les fibres de collagènes), afin de former des « rails » pour la migration directionnelle des PCCs (Drifka, Loeffler, Esquibel, *et al.*, 2016; Sada *et al.*, 2016; Erdogan *et al.*, 2017). En outre, elles permettent le remodelage de la MEC autour des cellules tumorales par la sécrétion de

MMPs (notamment MT1-MMP, MMP2 et MMP9) et promeuvent ainsi l'invasion et la dissémination des cellules néoplasiques (Koikawa *et al.*, 2018).

Ainsi, les CAFs agissent directement sur la progression tumorale, ainsi que sur son hétérogénéité.

3. La MEC, composante principale de la réaction desmoplasique

Les protéines (et autres molécules) de la MEC sont particulièrement impliquées dans la carcinogenèse et la progression tumorale. En effet, la mise en place d'une MEC « spécialisée » aux caractéristiques uniques, et son remodelage, permet de soutenir l'agressivité des cellules tumorales, directement ou indirectement.

a. Evolution de la MEC au cours de la carcinogenèse pancréatique

Dans le pancréas sain, les cellules épithéliales, acineuses et canalaire reposent sur une lame basale, et ne sont donc pas en contact direct avec la MEC interstitielle du tissu conjonctif sous-jacent. Lors du processus invasif, les cellules tumorales rompent la lame basale et se retrouvent donc exposées à une nouvelle matrice (Veenstra *et al.*, 2018). Les travaux de recherche, en nombre exponentiel, sur ce compartiment stromal montrent l'importance des protéines de la MEC et de leur dynamique dans l'ADKP.

Au cours de la carcinogenèse pancréatique, la MEC change sa composition et se remodèle, afin de créer une matrice permissive au développement et à la progression tumorale (Weniger, Honselmann and Liss, 2018; Thomas and Radhakrishnan, 2019; Tian *et al.*, 2019). En effet, une modulation de la MEC et du stroma est observée dès l'apparition des PanINs, et la composition et l'organisation de la MEC évoluent en parallèle des lésions pré-néoplasiques puis s'adaptent à la progression tumorale. Il a notamment été noté une augmentation de la quantité de matrice corrélée à la multiplication des myofibroblastes (Shi *et al.*, 2014; Bazzichetto *et al.*, 2020).

La composition moléculaire de la MEC tumorale a été décrite par plusieurs études -omics publiées ces dernières années (Li, Zhao and You, 2019; Lv *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2019; Y. Ma *et al.*, 2019), qui ont révélé une grande quantité de fibres de collagène de types I et III, de fibronectine et d'acide hyaluronique (HA), typiques de la fibrose (Mollenhauer, Roether and Kern, 1987; Hu *et al.*, 2019; Piersma, Hayward and Weaver, 2020). En outre, d'autres collagènes (de types IV, V, XI et XV) (García-Pravia *et al.*, 2013; Weniger, Honselmann and Liss, 2018), des protéoglycanes (biglycane, kératane-sulfate) (Weber *et al.*, 2001; Leiphrakpam *et al.*, 2019), certaines glycoprotéines et protéines matricielles (laminines, périostine, TNC) (Juuti, 2004; Esposito *et al.*, 2006; Ben *et al.*, 2011; Fiorino *et al.*, 2018; Leppänen *et al.*, 2019) sont sur-exprimées dans la MEC tumorale. La présence de ces différentes protéines a de plus été corrélée à la survie (bonne ou mauvaise) des patients, montrant l'importance de la

composition de la MEC dans la progression tumorale de l'ADKP et son agressivité (Li *et al.*, 2014; Whatcott *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2019). Alors que les protéines de la MEC sont principalement produites par les PSCs (90%), les cellules tumorales peuvent également sécréter des protéines matricielles de nature différente et à des taux différents. Une forte sécrétion de protéines matricielles par les PCCs est d'ailleurs de mauvais pronostic (Tian *et al.*, 2019).

Cette matrice (pré)tumorale ne cesse d'être remodelée afin de s'adapter aux différentes étapes de la progression tumorale. En effet, sa composition est modifiée et plusieurs MMPs sont exprimées par les cellules stromales et tumorales (Jakubowska *et al.*, 2016; Knapinska, Estrada and Fields, 2017; Slapak *et al.*, 2020). Après activation, ces MMPs permettent la dégradation des protéines de la matrice, notamment nécessaire pour la migration et l'invasion cellulaires ainsi que pour le relargage de signaux séquestrés dans la matrice (Tjomsland *et al.*, 2016; Koikawa *et al.*, 2018; Pothula *et al.*, 2020). En outre, ce remodelage génère des fragments pouvant être une source de nutriments pour les cellules tumorales, ce qui leur confère une résistance supplémentaire dans le stroma hypovasculaire (Olivares *et al.*, 2017; Gouirand and Vasseur, 2018).

b. Rôle de la MEC dans la progression tumorale

La MEC tumorale présente des caractéristiques biomécaniques particulières, qui influent sur le comportement cellulaire. En effet, le changement de composition de la matrice au cours de la carcinogenèse entraîne une rigidification de celle-ci, qui favorise l'activation des PSCs (Lachowski *et al.*, 2017; Kalli *et al.*, 2018). Ces PSCs alors activées seront ensuite responsables du dépôt d'une matrice dense, formant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif. De plus, cette rigidité module le compartiment des cellules tumorales et stromales par mécanotransduction (Lachowski *et al.*, 2017; Fiorino *et al.*, 2018; Stylianou *et al.*, 2019; Piersma, Hayward and Weaver, 2020). Les forces mises en jeu au sein de la MEC tumorale favorisent également la rupture de la lame basale, et donc l'invasion cellulaire (Chang, Thakar and Weaver, 2017), et l'architecture même des protéines de la MEC, leur alignement notamment, influe sur la migration des cellules tumorales, et constitue ainsi un facteur de mauvais pronostic (Drifka, Loeffler, Esquibel, *et al.*, 2016; Drifka, Loeffler, Mathewson, *et al.*, 2016).

Par ailleurs, les protéines de la MEC tumorale influent directement sur le comportement cellulaire. En effet, le collagène de type I promeut la prolifération et les capacités d'adhérence, de migration et d'invasion des cellules cancéreuses (Mollenhauer, Roether and Kern, 1987; Shields *et al.*, 2012; Hamada and Masamune, 2018; Procacci *et al.*, 2018), via les récepteurs DDR2 et intégrine $\beta 1$ et les voies de signalisation JNK1 et FAK. Cet effet est égale-

-ment retrouvé pour les collagènes de types IV et V (Öhlund *et al.*, 2013; Berchtold *et al.*, 2015). De plus, les collagènes de types I et III sont impliqués dans la TEM des cellules tumorales (Menke *et al.*, 2001; Puls *et al.*, 2017). Ainsi, le collagène (principalement de type I), qui pourrait être vu comme une barrière à la progression des cellules tumorales, est en fait un facilitateur de cette progression. En effet, les cellules s'adaptent à ce nouveau substrat et deviennent plus motiles et invasives dans ce contexte (Armstrong *et al.*, 2004; Shields *et al.*, 2011). La fibronectine est quant à elle impliquée dans la prolifération, la migration/invasion et la survie des PCCs ainsi que dans l'angiogenèse et la résistance aux chimiothérapies (Vaquero *et al.*, 2003; Topalovski and Brekken, 2016; Amrutkar *et al.*, 2019). L'acide hyaluronique (GAG non lié à une glycoprotéine) promeut quant à lui la migration des PCCs et maintient l'hypovascularisation de l'ADKP par pression hydrostatique (l'HA est très hydraté), qui écrase les vaisseaux (Jacobetz *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2016; Junliang *et al.*, 2019). D'autres protéoglycanes régulent également le compartiment stromal et peuvent moduler l'agressivité tumorale (PG à héparane sulfate et lumican/décorine, respectivement) (Köninger *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2017; Bokas *et al.*, 2020). Enfin, des glycoprotéines appartenant à la famille des protéines matricellulaires comme la périostine ou la TNC, favorisent la prolifération, la TEM et l'invasion des cellules tumorales (Ben *et al.*, 2011; Paron *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2017, 2018; Liu *et al.*, 2017; Yoneura *et al.*, 2018; Munasinghe *et al.*, 2020). Ainsi, la MEC constitue une niche dynamique favorisant la croissance et la survie des cellules tumorales et cellules souches cancéreuses (Lu, Weaver and Werb, 2012; Begum *et al.*, 2017). Dans les premiers stades de la carcinogenèse, la lame basale, qui promeut classiquement le phénotype épithélial, peut aussi favoriser le caractère invasif des cellules, juste avant d'être rompue. En effet, les capacités invasives de lignées cellulaires tumorales pancréatiques sont augmentées lorsque celles-ci sont cultivées sur du Matrigel (mélange de protéines matricielles issues de cellules de sarcome, de composition proche de la lame basale) (Sawai *et al.*, 2008). Dans un modèle intéressant qui récapitule la transition d'une matrice de type lame basale vers une MEC interstitielle, il a de plus été montré que la composition de la MEC influe sur le phénotype des cellules tumorales, ainsi que sur leur sécrétome (Biondani *et al.*, 2018). Enfin, en opposition aux protéines sur-exprimées très étudiées, peu de protéines ont été détectées comme perdues au cours de la carcinogenèse et qui pourraient donc limiter l'agressivité des cellules tumorales, comme le collagène de type XV, bien que cela soit particulièrement intéressante d'un point de vue thérapeutique (Clementz *et al.*, 2013).

Catégorie (matrisome)	Nom de la protéine matricielle			Rôle Pro(+) or Anti(-) tumoral dans l'ADKP	Sécrété par									
Collagènes	Type I	+	Patients <i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Survie des patients • Source nutritive • + Invasion and TEM • Contrainte mécanique → hypovascularisation, faible infiltration de cellules immunitaires, - délivrance des molécules thérapeutiques 	Cellules stromales									
				Type III	+	<i>In vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • + Prolifération, migration, TEM, et - apoptose • Desmoplasie/Contrainte mécanique → hypovascularisation, faible infiltration de cellules immunitaires, - délivrance des molécules thérapeutiques • Fort taux de collagène IV circulant : ↳ survie des patients après chirurgie (rechute rapide) • Mauvais tableau clinique 	Cellules stromales						
							Type IV	+	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Source nutritive • + Croissance des cellules tumorales, maintien du phénotype migratoire, - apoptose 	Cellules tumorales et stromales			
										Type V	+	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • + Formation de métastases • + Adhérence, prolifération, migration et survie des cellules tumorales • + Angiogenèse 	Cellules stromales, PSCs
													Type VI	+
	Type XV	-	<i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • - Capacités migratoires et TEM des cellules tumorales 	Cellules stromales									
	Protéoglycannes	Tectican	+	Patients <i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Faible survie des patients • + Dépôt de collagène et croissance des cellules tumorales invasives • + Prolifération, survie, migration, invasion et TEM des cellules tumorales 	Cellules stromales								
					Lumican	-	Patients <i>In vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ↗ Survie des patients • ↳ Récidive métastatique après chirurgie • - Croissance des cellules tumorales 	Cellules stromales					
		Décorine	-	<i>In vitro</i>				<ul style="list-style-type: none"> • - Croissance des cellules tumorales 	Cellules stromales					
								Biglycan	-	<i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • - Croissance des cellules tumorales • - Migration des cellules tumorales / métastases 	Cellules tumorales et stromales		
		Versican	+	<i>In vivo et In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mauvais pronostic (↳ survie globale des patients) • Composant immunosuppresseur, ↳ infiltration des cellules T 	Cellules stromales								
					Laminines	+	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mauvais pronostic • + Prolifération, migration et invasion des cellules tumorales (+ métastases) • + Prolifération, survie, migration, invasion et TEM des cellules tumorales 	Cellules tumorales					
								Fibronectine	+	<i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Associé à des stades avancés, à une courte survie des patients et à un mauvais pronostic • + Croissance tumorale et invasion • + Chimiorésistance 	Cellules tumorales et stromales		
		TGFβ1	+	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mauvais pronostic, associé à une courte survie des patients • + Rigidité de la tumeur, immunosuppression • + Croissance tumorale 	Cellules tumorales et stromales								
					Ténascine-C	+	Patients <i>In vitro</i>				<ul style="list-style-type: none"> • Migration et invasion des cellules tumorales • Mauvais pronostic, selon le stade de la tumeur • Corré à une invasion périmébrale, à des stades avancés, à une récidive post-opératoire et à la présence de métastases • + Invasion périmébrale • + Prolifération, invasion et TEM des cellules tumorales (métastases) 	Cellules stromales		

MATRISOME « CŒUR »

Tableau 6 (partie 1) : Implication des protéines de la MEC (matrisome « cœur ») dans la carcinogenèse pancréatique (+ = promotion, - = inhibition, ↗ = augmentation, ↳ = diminution) (Traduit et simplifié de (Liot et al., 2021)).

Catégorie (matrisome)	Nom de la protéine matricielle		Rôle Pro(+) or Anti(-) tumoral dans l'ADKP	Sécrété par	
Facteurs solubles/sécrétés	TGFβ	+	<i>In vivo</i> • Activation, prolifération et synthèse de collagène par les PSC • Métastases • Immunosuppression and inflammation inappropriée	Cellules tumorales et stromales	
	SHH	+	<i>In vitro</i> • Activation, prolifération et synthèse de collagène par les PSC • Prolifération, invasion et TEM, et - appoïse des cellules tumorales	Cellules tumorales	
	FGF-2	+	<i>In vivo et In vitro</i> • Recrutement et activation des PSC (+ desmoplasie)	Cellules tumorales	
	PDGF	+	<i>In vitro</i> • Activation et synthèse de collagène par les PSC	Cellules tumorales	
	CXCLs	+	<i>In vitro</i> • Activation et synthèse de collagène par les PSC	Cellules tumorales	
	Protéines S100		+	<i>In vivo</i> • Réaction desmoplasique and angiogénèse • Migration/invasion des cellules tumorales • Inflammation	Cellules tumorales
			+	<i>In vivo</i> • Croissance tumorale et métastases • Survie et migration/invasion des cellules tumorales	Cellules tumorales
Matrisome-Associated Proteins	MMPs	+	<i>Patients</i> • Mauvais pronostic <i>In vivo</i> • Induction de l'ADM • Croissance tumorale et métastases • Angiogénèse	Cellules tumorales	
	ADAMs	+	<i>In vitro</i> • Prolifération et invasion des cellules tumorales <i>Patients</i> • Associé à un mauvais pronostic et à des tumeurs invasives	Cellules tumorales et stromales	
	TIMPs		-	<i>In vivo</i> • Croissance tumorale et métastases • Angiogénèse <i>In vitro</i> • Associé à un mauvais pronostic et à des tumeurs invasives	Cellules stromales
			+	<i>In vivo</i> • Croissance tumorale et métastases • Résistance aux thérapies	Cellules tumorales
	SERPINS		+	<i>Patients</i> • Faible survie des patients, mauvais pronostic <i>In vivo</i> • Croissance tumorales, invasion et métastases	Cellules tumorales et stromales
			(-)	<i>Patients</i> • Faible survie des patients post-réssection	Cellules stromales
	LOXs		+	<i>In vivo</i> • Résistance aux thérapies : + desmoplasie, - perfusion • Migration/invasion des cellules tumorales, + métastases	Cellules stromales
				<i>Patients</i> • Associé à une faible survie des patients, à la progression tumorale et à la récidive post-réssection	Cellules stromales
	Protéines associées à la MEC	Annexines	+	<i>In vivo</i> • Métastases <i>In vitro</i> • Croissance des cellules tumorales, - apoptose • Invasion et TEM des cellules tumorales • Chimiorésistance	Cellules tumorales et stromales
		Galectines		<i>In vivo</i> • Gal1 : Induction de l'ADM • Gal2 : + Croissance tumorale et évation immunitaire • Gal9 : + Evasion immunitaire	Cellules stromales et stromales
			+	<i>In vitro</i> • Gal1 and 3 : + Activation des PSC • Gal1 : + Prolifération et migration/invasion des cellules tumorales, + immunosuppression • Gal2 : + Croissance, prolifération et migration/invasion des cellules tumorales • Gal4 : Associé à une meilleure survie des patients et à un plus faible taux de métastases • Gal4 : - Migration et invasion des cellules tumorales	Cellules stromales (Gal1) and cellules tumorales (Gal3 and Gal9)

Tableau 6 (partie 2) : Implication des protéines associées au matrisome dans la carcinogénèse pancréatique (+ = promotion, - = inhibition, ↗ = augmentation, ↘ = diminution) (Traduit et simplifié de (Liot et al., 2021)).

La signalisation des protéines de la MEC, et donc leurs effets cellulaires directs, passent principalement par les intégrines, qui sont l'élément principal du dialogue MEC – tumeur. Plusieurs sous-unités d'intégrines sont sur-exprimées dans l'ADKP, comprenant les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ et αV ainsi que $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ (Löhr *et al.*, 1996). Ainsi, le collagène de type I (1) permet l'adhérence des CAFs à la matrice par interaction avec l'intégrine $\alpha 11$, et (2) promeut l'invasion des PCCs via l'intégrine $\alpha 11\beta 1$. La fibronectine quant à elle transmet un signal via l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ afin de permettre la migration des PCCs sur ce substrat. En outre, plusieurs combinaisons des sous-unités d'intégrine sont associées (1) à l'activation et la migration des PSCs : $\alpha \nu\beta 5$ (Franco-Barraza *et al.*, 2017) et $\alpha 11\beta 1$ (Schnittert *et al.*, 2019; Zeltz *et al.*, 2019) et (2) à l'agressivité des PCCs (Walsh *et al.*, 2009; Gharibi *et al.*, 2017) : $\alpha 2\beta 1$ (Grzesiak and Bouvet, 2006) et $\alpha \nu\beta 6$ (Reader *et al.*, 2019), avec parfois une corrélation avec la survie des patients.

Enfin, en plus de protéines structurales, des facteurs solubles sécrétés par les différents compartiments du stroma et par la tumeur baignent dans la MEC. Par ce biais, la MEC joue donc un rôle de régulation de la biodisponibilité de ces facteurs solubles, agissant ainsi indirectement sur le comportement des cellules tumorales et stromales. Les cytokines comprennent l'ensemble des chimiokines (molécules d'attraction pour les cellules) et des facteurs de croissance. Parmi les facteurs sécrétés dans l'ADKP, plusieurs chimiokines (CXCL12, CXCL8), facteurs de croissances (TGF β 1, EGF, VEGF, HGF, FGF), morphogènes (SHh, Wnt) et autres cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10,) ont été identifiés (Bartholin, 2012; Bazzichetto *et al.*, 2019, 2020; Ram Makena *et al.*, 2019; Zeltz *et al.*, 2020). C'est la sécrétion et la signalisation aberrante de ces facteurs qui en font des acteurs de la carcinogenèse et de la progression tumorale (Coleman *et al.*, 2014). Le TGF β , par exemple, a un rôle double au cours de la carcinogenèse. Dans de nombreuses tumeurs, il joue en effet un rôle antitumoral en début de carcinogenèse, et devient ensuite protumoral, favorisant la croissance tumorale et la dissémination métastatique (Massagué, 2008). Dans l'ADKP, ce rôle double du TGF β a également été observé (Ahmed *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2017), mais semble plus complexe encore, puisque le TGF β promeut l'ADM et pourrait ainsi être pro-tumoral dès les stades précoces de la carcinogenèse pancréatique (Chuvin *et al.*, 2017). Dans ce contexte, le TGF β est connu pour agir à plusieurs niveaux, sur les compartiments stromal et tumoral (Neuzillet *et al.*, 2014; Principe *et al.*, 2016; Stylianou, Gkretsi and Stylianopoulos, 2018). En outre, sa voie de signalisation, qui comprend la liaison à ses récepteurs (TGF β RI et TGF β RII) pour déclencher la voie des Smad (phosphorylation de Smad2 et Smad3, couplage avec Smad4, translocation dans le noyau et régulation de l'expression des gènes cibles du TGF β) (Principe *et al.*, 2014), est souvent altérée dans l'ADKP, par les mutations sur SMAD4.

Ainsi, la composition de la MEC, son organisation et sa dynamique sont hautement impliquées dans l'initiation, la progression et l'agressivité de l'ADKP. Composante majoritaire du stroma, elle est à ce jour de plus en plus étudiée. Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de participer activement à la rédaction d'une revue mettant en lumière le rôle primordial du stroma au cours de la carcinogenèse pancréatique (Liot *et al.*, 2021). Le **Tableau 6** répertorie les principales protéines matricielles dérégulées au cours de la carcinogenèse pancréatique, ainsi que leur rôle et les cellules responsables de la sécrétion de ces protéines ; et fait partie intégrante de la revue publiée.

4. Implications cliniques

La présence d'un stroma desmoplasique important au sein de l'ADKP est l'une des raisons de son agressivité et de l'échec des thérapies actuelles, et devient donc une cible thérapeutique importante.

a. Stroma et résistance aux chimiothérapies

Le stroma tumoral, et notamment la MEC, joue un rôle important dans la chimiorésistance de l'ADKP (McCarroll *et al.*, 2014). D'une part, la fibrose et l'hypoxie qu'elle engendre entraînent un isolement, puis une adaptation des cellules à ce milieu particulier, et les rend ainsi plus résistantes (chimiorésistance acquise). D'autre part, ce stroma représente une barrière physique aux chimiothérapies actuelles, du fait (1) de la mauvaise perfusion de la tumeur, les vaisseaux étant comprimés par la réaction desmoplasique, et (2) de l'inaccessibilité des cellules tumorales entourées de fibrose. Cette chimiorésistance est donc à la fois intrinsèque (modification du métabolisme, modification des voies de transport et de métabolisation des agents chimiothérapeutiques, échappement aux effets cytotoxiques) et extrinsèque (effets des CAFs, des cellules immunitaires et de la MEC, régulation du flux sanguin, sélection des cellules résistantes, *etc*) aux cellules tumorales pancréatiques (Whatcott *et al.*, 2012; Schober *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2017). Pour la gemcitabine par exemple, l'expression de son transporteur (hENT1) est diminuée dans les cellules tumorales pancréatiques et l'enzyme nécessaire à son activation (deoxycytidine kinase, dCK) est inactivée (Zheng *et al.*, 2015). En outre, les PSCs « accumulent » et inactivent la gemcitabine de manière intracellulaire, et empêchent ainsi son action sur les cellules tumorales (Hessmann *et al.*, 2018). Au regard de cette chimiorésistance dirigée par le stroma, il est donc apparu que ce compartiment puisse être une cible thérapeutique de choix.

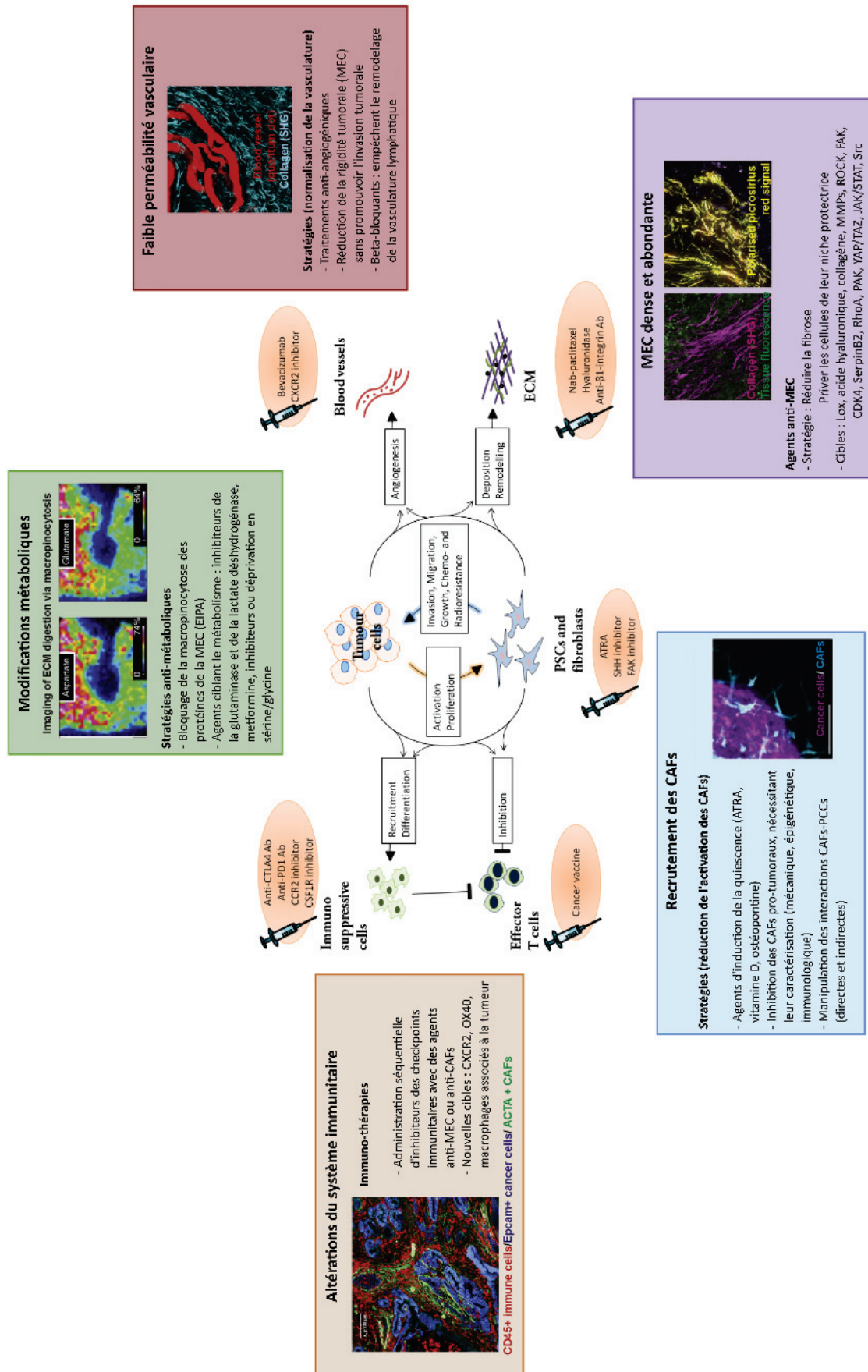


Figure 21 : Cibles et stratégies thérapeutiques dans le stroma de l'ADKP (d'après (Lunardi, Muschel and Brunner, 2014; Vennin et al., 2018)).

b. Cibler le stroma : bonne ou mauvaise idée ?

L'intérêt thérapeutique de ciblage du stroma est double. En effet, cela pourrait permettre à la fois une meilleure pénétrance des drogues, ainsi que de limiter ses effets protumoraux. Une première stratégie a donc été le ciblage global des CAFs, responsables de la réaction desmoplastique. Cependant, une ablation totale des CAFs a entraîné une aggravation de l'ADKP dès le stade préclinique (Gore and Korc, 2014; Özdemir *et al.*, 2014). En effet, la suppression des cellules α SMA⁺ dans un modèle murin par manipulation génétique favoriserait les capacités invasives des cellules tumorales (TEM, migration, invasion) et mènerait à un enrichissement de la tumeur en cellules souches cancéreuses, aboutissant *in fine* à des tumeurs moins différenciées et plus agressives. Ces résultats ont révélé que la population des CAFs présente une certaine diversité fonctionnelle, avec des CAFs promoteurs de tumeur (pCAF), et des CAFs qui restreindraient l'initiation et la progression tumorale (rCAF) (Helms, Onate and Sherman, 2020). Les pCAF apportent aux cellules tumorales un support métabolique, favorisent leur survie et leur prolifération, et façonnent le compartiment immunitaire vers un état immunosuppresseur, effets décrits précédemment. Les rCAF, quant à eux, seraient à l'origine de molécules favorisant la différenciation des cellules tumorales, les rendant moins agressives, et modèleraient le compartiment immunitaire pour le rendre moins immunosuppresseur (Miyai *et al.*, 2020).

Ainsi, la « normalisation » du compartiment stromal (ciblant CAFs et MEC) semblerait plus bénéfique que son élimination (**Figure 21**) (Froeling and Kocher, 2015; Neesse *et al.*, 2015; Whatcott, Han and Von Hoff, 2015; Mei, Du and Ma, 2016; Hauge and Rofstad, 2020). Des stratégies anti-FAK, anti-TGF β et anti-SHh, ou l'utilisation de l'ATRA (All Trans-Retinoic Acid), permettant respectivement de limiter l'activation des CAFs ou de les désactiver, se sont avérées efficaces dans les études précliniques. Cependant, les résultats sont limités voire décevants lors des essais cliniques chez les patients (Whatcott *et al.*, 2012; Neuzillet *et al.*, 2014). En outre, la réduction du collagène ou de l'acide hyaluronique, en combinaison avec des agents anti-cancéreux a montré un effet bénéfique dans un modèle murin, avec une meilleure pénétration des molécules thérapeutiques. Ces stratégies sont en cours d'essai chez l'Homme, mais le ciblage de l'acide hyaluronique, qui semblait prometteur (PEGPH20), a dû être arrêté par manque de résultat probant sur la survie des patients (Mei, Du and Ma, 2016; Zinger *et al.*, 2019).

A ce jour, aucune molécule « anti-stroma » n'a donc pu être validée. Cependant, cela reste une piste intéressante, et la combinaison agent chimiothérapeutique / normalisation du stroma reste à explorer. En outre, des stratégies thérapeutiques ciblant les autres compartiments du stroma (modulation de l'immunosuppression et agents anti-angiogéniques) font l'objet d'essais cliniques, montrant le fort potentiel thérapeutique du stroma tumoral (**Figure 21**) (Bahrami *et al.*, 2017).

D. Modèles d'étude de l'ADKP, de la lignée cellulaire à la tumeur humaine

Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'initiation, le développement et la progression de l'ADKP et présentés dans ce chapitre n'auraient pu être élucidés sans de bons modèles d'études, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Il existe de nombreux modèles se rapprochant plus ou moins de la physiopathologie humaine de l'ADKP, et utilisés autant en recherche fondamentale que dans les études précliniques (Behrens, Walther and Fichtner, 2017; Krempley and Yu, 2017).

1. Modèles *in vitro*

La culture de cellules constitue l'une des approches les plus couramment utilisées pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires. En effet, ces modèles *in vitro* sont une version « simplifiée » de la physiopathologie *in vivo*, relativement rapide à mettre au point et peu coûteuse. Ils sont ainsi utilisés dans l'étude de nombreuses pathologies, dont la tumorigenèse pancréatique.

Dans l'étude de l'ADKP, l'utilisation des cultures en 2D est de plus en plus délaissée, au profit des modèles en 3D, plus proches de la physiopathologie. Les lignées de cellules tumorales pancréatiques, dérivées de tumeurs primaires et métastases de patients, sont nombreuses et bien caractérisées (Monti *et al.*, 2004; Schiarea *et al.*, 2010; Alhamdani *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014). L'état de différenciation, les capacités d'adhérence, de migration et d'invasion, ainsi que l'index de prolifération varient entre ces différentes lignées, fournissant ainsi une grande diversité de phénotypes cellulaires (Deer *et al.*, 2010). En outre, des PSCs ont été extraites et mises en culture à partir de différents organismes, dont la souris, le rat et l'Homme (Apte *et al.*, 1998; Bachem *et al.*, 1998; Strobel *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). Cela a notamment permis la caractérisation de ces cellules particulières, et l'élucidation de leurs mécanismes d'activation (Vonlaufena *et al.*, 2010). L'immortalisation des PSCs primaires a ensuite permis d'établir des lignées de PSCs, qui peuvent alors être plus facilement utilisées (Suklabaidya *et al.*, 2018).

Les co-cultures directes et indirectes (milieux conditionnés) des lignées de cellules pancréatiques tumorales et de PSCs ont, dans un premier temps, permis de mettre en évidence les interactions bidirectionnelles entre ces deux types cellulaires. Cependant, l'importance de la réaction desmoplastique dans l'ADKP, et la volonté d'aller vers des modèles plus physiologiques, ont mené les chercheurs à mettre en place divers modèles *in vitro* en 3 dimensions (Zeeberg *et al.*, 2016; Suklabaidya *et al.*, 2018).

Les sphéroïdes sont un modèle permettant de récapituler la structure en 3D des cellules tumorales dans l'ADKP. Elles sont particulièrement utilisées dans l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques, pour tester leur pénétrance notamment. De plus, la forme de sphère confère une hétérogénéité au sein de celle-ci, avec une zone hypoxique au centre et une zone plus proliférative en périphérie (Dufau *et al.*, 2012; Longati *et al.*, 2013; Ware *et al.*, 2016). En outre, la co-culture de PSCs avec les PCCs sous forme de sphéroïdes permet de récapituler un environnement tumoral plus complet, proche des résultats obtenus par greffe orthotopique de cellules tumorales, avec le dépôt de protéines de la MEC autour des PCCs, par les PSCs (Ware *et al.*, 2016). L'ajout de cellules endothéliales ou immunitaires est également envisageable, afin de se rapprocher au mieux du stroma tumoral (Shoval *et al.*, 2017; Lazzari *et al.*, 2018).

Le modèle de culture organotypique constitue un pas de plus vers la reconstitution de l'histologie de l'ADKP. Il consiste en effet à cultiver des cellules tumorales dans ou sur une matrice (Matrigel ou gel de collagène I), ajoutant donc l'aspect desmoplasie à ce modèle 3D (Coleman, 2014). La création d'une interface air-liquide lorsque les cellules sont posées sur la matrice, permet la reconstitution d'une « lumière », traduisant l'aspect canalaire de l'ADKP, et permet notamment l'étude de l'invasion des cellules dans la matrice par chimiotactisme, le milieu nutritif étant vers le bas (Nyström *et al.*, 2005; Froeling *et al.*, 2009; Froeling, Marshall and Kocher, 2010; Moutasim, Nystrom and Thomas, 2011). Il est à noter que le type de matrice, ainsi que le phénotype initial des cellules sont des points importants à prendre en compte dans la mise au point de ces modèles (Puls *et al.*, 2017). De nouveau, l'ajout d'autres types cellulaires du stroma permet de se rapprocher au mieux de la composition du stroma tumoral (Karnevi *et al.*, 2016).

Enfin, le modèle « organoïde » est défini par l'ensemencement de morceaux de tissu (sain ou tumoral), ou de cellules souches pluripotentes ou embryonnaires capables d'auto-organisation, dans une matrice (Matrigel ou collagène) (Moreira *et al.*, 2018; D'Agosto *et al.*, 2019). Dans la recherche sur l'ADKP, le protocole le plus fréquemment rencontré est l'établissement d'organoïdes à partir de tissu pancréatique sain ou tumoral, humain ou murin. Ce modèle permet d'obtenir *in vitro* une bonne représentation du tissu initial au niveau phénotypique et génomique (Tiriach *et al.*, 2019), et est le modèle *in vitro* se rapprochant le plus de l'ADKP *in vivo*. En effet, une étude princeps a montré que ces organoïdes reproduisaient l'histologie (canaire ou tumorale) du tissu initial et en conservaient ses caractéristiques, en termes de protéomique et de transcriptomique (Boj *et al.*, 2015, 2016; Patman, 2015). Ce modèle est aujourd'hui particulièrement important dans les études pré-cliniques (test de nouvelles molécules, association génomique – traitement) et pour la médecine personnalisée (Muthuswamy, 2017; D'Agosto *et al.*, 2019).

2. Modèles *in vivo*

Bien qu'importants dans la compréhension de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires, les modèles *in vitro* ne sauraient cependant récapituler tous les éléments d'initiation et de progression tumorale.

L'utilisation d'animaux modèles, principalement de souris, est donc très répandue dans la recherche sur l'ADKP. Historiquement induit par injection de carcinogènes tels que le de DMBA (7,12-DiMethylBenz(a)Anthracene), l'ADKP est aujourd'hui étudié dans des modèles de transplantation ou de souris génétiquement modifiées (Herrerros-Villanueva *et al.*, 2012; Mazur *et al.*, 2015). Comme un dialogue à double sens, la compréhension de la physiopathologie de l'ADKP, et notamment de son instabilité génétique, a permis le développement de tels modèles. En retour, ces modèles permettent aujourd'hui de pousser les investigations afin de comprendre les mécanismes de développement et de progression tumorale (Bartholin, 2012). L'utilisation de ces animaux permet notamment d'étudier les facteurs de risque, de décortiquer les altérations géniques et le processus d'initiation de la tumorigenèse, de mettre au point des méthodes de diagnostic ou encore de tester de nouveaux traitements (Pérez-Mancera *et al.*, 2012; Murtaugh, 2014; Bisht and Feldmann, 2019).

a. Modèles de métaplasie acino-canalaire et de pancréatite

L'ADM étant considérée comme la principale source de genèse des cellules (pré)cancéreuses, des modèles d'induction de pancréatite peuvent être utilisés pour l'étude de l'initiation de l'ADKP. La technique la plus répandue pour cela consiste en l'injection répétée de céruléine, analogue de la cholécystokinine, qui entraîne une augmentation des sécrétions pancréatiques (Wang, Xie and Wei, 2019). Une inflammation du pancréas est alors observée, proche de la pancréatite, avec une infiltration immunitaire importante et la modification des acini vers un phénotype canalaire. Ce phénomène est réversible en environ 7 jours chez la souris, en l'absence d'injections répétées. Moins courants, il existe d'autres inducteurs de la pancréatite (aigüe ou chronique), parmi lesquels l'injection de cytokines, d'agents chimiques, un régime gras ou la ligature du canal pancréatique principal (Saloman *et al.*, 2019). Il est ainsi possible d'étudier les étapes précoces pouvant potentiellement mener à une transformation maligne *in vivo*.

b. Modèles de transplantation

La transplantation sous-cutanée ou orthotopique de cellules cancéreuses est assez répandue et permet l'étude du microenvironnement et de facteurs extrinsèques à la tumeur sur la progression tumorale, ainsi que l'évaluation de nouveaux traitements. Ce type de modèle nécessite cependant l'utilisation de souris immunodéprimées, ne permettant donc pas l'étude du compartiment immunitaire. Les cellules injectées sont généralement des lignées cellulaires pancréatiques tumorales, pouvant être co-injectées avec d'autres types cellulaires dont notamment des CAFs. La transplantation sous-cutanée est plus simple et permet la reconstitution rapide d'une tumeur, facilement observable. A l'inverse, la transplantation orthotopique (dans le pancréas) est plus complexe, mais permet de remettre les cellules tumorales dans leur contexte (Ding *et al.*, 2010). Les greffes de cellules tumorales ne permettent cependant pas l'étude des interactions cellulaires et des aspects structuraux (du stroma notamment).

Un autre modèle d'injection, nommé PDX (Patient-Derived Xenograft) consiste en l'implantation de tissu tumoral humain issu de biopsies ou de résection (sans traitement néoadjuvant) en sous-cutané ou de manière orthotopique dans des souris immunodéficientes (Rubio-Viqueira *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009). Cette technique présente une fourchette de réussite de 20 à 80% (en 1 à 4 mois) selon la qualité du greffon, sa composition, le lieu d'injection ou encore la souche de souris choisie (Behrens, Walther and Fichtner, 2017). Les PDX possèdent de nombreux avantages, dont la conservation de l'histologie et des altérations géniques de la tumeur initiale, ainsi que la possibilité de « passer » les greffons (en changeant de souris), afin de les garder dans le temps. Cela a notamment permis d'élaborer une « banque » de PDX, récapitulant en partie la diversité de l'ADKP chez l'Homme (Cho *et al.*, 2016). En recherche fondamentale, les PDX permettent donc l'étude de l'hétérogénéité et de la complexité tumorales, et sa dynamique d'évolution. En outre, ils représentent une plateforme importante dans les études pré-cliniques, pour l'évaluation de nouveaux traitements ou outils diagnostiques (Byrne *et al.*, 2017). Enfin, ils entrent dans le domaine de la médecine personnalisée, permettant de prédire la réponse aux traitements du patient (Gao *et al.*, 2015). A l'avenir, l'utilisation de souris humanisées, permettra peut-être l'étude du compartiment immunitaire et ainsi l'évaluation des immunothérapies (Hidalgo *et al.*, 2014; Sereti *et al.*, 2018).

A Modèles de développement de lésions de type PanIN							
GEM model	Tumor initiation	Targeted cell type	Lesions (incidence %)			Observations	References
			PanIN	PDAC	MET		
Elastase-TGF- α	Prenatal	Acinar	100	10	No	KrasG12D accelerates progression of mPanIN lesions to PDAC	Wagner et al., 2001
Pdx1-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D}	Prenatal	Acinar, CAC, ductal, endocrine	100	Not all mice, long latency	Yes	Impossibility to asses cell of origin	Hingorani et al., 2003
Ptf1a-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D}	Prenatal	Acinar, CAC, ductal, endocrine	100		Yes	Impossibility to asses cell of origin	Hingorani et al., 2003
Elastase-tTA; Tet-O-Cre; K-Ras ^{+LSLG12Vgeo}	Prenatal	Acinar	90	10	No	Pancreatitis accelerates PanIN development.	Guerra et al., 2007
Elastase-CreER; K-Ras ^{+LSLG12D}	Postnatal (6 weeks)	Acinar	36	NA	No	Leaky system. Short term study.	De La O et al., 2008
Elastase-CreERT2; K-Ras ^{+LSLG12D}	Postnatal (6 weeks)	Acinar	63	No	No	PanIN development does not require pancreatitis.	Habbe et al., 2008
Mist1-CreERT2; K-Ras ^{+LSLG12D}	Postnatal (6 weeks)	Acinar	30	No	No	PanIN development does not require pancreatitis.	Habbe et al., 2008
Pdx1-CreER; K-Ras ^{+LSLG12D}	Postnatal (8 weeks)	Endocrine	55	Rare	No	The system may target acinar and precursor cells.	Gidekel-Friedlander et al., 2009
proCPA1CreERT2; K-Ras ^{+LSLG12D}	Postnatal (3 weeks)	Acinar	10	No	No	PanIN development require pancreatitis in older mice (5–8 weeks): PanIN in 33% mice.	Gidekel-Friedlander et al., 2009

B Modèles d'ADKP					
GEM model	Lesions	Metastasis	Survival	References	
Pdx1-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; Ink4a/Arf ^{lox/lox}	PanIN and PDAC	Yes	2 m	Aguirre et al., 2003	
Pdx1-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; p53 ^{R172H/+} (KPC)	PanIN and PDAC	Yes	5 m	Hingorani et al., 2005	
Pdx1-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; Ink4a/Arf ^{-/-}	PanIN and PDAC	Yes	5 m	Bardeesy et al., 2006	
Pdx1-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; p53 ^{lox/lox}	PanIN and PDAC	No	3 m	Bardeesy et al., 2006	
Pdx1-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; p53 ^{lox/lox} ; Ink4a/Arf ^{-/-}	PanIN and PDAC	Yes	2 m	Bardeesy et al., 2006	
Pdx1-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; Smad4 ^{lox/lox}	IPMN and PDAC	Yes	9 m	Bardeesy et al., 2006	
Ptf1a-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; TGF β IR ^{lox/lox}	PanIN and PDAC	Yes	2 m	Ijichi et al., 2006	
Elastase-tTA; Tet-O-Cre; K-Ras ^{+LSLG12Vgeo} ; p53 ^{-/-}	PanIN and PDAC	Yes	3–4 m	Guerra et al., 2007	
Ptf1a-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; Elastase-TGF- α	PanIN, IPMN, PDAC	Yes	7 m	Siveke et al., 2007	
Ptf1a-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; Smad4 ^{lox/lox}	MCN and PDAC	Yes	8 m	Izeradjene et al., 2007	
Pdx1-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; Brca2 ^{Tr/Δ11}	PanIN and PDAC	NA	NA	Skoulidis et al., 2010	
Pdx1-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; p53 ^{R270H/+} ; Brca2 ^{Tr/+}	PanIN and PDAC	NA	<5 m	Skoulidis et al., 2010	
Pdx1-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; p53 ^{R270H/+} ; Brca2 ^{Tr/Δ11}	PanIN and PDAC	Yes	2.5 m	Skoulidis et al., 2010	
Pdx1-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; Lkb1 ^{lox/lox}	PanIN and PDAC	NA	4.5 m	Morton et al., 2010	
Pdx1-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; Notch1 ^{lox/lox}	PanIN (high grade)	No	3 m	Hanlon et al., 2010	
Ptf1a-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; Notch2 ^{lox/lox}	MCN, anaplastic, PDAC	No	>12 m	Mazur et al., 2010	
Elastase-tTA; Tet-O-Cre; K-Ras ^{+LSLG12Vgeo} ; p53 ^{lox/lox}	PanIN and PDAC	Yes	3–4 m	Guerra et al., 2011	
Elastase-tTA; Tet-O-Cre; K-Ras ^{+LSLG12Vgeo} ; Ink4a/Arf ^{lox/lox}	PanIN and PDAC	Yes	3–4 m	Guerra et al., 2011	
Pdx1-Cre; K-Ras ^{+LSLG12D} ; Usp9x ^{+lox}	PanIN and PDAC	NA	NA	Perez-Mancera et al., 2012	

m: Months; NA: Not analyzed.

Tableau 7 : Modèles murins génétiquement modifiés permettant l'étude des lésions pré-néoplasiques (A) et de l'ADKP (B) (d'après (Guerra and Barbacid, 2013)), classés par ordre chronologique. PDAC = Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, MET = métastases, NA = non analysé.

c. Modèles murins génétiquement modifiés

L'utilisation de modèles de souris génétiquement modifiées reste prévalente en recherche fondamentale. En effet, bien que ce type de modèles soit chronophage et relativement cher, ils permettent de récapituler l'intégralité des événements tumoraux, de l'initiation aux métastases, selon le modèle choisi. Le principe de ces modèles repose sur l'expression de gènes mutés sous le contrôle de promoteurs spécifiques du pancréas, notamment grâce au système CRE-Lox. Les principaux modèles utilisés dans l'étude de l'ADKP sont décrits dans le **Tableau 7** (Guerra and Barbacid, 2013; Gopinathan *et al.*, 2015; Weng, Lin and Cheng, 2019; Kong *et al.*, 2020).

Le premier promoteur utilisé fut celui du gène de l'élastase, enzyme principalement exprimée dans le compartiment acineux ; et les gènes initialement ciblés furent *myc*, *Tgfa* et *Hras*. Cependant, l'utilisation du promoteur du gène de l'élastase mène à des lésions de type acineuses, assez éloignées du caractère canalaire des lésions (pré)néoplasiques de l'ADKP. En revanche, des cellules en métaplasie (ADM) ont été observées dans ce premier modèle, notamment dans les souris surexprimant le TGF α (Sandgren *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 2001). Par la suite, le développement de souris possédant la mutation *Kras*^{G12D} (majoritaire chez les patients) précédée d'une séquence Lox-STOP-Lox (« STOP » transcriptionnel) (Jackson *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2001), a permis à Hingorani et ses collègues de proposer en 2003 un modèle de souris exprimant *Kras* mutée sous le contrôle de promoteurs de gènes impliqués dans le développement du pancréas, *Pdx1* et *Ptf1a* (ou *p48*), qui sont alors suivis d'une séquence codant la recombinase CRE (Hingorani *et al.*, 2003). Dans le langage usuel, ce modèle est nommé « KC ». L'activation constitutive de *Kras* spécifiquement dans le pancréas, entraîne le développement de PanINs chez toutes ces souris mais une progression vers l'ADKP très longue, et dans moins de 10% des souris (Hingorani *et al.*, 2003; Ariston Gabriel *et al.*, 2020).

La caractérisation de ce modèle a permis de mettre en évidence l'activation de nombreuses voies impliquées dans l'ADKP, ainsi que le développement d'une réaction desmoplasique, montrant sa proximité avec la pathologie humaine. Il présente cependant quelques biais, dont notamment une désorganisation du compartiment endocrine (avec le promoteur *Pdx1*) (Friedlander *et al.*, 2009; Gout *et al.*, 2013). De plus, le modèle murin développé initialement montre une sensibilité importante des poumons, du thymus et de la peau à l'activation de KRAS, qui pourrait dégénérer en cas d'expression non pancréas-spécifique de la recombinase CRE (Johnson *et al.*, 2001).

Afin d'accélérer la cinétique de progression tumorale, l'extinction de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *Tp53* (modèle KPC), *Ink4a* (modèle KIC) ou *Smad4* a été ajoutée à ce modèle. En effet, la combinaison de la mutation *Kras^{G12D}* avec un ou plusieurs de ces KO conditionnels (dans le pancréas uniquement) accélère le développement des lésions, la progression en ADKP et le processus métastatique, récapitulant ainsi la physiopathologie humaine, en un temps plus court que dans le modèle KC (Aguirre *et al.*, 2003; Hingorani *et al.*, 2005; Bardeesy *et al.*, 2006; Izeradjene *et al.*, 2007; Kojima *et al.*, 2007). Le modèle KPC est ainsi très utilisé à ce jour, notamment dans les études sur la progression tumorale ou sur les aspects immunitaires, et dans de nombreuses études pré-cliniques, pour l'essai de nouvelles thérapies (Gopinathan *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016; Ariston Gabriel *et al.*, 2020). En outre, d'autres gènes dont *Tgfbr2*, *Brca2*, *Lkb1* et *Notch1* et 2, mutés de manière plus anecdotique chez les patients, ont été ciblés pour générer des souris récapitulant le cancer du pancréas humain, et certaines formes familiales (Ijichi *et al.*, 2006; Morton *et al.*, 2010; Skoulidis *et al.*, 2010; Gharibi, Adamian and Kelber, 2016).

De nombreux promoteurs existent, qui permettent de cibler plus ou moins bien les différentes cellules pancréatiques, à des stades du développement plus ou moins précoces (Magnuson and Osipovich, 2013). L'une des problématiques à l'utilisation du modèle KC est que l'expression de *Pdx1* et *Ptf1a* démarre très tôt dans le développement du pancréas, au stade prénatal. En outre, cette expression n'est pas strictement restreinte au pancréas. En effet, l'épiderme ainsi que l'estomac et le duodénum montrent une expression de *Pdx1*, tandis que *Ptf1a* serait également exprimé dans le système nerveux (Mazur *et al.*, 2010; Bartholin, 2012; Mazur and Siveke, 2012). Ces modèles de souris modifiées pourraient alors présenter une sensibilité à développer d'autres tumeurs, observation qui fera l'objet d'une des publications de ce manuscrit de thèse, et qui affecterait la pathogenèse de l'ADKP. Afin de contourner ces barrières, des modèles inductibles ont été créés, permettant à l'expérimentateur de déclencher, de façon temporelle, l'expression de la recombinaison et donc de la mutation *Kras^{G12D}* dans le pancréas (par les technologies CRE-ERT ou TetO-CRE (tétracycline), notamment) (Guerra and Barbacid, 2013; Kong *et al.*, 2020). Plusieurs travaux de recherches ont également placé l'expression de l'oncogène muté *Kras^{G12D}* sous le contrôle de promoteurs plus tardifs et spécifiques, tels que ceux de l'élastase ou *Mist1*, de manière inductible (Habbe *et al.*, 2008) ou non (Tuveson *et al.*, 2006), permettant le développement de PanINs ou de tumeurs invasives métastatiques, respectivement (Alison, 2020).

Modèles	Avantages	Limites
IN VITRO		
Culture 2D	<ul style="list-style-type: none"> • Peu cher • Modèle simplifié (standardisé, rapide) • Cocultures : Oui • Conservation et amplification possible • <u>Applications</u> : analyses moléculaires (voie de signalisation), mise au point et screening haut-débit de molécules thérapeutiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence d'hétérogénéité tumorale • Pas d'organisation en 3D • Pas de microenvironnement • Dérives génétiques (passages) → Éloigné de la physiopathologie
Sphéroïdes	<ul style="list-style-type: none"> • Rapide et peu cher • Organisation, culture hors plastique • Cocultures : Oui • <u>Applications</u> : screening haut-débit de molécules thérapeutiques principalement 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de microenvironnement • Absence d'hétérogénéité tumorale (lignées cellulaires)
Cultures 3D organotypiques	<ul style="list-style-type: none"> • Microenvironnement (matrice) simplifié • Coûts modérés → Modèle intermédiaire (assez rapide, plus proche de la physiopathologie humaine) • Cocultures : Oui • <u>Applications</u> : études fondamentales, screening haut-débit de molécules thérapeutiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisation de lignées (dérive génétique, absence d'hétérogénéité) • Ensemencement en cellules isolées
Cultures 3D organoïdes	<ul style="list-style-type: none"> • Organisation des cellules en 3D • Coûts modérés • Conservation possible (passages) → Proximité avec la physiopathologie humaine (hétérogénéité, organisation) • Cocultures : Oui • <u>Applications</u> : études fondamentales, screening haut-débit de molécules thérapeutiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Techniquement complexe • Absence de microenvironnement
IN VIVO		
Xénogreffes dérivées de lignées cellulaires	<ul style="list-style-type: none"> • Assez rapide (préparation et développement de la tumeur) • Peu complexe (sauf en cas de greffe orthotopique) • Co-injections possibles • <u>Applications</u> : screening de molécules thérapeutiques, recherche de biomarqueurs 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence d'hétérogénéité tumorale • Absence de système immunitaire • Stroma absent lors d'une injection simple (sans PSCs ou fibroblastes)
PDX	<ul style="list-style-type: none"> • Hétérogénéité inter-tumorale • Phénotype et génotype conservés (tumeur d'origine) • <u>Applications</u> : médecine personnalisée, prédiction de chimiorésistance, screening de molécules thérapeutiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Cher et long • Absence de microenvironnement • Absence de système immunitaire • Faible rendement de réussite
Souris génétiquement modifiées	<ul style="list-style-type: none"> • Développement proche du développement tumoral chez l'humain • Présence de stroma et système immunitaire • Applications : études fondamentales (analyses génétiques, moléculaires et cellulaires de la progression tumorale) 	<ul style="list-style-type: none"> • Cher et long • Absence de complexité génétique (quelques mutations seulement)

Tableau 8 : Comparaison des modèles d'étude de l'ADKP, in vitro et in vivo. Les avantages et inconvénients de chacun sont exposés ici (inspiré de (Behrens, Walther and Fichtner, 2017; Krempley and Yu, 2017)).

Bien qu'imparfaits, ces modèles de souris génétiquement modifiées permettent donc la compréhension de mécanismes moléculaires et cellulaires clés de l'ADKP, et notamment l'identification des cellules à l'origine des lésions pré-néoplasiques, ou l'étude approfondie du stroma tumoral. Il est également possible, par croisement, d'étudier le rôle de protéines d'intérêt dans la carcinogenèse pancréatique, comme ce fut le cas au cours de ma thèse (Ijichi, 2011; Westphalen and Olive, 2012). Ainsi, l'utilisation de modèles murins permet de s'approcher au plus près de la physiopathologie humaine de l'ADKP, bien que les comparaisons de la souris à l'Homme doivent toujours être faites avec précautions, puisque des différences persistent à l'état physiologique et physiopathologique (Tuveson and Hingorani, 2005; Ijichi, 2011).

Finalement, chaque modèle possède des avantages et des limites, et permet de répondre à des hypothèses scientifiques variées, selon l'objectif scientifique et la cinétique de développement abordés (**Tableau 8**) (Saloman *et al.*, 2019). En outre, de nouveaux modèles se développent afin de s'approcher plus encore de la physiopathologie humaine (culture d'organes *in vitro*, bioimpression 3D) et les approches bio-informatiques deviennent de plus en plus importantes dans la compréhension des mécanismes et de l'hétérogénéité prenant place au cours de l'ADKP (Swayden, Soubeyran and Iovanna, 2020).

RÉSULTATS

PREMIER ARTICLE

Etude du statut de la Ténascine-X dans les tumeurs solides humaines

Préambule

Le cancer est une pathologie systémique mettant en jeu de nombreuses molécules, produites par les cellules tumorales elles-mêmes ou les cellules stromales qui les entourent. Le rôle pro-ou anti-tumoral du microenvironnement tumoral est toujours discuté. En effet, il peut, d'une part, être considéré comme une barrière à la progression tumorale, mais aussi constituer une barrière physique à la diffusion d'agents chimiothérapeutiques dans la tumeur. En outre, alors que certaines molécules présentes dans le stroma favorisent nettement l'agressivité des cellules tumorales, d'autres pourraient avoir l'effet inverse en limitant, par exemple, la prolifération cellulaire. Cette dualité serait aussi vraie pour les compartiments cellulaires stromaux (cellules immunitaires et fibroblastes notamment), ce qui fait du stroma un composant complexe mais ayant un rôle crucial dans le développement de tumeurs.

L'implication des protéines matricielles dans la carcinogenèse et la progression tumorale est donc aujourd'hui de plus en plus étudiée. Dans la famille des Ténascines, la TNC (et la TNW dans une moindre mesure) est maintenant reconnue comme marqueur de l'expansion tumorale et de l'invasion métastatique dans plusieurs types de cancers. En revanche, le statut et le rôle des autres Ténascines reste peu étudié.

Le statut de la TNX dans les cancers a été abordé dans une dizaine d'études, portant sur des tumeurs relativement rares, et reste controversé. En effet, entre les années 1995 et 2015, la TNX a été décrite comme sous-exprimée dans les astrocytomes de haut-grade, les tumeurs malignes des gaines nerveuses périphériques, les mélanomes ainsi que les léiomyomes. Il a également été démontré qu'elle était sous-exprimée suite à une transplantation de cellules de carcinome rénal, chez la souris. Cependant, deux études ont révélé une surexpression de TNX dans le mésothéliome malin ainsi que les tumeurs ovariennes.

Ces études antérieures, très éloignées méthodologiquement, ne supposaient pas une régulation commune de la TNX dans les différents tissus tumoraux étudiés, mais nous étions peu convaincus de la méthodologie employée dans certains articles, notamment celui abordant le cancer ovarien. L'expression opposée de TNX et TNC dans différents processus physiopathologiques tels que la cicatrisation, mais également dans l'étude sur le mélanome

nous laissait penser qu'une sous-expression de TNX pourrait se généraliser à de nombreux types de cancers dans lesquels la TNC est surexprimée. L'hypothèse posée ici était donc la régulation négative de la TNX dans la plupart des cancers, en opposition avec la TNC, et un potentiel rôle oncosuppresseur de la TNX.

Ainsi, notre première étude fut d'étudier le statut de la TNX dans les 6 cancers les plus incidents et mortels au monde, à savoir les cancers du poumon, du sein, de la prostate, du colon, du foie et de l'estomac. Nous avons ajouté à cette étude les cancers pour lesquels l'expression de la TNX avait été précédemment décrite afin d'en confirmer ou infirmer les résultats. Dans cet article, nous avons d'abord étudié le statut de la TNX au niveau ARNm, par des analyses bioinformatiques. Après une large recherche de données de microarray existantes dans la littérature, chaque ensemble de données a été analysé grâce à l'outil GEO2R (jeux de données G.E.O.). Ainsi, 5 à 15 jeux de données ont été analysés par localisation de cancer (tous types confondus), nous permettant d'avoir une vue globale de la régulation de l'expression du gène *TNXB* dans les tissus tumoraux étudiés. En outre, la base de données TCGA a été analysée grâce à l'outil en ligne UALCAN, nous permettant d'augmenter encore le nombre de cas analysés. Dans une deuxième partie, le statut de la TNX a été étudié au niveau protéique sur des Tissue Micro Array. La TNX a été détectée par immunohistochimie sur des tissus normaux et tumoraux des différents types de cancers préalablement étudiés *in silico*, et le marquage dans le stroma a été quantifié par analyse d'image et évalué par une anatomopathologiste.

Dans cette étude, nous avons observé une sous-expression significative de la TNX au cours de la progression tumorale de la plupart des cancers étudiés aux niveaux ARNm et protéine, à l'exception des tumeurs cérébrales, pour lesquelles nous avons trouvé une surexpression de la TNX. En outre, l'analyse des données cliniques de survie et d'avancement tumoral nous a permis de mettre en évidence qu'une expression plus forte du gène *TNXB* dans les tumeurs pulmonaires et du sein était associée à un meilleur pronostic pour les patients.

Ainsi, cette étude nous a permis de conclure à une régulation négative de la TNX dans une grande majorité de cancers, et notamment ceux à forte incidence et mortalité. Ce résultat ouvre la porte à une hypothèse intéressante quant au rôle que pourrait avoir la TNX dans le développement et/ou la progression tumorale.



Loss of Tenascin-X expression during tumor progression: A new pan-cancer marker

Sophie Liot^a, Alexandre Aubert^a, Valérie Hervieu^b, Naïma El Kholti^a,
Joost Schalkwijk^c, Bernard Verrier^a, Ulrich Valcourt^a and Elise Lambert^a

a - Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTI), UMR CNRS 5305, Université Lyon 1, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, 7, passage du Vercors, F-69367 Lyon Cedex 07, France

b - Service d'Anatomopathologie, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

c - Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Faculty of Medical Sciences, 370 Geert Grooteplein-Zuid 26 28, 6525 GA Nijmegen, Netherlands

Correspondence to Ulrich Valcourt and Elise Lambert: ulrich.valcourt@ibcp.fr, elise.lambert@ibcp.fr

<https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2020.100021>

Abstract

Cancer is a systemic disease involving multiple components produced from both tumor cells themselves and surrounding stromal cells. The pro- or anti-tumoral role of the stroma is still under debate. Indeed, it has long been considered the main physical barrier to the diffusion of chemotherapy by its dense and fibrous nature and its poor vascularization. However, in murine models, the depletion of fibroblasts, the main ExtraCellular Matrix (ECM)-producing cells, led to more aggressive tumors even though they were more susceptible to anti-angiogenic and immuno-modulators. Tenascin-C (TNC) is a multifunctional matricellular glycoprotein (*i.e.* an ECM protein also able to induce signaling pathway) and is considered as a marker of tumor expansion and metastasis. However, the status of other tenascin (TN) family members and particularly Tenascin-X (TNX) has been far less studied during this pathological process and is still controversial. Herein, through (1) *in silico* analyses of the Gene Expression Omnibus (GEO) and The Cancer Genome Atlas (TCGA) databases and (2) immunohistochemistry staining of Tissue MicroArrays (TMA), we performed a large and extensive study of TNX expression at both mRNA and protein levels (1) in the 6 cancers with the highest incidence and mortality in the world (*i.e.* lung, breast, colorectal, prostate, stomach and liver) and (2) in the cancers for which sparse data regarding TNX expression already exist in the literature. We thus demonstrated that, in most cancers, TNX expression is significantly downregulated during cancer progression and we also highlighted, when data were available, that high *TNXB* mRNA expression in cancer is correlated with a good survival prognosis.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

A normal tissue stroma is essential for the maintenance and the integrity of epithelial tissues and contains a multitude of cells (fibroblasts, immune and endothelial cells) that collaborate to sustain normal tissue homeostasis through direct cell-cell contacts, cell-ECM interactions or cytokine and matrikine release [1,2].

Tumor development is a multi-step process initially involving (1) chronic inflammation and viral and bacterial infections [3] and/or (2) the genetic alter-

ation of critical genes thus allowing the selection of the malignant cells with the highest proliferative potential [4]. The newly formed primary tumor then educates its surrounding environment thanks to (1) secretion of a broad range of cancer-derived factors and (2) specific stimuli, such as local hypoxia and oxidative stress, which thus enable the evolution of normal surrounding stroma into a Tumor MicroEnvironment (TME). This TME basically consists of (1) the nonmalignant cells of the tumor, such as Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs), specialized mesenchymal cell types distinctive to each tissue

0022-2836/© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

environment, innate and adaptive immune cells and vasculature with endothelial cells and pericytes and (2) a modified ECM [5–7]. During cancer progression, stroma thus dramatically evolves thanks to the proliferation of CAFs and the subsequent deposition of a dense ECM displaying a particular composition. This process, common to most carcinomas and known as desmoplastic reaction, allows the establishment of “the soil” favorable to tumor cell (“seed”) proliferation, invasion and metastasis [8–13].

Over the past decade, intense progress has been made on the knowledge of the TME and the tumor-stroma crosstalk and leads us to consider new prognostic tools or new therapeutic strategies aiming at a disruption of the dynamics of tumor-stroma interactions. One of the most promising strategies is to specifically target the CAFs of the TME. However, this approach is still in progress and faces different barriers in cancer mouse models and in clinical trials such as CAFs heterogeneity, multiple and sometimes opposite functions of the different CAF subpopulations, diversity of responses in the various studied carcinomas. Altogether, these issues thus underline the absolute requirement for a more in-depth and accurate knowledge of TME composition, function and evolution during cancer progression [14].

Normal ECM is a non-cellular three-dimensional macromolecular network composed of collagens, proteoglycans/glycosaminoglycans, elastin, fibronectin, laminins, and several other glycoproteins. This ECM is a highly dynamic structural network that continuously undergoes remodeling during normal and pathological conditions [15,16]. In the tumor context, various ECM proteins are particularly involved, notably (1) the Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Lysyl-Oxidase family members, which are able to degrade and remodel the pre-existing ECM and to initiate crosslinking of the newly synthesized matrix components and (2) the matricellular proteins, for their role as cell signaling initiator [17,18]. Among the matricellular proteins, Tenascin-C has been largely reported to be associated with cancer [19,20].

In mammals, the Tenascin (TN) family includes four members, called TNC, TNR, TNW, and TNX, all of them sharing a common molecular architecture: a N-terminal region that enables trimerization through coiled-coil interactions, followed by epidermal growth factor-like repeats, a series of fibronectin type III (FNIII) modules and a fibrinogen (FBG)-related domain at the C-terminal end. While TNX and TNR form tribrachions, TNC and TNW form hexabrachions thanks to N-terminal cysteines that can support the covalent linking of two trimers [21].

Each TN displays a unique spatio-temporal expression pattern. TNC, the first and the best described member of Tenascins, is widely expressed in the embryo at sites of epithelial-

mesenchymal interactions and around motile cells, including neural crest cells, migrating neuroblasts and glial precursors. It is also found at sites of branching morphogenesis and in developing smooth muscle, bone and cartilage. In the adult, TNC expression is restricted to few tissues exhibiting high tensile stress and in some stem cell niches [22,23]. However, TNC is known to be *de novo* expressed during pathological processes and is now considered as a classic marker of tumor progression [24]. Furthermore, its re-expression is correlated with poor prognosis in melanoma, colorectal, breast, oesophageal, prostate and gastric cancers [17,25–30]. In mammalian embryos, TNW is primarily expressed at sites of osteogenesis, whereas in adults, TNW is completely absent except in certain stem cell niches [31]. Interestingly, analyses of human biopsies revealed a prominent *de novo* expression in all tumors investigated. TNW is thus overexpressed in the tumor stroma of breast, colorectal, brain (oligodendroglioma, astrocytoma and glioblastoma), kidney (clear cell carcinoma, papillary carcinoma, chromophobe renal carcinoma, and oncocytoma), ovarian, prostate, pancreas, and lung cancers as well as in melanomas [31–35]. TNR expression pattern is almost exclusively located to the central nervous system but transiently appears also in Schwann cells during peripheral nerve development [36–40]. TNR is overexpressed in specific brain cancers, *i.e.* in pilocytic astrocytoma, oligodendroglioma and ganglioglioma, but not glioblastoma, suggesting that it could act as a suppressor of glioma invasion [41,42].

TNX protein, encoded by the *TNXB* gene, is ubiquitously expressed in the late, but not in the early, stages of embryonic development indicating that this glycoprotein is mainly involved in organogenesis [20,43,44]. In adult, TNX is ubiquitously expressed in connective tissues of a large variety of organs, where it has been shown to play a crucial role in the collagenous network assembly and organization [20,45]. Compared to the other tenascins, the status of TNX expression during cancer progression has been far less studied and is relatively controversial. Indeed, TNX expression has been described to be downregulated in the stroma of tumors formed following renal carcinoma cell transplantation [46], but also in high-grade astrocytomas [47], Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors (MPNST) [48], melanoma [49] and leiomyoma [50], but was shown to be up-regulated in malignant mesothelioma [51–53] and ovarian cancer [54].

Herein, we thus decided to perform a large meta-analysis to evaluate TNX expression during tumor progression and chose to focus on the 6 cancers with the highest incidence and mortality in the world, *i.e.* lung, breast, colorectal, prostate, stomach and liver carcinoma (Table 1 - Globocan 2018 - <http://>

Table 1. New cases and deaths for the selected cancers in 2018

Cancer site	New Cases		Deaths	
	Rank	No. of cases (% of all sites)	Rank	No. of cases (% of all sites)
Lung	1	2,093,876 (11.6)	1	1,761,007 (18.4)
Breast	2	2,088,849 (11.6)	4	626,679 (6.6)
Prostate	3	1,276,106 (7.1)	8	358,989 (3.8)
Colon	4	1,096,601 (6.1)	5	551,269 (5.8)
Stomach	5	1,033,701 (5.7)	2	782,685 (8.2)
Liver	6	841,080 (4.7)	3	781,631 (8.2)
Kidney	15	403,262 (2.2)	17	175,098 (1.8)
Brain, Nervous System	18	296,851 (1.6)	13	241,037 (2.5)
Ovary	19	295,414 (1.6)	15	184,799 (1.9)
Skin (melanoma)	20	287,723 (1.6)	24	60,712 (0.6)
Mesothelium (pleura)	34	30,443 (0.2)	29	25,576 (0.3)

gco.iarc.fr). Additionally, we included in our meta-analysis the 7 specific types of cancer already described in the literature to further validate our study and clarify previously published data performed with a low number of samples or restrictive datasets. We thus analyzed *TNX* expression in 13 types of cancer compared to normal equivalent tissues at the mRNA and protein levels (Table 1). *TNXB* mRNA expression was evaluated (1) by dissecting 90 GSE datasets from the Gene Expression Omnibus (GEO) database and (2) by using the UALCAN interactive web-portal to perform in-depth analyses of TCGA gene expression data [55]. In parallel, *TNX* expression was evaluated at the protein level on a pan-cancer Tissue MicroArray by immunohistochemistry followed by a quantitative imaging analysis and a blind scoring by an anatomopathologist.

Collectively, our results demonstrated (1) *TNX* is downregulated in most cancers, except gliomas, and (2) high *TNXB* mRNA expression in tumoral samples is correlated with a good survival prognosis in the 2 cancers with the highest incidence and mortality worldwide, *i.e.* breast and lung carcinomas, thus demonstrating that *TNX* could be used as a new diagnosis and prognosis marker of cancer.

Results

TNXB mRNA expression is mainly downregulated during carcinogenesis

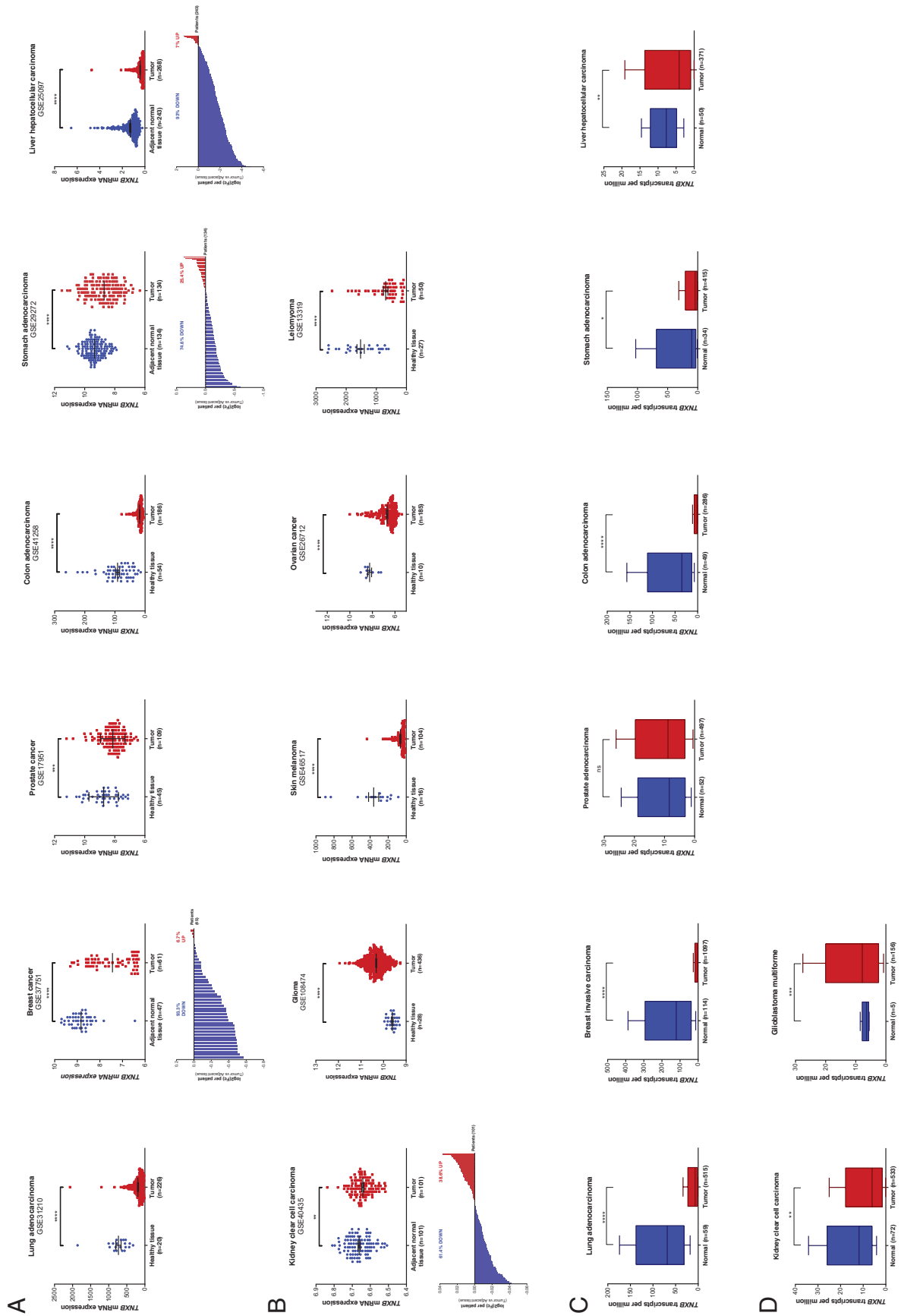
The aim of our study was to determine whether *TNX* mRNA and protein levels were significantly dysregulated in various cancer types compared to normal tissues (Table 1). For gene expression analysis, we focused on two databases: (1) The Gene Expression Omnibus (GEO) database, which is a public functional genomics data repository, and (2) The Cancer Genome Atlas (TCGA), this latter being analyzed through UALCAN, an integrated data-mining platform to harness the potential of

cancer transcriptome [55]. For the GEO database analyses, we performed a pre-screening of all the published datasets and only listed the most recent ones (from 2009) by excluding the datasets without healthy controls. To avoid interpatient variability, when possible, we chose the datasets with adjacent control tissues except for the prostate carcinoma, for which it is clearly established that the gene expression pattern in tissues adjacent to prostate cancer is so substantially altered that it resembles a cancer field effect [56]. For malignant mesothelioma, we only focused on malignant pleural mesothelioma, since this specific neoplasia (1) accounts for 80–90% of all diagnosed cases and (2) was the subject of a previously published study [53]. Furthermore, we only selected the datasets with pleura as normal samples to perform a proper comparison between normal and tumoral tissues. Finally, for dataset selection, we excluded datasets with low number of samples (<20 normal or tumoral cases) except for rare carcinomas, for which datasets with high number of normal samples were not available, *i.e.* MPNST, skin melanoma, ovarian cancer and malignant mesothelioma (Supplementary data S1).

Therefore, we investigated 90 GSE datasets for the 13 selected types of cancer (Table 1) and an overall analysis showed *TNXB* gene was

Table 2. Summary of the analyzed G.E.O datasets.

Cancer site	Nb of datasets	Variation		
		DOWN	UP	ns
Lung	13	11	0	2
Breast	7	7	0	0
Prostate	2	2	0	0
Colon	15	11	1	3
Stomach	14	9	0	5
Liver	10	6	0	4
Kidney	7	6	0	1
Cerebrum (glioma)	2	0	2	0
Ovary	10	9	0	1
Skin (melanoma)	3	3	0	0
Uterus (leiomyoma)	2	2	0	0
Pleura (mesothelium)	3	1	0	2
Peripheral nerve sheath	2	0	0	2
TOTAL	90	67	3	20
% of datasets		74.44	3.33	22.22



significantly downregulated for 67 of them (74.4%), upregulated for 3 of them (3.3%) and not significantly altered in 20 of them (22.2%) (Table 2 and Supplementary data S1). For each cancer, we next analyzed the pre-screened datasets and evaluated the number of datasets for which *TNXB* mRNA expression was significantly up- or down-regulated. We then established the regulation trend for *TNXB* mRNA expression and chose the most representative dataset for each cancer with the highest number of samples by selecting the dataset with clinical data when available (Supplementary data S1). In all the selected cancers with the highest incidence and mortality worldwide, we thus clearly observed a significant downregulation of *TNXB* gene expression. Indeed, compared to normal tissues, we found a 78.5% decrease of *TNXB* mRNA expression in lung cancer, 15.8% in breast, 7.2% in prostate, 81.2% in colorectal, 6.8% in gastric and 71.4% in liver carcinomas (Fig. 1A). *TNXB* gene expression was also significantly downregulated in kidney clear cell carcinoma (−0.30%) and leiomyoma (−63.4%) (Fig. 1B). For skin melanoma and ovarian cancer, we also concluded that *TNXB* mRNA expression was downregulated during cancer progression of 85.6% and 23.8% respectively, even if the initial fixed cut-off of 20 control or tumoral samples was not reached (Fig. 1B). We could not conclude regarding the status of *TNXB* gene expression in MPNST and malignant mesothelioma due to the very low number of normal tissue samples (≤ 5 samples) (Supplementary data S1 – MPNST and Malignant Mesothelioma). Finally, *TNXB* expression was unexpectedly upregulated by 7.5% in glioma compared to healthy controls (Fig. 1B). As mentioned previously, when available, we selected datasets with adjacent normal tissues as controls to exclude inter-individual variability. We were thus able to demonstrate a downregulation of *TNXB* mRNA expression in tumoral sample compared to adjacent normal tissue for patients suffering of breast cancer (in 93.3% of analyzed patients), stomach adenocarcinoma (74.6%), liver hepatocellular carcinoma (93%) and kidney clear cell carcinoma (61.4%) (Fig. 1A and B, lower bar charts). For datasets for which clinical information were available, we have also analyzed more precisely *TNXB* expression status in various clinical subgroups referring to (1) classical mutation

status (ALK fusion, EGFR and KRAS mutations) or the Myc oncogene expression status in lung adenocarcinoma, (2) the breast cancer subtypes (Estrogen Receptor positive or negative carcinoma; Triple negative carcinoma or other subtypes), (3) p53 mutation status in colon adenocarcinoma or to (4) the various subtypes of glioma (astrocytoma, glioblastoma multiforme and oligodendroglioma) (Supplementary Fig. S2A). We thus demonstrated that *TNXB* expression was downregulated in all subgroups of lung, breast and colon carcinomas compared to the group composed of equivalent healthy tissues and we definitively showed that *TNXB* mRNA level was upregulated in all glioma subtypes compared to equivalent normal samples (Supplementary Fig. S2A).

To validate our results obtained through GEO database analyses, we also studied The Cancer Genome Atlas database through the UALCAN web-portal [55]. TCGA only focuses on 33 selected types of cancer, explaining why information were absent for leiomyoma and MPNST. Additionally, we could not conclude for ovarian carcinoma, malignant mesothelioma and skin melanoma because, in TCGA database, no or only one normal sample was available. However, this database allowed us to show that *TNXB* mRNA expression was downregulated in lung (−89.9%), breast (−96.4%), colon (−94.8%), stomach (−56.1%), liver (−46%) and renal (−48.7%) carcinomas (Fig. 1C and D), thus confirming the results obtained from the GEO database. Nevertheless, *TNXB* mRNA level was not significantly regulated in prostate adenocarcinoma compared to normal tissue (Fig. 1C). Once again, *TNXB* expression was upregulated (+21.3%) in glioblastoma multiforme compared to normal samples (Fig. 1D), in contrast to previously published data [47]. Altogether, this extensive *in silico* analysis enabled us to demonstrate that *TNXB* expression was downregulated in most analyzed cancers except in brain tumors where it was upregulated.

***TNXB* downregulation in cancer is confirmed at the protein level**

We next studied *TNX* protein level through analysis of a pan-cancer TMA following

Fig. 1. Variation of *TNXB* mRNA expression in tumors versus normal or adjacent tissues. Cancers of high incidence/mortality were studied (A and C), as well as cancers for which *TNX* status had been previously studied (B and D). A and B: Expression values of *TNXB* mRNA obtained from the selected datasets extracted from the GEO database. Non-parametric paired (breast, stomach, liver, and kidney cancers) and unpaired (lung, prostate, colon, glioma, ovary, melanoma and leiomyoma cancers) tests were performed comparing tumoral to normal tissues. For datasets comparing *TNXB* mRNA expression in tumoral sample versus adjacent normal tissue, a bar chart is presented just below the first graphical representation. Each bar corresponds to a patient and is either blue, when *TNXB* mRNA expression is downregulated in tumoral sample or red, when *TNXB* expression is upregulated. C and D: Expression data and associated p-values extracted from the UALCAN web-portal. Numbers of tumoral and control samples for each dataset are indicated. ***p < 0.0001; **p < 0.001; *p < 0.01 and *p < 0.05.

immunohistochemistry and quantitative staining analysis or through blind scoring by an anatomopathologist. This pan-cancer array comprised at least 8 healthy tissues and 20 tumoral samples for each type of analyzed cancers, except for malignant mesothelioma. For this specific cancer, we used a malignant mesothelioma Tissue MicroArray, which was the only commercial array available with equivalent healthy tissue samples. Prior to the experiment, four different TNX antibodies raised against the C-terminal region of the human TNX were assessed on human skin sections: two commercially available (sc-271594, clone F11, from Santa Cruz and AF6999 from R&D systems) and two home-made antibodies (kindly provided by Joost SCHALKWIJK and Manuel KOCH) (Supplementary Fig. S3A). All antibodies, except the one from R&D systems, showed a similar and specific staining of TNX in the dermis of healthy donors, as expected [57] (Supplementary Fig. S3B). We selected the clone F11 from Santa Cruz (sc-271594), which (1) demonstrated the strongest staining in the dermis of healthy donor with no background in the epidermis (Supplementary Fig. S3B) and (2) led to no staining on skin sections of patient suffering of classical-like Ehlers-Danlos syndrome (EDS due to TNX deficiency) (Supplementary Fig. S3C). This mouse monoclonal antibody is specific for a short epitope (14 amino-acids) mapping the fibrinogen-related domain at the C-terminus of human TNX and does not cross-react with the FBG domain of other TN family members (data not shown).

As expected, TNX was immunodetected in the ECM of normal samples. A stroma-specific quantification of TNX labelling using Fiji software was performed (Supplementary Fig. S4). In order to overcome the histological heterogeneity of cancers and origin of tissues, we repeated the segmentation training for each tissue spot. We thus demonstrated that TNX protein level was significantly decreased in the stroma of lung, breast, prostate, colon, liver, kidney and uterus carcinomas as well as in skin melanoma, compared to equivalent normal tissues (Fig. 2A and B). The downregulation was not significant for ovary carcinoma due to 3 highly positive tumor samples, whereas the others were definitely negative for TNX labelling (Fig. 2A and B and Supplementary Fig. S5). For malignant pleura mesothelioma, a decrease in TNX level was also observed, however statistical analysis could not be performed due to the very low number of samples available. For stomach adenocarcinoma, a non-significant upregulation was observed compared to equivalent normal samples, which was at odds with the results obtained through the GEO and TCGA database analyses. Furthermore, and as already deduced through GEO and TCGA database analyses, TNX protein level was significantly upregulated in gliomas compared to equivalent healthy samples

(Fig. 2A and B). Finally, we confirmed that TNX protein level in tumoral samples was observed regardless of the subtype of analyzed cancer (Supplementary Fig. S2B). All tissue core quantifications were confirmed through blind scoring by a clinical anatomopathologist (Fig. 2C), thus definitely demonstrating that TNX protein level is markedly diminished in most of the analyzed cancers.

TNXB mRNA expression is correlated with tumor progression and should be considered as a new prognosis marker in cancer

As mentioned above, for the GEO dataset selection, we chose, when available, datasets associated with clinical data, *i.e.* grade/stage and survival. We first studied *TNXB* expression levels in the various clinical stages or grades of cancer development. Therefore, we demonstrated that the decrease in *TNXB* expression observed in lung and breast carcinomas is all the more important that the stage of tumor development is advanced (Fig. 3A and B). Inversely, *TNXB* expression levels increased concomitantly with the grade of glioma (Fig. 3C).

Datasets for lung and breast carcinomas also presented clinical survival information. We thus analyzed the expression of *TNXB* mRNA in tumoral samples and established *TNXB*^{low} and *TNXB*^{high} expression subgroups by median cut-off on *TNXB* expression values, meaning that the 50% of patients with lowest expression values were considered as "*TNXB*^{low}" and the 50% of patients with highest expression values were considered as "*TNXB*^{high}". Therefore, we demonstrated that the percentage of patient survival is significantly higher in *TNXB*^{high} subgroups compared to *TNXB*^{low} subgroups for lung adenocarcinoma ($p = 0.0014$, Fig. 3D) and for breast carcinoma ($p = 0.0234$, Fig. 3E).

Altogether, these data clearly demonstrated that *TNXB* expression is correlated with tumor progression and that high level of *TNXB* mRNA is a good survival marker in carcinomas and could thus be used as a novel survival prognosis marker.

Discussion

Through *in silico* analysis of expression data and immunohistological approaches, we demonstrated TNX mRNA and protein levels are downregulated in most cancers, except for glioma where TNX expression is upregulated (Table 3). In this study, we only focused on the 6 cancers with the highest incidence and mortality worldwide and the 7 cancers already described for TNX expression. However, the pan-cancer TMA we immunostained also contained other types of cancer (such as bladder, uterus, head and neck carcinomas) and a simple microscopic observation of the TNX staining enabled us to confirm that our results

can be generalized to most cancers (Supplementary Fig. S5), suggesting that TNX is a good pan-cancer marker. Furthermore, we performed equivalent *in silico* analyses focusing on *TNC* and *TNW* genes and we definitely confirmed that TNX presented a particular interest as prognosis and diagnosis marker among TN family (Supplementary Figs. S6 and S7). This discovery could be of great importance since even MMPs that are known to be regulated during tumor progression can hardly be considered as pan-

cancer markers [58]. Our results are reinforced by the data recently published by Chakravarthy et al., in which they examined TCGA database and analyzed the pan-cancer landscape of ECM gene dysregulation in 8043 malignant tissues from 15 different tumor types and 704 corresponding normal tissues. In this study, 58 out of the 249 ECM genes represented in the RNA-seq dataset were significantly dysregulated; 30 of them were upregulated and 28 of them were downregulated. Interestingly,

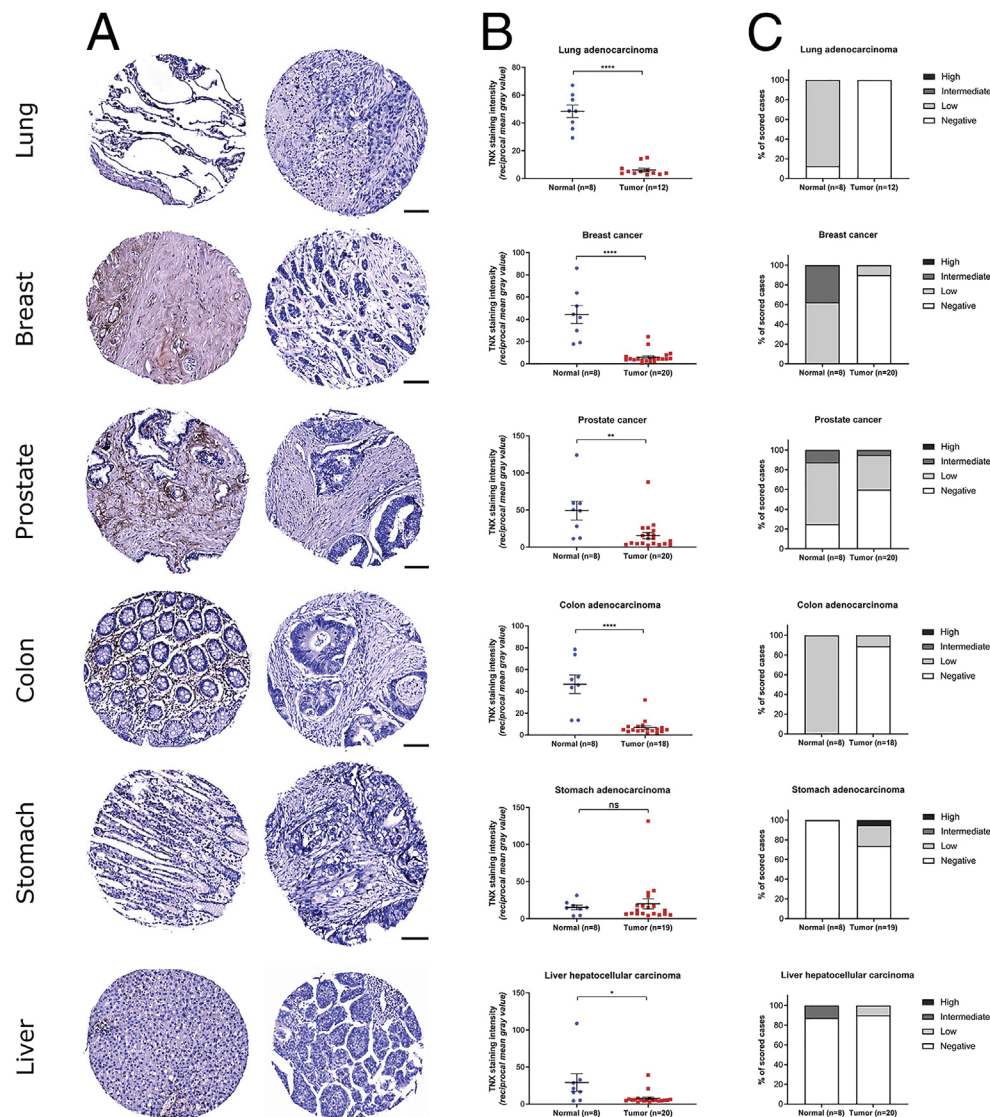


Fig. 2. TNX protein level in tumoral versus normal tissues. Cancers of high incidence/mortality were studied (upper part), as well as cancers for which TNX status was previously studied (lower part) thanks to TNX immunolabelling of tissue sections on Tissue MicroArray slides (#MC6163 and #T392a). A: Representative cores of normal (left) and tumoral (right) tissues. Scale bar = 100 μ m. B: Quantification of stromal TNX staining intensity. A segmentation between stromal and epithelial areas was performed, followed by measurement of reciprocal mean grey value (staining intensity) in the stromal area. Segmentation training was newly performed for each spot. Mann-Whitney test was performed between normal and tumoral conditions (**** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$). C: Clinical sample scoring. Staining was blindly scored according to 4 categories: negative, low, intermediate and high. Results are presented as percentage of total cores for each cancer type.

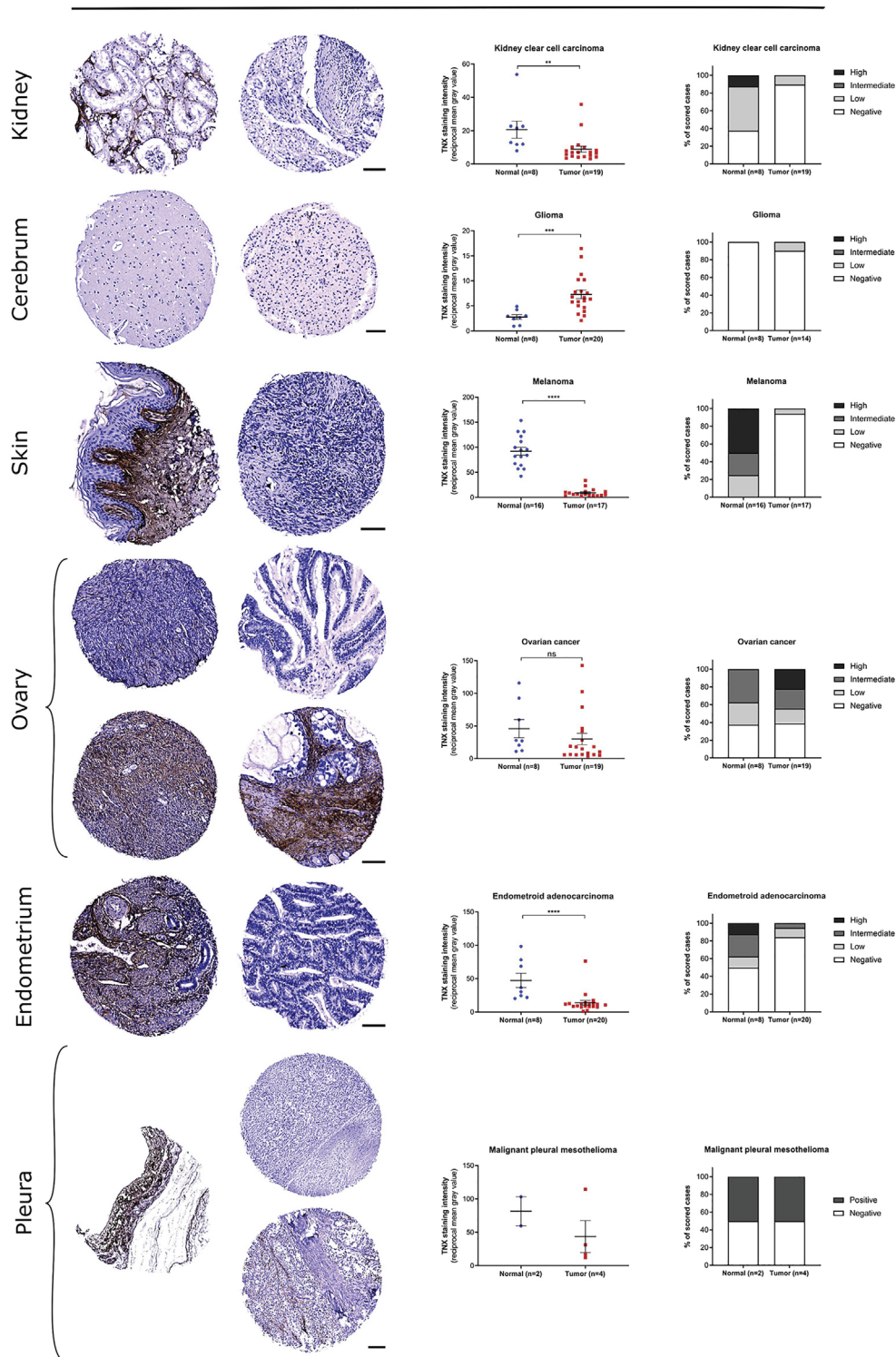


Fig. 2. (continued).

the gene which was the most significantly downregulated in cancers, was *TNXB* [59].

Obviously, this large study also leads to many questions and notably regarding the relevance of

TNX regulation in all subtypes of cancers but we demonstrate when data were available that, except for gliomas in which TNX was inversely regulated, all subtypes of analyzed cancers presented a *TNXB*

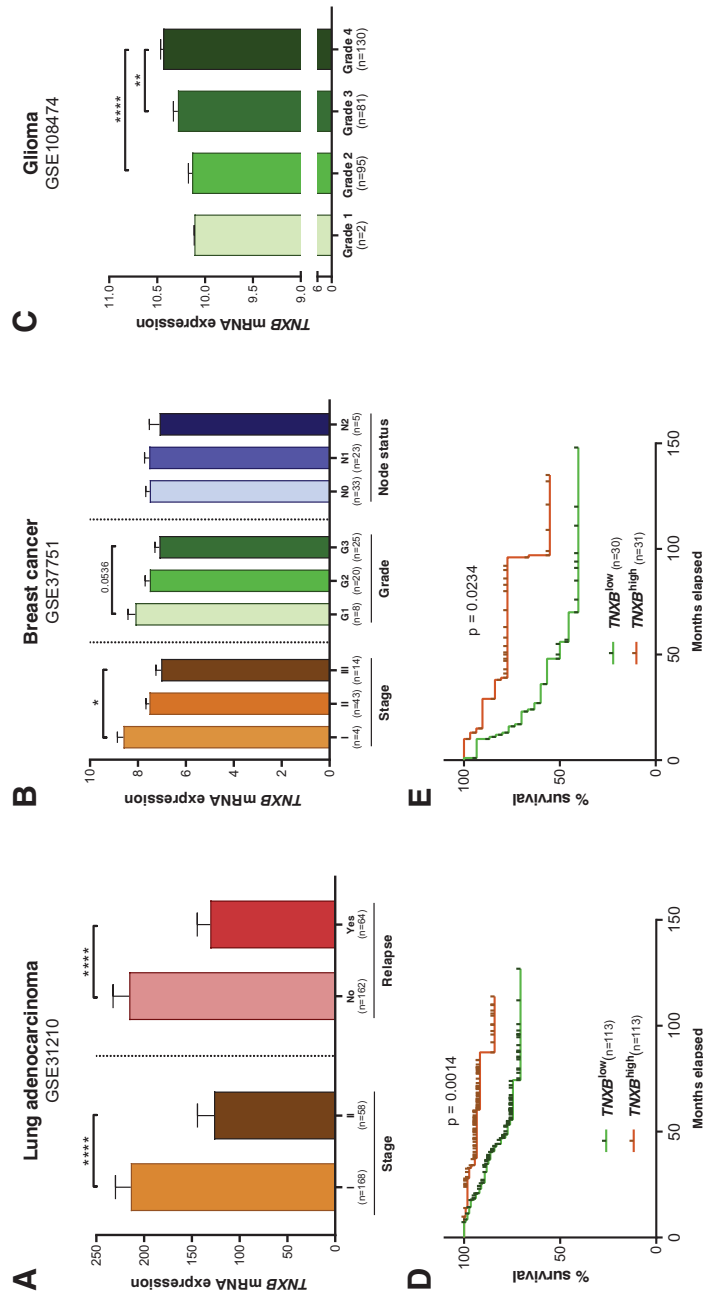


Fig. 3. Prognosis according to TNXB expression level in tumors. TNXB mRNA levels at various stages or grades of tumor progression in lung adenocarcinoma (A), breast cancer (B) and glioma (C). Comparison of survival probability of patients with TNXB^{low} versus TNXB^{high} mRNA expression in lung (D) and breast (E) tumors by Kaplan–Meier method. Groups were delimited by median cut-off according to TNXB expression values in tumoral samples.

Table 3. Outcomes of the study.

Cancer type	Literature	Bioinformatics analyses		Tissue MicroArray analysis	
		G.E.O. results	UALCAN results	TMA quantification	Clinical scoring
Lung adenocarcinoma	[Grey box]	Down regulation	Down regulation	Down regulation	Down regulation
Breast cancer		Down regulation	Down regulation	Down regulation	Down regulation
Prostate cancer		Down regulation	Down regulation	Down regulation	Down regulation tendency
Colon adenocarcinoma		Down regulation	Down regulation	Down regulation	Down regulation
Stomach adenocarcinoma		Down regulation	Down regulation	Down regulation	Up regulation tendency
Liver hepatocellular carcinoma		Down regulation	Down regulation	Down regulation	Down regulation
Kidney clear cell carcinoma	Down regulation	Down regulation	Down regulation	Down regulation	Down regulation
Glioma	Up regulation	Up regulation	Up regulation	Up regulation	Up regulation
Ovarian cancer	Up regulation	Down regulation	No data available	Down regulation	Up regulation tendency
Melanoma of skin	Down regulation	Down regulation	No data available	Down regulation	Down regulation
Leiomyoma	Down regulation	Down regulation	No data available	Down regulation	Down regulation
Malignant mesothelioma	Up regulation	No data available	No data available	No data available	No data available
Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor	Down regulation	No data available	No data available	No data available	No data available

Down regulation
 Down regulation tendency
 Up regulation
 Up regulation tendency
 Non significant
 No data available

repression (Supplementary Fig. S2). However, a fine analysis of TNX expression in all subtypes of all cancers has to be realized.

Moreover, whereas the downregulation of TNX mRNA and protein levels was robustly observed in most cancers, we also noted some discrepancies between gene and protein expressions in our analyses, as well as with results reported in the literature, as discussed hereafter (Table 3). Indeed, when analyzed in detail, we could observe that for the *in silico* analysis of prostate cancer dataset from TCGA using UALCAN webportal, *TNXB* mRNA expression was not significantly regulated. However, as previously described for the prostate carcinoma, the gene expression pattern in tissues adjacent to prostate cancer is so substantially altered that it resembles a neoplastic tissue [56]. And in fact, control tissues for prostate cancer in TCGA dataset included tumor-adjacent tissues which could lead to misinterpretation [60]. Our hypothesis that TNX is diminished in prostate cancer is strengthened by the fact that we observed (1) a significant *TNXB* downregulation in prostate carcinoma through the 2 GEO dataset analyzed and (2) a robust decrease of TNX immunostaining in 20 tumors compared to 8 normal samples. Additionally, we are particularly confident in the non-tumoral origin of the “normal tissues” in our pan-cancer TMA since they were collected from healthy patients between 30 and 40-year-old and the average age at which prostate cancer is diagnosed is 73-year-old (<http://gco.iarc.fr/>).

For stomach adenocarcinoma, our results showed *TNXB* mRNA expression was significantly downregulated, whereas TNX protein detection by immunohistochemistry revealed an upregulation trend even if it was not significant. The stomach is composed of three anatomical regions: (1) the cardiac, which contains mucous secreting glands (called cardiac glands) and is closest to the oesophagus, (2) the fundus (corpus), the body or largest part of the stomach which contains the gastric (fundic) glands and (3) the pyloric, which secretes the gastrin hormone and two types of mucus. Clinicopathological and molecular analyses have evidenced the diversity of gastric carcinoma and led researchers to classify gastric carcinomas in three subgroups according to their location for appropriate management [61]. In the used TMA, localization of tumor and normal samples has not been specified. However, a detailed histological analysis allowed us to conclude that most healthy samples could correspond to the fundus which is known by anatomopathologists to be particularly reactive to unspecific immunostainings (and were scored as negative by our specialist). Thus, our interpretation could be biased by the origin and unspecific immunoreactivity of the samples and we could not conclude for TNX protein regulation during stomach adenocarcinoma formation.

In this report, we definitely demonstrated that TNX mRNA and protein levels were significantly upregulated in brain cancer. This result is particularly surprising since TNX is downregulated in the other analyzed

cancer types. However, we confirmed the significant upregulation of *TNXB* gene in various glioma subtypes (astrocytoma, glioblastoma multiforme and oligodendroglioma). In brain, the ECM is unique both in its composition and functions. Indeed, in contrast to other tissues, the ECM of the central nervous system lacks fibrous proteins under normal conditions and is enriched in glycoproteins and proteoglycans [62]. We can therefore assume that TNX is differently regulated in this particular tissue during pathological context and notably during tumor progression.

Kramer and colleagues have shown, through TNX immunodetection using AF6999 antibody, that TNX was upregulated in ovary cancer [54]. However, in our hands, this antibody gave unspecific results in the epidermis of human skin and still stained the dermis of TNX-deficient patients (Supplementary Fig. S3). Additionally, our GEO dataset analysis demonstrated that 7 over the 8 selected datasets presented a significant downregulation of *TNXB* during ovarian carcinoma and results for the remaining dataset were not significant (Supplementary data S1). Therefore, our analysis of curated datasets is definitely at odds with the published data. Though, it has to be noted that results obtained through TNX immunohistochemistry on TMA were less clearcut. Indeed, TNX protein expression was predominantly downregulated in most ovarian cancers (16 samples) compared to normal tissues (8 samples), whereas it was drastically upregulated in 3 tumoral samples (Fig. 2). Ovarian cancers can be classified in 5 major clinicopathologically distinct entities: endometrioid carcinoma, clear cell carcinoma, mucinous carcinoma, low-grade serous carcinoma and high-grade serous carcinoma [63]. The 3 TNX-overexpressing tumor samples corresponded to mucinous adenocarcinoma (2 positive cores/11 mucinous adenocarcinomas) and high-grade serous carcinoma (1 positive core/9 high grade serous carcinomas), so we could not attribute this sporadic TNX upregulation to a specific ovary cancer subtype. The ovary tumoral tissues present distinct biological and molecular properties (even within the same histological subtype) demonstrating the complexity of the disease [64] and the need for further investigations regarding TNX protein levels in this particular cancer.

Malignant mesothelioma is a rare disease and among the various forms, the pleural mesothelioma develops in the pleura, a thin membrane of cells lining the lungs and the chest wall. TNX has been shown to be highly expressed in malignant mesothelioma compared to other cancers involving the serosal cavities [51,52]. However, in those studies, no healthy tissue has been analyzed. In contrast, in a very recent study, Nayakama and collaborators have demonstrated that *TNXB* gene expression was upregulated in malignant pleural mesothelioma compared to healthy adjacent tissue using the GSE51024 dataset from GEO database. However, in this study normal paired lung parenchyma was

used as control tissue but does not correspond to equivalent healthy tissue to malignant pleural mesothelioma and is therefore in our view hardly comparable [53]. In the GEO database, no dataset was available with sufficient number of equivalent normal tissues. However, we decided to analyze datasets with low number of proper normal tissue (pleura) but could not demonstrate a regulation of *TNXB* expression with certainty.

A very low number of normal and tumoral samples were also present in the MPNST datasets from GEO and no TMA was available for this specific cancer thus unabling us to conclude for this rare disease.

In this report, we demonstrated *TNXB* mRNA and TNX protein levels were concomitantly and significantly downregulated in various types of cancer, which raises the question of the mechanism(s) leading to the downregulation of *TNXB* gene expression in this pathological context. Very few data are currently available regarding *TNXB* gene regulation. Unlike for the other tenascins, there are so far no report indicating that *TNXB* is regulated by growth factors or cytokines. However, like *TNC* and *TNW*, *TNXB* is subjected to negative regulation by glucocorticoids [40,46,65]. Nevertheless, through GSE dataset analysis, we could not find an upregulation of glucocorticoid receptor (*NR3C1*) mRNA level concomitant with *TNXB* mRNA downregulation. Additionally, assuming that during cancer progression, *TNXB* is regulated in an opposite way compared to *TNC*, this hypothesis is ruled out.

In the human genome, *TNXB* transcription can be initiated from 3 different widely separated promoters [66]. However, only one of the 3 promoters was shown to be the main control region for *TNXB* transcription in all tissues tested and its analysis revealed several putative binding sites for Sp1/Sp3 transcription factors. A cluster of 5 sites close to the Transcription Start Sites (TSSs) was proven to be functional and required for driving *TNXB* expression in fibroblasts [40,66,67]. Another promoter and TSS within the *TNXB* gene were described. This promoter was shown to be activated by hypoxia and subsequent histone deacetylase 1 (HDAC1) dissociation from Sp1/HDAC1 complex [68] resulting in a transcript encoding an N-terminally truncated and shorter TNXB (TNXB-S) protein with cytoplasmic localization [69]. However, the physiological significance of hypoxia-induced expression of *TNXB-S* gene has not yet been understood. Hypoxia corresponds to a non-physiological level of oxygen tension, a phenomenon common in a majority of malignant tumors. We could thus hypothesize that under hypoxic conditions the short TNXB (TNXB-S) protein is favoured at the expense of the long form and that HDAC1 is involved in this process. By analyzing the GEO datasets used for *TNXB* mRNA expression (GSE31210 for lung cancer and GSE37751 for breast cancer), we demonstrated that *HDAC1* mRNA expression was significantly upregulated in lung (Fc = 0.401; p =

$1.30 \cdot 10^{-4}$) and breast ($F_c = 0.457$; $p = 4.90 \cdot 10^{-6}$) carcinomas compared to non-tumoral tissues. To definitely validate our hypothesis, it will be important to analyze the level of TNXB-S protein in tumor samples through the specific antibodies raised against the truncated TNXB (anti-h29 and anti-h30 antibodies developed by Endo et al. [69]).

A number of long non-coding RNAs (lncRNAs) have been shown to play significant roles in the pathogenesis of several cancers including colorectal, kidney and breast cancers [70–72]. Through bioinformatics analysis, Yan and colleagues demonstrated that the lncRNA LINC01305 was the most overexpressed lncRNAs in cervical cancer and that *TNXB* was a target gene of LINC01305. Additionally, an upregulation of LINC01305 in cervical cancer cell lines was observed concomitantly with a downregulation of TNX [73]. In the pan-cancer TMA we used, we also detected lower TNX protein levels in cervical cancer samples compared to adjacent normal cervix tissues (Supplementary Fig. S5). The correlation between *LINC01350* and *TNXB* expressions in cervical cancer prompted us to analyze *LINC01350* expression in our selected GSE datasets where *TNXB* was downregulated, but this link could not be generalized to the other analyzed cancers (data not shown). However, we cannot exclude that other lncRNAs could be responsible for *TNXB* downregulation in cancers and this last hypothesis thus requires further investigations.

Very interestingly, Yan and colleagues also demonstrated that *TNXB* overexpression led to (1) MMP2, MMP9 and vimentin downregulations at both mRNA and protein levels and (2) cervical cancer cell line migration and invasion decreases [73]. These results thus suggest that high *TNXB* expression could limit metastasis formation and thus could be a good prognosis factor during cancer progression. Indeed, in our study, we observed that high *TNXB* expression is correlated with a good survival rate in breast and lung carcinomas. The link between the expressions of TNX protein and gelatinases (MMP-2 and -9) and tumor progression has also been largely described by the group of Matsumoto [74–76]. In our study, a significant upregulation of *MMP9* gene was observed concomitantly with *TNXB* downregulation in most analyzed carcinomas (data not shown) thus suggesting that reinducing *TNXB* expression could be a good pan-cancer therapeutic strategy.

Experimental procedures

In silico analyses

Microarray datasets were selected from the NCBI GEO database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>).

Results were filtered by date and number of samples.

For all datasets, differentially expressed genes (D.E.G.) between cancer and normal tissues were obtained thanks to GEO2R analysis tool which compares both groups using limma (Linear Models for Microarray Analysis) R package (Bayesian statistics). D.E.G. were determined by Benjamini & Hochberg (False discovery rate) adjusted p -value < 0.05 . Then, representative datasets were selected according to the criteria cited in the “Results” section. For those datasets, *TNXB* expression values were extracted from GEO and plotted. Comparisons between tumoral and non-tumoral tissues were performed using non-parametric paired (Mann-Whitney, when non-tumoral samples were adjacent tissues) or unpaired (Wilcoxon, when non-tumoral samples were healthy tissues) statistical tests. TCGA data were analyzed through UALCAN web-portal and results for *TNXB* gene expression were extracted as presented in the website.

To study *TNXB* mRNA expression during tumor progression, patients were separated depending on their tumor stage or grade and the mean *TNXB* expression value of each group was plotted. Groups were then compared using non-parametric one-way ANOVA (Kruskal-Wallis test) followed by Dunn's multiple comparison test.

Finally, patient survival was studied using datasets containing clinical data. Tumor samples were separated in 2 groups (*TNXB^{low}* and *TNXB^{high}*) by median cut-off on the *TNXB* expression values (50% of patients with the lowest values = *TNXB^{low}*, 50% with the highest values = *TNXB^{high}*). Cumulative survival proportions were estimated using the Kaplan–Meier method and *TNXB^{low}* and *TNXB^{high}* groups were compared thanks to Log-Rank (Mantel-Cox) statistical test.

Immunohistochemistry

TNX immunostaining was performed following a classical protocol. Briefly, after deparaffinization and rehydration, epitopes retrieval step was performed in sodium citrate buffer pH 6 for 20 min at 98 °C. Endogenous peroxidases were then quenched by 3% H₂O₂ (v/v) in phosphate Buffered Saline (PBS) and non-specific sites were blocked with 2.5% (v/v) normal horse serum in Tris-buffered saline (TBS). TNX primary antibodies were incubated in blocking solution overnight at 4 °C and biotinylated secondary antibodies were incubated 30 min at room temperature. Revelation was performed using ABC Reagent and 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) chromogen (R.T.U. Vectastain Universal Elite ABC Kit from Vector Laboratories, PK-7200), as recommended by the manufacturer, and nuclei were counterstained using Gill's hematoxylin.

TNX labelling was first assessed on human skin sections with different antibodies (sc-271594 (1/100) from Santa Cruz, AF6999 (1/100) from R&D Systems and two home-made antibodies provided by Joost SCHALKWIJK (1/100) and Manuel KOCH (1/1000)) (Supplementary Fig. S3), and sc-271,594 antibody (Santa Cruz, clone F11; 1/100) was then used to immunostain sections on two commercially available Tissue MicroArray (TMA) slides from US BioMax, Inc.: (1) *High-density multiple organ tumor and normal tissue array, including pathology grade, TNM and clinical stage*, 616 cases/616 cores (#MC6163) and (2) *Malignant mesothelioma with pleura tissue microarray, containing 4 cases of malignant mesothelioma, 2 pleura tissue* (#T392a). After TNX labelling, tissue cores were scanned using AxioScan.Z1 microscope (Zeiss). Each imaged spot was extracted by QuPath software (<https://qupath.github.io/>) and analyzed using Fiji software (<https://fiji.sc/>). Stromal and epithelial areas were separated thanks to Fiji Trainable Weka Segmentation plugin (https://imagej.net/Trainable_Weka_Segmentation). The segmentation training was newly performed for each tissue spot because of histological differences between the various analyzed organs and between tumoral and normal samples. Colors were then separated by “H DAB” Colour Deconvolution and DAB staining was quantified in stromal region (mean grey value). Reciprocal mean grey value (255 - mean grey value) was considered, as LookUp Table (LUT) is inverted in Fiji software. An example of the quantification process is shown in Supplementary Fig. S4. Tumoral and normal tissues were compared by non-parametric unpaired (Mann-Whitney) test. Additionally, TNX protein staining intensity was evaluated blindly by an anatomopathologist (Dr. Valérie HERVIEU, France).

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 software. Data were presented as mean \pm SEM. Groups were compared as explained in the previous sub-sections. p-Values < 0.05 were considered significant (****p < 0.0001 ; ***p < 0.001 ; **p < 0.01 and *p < 0.05). TCGA data statistics were calculated by the UALCAN web-portal.

Acknowledgments

We acknowledge the contribution of Federative Structure of Health Research Lyon-Est CNRS UMS3453/INSERM US7 and particularly Denis RESSNIKOFF from the microscopy platform (CIQLE) for his advice regarding TMA scanning and imaging analysis. Additionally, we greatly thank members of the histology and imaging facility

(PrImaTiss) at the LBTI institute for their advices regarding the setting for TNX immunodetection. We are very grateful to Manuel KOCH (University of Cologne, Germany) for kindly providing us the anti-human TNX antibodies used for antibody specificity validation. We also acknowledge Sylvie RICARD-BLUM for critical reading of the manuscript. SL and AA are recipients of PhD student fellowship from the French government (NMRT/ENS of Lyon). This work was supported by the “Ligue Nationale contre le Cancer, Comité du Rhône” and “Comité de l’Allier”, as well as by the “Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer” (PJA 20141201790).

CRedit author statement

Sophie Liot: Methodology, Data Curation, Software, Investigation, Formal Analysis, Visualization, Writing – Original draft; **Alexandre Aubert:** Validation; **Valérie Hervieu:** Formal Analysis, Investigation; **Naïma El Kholiti:** Methodology; **Joost SCHALKWIJK:** Resources; **Bernard Verrier:** Funding acquisition; **Ulrich Valcourt:** Supervision, Writing – Review & Editing, Funding Acquisition; **Elise Lambert:** Conceptualization, Methodology, Visualization, Supervision, Writing – Original draft.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2020.100021>.

Received 4 September 2019;
Received in revised form 12 December 2019;
Accepted 12 December 2019
Available online xxx

Keywords:

Tenascin-X;
Cancers;
mRNA and protein levels;
Prognosis marker;
Meta-analysis;
Tissue MicroArray

Abbreviations used:

CAF, Cancer-Associated Fibroblast; D.E.G., Differentially Expressed Genes; ECM, Extracellular Matrix; EDS, Ehlers-Danlos syndrome; FBG, fibrinogen; FNIII, fibronectin type III; GEO, Gene Expression Omnibus; GSE, GEO Series; HDAC1, histone deacetylase-1; lncRNA, long non-coding RNA; MMP, Matrix Metalloproteinase; MPNST, Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors; TCGA, The Cancer Genome Atlas; TMA, Tissue MicroArray; TME, Tumor MicroEnvironment; TN, Tenascin;

TNC, Tenascin-C; TNR, Tenascin-R; TNW, Tenascin-W; TNX, Tenascin-X; TSS, Transcription Start Site.

References

- [1] T. Rozario, D.W. DeSimone, The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view, *Dev. Biol.* 341 (1) (May 2010) 126–140, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>.
- [2] S.A. Wickström, K. Radovanac, R. Fässler, Genetic analyses of integrin signaling, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2) (Feb. 2011) <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005116>.
- [3] S.P. Hussain, C.C. Harris, Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials, *Int. J. Cancer* 121 (11) (2007) 2373–2380, <https://doi.org/10.1002/ijc.23173>.
- [4] G.M. Cooper, G.M. Cooper, *The Cell*, 2nd ed. Sinauer Associates, 2000.
- [5] H. Järveläinen, A. Sainio, M. Koulu, T.N. Wight, R. Penttinen, Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy, *Pharmacol. Rev.* 61 (2) (Jun. 2009) 198–223, <https://doi.org/10.1124/pr.109.001289>.
- [6] R.M. Bremnes, et al., The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer, *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 6 (1) (Jan. 2011) 209–217, <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181f8a1bd>.
- [7] D. Avery, P. Govindaraju, M. Jacob, L. Todd, J. Monslow, E. Puré, Extracellular matrix directs phenotypic heterogeneity of activated fibroblasts, *Matrix Biol.* 67 (2018) 90–106, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.003>.
- [8] S. Paget, The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889, *Cancer Metastasis Rev.* 8 (2) (Aug. 1989) 98–101.
- [9] I.J. Fidler, The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited, *Nat. Rev. Cancer* 3 (6) (2003) 453–458, <https://doi.org/10.1038/nrc1098>.
- [10] M. Akhtar, A. Haider, S. Rashid, A.D.M.H. Al-Nabet, Paget's 'seed and soil' theory of cancer metastasis: an idea whose time has come, *Adv. Anat. Pathol.* 26 (1) (Jan. 2019) 69–74, <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000219>.
- [11] G.S. Karagiannis, T. Poutahidis, S.E. Erdman, R. Kirsch, R. H. Riddell, E.P. Diamandis, Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue, *Mol. Cancer Res.* MCR 10 (11) (Nov. 2012) 1403–1418, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0307>.
- [12] N.E. Sounni, A. Noel, Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy, *Clin. Chem.* 59 (1) (Jan. 2013) 85–93, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.185363>.
- [13] M.W. Pickup, J.K. Mouw, V.M. Weaver, The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer, *EMBO Rep.* 15 (12) (Dec. 2014) 1243–1253, <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>.
- [14] X. Chen, E. Song, Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (2) (Feb. 2019) 99–115, <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0004-1>.
- [15] A.D. Theocharis, S.S. Skandalis, C. Gialeli, N.K. Karamanos, Extracellular matrix structure, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97 (Feb. 2016) 4–27, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.
- [16] N.K. Karamanos, A.D. Theocharis, T. Neill, R.V. Iozzo, Matrix modeling and remodeling: a biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases, *Matrix Biol.* 75–76 (2019) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.08.007>.
- [17] G. Botti, M. Cerrone, G. Scognamiglio, A. Anniciello, P.A. Ascierto, M. Cantile, Microenvironment and tumor progression of melanoma: new therapeutic perspectives, *J. Immunotoxicol.* 10 (3) (Sep. 2013) 235–252, <https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.723767>.
- [18] T. Liu, L. Zhou, D. Li, T. Andl, Y. Zhang, Cancer-associated fibroblasts build and secure the tumor microenvironment, *Front. Cell Dev. Biol.* 7 (Apr. 2019) <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00060>.
- [19] R. Thakur, D.P. Mishra, Matrix reloaded: CCN, tenascin and SIBLING group of matricellular proteins in orchestrating cancer hallmark capabilities, *Pharmacol. Ther.* 168 (2016) 61–74, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.09.002>.
- [20] U. Valcourt, L.B. Alcaraz, J.-Y. Exposito, C. Lethias, L. Bartholin, Tenascin-X: beyond the architectural function, *Cell Adhes. Migr.* 9 (1–2) (Jan. 2015) 154–165, <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.994893>.
- [21] R. Chiquet-Ehrismann, R.P. Tucker, Tenascins and the importance of adhesion modulation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (5) (May 2011) <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004960>.
- [22] R. Chiquet-Ehrismann, G. Orend, M. Chiquet, R.P. Tucker, K. S. Midwood, Tenascins in stem cell niches, *Matrix Biol.* 37 (Jul. 2014) 112–123, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.01.007>.
- [23] K.S. Midwood, M. Chiquet, R.P. Tucker, G. Orend, Tenascin-C at a glance, *J. Cell Sci.* 129 (23) (2016) 4321–4327, 01 <https://doi.org/10.1242/jcs.190546>.
- [24] Z. Sun, et al., Tenascin-C increases lung metastasis by impacting blood vessel invasions, *Matrix Biol.* 83 (Oct. 2019) 26–47, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.07.001>.
- [25] T. Murakami, et al., Tenascin C in colorectal cancer stroma is a predictive marker for liver metastasis and is a potent target of miR-198 as identified by microRNA analysis, *Br. J. Cancer* 117 (9) (Oct. 2017) 1360–1370, <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.291>.
- [26] V. Gocheva, et al., Quantitative proteomics identify Tenascin-C as a promoter of lung cancer progression and contributor to a signature prognostic of patient survival, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (28) (2017) E5625–E5634, 11 <https://doi.org/10.1073/pnas.1707054114>.
- [27] W.-D. Ni, Z.-T. Yang, C.-A. Cui, Y. Cui, L.-Y. Fang, Y.-H. Xuan, Tenascin-C is a potential cancer-associated fibroblasts marker and predicts poor prognosis in prostate cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486 (3) (2017) 607–612, 06 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.021>.
- [28] Z. Yang, W. Ni, C. Cui, L. Fang, Y. Xuan, Tenascin C is a prognostic determinant and potential cancer-associated fibroblasts marker for breast ductal carcinoma, *Exp. Mol. Pathol.* 102 (2) (2017) 262–267, <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.02.012>.
- [29] C.M. Lowy, T. Oskarsson, Tenascin C in metastasis: a view from the invasive front, *Cell Adhes. Migr.* 9 (1–2) (2015) 112–124, <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1008331>.
- [30] C. Shen, et al., Tenascin-C expression is significantly associated with the progression and prognosis in gastric GISTs, *Medicine (Baltimore)* 98 (2) (Jan. 2019) <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014045>.
- [31] R.P. Tucker, M. Degen, The expression and possible functions of Tenascin-W during development and disease,

- Front. Cell Dev. Biol. 7 (Apr. 2019) <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00053>.
- [32] M. Degen, et al., Tenascin-W is a novel marker for activated tumor stroma in low-grade human breast cancer and influences cell behavior, *Cancer Res.* 67 (19) (Oct. 2007) 9169–9179, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0666>.
- [33] M. Degen, et al., Tenascin-W, a new marker of cancer stroma, is elevated in sera of colon and breast cancer patients, *Int. J. Cancer* 122 (11) (Jun. 2008) 2454–2461, <https://doi.org/10.1002/ijc.23417>.
- [34] E. Martina, et al., Tenascin-W is a specific marker of glioma-associated blood vessels and stimulates angiogenesis in vitro, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24 (3) (Mar. 2010) 778–787, <https://doi.org/10.1096/fj.09-140491>.
- [35] F. Brellier, et al., The adhesion modulating properties of tenascin-W, *Int. J. Biol. Sci.* 8 (2) (2012) 187–194.
- [36] L.B. Derr, L.A. McKae, R.P. Tucker, The distribution of tenascin-R in the developing avian nervous system, *J. Exp. Zool.* 280 (2) (Feb. 1998) 152–164.
- [37] B. Fuss, E.S. Wintergerst, U. Bartsch, M. Schachner, Molecular characterization and in situ mRNA localization of the neural recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to tenascin, *J. Cell Biol.* 120 (5) (Mar. 1993) 1237–1249, <https://doi.org/10.1083/jcb.120.5.1237>.
- [38] P. Pesheva, S. Gloor, M. Schachner, R. Probstmeier, Tenascin-R is an intrinsic autocrine factor for oligodendrocyte differentiation and promotes cell adhesion by a sulfatide-mediated mechanism, *J. Neurosci.* 17 (12) (Jun. 1997) 4642–4651.
- [39] R. Probstmeier, J. Nellen, S. Gloor, A. Wernig, P. Pesheva, Tenascin-R is expressed by Schwann cells in the peripheral nervous system, *J. Neurosci. Res.* 64 (1) (Apr. 2001) 70–78, <https://doi.org/10.1002/jnr.1055>.
- [40] F. Chiovaro, R. Chiquet-Ehrismann, M. Chiquet, Transcriptional regulation of tenascin genes, *Cell Adhes. Migr.* 9 (1–2) (2015) 34–47, <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1008333>.
- [41] B. Anlar, A. Gunel-Ozcan, Tenascin-R: role in the central nervous system, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (9) (Sep. 2012) 1385–1389, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.05.009>.
- [42] I. El Ayachi, C. Fernandez, N. Baeza, A.M. De Paula, P. Pesheva, D. Figarella-Branger, Spatiotemporal distribution of tenascin-R in the developing human cerebral cortex parallels neuronal migration, *J. Comp. Neurol.* 519 (12) (Aug. 2011) 2379–2389, <https://doi.org/10.1002/cne.22632>.
- [43] J. Bristow, M.K. Tee, S.E. Gitelman, S.H. Mellon, W.L. Miller, Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B, *J. Cell Biol.* 122 (1) (Jul. 1993) 265–278.
- [44] G.H. Burch, M.A. Bedolli, S. McDonough, S.M. Rosenthal, J. Bristow, Embryonic expression of tenascin-X suggests a role in limb, muscle, and heart development, *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 203 (4) (Aug. 1995) 491–504, <https://doi.org/10.1002/aja.1002030411>.
- [45] C. Lethias, A. Carisey, J. Comte, C. Cluzel, J.-Y. Exposito, A model of tenascin-X integration within the collagenous network, *FEBS Lett.* 580 (26) (Oct. 2006) 6281–6285, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.037>.
- [46] T. Sakai, et al., Tenascin-X expression in tumor cells and fibroblasts: glucocorticoids as negative regulators in fibroblasts, *J. Cell Sci.* 109 (Pt 8) (Aug. 1996) 2069–2077.
- [47] K. Hasegawa, T. Yoshida, K. Matsumoto, K. Katsuta, S. Waga, T. Sakakura, Differential expression of tenascin-C and tenascin-X in human astrocytomas, *Acta Neuropathol. (Berl.)* 93 (5) (May 1997) 431–437.
- [48] P. Lévy, et al., Microarray-based identification of tenascin C and tenascin XB, genes possibly involved in tumorigenesis associated with neurofibromatosis type 1, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13 (2 Pt 1) (Jan. 2007) 398–407, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0182>.
- [49] C. Geffrotin, et al., Opposite regulation of tenascin-C and tenascin-X in MeLiM swine heritable cutaneous malignant melanoma, *Biochim. Biophys. Acta* 1524 (2–3) (Dec. 2000) 196–202.
- [50] S.O. Lee, S.Y. Lee, S.R. Lee, W. Ju, S.C. Kim, Tenascin-X and leukemia inhibitory factor receptor are down-regulated in leiomyoma compared with normal myometrium, *J. Gynecol. Oncol.* 19 (2) (Jun. 2008) 139–144, <https://doi.org/10.3802/jgo.2008.19.2.139>.
- [51] B. Davidson, et al., Gene expression signatures differentiate ovarian/peritoneal serous carcinoma from diffuse malignant peritoneal mesothelioma, *Clin. Cancer Res.* 12 (20) (Oct. 2006) 5944–5950, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1059>.
- [52] Y. Yuan, et al., Tenascin-X is a novel diagnostic marker of malignant mesothelioma, *Am. J. Surg. Pathol.* 33 (11) (Nov. 2009) 1673–1682, <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181b6bde3>.
- [53] K. Nakayama, et al., Tenascin XB is a novel diagnostic marker for malignant mesothelioma, *Anticancer Res.* 39 (2) (Feb. 2019) 627–633, <https://doi.org/10.21873/anticancer.13156>.
- [54] M. Kramer, S. Pierredon, P. Ribaux, J.-C. Tille, P. Petignat, M. Cohen, Secretome identifies Tenascin-X as a potent marker of ovarian cancer, *Biomed. Res. Int.* 2015 (2015) 208017, <https://doi.org/10.1155/2015/208017>.
- [55] D.S. Chandrashekar, et al., UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses, *Neoplasia N. Y. N* 19 (8) (Aug. 2017) 649–658, <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.002>.
- [56] Y.P. Yu, et al., Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22 (14) (Jul. 2004) 2790–2799, <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.158>.
- [57] J. Schalkwijk, et al., A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency, *N. Engl. J. Med.* 345 (16) (Oct. 2001) 1167–1175, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa002939>.
- [58] E. Gobin, et al., A pan-cancer perspective of matrix metalloproteases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential, *BMC Cancer* 19 (1) (Jun. 2019), 581. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5768-0>.
- [59] A. Chakravarthy, L. Khan, N.P. Bensler, P. Bose, D.D.D. Carvalho, TGF- β -associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure, *Nat. Commun.* 9 (1) (Nov. 2018) 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06654-8>.
- [60] Cancer Genome Atlas Research Network, The molecular taxonomy of primary prostate cancer, *Cell* 163 (4) (Nov. 2015) 1011–1025, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.025>.
- [61] K.K. Huang, et al., Genomic and epigenomic profiling of high-risk intestinal metaplasia reveals molecular determinants of progression to gastric cancer, *Cancer Cell* 33 (1) (2018) 137–150.e508. [10.1016/j.ccell.2017.11.018](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.018).
- [62] V.R. Krishnaswamy, A. Benbenishty, P. Blinder, I. Sagi, Demystifying the extracellular matrix and its proteolytic remodeling in the brain: structural and functional insights,

- Cell. Mol. Life Sci. CMLS 76 (16) (Aug. 2019) 3229–3248, <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03182-6>.
- [63] M. Koshiyama, N. Matsumura, I. Konishi, Subtypes of ovarian cancer and ovarian cancer screening, *Diagn. Basel Switz.* 7 (1) (Mar. 2017) <https://doi.org/10.3390/diagnostics7010012>.
- [64] S. Lheureux, C. Gourley, I. Vergote, A.M. Oza, Epithelial ovarian cancer, *Lancet Lond. Engl.* 393 (10177) (Mar. 2019) 1240–1253, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32552-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32552-2).
- [65] M. Ekblom, R. Fässler, B. Tomasini-Johansson, K. Nilsson, P. Ekblom, Downregulation of tenascin expression by glucocorticoids in bone marrow stromal cells and in fibroblasts, *J. Cell Biol.* 123 (4) (Nov. 1993) 1037–1045, <https://doi.org/10.1083/jcb.123.4.1037>.
- [66] M. Speek, F. Barry, W.L. Miller, Alternate promoters and alternate splicing of human tenascin-X, a gene with 5' and 3' ends buried in other genes, *Hum. Mol. Genet.* 5 (11) (Nov. 1996) 1749–1758.
- [67] S.D. Wijesuriya, J. Bristow, W.L. Miller, Localization and analysis of the principal promoter for human tenascin-X, *Genomics* 80 (4) (Oct. 2002) 443–452.
- [68] A. Kato, T. Endo, S. Abiko, H. Ariga, K. Matsumoto, Induction of truncated form of tenascin-X (XB-S) through dissociation of HDAC1 from SP-1/HDAC1 complex in response to hypoxic conditions, *Exp. Cell Res.* 314 (14) (Aug. 2008) 2661–2673, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.05.019>.
- [69] T. Endo, H. Ariga, K. Matsumoto, Truncated form of tenascin-X, XB-S, interacts with mitotic motor kinesin Eg5, *Mol. Cell. Biochem.* 320 (1–2) (Jan. 2009) 53–66, <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9898-y>.
- [70] M. Smolle, S. Uranitsch, A. Gerger, M. Pichler, J. Haybaeck, Current status of long non-coding RNAs in human cancer with specific focus on colorectal cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (8) (Aug. 2014) 13993–14013, <https://doi.org/10.3390/ijms150813993>.
- [71] M. Seles, et al., Current insights into long non-coding RNAs in renal cell carcinoma, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (4) (Apr. 2016) 573, <https://doi.org/10.3390/ijms17040573>.
- [72] S. Cerk, et al., Current status of long non-coding RNAs in human breast cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (9) (Sep. 2016) <https://doi.org/10.3390/ijms17091485>.
- [73] S.-P. Yan, et al., LncRNA LINC01305 silencing inhibits cell epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer by inhibiting TNXB-mediated PI3K/Akt signalling pathway, *J. Cell. Mol. Med.* 23 (4) (Apr. 2019) 2656–2666, <https://doi.org/10.1111/jcmm.14161>.
- [74] K. Matsumoto, et al., Tumour invasion and metastasis are promoted in mice deficient in tenascin-X, *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 6 (12) (Dec. 2001) 1101–1111.
- [75] K.-I. Matsumoto, K. Takahashi, A. Yoshiki, M. Kusakabe, H. Ariga, Invasion of melanoma in double knockout mice lacking tenascin-X and tenascin-C, *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 93 (9) (Sep. 2002) 968–975.
- [76] T. Minamitani, H. Ariga, K. Matsumoto, Adhesive defect in extracellular matrix Tenascin-X-null fibroblasts: a possible mechanism of tumor invasion, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (11) (2002) 1472–1475, <https://doi.org/10.1248/bpb.25.1472>.

Supplementary data S1

Lung cancers

#GSE	Samples			Tumoral Cancer type	TNXB expression			Clinical data		Platform	Date
	Normal		N° of cases		adj pval	log2Fc	Variation	Survival	Stade/Grade		
	N° of cases	Adjacent									
GSE6499	190	no	490	Mixed	1.35E-02	-6.64E-02	DOWN	yes	no	GPL6244 - [HuGene-1_0-st] Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array [transcript (gene) version]	2015
GSE31210	20	no	226	Adenocarcinoma	1.79E-14	-2.2815726	DOWN	yes	yes	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2011
GSE32665	92	yes	87	Adenocarcinoma	6.70E-10	-0.177854	DOWN	no	no	GPL6102 - illumina human-6 v2.0 expression beadchip	2013
GSE75037	83	yes	83	Adenocarcinoma	1.49E-09	-3.39E-01	DOWN	no	yes	GPL6884 - illumina HumanWG-6 v3.0 expression beadchip	2016
GSE32667	58	yes	58	Adenocarcinoma	1.50E-04	-0.067	DOWN	no	yes	GPL6884 - illumina HumanWG-6 v3.0 expression beadchip	2012
GSE10072	49	yes	58	Adenocarcinoma	1.38E-33	-1.6941137	DOWN	no	yes	GPL96 - [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array	2008
GSE43458	30	no	80	Adenocarcinoma	1.34E-18	-1.5124159	DOWN	no	no	GPL6244 - [HuGene-1_0-st] Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array [transcript (gene) version]	2013
GSE2088	30	no	57	Adenocarcinoma (9) and squamous cell carcinoma (48)	7.78E-01	-0.0483854	ns	no	no	GPL962 - CHUGAI 41K	2009
GSE12472	28	no	35	Squamous cell carcinoma (microdissected cells)	1.44E-03	-3.16E-01	DOWN	yes	yes	GPL1708 - Agilent-012391 Whole Human Genome Oligo Microarray G4112A [Feature Number version]	2009
GSE101929	47	no	32	NSCLC	2.69E-14	-4.44	DOWN	yes	yes	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2017
GSE6459	34	yes	33	Adenocarcinoma	5.70E-01	-0.0270796	ns	duration	no	GPL6883 - illumina HumanRef-8 v3.0 expression beadchip	2015
GSE7670	28	yes	28	Adenocarcinoma	1.63E-11	-2.3959407	DOWN	no	no	GPL96 - [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array	2007
GSE2762	25	yes	25	NSCLC	3.02E-17	-2.0108193	DOWN	no	yes	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2013

NSCLC = Non-Small Cell Lung Carcinoma

Breast cancers

#GSE	Samples			Tumoral Cancer type	TNX expression (GEO2R)			Clinical data		Platform	Date
	Normal		N° of cases		adj pval	log2Fc	Variation	Survival	Stade/Grade		
	N° of cases	Adjacent									
GSE70905	47	yes	47	Adenocarcinoma	1.59E-10	-5.40E-01	DOWN	no	no	GPL4133 - Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x4K G4112F [Feature Number version]	2016
GSE70947	148	yes	148	Adenocarcinoma	7.15E-28	-2.0289	DOWN	no	no	GPL13607 - Agilent-028004 SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray [Feature Number version]	2016
GSE10780	143	no	42	IDC	4.73E-28	-2.3823	DOWN	no	no	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2009
GSE7751	47	yes	61	Mixed	2.22E-12	-1.3490	DOWN	yes	yes	GPL6244 - [HuGene-1_0-st] Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array [transcript (gene) version]	2013
GSE14999	61	yes	68	IDMC	2.73E-31	-0.3065	DOWN	no	no	GPL3991 - Human 3.0 A1	2009
GSE29044	36	yes	73	DCIS (6) and IDC (67)	2.09E-17	-3.09	DOWN	no	yes	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2014
GSE10810	27	some	31	Mixed	4.79E-20	-3.1354	DOWN	no	yes	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2009

IDC = Invasive Duct Carcinoma

IDMC = infiltrating Ductal Mammary Carcinoma

DCIS = Ductal Carcinoma In Situ

Prostate cancer

#GSE	Samples			Tumoral Cancer type	TNX expression (GEO2R)			Clinical data		Platform	Date
	Normal		N° of cases		adj pval	log2Fc	Variation	Survival	Stade/Grade		
	N° of cases	Adjacent									
GSE6855	23	no	65	Adenocarcinoma	1.03E-03	-0.7337	DOWN	no	yes	GPL8300 - [HG_U95Av2] Affymetrix Human Genome U95 Version 2 Array	2015
GSE17951	45	no	109	Not specified	6.79E-04	-0.6045	DOWN	no	no	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2009

Colorectal cancers

#GSE	Samples			Tumoral Cancer type	TNX expression (GEO2R)			Clinical data		Platform	Date
	Normal		N° of cases		adj pval	log2Fc	Variation	Survival	Stade/Grade		
	N° of cases	Adjacent									
GSE41258	54	no (colon)	186	Colon adenocarcinoma	1.04E-53	-2.2613	DOWN	yes	yes	GPL96 - [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array	2012
GSE87211	160	yes	203	Rectal cancer	2.86E-29	-1.0412	DOWN	yes	no	GPL13497 - Agilent-026652 Whole Human Genome Microarray 4x4K v2 [Probe Name version]	2017
GSE44076	50	no	98	Colon adenocarcinoma	7.51E-06	-0.5028	DOWN	no	yes	GPL13667 - [HG-U219] Affymetrix Human Genome U219 Array	2014
GSE117606	65	yes	74	Mixed colorectal adenocarcinoma	9.49E-21	-1.1214	DOWN	no	yes	GPL25373 - [HT_HG-U133_Plus_PM] Affymetrix HT HG-U133+PM Array Plate [CDF: HTHGU133PlusPM_Hs_ENTREZG_20]	2018
GSE106582	117	yes	77	CRC	7.25E-02	-0.0367	ns	no	no	GPL10558 - illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip	2018
GSE7182	88	no	84	CRC	7.51E-29	0.1711	UP	no	no	GPL6947 - illumina HumanHT-12 V3.0 expression beadchip	2013
GSE21510	25	no	123	CRC	6.04E-37	-2.0073	DOWN	no	yes	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2011
GSE20916	24	no	36	Colon adenocarcinoma	1.22E-03	-0.8193	DOWN	no	no	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2010
GSE83889	35	no	101	Colorectal carcinoma	6.90E-01	-0.0127	ns	no	no	GPL10558 - illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip	2017
GSE20842	65	yes	65	Rectal cancer	4.83E-19	-1.7722	DOWN	no	no	GPL4133 - Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x4K G4112F [Feature Number version]	2017
GSE90627	56	yes	32	Rectal cancer	3.07E-43	-3.0733	DOWN	no	no	GPL17077 - Agilent-039494 SurePrint G3 Human GE v2 8x60K Microarray 039381 [Probe Name version]	2017
GSE44861	95	yes	56	Colon cancer	7.96E-06	-1.2913	DOWN	no	no	GPL3921 - [HT_HG-U133A] Affymetrix HT Human Genome U133A Array	2014
GSE31279	34	yes	36	CRC (whole tissue)	1.85E-01	-0.0386	ns	no	no	GPL6104 - illumina humanRef-8 v2.0 expression beadchip	2011
GSE20970	30	yes	73	Colon carcinoma	5.92E-07	-0.3873	DOWN	no	no	GPL1528 - NC/ATC HS-OperonV2	2011

CRC = Colorectal Cancer

Stomach cancer

#GSE	Samples			Tumoral Cancer type	TNX expression (GEO2R)			Clinical data		Platform	Date
	Normal		N° of cases		adj pval	log2Fc	Variation	Survival	Stade/Grade		
	N° of cases	Adjacent									
GSE29272	134	yes	134	Cardia (67) and non-cardia (72) adenocarcinoma	1.34E-07	-0.5834	DOWN	no	no	GPL96 - [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array	2013
GSE37023	39	no	112	Gastric adenocarcinoma	1.25E-22	-1.5501	DOWN	no	no	GPL96 - [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array	2012
GSE27342	80	yes	80	Gastric carcinoma	4.73E-02	-0.7249	DOWN	no	yes	GPL5175 - [HuEx-1_0-st] Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array [transcript (gene) version]	2011
GSE4129	21	no	111	Gastric cancer	1.84E-06	-0.2916	DOWN	no	no	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2017
GSE13195	25	yes	25	Gastric adenocarcinoma	5.74E-01	-0.0479	ns	no	no	GPL5175 - [HuEx-1_0-st] Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array [transcript (gene) version]	2009
GSE29998	49	no	50	Gastric adenocarcinoma	4.13E-01	-0.5926	ns	no	no	GPL0947 - illumina HumanHT-12 V3.0 expression beadchip	2012
GSE53089	45	yes	45	Gastric cancer	8.16E-01	-0.0512	ns	no	no	GPL5175 - [HuEx-1_0-st] Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array [transcript (gene) version]	2014
GSE33429	25	yes	25	Gastric adenocarcinoma	5.74E-01	-0.0479	ns	no	yes	GPL5175 - [HuEx-1_0-st] Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array [transcript (gene) version]	2012
GSE13911	31	yes	38	Gastric cancer	3.94E-07	-1.7196	DOWN	no	no	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2008
GSE5801	32	yes	32	Gastric cancer	8.94E-05	-0.6442	DOWN	no	no	GPL14550 - Agilent-028004 SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray [Probe Name Version]	2015
GSE30727	30	yes	30	Gastric cancer	3.42E-03	-0.6675	DOWN	no	yes	GPL1588 - [HuEx-1_0-st] Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array [probe set (exon) version]	2014
GSE51575	26	yes	26	Advanced gastric carcinoma	6.55E-12	-3.1000	DOWN	no	yes	GPL13607 - Agilent-028004 SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray [Feature Number version]	2014
GSE33335	25	yes	25	Gastric adenocarcinoma	5.74E-01	-0.0479	ns	no	no	GPL5175 - [HuEx-1_0-st] Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array [transcript (gene) version]	2012
GSE7154	20	yes	24	Gastric adenocarcinoma	1.57E-02	-0.3175	DOWN	no	yes	GPL6699 - Print_1437	2010

Liver cancer

#GSE	Samples			Tumoral Cancer type	TNX expression (GEO2R)			Clinical data		Platform	Date
	Normal		N° of cases		adj pval	log2Fc	Variation	Survival	Stade/Grade		
	N° of cases	Adjacent									
GSE25097	243	yes	268	HCC	1.57E-77	-1.7634	DOWN	no	no	GPL10687 - Rosetta/Merck Human RSTA Affymetrix 1.0 microarray Custom CDF	2011
GSE14520	220	yes	225	HCC	5.11E-54	-1.0968	DOWN	no	no	GPL3921 - [HT_HG-U133A] Affymetrix HT Human Genome U133A Array	2010
GSE36376	193	yes	240	HCC	7.26E-01	0.0075	ns	no	yes	GPL10558 - illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip	2012
GSE76297	59	yes	62	HCC	2.19E-21	-0.5740	DOWN	no	no	GPL17586 - [HTA-2_0] Affymetrix Human Transcriptome Array 2.0 [transcript (gene) version]	2017
GSE57958	39	yes	39	HCC	4.37E-01	-0.0284	ns	no	no	GPL10558 - illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip	2014
GSE76427	52	yes	115	HCC	5.26E-01	-0.0167	ns	yes	yes	GPL10558 - illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip	2017
GSE45267	41	yes	46	HCC	3.70E-02	-0.1686	DOWN	no	no	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2014
GSE4041	60	yes	60	HCC	6.87E-08	-0.6237	DOWN	no	no	GPL6244 - [HuGene-1_0-st] Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array [transcript (gene) version]	2016
GSE57957	39	yes	39	HCC	4.37E-01	-0.0284	ns	no	no	GPL10558 - illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip	2014
GSE84005	38	yes	38	HCC	9.20E-06	-0.3027	DOWN	no	yes	GPL5175 - [HuEx-1_0-st] Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array [transcript (gene) version]	2017

HCC = Hepatocellular carcinoma

Supplementary data S1

Renal cancers

#GSE	Normal		Samples		Tumoral Cancer type	TNX expression (GEO2R)			Clinical data		Platform	Date
	N° of cases	Adjacent	N° of cases			adj pval	log2Fc	Variation	Survival	Stade/Grade		
GSE40495	101	yes	101		ccRCC	3.97E-02	-0.0206	DOWN	no	yes	GPL10558 - Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip	2013
GSE17895	22	no	138		ccRCC	3,61E-01	0,2413	ns	no	no	GPL9101 - Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (MBNI v11 Entrez Gene ID CDF)	2010
GSE53757	72	yes	72		ccRCC	6.21E-10	-1.1457	DOWN	no	yes	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2014
GSE46699	63	yes	67		ccRCC	2.33E-04	-0.1490	DOWN	no	no	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2014
GSE15641	23	no	69		Mixed	6.57E-19	-1.4407	DOWN	no	no	GPL96 - [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array	2009
GSE36895	23	no	29		ccRCC	3.27E-05	-0.5227	DOWN	no	yes	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2012
GSE66272	27	yes	27		ccRCC	2.85E-05	-1.5535	DOWN	no	yes	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2016

ccRCC = clear cell Renal cell carcinoma

Gloma

#GSE	Normal		Samples		Tumoral Cancer type	TNX expression (GEO2R)			Clinical data		Platform	Date
	N° of cases	Adjacent	N° of cases			adj pval	log2Fc	Variation	Survival	Stade/Grade		
GSE108474	28	no	148		Astrocytoma	3.77E-12	0.5923	UP	no	yes	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2018
			271		Glioblastoma multiforme	1.86E-24	0.8527	UP				
			67		Oligodendroglioma	2.32E-06	0.5384	UP				
			436		All	1.33E-16	0.7345	UP				
GSE4290	23	no	26		Astrocytoma	7.28E-04	0.8066	UP	no	yes	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2006
			77		Glioblastoma	1.07E-05	0.8594	UP				
			50		Oligodendroglioma	4.89E-04	0.5830	UP				
			153		All	2.05E-05	0.7600	UP				

Ovarian cancer

#GSE	Normal		Samples		Tumoral Cancer type	TNX expression (GEO2R)			Clinical data		Platform	Date
	N° of cases	Adjacent	N° of cases			adj pval	log2Fc	Variation	Survival	Stade/Grade		
GSE25712	10 (HOSE)	no	185		Late-stage high-grade ovarian cancer	7.07E-08	-1.5554	DOWN	yes	no	GPL96 - [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array	2011
GSE6008	4	no	99		Mixed	1.12E-10	-0.9230	DOWN	no	yes	GPL96 - [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array	2007
GSE40595	8 (stroma)	no	31 (stroma)		High grade serous ovarian cancer	1.03E-02	-0.6455	DOWN	no	no	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2014
	6 (HOSE)	no	32 (epith.)			2.86E-22	-3.3533	DOWN				
GSE18520	10 (HOSE)	no	53		Advanced-stage, high-grade papillary serous ovarian adenocarcinomas	8.54E-15	-1.6661	DOWN	yes	yes	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2009
GSE6957	12 (HOSE)	no	57		Ovarian carcinoma	9.20E-16	-1.0631	DOWN	no	no	GPL15048 - Rosetta/Merck Human RSTA Custom Affymetrix 2.0 microarray [HuRSTA_2a520709.CDF]	2014
GSE4122	14 (HOSE)	no	32 (malignant)		Not specified	3.28E-04	-2.8330	DOWN	no	no	GPL201 - [HG-Focus] Affymetrix Human HG-Focus Target Array	2008
	18 (benign)	no										
GSE12470	10 (peritoneum)	no	43		Early (8) and advanced (35) serous ovarian cancer	5.49E-12	-5.1441	DOWN	no	no	GPL887 - Agilent-012097 Human 1A Microarray (V2) G41108 [Feature Number version]	2009
GSE17308	4	no	42		Benign (7), LMP (7) and invasive (28) serous ovarian cancer	2.41E-01	-0.6090	ns	no	yes	GPL8928 - PC Human Operon 21k v2	2009

HOSE = human ovarian surface epithelium

LMP = low malignant potential

Skin melanoma

#GSE	Normal		Samples		Tumoral Cancer type	TNX expression (GEO2R)			Clinical data		Platform	Date
	N° of cases	Adjacent	N° of cases			adj pval	log2Fc	Variation	Survival	Stade/Grade		
GSE46517	7	no	104		Primary (31) and metastatic (73) melanoma	4.35E-11	-2.6440	DOWN	no	yes	GPL96 - [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array	2013
	9 (nevus)	no										
GSE7553	4	no	82		Mixed	3.27E-02	-2.7257	DOWN	no	no	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2008
GSE15605	16	no	58		Primary (46) and metastasis of (12) melanoma	4.39E-08	-1.7598	DOWN	no	no	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2012

Leiomyoma

#GSE	Normal		Samples		Tumoral Cancer type	TNX expression (GEO2R)			Clinical data		Platform	Date
	N° of cases	Adjacent	N° of cases			adj pval	log2Fc	Variation	Survival	Stade/Grade		
GSE13319	27 (myometrium)	no	50		Leiomyoma	1.21E-05	-1.4478	DOWN	no	no	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2009
GSE47643	29 (myometrium)	no	25		Leiomyosarcoma	4.40E-18	-3.1300	DOWN	no	no	GPL571 - [HG-U133A_2] Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array	2015

Malignant mesothelioma

#GSE	Normal		Samples		Tumoral Cancer type	TNX expression (GEO2R)			Clinical data		Platform	Date
	N° of cases	Adjacent	N° of cases			adj pval	log2Fc	Variation	Survival	Stade/Grade		
GSE2549	5 (pleura)	no	40		MPM	4.75E-02	-1.45022485	DOWN	no	no	GPL96 - GPL96[HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array	2005
GSE42977	5 (pleura)	no	39		MPM	5.45E-01	-7.49E-02	ns	no	no	GPL6790 - Illumina HumanRef-6 v2.0 expression beadchip	2013
GSE12345	4 (pleura)	no	9		MPM	0.562705	-2.67	ns	no	no	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2009

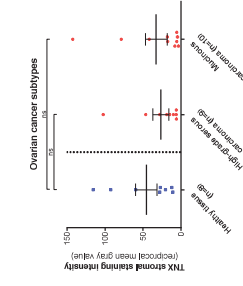
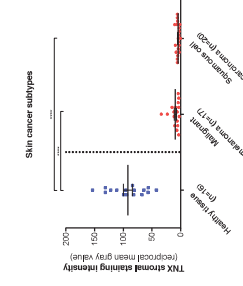
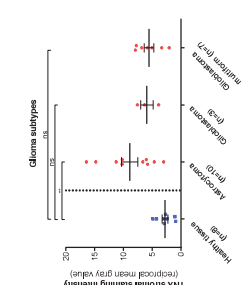
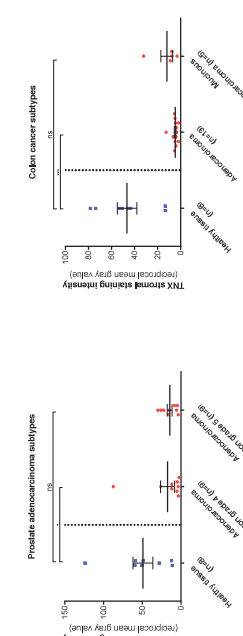
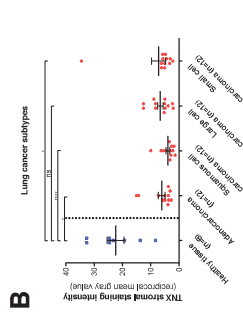
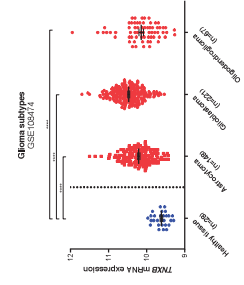
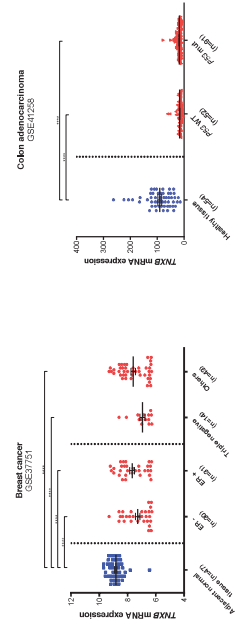
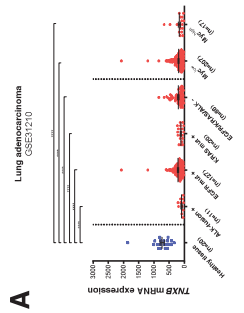
MPM = Malignant pleural mesothelioma

Malignant peripheral nerve sheath tumors

#GSE	Normal		Samples		Tumoral Cancer type	TNX expression (GEO2R)			Clinical data		Platform	Date
	N° of cases	Adjacent	N° of cases			adj pval	log2Fc	Variation	Survival	Stade/Grade		
GSE41747	3 (nerve)	no	6		MPNST	0.8359	0.0653	ns	no	no	GPL10371 - Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array [CDF: HGU133Plus2_Hs_REFSEQ_11.0.1]	2012
GSE52392	2 (fat)	no	10		MPNST	9.18E-01	0.0406	ns	no	no	GPL6947 - Illumina HumanHT-12 V3.0 expression beadchip	2013

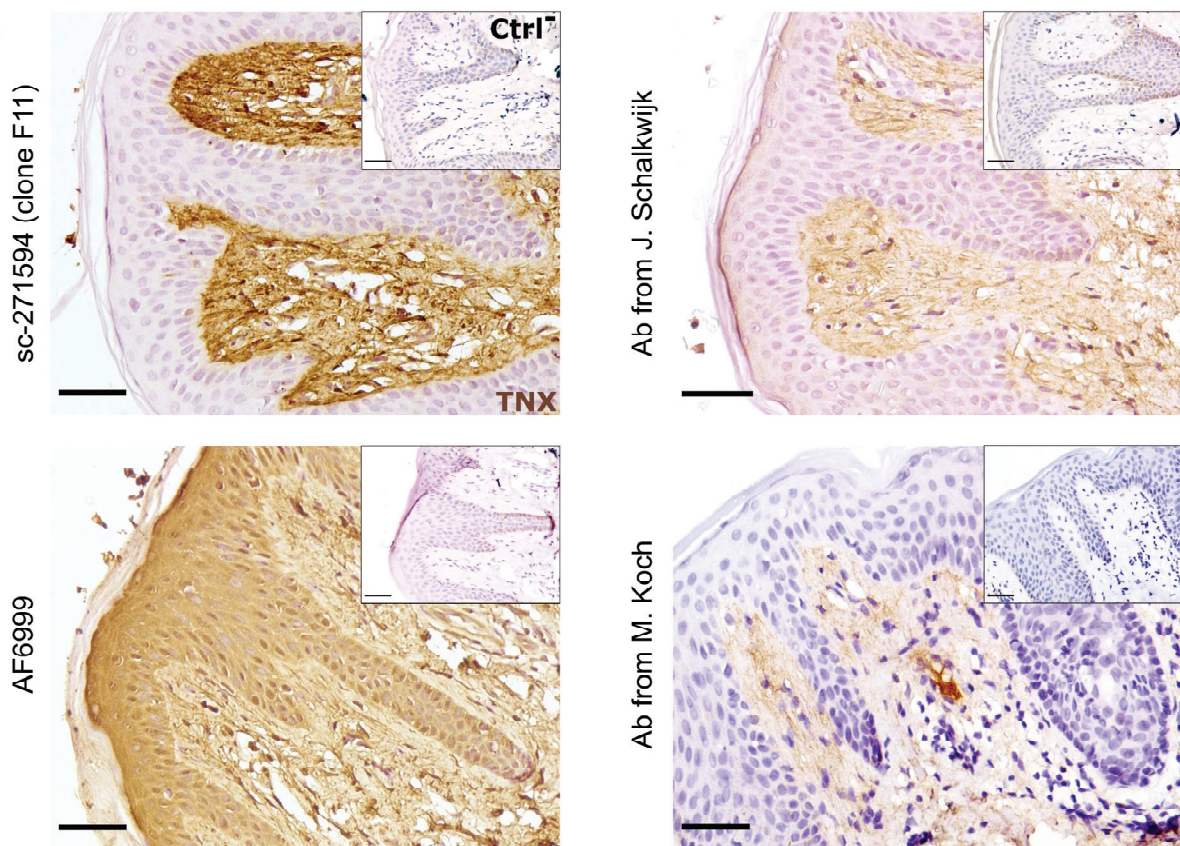
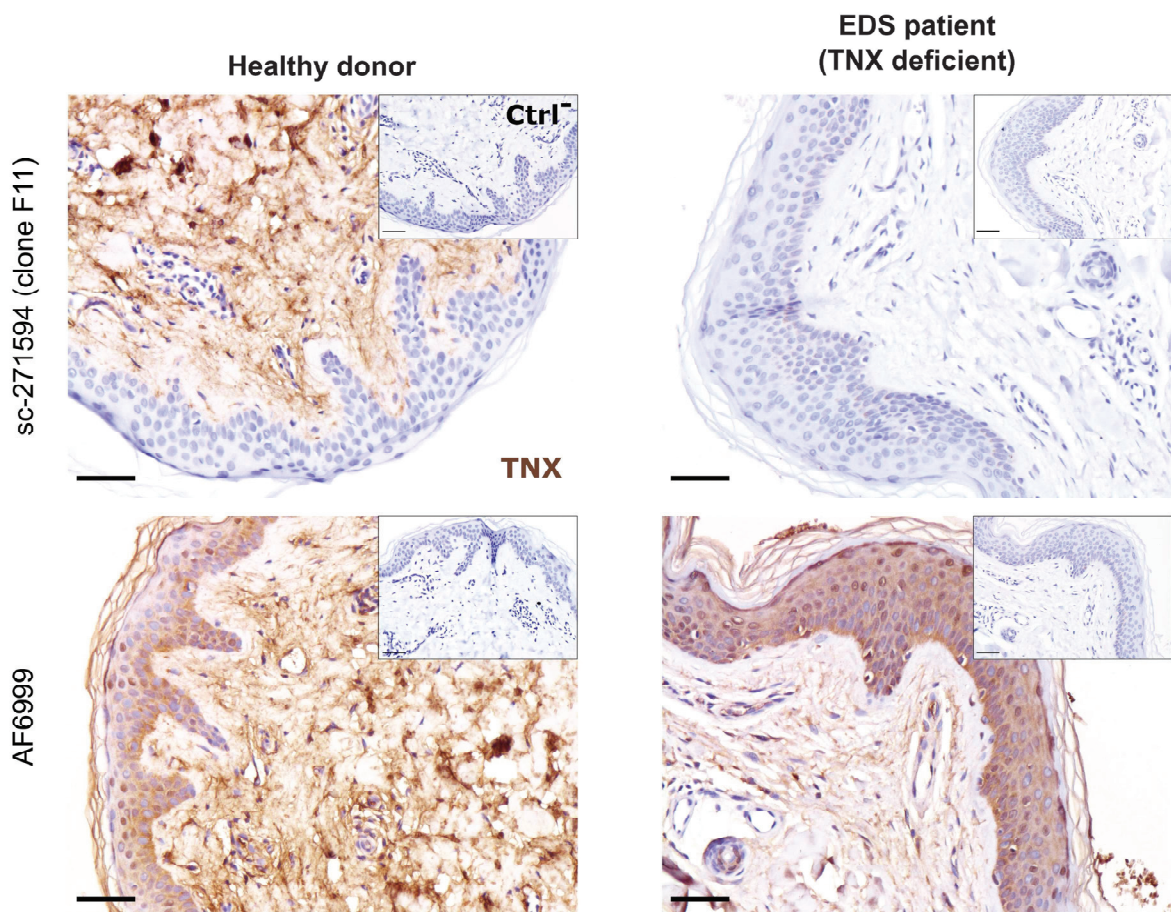
MPNST = Malignant peripheral nerve sheath tumors

Supplementary Figure S2

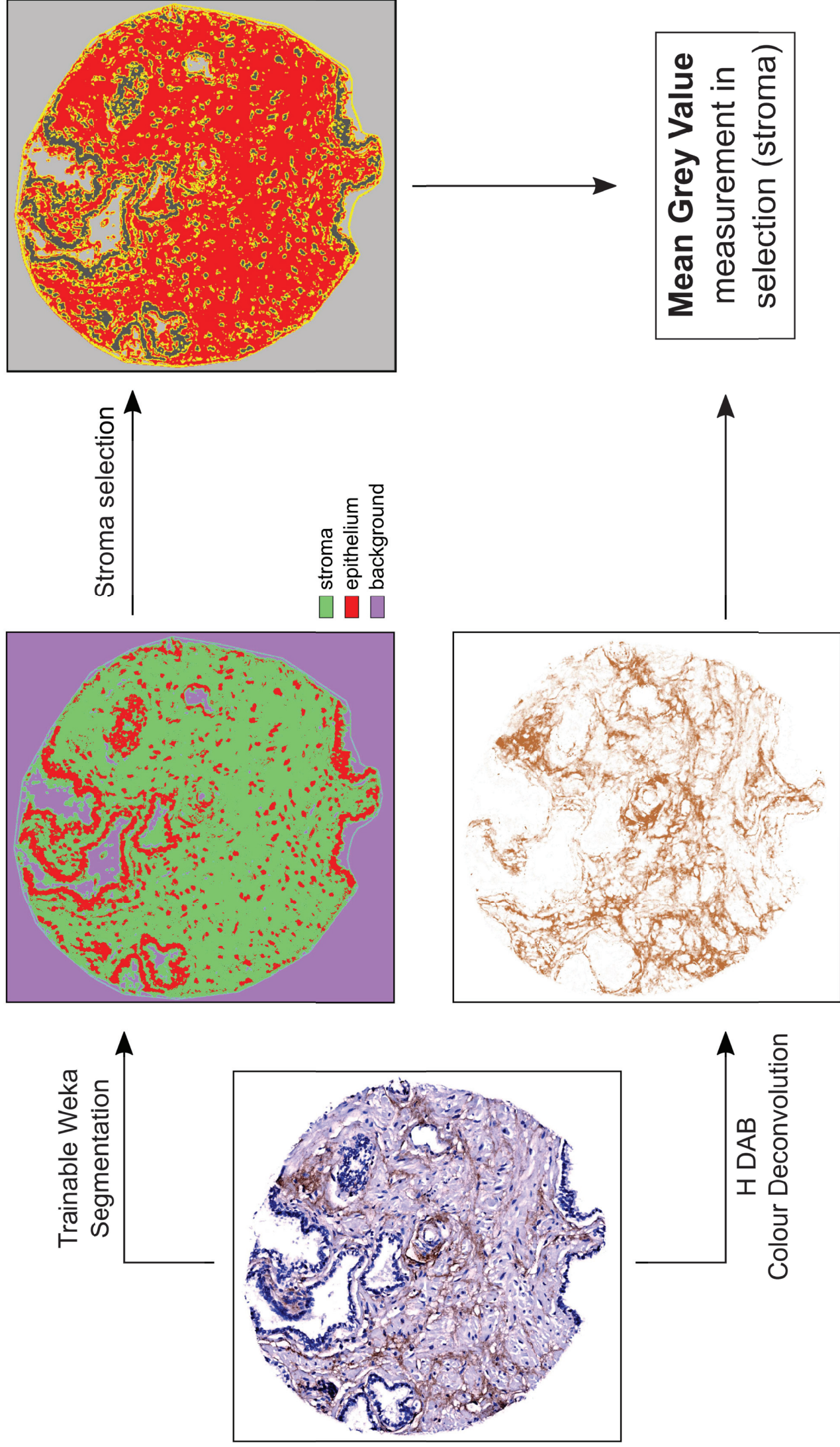


A

Reference	Origin	Epitope	Characteristics	Dilution
sc-271594	Santa Cruz	14aa in the FBG-like domain	Mouse Monoclonal	1/100
AF6999	R&D System	5 FNIII modules + FBG-like domain	Sheep Polyclonal	1/100
KR86	M. Koch	8 FNIII modules + FBG-like domain	Rabbit Polyclonal	1/1000
TNX-Guinea pig antiserum	J. Schalkwijk (Schalkwijk J et al., 2001)	7 FNIII modules + FBG-like domain	Guinea-Pig Polyclonal	1/100

B**C**

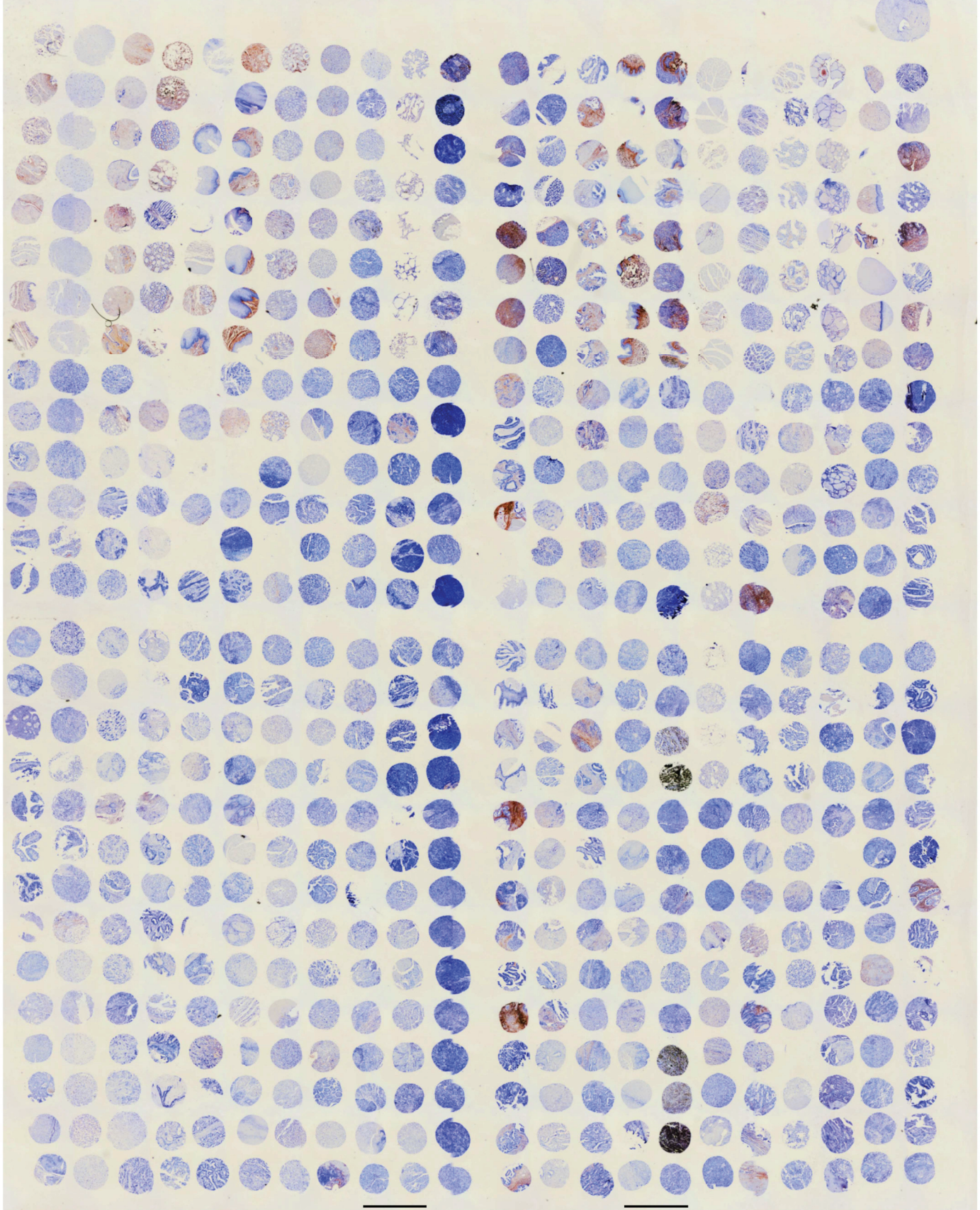
Supplementary Figure S4



Supplementary Figure S5

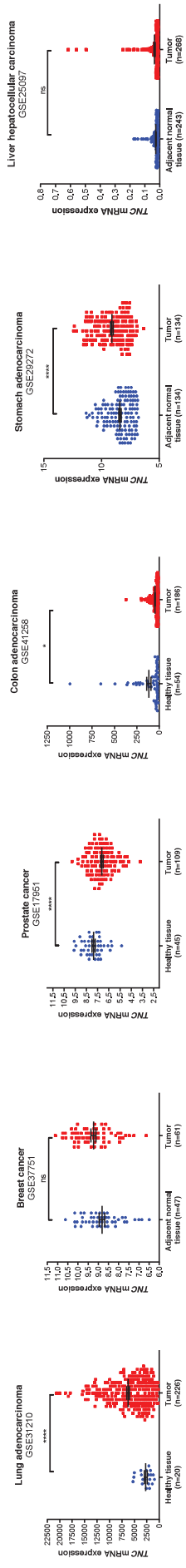
Tumor

Normal

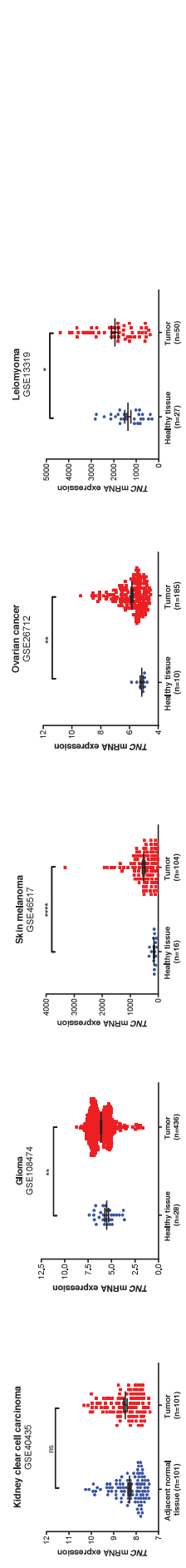


- Bladder
- Cerebrum
- Breast
- Colon
- Esophagus
- Mouth
- Kidney
- Liver
- Lung
- Lymph node
- Ovary
- Pancreas
- Prostate
- Skin
- Skeletal muscle
- Stomach
- Testis
- Thyroid gland
- Cervix
- Uterus

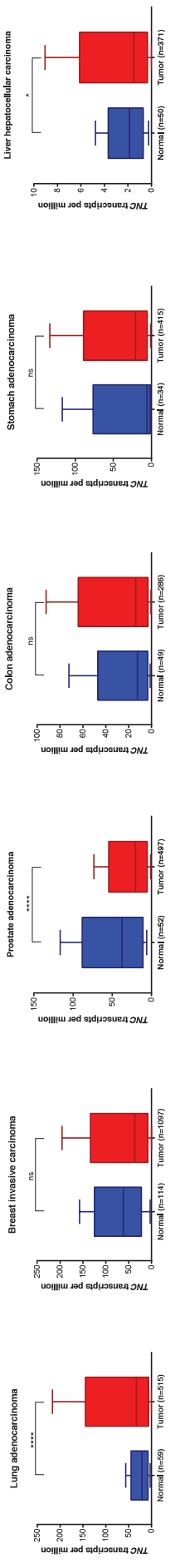
A



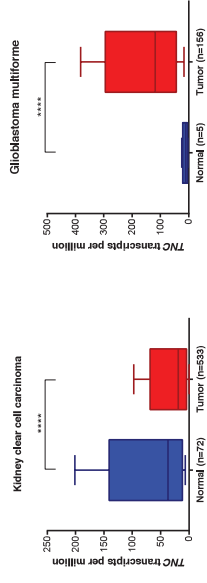
B



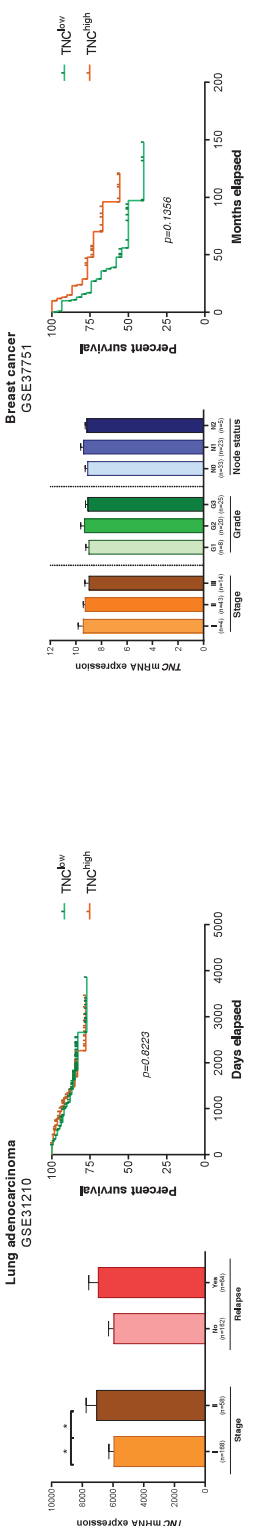
C



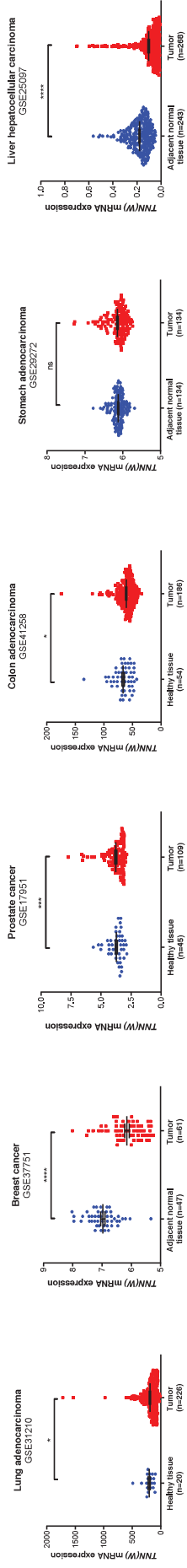
D



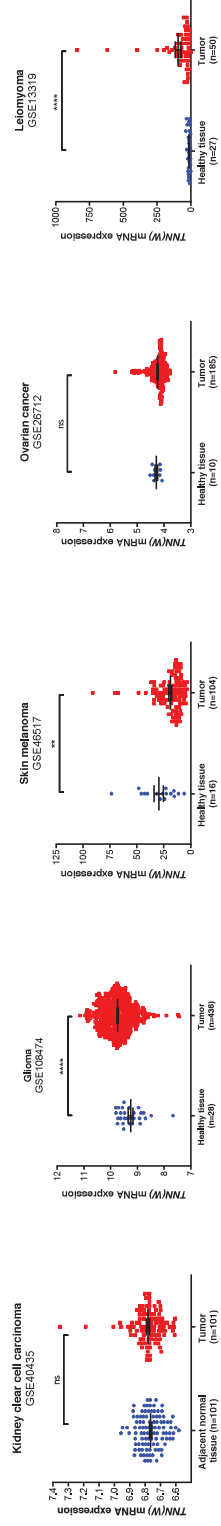
E



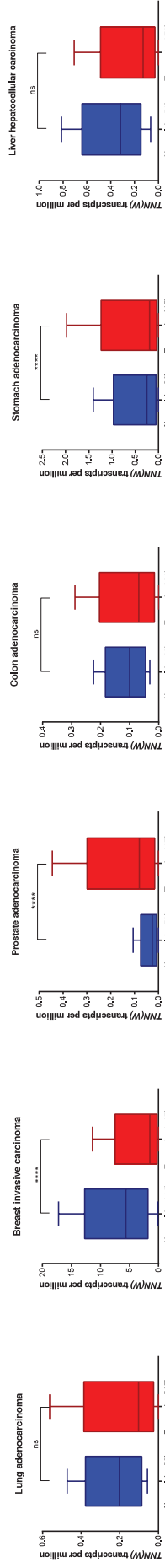
A



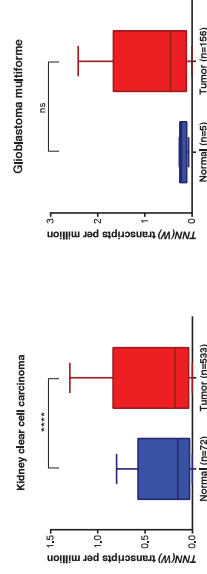
B



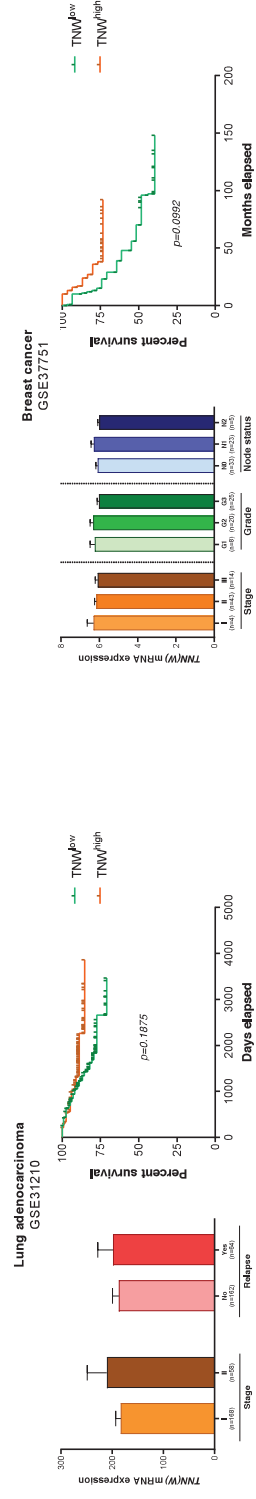
C



D



E



DEUXIÈME ARTICLE ET REVUE

Rôle des protéines matricielles dans la carcinogenèse pancréatique – Focus sur la TNX

Préambule

Le cancer du pancréas est actuellement la 7^{ème} cause de décès par cancer, et est prédit pour en devenir la deuxième si aucun progrès thérapeutique ou diagnostique n'est fait d'ici 2030. Parmi les différents types de tumeurs pancréatiques, l'adénocarcinome canalaire pancréatique (ADKP) est le plus répandu ainsi que le plus agressif, avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 10%. Face à ce tableau clinique sombre, il est important de mieux comprendre la biologie de ce cancer, ainsi que les mécanismes de résistance aux traitements.

Le développement de l'ADKP est particulier, puisqu'il démarre très en amont, avec le développement puis l'aggravation de lésions pré-néoplasiques, notamment les PanINs (Pancreatic Intraepithelial Neoplasias). Ces lésions, qui proviendraient principalement de la transformation de cellules acineuses (métaplasie acino-canalaire), progressent selon un modèle linéaire largement étudié. Leur évolution comprend la perte de la polarité cellulaire et l'apparition d'aberrations nucléaires, et mène au cancer invasif après rupture de la lame basale. Dans l'ADKP, le stroma tumoral est particulièrement important, puisqu'il peut représenter jusqu'à 90% de la masse tumorale (60% en moyenne). Il est majoritairement composé de fibroblastes « associés au cancer », de cellules immunitaires et d'une matrice extracellulaire (MEC) très abondante. Les protéines de cette MEC sont connues pour avoir de multiples rôles, comme le soutien et la modification du comportement des cellules stromales ou tumorales, selon leur nature, leur organisation et leur abondance.

Au cours de ma thèse, j'ai encadré Jonathan BALAS, étudiant en stage de Master 2 recherche « Cancer ». Dans ce cadre, Jonathan et moi avons eu l'opportunité de participer à la rédaction d'une mini-revue publiée dans une issue spéciale de *Frontiers in Immunology*. Cette mini-revue, insérée ci-après, met en lumière l'importance du compartiment stromal au cours de la carcinogenèse pancréatique et décrit les protéines majeures composant ce microenvironnement tumoral ainsi que les stratégies thérapeutiques développées et ciblant ces mêmes protéines (Liot *et al.*, 2021).

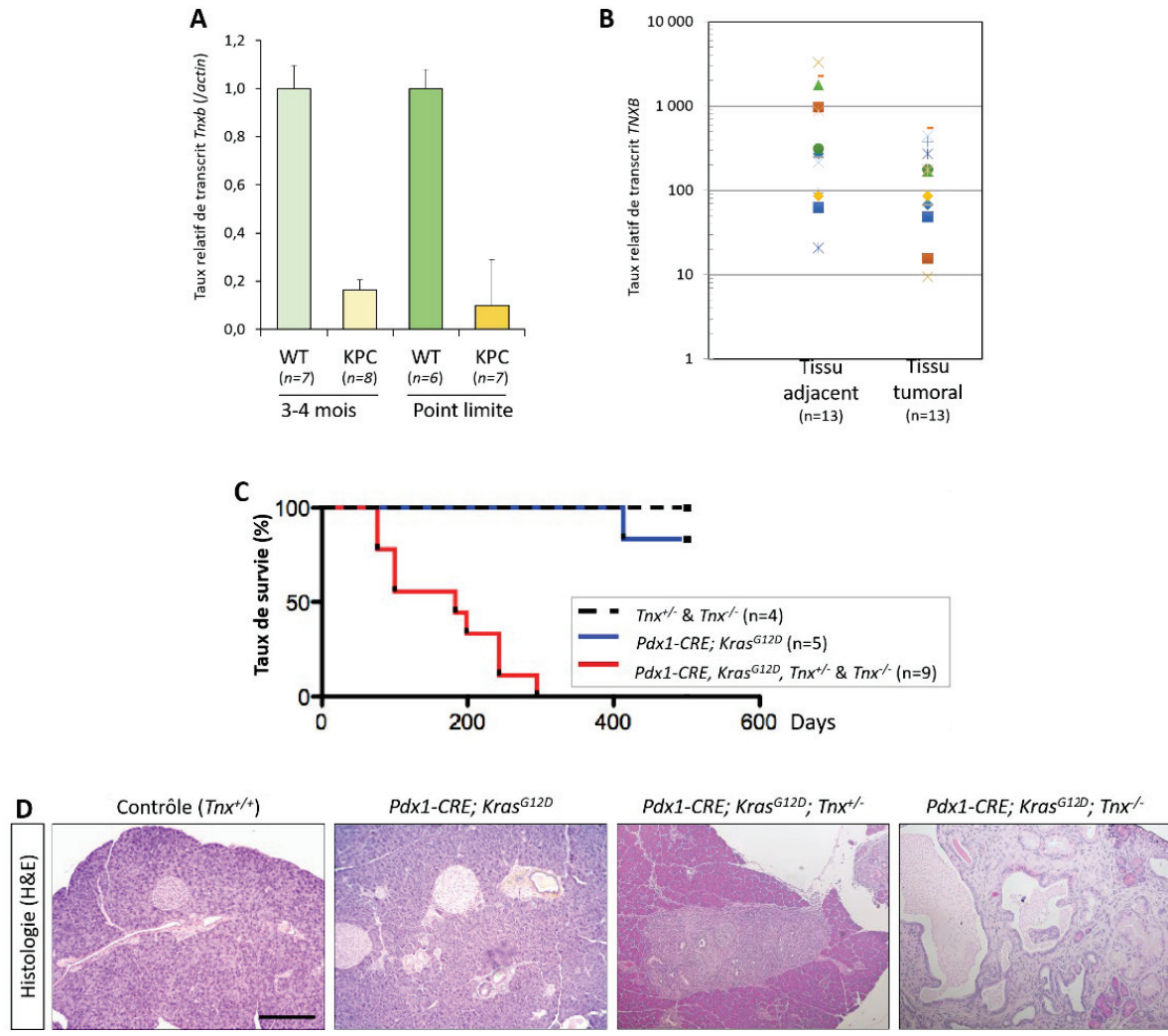


Figure 22 : Résultats préliminaires de l'étude du rôle de la TNX dans la carcinogénèse pancréatique. A et B : Analyse du taux de transcrits TNXB dans les échantillons d'ADKP murins (A) ou humains (B). C : Suivi longitudinal (étude de survie) de souris « KC » déficientes ou non pour la *Tnx*. D : Observations histologiques de lésions pré-néoplasiques observées dans les pancréas de souris KC déficientes ou non pour la TNX et âgées de 180 jours.

Parmi les protéines du microenvironnement tumoral de l'ADKP, la Ténascine-C, une glycoprotéine matricielle, est impliquée dans ce processus, et favorise notamment l'invasion et la dissémination des cellules tumorales. En revanche, les autres membres de la famille des Ténascines n'ont pas été étudiés dans le contexte de l'ADKP, et leur statut et leur rôle restent donc méconnus.

Après avoir montré la dérégulation de la TNX dans un grand nombre de tumeurs solides humaines, il était donc intéressant d'étudier le statut de la TNX dans l'ADKP. Ainsi, le premier axe de cette étude fut l'analyse de l'expression de la TNX au niveau ARNm et protéique dans des échantillons d'ADKP humains. En outre, peu d'études mécanistiques existent concernant un potentiel rôle oncosuppressif de la TNX. Dans la littérature, deux études successives d'une même équipe de recherche ont montré une plus forte croissance et invasion tumorale dans des souris KO pour la TNX, après injection de cellules de mélanome dans les coussinets. A l'inverse, l'injection de cellules tumorales chez des souris KO pour la TNC entraîne une plus faible croissance tumorale et moins de dissémination, en cohérence avec le rôle pro-tumoral largement décrit pour ce membre de la famille des Ténascines. Ces études, bien qu'incomplètes et ne possédant pas d'analyse mécanistique, soutiennent l'idée d'un effet oncosuppressif de la TNX à l'opposé de celui de la TNC, comme suggéré par sa forte diminution dans les tissus tumoraux.

Face à ces données, mon projet princeps de thèse était donc l'élucidation du rôle de la TNX dans la carcinogenèse pancréatique. Ce projet se basait sur des résultats préliminaires obtenus au CRCL (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, où a débuté ce projet avant la promotion d'Ulrich Valcourt au LBTI) l'année précédent mon arrivée au laboratoire (**Figure 22**). Ces travaux avaient notamment montré une baisse drastique d'expression du gène *Tnxb* dans des échantillons tumoraux de souris « KPC » (LSL:*Kras*^{G12D};*p53*^{R172H};*Pdx1*-CRE), qui reproduisent très rapidement l'ADKP invasif retrouvé chez l'Homme (**Figure 22A**). En outre, une diminution d'expression du gène *TNXB*, bien que non significative, avait pu être détectée par RT-PCR quantitative dans des échantillons tumoraux humains, par rapport aux tissus adjacents « histologiquement sains » (**Figure 22B**). A la suite de cela, une cohorte de souris « KC » (LSL:*Kras*^{G12D};*Pdx1*-CRE) déficientes ou non pour la *Tnx* avait été établie, afin d'observer le développement de lésions pré-néoplasiques puis néoplasiques. Cette cohorte pilote avait montré une plus faible survie des souris KC;*Tnxb*^{+/-} et KC;*Tnxb*^{-/-} (**Figure 22C**). Une analyse histologique du pancréas de ces souris suggérait une accélération du développement des lésions (pré)néoplasiques en absence de la TNX (**Figure 22D**). Ainsi, l'hypothèse d'un rôle oncosuppressif de la TNX dans la carcinogenèse pancréatique semblait cohérente, mais restait à confirmer grâce à une cohorte de plus grande ampleur.

Mon projet principal de thèse visait donc à confirmer ces résultats et en comprendre les mécanismes. Pour cela, trois axes avaient été définis, avec (1) la description du statut de la TNX dans des échantillons d'ADKP humains, (2) la détermination de l'effet de la TNX sur la carcinogenèse pancréatique *in vivo*, dans le modèle KC, et (3) l'analyse des mécanismes cellulaires de la TNX grâce à un modèle *in vitro* en trois dimensions. Cependant, nous avons été confrontés à différents verrous techniques et scientifiques, ce qui explique l'évolution de ce projet. L'article présenté ici s'intéresse donc plus en détail à la dynamique d'expression de la TNX au cours de la carcinogenèse pancréatique et aux possibles conséquences sur le comportement des lésions.

Dans cette étude, nous montrons que le taux de TNX est drastiquement diminué dans des échantillons humains d'ADKP, au niveau ARNm et protéique. Des analyses *in silico* réalisées à partir de données de microarray extraites de la littérature via l'interface Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) suggèrent que la diminution d'expression de *TNXB* serait effective aussi dans le modèle de souris « KC » (données non montrées). Dans un deuxième temps, nous avons analysé la présence de TNX par immunofluorescence dans des souris « KC » âgées de 50, 100, 150 et 200 jours, et montré que la TNX ne disparaissait pas dès les premières étapes de la carcinogenèse, mais que son dépôt serait plutôt dynamique. En effet, nous avons observé (1) une augmentation de la quantité totale de TNX sur les coupes de pancréas avec le temps et (2) un renforcement du marquage TNX autour des lésions de type ADM ou PanINs de bas grade, formant comme une « gaine » autour d'un ensemble de lésions, qui s'amointrit puis semble disparaître dans les stades les plus avancés. En revanche, le stroma situé à proximité directe des lésions et positif pour α SMA (marqueur des fibroblastes activés) est négatif en TNX. Ces données suggèrent que le dépôt de TNX est régulé au cours de la carcinogenèse pancréatique, avant sa disparition, et que la TNX ne participe pas à la réaction desmoplastique.

Enfin, une analyse bioinformatique de *Gene Ontology* des cohortes étudiées précédemment (tissus tumoraux humains) a montré que les tumeurs à faible taux de *TNXB* présentaient une sur-représentation des termes associés au cycle cellulaire, suggérant que la TNX pourrait influencer sur la prolifération des cellules tumorales et/ou stromales. Par ailleurs, plusieurs termes liés au système immunitaire et à l'inflammation étaient sous-représentés dans les ADKP présentant une faible expression de *TNXB*, suggérant que la TNX pourrait être impliquée dans la régulation de l'inflammation.

Une large étude *in vivo* a été menée durant cette thèse, visant à étudier le rôle potentiellement protecteur de la TNX. Dans ce but, nous avons comparé les lésions pancréatiques de souris « KC » déficientes ou non en TNX. Malheureusement, nous n'avons pu mettre en évidence aucune différence entre ces deux groupes, que ce soit en termes de progression tumorale (quantité de lésions) ou de caractérisation des lésions (prolifération, fibrose, activation des fibroblastes). Dans le modèle de souris « KC », l'absence de TNX dans le pancréas n'est donc pas un facteur favorisant l'apparition de lésions pancréatiques, et n'influe pas sur le phénotype des lésions qui se développent ; ce qui sera discuté par la suite.

Ces derniers résultats ne ferment cependant pas la porte à un rôle potentiellement oncosuppresseur de la TNX. En effet, l'article présenté ci-après démontre une dynamique d'expression de la TNX au cours de la carcinogenèse pancréatique, qui pourrait être une réponse du tissu conjonctif environnant au développement des cellules (pré)néoplasiques. Ainsi, une caractérisation de ce microenvironnement, ainsi que des analyses *in vitro* permettraient une meilleure compréhension du rôle de la TNX dans ce processus tumoral, comme expliqué dans la partie Discussion générale.

Tenascin-X dynamic deposition during pancreatic carcinogenesis – towards a protective role ?

Short title: TNX dynamic deposition during pancreatic carcinogenesis

Sophie LIOT¹, Valérie HERVIEU², Céline SCHMITTER¹, Naïma EL KHOLTI¹, Jonathan BALAS¹, Claire LETHIAS¹, Sylvie RICARD-BLUM³, Alexandre AUBERT¹, Perrine MERCIER-GOUY¹, Laura PRIGENT¹, Laurent BARTHOLIN⁴, Bernard VERRIER¹, Ulrich VALCOURT^{1,*,#} and Elise LAMBERT^{1,*,#}

¹ Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTI), UMR CNRS 5305, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, 7, passage du Vercors, F-69367 Lyon Cedex 07, France.

² Service d'Anatomopathologie, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

³ Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, INSA Lyon, CPE, Institute of Molecular and Supramolecular Chemistry and Biochemistry, UMR 5246, F-69622 Villeurbanne Cedex, France

⁴ 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 contributions

Correspondence should be addressed to U.V. (ulrich.valcourt@ibcp.fr) and E.L. (elise.lambert@ibcp.fr)

Acknowledgments

We acknowledge the contribution of Federative Structure of Health Research Lyon-Est CNRS UMS3453 / INSERM US7 and particularly the microscopy platform (CIQLE) and the animal facility (ALECS module SPF). Additionally, we greatly thank members of the histology and imaging facility (PrlmaTiss) at the LBTI institute. Finally, we acknowledge Dr. Philippe BERTOLINO and Dr. Laurent BARTHOLIN for providing us the KRAS^{G12D}-driven mouse model and for constructive advice regarding the project. SL is recipient of PhD student fellowship from the French government (NMRT). This work was supported by the “Ligue Nationale contre le Cancer, Comité du Rhône”, “Comité de l’Allier”, “Comité de Savoie” and “Comité de la Drôme”, as well as by the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer” (PJA 20141201790).

Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) represents about 90% of pancreatic cancers, and is one of the deadliest cancers, with a 5-year relative survival rate below 10%, due to late diagnosis and poor therapeutic efficiency. Throughout PDAC progression, a dense extracellular matrix (ECM) is deposited around neoplastic cells and accompanies tumor development and aggressiveness. This important stroma, both in terms of quantity and through its impact on tumoral cells, is now considered as a target for innovative therapies for patient survival improvement. Among ECM proteins, Tenascins (TNs) are a family of four glycoproteins (TNC, TNW, TNR and TNX) sharing a common modular structure, but exhibiting different expression patterns and functions depending on the physiological and physio-pathological contexts. In cancers, TNC and TNW are generally up-regulated and associated with poor prognosis, and TNC is notably considered as a pro-tumoral actor in PDAC. At the opposite, TNX is lost in numerous solid tumors, but its status and role in PDAC remains to be elucidated. Herein, we first demonstrated *TNXB* gene expression and TNX protein level are drastically decreased in human PDAC samples, and this loss tends to be correlated with higher grade tumors and reduced survival of patients. In Kras^{G12D}-driven mouse model of PDAC, we surprisingly observed that TNX deposition is dynamic during carcinogenesis, as it is first reinforced around cells undergoing ADM, and around low grade PanINs, slowed down at intermediate grade PanINs, before being decreased in later stages. Finally, we correlated *TNXB* low expression in human PDAC samples to increased proliferation and dysregulated immune system, suggesting that TNX could regulate tumor progression during the initial steps of PDAC development.

Keywords : Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma (PDAC), stroma, ExtraCellular Matrix (ECM), Tenascin (TN), Tumor MicroEnvironment (TME).

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) represents about 90% of pancreatic cancers, and is one of the deadliest cancers worldwide, with a 5-year relative survival rate below 10%^{1,2}. This poor prognosis relies on the difficulty of diagnosis and poor therapeutic solutions available. Indeed, PDAC develops without specific symptoms, and patients are thus at an advanced stage at diagnosis, with locally advanced or metastatic tumors³⁻⁵. As a consequence, only 20% of tumors are resectable and conventional chemotherapy is poorly effective, extending patient lifespan by only few months⁶. Thus, pancreatic cancers were ranked as the seventh cause of cancer mortality worldwide in 2018 and 2019⁷ (<https://gco.iarc.fr/>), and are predicted to become the second leading cause of cancer-related deaths in industrialized countries by 2030, if no significant progress is made^{8,9}.

PDAC classically develops from precursor lesions, the main ones being Pancreatic Intraepithelial Neoplasias (PanINs). These pre-neoplastic lesions progress according to a linear model, and are classified into different grades characterized by the evolution of epithelial cell morphology. Low-grade PanINs (PanIN-1) present a flat (PanIN-1A) or papillary (PanIN-1B) epithelium with elongated cells having normal nucleus and conserved polarity. The PanIN-2 stage is characterized by a loss of cell polarity, leading to a pseudo-stratified epithelium, and some nucleus aberrations. Finally, high-grade PanINs (PanIN-3), also referred as carcinoma *in situ*, display a multi-stratified epithelium and invasion of duct lumen¹⁰⁻¹³. Invasive PDAC then arises after basement membrane rupture and invasion of the underlying tissue by tumor cells. The question of the identity of the cells at the origin of PDAC is still controversial. Ductal morphology of tumor cells suggests a ductal origin, but the privileged hypothesis now is that acinar cells, the most abundant cells in the pancreas, undergo transition to a ductal phenotype through a process called acinar-to-

ductal metaplasia (ADM)^{14,15}. This process is observed during acute and chronic pancreatitis and could represent the initial step towards the development of PanINs¹⁶⁻¹⁹. In addition, PDAC development is accompanied by the accumulation of genetic alterations in (pre)-neoplastic cells, from *KRAS* oncogene activation, to tumor suppressor loss such as *CDKN2A*, *TP53* and *SMAD4*, and finally culminates with around 60 mutations in PDAC tumors^{20,21}.

PDAC is also characterized by an intense desmoplastic reaction around lesions, *i.e.* an excessive extracellular matrix (ECM) deposition due to the recruitment of activated fibroblasts originating from (1) resident fibroblasts, (2) Pancreatic Stellate Cells (PSCs), or (3) bone marrow^{22,23}. Thus, the connective tissue surrounding pancreatic cells increases from 5% in normal pancreas, to about 60% in tumor mass (up to 90% in some cases)²⁴. This dense stroma, associated with hypovascularisation, acts as a physical barrier against conventional chemotherapies, and has been correlated with poor prognosis^{25,26}. Initially ignored, tumor microenvironment (TME) is now the subject of intense research, as it influences tumor progression and thus represents a new therapeutic target. However, therapeutic strategies based on stromal cell suppression failed^{27,28}, revealing that stroma also contains anti-tumor components and highlighting the high complexity and interest of this particular compartment²⁹.

Normal ECM is a meshwork of proteins, mostly composed of fibers (elastic and collagens), glycoproteins (among which fibronectins and laminins) and proteoglycans (glycosaminoglycans anchored to glycoproteins)^{30,31}. While historically described as an inert support for cells with only an architectural role, ECM is now known to influence cell behavior either (1) directly, by interacting with cells, or (2) indirectly by sequestering cytokines and growth factors, that can be released in

response to a stimulus³². This signaling role has been evidenced not only for constitutive ECM in healthy connective tissue, but also for the tumor-surrounding ECM. Indeed, many matrix proteins can modify cancer cell behavior, and thus be involved in cancer progression³³, as we recently reviewed for the particular case of PDAC²⁹.

Matricellular proteins are a group of matrix proteins with mostly no structural role but able to modify cell behavior³⁴. Among them, tenascins (TNs) are a group of 4 glycoproteins (TN-C, -R, -W, -X) sharing a common modular structure: (1) an oligomerization domain involved in subunit trimerization through coil-coil interactions, (2) repeats of EGF-like domains, (3) Fibronectin-type III domain repetitions (FN-III), and (4) a final Fibrinogen-like globular domain (FBG)³⁵, Aubert *et al*, 2021, in revision. Although belonging to the same family, TNs display very different spatio-temporal expression patterns in physiological contexts, and their expression and role in tumor progression have been unequally studied.

Tenascin-C (TNC), which forms hexamers thanks to a disulfide bond between two trimers, is the most studied of the four TNs. This protein is notably expressed during development, at the embryonic epithelio-mesenchymal interface, around motile cells, during branching morphogenesis, and in developing smooth muscle, bone and cartilage. In adults, its expression is drastically restrained to some stem cell niches, tendons, myotendinous junctions and nervous system^{36,37}. However, TNC is *de novo* expressed in several pathological contexts, such as carcinogenesis^{38,39}. Indeed, TNC expression is considered as a marker of tumor progression and is correlated with bad prognosis in many cancers such as several digestive tract tumors, prostate and breast cancers and melanoma^{38,40-45}. Tenascin-W (TNW) expression has been far less studied, but is also

detected during embryogenesis, notably at sites of osteogenesis, and is restricted to periosteum, kidney and some muscles in adults⁴⁶⁻⁴⁸. As TNC, its expression is increased in numerous solid tumors, including breast, colorectal, prostate, lung, ovarian and brain cancers and in melanoma^{47,49-51}. Tenascin-R (TNR) presents an even more restricted expression pattern, being exclusively expressed in the developing and adult nervous system⁵²⁻⁵⁵. Status of TNR during tumor progression is more controversial, as TNR has been found overexpressed in some but not all brain tumors⁵⁶. Finally, Tenascin-X (TNX), the largest member of the TN family (450kDa) encoded by *TNXB* gene, presents a very broad expression pattern. Indeed, it is expressed from late developmental stages, suggesting a role during organogenesis, and persists in adult connective tissues of numerous organs⁵⁷⁻⁵⁹. Within these tissues, TNX plays a dual role, with (1) an architectural function for collagenous network organization, as it has been suggested to regulate the spacing between collagen fibers⁶⁰⁻⁶², and (2) a matricellular role, due to its ability to modulate cell adhesion, and to regulate growth factor bioavailability, notably that of TGF- β ⁶³, Aubert *et al*, 2021, in revision.

Compared to TNC and TNW, the status and the role of TNX during tumor progression was quite controversial until recently. Indeed, only sparse and quite old data existed regarding TNX expression in tumors, and the studied cancers corresponded to rare carcinomas⁶⁴⁻⁷². In a previous study, we thus studied the expression of TNX in many cancers, including the 6 most incident and deadliest cancers worldwide. In this work, we demonstrated (1) TNX expression is downregulated in almost all studied cancers - excepted in brain tumors, in which TNX levels are increased - and (2) low level of *TNXB* expression in lung and breast tumors is associated with reduced patient survival⁷³.

Along with this observation, in a study gathering 15 tumor types, Chakravarthy and colleagues demonstrated that *TNXB* is one of the most significantly downregulated gene in cancer samples, compared to the corresponding healthy tissue⁷⁴. In addition, Matsumoto and colleagues demonstrated that melanoma cells injected in the foot pad of *TNX*-deficient mice led to an increase of primary tumor size and lung metastases compared to *Tnxb*^{+/+} mice⁷⁵. Altogether, these studies suggest *TNX* could have a protective role against tumor development and progression.

Herein, we aimed at (1) determining *TNX* status in the particular case of PDAC, (2) following *TNX* deposition along pancreatic carcinogenesis, and (3) elucidating its potential role in tumor progression. Thus, we first demonstrated that *TNXB* transcript and *TNX* protein levels are drastically decreased in human PDAC samples, which tends to be correlated with higher grade tumors and reduced survival of PDAC patients. Using a *Kras*^{G12D}-driven mouse model of pancreatic cancer, we observed *in vivo* that *TNX* deposition is dynamic during first steps of carcinogenesis. Indeed, *TNX* is first highly deposited around cells undergoing ADM and low grade PanINs, then slightly reduced in intermediate grade PanINs, before being clearly decreased in later stages. Finally, we correlated *TNXB* low expression in human PDAC samples to increased proliferation and dysregulated immune system, suggesting that *TNX* could limit tumor progression during the initial steps of PDAC development.

Materials and Methods

Human tissue analyses

In silico analyses

In order to study *TNXB* gene expression in PDAC tumors, microarray datasets were selected from the NCBI GEO database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>). Two datasets (GSE62452 and GSE15471, 60 and 36 patients, respectively) were analyzed with GEO2R analysis tool, which compares both groups using LIMMA (Linear Models for Microarray Analysis) R package (Bayesian statistics). Differentially expressed genes (D.E.G.) in PDAC versus normal adjacent tissue were extracted (Benjamini & Hochberg (False discovery rate) adjusted p-value < 0.05), and *TNXB* ID was studied. *TNXB* normalized expression values were then obtained for each sample and Gaussian distribution was verified. Expression values were plotted and PDAC and normal adjacent tissue groups were compared using t-test.

Patient survival and enriched pathways were then studied on the GSE62452 dataset. To do so, first and last quartiles based on *TNXB* expression values in tumor samples allowed to define 2 groups: *TNXB*^{low} and *TNXB*^{high} tumors, respectively (25% of patients with the lowest values = *TNXB*^{low}, 25% with the highest values = *TNXB*^{high}). Cumulative survival proportions were estimated using the Kaplan–Meier method and *TNXB*^{low} and *TNXB*^{high} groups were compared thanks to Log-Rank (Mantel-Cox) statistical test. Finally, new GEO2R analysis was achieved comparing those groups and Gene Ontology was performed on the D.E.G. using Functional Annotation Tools of DAVID online software^{76,77}. Enriched pathways were represented thanks to the Reactome online tool⁷⁸.

Immunohistochemistry (Tissue Micro array)

For TNX immunodetection on human PDAC tissue, commercially available Tissue Micro Array (TMA) slide - including 62 tumors and matched normal tissues adjacent to the tumor (NAT) (US Biomax, HPanA150CS03) - was used. Immunohistochemistry (IHC) staining was performed using R.T.U. Vectastain Universal Elite ABC Kit (VectorLabs, PK-7200) following manufacturer's instructions. After deparaffinization and rehydration, antigen retrieval was achieved in sodium citrate buffer (pH 6) for 20min at 98°C followed by a 20min cooling time. Then, endogenous peroxidases were quenched by 3% H₂O₂ and sections were saturated (2.5% (v:v) normal horse serum in PBS). Primary antibody (sc-271594, Santa Cruz, 1/100) was incubated in blocking solution overnight at 4°C and biotinylated-secondary antibody for 30min at room temperature. Development was performed using R.T.U. ABC Reagent (30min incubation) and 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, VectorLabs SK-4105). Finally, nuclei were counterstained with Gill's Hematoxylin, sections were mounted with DEPEX and tissue cores were scanned using AxioScan.Z1 microscope (Zeiss).

Image analysis

Each imaged core was extracted by QuPath software (<https://qupath.github.io/>) and analyzed using Fiji software (<https://fiji.sc/>) as previously described⁷³. Stromal and epithelial tissues were separated thanks to Fiji Trainable Weka Segmentation plugin ([https://imagej.net/Trainable Weka Segmentation](https://imagej.net/Trainable%20Weka%20Segmentation)). The segmentation training was newly performed for each tissue core because of histological differences between tumoral and normal samples. Colors were then separated by "H DAB" Colour Deconvolution and DAB staining was quantified in the stromal region (mean grey value). Reciprocal mean grey value (255 – mean grey value) was considered, as LookUp Table (LUT) is inverted in Fiji software.

Additionally, TNX protein staining intensity in stroma was blindly evaluated by an anatomopathologist specialized in pancreatic cancers (Dr. Valérie Hervieu, Lyon, France^{79,80}).

Mouse tissue analyses

Animals

LSL:*Kras*^{G12D} (B6.129S4-*Kras*^{tm4Tyj}/J strain, The Jackson Laboratory) and *Pdx1*-Cre (B6.FVB-Tg(*Pdx1*-cre)6Tuv/J strain, The Jackson Laboratory) mouse strains were previously described⁸¹⁻⁸³ and respectively provided by Dr. Philippe Bertolino and Dr. Laurent Bartholin (CRCL, Lyon, France). Mice were maintained in a pathogen-free animal facility at the "ALECS SPF module" (Lyon, France) and crossed in order to obtain [LSL:*Kras*^{G12D};*Pdx1*-Cre] mice, also named "KC" mice⁸³. All procedures were approved by an ethic committee under regulatory of governmental authority (CECCAPP n°ENS_2018_023, APAFIS #16242-201804271428498). Animals were genotyped one week after birth and euthanized at 50-, 100-, 150- and 200-days post-parturition. After dissection, pancreas were directly embedded in OCT (Optimal Cutting Temperature) compound, snap-frozen in cold isopentane and kept at -80°C until sectioning.

Immunofluorescence

To analyze TNX levels in pancreas of 50-, 100-, 150- and 200-day-old KC mice and their correlations with reactive stroma, (co)-immunofluorescence experiments (TNX with α SMA, and CK19 alone) were achieved on serial 10 μ m cryosections. Immediately after sectioning, slices were fixed in cold methanol (-20°C) for 10min and immunofluorescent staining was performed as follow. After 10min permeabilization with 0.5% Triton-X100 in PBS, aspecific sites were blocked using horse serum (2.5 to 5% (v:v) in PBS). Primary antibodies (TNX, 1/100, produced in laboratory⁵⁸; CK19, 1/100, TROMA-III-s (DHSB) and α SMA, 1/2000, GTX100034 (GeneTex)) were applied overnight at 4°C and secondaries coupled with

fluorochrome were incubated for 45min at room temperature. Slides were then mounted using Fluoromount Medium with DAPI (VectorLabs, H-1200). In parallel, Hematoxylin and Eosin staining was performed on serial sections in order to better identify pancreatic lesions.

Image analysis

All sections were imaged using the slide scanner AxioScanSP5 X (Zeiss) at CIQLE (Lyon, France). Images were quantified using QuPath (<https://qupath.github.io/>) software. A simple tissue detection was first made in order to measure the total area of pancreas in the image, and TNX staining was quantified thanks to Pixel classification in whole pancreas and around each identified lesion, taking care of keeping same Brightness and Contrast values between sections.

Statistical analyses (image quantifications)

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 software. Unless otherwise noted, data were presented as mean \pm SEM. After image analysis, groups were compared either by non-parametric one-way ANOVA (Kruskal Wallis test, if more than 2 groups to compare) or non-parametric mean comparison tests (Wilcoxon Rank sum for paired data, Mann-Whitney for unpaired data). *P*-values < 0.05 were considered significant (**** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$).

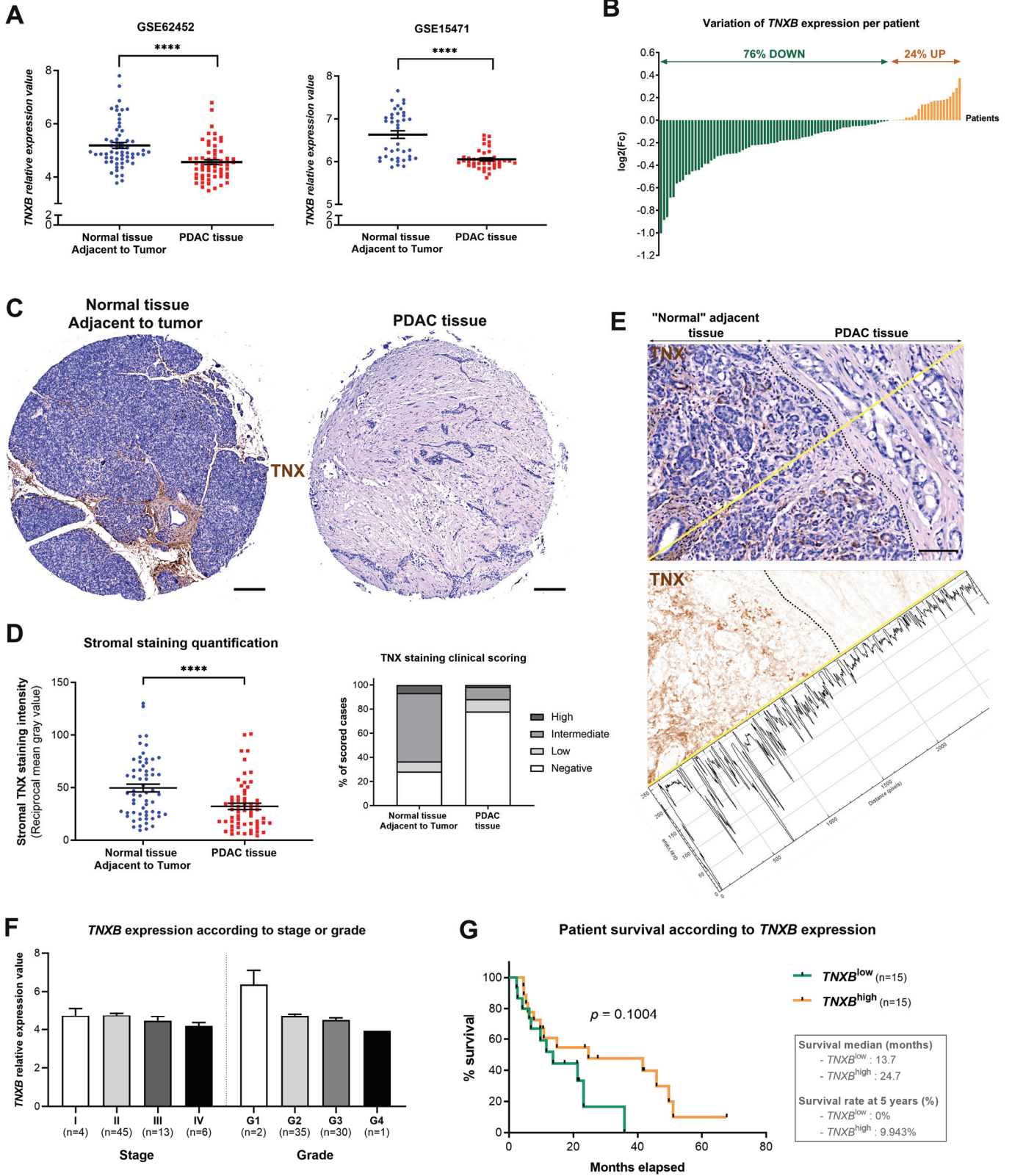
Results

TNX expression is decreased in human PDAC samples at mRNA and protein levels, and low *TNXB* expression predicts of a poorer patient survival

In this study, we first determined the status of *TNXB* gene expression in human PDAC samples. To do so, we curated microarray datasets comprising total resected PDAC and normal tissue in the NCBI GEO database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). We included datasets with elevated number of patients (>20), and in which controls were paired (matched normal tissue adjacent to the tumor, NAT) to avoid inter-patient variability, leading to the selection of two cohorts: GSE62452 (60 patients) and GSE15471 (36 patients). On both, we performed GEO2R analysis, allowing to determine differentially expressed genes (D.E.G.) between tumoral and NAT groups, and found *TNXB* transcript in the D.E.G. (downregulated in both cohorts). We then extracted and plotted normalized expression values for the ID corresponding to *TNXB* gene and compared both groups (tumor and NAT) by a classic paired t-test. We thus showed that *TNXB* mRNA level was significantly decreased ($p < 0.0001$) in PDAC samples compared to NAT samples, in both cohorts (Figure 1A). Additionally, we determined the fold change between tumor and NAT tissue for each patient, and evidenced that almost 75% of patients had a decreased *TNXB* expression in their tumor (Figure 1B).

At the protein level, we immunodetected TNX on a Tissue Micro Array (TMA) slide containing 62 PDAC samples associated with NAT samples (Figure 1C). We quantitatively measured TNX level in stromal compartment of normal and tumoral pancreas and observed a significant decrease of TNX labelling in the stroma of PDAC tissues, compared to connective tissue of adjacent non-tumoral cores (Figure 1D, left). Additionally, TMA slide was analyzed by an anatomopathologist specialized on pancreatic cancers, who scored each core in 4 categories: negative, low, intermediate or high TNX

Figure 1



stromal level. Almost 80% of PDAC cores were scored as negative, compared to 30% for NAT cores, for which 50% presented an intermediate level of TNX in their connective tissue (Figure 1D, right). Interestingly, we also pointed out that in the same core, TNX labelling was negative in tumor part, while it was positive in the normal tissue adjacent to the tumor. This was notably visible by plotting the histogram of DAB (TNX) labelling following one line passing through adjacent and PDAC tissue. We thus clearly observed that NAT revealed an elevated DAB level, while tumor tissues were weak for DAB (Figure 1E). These three results demonstrated that TNX protein level is drastically decreased in the stroma of human PDAC.

Finally, to determine if this loss of TNX expression was correlated with disease progression, and if this could be deleterious for patients, we first plotted *TNXB* expression values depending on AJCC stages or WHO grades, indicated for each patient in the GSE62452 cohort. We did not observe any difference in *TNXB* expression level between patients with different AJCC stages, which reflects the anatomical advancement of the tumor (Figure 1F, left). However, we were able to observe a trend corresponding to a decrease of *TNXB* gene expression in the tumors with the

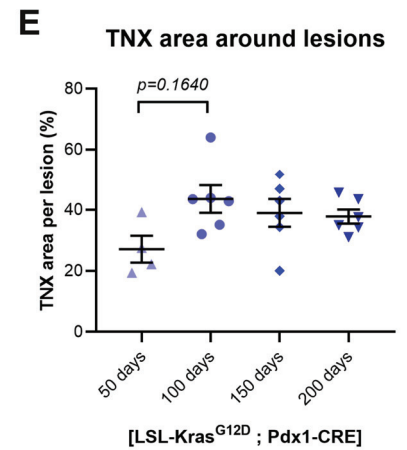
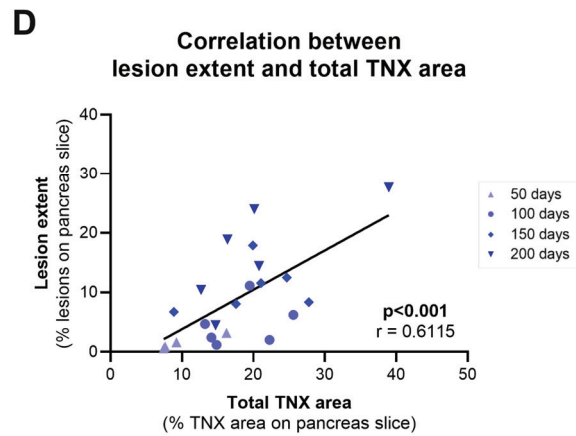
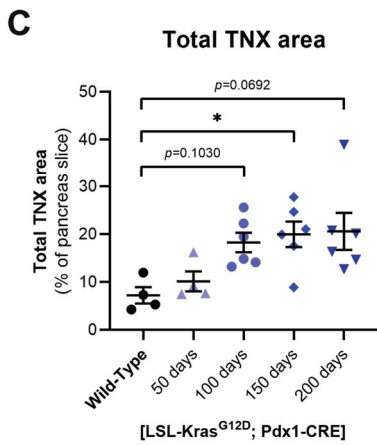
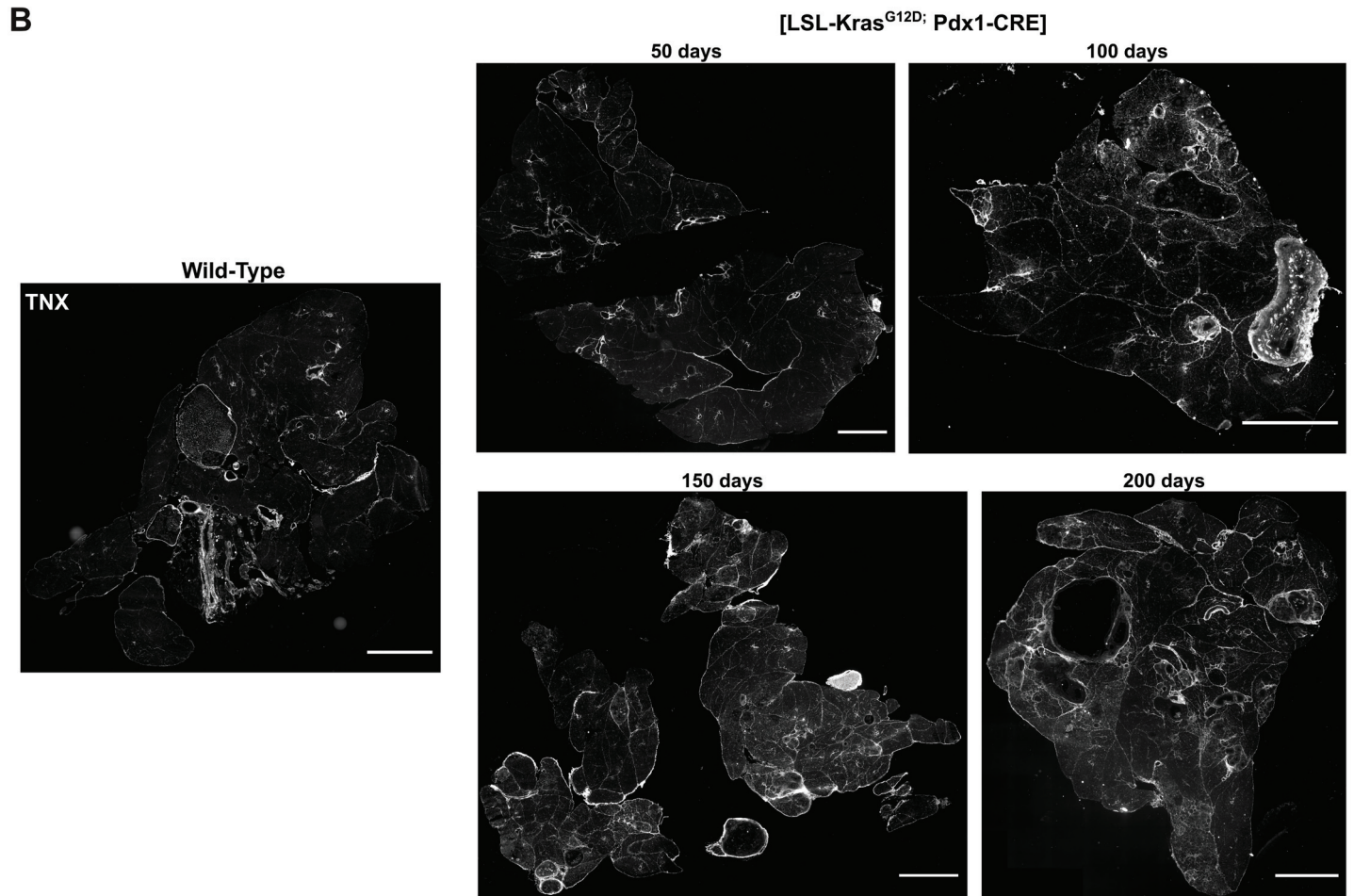
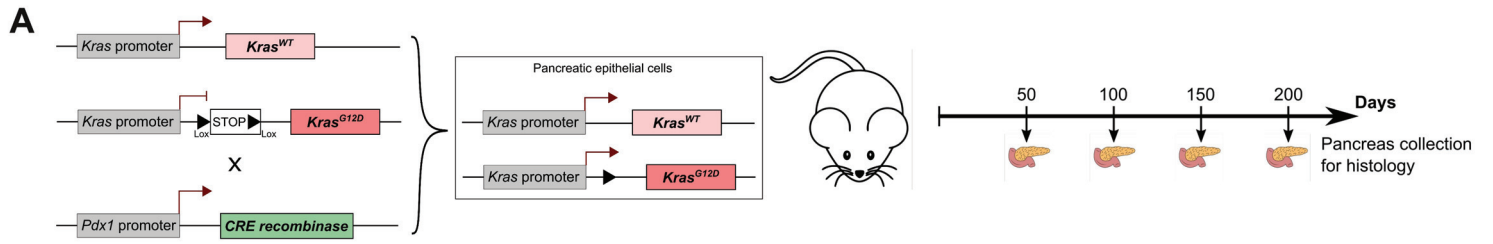
highest grades, which are the less differentiated (Figure 1F, right). We then divided the GSE62452 cohort of patients in two groups, according to *TNXB* expression values in PDAC samples. *TNXB*^{high} and *TNXB*^{low} patients respectively correspond to those with the highest and the lowest *TNXB* expression in their tumor (first and last quartiles). Thanks to survival data provided in GSE62452, we drawn cumulative survival proportions using the Kaplan–Meier method. Interestingly, and even if results are not significant, probably due to the weak number of patients, *TNXB*^{low} tumors seemed to be of bad prognosis, compared to *TNXB*^{high} tumors (Figure 1G). This was notably visible when comparing *TNXB*^{high} versus *TNXB*^{low} patients in terms of median survival (24.7 months versus 13.7 months, respectively), and survival rate at three (39.7% versus 0%, respectively) and five years (9.9% versus 0%, respectively) (Figure 1G). Thus, low *TNXB* expression in tumor seems to be associated with bad prognosis for patients suffering from PDAC.

We thus demonstrated here that *TNXB* mRNA and TNX protein levels are markedly decreased in human PDAC samples, and that low *TNXB* expression could predict poor prognosis for patients.

Figure 1: TNX loss in human PDAC samples could predict bad prognosis

A- *TNXB* normalized expression values for the two selected GEO datasets (individual values with mean \pm SEM). B- $\text{Log}_2(\text{Fold change})$ between PDAC and normal tissue adjacent to the tumor (NAT) for patients from both cohorts. Green and orange bar indicates negative and positive $\text{Log}_2(\text{Fc})$, respectively. C- Representative images of NAT and PDAC cores from analyzed TMA. Scale bar = 200 μm . D- Left: Quantitative analysis of TNX labelling in the stromal compartment of PDAC and NAT cores of TMA. Right: Clinical scoring of TNX staining in stromal part of PDAC and NAT cores of TMA by an anatomopathologist. E- Top: Image from PDAC tissue core with tumoral and non-tumoral tissues, with Gill's hematoxylin counterstain. Scale bar = 100 μm . Bottom: Same image with only DAB (TNX) staining and histogram (DAB level) following yellow line. F- *TNXB* gene expression values according to AJCC stage or WHO grade for patients from the GSE62452 cohort (mean + SEM). Number of patients in each group is indicated (n=). G- Cumulative survival proportion depending on high (orange) or low (green) *TNXB* transcript level in PDAC samples from patients of the GSE62452 cohort. Survival median and survival rate at 5 years for each group of patients are indicated in gray.

Figure 2



TNX deposition is increased in first steps of pancreatic carcinogenesis *in vivo*

After having evidenced TNX loss in human PDAC samples, our objective was to follow the kinetics of TNX deposition during pancreatic carcinogenesis. Thus, we used the [LSL:*Kras*^{G12D};*Pdx1*-CRE] (“KC”) mouse model, which are predisposed to develop pancreatic cancer⁸³ (Figure 2A, left). Indeed, expression of the mutated *Kras* oncogene in *Pdx1*⁺ cells (pancreatic epithelial cells) leads to the development of PDAC precursor lesions such as PanINs. We then followed pancreatic cancer development by harvesting pancreas from 50-, 100-, 150- and 200-day-old KC mice (Figure 2A, right), and analyzed TNX protein level and localization on tissue samples.

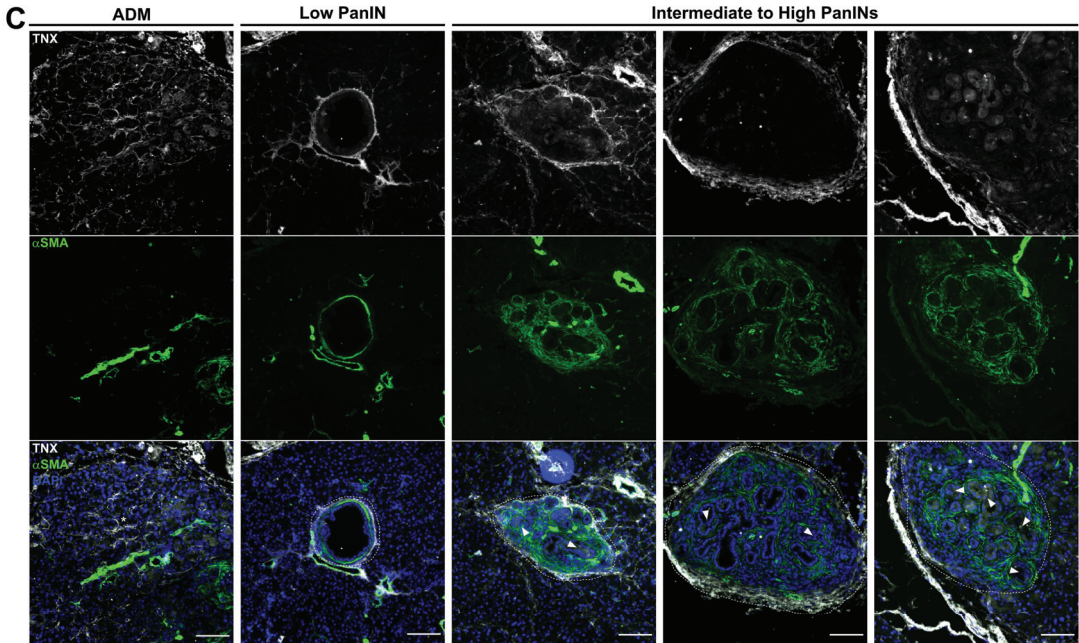
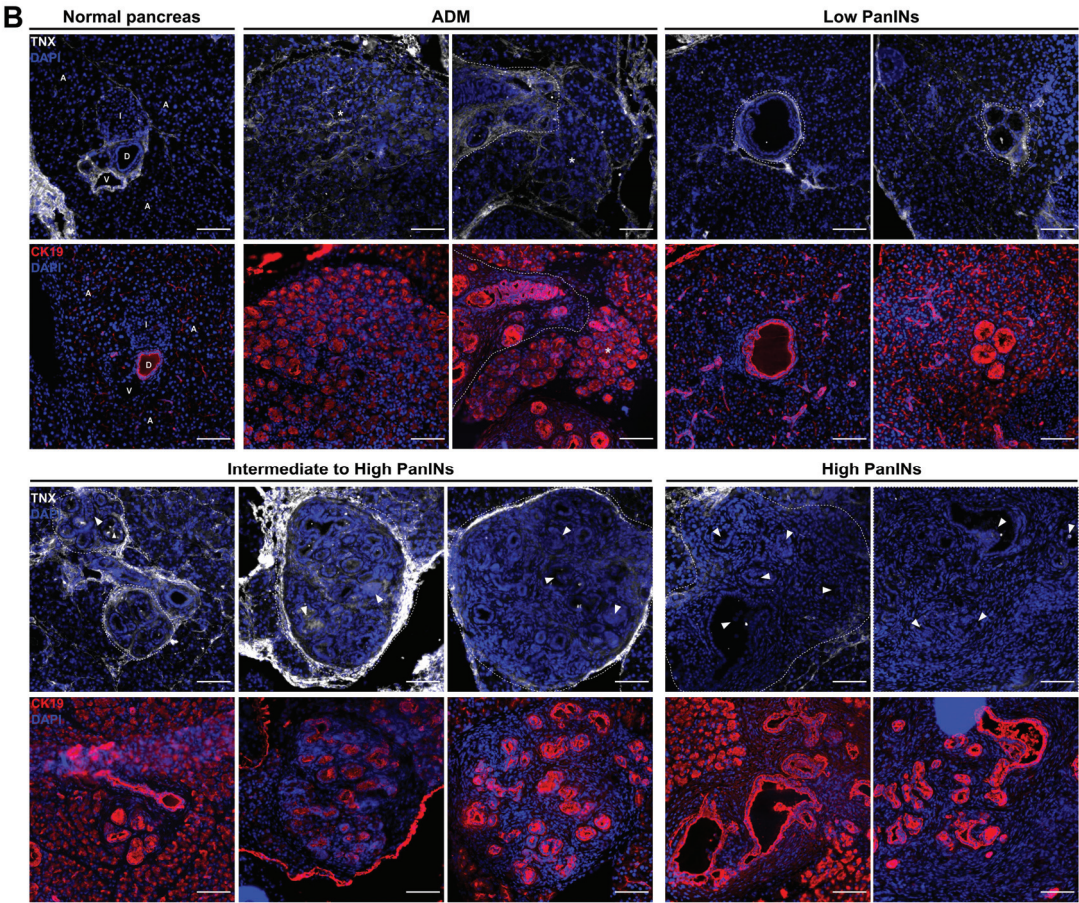
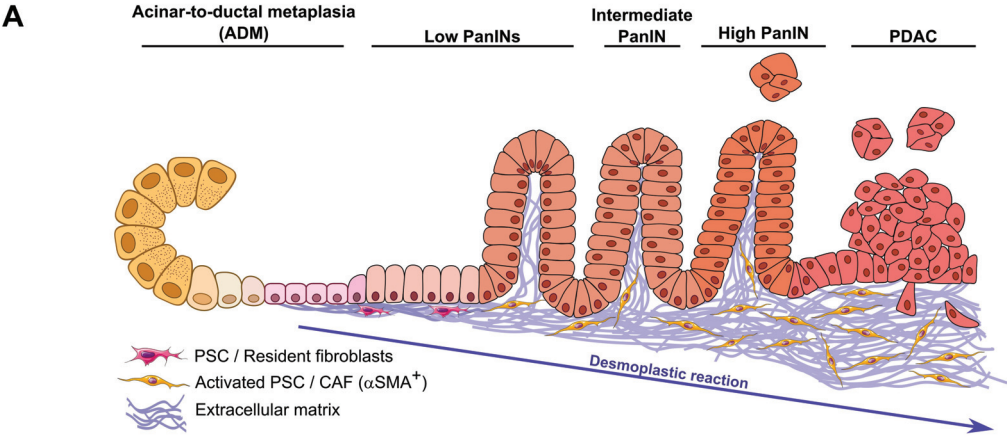
In a first set of experiments, we labelled TNX by immunofluorescence on pancreas cryosections from WT and KC mice collected at the different time-points. Sections were scanned and TNX staining was quantified (1) on total slice and (2) around each PanIN-like lesion in KC mice. In contrast to the results obtained in human samples, we observed that in total pancreas, TNX deposition unexpectedly seemed to increase over time in KC mice, compared to WT

mice. Indeed, as shown on representative images (Figure 2B) and by total TNX quantification (Figure 2C), TNX area was quite similar in WT and 50-day-old KC pancreas but increased in 100-, 150- and 200-day-old KC pancreas, with a significant difference between WT and 150-day-old KC mice. In order to associate this increase to lesion development, we plotted total TNX area in regards with the area occupied by lesions on the same pancreas slice, and interestingly revealed a clear correlation ($r= 0.6115$; $p<0.001$) between TNX area and PanIN-like lesion extent (Figure 2D). Finally, we pointed out each ADM and PanIN-like lesion in KC pancreas at the different time-points and quantified TNX positive area deposited around these lesions. Surprisingly, even if none of the results were significant, we observed that TNX deposition first tended to increase around lesions (between 50 and 100 days), before slightly decreasing (from 150 to 200 days) (Figure 2E). Thus, these results led us to suggest that TNX deposition increases in the first steps of pancreatic carcinogenesis, but could then decrease until disappearing, as observed in human samples.

Figure 2: TNX expression is increased in the pancreas of KC mice.

A- Schematic representation of genetic modification of KC mice, responsible for pancreatic cancer predisposition (left) and of the kinetics followed during this study (right). B- Representative images of whole pancreas sections from WT (200-day-old) and KC (50-, 100-, 150- and 200-day-old) mice, labelled for TNX (white). Scale bar = 1000 μ m. C- Quantification of TNX area in whole sections (individual values (one per mouse), with mean \pm SEM, Kruskal-Wallis test). D- Correlation between total lesion area and total TNX staining area (one point per mouse, Spearman correlation). E- Quantification of TNX area around each PanIN-like lesion in pancreas of KC mouse (individual values (mean for each mouse), with mean \pm SEM, Kruskal-Wallis test).

Figure 3



In order to better characterize TNX deposition during pancreatic carcinogenesis, we performed a deeper histological analysis, and tried to correlate TNX level to different grades of PanIN-like lesions determined thanks to CK19 labelling and H&E staining. PanIN lesion linear development model is presented on Figure 3A. Low grade PanINs were considered when epithelium presented a flat or papillary morphology without nuclear aberration. We evaluated PanINs as intermediate when nuclear polarity was at least partially lost and when some cells entered in the duct. Finally, when epithelium was clearly pluri-stratified and with many cells invading duct of the lesion, we considered lesions as high grade. In normal pancreas, TNX was classically deposited around ducts and vessels, and in very thin connective trabeculae around acini lobules (Figure 3B, top left). Interestingly, we observed an increased deposition of TNX around acini when acinar cells exhibited features of ADM. Staining was then reinforced around PanIN-like lesions with low grade (Figure 3B, top), before being slightly decreased in PanIN with intermediate grade. Finally, TNX was weakly detected around PanIN-like lesions with higher grades, until disappearance in a mouse exhibiting advanced lesions in the whole pancreas (last picture) (Figure 3B, bottom). However, despite these interesting observations, we also saw a high variability between lesions, that prevented us to quantitatively show any TNX area or intensity difference between ADM, low-grade and high-grade lesions.

Taken together, these results demonstrate that before being downregulated, TNX is highly deposited around precursor lesions. This could suggest a reaction of the stromal tissue in response to lesion development.

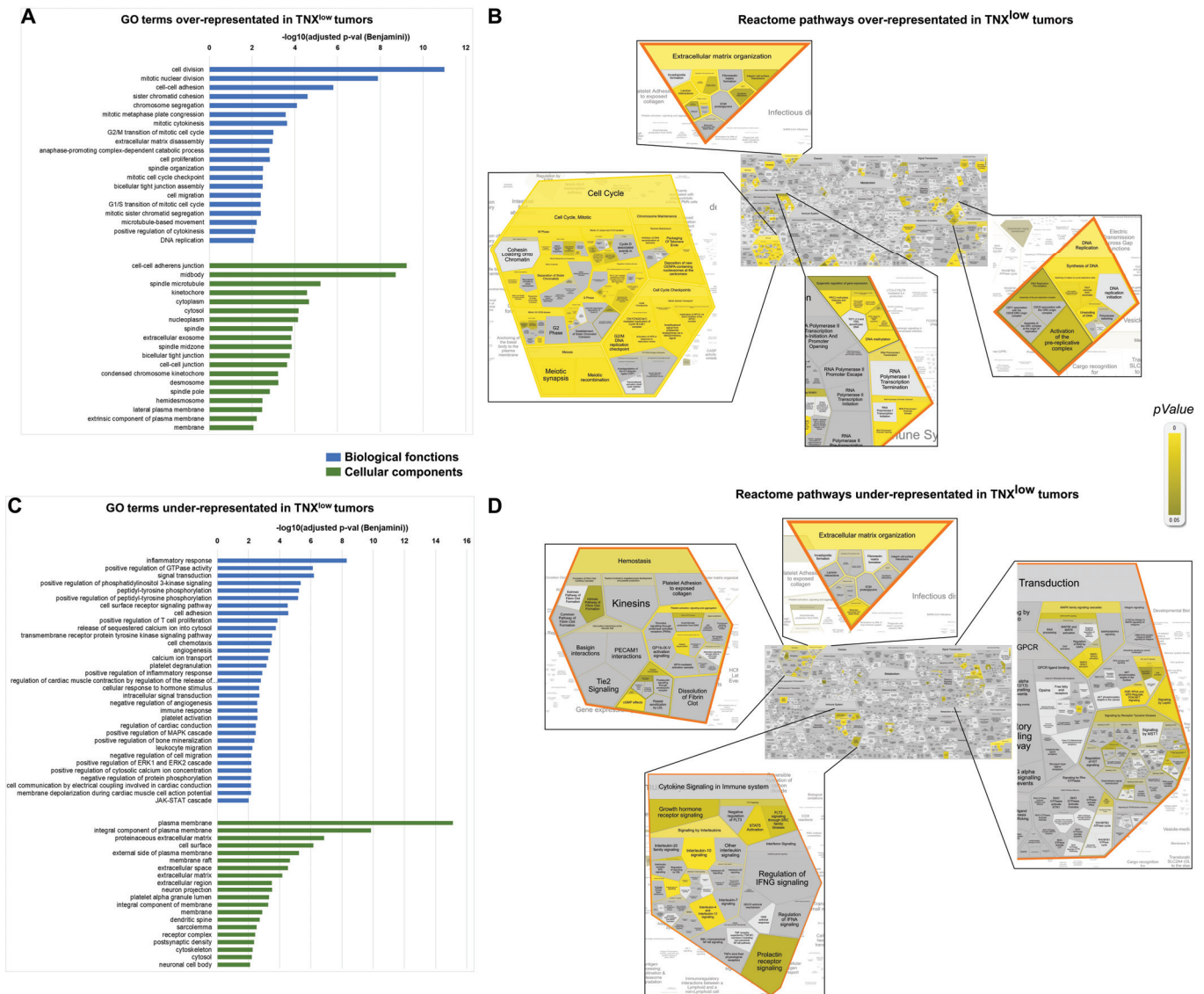
TNX deposition does not localize within reactive stroma

In order to determine if TNX was involved in desmoplastic reaction accompanying PDAC, we performed a co-immunofluorescent staining to localize TNX around lesions and α SMA staining. Indeed, α SMA is a marker for the activated fibroblasts, involved in stroma reaction and classically associated with bad prognosis (known pro-tumoral role). Interestingly, TNX almost never co-localized with α SMA staining. Indeed, in early lesions, TNX surrounded hyperplastic ducts and cells undergoing ADM, while α SMA was quite weak and, when present, was closer to the lesions than TNX (Figure 3C, left). In advanced lesions, TNX faded around each abnormal duct to be relegated outwards, forming a sheath around a group of lesions, in contrast with α SMA staining that accumulated around each abnormal duct (Figure 3C, right). Thus, TNX seemed not to be deposited within the reactive stroma deposited by activated fibroblasts, but surrounded this stromal reaction.

Figure 3: TNX is dynamically deposited during pancreatic carcinogenesis, but does not localized with reactive stroma

A- Schematic representation of linear model of PanIN progression, with associated desmoplastic reaction (reactive stroma development). B- Representative pictures of normal pancreas and the spectrum of PanIN-like lesions encountered in KC mouse pancreas. TNX (white) and CK19 (red) were stained by immunofluorescence on serial cryosections. On top left, normal pancreas is presented, with duct (D), vessel (V) and Langerhans islet (I) in the center, and acini (A) around. On top, ADM zones () and early PanINs are presented. Below, representative images of later PanIN lesions are presented. C- Representative pictures of ADM (*) and the spectrum of PanIN-like lesions encountered in KC mouse pancreas. TNX (white, on top) and α SMA (green, at the middle) were stained by co-immunofluorescence on the same cryosection, merge is presented below. A and B- PanIN lesions are surrounded by dotted line, and arrowheads highlight cells entering in duct, reflecting advanced PanINs.*

Figure 4



***TNXB* expression loss in human PDAC is associated with increased proliferation and dysregulated immune response .**

Finally, we wanted to decipher the consequences of TNX loss in human PDAC samples, and indirectly, the role of TNX in pancreatic cancer. Therefore, we analyzed GSE62452 dataset containing the highest number of patients. Based on *TNXB* expression in PDAC samples, we determined *TNXB*^{low} and *TNXB*^{high} groups, as we did for the survival study. We then determined the differentially expressed genes (D.E.G.) by comparing *TNXB*^{low} and *TNXB*^{high} groups (GEO2R), and analyzed enriched pathways in gene lists using two methods: (1) Gene Ontology (DAVID, enriched biological processes and cellular components) and (2) Reactome (enriched pathways).

Interestingly, both methods revealed that many genes involved in cell cycle, DNA replication, cell proliferation and in cell-cell junctions were up-regulated in *TNXB*^{low} tumors. In addition, up-regulation of genes associated with (1) extracellular matrix organization and cell migration and (2) transcription mechanisms and senescence were highlighted

by Gene Ontology and Reactome analyses, respectively (Figures 4A and B). Enrichment analysis of genes downregulated in *TNXB*^{low} showed that genes correlated with inflammation and immune system, and notably Interleukin 4 and 13 signaling, were downregulated in *TNXB*^{low} tumors, as well as genes involved in several signaling pathways (MAPK, PI3K/AKT and ERK). More anecdotally, genes associated with growth factors (notably VEGF), extracellular matrix organization, cell adhesion and angiogenesis were also downregulated in *TNXB*^{low} tumors (Figure 4C and D).

Altogether, these results demonstrate the dysregulation of several important cellular processes associated with *TNXB* gene expression loss in human PDAC. In particular, cell proliferation is increased when *TNXB* expression is low, indicating that TNX could inhibit this cellular process. In another hand, immune system seems also dysregulated in absence of TNX, and notably inflammation. These results suggest that TNX could influence cancer cells, as well as stromal cells.

Figure 4: Dysregulated pathways in TNX^{low} PDAC samples

A- Gene Ontology biological processes (in blue) and cellular components (in green) enriched in upregulated genes in TNX^{low} PDAC samples, determined by DAVID tool and presented according to p-value. B- Reactome result map after analysis of upregulated genes in TNX^{low} PDAC samples, determined by Reactome online tool. Light yellow means lowest p-value, as shown by the color scale. Zooms are presented for the most enriched pathways. C- Gene Ontology biological processes (in blue) and cellular components (in green) enriched in downregulated genes in TNX^{low} PDAC samples, determined by DAVID tool and presented according to p-value. D- Reactome result map after analysis of downregulated genes in TNX^{low} PDAC samples, determined by Reactome online tool. Light yellow means lowest p-value, as shown by the color scale. Zooms are presented for the most enriched pathways.

Discussion

In the present study, we first demonstrated that *TNXB* gene expression and TNX protein level were drastically decreased in human PDAC tumors compared to corresponding normal tissue adjacent to the tumor, and that low *TNXB* expression tended to be correlated with (1) poorly differentiated tumors, which are often more aggressive, and (2) reduced patient survival. Despite appearing normal, adjacent tissue to the tumor can be altered by the proximity of tumor cells. Therefore, we analyzed other datasets from the GEO database, with normal pancreas as controls (Supplementary Table 1) and confirmed significant *TNXB* downregulation in tumor samples compared to normal pancreatic tissues for the majority of datasets (8/12). This result is of particular interest in regards with the work we published recently, in which we analyzed the status of TNX in 13 types of tumors⁷³. Indeed, in this later, we determined that *TNXB* transcript and TNX protein levels in tissue were decreased in a majority of cancer types, including the 6 most incident and deadliest worldwide, except for brain, which is known to present a particular ECM at physiological state. Thus, this down-regulation of TNX expression seems to be a generalizable mechanism, which could suggest a common role for TNX in tumor progression.

This result led us to characterize the kinetics of TNX loss during pancreatic carcinogenesis, and thus to follow PanIN-like lesion development thanks to [LSL:*Kras*^{G12D};*Pdx1*-CRE] ("KC") mouse model. Whereas we were expecting a progressive decrease of TNX deposition, we surprisingly observed an increase of total TNX area in pancreas along the kinetics, from 100- to 200-day-old mice, compared to normal pancreas of WT mice. However, TNX area around individual lesions seemed to be first increased and then slightly decreased in mice older than 100 days. When identifying lesion

grade, we showed that TNX staining was first reinforced around cells in ADM and around low-grade PanINs, before being reduced in intermediate lesions and almost lost in high-grade PanINs. However, a high inter-individual variability was noticed, unabling us to quantify this deposition dynamics (which was still mostly observed). It has to be noted that the lesion origin and thus the lesion phenotype could influence TNX deposition. Indeed, as the level of TNX is quite low around individual acini in normal pancreas, we noted that connective trabeculae around cells in ADM were enriched for this TN family member. This deposit drastically increased when lesions progressed to PanIN-like lesions. In contrast, lesions resembling to hyperplasic ducts, which could originate from normal ducts, presented a TNX-positive "sheath", which seemed thinner (Figure 3A). Unfortunately, these observations are difficult to confirm, since the cell origin for PanIN and PDAC is still under debate and cannot be deciphered in the KC mouse model, due to prenatal *Pdx1* expression^{84,85}.

Nevertheless, we highlighted here for the first time that TNX deposition during pancreatic carcinogenesis was dynamic, and not just the result of progressive loss of expression. In addition, we clearly showed that TNX deposition did not co-localize with α SMA staining, which revealed the presence of activated fibroblasts around lesions. However, it is important to note that the absence of stromal reaction (α SMA⁺ labelling) around lesions did not necessarily correlate with a higher amount of TNX around lesion (data not shown). Interestingly, in intermediate to high PanINs, TNX labelling formed a sheath, encompassing the lesion and its reactive stroma, and which was reduced in later stage lesions. These observations led us to think (1) that TNX may not take part to desmoplastic reaction, and (2) that TNX could be pushed

outwards by the development of the lesion and its desmoplastic stroma.

In addition, our *in vivo* results suggest that TNX deposition could be a reaction of the surrounding tissue to counteract pre-tumoral lesion development during the first steps of pancreatic carcinogenesis. Indeed, there is a dichotomy between (1) TNX total area increase and (2) labelling decrease around individual lesions, implying that TNX deposition could be induced in normal parts of pancreas, which is notably supported by the TNX labelling reinforcement we observed around cells undergoing ADM. Along with this, recent studies propose that modification in microenvironment could precede pancreatic (pre)tumoral cell development⁸⁶, and that desmoplastic reaction itself can be first considered as a physical barrier against tumor cell invasion. In other tumor types, the development of a protective ECM has been demonstrated in first steps of tumor progression, even if far less described that the pro-tumor ECM deposited afterwards⁸⁷. Thus, PDAC tumor microenvironment, and its ECM, could be spatially and temporally compartmentalized during carcinogenesis, correlated with a dual role, firstly anti-tumoral, before evolving to pro-tumoral.

Cancer-associated fibroblasts (CAFs) present a such duality. Indeed, while many studies proved that CAFs promote tumor progression, notably by depositing dense ECM around lesions, the failure of the therapeutic strategy consisting in CAF depletion suggested that a part of CAF population could be cancer-restraining (rCAF) during earliest stages^{27,88}. Very recently, several works have characterized such rCAF populations⁸⁹⁻⁹¹, which could corroborate our idea of a spatio-temporally compartmentalized stroma during PDAC development and progression. In addition, different types of stroma have been characterized and linked with clinical outcome, depending on their composition (collagen content, CAF markers, etc)⁹², or their position

in regard with tumor cells⁹³. This later study is of particular interest regarding our results. While we highlighted a peripheral localization of TNX during pancreatic carcinogenesis, they showed that TNC was deposited in close proximity with tumor cells, and not in peripheral stroma⁹³. This non-uniform localization of TNC was observed in other works, with a co-localization with α SMA⁹⁴⁻⁹⁶. Interestingly, TNC and TNX have often been demonstrated as exclusively expressed, either spatially, in the dermis, or temporally, during development, wound healing, or even in melanoma and astrocytoma^{58,65,67,97,98}, which could also occur in PDAC as well. Other ECM molecules present non-uniform location within PDAC stroma, including fibronectin⁹⁹ and periostin¹⁰⁰, for example, directly placed in close contact with PanINs or tumor cells. The well-demonstrated pro-tumor role of these proteins²⁹ suggest that ECM present in close proximity to tumor cells could be tumor-permissive, maybe in contrast to other ECM proteins more peripherally located, which may have protective role. Identification of the proteins deposited concomitantly with TNX in the peripheral sheath surrounding lesions would allow to better understand the role of this ECM, and therefore the role of TNX in the first steps of carcinogenesis. This work clearly showed the importance to histologically investigate ECM in carcinogenesis context, in order to better characterize the different types of deposited matrix. For now, most of studies described the matrix accompanying carcinogenesis thanks to *in silico* analysis^{96,101,102}, which do not permit to discriminate ECM heterogeneity within early pancreatic lesion stroma. In the future, other ECM molecules will be labelled on KC mouse pancreas. Similar investigations should also be conducted on the human PanIN spectrum in order to (1) confirm the dynamic deposition of TNX during carcinogenesis and (2) characterize the ECM deposited around lesions in human pancreatic tissue. However, due to late

diagnosis, pancreas of patients mainly present invasive PDAC and are usually devoid of PanIN lesions. Moreover, the human PanIN lesions studied are often those found around PDAC tumors, and could be influenced by this tumoral tissue. Thus, it is difficult to obtain proper human samples of early stages of pancreatic cancer but the deep analysis of ECM deposition during pancreatic carcinogenesis is a prerequisite for the emerging of efficient therapies.

In order to better understand TNX role during pancreatic carcinogenesis, we then investigated the impact of *TNXB* loss of expression in human PDAC samples. To do so, we studied the biological processes (Gene Ontology) and the pathways (Reactome) dysregulated with *TNXB* downregulation. Reactome raw graphical representations are presented in Supplementary Figures 1 and 2. Interestingly, we showed that many genes involved in cell cycle, and notably in cell proliferation, were upregulated in *TNXB*^{low} tumors, indicating that TNX could inhibit tumor and/or stromal cell proliferation. Moreover, genes involved in immune system, and notably inflammation, seemed to be downregulated in *TNXB*^{low} tumors, suggesting that TNX could influence inflammation, maybe as a reaction to tumor development or environmental cues. Interestingly, immune reaction is dynamic during pancreatic carcinogenesis, and thus could be correlated with TNX deposition¹⁰³. However, these *in silico* analyses should be confirmed experimentally. As for α SMA, it would be interesting to perform co-immunostaining of TNX with proliferation or inflammatory cell markers, and correlate TNX deposition with a sub-population of immune cells or with tumor/stromal cell proliferation. For now, we were not able to do so using the Ki67 cell proliferation marker (data not shown), but this could rely on experimental bias (lack of sensibility/amplification during immunolabelling). Nevertheless, our results are still

coherent with a potential oncosuppressive role of the TNX. Unfortunately, we were not able to evidence any difference in PanIN progression between KC mice deleted or not for *Tnxb* gene (data not shown). Indeed, while we were expecting a faster development of PanINs in KC;*Tnxb*^{-/-} mice, we were disappointed to see that lesion extent and PanIN lesion grades were similar between KC;*Tnxb*^{+/+} and KC;*Tnxb*^{-/-} mice. Additionally, we could not evidence an acceleration of PDAC invasiveness in the KC;*Tnxb*^{-/-} group of mice compared to KC controls. However, we can now hypothesize that TNX loss is involved in PanIN to PDAC transformation and in the acquisition of more aggressive phenotype by tumor cells, rather than during PanIN progression. The study of Matsumoto *et al*, in 2001, suggest that TNX could limit invasiveness and dissemination of tumor cells as well. Indeed, after the injection of melanoma cells into foot pad, *Tnxb*^{-/-} mice exhibited more lung metastases than *Tnxb*^{+/+} mice⁷⁵. Other studies have shown that TNX displays an anti-adhesive role *in vitro*, in normal fibroblasts (mouse subcutaneous fibroblasts L cells), and fibrosarcoma and osteosarcoma cells^{104,105}, function that could be involved in the hypothesized process. Thus, as pancreatic lesions present in KC mice rarely evolve into invasive PDAC, is it likely that this model was not the good one for such study, and that we did not let the mice age enough. So, a mouse model with shorter latency should be useful to answer the question of a protective role of TNX in the transformation of PanINs into invasive PDAC.

Finally, the identification of TNX-expressing cells within the pancreas, as well as the understanding of the regulation of TNX expression would be of great interest for the perspective of this project. Indeed, no data are currently available regarding the identity of cells expressing TNX in the pancreas. Regarding connective tissue localization, we can assume TNX is expressed by fibroblastic cells (either

resident fibroblasts or PSCs) in normal pancreas and during the initial steps of pancreatic cancer development, but this hypothesis has to be experimentally validated through *in situ* hybridization. It would also be essential to understand why, and in response to which signal, TNX level is first increased, before being downregulated. Unlike TNC, only sparse data are available on *TNXB* gene regulation, with (1) a negative regulation by glucocorticoids^{64,106,107}, and (2) the involvement of Sp1 transcription factor in transcriptional activity of *TNXB* gene^{108–110}. The potential deposition of TNX in distant normal

pancreas sites in reaction to tumor development suggest that *TNXB* expression could be regulated by cytokine(s), but no evidence of such regulation exists for now.

In conclusion, we described here that TNX is lost in PDAC, after a dynamic deposition in the first steps of carcinogenesis, and could influence tumor and/or stromal cell behaviors. This study therefore raises many questions that should be answered in few years. However, if the oncosuppressive role of TNX were to be confirmed, this protein could be considered and tested as a new therapeutic tool.

Supplementary Data

Supplementary Table 1: Supplemental GEO datasets analyzed, with normal pancreas as control. *TNXB* expression variation is indicated (green = downregulation), together with adjusted p-value and logFc for the probe ID with best result. The number of patients per group is indicated, as well as the platform with which microarray was performed.

Supplementary Figure 1: Reactome graphical result for enriched pathways found in up-regulated gene list in *TNXB*^{low} tumors.

Supplementary Figure 2: Reactome graphical result for enriched pathways found in downregulated gene list in *TNXB*^{low} tumors.

References

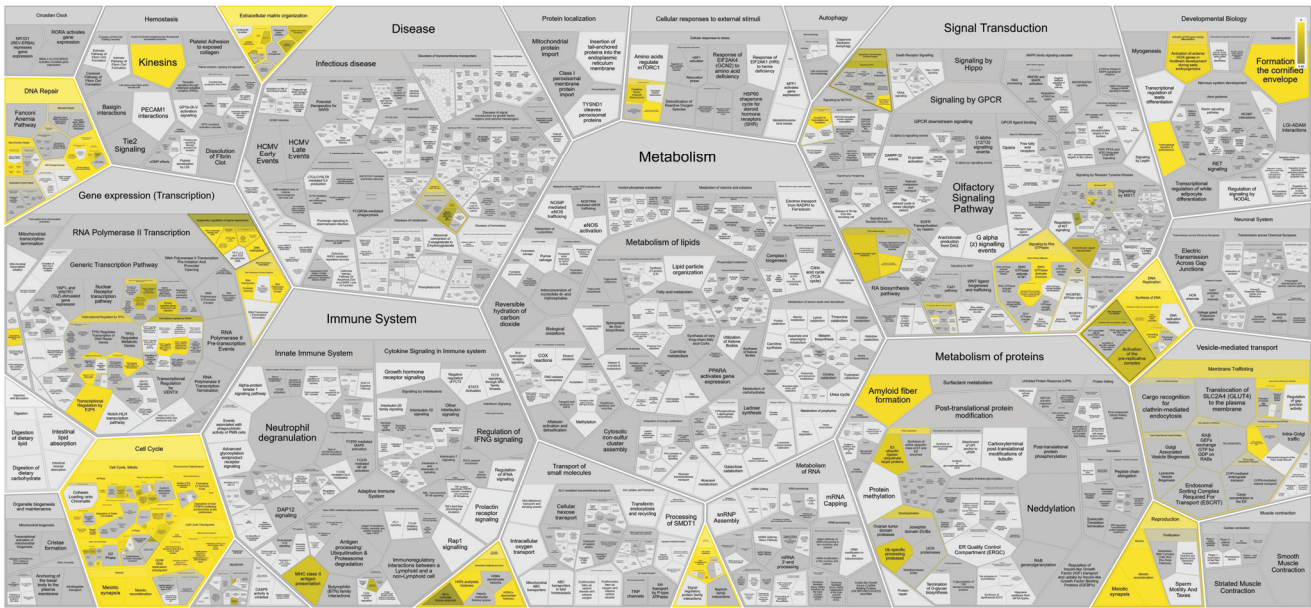
1. Rawla, P., Sunkara, T. & Gaduputi, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol* **10**, 10–27 (2019).
2. Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer* **144**, 1941–1953 (2019).
3. Eibl, A. S. and G. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* (2015) doi:10.3998/panc.2015.14.
4. Walter, F. M. *et al.* Symptoms and patient factors associated with diagnostic intervals for pancreatic cancer (SYMPTOM pancreatic study): a prospective cohort study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* **1**, 298–306 (2016).
5. Porta, M. *et al.* Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol* **7**, 189–197 (2005).
6. Adamska, A., Domenichini, A. & Falasca, M. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma:

Supplementary Table 1

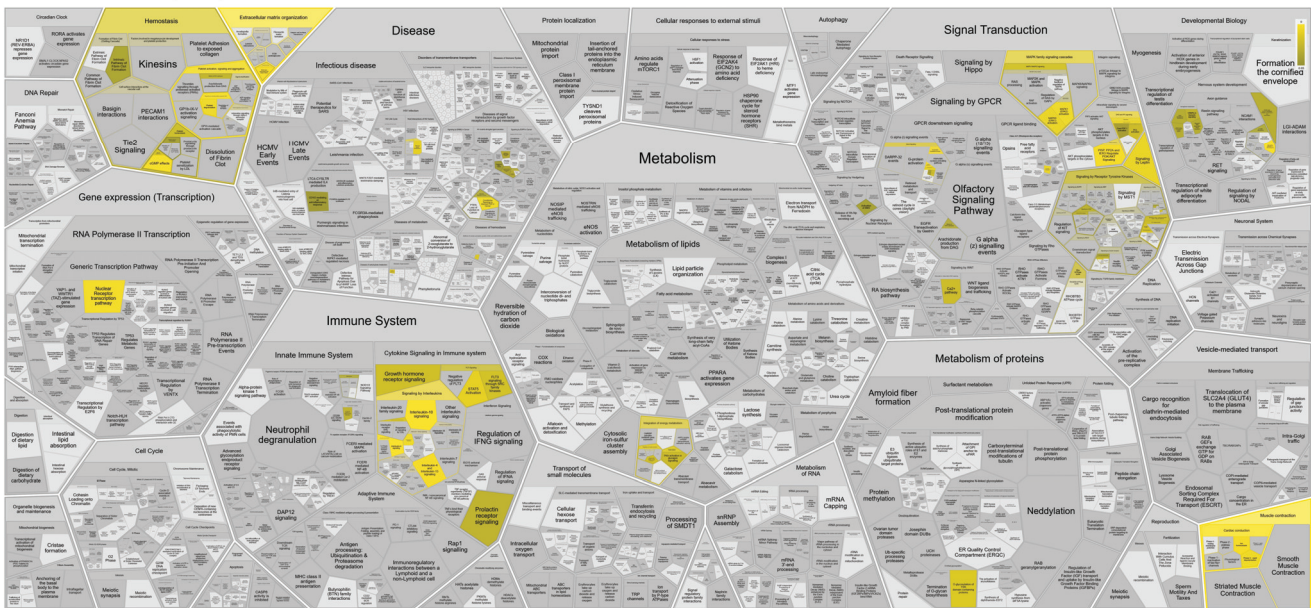
PDAC vs Normal pancreas (Human)

#GSE	Date	Normal	Number of cases	Tumoral	TNB gene expression (GEO2R analysis)		Platform	
					adj pval	logFC		Variation
GSE41366	2013	Normal pancreas (n=6)		PDAC (n=6)	7.44e-02	-1.98e-01	rs	GPL6244 - [HuGene-1_0-st] Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array (transcript (gene) version)
GSE71729	2015	Pancreas_normal (n=46)		Pancreas_primary tumor (n=145)	2.31e-05	-0.5372256	DOWN	GPL20769 - Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x4K G4112F (Gene Symbol Version; updated July 2014)
GSE62165	2016	Control samples (n=13)		PDAC samples (n=18)	1.06e-04	-1.04	DOWN	GPL3667 - [HG-U219] Affymetrix Human Genome U219 Array
GSE71968	2015	Human normal panc. Tissue (n=8)		Human PDAC tissue (n=13)	2.03e-05	-0.7193262	DOWN	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE32676	2011	non malignant pancreas (n=7)		human PDAC (n=25)	0.0124554	-1.57	DOWN	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE16615	2005	Normal sample (n=10)		Panc. tumor sample (n=36)	2.27e-03	-0.6891006	DOWN	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE11838	2008	Normal pancreas (n=4)		Primary pancreatic tumor (n=28)	0.8846	0.1008666	rs	GPL6977 - Human 1A Microarray G4110A/G4110E
GSE46234	2017	Normal pancreas (n=4)		PDAC pancreas (n=4)	0.523	-1.6370315	rs	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE91035	2016	Normal pancreatic tissue (n=8)		Tumor pancreatic tissue (n=25)	6.22e-03	-0.6766846	DOWN	GPL22763 - Agilent-039714 LincRNA SurePrint G3 Human GE 6x60K Microarray PVD 028004 [Probe Name version]
GSE63111	2017	Normal pancreatic tissue (n=3)		PDAC tissue (n=26)	3.07e-04	-1.20	DOWN	GPL5188 - [HuEx-1_0-st] Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array [probe set (exon) version]
GSE43795	2013	Non-neoplastic pancreas (n=5)		PDAC tissue (n=7)	1.22e-02	-0.3612743	DOWN	GPL10588 - Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip
GSE19281	2013	Normal pancreas (n=8)		Primary PDAC (n=4)	0.3476	-0.2777736	rs	GPL96 - [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array

Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S2



- Current and Evolving Therapies. *Int J Mol Sci* **18**, (2017).
7. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **68**, 394–424 (2018).
 8. 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).
 9. Quante, A. S. *et al.* Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030. *Cancer Medicine* **5**, 2649–2656 (2016).
 10. Hruban, R. H., Maitra, A. & Goggins, M. Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol* **1**, 306–316 (2008).
 11. Basturk, O. *et al.* A revisited classification system and recommendations from the Baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. *Am J Surg Pathol* **39**, 1730–1741 (2015).
 12. Morris, J. P., Wang, S. C. & Hebrok, M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Reviews Cancer* **10**, 683–695 (2010).
 13. Tuveson, D. A. & Hingorani, S. R. Ductal Pancreatic Cancer in Humans and Mice. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**, 65–72 (2005).
 14. Schmid, R. M. Acinar-to-ductal metaplasia in pancreatic cancer development. *J Clin Invest* **109**, 1403–1404 (2002).
 15. Ziv, O., Glaser, B. & Dor, Y. The Plastic Pancreas. *Developmental Cell* **26**, 3–7 (2013).
 16. Bailey, J. M., DelGiorno, K. E. & Crawford, H. C. The secret origins and surprising fates of pancreas tumors. *Carcinogenesis* **35**, 1436–1440 (2014).
 17. Storz, P. Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**, 296–304 (2017).
 18. Rooman, I. & Real, F. X. Pancreatic ductal adenocarcinoma and acinar cells: a matter of differentiation and development? *Gut* **61**, 449–458 (2012).
 19. Carrière, C., Young, A. L., Gunn, J. R., Longnecker, D. S. & Korc, M. Acute pancreatitis markedly accelerates pancreatic cancer progression in mice expressing oncogenic Kras. *Biochem Biophys Res Commun* **382**, 561–565 (2009).
 20. Jones, S. *et al.* Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* **321**, 1801–1806 (2008).
 21. Bardeesy, N. & DePinho, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* **2**, 897–909 (2002).
 22. Feig, C. *et al.* The pancreas cancer microenvironment. *Clin. Cancer Res.* **18**, 4266–4276 (2012).
 23. Sun, Q. *et al.* The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer. *Theranostics* **8**, 5072–5087 (2018).
 24. Leppänen, J. *et al.* Tenascin C, Fibronectin, and Tumor-Stroma Ratio in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas* **48**, 43–48 (2019).
 25. Sun, Y. Tumor microenvironment and cancer therapy resistance. *Cancer Letters* **380**, 205–215 (2016).
 26. Erkan, M. *et al.* The Activated Stroma Index Is a Novel and Independent Prognostic Marker in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **6**, 1155–1161 (2008).
 27. Rhim, A. D. *et al.* Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **25**, 735–747 (2014).

28. Özdemir, B. C. *et al.* Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. *Cancer Cell* **25**, 719–734 (2014).
29. Liot, S. *et al.* Stroma involvement in pancreatic ductal adenocarcinoma: an overview focusing on extracellular matrix proteins. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
30. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. & Karamanos, N. K. Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews* **97**, 4–27 (2016).
31. Hynes, R. O. & Naba, A. Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, (2012).
32. Rozario, T. & DeSimone, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* **341**, 126–140 (2010).
33. Walker, C., Mojares, E. & Del Río Hernández, A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 3028 (2018).
34. Bornstein, P. Matricellular proteins: an overview. *J. Cell Commun. Signal.* **3**, 163 (2009).
35. Chiquet-Ehrismann, R. Tenascins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 986–990 (2004).
36. Chiquet-Ehrismann, R., Orend, G., Chiquet, M., Tucker, R. P. & Midwood, K. S. Tenascins in stem cell niches. *Matrix Biol.* **37**, 112–123 (2014).
37. Midwood, K. S., Chiquet, M., Tucker, R. P. & Orend, G. Tenascin-C at a glance. *J. Cell. Sci.* **129**, 4321–4327 (2016).
38. Lowy, C. M. & Oskarsson, T. Tenascin C in metastasis: A view from the invasive front. *Cell Adhesion & Migration* **9**, 112–124 (2015).
39. Orend, G. & Chiquet-Ehrismann, R. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Letters* **244**, 143–163 (2006).
40. Sun, Z. *et al.* Tenascin-C increases lung metastasis by impacting blood vessel invasions. *Matrix Biol.* **83**, 26–47 (2019).
41. Murakami, T. *et al.* Tenascin C in colorectal cancer stroma is a predictive marker for liver metastasis and is a potent target of miR-198 as identified by microRNA analysis. *Br. J. Cancer* **117**, 1360–1370 (2017).
42. Gocheva, V. *et al.* Quantitative proteomics identify Tenascin-C as a promoter of lung cancer progression and contributor to a signature prognostic of patient survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E5625–E5634 (2017).
43. Ni, W.-D. *et al.* Tenascin-C is a potential cancer-associated fibroblasts marker and predicts poor prognosis in prostate cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **486**, 607–612 (2017).
44. Yang, Z., Ni, W., Cui, C., Fang, L. & Xuan, Y. Tenascin C is a prognostic determinant and potential cancer-associated fibroblasts marker for breast ductal carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* **102**, 262–267 (2017).
45. Shen, C. *et al.* Tenascin-C expression is significantly associated with the progression and prognosis in gastric GISTs. *Medicine (Baltimore)* **98**, (2019).
46. Scherberich, A. *et al.* Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. *Journal of Cell Science* **117**, 571–581 (2004).
47. Tucker, R. P. & Degen, M. The Expression and Possible Functions of Tenascin-W During Development and Disease. *Front Cell Dev Biol* **7**, 53 (2019).
48. Martina, E., Chiquet-Ehrismann, R. & Brellier, F. Tenascin-W: an extracellular matrix protein associated with

- osteogenesis and cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1412–1415 (2010).
49. Degen, M. *et al.* Tenascin-W is a novel marker for activated tumor stroma in low-grade human breast cancer and influences cell behavior. *Cancer Res.* **67**, 9169–9179 (2007).
 50. Degen, M. *et al.* Tenascin-W, a new marker of cancer stroma, is elevated in sera of colon and breast cancer patients. *Int. J. Cancer* **122**, 2454–2461 (2008).
 51. Martina, E. *et al.* Tenascin-W is a specific marker of glioma-associated blood vessels and stimulates angiogenesis in vitro. *FASEB J.* **24**, 778–787 (2010).
 52. Derr, L. B., McKae, L. A. & Tucker, R. P. The distribution of tenascin-R in the developing avian nervous system. *J. Exp. Zool.* **280**, 152–164 (1998).
 53. Fuss, B., Wintergerst, E. S., Bartsch, U. & Schachner, M. Molecular characterization and in situ mRNA localization of the neural recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to tenascin. *J. Cell Biol.* **120**, 1237–1249 (1993).
 54. Pesheva, P., Gloor, S., Schachner, M. & Probstmeier, R. Tenascin-R is an intrinsic autocrine factor for oligodendrocyte differentiation and promotes cell adhesion by a sulfatide-mediated mechanism. *J. Neurosci.* **17**, 4642–4651 (1997).
 55. Probstmeier, R., Nellen, J., Gloor, S., Wernig, A. & Pesheva, P. Tenascin-R is expressed by Schwann cells in the peripheral nervous system. *J. Neurosci. Res.* **64**, 70–78 (2001).
 56. Anlar, B. & Gunel-Ozcan, A. Tenascin-R: Role in the central nervous system. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **44**, 1385–1389 (2012).
 57. Burch, G. H., Bedolli, M. A., McDonough, S., Rosenthal, S. M. & Bristow, J. Embryonic expression of tenascin-X suggests a role in limb, muscle, and heart development. *Dev. Dyn.* **203**, 491–504 (1995).
 58. Valcourt, U., Alcaraz, L. B., Exposito, J.-Y., Lethias, C. & Bartholin, L. Tenascin-X: beyond the architectural function. *Cell Adhesion & Migration* **9**, 154–165 (2015).
 59. Lethias, C., Descollonges, Y., Boutillon, M. M. & Garrone, R. Flexilin: a new extracellular matrix glycoprotein localized on collagen fibrils. *Matrix Biol.* **15**, 11–19 (1996).
 60. Lethias Claire, Carisey Alexandre, Comte Jane, Cluzel Caroline, & Exposito Jean-Yves. A model of tenascin-X integration within the collagenous network. *FEBS Letters* **580**, 6281–6285 (2006).
 61. Bristow, J., Carey, W., Egging, D. & Schalkwijk, J. Tenascin-X, collagen, elastin, and the Ehlers–Danlos syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* **139C**, 24–30 (2005).
 62. Mao, J. R. *et al.* Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. *Nature Genetics* **30**, 421–425 (2002).
 63. Alcaraz, L. B. *et al.* Tenascin-X promotes epithelial-to-mesenchymal transition by activating latent TGF- β . *J. Cell Biol.* **205**, 409–428 (2014).
 64. Sakai, T. *et al.* Tenascin-X expression in tumor cells and fibroblasts: glucocorticoids as negative regulators in fibroblasts. *Journal of Cell Science* **109**, 2069–2077 (1996).
 65. Hasegawa, K. *et al.* Differential expression of tenascin-C and tenascin-X in human astrocytomas. *Acta Neuropathol* **93**, 431–437 (1997).
 66. Lévy, P. *et al.* Microarray-Based Identification of Tenascin C and Tenascin XB, Genes Possibly Involved in Tumorigenesis Associated with Neurofibromatosis Type 1. *Clin Cancer Res* **13**, 398–407 (2007).

67. Geffrotin, C. *et al.* Opposite regulation of tenascin-C and tenascin-X in MeLiM swine heritable cutaneous malignant melanoma. *Biochim. Biophys. Acta* **1524**, 196–202 (2000).
68. Lee, S. O., Lee, S. Y., Lee, S. R., Ju, W. & Kim, S. C. Tenascin-X and leukemia inhibitory factor receptor are down-regulated in leiomyoma compared with normal myometrium. *Journal of Gynecologic Oncology* **19**, 139–144 (2008).
69. Davidson, B. *et al.* Gene Expression Signatures Differentiate Ovarian/Peritoneal Serous Carcinoma from Diffuse Malignant Peritoneal Mesothelioma. *Clin Cancer Res* **12**, 5944–5950 (2006).
70. Yuan, Y. *et al.* Tenascin-X is a novel diagnostic marker of malignant mesothelioma. *Am J Surg Pathol* **33**, 1673–1682 (2009).
71. Nakayama, K. *et al.* Tenascin XB Is a Novel Diagnostic Marker for Malignant Mesothelioma. *Anticancer Res* **39**, 627–633 (2019).
72. Kramer, M. *et al.* Secretome Identifies Tenascin-X as a Potent Marker of Ovarian Cancer. *BioMed Research International* <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/208017/> (2015) doi:10.1155/2015/208017.
73. Liot, S. *et al.* Loss of Tenascin-X expression during tumor progression: A new pan-cancer marker. *Matrix Biology Plus* **100021** (2020) doi:10.1016/j.mbplus.2020.100021.
74. Chakravarthy, A., Khan, L., Bensler, N. P., Bose, P. & Carvalho, D. D. D. TGF- β -associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure. *Nat Commun* **9**, 1–10 (2018).
75. Matsumoto, K. *et al.* Tumour invasion and metastasis are promoted in mice deficient in tenascin-X. *Genes to Cells* **6**, 1101–1111 (2001).
76. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* **37**, 1–13 (2009).
77. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44–57 (2009).
78. Jassal, B. *et al.* The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **48**, D498–D503 (2020).
79. Goehrig, D. *et al.* Stromal protein β ig-h3 reprogrammes tumour microenvironment in pancreatic cancer. *Gut* **68**, 693–707 (2019).
80. Foulfouin, M. *et al.* Treatment of metastatic pancreatic neuroendocrine tumors: relevance of ENETS 2016 guidelines. *Endocr Relat Cancer* **24**, 71–81 (2017).
81. Jackson, E. L. *et al.* Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev.* **15**, 3243–3248 (2001).
82. Johnson, L. *et al.* Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* **410**, 1111–1116 (2001).
83. Hingorani, S. R. *et al.* Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437–450 (2003).
84. Yamaguchi, J., Yokoyama, Y., Kokuryo, T., Ebata, T. & Nagino, M. Cells of origin of pancreatic neoplasms. *Surg. Today* **48**, 9–17 (2018).
85. Xu, Y., Liu, J., Nipper, M. & Wang, P. Ductal vs. acinar? Recent insights into identifying cell lineage of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Pancreat Cancer* **2**, (2019).
86. Mohan, V., Das, A. & Sagi, I. Emerging roles of ECM remodeling processes in cancer. *Seminars in Cancer Biology* **62**, 192–200 (2020).

87. Sala, M., Ros, M. & Saltel, F. A Complex and Evolutive Character: Two Face Aspects of ECM in Tumor Progression. *Front. Oncol.* **10**, 1620 (2020).
88. Helms, E., Onate, M. K. & Sherman, M. H. Fibroblast Heterogeneity in the Pancreatic Tumor Microenvironment. *Cancer Discov* (2020) doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1353.
89. Mizutani, Y. *et al.* Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Res* **79**, 5367–5381 (2019).
90. Miyai, Y., Esaki, N., Takahashi, M. & Enomoto, A. Cancer-associated fibroblasts that restrain cancer progression: Hypotheses and perspectives. *Cancer Science* **111**, 1047–1057 (2020).
91. Garcia, P. E. *et al.* Differential Contribution of Pancreatic Fibroblast Subsets to the Pancreatic Cancer Stroma. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **10**, 581–599 (2020).
92. Ogawa, Y. *et al.* Three distinct stroma types in human pancreatic cancer identified by image analysis of fibroblast subpopulations and collagen. *Clin Cancer Res* clincanres.2298.2020 (2020) doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-2298.
93. Nielsen, M. F. B., Mortensen, M. B. & Detlefsen, S. Typing of pancreatic cancer-associated fibroblasts identifies different subpopulations. *World J. Gastroenterol.* **24**, 4663–4678 (2018).
94. Esposito, I. *et al.* Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis. *J. Pathol.* **208**, 673–685 (2006).
95. Juuti, A. Tenascin C expression is upregulated in pancreatic cancer and correlates with differentiation. *Journal of Clinical Pathology* **57**, 1151–1155 (2004).
96. Tian, C. *et al.* Proteomic analyses of ECM during pancreatic ductal adenocarcinoma progression reveal different contributions by tumor and stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 19609–19618 (2019).
97. Geffrotin, C., Garrido, J. J., Tremet, L. & Vaiman, M. Distinct Tissue Distribution in Pigs of Tenascin-X and Tenascin-C Transcripts. *European Journal of Biochemistry* **231**, 83–92 (1995).
98. Schalkwijk, J. *et al.* A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1167–1175 (2001).
99. Hu, D. *et al.* Stromal fibronectin expression in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Surg Oncol* **17**, 29 (2019).
100. Shi, C. *et al.* Fibrogenesis in pancreatic cancer is a dynamic process regulated by macrophage-stellate cell interaction. *Lab. Invest.* **94**, 409–421 (2014).
101. Buchholz, M. *et al.* Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: organ-specific variations of a common transcriptional phenotype. *J Mol Med* **83**, 795–805 (2005).
102. Pan, S. *et al.* Quantitative proteomics investigation of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Electrophoresis* **30**, 1132–1144 (2009).
103. Clark, C. E. *et al.* Dynamics of the Immune Reaction to Pancreatic Cancer from Inception to Invasion. *Cancer Res* **67**, 9518–9527 (2007).
104. Fujie, S., Maita, H., Ariga, H. & Matsumoto, K. Tenascin-X Induces Cell Detachment through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **32**, 1795–1799 (2009).
105. Elefteriou, F., Exposito, J.-Y., Garrone, R. & Lethias, C. Cell adhesion to tenascin-X mapping of cell adhesion sites and identification of integrin receptors. *European Journal of Biochemistry* **263**, 840–848 (1999).
106. Chiovaro, F., Chiquet-Ehrismann, R. & Chiquet, M. Transcriptional regulation of

- tenascin genes. *Cell Adhesion & Migration* **9**, 34–47 (2015).
107. Ekblom, M., Fässler, R., Tomasini-Johansson, B., Nilsson, K. & Ekblom, P. Downregulation of tenascin expression by glucocorticoids in bone marrow stromal cells and in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **123**, 1037–1045 (1993).
108. Li, L. & Davie, J. R. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* **192**, 275–283 (2010).
109. Kato, A., Endo, T., Abiko, S., Ariga, H. & Matsumoto, K. Induction of truncated form of tenascin-X (XB-S) through dissociation of HDAC1 from SP-1/HDAC1 complex in response to hypoxic conditions. *Exp. Cell Res.* **314**, 2661–2673 (2008).
110. Endo, T., Ariga, H. & Matsumoto, K. Truncated form of tenascin-X, XB-S, interacts with mitotic motor kinesin Eg5. *Mol Cell Biochem* **320**, 53–66 (2009).



Stroma Involvement in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: An Overview Focusing on Extracellular Matrix Proteins

Sophie Liot^{1†}, Jonathan Balas^{1†}, Alexandre Aubert¹, Laura Prigent¹, Perrine Mercier-Gouy¹, Bernard Verrier¹, Philippe Bertolino², Ana Hennino², Ulrich Valcourt¹ and Elise Lambert^{1*}

¹ Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTI), UMR CNRS 5305, Université Lyon 1, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon, France, ² Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Gertraud Orend,
INSERM Immuno Rhumatologie
Moléculaire (IRM), France

Reviewed by:

Rolf A. Brekken,
University of Texas Southwestern
Medical Center, United States
I. Velázquez-Quesada,
Temple University, United States

*Correspondence:

Elise Lambert
elise.lambert@ibcp.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Immunity and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 30 September 2020

Accepted: 23 February 2021

Published: 06 April 2021

Citation:

Liot S, Balas J, Aubert A, Prigent L,
Mercier-Gouy P, Verrier B, Bertolino P,
Hennino A, Valcourt U and Lambert E
(2021) Stroma Involvement in
Pancreatic Ductal Adenocarcinoma:
An Overview Focusing on Extracellular
Matrix Proteins.
Front. Immunol. 12:612271.
doi: 10.3389/fimmu.2021.612271

Pancreatic cancer is the seventh leading cause of cancer-related deaths worldwide and is predicted to become second in 2030 in industrialized countries if no therapeutic progress is made. Among the different types of pancreatic cancers, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is by far the most represented one with an occurrence of more than 90%. This specific cancer is a devastating malignancy with an extremely poor prognosis, as shown by the 5-years survival rate of 2–9%, ranking firmly last amongst all cancer sites in terms of prognostic outcomes for patients. Pancreatic tumors progress with few specific symptoms and are thus at an advanced stage at diagnosis in most patients. This malignancy is characterized by an extremely dense stroma deposition around lesions, accompanied by tissue hypovascularization and a profound immune suppression. Altogether, these combined features make access to cancer cells almost impossible for conventional chemotherapeutics and new immunotherapeutic agents, thus contributing to the fatal outcomes of the disease. Initially ignored, the Tumor MicroEnvironment (TME) is now the subject of intensive research related to PDAC treatment and could contain new therapeutic targets. In this review, we will summarize the current state of knowledge in the field by focusing on TME composition to understand how this specific compartment could influence tumor progression and resistance to therapies. Attention will be paid to Tenascin-C, a matrix glycoprotein commonly upregulated during cancer that participates to PDAC progression and thus contributes to poor prognosis.

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma, stroma, tumor microenvironment, extracellular matrix, tenascin

INTRODUCTION

Pancreatic cancer is relatively rare and represents 2.5% of all cancers worldwide in 2018 (1). However, the fatal outcome of this disease is almost inevitable which consequently ranks this cancer site as the most devastating one. This poor survival is mainly inherent to the fact that this cancer evolves with few specific symptoms and is therefore mostly diagnosed at an advanced stage when

the cancer presents a very aggressive behavior (4). Upon cancer detection, resection is possible in 10–20% of the cases, depending on tumor stage, and localization. Before or after surgery, or for unresectable tumors, various treatments including chemotherapeutic agents (gemcitabine, nab-paclitaxel, 5-fluorouacil, or FOLFIRINOX) and radiotherapy are generally used, but demonstrate little improvement of patient survival (4–6). Therefore, the discovery of new therapeutics and/or earlier detection of the disease before the onset of signs and symptoms is mandatory to improve patient survival rate.

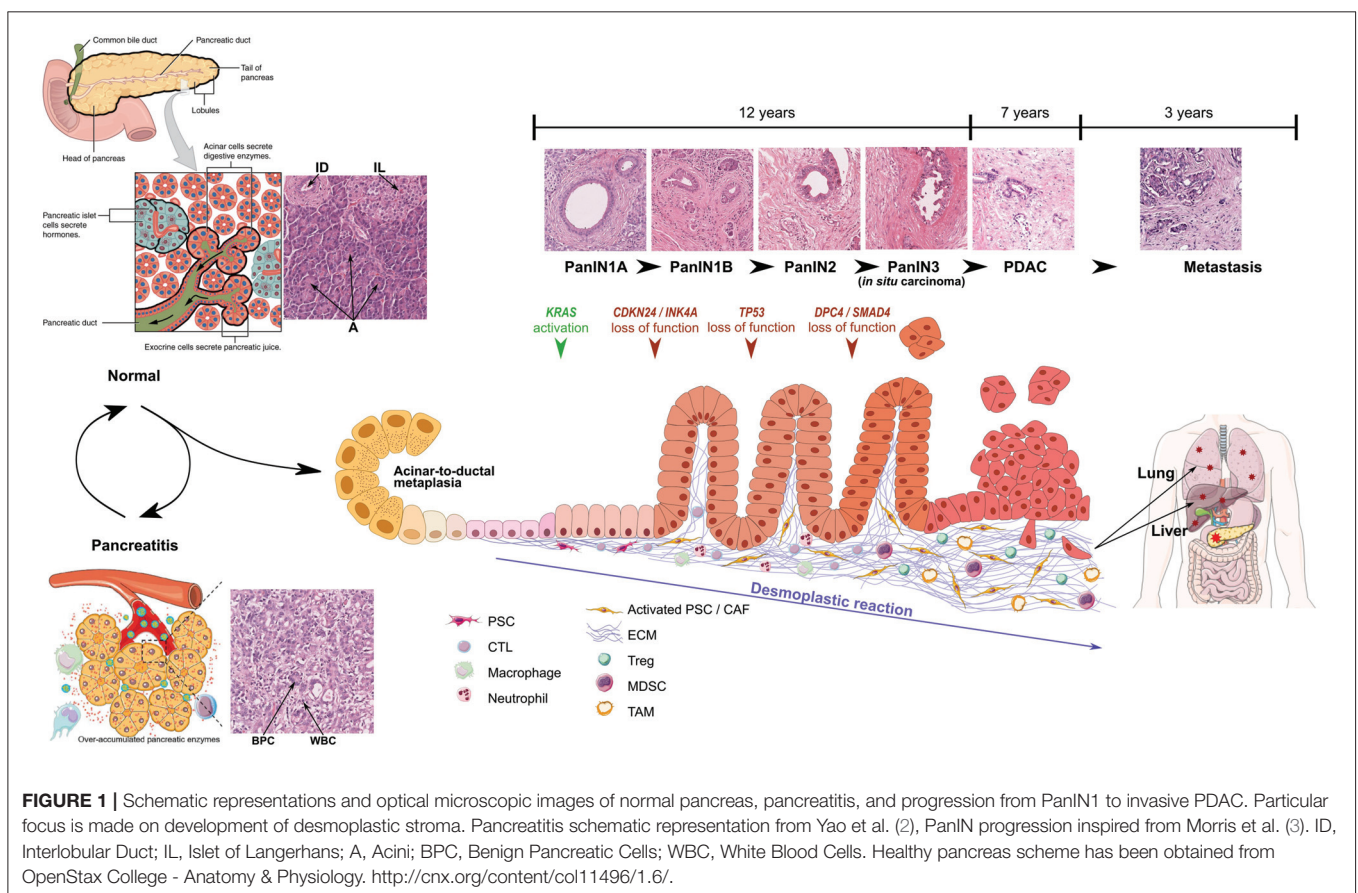
Acinar cells are the predominant cell type in the pancreas and present an intrinsic plasticity enabling them to perform metaplasia to ductal-like cells. This metaplastic process called acinar-to-ductal metaplasia (ADM), is observed during acute and chronic pancreatitis and may represent the initial step toward the formation of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN), which may then progress to PDAC. PanIN lesions are classified in different grades, from PanIN1A to PanIN3, characterized by the evolution of epithelial cell morphology (Figure 1).

Pancreatic carcinogenesis is a multi-stage process resulting primarily from the accumulation of genetic alterations (average of 63 mutations per patient) in the somatic DNA of normal cells as well as inherited mutations (7). Among the numerous referenced alterations, *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, and *SMAD4* are the four most frequently mutated

genes. *KRAS* proto-oncogene mutations have been detected in 92% of PDAC and are already detectable in precursor lesions, including early preinvasive intraepithelial neoplasia. Interestingly, *SMAD4* mutations are associated with tumor size, lymphatic invasion, and metastasis and no survival at 5 years (8).

Besides the dramatic modifications in epithelial tissue morphology and genome, PDAC formation is also characterized by the desmoplastic reaction induced by tumor cells, which corresponds to a profound modification of the connective tissue through (1) recruitment and activation of specific fibroblasts and (4) intense ECM deposition. Initially corresponding to around 5% of pancreas mass, the connective tissue thus largely develops up to 90% of tumor area (60% on average) (9). Changes in stroma composition also lead to modifications in local immune system and vascularization, which dramatically influence prognosis (10, 11). However, the TME also contains anti-tumor components, which could explain why strategies depleting connective tissue cells have been so ineffective or even deleterious (12, 13).

The purpose of this review will thus be to describe the changes (1) in the cellular composition of the TME, as well as (4) in the ECM composition by attempting to identify which proteins have a potential pro- or anti-tumoral role with the ultimate aim of bringing out new therapeutic targets.



Cellular Composition of the Stroma

Cancer-Associated Fibroblasts

Among the various PDAC stromal cell types, the Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) are the most abundant. The CAF population presents a high heterogeneity and diversity of functions, presumably due to the multiple origins of these cells (14). Indeed, they can originate from tissue-resident fibroblasts that are activated under the control of growth factors such as TGF β or following genetic mutations such as TP53 or PTEN (15). Another cellular origin of CAFs, and probably the most frequent one, is the Pancreatic Stellate Cells (PSCs) (16). PSC activation occurs following pancreatic injury, or upon PDGF or TGF β stimulation, and leads to (1) morphological changes from a star-like shape into spindle-like cells, (4) loss of vitamin-A droplets and (5) increase in cell nucleus volume (17–19). CAFs may also derive from the recruitment and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells or from the trans-differentiation of non-fibroblastic lineages such as adipocytes or epithelial cells (12, 20, 21). Various markers can be used to distinguish the multiple subsets of CAFs, such as PDGF-receptor α and β (PDGFR α/β), α -SMA, FAP, and S100A4 (Ca²⁺-binding protein), but none of them is exclusively expressed by CAFs, further highlighting CAF heterogeneity (21, 22). CAFs are responsible for the deposition of a dense tumor stroma, which subsequently can function as a physical barrier against immune infiltration or as a structural scaffold for cell interactions. In addition, CAFs secrete MMPs, which consequently ensure ECM degradation and the subsequent release of various factors leading to the recruitment of specific cells and/or cell dissemination. Finally, CAFs also produce many growth factors and proinflammatory cytokines such as TGF β , vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin-6 (IL-6) and CXC-chemokine ligand 12 (CXCL12), thereby promoting tumor growth, angiogenesis and recruitment of immunosuppressive cells into the TME to assist in immune evasion (20, 23). In an effort to depict the fibroblast heterogeneity, 3 different CAF subpopulations have been identified according to their function or gene signature: the “inflammatory,” “myofibroblastic” and “antigen-presenting” CAFs (24, 25).

Endothelial Cells

Despite the obvious production of pro-angiogenic factors by CAFs and pancreatic tumor cells, PDAC is characterized by a low microvascular density compared to other types of cancers (11). Indeed, the dense fibrotic stroma forms a physical barrier that inhibits the formation and the proper functioning of vasculature, resulting in sparse constricted blood and lymphatic vessels that are only partially functional and physically separated from the cancer cells. This feature is deleterious for patient survival since low vascularity is associated with poor patient survival due to poor anti-cancer immune cell infiltration and chemotherapeutic drug delivery (26). Consequently, addition of anti-angiogenic drug (bevacizumab) to standard chemotherapy demonstrated no improvement in PDAC outcome (27). On contrary, vascular normalization aiming at improving drug delivery could be a good strategy for this type of carcinoma (27).

Infiltrating Immune Cells

Chronic pancreatitis is a risk factor for the development of PDAC as well as of systemic diseases characterized by chronic low-grade inflammation, such as metaflammation in patients with the metabolic syndrome or diabetes (28, 29). Interestingly, chronic pancreatitis and PDAC tissues show similarities in their desmoplasia and inflammatory infiltrates, indicating overlapping inflammatory responses.

The prevention and elimination of cancer cells are dependent on the immune system around the tumor. The PDAC immune microenvironment is characterized by (1) the exhaustion of anti-cancer immune cytotoxic T lymphocytes notably due to high mechanical constraints within the tumor and (4) the infiltration of multiple types of tumor-promoting immune cells, including myeloid-derived suppressor cells, tumor-associated macrophages and regulatory T cells (10, 30). Those tumor-promoting immune cells, in combination with CAFs and cancer cells secrete various pro-inflammatory cytokines such as TGF β , TNF α , and different interleukins which subsequently favor immune evasion, PDAC development and metastasis formation (31). Various strategies are currently developed to treat PDAC by restoring proper immune system function: enzymatic digestion of TME, vascular normalization and neutralization of immune system modulators (21).

ECM Evolution During Pancreatic Carcinogenesis

PDAC is characterized by an intense desmoplastic reaction, defined as the fibrotic response of healthy tissue to invasive carcinoma and consisting of an abnormal accumulation of ECM components, mostly collagen fibers (32). This new TME acts as a physical barrier preventing (1) proper angiogenesis, and subsequent drug delivery, and (4) anti-cancer immune infiltration (33, 34). Consequently, TME has been considered as deleterious for patient prognosis and CAFs, which are responsible for dense ECM deposition, have been the target of clinical trials. However, CAF depletion resulted in an apparent paradoxical accelerated disease progression and encouraged a more detailed analysis of the most differentially regulated ECM components in the pancreatic tumors vs. healthy tissue, in order to identify new therapeutic targets within the TME (35, 36). We hereafter describe these matrix components according to the matrisome classification [Table 1; (37)].

Core Matrisome

Collagens

Collagens are by far the most represented constituents of the connective tissue of normal and pathological pancreas (>90% of ECM proteins), with the type I and III fibrillar collagens accounting for >90% of all collagen mass (36, 38). Protein level for those collagens increases 2.6-fold during pancreatic tumor progression, which explains desmoplasia and justifies them as crucial targets. Additionally, the stroma undergoes intense rearrangement, leading to highly aligned collagen fibers, associated with bad prognosis for patients following pancreatic cancer resection (111). Despite their increased deposition, no ratio variation is observed for type I and III collagens

TABLE 1 | ECM proteins involved in PDAC, presented according to the matrisome classification.

Matrisome category	Name	Pro (+) or Anti (-) tumoral role in PDAC			Secreted by...	References		
Part 1								
Core matrisome	Collagens	Collagen type I	+	Patients	• \approx Patient survival (analysis of PDAC patient samples and their corresponding clinicopathological parameters)	Stromal cells	(36, 38–45)	
			<i>in vivo</i>		• Nutritive source (PK1 model)			
			<i>in vitro</i>		• + Invasion and EMT • Mechanical constraint \rightarrow hypovascularization, low immune cell infiltration, - chemotherapy delivery			
		Collagen type III	+	<i>in vivo</i>	• Desmoplasia/mechanical constraint \rightarrow hypovascularization, low immune cell infiltration, - chemotherapy delivery	Stromal cells		
		Collagen type IV	+	Patients	• High circulating collagen IV: \approx survival after surgery (quick relapse)	Tumor and stromal cells		(46, 47)
			<i>in vivo</i>		• Poor outcome			
			<i>in vitro</i>		• Nutritive source (PK1 model)			
		Collagen type V	+	<i>in vivo</i>	• + Metastasis formation (orthotopic mouse models of PDAC)	Stromal cells, PSCs		(48)
	<i>in vitro</i>			• + Adhesion, proliferation, migration and survival (PDAC cell lines) • + Angiogenesis				
	Collagen type VI	+	<i>in vivo</i>	• + Metastasis under hyperglycemia conditions (orthotopic implantation and intravenous injection of PDAC murine cells)	Stromal cells	(36, 39)		
	Collagen type XV	-	<i>in vitro</i>	• - Migratory abilities and EMT (BxPC-3 cell line)	Stromal cells	(49)		
	Proteoglycans	Testican	+	Patients	• Poor patient survival	Stromal cells	(50, 51)	
			<i>in vitro</i>		• + Collagen deposition and invasive cancer cell growth (organotypic coculture models) • + Cancer cell proliferation, survival, migration, invasion and EMT (PDAC cell lines)			
		Lumican	-	Patients	• \approx Patient survival • \approx Metastatic recurrence after surgery	Stromal cells	(52, 53)	
			<i>in vivo</i>		• - Cancer cell growth (xenograft and syngeneic orthotopic mouse models)			
Decorin		-	<i>in vitro</i>	• - Cell growth (cancer cell lines)	Stromal cells	(36, 54)		
Biglycan		-	<i>in vitro</i>	• Cell growth (PDAC cell lines) • - Cell migration / metastasis (pancreatic cell lines)	Tumor and stromal cells	(55–58)		
	+	Patients	• Poor prognosis (\approx overall survival)	Stromal cells				
Versican	+	<i>in vivo and in vitro</i>	• Immunosuppressive component, \approx T cell infiltration (KPC mouse model and PDAC organotypic spheroid coculture models)	Tumor and stromal cells	(59, 60)			
ECM glycoproteins	Laminins	+	Patients	• Poor prognosis (public online databases)	Tumor cells	(61, 62)		
		<i>in vivo</i>		• + Cancer cell proliferation, invasion and migration (+ metastasis) (subcutaneous xenograft mouse model and pancreatic cancer liver metastasis mouse model)				
		<i>in vitro</i>		• + Cancer cell proliferation, survival, migration, invasion and EMT (pancreatic cell lines)				
	Fibronectin	+	Patients	• Associated with advanced stages, patient short survival and poor prognosis (analysis of PDAC patient samples and their corresponding clinicopathological parameters)	Tumor and stromal cells	(63–68)		
		<i>in vitro</i>		• + Tumor growth and invasion • + Chemoresistance (cells from PDAC patients and pancreatic cancer cell lines)				
	TGF β i	+	Patients	• Poor prognosis, associated with patient short survival	Tumor and stromal cells	(69–72)		
		<i>in vivo</i>		• + Tumor rigidity and immunosuppression (various pancreatic mouse models)				
		<i>in vitro</i>		• + Tumor growth • + Cancer cell migration and invasion (pancreatic cancer cell lines)				
	Tenascin-C	+	Patients	• Poor prognosis (PDAC patient samples), may depend on tumor stage • Correlated with perineural invasion, advanced stages, postoperative locoregional recurrence and metastases (resected PDAC specimens and clinicopathological features)	Stromal cells	(9, 73–77)		
<i>in vitro</i>			• + Perineural invasion (coculture model) • + Cancer cell proliferation, invasion and EMT (metastasis) (PDAC cell lines and primary PanIN and PDAC cells)					

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Matrisome category	Name	Pro (+) or Anti (-) tumoral role in PDAC		Secreted by...	References			
PART 2								
Matrisome-associated proteins	Secreted factors	TGFβ	+	<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> + PSC activation, proliferation and collagen synthesis (subcutaneous and orthotopic transplantation models and transgenic mouse models) + Metastasis (orthotopic and transgenic mouse models) Immunosuppression and inappropriate inflammation 	Tumor and stromal cells	(40, 78–81)	
			<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> + PSC activation, proliferation and collagen synthesis + Cancer cell proliferation and –apoptosis (various pancreatic cancer cell lines and coculture models) + Cancer cell EMT and invasion 				
		SHH	+	<i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> + PSC recruitment and activation (+ desmoplasia) (human pancreatic primary cells, PDAC cell lines, subcutaneous and orthotopic transplantation of PDAC cells and transgenic pancreatic mouse models) 	Tumor cells		(82)
		FGF-2	+	<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> + PSC activation and collagen synthesis (various PDAC cell lines) 	Tumor cells		(40)
		PDGF	+	<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> + PSC activation and collagen synthesis (various PDAC cell lines) 	Tumor cells		(40)
		CXCLs	+	<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> + Desmoplastic reaction and tumor angiogenesis (transgenic mouse models) + Cancer cell migration/invasion + Inflammation 	Tumor cells		(36, 83, 84)
		S100 proteins	+	<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> + Tumor growth and metastasis (various xenograft and transgenic pancreatic mouse models) 	Tumor cells		(85–87)
	<i>in vitro</i>			<ul style="list-style-type: none"> + Cancer cell survival, migration/invasion (PDAC cell lines) 				
	ECM regulators	MMPs	+	Patients	<ul style="list-style-type: none"> Poor prognosis (analysis of PDAC patient samples and their corresponding clinicopathological parameters) 	Tumor cells	(36, 88–90)	
				<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> ADM induction (various KRAS mouse models) + Tumor growth and metastasis (mice harboring orthotopic pancreatic cancers, subcutaneously injected with pancreatic cancer cell lines or several genetic Kras-driven PDAC models) + Angiogenesis (subcutaneously or orthotopically injected mice with PDAC cells) 			
				<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> + Cancer cell proliferation and invasion 			
		ADAMs	+	Patients	<ul style="list-style-type: none"> Associated with poor prognosis and invasive tumors (analysis of PDAC patient samples and their corresponding clinicopathological parameters) 	Tumor and stromal cells	(91–93)	
				<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> + Tumor growth and metastasis (orthotopically-injected mice and KRAS mouse model) + Angiogenesis 			
				<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> + Cancer cell migration/invasion (PDAC cell lines) + Angiogenesis 			
TIMPs		–	<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> Tumor growth and metastasis, + apoptosis (subcutaneous and orthotopic injection) – Angiogenesis 	Stromal cells	(94–96)		
			<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> – Cancer cell invasion, –invadopodia (co-culture models) 				
SERPINS		+ (–)	Patients	<ul style="list-style-type: none"> Poor survival / Poor prognosis (analysis of PDAC patient samples and their corresponding clinicopathological parameters) 	Tumor and stromal cells	(36, 97–100)		
			<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> + Tumor growth, invasion and metastasis (PDAC cells transplanted mouse models) 				
LOXs	+	Patients	<ul style="list-style-type: none"> Poor survival post-resection (transcriptomic analysis of patient samples) 	Stromal cells	(36, 101, 102)			
		<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> Drug resistance: + desmoplasia, –perfusion (orthotopically transplanted mouse model) + Cancer cell migration/invasion, + metastasis (KPC mouse model) 					

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Matrisome category	Name	Pro (+) or Anti (-) tumoral role in PDAC			Secreted by...	References
ECM-affiliated proteins	Annexins	+	Patients	<ul style="list-style-type: none"> • Associated with poor patient survival, tumor progression and recurrence post-resection (analysis of PDAC patient samples and their corresponding clinicopathological parameters, and TCGA public online database) 	Tumor and stromal cells	(103–109)
			<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • + Metastasis (pancreatic transplanted mouse model) 		
			<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • + Cancer cell growth, - apoptosis • + Cancer cell invasion and EMT activation (PDAC cell lines) • + Chemoresistance 		
	Galectins	+	<i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Gal1: ADM induction • Gal3: + Tumor growth and immune escape • Gal9: + Immune escape 	Stromal cells (Gal1) and tumor cells (Gal3 and Gal9)	(110)
			<i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Gal1 and 3: + PSC activation • Gal1: + Cancer cell proliferation, migration/invasion and immunosuppression • Gal3: + Cancer cell growth/proliferation and invasion/migration 		
		-	Patients	<ul style="list-style-type: none"> • Gal4: Associated with patient better survival and less metastases 	Tumor cells	
<i>in vitro</i>			<ul style="list-style-type: none"> • Gal4: -Cancer cell migration and invasion (PDAC primary cells and cell lines) 			

Pro-(+) or anti(-) tumoral role as well as cells responsible for their secretion are detailed. +: promotion, -: inhibition, ↗: increased, ↘: decreased. Each protein family has been classified according to the matrisome classification and is highlighted with a specific color. Tenascin-C information is highlighted in dark green.

between healthy and PDAC connective tissues, thus encouraging attention to other collagens differentially expressed during pancreatic carcinogenesis (37). Among them, type IV, V, VI, VII, XII, XIV, and XV collagens are key players in pancreatic tumorigenesis and act either as beneficial or detrimental molecules. For instance, collagen IV, which is an essential constituent of the basement membrane (BM), is produced by cancer cells, favors cancer cell growth, migration and protect them from apoptosis. Consequently, high serum level of collagen IV is associated with quick relapse after surgery and thus poor survival (46, 47). On contrary, another BM component, collagen XV, is lost during pancreatic tumorigenesis and its overexpression reduces the migratory abilities of PDAC cells in type I collagen-rich matrices (49). Interestingly, collagen VI is highly expressed during PDAC progression, induces metastatic colonization particularly in a hyperglycemic context and could therefore be targeted especially in diabetic patients (36, 39).

Besides their architectural and signaling role enabling tumor progression, collagens also serve as a nutritive source. Indeed, under PDAC specific conditions low in oxygen and nutrients, tumor cells metabolize collagen molecules, and thus collagen-derived proline enables PDAC cell proliferation (112). Therefore, this could explain the correlation between high serum collagen fragment levels in serum and significantly shorter overall survival, and prompts detailed analysis of collagen fragment role during PDAC progression (113).

Proteoglycans

Proteoglycans consist of one or more glycosaminoglycan (GAG) chain(s)—representing around 85% of the molecule mass—covalently attached to a core protein, and are categorized depending of their GAG chain nature and size (114). Among the small proteoglycans which are mainly expressed by TME, testican

acts as a pro-tumoral molecule by affecting collagen deposition and thus favoring tumor cell growth and invasion, therefore leading to a poor patient survival, whereas lumican interferes with tumor progression and is associated with prolonged patient survival by limiting cancer cell growth and metastasis (50, 52, 53). Decorin is also considered as an anti-tumoral constituent by reducing tumor cell growth (36, 54) whereas the pro- or anti-tumoral status of biglycan in PDAC is still under debate. Indeed, its expression by stromal and epithelial cells (1) is induced by TGFβ, (4) has been described to inhibit pancreatic cancer cell growth and migration (55–57), but (5) is associated with poor prognosis (58). Finally, versican, which corresponds to a large proteoglycan expressed by both stromal and epithelial cells in PDAC, acts as an immunosuppressive component by reducing T cell infiltration and is thus considered as a deleterious molecule for patient survival (59).

Glycoproteins

Laminins are a family of ECM glycoproteins representing the major non-collagenous constituent in BM. Most of their subunits are over-expressed in PDAC and associated with poor outcome for patient survival (61). Fibronectin (FN1), which supports cell-ECM interactions, is essential for wound healing, development, and tissue homeostasis under physiological context. FN1 is also upregulated in PDAC which leads to tumor growth, invasion and metastasis formation and is consequently associated with poor prognosis in PDAC patients (63).

Transforming Growth Factor beta-induced (TGFβi) protein, also named βig-h3, is able to modulate cell adhesion through various integrins, including αvβ3, α1β1, and αvβ5. This glycoprotein is increased during pancreatic cancer and acts either directly on tumor CD8+ T cells by reducing their proliferation and activation or on tumor cells by promoting their migration and invasion (69, 115). TGFβi could thus be regarded

for its double therapeutic potential to increase local anti-tumor immunity and subsequently induce cancer cell apoptosis or inhibit metastasis (69–72).

Among the four members of the Tenascin (TN) family, Tenascin-C (TNC) is by far the most well-characterized and is commonly described as being widely distributed in embryonic tissues, restricted in some adult tissues, such as stem cell niches and tendons (116), and *de novo* re-expressed during physio-pathological contexts such as wound healing and tumor progression (117). In PDAC, TNC protein is restrained to the tumor stroma and is not found in epithelial tumor cells or adjacent normal pancreatic tissue (9). High TNC expression, and downstream signaling through the Annexin II receptor, have been initially correlated with poor prognosis but this association is still controversial and could depend on the stage and grade of the pancreatic tumor or the specific location of TNC (9, 73, 118). So, high perineural TNC expression is associated with perineural invasion and poor prognosis with high loco-regional recurrence (74). In the same line, a recent study highlighted TNC as a prominent protein found in exosomal compartment and associated with local invasion and distant metastasis (75).

We recently demonstrated *TNXB* gene and TNX protein were significantly downregulated in the six cancers with the highest incidence and mortality worldwide (i.e., lung, breast, prostate, stomach, colorectal, and liver carcinomas) and low TNX levels were associated with poor prognosis in patients suffering from lung and breast carcinomas (119). In the same study, TNX protein expression was also decreased in tumor samples from PDAC patients (119).

Matrisome-Associated Proteins

Secreted Factors

In pancreatic cancer, Various Factors Are Mainly produced by cancer cells to favor tumor progression. Among them, TGF β role is complex and mediates both pro- and anti-tumoral activities in cancer cells depending on their context, in space and time and their microenvironment. Indeed, in normal pancreatic cells and at early stages of pancreatic carcinogenesis, TGF β exerts a tumor suppressive effect through SMAD4-regulated genes. However, in the late phase, SMAD4 is inactivated whereas TGF β expression is upregulated leading to PI3K/Akt, Ras/ERK, p38MAPK, and Rho/GTPase pathway activation and subsequent tumor progression (120). Then, TGF β invariably induces (1) proliferation and survival of PDAC cells, (4) EMT, invasion, and metastasis, (5) production of a dense fibrotic stroma and (6) deregulation of the immune microenvironment toward immunosuppression and inappropriate inflammation. Thus, various promising pre-clinical and clinical trials have already evaluated the potential of TGF β -targeting therapies, through TGF β regulator (losartan), TGF β neutralizing antibodies or TGF β receptor inhibitors (78–81, 121, 122). Other signaling factors are secreted by pancreatic cancer cells, enabling PSC recruitment and activation, and subsequent desmoplastic response inducing collagen synthesis. Thus, Sonic HedgeHog (SHH), Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) and Platelet-derived Growth Factor (PDGF) are overexpressed during PDAC and interfering with their signaling corresponds to valuable strategies

for PDAC treatment (40, 82). However, clinical trials using IPI-926, vismodegib and sonidegib that target the hedgehog pathway have so far been disappointing (123). PDAC cells also overexpress several CXC ligands, which are involved in desmoplastic reaction, immune modulation and tumor angiogenesis (36, 124). Thus, blocking the CXCLs-CXCR2 axis improves survival in a PDAC developing mouse model by reducing cell invasion and inflammation and could be a therapeutic approach against PDAC progression (83, 125). Finally, proteomic analyses of ECM during PDAC progression demonstrated that various members of the S100 Ca²⁺-binding protein family, notably S100P and S100A4, are upregulated in this disease and their high levels are associated with poor prognosis, thus shedding light on their receptor, i.e., the Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE) and the RAGE/S100 ligand axis as a promising therapeutic approach (85). Therefore, various S100 monoclonal antibodies, S100 protein inhibitors or RAGE antagonist have already demonstrated a reduction of tumor growth and metastasis formation in mouse models (85).

ECM Regulators

Many proteins overexpressed during pancreatic tumorigenesis are responsible for ECM remodeling and are therefore potential targets for pancreatic cancer treatment. Matrix MetalloProteinases (MMPs), A Disintegrin And Metalloproteinases (ADAMs), and A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs (ADAMTSs) are zinc-dependent endopeptidases that are able to degrade all ECM proteins. Their activities are tightly regulated by proteolytic activation and inhibition *via* their natural inhibitors, Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs) (126). The imbalance between the expression of metalloproteinases and TIMPs is thus of crucial interest in cancer development and metastasis (127). With some exceptions, those proteases are overexpressed during pancreatic cancer progression and are the targets of numerous pre-clinical and clinical trials, which for some of them were disappointing or less powerful than expected, probably due to (1) aspecific metalloproteinase targeting (use of broad-spectrum inhibitors) or (4) compensation mechanisms set up by tumor cells (88).

Several SERPIN family members are also importantly differentially regulated during PDAC development, mainly promoting tumor growth, invasion, and are associated with poor survival, but their activities have to be analyzed individually with particular attention paid to their original cells (36, 97–99). Finally, Lysyl Oxidases (LOX), a family of extracellular copper-dependent enzymes involved in ECM cross-linking, are also important matrix regulators over-represented during pancreatic tumorigenesis (36). Their inhibition in mouse model prolonged tumor-free survival by interfering with stroma stiffness (101, 102).

ECM-Affiliated Proteins

Among the ECM-affiliated proteins significantly deregulated during PDAC development, numerous members belong to the vertebrate “A subgroup” of the annexin superfamily coding a

calcium- and membrane-binding protein (36). This subgroup consists of at least 12 members (A1-A11 and A13), all of which are suspected to be involved in tumor development (103). In PDAC, annexins are known to favor tumor cell growth, EMT, invasion and metastasis and to inhibit apoptosis. Additionally, they interact with various peri-cellular proteins such as S100 proteins and TNC, which are upregulated during PDAC progression. Therefore, annexin overexpression is associated with poor patient prognosis and could inspire new therapeutic strategies (128). Galectins, which are a family of carbohydrate-binding proteins, are also upregulated during PDAC progression (36, 110). Besides galectin-4, which has been described as a tumor suppressor by inhibiting tumor cell migration and invasion, the other galectins favor pancreatic tumor. Consequently, galectin inhibitors are considered as promising opportunities for pancreatic cancer therapeutic interventions, either alone or combined with current chemo- and/or immunotherapies (110).

CONCLUSIONS

During pancreatic tumorigenesis, important stromal modifications occur both at the cell landscape level and the matrix molecular composition in response to tumor signals. Herein, we have listed these major changes by focusing only on the proteins belonging to the matrisome. However, other extracellular components have not been underlined, but can drastically influence pancreatic tumor progression, as it is the case for hyaluronic acid (HA) (129–136). Indeed, in PDAC mouse model, HA deposition (1) was observed very early during tumor formation in an intralobular position in ADM regions and close to PanIN lesions and (4) preceded collagen deposition around lesions that will progress to PDAC (129). Besides making the ECM denser, HA deposition may be related to an inflammatory stage allowing the recruitment of immune cells in ADM areas, which further underlines the value of HA as a therapeutic target for PDAC treatment. Various drugs targeting HA have been developed such as pegylated hyaluronidase (PEGPH20) and Minnelide (132, 137). However, PEGPH20 in combination with conventional

chemotherapies failed to demonstrate an improvement in median overall survival, leading to the recent discontinuation of PEGPH20 development after a phase 3 clinical trial. Minnelide, corresponding to an active substance extracted from thunder god vine is still under investigation and its mechanism of action seems multimodal (132, 138–140). Additionally, abnormal glycosylation of ECM components such as proteoglycans and glycoproteins can significantly influence tumor growth, neoplastic progression, metastasis and chemoresistance and thus should be considered for new drug design (141, 142). So far, despite promising results in preclinical models, no therapeutic strategy targeting the stroma compartment has brought conclusive results in clinical settings. This could be explained by differences in pharmacokinetics, pharmacodynamics and metabolism and the failure to accurately model the tumor microenvironment of patients using preclinical mouse models. However, a better understanding of the tumor stroma is expected to open up new possibilities for the development of new drugs.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SL and JB: data curation, investigation and writing—original draft. AA, LP, and PM-G: writing—review and editing. BV: funding acquisition. PB and UV: writing—review and editing and funding acquisition. AH: investigation and writing—review and editing. EL: conceptualization, supervision, and writing—original draft. All authors: contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer, Comité du Rhône, Comité de l'Allier, Comité de Savoie, and Comité de la Drôme, Comité Régional Auvergne-Rhône-Alpes et Saône-et-Loire (2019) as well as by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (PJA 20141201790), Bristol Myers Squibb Foundation (2018–2019), and Inserm Transfert (2018–2020).

REFERENCES

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. (2019) 144:1941–53. doi: 10.1002/ijc.31937
2. Yao Q, Jiang X, Zhai Y-Y, Luo L-Z, Xu H-L, Xiao J, et al. Protective effects and mechanisms of bilirubin nanomedicine against acute pancreatitis. *J Control Release*. (2020) 322:312–25. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.03.034
3. Morris JP, Wang SC, Hebrok M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer*. (2010) 10:683–95. doi: 10.1038/nrc2899
4. Eibl AS G. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*. (2015). Available online at: /reviews/pancreatic-ductal-adenocarcinoma (accessed September 19, 2020).
5. Lambert A, Schwarz L, Borbath I, Henry A, Van Laethem J-L, Malka D, et al. An update on treatment options for pancreatic adenocarcinoma. *Ther Adv Med Oncol*. (2019) 11:1758835919875568. doi: 10.1177/1758835919875568
6. Oba A, Ho F, Bao QR, Al-Musawi MH, Schulick RD, Del Chiaro M. neoadjuvant treatment in pancreatic cancer. *Front Oncol*. (2020) 10:245. doi: 10.3389/fonc.2020.00245
7. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*. (2008) 321:1801–6. doi: 10.1126/science.1164368
8. Oshima M, Okano K, Muraki S, Haba R, Maeba T, Suzuki Y, et al. Immunohistochemically detected expression of 3 major genes (CDKN2A/p16, TP53, and SMAD4/DPC4) strongly predicts survival in patients with resectable pancreatic cancer. *Ann Surg*. (2013) 258:336–46. doi: 10.1097/SLA.0b013e3182827a65
9. Leppänen J, Lindholm V, Isohookana J, Haapasaaari K-M, Karihtala P, Lehenkari PP, et al. Tenascin C, Fibronectin, and tumor-stroma ratio in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*. (2019) 48:43–8. doi: 10.1097/MPA.0000000000001195
10. Li K-Y, Yuan J-L, Trafton D, Wang J-X, Niu N, Yuan C-H, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma immune microenvironment

- and immunotherapy prospects. *Chronic Dis Transl Med.* (2020) 6:6–17. doi: 10.1016/j.cdtm.2020.01.002
11. Longo V, Brunetti O, Gnoni A, Cascinu S, Gasparini G, Lorusso V, et al. Angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma: A controversial issue. *Oncotarget.* (2016) 7:58649–58. doi: 10.18632/oncotarget.10765
 12. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, Mirek ET, Palermo CE, Sastra SA, et al. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* (2014) 25:735–47. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.021
 13. Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu C-C, Simpson TR, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell.* (2014) 25:719–34. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.005
 14. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med.* (2014) 211:1503–23. doi: 10.1084/jem.20140692
 15. Arina A, Idel C, Hyjek EM, Alegre M-L, Wang Y, Bindokas VP, et al. Tumor-associated fibroblasts predominantly come from local and not circulating precursors. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2016) 113:7551–6. doi: 10.1073/pnas.1600363113
 16. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Ragulan C, Cros J, Patil Y, Martinet M, et al. Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol.* (2019) 248:51–65. doi: 10.1002/path.5224
 17. Xu Z, Pothula SP, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic cancer and its stroma: a conspiracy theory. *World J Gastroenterol.* (2014) 20:11216–29. doi: 10.3748/wjg.v20.i32.11216
 18. Moir JAG, Mann J, White SA. The role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer. *Surgical Oncology.* (2015) 24:232–8. doi: 10.1016/j.suronc.2015.05.002
 19. Apte MV, Xu Z, Pothula S, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic cancer: The microenvironment needs attention too!. *Pancreatol.* (2015). 15 (4. Suppl):S32–8. doi: 10.1016/j.pan.2015.02.013
 20. Sun Q, Zhang B, Hu Q, Qin Y, Xu W, Liu W, et al. The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer. *Theranostics.* (2018) 8:5072–87. doi: 10.7150/thno.26546
 21. Liu T, Han C, Wang S, Fang P, Ma Z, Xu L, et al. Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* (2019) 12:86. doi: 10.1186/s13045-019-0770-1
 22. Norton J, Foster D, Chinta M, Titan A, Longaker M. Pancreatic cancer associated fibroblasts (caf): under-explored target for pancreatic cancer treatment. *Cancers (Basel).* (2020) 12:12051347. doi: 10.3390/cancers12051347
 23. Huang T-X, Guan X-Y, Fu L. Therapeutic targeting of the crosstalk between cancer-associated fibroblasts and cancer stem cells. *Am J Cancer Res.* (2019) 9:1889–904.
 24. Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvisé M, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med.* (2017) 214:579–96. doi: 10.1084/jem.20162024
 25. Elyada E, Bolisetty M, Laise P, Flynn WF, Courtois ET, Burkhart RA, et al. Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts. *Cancer Discov.* (2019) 9:1102–23. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0094
 26. Katsuta E, Qi Q, Peng X, Hochwald SN, Yan L, Takabe K. Pancreatic adenocarcinomas with mature blood vessels have better overall survival. *Sci Rep.* (2019) 9:1310. doi: 10.1038/s41598-018-37909-5
 27. Li S, Xu H-X, Wu C-T, Wang W-Q, Jin W, Gao H-L, et al. Angiogenesis in pancreatic cancer: current research status and clinical implications. *Angiogenesis.* (2019) 22:15–36. doi: 10.1007/s10456-018-9645-2
 28. Kirkegård J, Mortensen FV, Cronin-Fenton D. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* (2017) 112:1366–72. doi: 10.1038/ajg.2017.218
 29. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature.* (2017) 542:177–85. doi: 10.1038/nature21363
 30. Hosein AN, Brekken RA, Maitra A. Pancreatic cancer stroma: an update on therapeutic targeting strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* (2020) 17:487–505. doi: 10.1038/s41575-020-0300-1
 31. Padoan A, Plebani M, Basso D. Inflammation and pancreatic cancer: focus on metabolism, cytokines, and immunity. *Int J Mol Sci.* (2019) 20:20030676. doi: 10.3390/ijms20030676
 32. Nielsen MFB, Mortensen MB, Detlefsen S. Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells. *World J Gastroenterol.* (2016) 22:2678–700. doi: 10.3748/wjg.v22.i9.2678
 33. Feig C, Gopinathan A, Nesses A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res.* (2012) 18:4266–76. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3114
 34. Whatcott CJ, Posner RG, Von Hoff DD, Han H. Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. In: Grippo PJ, Munshi HG, editors. *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment* [Internet]. Trivandrum (India): Transworld Research Network (2012) (accessed April 23, 2020). Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98939/>
 35. Amakye D, Jagani Z, Dorsch M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Na Med.* (2013) 19:1410–22. doi: 10.1038/nm.3389
 36. Tian C, Clauser KR, Öhlund D, Rickelt S, Huang Y, Gupta M, et al. Proteomic analyses of ECM during pancreatic ductal adenocarcinoma progression reveal different contributions by tumor and stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2019) 116:19609–18. doi: 10.1073/pnas.1908626116
 37. Naba A, Clauser KR, Ding H, Whittaker CA, Carr SA, Hynes RO. The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. *Matrix Biol.* (2016) 49:10–24. doi: 10.1016/j.matbio.2015.06.003
 38. Imamura T, Iguchi H, Manabe T, Ohshio G, Yoshimura T, Wang ZH, et al. Quantitative analysis of collagen and collagen subtypes I, III, and V in human pancreatic cancer, tumor-associated chronic pancreatitis, and alcoholic chronic pancreatitis. *Pancreas.* (1995) 11:357–64. doi: 10.1097/00006676-199511000-00007
 39. Jian Z, Cheng T, Zhang Z, Rauléfs S, Shi K, Steiger K, et al. Glycemic variability promotes both local invasion and metastatic colonization by pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* (2018) 6:429–49. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.07.003
 40. Bachem MG, Schünemann M, Ramadan M, Siech M, Beger H, Buck A, et al. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology.* (2005) 128:907–21. doi: 10.1053/j.gastro.2004.12.036
 41. Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* (2012) 21:418–29. doi: 10.1016/j.ccr.2012.01.007
 42. Whatcott CJ, Diep CH, Jiang P, Watanabe A, LoBello J, Sima C, et al. Desmoplasia in primary tumors and metastatic lesions of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* (2015) 21:3561–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1051
 43. Weniger M, Honselmann KC, Liss AS. The extracellular matrix and pancreatic cancer: a complex relationship. *Cancers.* (2018) 10:316. doi: 10.3390/cancers10090316
 44. Shintani Y, Hollingsworth MA, Wheelock MJ, Johnson KR. Collagen i promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-jun nh2-terminal kinase 1 and up-regulating n-cadherin expression. *Cancer Res.* (2006) 66:11745–53. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2322
 45. Armstrong T, Packham G, Murphy LB, Bateman AC, Conti JA, Fine DR, et al. Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* (2004) 10:7427–37. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0825
 46. Öhlund D, Lundin C, Ardnor B, Oman M, Naredi P, Sund M. Type IV collagen is a tumour stroma-derived biomarker for pancreas cancer. *Br J Cancer.* (2009) 101:91–7. doi: 10.1038/sj.bjc.6605107
 47. Öhlund D, Franklin O, Lundberg E, Lundin C, Sund M. Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC Cancer.* (2013) 13:1–11. doi: 10.1186/1471-2407-13-154
 48. Berchtold S, Grünwald B, Krüger A, Reithmeier A, Hähl T, Cheng T, et al. Collagen type V promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Lett.* (2015) 356(2, Part B):721–32. doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.020

49. Clementz AG, Mutolo MJ, Leir S-H, Morris KJ, Kucybała K, Harris H, et al. Collagen XV inhibits epithelial to mesenchymal transition in pancreatic adenocarcinoma cells. *PLoS ONE*. (2013) 8:e72250. doi: 10.1371/journal.pone.0072250
50. Veenstra VL, Damhofer H, Waasdorp C, Steins A, Kocher HM, Medema JP, et al. Stromal SPOCK1 supports invasive pancreatic cancer growth. *Mol Oncol*. (2017) 11:1050–64. doi: 10.1002/1878-0261.12073
51. Li J, Ke J, Fang J, Chen J-P. A potential prognostic marker and therapeutic target: SPOCK1 promotes the proliferation, metastasis, and apoptosis of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem*. (2020) 121:743–54. doi: 10.1002/jcb.29320
52. Li X, Truty MA, Kang Y, Chopin-Laly X, Zhang R, Roife D, et al. Extracellular lumican inhibits pancreatic cancer cell growth and is associated with prolonged survival after surgery. *Clin Cancer Res*. (2014) 20:6529–40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0970
53. Li X, Kang Y, Roife D, Lee Y, Pratt M, Perez MR, et al. Prolonged exposure to extracellular lumican restrains pancreatic adenocarcinoma growth. *Oncogene*. (2017) 36:5432–8. doi: 10.1038/onc.2017.125
54. Königer J, Giese NA, Mola FF di, Berberat P, Giese T, Esposito I, et al. Overexpressed decorin in pancreatic cancer: potential tumor growth inhibition and attenuation of chemotherapeutic action. *Clin Cancer Res*. (2004) 10:4776–83. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-1190-03
55. Weber CK, Sommer G, Michl P, Fensterer H, Weimer M, Gansauge F, et al. Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterology*. (2001) 121:657–67. doi: 10.1053/gast.2001.27222
56. Chen W-B, Lenschow W, Tiede K, Fischer JW, Kalthoff H, Ungefroren H. Smad4/DPC4-dependent regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta in pancreatic tumor cells. *J Biol Chem*. (2002) 277:36118–28. doi: 10.1074/jbc.M203709200
57. Otterbein H, Lehnert H, Ungefroren H. Negative control of cell migration by rac1b in highly metastatic pancreatic cancer cells is mediated by sequential induction of nonactivated smad3 and biglycan. *Cancers (Basel)*. (2019) 11:11121959. doi: 10.3390/cancers11121959
58. Aprile G, Avellini C, Reni M, Mazzer M, Foltran L, Rossi D, et al. Biglycan expression and clinical outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Tumour Biol*. (2013) 34:131–7. doi: 10.1007/s13277-012-0520-2
59. Rainiero HR, Emmerich PB, Sievers CK, Maloney CJ, Pitera RT, Payne SN, et al. Abstract 1904: Versican production is driven by both epithelial and stromal cells in pancreatic cancer. *Cancer Res*. (2019) 79(13 Supplement):1904–904. doi: 10.1158/1538-7445.AM2019-1904
60. Skandalis SS, Kletsas D, Kyriakopoulou D, Stavropoulos M, Theocharis DA. The greatly increased amounts of accumulated versican and decorin with specific post-translational modifications may be closely associated with the malignant phenotype of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta*. (2006) 1760:1217–25. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.03.021
61. Yang C, Liu Z, Zeng X, Wu Q, Liao X, Wang X, et al. Evaluation of the diagnostic ability of laminin gene family for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Aging (Albany NY)*. (2019) 11:3679–703. doi: 10.18632/aging.102007
62. Zhang H, Pan Y-Z, Cheung M, Cao M, Yu C, Chen L, et al. LAMB3 mediates apoptotic, proliferative, invasive, and metastatic behaviors in pancreatic cancer by regulating the PI3K/Akt signaling pathway. *Cell Death Dis*. (2019) 10:230. doi: 10.1038/s41419-019-1320-z
63. Hu D, Ansari D, Zhou Q, Sasor A, Said Hilmersson K, Andersson R. Stromal fibronectin expression in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Surg Oncol*. (2019) 17:29. doi: 10.1186/s12957-019-1574-z
64. Porter RL, Magnus NKC, Thapar V, Morris R, Szabolcs A, Neyaz A, et al. Epithelial to mesenchymal plasticity and differential response to therapies in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2019) 16:26835–45. doi: 10.1073/pnas.1914915116
65. Hu D, Ansari D, Pawłowski K, Zhou Q, Sasor A, Welinder C, et al. Proteomic analyses identify prognostic biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. (2018) 9:9789–807. doi: 10.18632/oncotarget.23929
66. Topalovski M, Brekken RA. Matrix control of pancreatic cancer: New insights into fibronectin signaling. *Cancer Letters*. (2016) 381:252–8. doi: 10.1016/j.canlet.2015.12.027
67. Hiroshima Y, Kasajima R, Kimura Y, Komura D, Ishikawa S, Ichikawa Y, et al. Novel targets identified by integrated cancer-stromal interactome analysis of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Letters*. (2020) 469:217–27. doi: 10.1016/j.canlet.2019.10.031
68. Amrutkar M, Aasrum M, Verbeke CS, Gladhaug IP. Secretion of fibronectin by human pancreatic stellate cells promotes chemoresistance to gemcitabine in pancreatic cancer cells. *BMC Cancer*. (2019) 19:596. doi: 10.1186/s12885-019-5803-1
69. Goehrig D, Nigri J, Samain R, Wu Z, Cappello P, Gabiane G, et al. Stromal protein β ig-h3 reprogrammes tumour microenvironment in pancreatic cancer. *Gut*. (2019) 68:693–707. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317570
70. Turtoi A, Musmeci D, Wang Y, Dumont B, Somja J, Bevilacqua G, et al. Identification of novel accessible proteins bearing diagnostic and therapeutic potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Proteome Res*. (2011) 10:4302–13. doi: 10.1021/pr200527z
71. Sato T, Muramatsu T, Tanabe M, Inazawa J. Identification and characterization of transforming growth factor beta-induced in circulating tumor cell subline from pancreatic cancer cell line. *Cancer Sci*. (2018) 109:3623–33. doi: 10.1111/cas.13783
72. Costanza B, Rademaker G, Tiamiou A, De Tullio P, Leenders J, Blomme A, et al. Transforming growth factor beta-induced, an extracellular matrix interacting protein, enhances glycolysis and promotes pancreatic cancer cell migration. *Int J Cancer*. (2019) 145:1570–84. doi: 10.1002/ijc.32247
73. Yoneura N, Takano S, Yoshitomi H, Nakata Y, Shimazaki R, Kagawa S, et al. Expression of annexin II and stromal tenascin C promotes epithelial to mesenchymal transition and correlates with distant metastasis in pancreatic cancer. *Int J Mol Med*. (2018) 2:821–30. doi: 10.3892/ijmm.2018.3652
74. Furuhashi S, Sakaguchi T, Murakami T, Fukushima M, Morita Y, Ikegami K, et al. Tenascin C in the tumor-nerve microenvironment enhances perineural invasion and correlates with locoregional recurrence in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*. (2020) 49:442–54. doi: 10.1097/MPA.0000000000001506
75. Qian S, Tan X, Liu X, Liu P, Wu Y. Exosomal Tenascin-c induces proliferation and invasion of pancreatic cancer cells by WNT signaling. *Onco Targets Ther*. (2019) 12:3197–205. doi: 10.2147/OTT.S192218
76. Xu Y, Li Z, Jiang P, Wu G, Chen K, Zhang X, et al. The co-expression of MMP-9 and Tenascin-C is significantly associated with the progression and prognosis of pancreatic cancer. *Diagn Pathol*. (2015) 10:211. doi: 10.1186/s13000-015-0445-3
77. Cai J, Lu W, Du S, Guo Z, Wang H, Wei W, et al. Tenascin-C modulates cell cycle progression to enhance tumour cell proliferation through AKT/FOXO1 signalling in pancreatic cancer. *Journal of Cancer*. (2018) 9:4449–62. doi: 10.7150/jca.25926
78. Löhr M, Schmidt C, Ringel J, Kluth M, Müller P, Nizze H, et al. Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res*. (2001) 61:550–5.
79. Neuzillet C, Gramont A de, Tijeras-Raballand A, Mestier L de, Cros J, Faivre S, et al. Perspectives of TGF- β inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas. *Oncotarget*. (2013) 5:78–94. doi: 10.18632/oncotarget.1569
80. Shen W, Tao G, Zhang Y, Cai B, Sun J, Tian Z. TGF- β in pancreatic cancer initiation and progression: two sides of the same coin. *Cell Biosci*. (2017) 7:39. doi: 10.1186/s13578-017-0168-0
81. Principe DR, Park A, Dorman MJ, Kumar S, Viswakarma N, Rubin J, et al. TGF β blockade augments pd-1 inhibition to promote t-cell-mediated regression of pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. (2019) 18:613–20. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0850
82. Bailey JM, Swanson BJ, Hamada T, Eggers JP, Singh PK, Caffery T, et al. Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. (2008) 14:5995–6004. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0291
83. Sano M, Ijichi H, Takahashi R, Miyabayashi K, Fujiwara H, Yamada T, et al. Blocking CXCLs - CXCR2 axis in tumor-stromal interactions contributes to survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma through reduced cell invasion/migration and a shift of immune-inflammatory microenvironment. *Oncogenesis*. (2019) 8:1–12. doi: 10.1038/s41389-018-0117-8

84. Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Brier B, Tada M, et al. Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Invest.* (2011) 121:4106–17. doi: 10.1172/JCI42754
85. Leclerc E, Vetter SW. The role of S100 proteins and their receptor RAGE in pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta.* (2015) 1852:2706–11. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.09.022
86. Arumugam T, Ramachandran V, Sun D, Peng Z, Pal A, Maxwell DS, et al. Designing and developing S100P inhibitor 5-methyl cromolyn for pancreatic cancer therapy. *Mol Cancer Ther.* (2013) 12:654–62. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0771
87. Dakhel S, Padilla L, Adan J, Masa M, Martinez JM, Roque L, et al. S100P antibody-mediated therapy as a new promising strategy for the treatment of pancreatic cancer. *Oncogenesis.* (2014) 3:e92. doi: 10.1038/oncsis.2014.7
88. Slapak EJ, Duitman J, Tekin C, Bijlsma MF, Spek CA. Matrix metalloproteases in pancreatic ductal adenocarcinoma: key drivers of disease progression? *Biology.* (2020) 9:80. doi: 10.3390/biology9040080
89. Awasthi N, Mikels-Vigdal AJ, Stefanutti E, Schwarz MA, Monahan S, Smith V, et al. Therapeutic efficacy of anti-MMP9 antibody in combination with nab-paclitaxel-based chemotherapy in pre-clinical models of pancreatic cancer. *J Cell Mol Med.* (2019) 23:3878–87. doi: 10.1111/jcmm.14242
90. Rath N, Morton JP, Julian L, Helbig L, Kadir S, McGhee EJ, et al. ROCK signaling promotes collagen remodeling to facilitate invasive pancreatic ductal adenocarcinoma tumor cell growth. *EMBO Mol Med.* (2017) 9:198–218. doi: 10.15252/emmm.201606743
91. Oria VO, Lopatta P, Schmitz T, Preca B-T, Nyström A, Conrad C, et al. ADAM9 contributes to vascular invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Oncol.* (2019) 13:456–79. doi: 10.1002/1878-0261.12426
92. Schlomann U, Koller G, Conrad C, Ferdous T, Golfi P, Garcia AM, et al. ADAM8 as a drug target in pancreatic cancer. *Nat Commun.* (2015) 6:6175. doi: 10.1038/ncomms7175
93. Veenstra VL, Damhofer H, Waasdorp C, van Rijssen LB, van de Vijver MJ, Dijk F, et al. ADAM12 is a circulating marker for stromal activation in pancreatic cancer and predicts response to chemotherapy. *Oncogenesis.* (2018) 7:87. doi: 10.1038/s41389-018-0096-9
94. Bloomston M, Shafiq A, Zervos EE, Rosemurgy AS. TIMP-1 overexpression in pancreatic cancer attenuates tumor growth, decreases implantation and metastasis, and inhibits angiogenesis. *J Surg Res.* (2002) 102:39–44. doi: 10.1006/jsre.2001.6318
95. Benzing C, Lam H, Tsang CM, Rimmer A, Arroyo-Berdugo Y, Calle Y, et al. TIMP-2 secreted by monocyte-like cells is a potent suppressor of invadopodia formation in pancreatic cancer cells. *BMC Cancer.* (2019) 19:1214. doi: 10.1186/s12885-019-6429-z
96. D'Costa Z, Jones K, Azad A, van Stiphout R, Lim SY, Gomes AL, et al. Gemcitabine-Induced TIMP1 attenuates therapy response and promotes tumor growth and liver metastasis in pancreatic cancer. *Cancer Res.* (2017) 77:5952–62. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2833
97. Mardin WA, Ntalos D, Mees ST, Spieker T, Senninger N, Haier J, et al. SERPINB5 promoter hypomethylation differentiates pancreatic ductal adenocarcinoma from pancreatitis. *Pancreas.* (2016) 45:743–7. doi: 10.1097/MPA.0000000000000526
98. Harris NLE, Vennin C, Conway JRW, Vine KL, Pinese M, Cowley MJ, et al. SerpinB2 regulates stromal remodelling and local invasion in pancreatic cancer. *Oncogene.* (2017) 36:4288–98. doi: 10.1038/onc.2017.63
99. Tian C, Öhlund D, Rickelt S, Lidström T, Huang Y, Hao L, et al. Cancer cell-derived matrisome proteins promote metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.* (2020) 80:1461–74. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2578
100. Bianconi D, Herac M, Spies D, Kieler M, Brettner R, Unselde M, et al. SERPINB7 expression predicts poor pancreatic cancer survival upon gemcitabine treatment. *Transl Oncol.* (2019) 12:15–23. doi: 10.1016/j.tranon.2018.08.019
101. Miller BW, Morton JP, Pinese M, Saturno G, Jamieson NB, McGhee E, et al. Targeting the LOX/hypoxia axis reverses many of the features that make pancreatic cancer deadly: inhibition of LOX abrogates metastasis and enhances drug efficacy. *EMBO Mol Med.* (2015) 7:1063–76. doi: 10.15252/emmm.201404827
102. Le Calvé B, Griveau A, Vindrieux D, Maréchal R, Wiel C, Svrcek M, et al. Lysyl oxidase family activity promotes resistance of pancreatic ductal adenocarcinoma to chemotherapy by limiting the intratumoral anticancer drug distribution. *Oncotarget.* (2016) 7:32100–12. doi: 10.18632/oncotarget.8527
103. Mussunoor S, Murray GI. The role of annexins in tumour development and progression. *J Pathol.* (2008) 216:131–40. doi: 10.1002/path.2400
104. O'Sullivan D, Dowling P, Joyce H, McAuley E, McCann A, Henry M, et al. A novel inhibitory anti-invasive MAb isolated using phenotypic screening highlights AnxA6 as a functionally relevant target protein in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* (2017) 117:1326–35. doi: 10.1038/bjc.2017.306
105. Karanjawala ZE, Illei PB, Ashfaq R, Infante JR, Murphy K, Pandey A, et al. New markers of pancreatic cancer identified through differential gene expression analyses: claudin 18 and annexin A8. *Am J Surg Pathol.* (2008) 32:188–96. doi: 10.1097/PAS.0b013e31815701f3
106. Zheng L, Foley K, Huang L, Leubner A, Mo G, Olino K, et al. Tyrosine 23 phosphorylation-dependent cell-surface localization of annexin A2 is required for invasion and metastases of pancreatic cancer. *PLoS ONE.* (2011) 6:e19390. doi: 10.1371/journal.pone.0019390
107. Takano S, Togawa A, Yoshitomi H, Shida T, Kimura F, Shimizu H, et al. Annexin II overexpression predicts rapid recurrence after surgery in pancreatic cancer patients undergoing gemcitabine-adjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol.* (2008) 15:3157–68. doi: 10.1245/s10434-008-0061-5
108. Takahashi H, Katsuta E, Yan L, Dasgupta S, Takabe K. High expression of Annexin A2 is associated with DNA repair, metabolic alteration, and worse survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Surgery.* (2019) 166:150–6. doi: 10.1016/j.surg.2019.04.011
109. Zhu J, Wu J, Pei X, Tan Z, Shi J, Lubman DM. Annexin A10 is a candidate marker associated with the progression of pancreatic precursor lesions to adenocarcinoma. *PLoS ONE.* (2017) 12:e0175039. doi: 10.1371/journal.pone.0175039
110. Manero-Rupérez N, Martínez-Bosch N, Barranco LE, Visa L, Navarro P. The galectin family as molecular targets: hopes for defeating pancreatic cancer. *Cells.* (2020) 9:689. doi: 10.3390/cells9030689
111. Drifka CR, Loeffler AG, Esquibel CR, Weber SM, Eliceiri KW, Kao WJ. Human pancreatic stellate cells modulate 3D collagen alignment to promote the migration of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Biomed Microdevices.* (2016) 18:105. doi: 10.1007/s10544-016-0128-1
112. Olivares O, Mayers JR, Gouirand V, Torrence ME, Gicquel T, Borge L, et al. Collagen-derived proline promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell survival under nutrient limited conditions. *Nat Commun.* (2017) 8:16031. doi: 10.1038/ncomms16031
113. Willumsen N, Ali SM, Leitzel K, Drabick JJ, Yee N, Polimera HV, et al. Collagen fragments quantified in serum as measures of desmoplasia associate with survival outcome in patients with advanced pancreatic cancer. *Sci Rep.* (2019) 9:19761. doi: 10.1038/s41598-019-56268-3
114. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* (2015) 42:11–55. doi: 10.1016/j.matbio.2015.02.003
115. Patry M, Teinturier R, Goehrig D, Zetu C, Ripoche D, Kim I-S, et al. β ig-h3 Represses T-cell activation in type 1 diabetes. *Diabetes.* (2015). 64:4212–9. doi: 10.2337/db15-0638
116. Chiquet-Ehrismann R, Orend G, Chiquet M, Tucker RP, Midwood KS. Tenascins in stem cell niches. *Matrix Biol.* (2014) 37:112–23. doi: 10.1016/j.matbio.2014.01.007
117. Midwood KS, Chiquet M, Tucker RP, Orend G. Tenascin-C at a glance. *J Cell Sci.* (2016) 129:4321–7. doi: 10.1242/jcs.190546
118. Esposito I, Penzel R, Chaib-Harrireche M, Barcena U, Bergmann F, Riedl S, et al. Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis. *J Pathol.* (2006) 208:673–85. doi: 10.1002/path.1935
119. Liot S, Aubert A, Hervieu V, Kholti NE, Schalkwijk J, Verrier B, et al. Loss of Tenascin-X expression during tumor progression: A new pan-cancer marker. *Matrix Biol Plus.* (2020) 100021. doi: 10.1016/j.mbplus.2020.100021
120. Ahmed S, Bradshaw A-D, Gera S, Dewan MZ, Xu R. The TGF- β /smad4 signaling pathway in pancreatic carcinogenesis and its clinical significance. *J Clin Med.* (2017) 6:10005. doi: 10.3390/jcm6010005
121. Murphy JE, Wo JY, Ryan DP, Clark JW, Jiang W, Yeap BY, et al. Total Neoadjuvant therapy with folfoxirinox in combination with losartan followed

- by chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer. *JAMA Oncol.* (2019) 5:1020–7. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.0892
122. Hauge A, Rofstad EK. Antifibrotic therapy to normalize the tumor microenvironment. *J Transl Med.* (2020) 18:207. doi: 10.1186/s12967-020-02376-y
 123. Jiang B, Zhou L, Lu J, Wang Y, Liu C, You L, et al. Stroma-targeting therapy in pancreatic cancer: one coin with two sides? *Front Oncol.* (2020) 10:576399. doi: 10.3389/fonc.2020.576399
 124. Susek KH, Karvouni M, Alici E, Lundqvist A. The role of CXC chemokine receptors 1-4 on immune cells in the tumor microenvironment. *Front Immunol.* (2018) 9:2159. doi: 10.3389/fimmu.2018.02159
 125. Cheng Y, Ma X-L, Wei Y-Q, Wei X-W. Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* (2019) 1871:289–312. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.01.005
 126. Raeeszadeh-Sarmazdeh M, Coban M, Sankaran B, Radisky E. Engineering protein therapeutics for cancer based on the natural matrix metalloproteinase inhibitor TIMP-1. *The FASEB Journal.* (2020) 34:1. doi: 10.1096/fasebj.2020.34.s1.04889
 127. Bramhall SR. The matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *From molecular science to a clinical application. Int J Pancreatol.* (1997) 21:1–12.
 128. Schloer S, Pajonczyk D, Rescher U. Annexins in translational research: hidden treasures to be found. *Int J Mol Sci.* (2018) 19:19061781. doi: 10.3390/ijms19061781
 129. Johnson BL, Salazar M d'Alincourt, Mackenzie-Dyck S, D'Apuzzo M, Shih HP, Manuel ER, et al. Desmoplasia and oncogene driven acinar-to-ductal metaplasia are concurrent events during acinar cell-derived pancreatic cancer initiation in young adult mice. *PLoS ONE.* (2019) 14:e0221810. doi: 10.1371/journal.pone.0221810
 130. Sato N, Kohi S, Hirata K, Goggins M. Role of hyaluronan in pancreatic cancer biology and therapy: once again in the spotlight. *Cancer Sci.* (2016) 107:569–75. doi: 10.1111/cas.12913
 131. Sato N, Cheng X-B, Kohi S, Koga A, Hirata K. Targeting hyaluronan for the treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Acta Pharm Sin B.* (2016) 6:101–5. doi: 10.1016/j.apsb.2016.01.002
 132. Banerjee S, Modi S, McGinn O, Zhao X, Dudeja V, Ramakrishnan S, et al. Impaired synthesis of stromal components in response to minnelide improves vascular function, drug delivery, and survival in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* (2016) 22:415–25. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1155
 133. Nakazawa H, Yoshihara S, Kudo D, Morohashi H, Kakizaki I, Kon A, et al. 4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* (2006). 57:165–70. doi: 10.1007/s00280-005-0016-5
 134. Cheng X-B, Sato N, Kohi S, Yamaguchi K. Prognostic impact of hyaluronan and its regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS ONE.* (2013) 8:e80765. doi: 10.1371/journal.pone.0080765
 135. van Mackelenbergh MG, Stroes CI, Spijker R, van Eijck CHJ, Wilmink JW, Bijlsma MF, et al. Clinical trials targeting the stroma in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancers (Basel).* (2019) 11:588. doi: 10.3390/cancers11050588
 136. Ho WJ, Jaffee EM, Zheng L. The tumour microenvironment in pancreatic cancer - clinical challenges and opportunities. *Nat Rev Clin Oncol.* (2020) 17:527–40. doi: 10.1038/s41571-020-0363-5
 137. Hingorani SR, Zheng L, Bullock AJ, Seery TE, Harris WP, Sigal DS, et al. HALO 202: randomized phase ii study of pegph20 plus nab-paclitaxel/gemcitabine versus nab-paclitaxel/gemcitabine in patients with untreated, metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* (2018) 36:359–66. doi: 10.1200/JCO.2017.74.9564
 138. Banerjee S, Saluja A. Minnelide, a novel drug for pancreatic and liver cancer. *Pancreatol.* (2015) 15(4 Suppl.):S39–43. doi: 10.1016/j.pan.2015.05.472
 139. Dauer P, Nomura A, Saluja A, Banerjee S. Microenvironment in determining chemo-resistance in pancreatic cancer: Neighborhood matters. *Pancreatol.* (2017) 17:7–12. doi: 10.1016/j.pan.2016.12.010
 140. Jentzsch V, Davis JAA, Djamgoz MBA. Pancreatic Cancer (PDAC): introduction of evidence-based complementary measures into integrative clinical management. *Cancers (Basel).* (2020) 12:3096. doi: 10.3390/cancers12113096
 141. Pan S, Brentnall TA, Chen R. Proteome alterations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Lett.* (2020) 469:429–36. doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.020
 142. Silsirivanit A. Glycosylation markers in cancer. *Adv Clin Chem.* (2019) 89:189–213. doi: 10.1016/bs.acc.2018.12.005
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2021 Liot, Balas, Aubert, Prigent, Mercier-Gouy, Verrier, Bertolino, Hennino, Valcourt and Lambert. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

TROISIÈME ARTICLE

Développement de tumeurs thymiques dans le modèle murin [LSL:*Kras*^{G12D};*Pdx1*-CRE] : un effet indésirable associé à une accélération de la carcinogenèse pancréatique

Préambule

L'étude de pathologies en biologie fondamentale fait très souvent appel à des animaux dits « modèles ». Ces animaux sont conçus de manière à reproduire au mieux la pathologie humaine, afin de pouvoir (1) décrire les mécanismes moléculaires, cellulaires et physiopathologiques de la maladie et (2) éventuellement tester différentes stratégies thérapeutiques avant de les proposer chez l'Homme. Cependant, il est nécessaire de toujours garder à l'esprit que des différences significatives existent entre ces animaux et l'Homme, et que ces modèles possèdent souvent des biais dans le développement des pathologies.

L'étude de l'ADKP fait appel à de nombreux animaux modèles, principalement des souris génétiquement modifiées. La plupart des constructions consistent en l'expression de l'oncogène *Kras* muté sous le contrôle d'un promoteur spécifique des cellules épithéliales pancréatiques (système CRE-Lox), additionnée ou non de mutations supplémentaires qui permettent l'accélération de la carcinogenèse pancréatique. Dans le modèle initialement développé et nommé « KC » (LSL:*Kras*^{G12D};*Pdx1*-CRE), ces modifications entraînent le développement de lésions de type pré-cancéreuses, évoluant en ADKP invasif dans 10% des cas, après un long temps de latence (>1 an).

Très utilisé, ce modèle comporte cependant plusieurs biais pouvant fausser les résultats obtenus s'ils ne sont pas pris en compte. D'une part, le gène *Pdx1* est exprimé très tôt dans le développement embryonnaire pancréatique, et persiste à de plus faibles niveaux chez l'adulte. En outre, son expression n'est pas restreinte à un type cellulaire particulier du pancréas, mais vaut pour toutes les cellules épithéliales pancréatiques, aussi bien exocrines qu'endocrines. Ce patron d'expression entraîne donc une induction de l'expression de *Kras* muté dès le stade prénatal, dans toutes les cellules épithéliales pancréatiques, ce qui constitue un premier biais au regard de la pathologie humaine se développant à l'état adulte, probablement à partir des cellules acineuses. D'autre part, l'expression de *Pdx1* n'est pas totalement spécifique du pancréas et peut être retrouvée dans le duodénum et l'estomac, ainsi que dans l'épiderme, pouvant donc mener à l'induction d'autres types de tumeurs.

Malgré ces biais, ce modèle a permis la compréhension de nombreux mécanismes impliqués dans l'ADKP, et notamment dans les premières étapes de développement du cancer du pancréas. C'est pourquoi c'est le modèle que nous avons utilisé en première instance pour l'élucidation du rôle de la TNX au cours de la carcinogenèse pancréatique. Ce choix avait été notamment orienté par une étude pilote incluant une dizaine de souris et montrant que l'inactivation du gène codant la TNX semblait conduire à une accélération de la carcinogenèse pancréatique.

Dans l'étude que j'ai menée, près de 70 souris possédant cette prédisposition au développement d'un ADKP ont été générées (délétées ou non pour le gène *Tnxb*, bien que seules les souris WT pour la TNX n'aient été utilisées dans l'article 2). Au cours de l'établissement de cette cohorte, nous avons été confrontés à des souris, environ 10%, montrant des signes de souffrance et de détresse respiratoire, ainsi qu'une perte de poids soudaine entre 100 et 150 jours, conduisant à l'atteinte de points limites et à la mise à mort de l'animal ; ce qui n'était pas attendu à ce stade dans le modèle KC.

L'autopsie de ces souris a révélé une masse thymique au niveau de la cage thoracique, écrasant les poumons, le cœur et l'œsophage, et donc responsable des symptômes observés. L'observation histologique de cette masse indique qu'elle pourrait correspondre à un lymphome thymique très prolifératif. Les analyses moléculaires des tumeurs thymiques montrent que la cassette Lox-STOP-Lox présente en amont de l'oncogène *Kras* muté est recombinaisonnée, menant à l'expression de la protéine *Kras*^{G12D} par toutes les cellules présentes dans ces tumeurs thymiques, à l'inverse des souris ne présentant pas de masse thymique. Par ailleurs, nous avons également observé dans les souris développant une tumeur thymique une désorganisation du compartiment immunitaire (notamment visible dans la rate), et avons observé plusieurs amas cellulaires au niveau des poumons. De manière intéressante, nous avons observé histologiquement que le pancréas de ces souris présentait des lésions bien plus avancées que les souris ne développant pas cette masse thymique suggérant que cette dernière pouvait accélérer la carcinogenèse pancréatique. Cette masse thymique n'était visible qu'après ouverture de la cage thoracique, et peut donc être manquée si seul le pancréas est prélevé. Ainsi, le développement de cette tumeur thymique peut clairement conduire à une surinterprétation des résultats lors l'analyse histologique des lésions pancréatiques ; ce qui avait été notamment le cas lors de l'analyse de la cohorte pilote.

Face à ces résultats, nous avons pris la décision d'enlever de notre cohorte ces souris présentant une masse thymique, et de décrire nos observations dans un article, présenté ci-après. En effet, au vu de l'utilisation courante de ce modèle, il nous est paru essentiel de décrire cet artefact expérimental. Les résultats présentés ici permettent donc de rappeler, si besoin était, que les modèles animaux doivent être utilisés avec précaution, et que tous les signes symptomatiques et anatomiques doivent être pris en compte lors d'une analyse *in vivo*.

Development of thymic tumor in [*LSL-Kras^{G12D}*; *Pdx1-CRE*] mice, an adverse effect associated with accelerated pancreatic carcinogenesis.

Short title: Thymic tumor development in KC mouse model is associated with accelerated pancreatic carcinogenesis.

Sophie LIOT¹, Naïma EL KHOLTI¹, Bernard VERRIER¹, Ulrich VALCOURT¹ and Elise LAMBERT^{1,#}

¹Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTI), UMR CNRS 5305, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, 7, passage du Vercors, F-69367 Lyon Cedex 07, France.

Correspondence should be addressed to E.L. (elise.lambert@ibcp.fr)

Acknowledgments

We greatly thank members of the histology and imaging facility (PrImaTiss) at the LBTI institute, as well as we acknowledge the contribution of Federative Structure of Health Research Lyon-Est CNRS UMS3453 / INSERM US7 and particularly the microscopy platform (CIQLE) and the animal facility (ALECS module SPF). Finally, we thank Dr. Philippe BERTOLINO and Dr. Laurent BARTHOLIN for providing us the *KRAS^{G12D}*-driven mouse model. SL is recipient of PhD student fellowship from the French government (NMRT). This work was supported by the “Ligue Nationale contre le Cancer, Comité du Rhône”, “Comité de l’Allier”, “Comité de Savoie” and “Comité de la Drôme”, as well as by the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer” (PJA 20141201790).

Abstract

Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma (PDAC) represents about 90% of pancreatic cancers. It is one of the most aggressive cancer, with a 5-year survival rate below 10% due to late diagnosis and poor therapeutic efficiency. This bad prognosis thus encourages intense research, in order to better understand PDAC pathogenesis and molecular basis leading to the development of innovative therapeutic strategies. Fundamental research in the field of oncology is based on the use of models recapitulating human pathology. For PDAC study, one of the most widely used model is the KC (*LSL:Kras^{G12D};Pdx1-CRE*) genetically engineered mouse model, which provides pancreatic cancer predisposition but possesses some biases. Herein, we report a new adverse effect of *Kras^{G12D}* mutation in KC mouse model, which has not been described yet. In our hands, 10% of KC mice developed end-point symptoms between 100 and 150 days post-parturition, associated to large thymic mass discovered at autopsy. We histologically suggest that these massive thymus could correspond to highly proliferative thymic lymphoma and detected the recombination of the Lox-STOP-Lox cassette upstream *Kras^{G12D}* allele and subsequent *Kras^{G12D}* protein expression in all cells composing thymic masses. In addition, we highlighted that development of such thymic tumor was associated with accelerated pancreatic carcinogenesis, immune compartment disorganization, and in some cases, lung malignancies.

Keywords : Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma, KC mouse model, Thymic mass, *Kras^{G12D}* expression

Introduction

Pancreatic cancer, among which Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma (PDAC) represents about 90% of cases, is currently the seventh cause of cancer-related deaths worldwide, and is predicted to become second in industrialized countries if no progress is made¹⁻³. PDAC is one of the most aggressive cancer, with a 5-year survival rate below 10%, due to late diagnosis and poor therapeutic efficiency⁴. Indeed, PDAC develops without specific symptoms, leading to diagnosis at locally advanced or metastatic tumor stage^{5,6}. As a consequence, only 20% of PDAC are resectable, and classical chemotherapies are inefficient, only prolonging patient lifespan by a few months⁷. Thus, PDAC is currently the subject of intense research, in search of innovative therapeutic strategies, based on the understanding of PDAC pathogenesis and molecular basis.

Fundamental research in the field of oncology is based on the use of models recapitulating human pathology. In the case of PDAC, a large spectrum of models is available, including, from the farthest to the closest of human pathogenesis: 2D and 3D (organotypics) *in vitro* cell culture systems with tumor cell lines, organoids and animal models^{8,9}. These latter are now widely used and comprise several experimental strategies. Historically, PDAC was chemically induced by the injection of strong carcinogens such as DMBA (7,12-DiMethylBenz(a)Anthracene) in the pancreas. This method has been abandoned in favor of xenografts (of tissues or cell lines derived from patient tissues) and genetically-engineered mouse models (GEMM)^{10,11}, which can be considered as the ones recapitulating as close as possible PDAC carcinogenesis, invasive tumor progression and metastases. GEMM notably allow to study risk factors, genetic alterations, and PDAC initiation and progression, and represent a pre-clinical study platform for the development of new diagnosis methods and treatments¹²⁻¹⁵.

First GEMM used in PDAC research were constructed by the overexpression of TGF α under the control of *Elastase* promoter (specific of pancreatic acinar cells)^{16,17}. However, this model did not allow to trigger invasive PDAC and was then replaced by several models involving mutated *Kras* oncogene. KRAS (for Kristen RAS) is a small GTPase of the RAS family having a preponderant role in malignancies, since it is involved in several signaling pathways leading to the activation of cell proliferation¹⁸⁻²⁰. Single KRAS amino-acid mutation, often on residue G12, results in KRAS constitutive activation and subsequent cell behavior modification. *KRAS* proto-oncogene mutations have been detected in about 30% of human tumors²¹, and 92% of PDAC, in which it is correlated to worse prognosis²². In PDAC, *KRAS* mutation is even considered as the first hit mutation (detected from the pre-malignant stages), leading to cell sensitivity to malign transformation induced by the accumulation of other mutations (notably the inactivation of tumor suppressor genes *TP53*, *CDKN2A* (also named *INK4A*) and *SMAD4*) and chromosomal aberrations.

As a consequence, *Kras* mutation in mouse results in the development of malignancies²³. In 2001, Jackson and colleagues have developed a model allowing to induce conditional KRAS activation thanks to the CRE-Lox system, with the mutated *Kras*^{G12D} oncogene placed downstream a Lox-STOP-Lox sequence (transcriptional STOP)²⁴. This construction has then been used in 2003 in the same laboratory to create a pancreatic cancer predisposition model in which the CRE recombinase expression is under the control of pancreas-specific gene promoters: *Pdx1* or *Ptf1a* (*p48*), allowing a tissue specific expression of *Kras*^{G12D} (model named "KC", for [LSL:*Kras*^{G12D};*Pdx1* or *Ptf1a*-CRE])²⁵. These mice develop pancreatic preneoplastic lesions similar to human ones, but rarely evolving into

PDAC. In order to counteract this long latency limiting PDAC progression study, other GEMM have been established with additional mutations in the [LSL:*Kras*^{G12D};*Pdx1*-CRE] context, including *p53* (“KPC model”)²⁶ and *Ink4a* (“KIC model”)²⁷ mutated tumor suppressor genes, enabling the development of invasive PDAC within few months²⁸.

Nowadays, KC mouse model (which will refer to [LSL:*Kras*^{G12D};*Pdx1*-CRE] from now) continues to be widely used, as it allows a good understanding of pancreatic pre-neoplastic lesions preceding invasive PDAC. Indeed, this model recapitulates the main characteristics of human pancreatic carcinogenesis, including desmoplastic reaction and PanIN linear development. It thus allows to better understand key signaling pathways involved in these processes, as well as it is a good model in search of early diagnostic method¹⁴. However, it is still important to keep in mind that GEMM do not totally recapitulate human pathogenesis and may have some undesirable effects, and limits and experimental biases have been reported concerning KC model. Indeed, *Pdx1* (Pancreatic and duodenal homeobox 1) is a transcription factor activating the expression of various pancreatic proteins, such as insulin, and highly involved in pancreas development, as it is responsible for pancreatic identity induction^{29,30}. As a consequence, KC model is a “pre-natal” model, in which *Kras*^{G12D} mutated oncogene will be expressed at early step of pancreatic development, and thus does not exactly mimic the human pathogenesis^{28,31,32}. Furthermore, at adulthood, *Pdx1* is classically expressed in duodenum and pancreas. In this latter, it has

mainly been detected in nuclei of β cells (endocrine cells of Langerhans islets) and in a lower manner in the nuclei of ductal and acinar cells^{33,34}. Therefore, it is not possible to decipher the cells that are at the origin of PDAC using this model, since *Kras*^{G12D} will be expressed in the different pancreatic epithelial cells. Additionally, islet disorganization as well as lesions within the endocrine part of the pancreas have been highlighted^{35,36}, showing some limits of this model.

Herein, we reported a new adverse effect of *Kras*^{G12D} mutation in KC mouse model, which has not been described yet. In our hands, 10% of KC mice developed end-point symptoms between 100 and 150 days post-parturition, including weight loss and respiratory distress. At autopsy, all concerned mice presented a large thymic mass filling the entire space inside the rib cage, crushing the lungs, heart and esophagus. We histologically suggest that this thymic mass could correspond to highly proliferative thymic lymphoma. In all concerned thymus, we detected the recombination of the Lox-STOP-Lox cassette upstream *Kras*^{G12D} allele and subsequent KRAS^{G12D} protein expression in all thymic mass cells, as opposed to normal thymus. In addition, we highlighted that development of such thymic tumor was associated with accelerated pancreatic carcinogenesis and immune compartment disorganization (visible in the spleen), and observed some mice with lung malignancies. Our study thus alerts about the presence of a non-silent side effect of *Kras*^{G12D} mutation in 10% of KC mice, that can be missed if the dissection is restricted to the abdominal cavity.

Materials and Methods

Animals

LSL:*Kras*^{G12D} (B6.129S4-*Kras*^{tm4Tyj}/J strain, The Jackson Laboratory) and *Pdx1*-CRE (B6.FVB-Tg(*Pdx1-cre*)6Tuv/J strain, The Jackson Laboratory) mouse strains were previously described^{24,25,37} and generously gifted by P. Bertolino and L. Bartholin, respectively. They were maintained in two pathogen-free animal facilities (“ALECS SPF module” and “PBES” (Lyon, France)), and crossed in order to obtain [LSL:*Kras*^{G12D};*Pdx1*-CRE] mice, predisposed to pancreatic cancer development. All procedures were approved by an ethic committee under regulatory of governmental authority (CECCAPP n°ENS_2018_023, APAFIS #16242-201804271428498). Animals were genotyped one week after birth and euthanized either at 100 or 150 days post-parturition or at reaching end-point (weight loss, signs of pain, etc). Several organs were harvested, including pancreas, spleen, lung, thymus, as well as the tail for control. After dissection, one part of each organ (except tail) was fixed in formalin before being processed for paraffin embedding. Other part was directly snap frozen in liquid nitrogen for DNA extraction.

Histological staining and immunohistochemistry

For histological analyses, formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues were cut into 3µm sections and Hematoxylin and Eosin (H&E) staining was performed after dewaxing and rehydration.

Immunohistochemistry staining on FFPE tissues was performed on 3µm sections using ImmPRESS® Excel Amplified Polymer Staining Kit, Anti-Rabbit IgG, Peroxidase (VectorLaboratories, MP-7601) for Ki67 and KRAS^{G12D}, and R.T.U. Vectastain Universal Elite ABC Kit (VectorLabs, PK-7200) for CK19, following manufacturer’s instructions. After deparaffinization and rehydration, antigen retrieval was performed either in Sodium Citrate buffer (pH 6) for 20min at 98°C followed

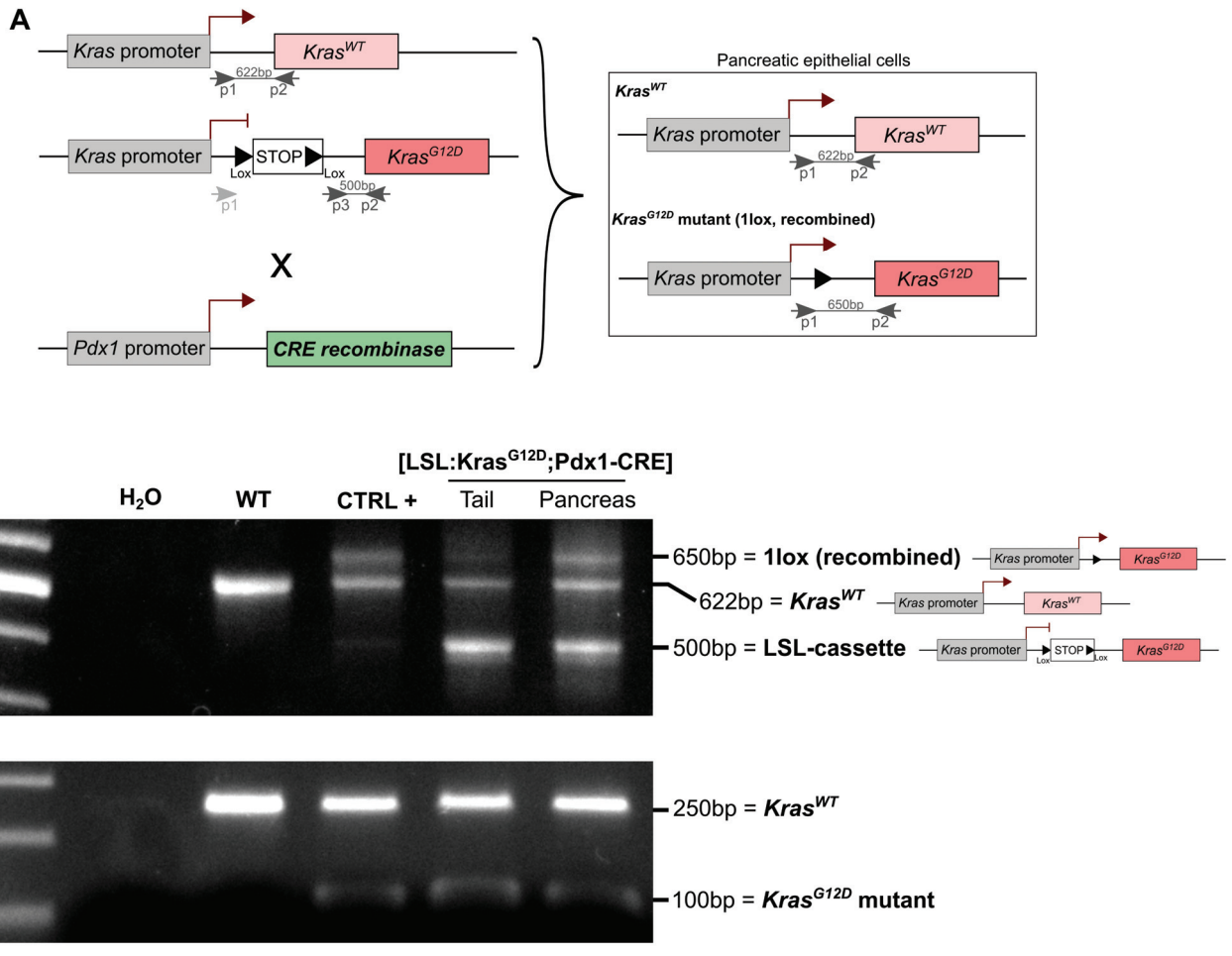
by 20min cooling (Ki67 and CK19) or 30min in 1% pepsin in PBS (KRAS^{G12D}). Then, endogenous peroxidases were quenched and slices were saturated with 2.5% Horse Serum. Primary antibodies (CK19, 1/100, #TROMA-III-s (DHSB); Ki67, prediluted, #RMPD-004 (Clinisciences); KRAS^{G12D}, 1/50, #14429 (Cell Signaling)) were incubated in blocking solution or 1% Horse Serum (KRAS^{G12D}) overnight at 4°C. The next day, amplification and development were performed following manufacturer’s instructions, nuclei were counterstained with Gill’s Hematoxylin and slices were mounted in DEPEX. All slices were imaged using the slide scanner AxioScanSP5 X (Zeiss) at CIQLE (Lyon, France) in order to have a general view of all tissues. Representative images were then extracted and shown in this article.

Kras^{G12D} PCR

Genomic DNA extraction was performed by incubating tissues for 30min in alkaline lysis solution (25mM NaOH, 0.2mM Na₂EDTA) at 95°C. Tissue lysis was stopped by adding neutralization solution (40mM Tris-HCl), vol:vol, on ice.

[LSL:*Kras*^{G12D};*Pdx1*-CRE] mice were genotyped by PCR amplification of genomic DNA from tail, as advised for this mouse strain (<https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=008179&protocolID=29388>). PCR mix was composed of 1X TAQ polymerase buffer, 2.5mM MgCl₂, 1mM dNTP (each), 1µM primers (each), 1U TAQ Polymerase. Primers used were: (1) 5' TGTCTTTCCCCAGCAGAGT 3', (2) 5' CTGCATAGTACGCTATACCCTGT 3', (3) 5' GCAGGTCGAGGGACCTAATA 3'. 2 µl of DNA was added to the mix and PCR was performed following cycles: 5min at 96°C, 35 cycles (30s at 96°C, 35s at 60°C, 45s at 72°C), 5min at 72°C. PCR amplicons were separated on a 2% agarose gel in order to detect the 250bp wild-type *Kras* and 100bp floxed LSL:*Kras*^{G12D} products.

Figure 1



Kras^{G12D} conditional PCR was performed on thymus, pancreas and tail genomic DNA as mentioned by The Jackson laboratories (https://jacksonlabs.mit.edu/protocols/genotyping/kras_cond). PCR mix was composed of 1X TAQ polymerase buffer, 2.5mM MgCl₂, 0.4mM dNTP (each), 0.4μM primers (each), 1U TAQ Polymerase. Primers used were: (p1) 5' GTCTTTCCCAGCACAGTGC 3', (p2) 5' CTCTTGCTACGCCACCAGCTC 3', (p3) 5' AGCTAGCCACCATGGCTTGAGTAAGTCTGCA 3'. 1 μl of DNA was added to the mix and PCR was performed following cycles: 5min at 96°C, 35 cycles (30s at 96°C, 30s at 63°C, 45s at 72°C), 5min at 72°C. PCR amplicons were separated on a 2% agarose gel in order to detect the 622bp wild-type *Kras*, 500bp floxed LSL:*Kras*^{G12D} and 650bp recombined *Kras*^{G12D} products. Position of primers and expected results are presented in **Figure 1**.

Results

In KC mouse model, LSL recombination occurs in pancreas but not in tail

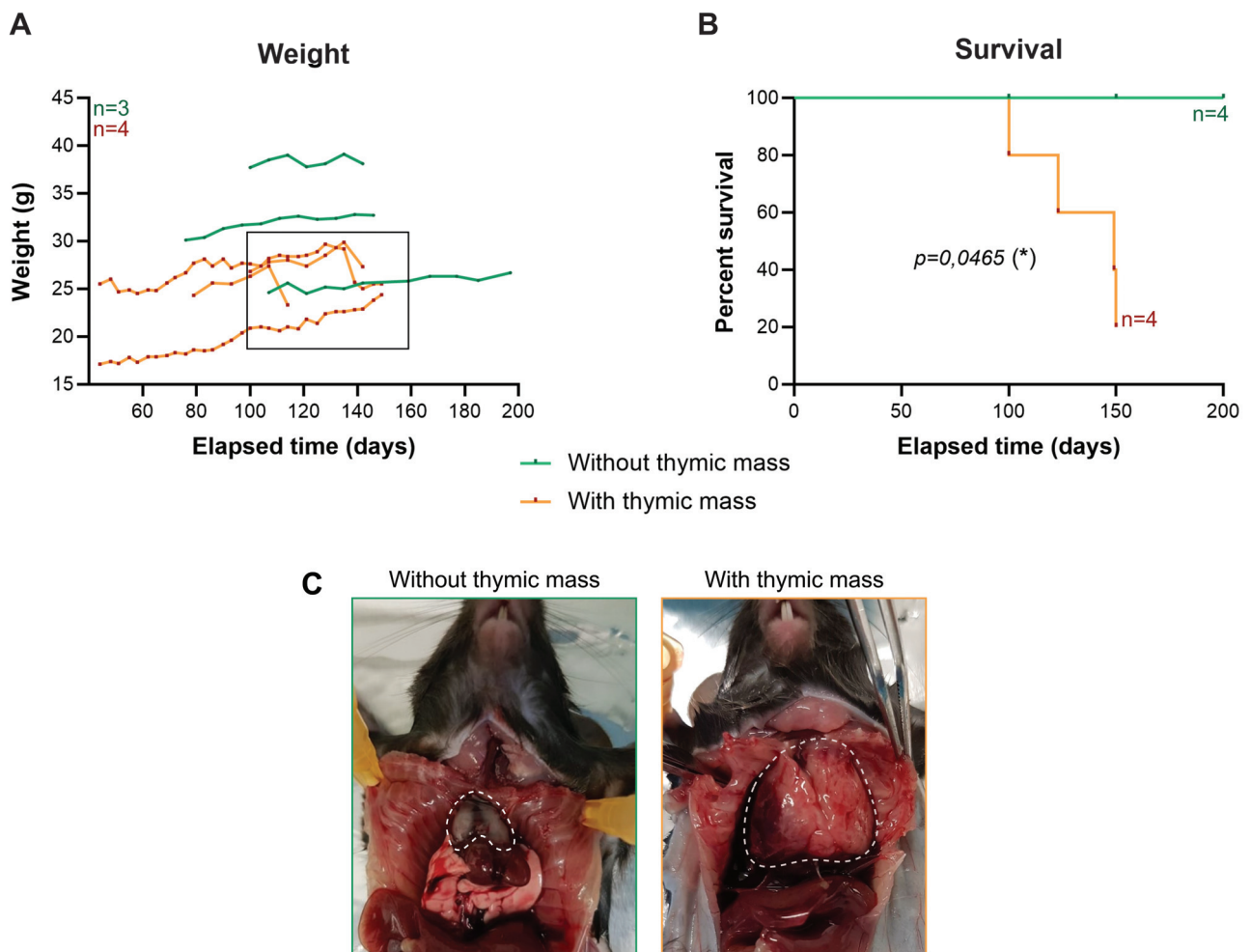
KC mice model were obtained by crossing the *Pdx1*-CRE and LSL:*Kras*^{G12D} mouse strains, in order to study pancreatic carcinogenesis. In the LSL:*Kras*^{G12D} strain, the endogenous *Kras*^{G12D} allele is preceded by a Lox-STOP-Lox (LSL) cassette avoiding *Kras*^{G12D} transcription in absence of recombination. In order to have a conditional expression of the mutated

oncogene in the pancreas, we used the *Pdx1*-CRE mouse strain, in which the CRE recombinase coding sequence is placed downstream the *Pdx1* gene promoter (Figure 1A).

Mice were genotyped one-week post-parturition by a classic Polymerase Chain Reaction (PCR). All KC mice carried both the wild-type (WT) and the mutated (LSL:*Kras*^{G12D}) *Kras* alleles, while WT mice presented only the WT *Kras* band (Figure 1B, bottom). In order to confirm correct pancreas-specific recombination, conditional *Kras*^{G12D} PCR was performed on tail and pancreas of one KC mouse. This PCR allows to detect LSL cassette recombination (Figure 1B, top). Primers used for this PCR are presented on Figure 1A. In tail of KC mice, we observed wild-type (WT) and LSL:*Kras*^{G12D} bands only, while in pancreas we noted the presence of a third band (corresponding to *Kras*^{G12D} without LSL cassette). The coexistence of the 3 bands in pancreas suggests that recombination is partial, not in all cells composing tissue extract. As controls, we analyzed pancreatic DNA (1) from WT mouse pancreas, for which we detected the WT *Kras* allele only, with a large band, and (2) from KC mouse tumoral tissue with almost total recombination (CTRL+), which mainly showed the presence of WT and *Kras*^{G12D} alleles without LSL cassette. This result confirmed the correct pancreas-specific recombination of mutated *Kras*^{G12D} oncogene.

Figure 1: KC (LSL:*Kras*^{G12D}:*Pdx1*-CRE;) mouse model. A- Schematic representation of the genetic construct for conditional *Kras*^{G12D} expression under the control of *Pdx1* promoter (CRE-Lox system). Primers used for *Kras*^{G12D} conditional PCR are noticed. B- Top: *Kras*^{G12D} conditional PCR showing LSL cassette recombination in pancreas, but not tail, from KC mouse, and not in WT mouse. Bottom: *Kras*^{G12D} genotyping PCR showing heterozygosity in KC mice (WT and *Kras*^{G12D} alleles) and homozygosity in WT mouse (WT allele).

Figure 2



10% of KC mice display severe symptoms associated with thymic mass development.

While constituting a KC cohort, we observed some mice suffering of severe symptoms between 100- and 150-days post-parturition. These symptoms included weight loss (up to 4 grams in one week, Figure 2A) and respiratory distress, corresponded to end-points and led us to euthanize the animals before the scheduled date (Figure 2B). These mice finally accounted for about 10% of the total cohort (9/89), which thus cannot be ignored. In this article, we show 4 mice harboring such symptoms in our cohort, and compare them to 4 mice at same ages (100 and 150 days). During dissection, we observed that all mice that have reached a human end-point showed a rib cage invaded by a huge mass clearly developed from thymus. This thymic mass caused the crushing of esophagus, heart and lung, explaining the observed symptoms (Figure 2C). It has to be noted that on the Figure 2C, lung and heart were present in both mice, but hidden by the thymic mass (photo on the right).

Thymic masses are lymphocyte-rich, and exhibit total LSL cassette recombination and subsequent KRAS^{G12D} expression.

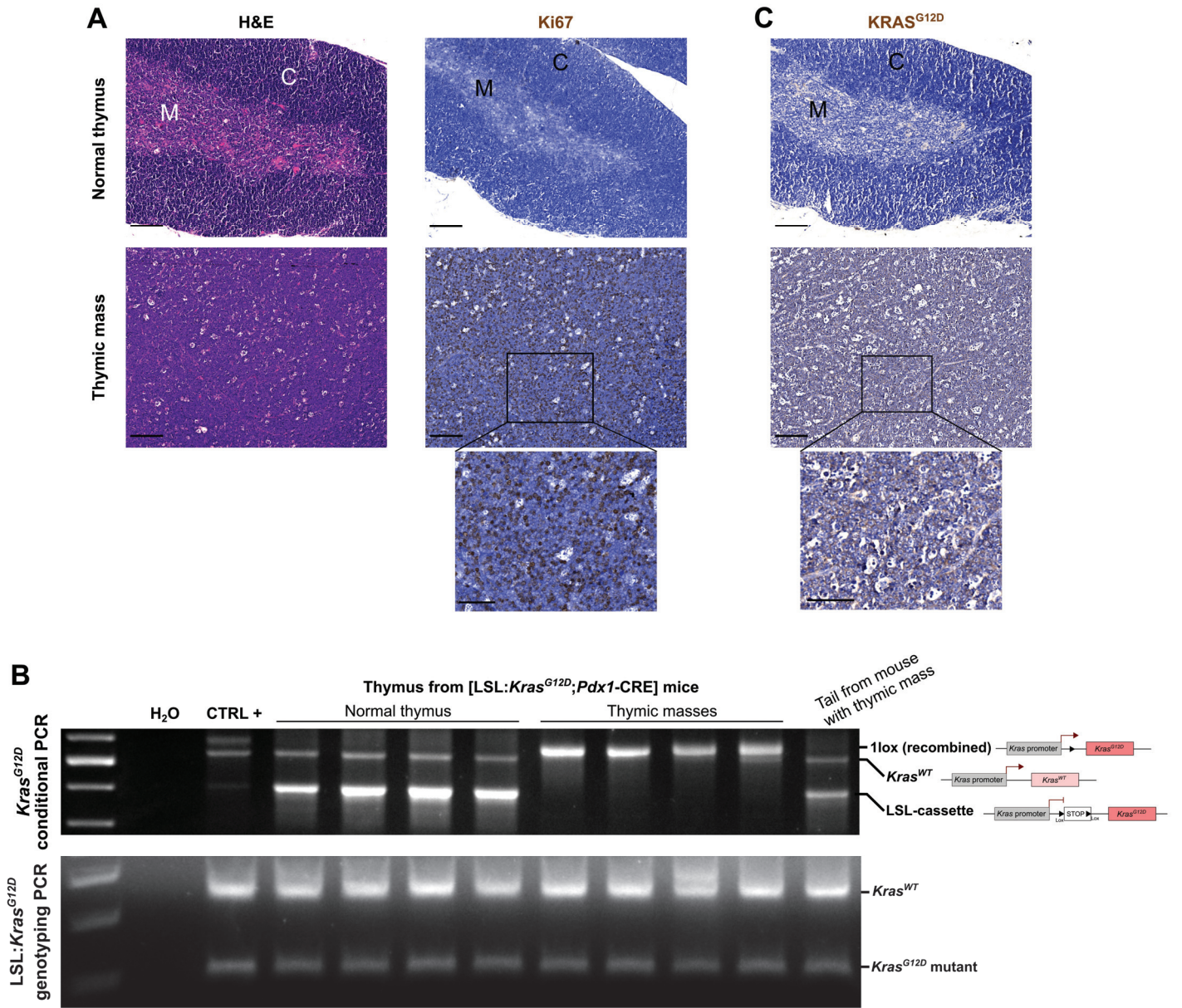
We then performed histological analysis of these thymic masses and compared them to normal thymus. After paraffin-embedding, tissues were cut and sections were stained with Hematoxylin-Eosin or labelled by immunohistochemistry (IHC) for Ki67 (proliferation) (Figure 3A). As expected, normal thymus was composed of (1) a connective tissue capsule, (2) the cortex, which is darker and contains lymphocytes, some epithelial reticular cells and macrophages and (3) the medulla, containing larger lymphocytes and Hassall's Corpuscles. In contrast, the thymic

masses did not show such organization, and seemed to be very rich in lymphocytes (round cells mostly occupied by nucleus), reminiscent of a thymic lymphoma. These cells were highly proliferative, as shown by the Ki67 immunolabelling.

PCR were also performed on these tissues, in order to determine if LSL cassette recombination occurred, leading to *Kras*^{G12D} expression and the subsequent tumor development in the thymus (Figure 3B). Interestingly, we highlighted that normal thymus did not present any LSL cassette recombination, while the recombination was total in thymic masses. Indeed, in those tissues, we were not able to detect any LSL:*Kras*^{G12D} band, suggesting that all cells proceeded to LSL cassette recombination, and thus expressed *Kras*^{G12D} allele. Moreover, such recombination seemed to be specific to the thymus, as we have not detected recombination of the LSL cassette in the tail of mice suffering from thymic mass development. It has to be noted that WT *Kras* amplicon was always visible in normal thymus, while it was sometimes difficult to discriminate in thymic masses. Thus, genotyping PCR was performed on tails from the same animals to confirm the heterozygosity of all KC mice (homozygous *Kras*^{G12D/G12D} is lethal). Finally, we confirmed LSL cassette recombination by performing an anti-KRAS^{G12D} immunohistochemistry and observed that all cells expressed KRAS^{G12D} in thymic mass, while none were positive in normal thymus (Figure 3C). Thus, it seemed that LSL cassette recombination and subsequent mutated *Kras*^{G12D} oncogene expression occurred in thymus of 10% of KC mice, leading to the development of thymic mass (lymphoma-like tumor).

Figure 2: 10% of KC mice exhibited rapid weight loss and decreased survival associated with thymic mass development. A- Weight tracking of 7 of the 8 KC mice presented in this study (3 without thymic mass (the 4th having been euthanized before the start of weighing, at 100 days) and 4 with thymic mass revealed during dissection). B- Cumulative survival proportion depending on the development (orange, n=4) or not (green, n=4) of thymic mass. C- Photo of the rib cage at autopsy, showing normal thymus (left) and the thymic mass developed in 10% of KC mice (right). Dotted line delimits thymus.

Figure 3



Thymic mass development is associated with accelerated pancreatic carcinogenesis, immune disorder and lung malignancies

Finally, we wanted to decipher if such thymic tumor development could have an effect on pancreatic carcinogenesis. We thus analyzed pancreas of mice exhibiting or not thymic mass, by classical H&E staining and Ki67, CK19 and KRAS^{G12D} immunolabelling. We clearly noticed that mice with thymic tumor exhibited an accelerated pancreatic carcinogenesis, as they displayed larger area occupied by pre-tumoral lesions, and more advanced lesions in three of the four mice (Figure 4A, left). One of the mice also showed high level of infiltration, probably of immune cells, which were highly proliferative, and accompanied by the presence of large lymph nodes on section (Supplementary Figure S1).

We detected KRAS^{G12D} mutated protein within preneoplastic lesions, as well as in Langerhans islets of all KC mouse pancreas, in contrast with WT mouse, which did not display any labelling. In addition, KRAS^{G12D} was detected in acinar cells bordering pre-tumoral lesions, and that seemed to undergo ADM (Figure 4A, right). We also observed some KRAS^{G12D} positive cells in the spleen adjacent to pre-tumoral pancreatic lesions in KC mice with thymic mass, suggesting proximal invasion in regard to cell and nucleus morphologies (Supplementary Figure S2).

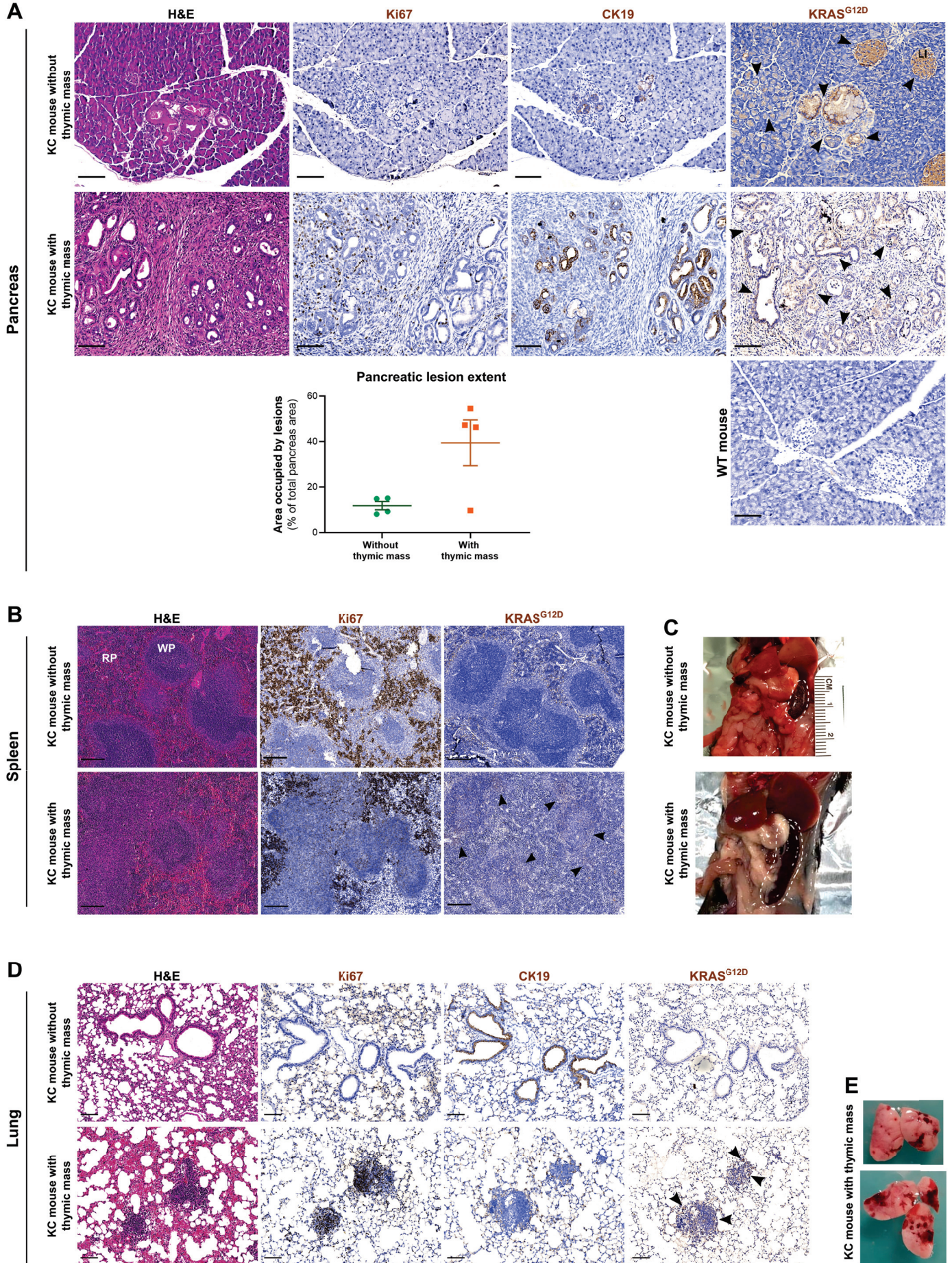
Thymus being one of the primary lymphoid organs, we also investigated the immune compartment, notably thanks to spleen analysis. Interestingly, mice with thymic tumor displayed highly enlarge spleen, which seemed to be histologically disorganized (Figure 4B and 4C). Indeed, white pulp seemed larger, and less organized and dense, as it can be observed following H&E staining and Ki67 immunolabelling. In addition, KRAS^{G12D} protein was detected in white pulp in spleen from mice developing thymic mass, suggesting either the recruitment of lymphocytes from thymus or LSL cassette recombination in spleen too. Interestingly, in mouse with high level of immune infiltration, lymph nodes and immune cells present around pre-malignant cells were also KRAS^{G12D} positive (Supplementary Figure S1).

Finally, in three out of four mice exhibiting thymic mass development, we also noticed proliferative masses (Ki67-positive) in lungs, positive for KRAS^{G12D} (Figure 4D). These lung malignancies were negative for CK19 and did not show a PDAC morphology. In one of them, such masses were even visible macroscopically at autopsy (Figure 4E).

In conclusion, mice developing thymic tumor seemed to have an accelerated pancreatic carcinogenesis and lung damages, potentially associated with immune perturbations.

Figure 3: Thymic mass showed a lymphoma-like histology and total LSL cassette recombination associated with KRAS^{G12D} expression in all cells. A- Representative images of normal thymus and thymic mass histologically analyzed (H&E staining and Ki67 immunohistochemistry). C = cortex, M = medulla, scale bars = 100µm (50µm for the higher magnification). B- Top: Kras^{G12D} conditional PCR showing LSL cassette recombination in thymic mass but not in normal thymus and tail (KC mice). Bottom: Kras^{G12D} genotyping PCR showing heterozygosity in all KC mice of this study (WT and Kras^{G12D} alleles). C- Representative images of KRAS^{G12D} protein expression in normal thymus and thymic mass (immunohistochemistry). Scale bars = 100µm (50µm for the higher magnification).

Figure 4



Discussion

Taken together, our results highlight a new adverse effect linked to genetic modification in KC mouse model. Indeed, we pointed out the development of thymic tumor in 10% of KC mouse cohort, which cannot be ignored. Interestingly, such observations were made in two different animal facilities, indicating that it would better rely on intrinsic mechanism than on environmental cues. Mice presenting thymic mass reached human end-points between 100 and 150 days post-parturition, including rapid weight loss and respiratory distress, probably due to lung, heart and esophagus crushing under the tumor mass, since these organs were smaller than in normal KC mice. In addition, those mice were prostrated in their cage, suggesting abdominal pain. Such symptoms are close to the ones developed in consequence to PDAC development and are thus confounding for this mouse model at early age. It must be noted that presence of this thymic mass could not be predict without opening rib cage, showing the importance to proceed to a complete autopsy.

Histologically, thymic masses showed a disorganized structure, with the absence of distinguishable cortex and medulla, in contrast with normal thymus. Tumors seemed to be lymphocyte-rich and highly proliferative, evoking thymic lymphoma, with few epithelial cells³⁸⁻⁴⁰.

We then investigated *Kras*^{G12D} expression within these thymic masses. To do so, we first analyzed LSL cassette recombination upstream *Kras*^{G12D} allele, and showed that the transcriptional STOP was deleted in all thymic masses, while it was never the case in normal thymus. Interestingly, this recombination was total, with no remaining allele with LSL cassette, suggesting that all cells would have recombined, in contrast with pancreas where the LSL sequence persisted. This was confirmed by anti-KRAS^{G12D} immunohistochemistry, as we detected labelling in all cells from thymic masses, and not in normal thymus. Thus, we can confidently hypothesize that the development of such thymic tumors, would rely on the expression of mutated KRAS oncogene.

Figure 4: KC mice developing thymic tumor exhibited accelerated pancreatic carcinogenesis, immune perturbations and lung malignancies. A- Representative images of pancreas from KC mice showing or not thymic mass analyzed by classical histology (H&E staining) and immunohistochemistry (Ki67, CK19 and KRAS^{G12D}), and quantification of the area occupied by lesions in pancreas sections. B- Representative images of histological analysis of spleen from KC mice presenting or not thymic mass (H&E staining and Ki67 and *Kras*^{G12D} immunohistochemistry). Scale bars = 200µm. C- Image showing enlarged spleen from KC mouse with thymic mass. D- Representative images of histological analysis of lung from KC mice with or without thymic mass (H&E staining and Ki67, CK19 and *Kras*^{G12D} immunohistochemistry). Bottom: This mouse displayed moderate lesions in lung. E- Picture showing severe lung lesions, macroscopically visible, from KC mouse presenting thymic mass at autopsy. A, B, D- Arrowheads highlight KRAS^{G12D} staining. Scale bars = 100µm.

Initially, our hypothesis for such atypical KRAS^{G12D} expression was that *Pdx1* could be expressed by thymic antigen-presenting cells for lymphocyte education, with subsequent *Kras*^{G12D} expression which could lead to malign transformation in some cases (due to transient *Pdx1* expression). However, the described observations suggest another mechanism. The lymphoma-like phenotype of thymic tumoral mass, as well as the expression of *Kras*^{G12D} in all thymic cells (including lymphocytes) suggested that recombination could occur independently from *Pdx1* expression. Indeed, in the original study using *Kras*^{G12D} oncogene in mouse model, Johnson and colleagues studied the organs, which were sensitive to sporadic recombination (unequal sister chromatid exchange or intra-chromosomal recombination) leading to *Kras*^{G12D} expression. Interestingly, they highlighted the development of lung tumors, thymic lymphomas and papillomas, suggesting that lung, thymus and skin were the organs in which sporadic recombination occurred³⁷. The development of thymic masses we observed could thus be relied on sporadic recombination. In addition, we frequently observed papillomas on KC mice, with no deleterious effect on animal well-being (data not shown), coherently with Johnson *et al* study. We also highlighted that three of the four mice developing thymic mass exhibited some malignancies in lung, more or less visible, that were positive for KRAS^{G12D} and highly proliferative, as expected in consequence to KRAS activation. The mouse showing no lung disorder was dissected as scheduled, at 100 days and had not reached human end-points, suggesting that lung mass development could arise later. We thus observed here the same symptoms pointed out by Johnson and colleagues in 2001³⁷, which could be explained by sporadic recombination. This is encouraged by the fact that no correlation existed between pancreatic lesion extent and level of lung damage. In addition, lung malignancies were negative for CK19 and did not displayed PDAC

morphology, thus ruling out the hypothesis of pancreatic metastasis, since lung is a known metastasis site for pancreatic tumor cells.

We thus suggest here that *Pdx1*-CRE construction is not sufficient to restrain *Kras*^{G12D} recombination to the pancreas, and that sporadic recombination occurs in thymus (in 10% of cases), skin and lung. This is coherent with the fact that no evidence of *Pdx1* expression in the thymus has been found, and some articles even reported the absence of *Pdx1* in the thymus^{41,42}. However, *Pdx1* has already been shown to be expressed in skin, linked to the development of papillomas in KC mice⁴³. To finally confirm our hypothesis, it would be interesting to perform *Pdx1* labelling on thymus and thymic masses, which will allow to discriminate between sporadic or *Pdx1*-induced recombination. However, *Pdx1* expression in thymic cells would probably be transient, and could thus be difficult to show. In addition, sporadic recombination is favored by the presence of repeated sequences^{44,45}, as can be considered *Lox* sequences surrounding transcriptional STOP upstream *Kras*^{G12D} allele added by Jackson and colleagues in 2001²⁴, and lymphocyte population have been shown to be sensitive to *Kras* activation⁴⁶, encouraging the sporadic recombination hypothesis.

KC mouse model is one of the most used models to study pancreatic carcinogenesis. We thus investigated the impact of thymic mass development on this process. Unfortunately, we highlighted that thymic tumor occurrence was associated with an accelerated pancreatic carcinogenesis. Indeed, these mice developed more lesions and with higher grade. In addition, we detected some KRAS^{G12D}-positive cells within the adjacent spleen, suggesting an invasive phenotype for pancreatic (pre)tumoral cells. Thus, the presence of thymic tumor affects the study of the pancreatic carcinogenesis process. The accelerated carcinogenesis could be due to immune disorder within these mice. This

hypothesis is corroborated (1) by the disorganization we observed within the rate, with the perturbation of white pulp structure, and (2) high level of (immune) infiltration within the pancreas of one mouse with thymic mass. Indeed, disorder in thymus could affect T cell compartment and lead to the absence or the inefficiency of tumor-suppressing immune response in first steps of pancreatic carcinogenesis⁴⁷. In addition, in the mouse presenting high level of immune infiltration, it was interesting to note that lymph nodes and immune cells around pancreatic cells were positive for KRAS^{G12D} protein, as well as in spleen white pulp, suggesting either (1) sporadic recombination or (2) the recruitment of immune cells from thymic mass.

Finally, the labelling of KRAS^{G12D} was also quite interesting to understand the appearance of lesions in pancreas of KC mice. Indeed, we detected KRAS^{G12D} within preneoplastic lesions, as well as in Langerhans islets, as expected by the expression of *Pdx1* in these structures^{25,33,34}. The presence of KRAS^{G12D} in

the islets could explain the islet disorganization, as well as the lesions developing within islets that have been previously described^{35,36}. Interestingly, we also highlighted KRAS^{G12D} in acinar cells surrounding pre-tumoral lesions and evoking first steps of ADM (less contiguous acini and with more visible light), suggesting that *Pdx1* expression could be induced by the lesion and lead to transformation of adjacent normal acinar cells.

Our study thus pointed out an adverse effect of the *Kras*^{G12D} construction in KC mouse model classically used to study pancreatic carcinogenesis. To our knowledge, this is the first report showing the development of such thymic tumors in the KC mouse model. The hypothesis of sporadic recombination in organs with high level of recombination (thymus notably) is favored here. This bias is associated with an altered accelerated pancreatic carcinogenesis, and can thus lead to misinterpretations, knowing that thymic mass can be missed if the pancreas only is recovered (without opening the rib cage).

Supplementary Data

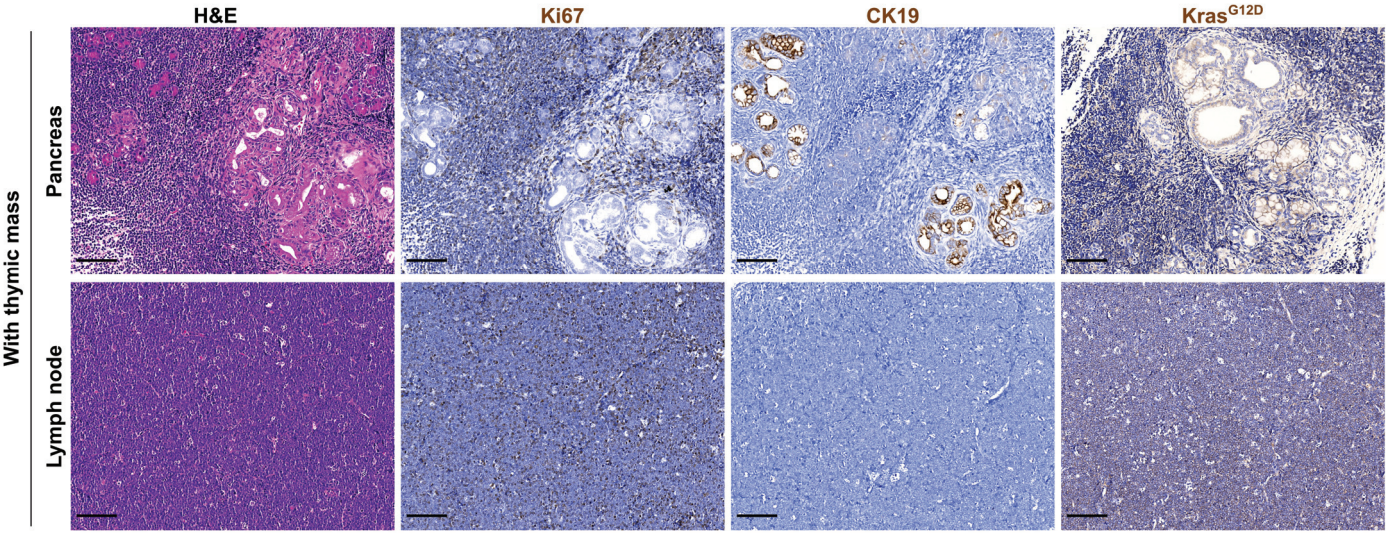
Supplementary Figure S1: Histological analysis of pancreas from KC mouse presenting high level of immune infiltration (H&E staining and Ki67, CK19 and *Kras*^{G12D} immunohistochemistry). Top: Representative image of pancreas. Bottom: Representative image of lymph node in close proximity to pancreas.

Supplementary Figure S2: Presence of KRAS^{G12D} positive cells in spleen adjacent to pancreas. Representative images of spleen adjacent to pancreas, labelled through anti-KRAS^{G12D} immunohistochemistry. KRAS^{G12D} positive cells evoking invasion from pancreas to spleen are pointed by arrowheads.

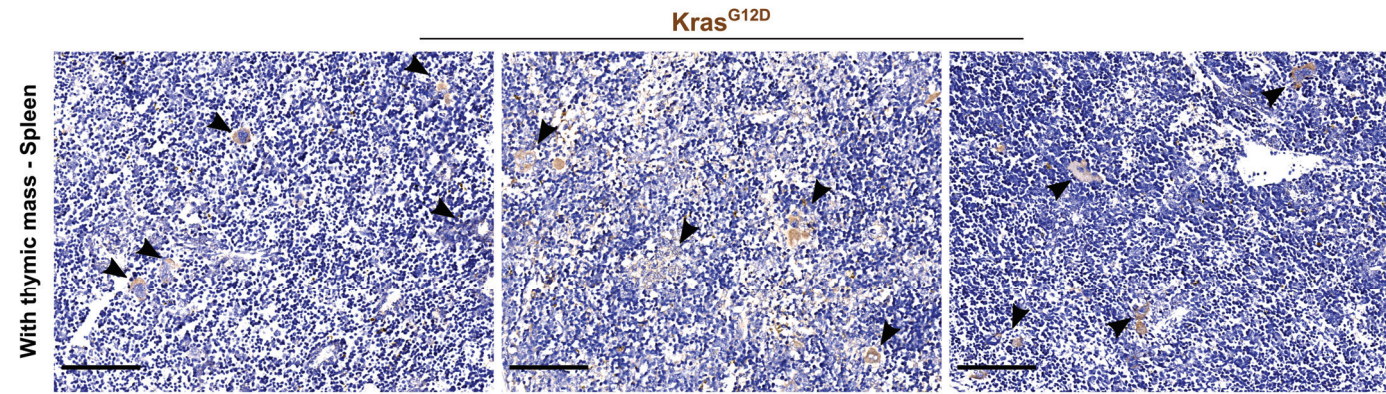
References

1. Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer* **144**, 1941–1953 (2019).
2. 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).
3. Quante, A. S. *et al.* Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030. *Cancer Medicine* **5**, 2649–2656 (2016).
4. Rawla, P., Sunkara, T. & Gaduputi, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global

Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S2



- Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol* **10**, 10–27 (2019).
5. Eibl, A. S. and G. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base* (2015) doi:10.3998/panc.2015.14.
 6. Walter, F. M. *et al.* Symptoms and patient factors associated with diagnostic intervals for pancreatic cancer (SYMPTOM pancreatic study): a prospective cohort study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* **1**, 298–306 (2016).
 7. Adamska, A., Domenichini, A. & Falasca, M. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *Int J Mol Sci* **18**, (2017).
 8. Behrens, D., Walther, W. & Fichtner, I. Pancreatic cancer models for translational research. *Pharmacology & Therapeutics* **173**, 146–158 (2017).
 9. Krempley, B. D. & Yu, K. H. Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chinese Clinical Oncology* **6**, (2017).
 10. Ding, Y., Cravero, J. D., Adrian, K. & Grippo, P. Modeling pancreatic cancer in vivo: from xenograft and carcinogen-induced systems to genetically engineered mice. *Pancreas* **39**, 283–292 (2010).
 11. Bartholin, L. Pancreatic cancer and the tumor microenvironment: Mesenchyme's role in pancreatic carcinogenesis. in *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment* (eds. Grippo, P. J. & Munshi, H. G.) (Transworld Research Network, 2012).
 12. Ijichi, H. Genetically-engineered mouse models for pancreatic cancer: Advances and current limitations. *World Journal of Clinical Oncology* **2**, 195–202 (2011).
 13. Pérez-Mancera, P. A., Guerra, C., Barbacid, M. & Tuveson, D. A. What We Have Learned About Pancreatic Cancer From Mouse Models. *Gastroenterology* **142**, 1079–1092 (2012).
 14. Mazur, P. K. & Siveke, J. T. Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology. *Gut* **61**, 1488–1500 (2012).
 15. Kong, K., Guo, M., Liu, Y. & Zheng, J. Progress in Animal Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Cancer* **11**, 1555–1567 (2020).
 16. Wagner, M. *et al.* A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease. *Genes Dev.* **15**, 286–293 (2001).
 17. Sandgren, E. P., Luetkeke, N. C., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. & Lee, D. C. Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell* **61**, 1121–1135 (1990).
 18. Jančík, S., Drábek, J., Radzioch, D. & Hajdúch, M. Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* vol. 2010 e150960 <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/150960/> (2010).
 19. Weng, C.-C., Lin, Y.-C. & Cheng, K.-H. The Use of Genetically Engineered Mouse Models for Studying the Function of Mutated Driver Genes in Pancreatic Cancer. *J Clin Med* **8**, (2019).
 20. Kattan, W. E. & Hancock, J. F. RAS Function in cancer cells: translating membrane biology and biochemistry into new therapeutics. *Biochemical Journal* **477**, 2893–2919 (2020).
 21. Timar, J. & Kashofer, K. Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer Metastasis Rev* **39**, 1029–1038 (2020).
 22. Buscail, L., Bournet, B. & Cordelier, P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **17**, 153–168 (2020).
 23. O'Hagan, R. C. & Heyer, J. KRAS Mouse Models. *Genes Cancer* **2**, 335–343 (2011).
 24. Jackson, E. L. *et al.* Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev.* **15**, 3243–3248 (2001).
 25. Hingorani, S. R. *et al.* Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437–450 (2003).
 26. Hingorani, S. R. *et al.* Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal

- adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**, 469–483 (2005).
27. Aguirre, A. J. *et al.* Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* **17**, 3112–3126 (2003).
 28. Guerra, C. & Barbacid, M. Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Molecular Oncology* **7**, 232–247 (2013).
 29. Ashizawa, S., Brunnicardi, F. C. & Wang, X.-P. PDX-1 and the pancreas. *Pancreas* **28**, 109–120 (2004).
 30. Vinogradova, T. V. & Sverdlov, E. D. PDX1: A unique pancreatic master regulator constantly changes its functions during embryonic development and progression of pancreatic cancer. *Biochemistry Moscow* **82**, 887–893 (2017).
 31. Habbe, N. *et al.* Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18913–18918 (2008).
 32. Tuveson, D. A. & Hingorani, S. R. Ductal Pancreatic Cancer in Humans and Mice. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**, 65–72 (2005).
 33. Park, J. Y. *et al.* Pdx1 Expression in Pancreatic Precursor Lesions and Neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **19**, 444–449 (2011).
 34. Tang, Z.-C., Chu, Y., Tan, Y.-Y., Li, J. & Gao, S. Pancreatic and duodenal homeobox-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma and diabetes mellitus. *Chin Med J (Engl)* **133**, 344–350 (2020).
 35. Gout, J. *et al.* The conditional expression of KRAS G12D in mouse pancreas induces disorganization of endocrine islets prior the onset of ductal pre-cancerous lesions. *Pancreatology* **13**, 191–195 (2013).
 36. Friedlander, S. Y. G. *et al.* Context-Dependent Transformation of Adult Pancreatic Cells by Oncogenic K-Ras. *Cancer Cell* **16**, 379–389 (2009).
 37. Johnson, L. *et al.* Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* **410**, 1111–1116 (2001).
 38. Hasserjian, R. P., Ströbel, P. & Marx, A. Pathology of thymic tumors. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* **17**, 2–11 (2005).
 39. Pearse, G. Histopathology of the Thymus. *Toxicol Pathol* **34**, 515–547 (2006).
 40. Huo, X. *et al.* Analysis of the relationship between microsatellite instability and thymic lymphoma induced by N-methyl-N-nitrosourea in C57BL/6J mice. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **771**, 21–28 (2015).
 41. Noso, S. *et al.* Insulin Transactivator MafA Regulates Intrathymic Expression of Insulin and Affects Susceptibility to Type 1 Diabetes. *Diabetes* **59**, 2579–2587 (2010).
 42. Brimnes, M. K. *et al.* Low Expression of Insulin in the Thymus of Non-obese Diabetic Mice. *Journal of Autoimmunity* **19**, 203–213 (2002).
 43. Mazur, P. K. *et al.* Identification of Epidermal Pdx1 Expression Discloses Different Roles of Notch1 and Notch2 in Murine KrasG12D-Induced Skin Carcinogenesis In Vivo. *PLOS ONE* **5**, e13578 (2010).
 44. Klein, H. L. Genetic control of intrachromosomal recombination. *BioEssays* **17**, 147–159 (1995).
 45. Andersen, S. L., Sloan, R. S., Petes, T. D. & Jinks-Robertson, S. Genome-Destabilizing Effects Associated with Top1 Loss or Accumulation of Top1 Cleavage Complexes in Yeast. *PLOS Genetics* **11**, e1005098 (2015).
 46. Kindler, T. *et al.* K-RasG12D-induced T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemias harbor Notch1 mutations and are sensitive to γ -secretase inhibitors. *Blood* **112**, 3373–3382 (2008).
 47. Vonderheide, R. H. & Bayne, L. J. Inflammatory networks and immune surveillance of pancreatic carcinoma. *Current Opinion in Immunology* **25**, 200–205 (2013).

DISCUSSION GÉNÉRALE

Au cours de cette thèse, j'ai travaillé sur plusieurs sujets, tous initiés à partir de mon projet princeps qu'était « l'élucidation du rôle de la TNX dans la carcinogenèse pancréatique ». En effet, au fur et à mesure de mes travaux de recherche, nous avons démontré que la TNX était perdue dans l'ADKP invasif ainsi que dans de nombreuses tumeurs solides, ce qui confortait notre hypothèse de départ d'un rôle potentiellement oncosuppressif de la TNX. Cependant, nous avons rencontré plusieurs difficultés à montrer ce rôle, ce qui nous a mené à d'abord décrire la cinétique de dépôt de TNX dans le développement et la progression de l'ADKP, qui s'est avérée très différente de ce que nous attendions. Par ailleurs, au cours de ces travaux sur la carcinogenèse pancréatique, nous avons fait face à une limite de l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés, effet indésirable que nous avons analysée plus en détails. Ces travaux, qui seront discutés ici, m'ont permis d'écrire les 3 articles originaux présentés ci-avant. Bien que le rôle précis de la TNX au cours de la carcinogenèse pancréatique reste encore à définir, mes travaux ouvrent la porte à de nombreuses questions, et donc de nombreuses perspectives, qui seront abordées ici.

I. Diminution de l'expression de TNX dans les tumeurs solides et impact sur la survie des patients

A. Perte de la TNX dans l'ADKP et de nombreuses tumeurs solides

L'un des premiers travaux menés au cours de cette thèse était l'élucidation du statut de la TNX dans l'ADKP. En effet, dans des travaux préliminaires, une expérience de RT-qPCR sur un modèle murin d'ADKP (modèle « KPC ») avait montré une baisse drastique de l'expression du gène codant la Tnx dans le pancréas de souris KPC, en comparaison à des souris WT. Afin de déterminer la pertinence biologique de notre étude dans la pathologie humaine, j'ai donc étudié le statut de la TNX dans des échantillons d'ADKP humains, au niveau ARNm (microarrays) et protéique (Tissue Micro Array) et ai ainsi montré que l'expression et le dépôt de TNX étaient très significativement diminués dans les échantillons tumoraux, en comparaison au tissu sain adjacent à la tumeur ou à du pancréas normal.

Nous avons ensuite élargi l'étude à d'autres tumeurs solides, en suivant la même méthodologie. En effet, mes résultats très clairs pour l'ADKP contrastaient avec les quelques données disponibles dans la littérature concernant le statut de la TNX, qui ne s'accordaient pas sur une régulation commune de la TNX dans les cancers en général, et ne concernaient que des cancers relativement rares, comme décrit dans l'introduction du premier article de ce manuscrit. En outre, l'une de ces études présentait une surexpression de la TNX dans le cancer de l'ovaire, basée en partie sur une immunohistochimie avec un anticorps que j'avais testé et qui présentait un marquage très aspécifique, notamment au niveau de l'épiderme de la peau qui me servait de témoin de marquage (la TNX n'est présente que dans le derme).

Dans le premier article de ce manuscrit, j'ai donc étudié le statut de la TNX, (1) par immunohistochimie sur des TMA et (2) par analyses de bases de données de microarray disponibles dans la littérature dans les 6 cancers les plus incidents et mortels au monde, et sur les cancers qui avaient été étudiés préalablement. La révision ardue du manuscrit m'a conduit à valider les anticorps anti-TNX choisis pour l'immunohistochimie de manière incontestable sur des coupes de peaux humaines de patients déficients pour la TNX (atteints du syndrome d'Ehlers-Danlos classical-like) et à invalider un anticorps qui était utilisé comme référence dans le domaine, mais qui donnait des marquages aspécifiques, et qui a mené à de mauvaises conclusions dans le cas du cancer de l'ovaire (Kramer *et al.*, 2015).

Au cours de mes analyses bioinformatiques, j'ai analysé différents jeux de données disponibles au travers de l'interface Gene Expression Omnibus. Ces jeux de données provenaient de différentes plateformes de microarray et certaines incluaient plusieurs sondes *TNXB*, ainsi que des sondes pour le pseudogène *TNXA*. Cependant, dans la plupart des cohortes analysées, les différentes sondes *TNXB* ont révélé la même diminution significative d'expression dans les tumeurs humaines. Ainsi, lorsque les mêmes plateformes de microarray étaient utilisées, j'ai représenté dans l'article les résultats obtenus à partir des mêmes sondes.

Finalement, cette étude m'a permis de démontrer que la TNX était perdue dans la plupart des tumeurs solides, à l'exception des tumeurs cérébrales, dans lesquelles elle était sur-exprimée. Le cas des tumeurs cérébrales est très particulier. En effet, en condition physiologique, la MEC du cerveau, synthétisée à la fois par les neurones et les cellules gliales, est principalement composée de glycosaminoglycanes (hyaluronane), de protéoglycanes (neurocan, brévican, versican et agrécan), de glycoprotéines (TNR) et de faibles taux de protéines fibreuses (collagène, fibronectine et vitronectine) (Song and Dityatev, 2018; Lam *et al.*, 2019). Ainsi, étant donné la faible proportion de collagène dans le système nerveux central physiologique, il est peu étonnant d'avoir très peu de TNX, qui est considéré comme la molécule responsable du bon espacement des fibres de collagène. L'augmentation d'expression de la TNX dans le cerveau en condition pathologique s'explique par la vascularisation importante au niveau de la tumeur cérébrale. En effet, sur la TMA « pan-cancer », j'ai pu constater un marquage de la TNX important au niveau des vaisseaux de la tumeur, ce qui conduit donc à l'observation d'une surexpression de la TNX dans les tumeurs cérébrales.

Cette étude nous a donc permis de généraliser les observations faites sur le pancréas, et ainsi montrer que la TNX était réprimée dans tous les cancers. Cette étude a été publiée en Janvier 2020 dans *Matrix Biology Plus*.

B. Conséquence de la perte de la TNX sur la survie des patients

Dans l'ADKP et pour les tumeurs du poumon et du sein (2 cancers les plus incidents et mortels actuellement), j'ai également étudié le rôle pronostic de la TNX. Pour cela, j'ai comparé les courbes de survie des patients présentant des tumeurs à fort ($TNXB^{high}$) ou faible ($TNXB^{low}$) taux de TNX, basé sur les données de microarray (valeur d'expression relative de $TNXB$ dans les échantillons tumoraux). Dans les tumeurs pulmonaires et mammaires, j'ai montré qu'une forte expression du gène $TNXB$ était corrélée à une meilleure survie des patients. Parmi les autres cancers étudiés, nous n'avons pas de données cliniques concernant la survie des patients, hormis pour le cancer du côlon pour lequel je n'ai pas retrouvé ce rôle de marqueur de bon pronostic pour la TNX. De la même manière, j'ai comparé la survie des patients atteints d'ADKP, qui semble être meilleure lorsque les tumeurs possèdent un taux élevé de transcrite $TNXB$, bien que la différence ne soit pas significative (vraisemblablement due au faible nombre de patients). De plus, il est intéressant de noter que l'expression du gène $TNXB$ semble être moins importante dans des tumeurs pancréatiques peu différenciées (grades 3 et 4), souvent plus agressives. Ainsi, la TNX pourrait être un marqueur de bon pronostic dans l'ADKP, bien que cela reste à confirmer avec une cohorte plus importante de patients. En outre, ce résultat pourrait être généralisé à de nombreux cancers, puisque retrouvé dans d'autres tumeurs, mais nécessite une méta-analyse de la survie basée sur des cohortes à grand nombre de patients et comprenant les données cliniques nécessaires.

Ainsi, j'ai pu mettre en évidence que la TNX était drastiquement perdue dans les tumeurs solides humaines, et que sa présence au sein de la tumeur serait un marqueur de bon pronostic, notamment dans le cas de l'ADKP. Ces premiers résultats assoient la pertinence biologique des travaux de recherche menés au cours de cette thèse. Cet article nous permettra également par la suite d'évoquer un potentiel rôle commun de la TNX à un grand nombre de cancers, lorsque celui dans l'ADKP aura été déterminé.

II. Implication de la TNX dans la carcinogenèse pancréatique

La perte de TNX dans les tumeurs solides humaines, ainsi que les données préliminaires présentées en préambule du deuxième article de ce manuscrit de thèse suggèrent que la TNX pourrait avoir un rôle protecteur, voire oncosuppressif, notamment dans l'ADKP. Ce cancer présente une forte réaction desmoplastique, qui implique un rôle non négligeable de la MEC dans la progression tumorale. En outre, ce projet a débuté dans un laboratoire spécialisé dans l'étude sur l'ADKP (L. Bartholin, CRCL), et qui possédait donc tous les outils nécessaires à l'étude de ce type de tumeurs.

Le postulat de base de la suite de mes travaux de thèse était que la TNX, exprimée dans les tissus conjonctifs sains, pourrait limiter le développement de cellules cancéreuses, avant de voir son expression diminuée et de laisser place à une tumeur de plus en plus invasive. Ainsi, j'ai étudié le rôle de la TNX au cours de la carcinogenèse pancréatique, grâce à un modèle murin de prédisposition au cancer du pancréas (souris « KC », [LSL:*Kras*^{G12D};*Pdx1*-CRE]), qui développe des lésions pancréatiques pré-tumorales de type PanINs. Cette étude a été quelque peu remodelée au fil des résultats obtenus. En effet, elle portait initialement sur la comparaison du développement des lésions dans des souris KC déficientes ou non en TNX, mais ces résultats, qui seront plus amplement détaillés par la suite, se sont avérés décevants. Afin de mieux comprendre ce résultat négatif, nous avons donc étudié la cinétique d'expression de la TNX au cours du développement et de la progression des lésions de type PanINs.

A. Un dépôt dynamique pour un rôle protecteur ?

1. Dépôt dynamique de TNX au cours de la carcinogenèse pancréatique

Dans le deuxième article de ce manuscrit de thèse, après avoir démontré la perte de TNX dans les ADKP humains, j'ai donc étudié la cinétique de dépôt de TNX au cours de la carcinogenèse pancréatique, dans des souris KC dont les pancréas ont été collectés à 50, 100, 150 et 200 jours post-parturition afin de pouvoir analyser un spectre important de lésions de type PanIN. *A priori*, et au regard des résultats préliminaires et des quantifications chez l'Homme, nous nous attendions à une perte progressive de TNX au cours du développement de ces lésions. De manière surprenante, nous avons mis en lumière par immunofluorescence un renforcement du dépôt de TNX, avec une augmentation de la quantité totale de TNX entre 100 et 200 jours post-parturition, positivement corrélée à l'étendue des lésions sur le pancréas. En revanche, le marquage autour des lésions prises individuellement semble augmenter dans les pancréas à 100 jours puis diminuer aux temps plus tardifs. Par une analyse histologique plus fine, nous avons ensuite montré que le dépôt de TNX augmentait autour des acini montrant des signes d'ADM et autour des lésions de type PanINs de bas grade, avant de s'amoinrir autour des lésions de grade intermédiaire. Autour de lésions plus avancées, nous avons montré que le marquage diminue nettement, jusqu'à disparaître dans une souris présentant un pancréas à la structure très altérée par les lésions pré-tumorales. Dans cette dernière souris, l'aire totale de TNX est également drastiquement diminuée, ce qui suggère que la perte de TNX pourrait être également vraie dans les modèles murins d'ADKP ; ce qui confirmerait alors les résultats obtenus chez l'humain montrant une perte d'expression de la TNX chez les patients atteints d'ADKP.

En outre, l'organisation même du dépôt de TNX est assez particulière : avec l'avancée des lésions, la TNX forme comme une « gaine » autour des lésions, mais n'est pas dans le stroma en continuité directe de ces lésions. Un comarquage immunofluorescent a notamment révélé que la TNX ne colocalisait que très peu avec le marqueur α SMA des fibroblastes activés, ce qui suggère que la TNX ne participe pas à la réaction desmoplastique en elle-même. Il est cependant à noter qu'à l'inverse, l'absence d' α SMA autour d'une lésion n'est pas synonyme de présence de TNX.

Ces résultats semblent indiquer que ce dépôt transitoire de TNX est une réaction du pancréas (et notamment du tissu conjonctif sous-jacent aux acini) au développement de lésions pré-tumorales. En effet, la dichotomie de ce dépôt est assez intéressante. Alors que la quantité totale de TNX est plus importante entre 100 et 200 jours post-parturition, la quantité de TNX autour de chaque lésion semble diminuer. Ceci suggère que les régions non atteintes présentes autour des lésions présenteraient une augmentation d'expression de TNX, ce qui serait cohérent avec un dépôt de TNX en périphérie des zones lésées, « en réaction » au développement de cellules pré-tumorales. Cette hypothèse est confortée par le fort dépôt de TNX présent autour des acini qui semblent entrer en métaplasie, ainsi qu'autour des lésions de bas grade, alors qu'à l'état physiologique, la TNX est peu présente autour de chaque acinus, et est plutôt restreinte aux travées conjonctives entre les lobules pancréatiques. Ainsi, l'augmentation du taux de TNX dans le pancréas pourrait être une barrière à la transformation des cellules pancréatiques en cellules pré-tumorales.

Malheureusement, il était difficile de quantifier ces observations, du fait (1) d'une classification des lésions en immunofluorescence pas toujours évidente, et (2) d'une grande hétérogénéité en termes de types de lésions et de marquage de TNX. En effet, les lésions observées pouvaient être à la fois très canalaire ou issues d'ADM, contenir plus ou moins de stroma, etc. De plus, le dépôt de TNX autour de chaque lésion ne peut être résumé uniquement par une quantification de son aire ou de son intensité. Dans les zones en métaplasie, par exemple, l'aire occupée par la TNX est relativement faible, en travées fines autour des acini, mais est très différente du pancréas normal. En outre, le marquage TNX pouvait être très différent autour de lésions de grade similaire mais présentant des phénotypes ou origines différents. Dans les figures du deuxième article de ce manuscrit de thèse, j'ai donc essayé de représenter au mieux cette diversité.

Finalement, ces observations nous permettent de poser l'hypothèse selon laquelle la TNX est dynamiquement déposée au cours de la carcinogenèse pancréatique, avec une forte expression en réaction aux premières transformations, puis une diminution de l'expression et du taux de protéines dans les stades plus tardifs dans le modèle murin KC, avant d'aboutir à une perte totale dans des tumeurs de patients atteints d'ADKP invasif. Ces données restent à confirmer chez l'Homme (pour le dépôt de TNX en cours de carcinogenèse), et dans un

modèle murin possédant un ADKP invasif (pour la perte de TNX). Grâce à plusieurs collaborations (V. Hervieu, pour les biopsies humaines, et A. Hennino et P. Bertolino, pour les tissus murins), cela pourra être fait rapidement et devrait conforter notre message.

2. Compartimentation du stroma de l'ADKP, vers un rôle double ?

Ces observations surprenantes n'en sont pas moins intéressantes et entraînent de nombreuses questions. En effet, l'absence de colocalisation entre la TNX, une protéine matricielle, et α SMA, un marqueur des fibroblastes activés (responsables du dépôt abondant de molécules matricielles au cours de la réaction desmoplastique), suggère qu'il pourrait y avoir plusieurs « types » de stroma et/ou de MEC autour des lésions pré-tumorales, voire au sein des tumeurs. Dans l'hypothèse que je formule ici, il y aurait (1) une MEC présente à proximité directe des lésions, qui serait déposée au cours de la réaction desmoplastique et dont les molécules seraient plutôt pro-tumorales, et (2) une MEC plus périphérique potentiellement protectrice et qui serait progressivement éliminée au cours de la progression (pré)tumorale.

a. Sous-populations fibroblastiques

Plusieurs études ont récemment proposé diverses compartimentations du stroma de l'ADKP, notamment liée à une hétérogénéité des CAFs, et pourraient corroborer les résultats obtenus pendant ma thèse. En effet, l'échec thérapeutique de l'ablation totale des CAFs a rapidement suggéré un rôle double pour ces cellules, pouvant être promotrices ou inhibitrices de tumeur (Rhim *et al.*, 2014; Özdemir *et al.*, 2014). Cependant, alors que les CAFs « pro-tumoraux » (pCAF) sont bien connus, les rCAF (pour cancer-restraining CAFs) sont peu caractérisés. Une étude publiée en 2019 par Mizutani et collègues (Mizutani *et al.*, 2019; Miyai *et al.*, 2020), a montré dans un modèle murin que l'ablation de CAFs positifs pour le marqueur Meflin (qui sont aussi positifs pour la Vitamine D, un marqueur des PSCs) entraînait une accélération de la carcinogenèse pancréatique. En outre, l'étude de 71 échantillons humains d'ADKP a révélé que la présence de CAFs Meflin⁺ était corrélée à un tableau clinique favorable et à des tumeurs bien différenciées. Dans cet article, les auteurs suggèrent que dans les premiers stades de la carcinogenèse, les CAFs Meflin⁺ seraient des CAFs « sentinelles » qui restreindraient le développement des cellules pré-tumorales, avant de devenir des CAFs α SMA⁺ promoteurs de tumeurs dans les stades plus tardifs (Figure 23A). La dynamique temporelle et l'aspect pronostique de ces CAFs pourraient être cohérents avec le dépôt dynamique de TNX au cours de la carcinogenèse pancréatique, et le fait qu'une forte expression de *TNXB* dans la tumeur soit de bon pronostic. En outre, cette même étude a montré que l'absence de Meflin ou sa faible expression serait corrélée à une organisation particulière des fibres de collagènes associée à un phénotype plus agressif des tumeurs (Mizutani *et al.*, 2019), qui ne saurait que rappeler que la TNX serait aussi impliquée dans l'organisation des fibres de collagène.

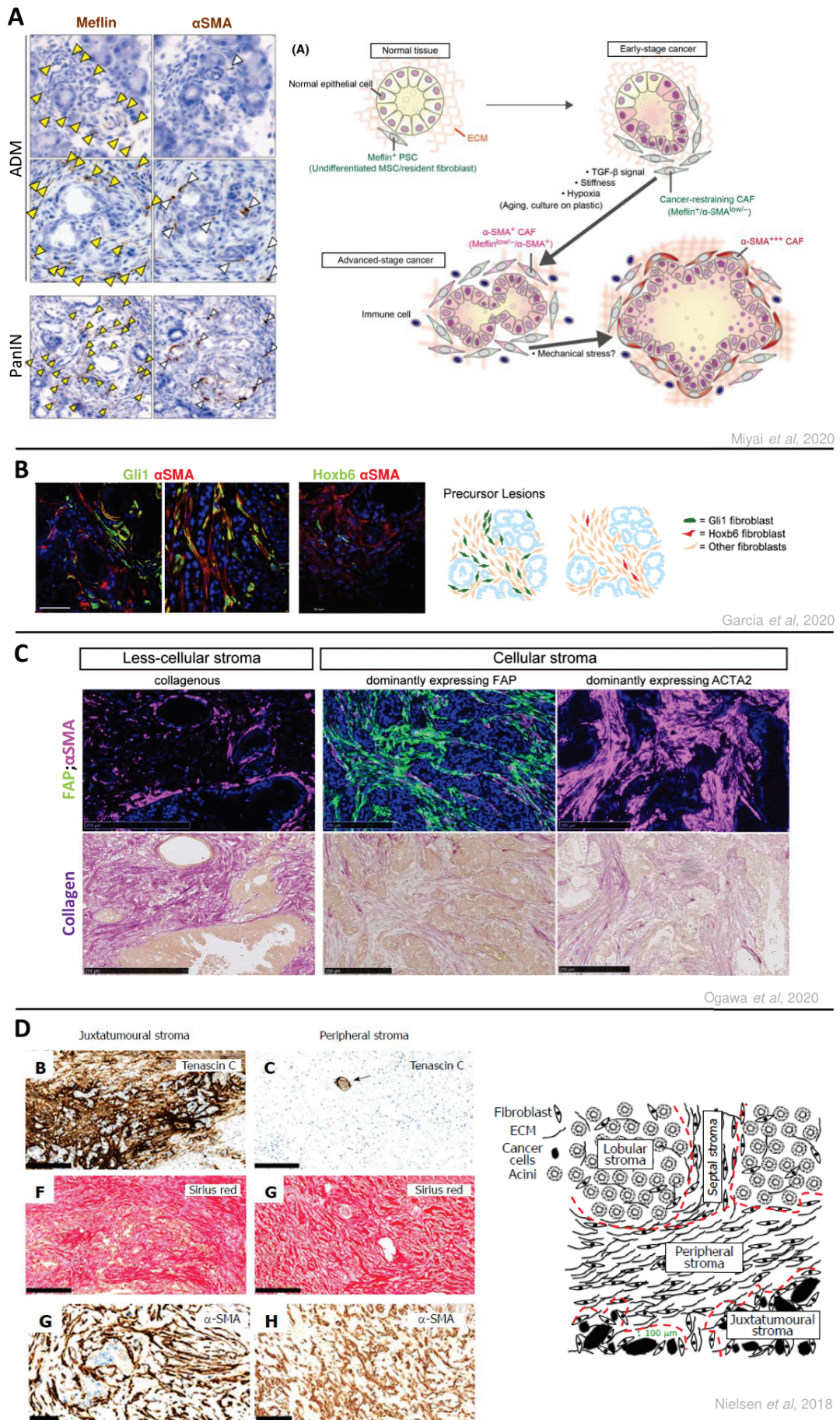


Figure 23 : Différentes compartimentations stromales proposées dans la littérature

Dans une autre étude publiée très récemment, Garcia et collègues avaient pour but d'identifier la sous-population de fibroblastes à l'origine du développement des CAFs (Garcia *et al.*, 2020). Par une approche à double recombinaison (*Frt/FlpO* et *CRE^{ERT}/Lox*) permettant une prédisposition au cancer du pancréas ainsi qu'un suivi de lignées cellulaires, les auteurs ont montré que les différentes sous-populations de fibroblastes présents à l'état physiologique ne participaient pas de la même manière à la carcinogenèse pancréatique. Ils ont notamment caractérisé les fibroblastes Gli1⁺ (et PDGFR α ⁺), présents à proximité directe des lésions, et qui avaient déjà été identifiés auparavant (Rhim *et al.*, 2014). Alors que le nombre de fibroblastes Gli1⁺ augmente de manière progressive dans les PanINs puis plus fortement dans les tumeurs invasives, à mesure qu'ils acquièrent α SMA, à l'opposé, les fibroblastes Hoxb6⁺, plus éloignés des lésions, restent en nombre équivalent (**Figure 23B**). Ces deux sous-populations de fibroblastes pourraient donc avoir des rôles différents au cours de la progression tumorale, et ne sont sûrement qu'un aperçu de la grande diversité de CAFs et de leurs rôles dans le développement et la progression tumorale de l'ADKP.

D'autre part, Ogawa et collègues ont décrit 3 types de stroma, selon l'expression de FAP et α SMA, ainsi que selon la quantité de collagène (**Figure 23C**). Dans cette étude, les auteurs ont corrélé le type de stroma peu cellulaire et riche en collagène à un meilleur pronostic, et à des tumeurs de plus bas grade (bien différenciées, moins agressives). En outre, les CAFs exprimant FAP seraient localisés plutôt en périphérie des lésions, tandis que les CAFs α SMA⁺ se trouveraient plutôt à proximité directe des lésions, et associés à un mauvais pronostic et à des tumeurs de plus haut grade (moins différenciées, plus agressives) (Ogawa *et al.*, 2020). Dans cette étude, les auteurs ont identifié les gènes différentiellement exprimés entre les différents types de stroma, parmi lesquels je n'ai malheureusement pas retrouvé le gène *TNXB*. Cependant, un cut-off basé sur les fold-change a été appliqué dans cette étude, et les gènes codant les protéines de la MEC, dont *TNXB*, présentent rarement des fold-changes importants, même s'ils sont très significativement dérégulés.

Il existe donc au sein du stroma (pré)tumoral de l'ADKP plusieurs sous-populations de CAFs, qui pourraient sécréter des matrices extracellulaires de composition différente. Cette hétérogénéité, et le fait que les CAFs puissent promouvoir ou restreindre la tumeur, implique que la TNX pourrait être exprimée par une ou des sous-population(s) particulière(s) de CAFs, autre(s) que les CAFs α SMA⁺. Au travers de ces trois études, il semblerait que le marqueur α SMA soit fortement relié à un rôle pro-tumoral des CAFs. La TNX, qui ne colocalise pas avec α SMA, pourrait donc avoir un rôle différent, potentiellement protecteur, de manière cohérente avec les observations faites dans les échantillons humains (perte de TNX). Il serait intéressant, dans la suite de notre étude, d'identifier les cellules à l'origine du dépôt de TNX. Grâce à la cohorte de patients étudiée dans la première partie de ces travaux de recherche (GSE62452), j'ai pu déterminer les gènes différentiellement exprimés entre les échantillons

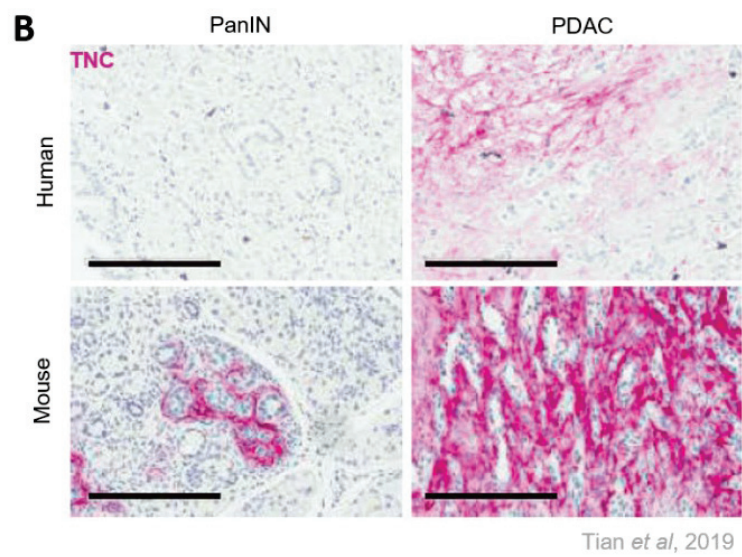
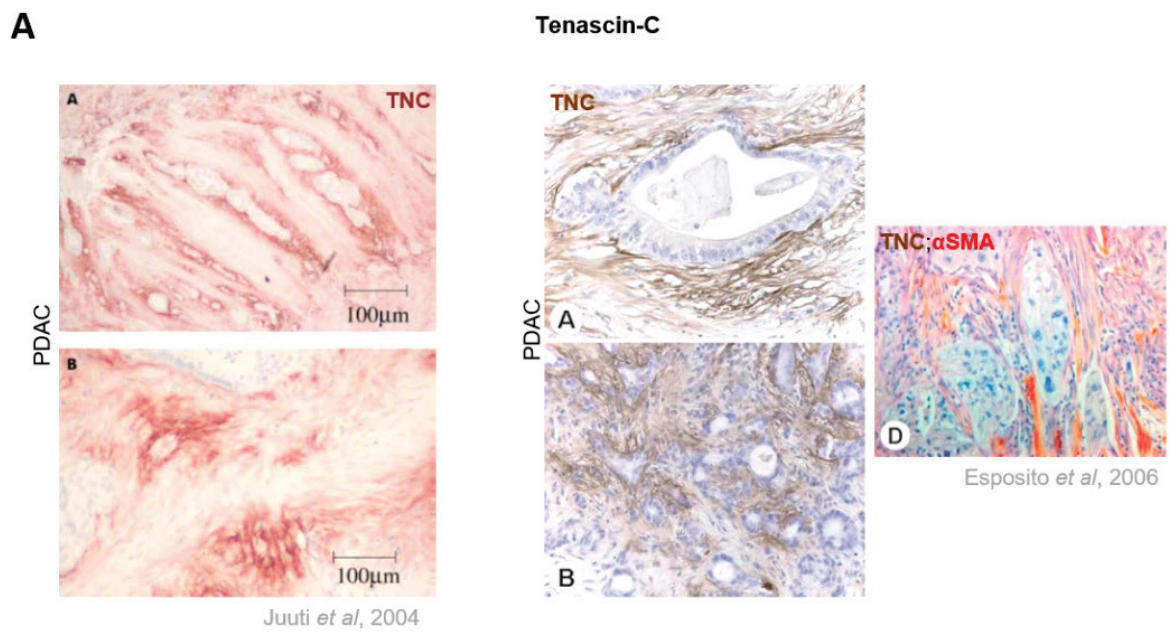


Figure 24 : Marquages de la TNC par immunohistochimie recensés dans la littérature. (PDAC = Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma)..

tumoraux $TNXB^{low}$ et $TNXB^{high}$. De manière surprenante, le gène *HOXB6* semble être sur-exprimé dans les tumeurs $TNXB^{low}$, alors que le gène *GLI1* n'est pas différentiellement exprimé entre les tumeurs $TNXB^{low}$ et $TNXB^{high}$, tout comme le gène codant la protéine Mefflin. En outre, l'analyse des marqueurs plus classiques des sous-populations de CAFs (*FAP*, *PDGFR α* et α SMA (ce dernier codé par le gène *ACTA2*)) s'est aussi avérée peu concluante. En effet, alors qu'aucune sonde *ACTA2* n'existe dans la technologie de microarray utilisée dans cette étude, le gène *PDGFRA* est sous-exprimé dans les tumeurs $TNXB^{low}$, tandis que le gène *FAP* n'est pas différentiellement exprimé. Cependant, il est important de garder en tête ici que ces résultats de microarray sur des échantillons d'ADKP humains ne peuvent pas récapituler la cinétique de développement des lésions pré-tumorales et tumorales murines. Afin de déterminer expérimentalement la ou les sous-population(s) de CAFs exprimant la TNX, nous envisageons donc de faire une immunofluorescence anti-TNX, ainsi qu'une hybridation *in situ* pour *Tnxb*, conjointe à un marquage de ces sous-populations de CAFs, pour lesquels il nous faudra déterminer les meilleurs marqueurs. Dans un premier temps, *PDGFR α* pourra être un bon candidat.

b. Une MEC compartimentée ?

Outre les CAFs, il pourrait exister au sein du stroma une compartimentation de la MEC. Une étude a récemment suggéré une compartimentation spatiale du stroma selon sa localisation vis-à-vis des lésions (**Figure 23D**) (Nielsen, Mortensen and Detlefsen, 2018). Plusieurs marqueurs ont été identifiés afin de caractériser ces différents stromas, mais ne sont pas totalement exclusifs. De manière étonnante, ils n'identifient pas de différence en termes de marquage α SMA entre le stroma juxtatumoral, à proximité directe des cellules tumorales, et le stroma périphérique, plus éloigné. En revanche, il est clairement montré que la TNC est présente dans le stroma juxtatumoral, mais absente dans le stroma périphérique. Si l'on transpose nos résultats ici, la TNX serait exprimée (1) dans le stroma dit périphérique au cours du développement des lésions, ainsi que (2) dans le stroma lobulaire autour des acini en cours de métaplasie, et (3) dans le stroma « septal » à l'état physiologique ; à l'inverse de la TNC.

Ainsi, il se pourrait que ces deux protéines matricielles ne soient pas localisées au même endroit et/ou au même moment dans le stroma tumoral pancréatique, comme cela est le cas dans d'autres processus physiologiques (développement, localisation dans le derme, cicatrisation) (Geffrotin *et al.*, 1995; Schalkwijk *et al.*, 2001; Valcourt *et al.*, 2015). Cette régulation opposée a également été montrée dans deux types de cancers : le mélanome (Geffrotin *et al.*, 2000) et l'astrocytome (Hasegawa *et al.*, 1997).

En outre, différentes études ont révélé par immunohistochimie un marquage souvent non uniforme de la TNC dans le stroma de l'ADKP, avec un renforcement à proximité directe des cellules tumorales, et une colocalisation avec α SMA (Juuti, 2004; Esposito *et al.*, 2006) (**Figure 24A**). L'expression de TNC à proximité des lésions a aussi pu être observée chez la souris, au stade PanIN (**Figure 24B**), mais ce marquage précoce n'est pas retrouvé dans les échantillons

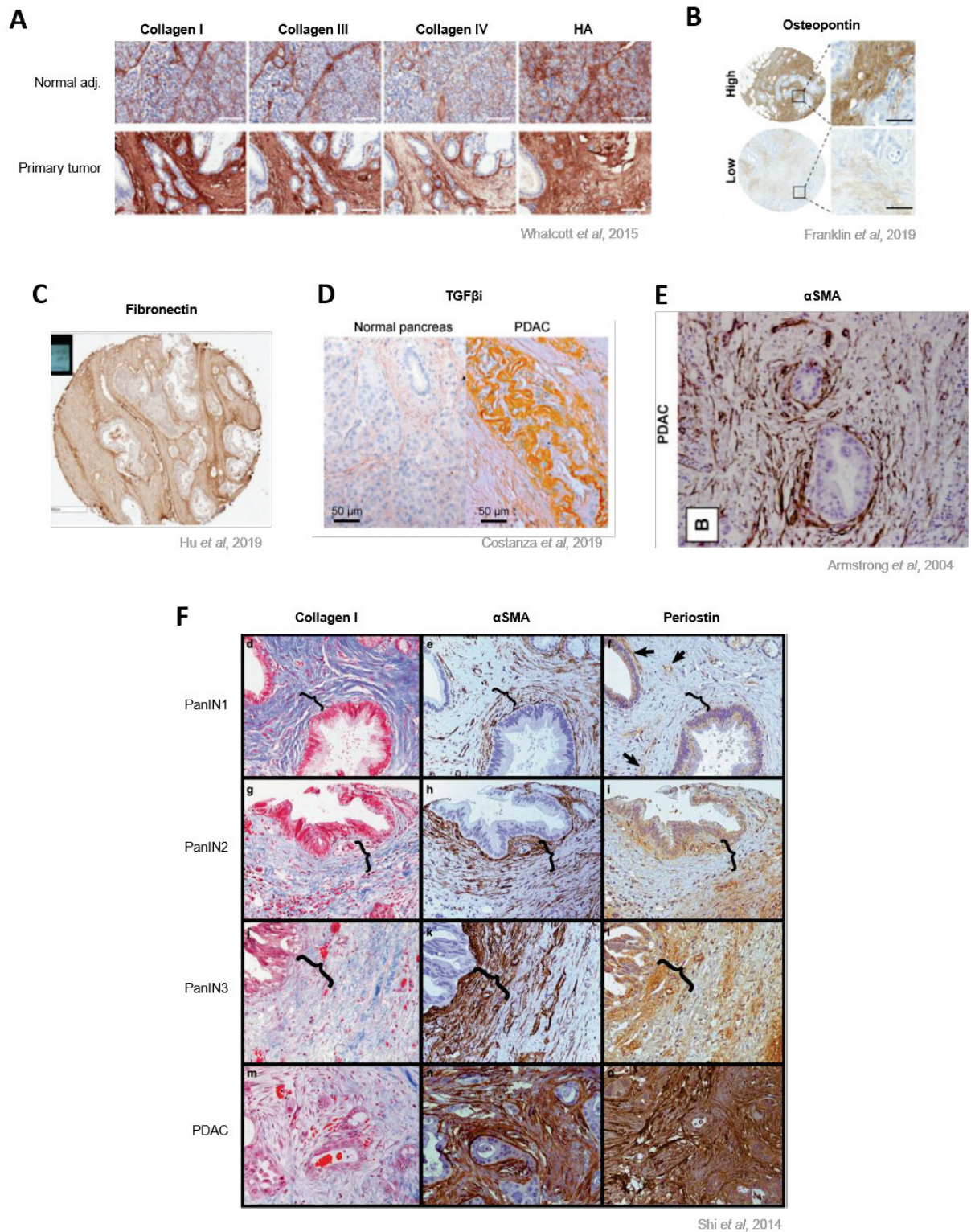


Figure 25 : Marquages de différentes molécules de la MEC par immunohistochimie trouvés dans la littérature. (PDAC = Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma). Les sources sont indiquées dans la figure.

PanINs humains dans cette étude (Tian *et al.*, 2019). Ces résultats soulignent les divergences phénotypiques entre les pancréas humains et murins au cours de la carcinogenèse et nous rappellent que nos observations (dépôt dynamique de la TNX) doivent encore être confirmées sur des échantillons de PanINs humains. Ces observations sont particulièrement intéressantes au regard des expressions souvent exclusives entre TNC et TNX, qui pourrait de nouveau prendre place ici en cours de carcinogenèse ainsi que dans des échantillons d'ADKP. Il serait donc intéressant de mieux caractériser l'expression de la TNC autour des lésions de type PanIN observées dans notre étude, en parallèle d'un marquage TNX. Outre le marquage TNX sur la TMA d'ADKP, un marquage TNC a été fait sur une lame sériée de cette même TMA, et permettra, après une analyse fine de déterminer si des divergences de localisation existent entre TNX et TNC dans des tumeurs invasives pancréatiques (données non montrées). En outre, par opposition au rôle fortement pro-tumoral de la TNC, l'hypothèse d'un rôle oncosuppressif pour la TNX semble toujours plausible, mais reste à démontrer.

D'autres molécules de la matrice sont déposées au cours de la carcinogenèse pancréatique, dont le rôle pro-tumoral est plus ou moins établi dans la littérature. La revue que nous avons écrite au cours de ma thèse récapitule le rôle de ces différentes protéines, que je ne reprendrai donc pas en détails ici. En revanche, il est à noter que la localisation de ces molécules, trop peu abordée et discutée, est intéressante.

En effet, alors que la localisation des collagènes de types I et III, de l'acide hyaluronique (HA) et de l'ostéopontine semble uniforme dans tout le stroma, celle du collagène de type IV est plus importante autour des cellules tumorales (**Figure 25A et B**) (Whatcott *et al.*, 2015; Franklin *et al.*, 2019). En outre, il existerait deux types d'HA, non discriminés en IHC mais de masses moléculaires différentes, dont le plus lourd serait corrélé à un mauvais pronostic (Franklin *et al.*, 2019). De manière similaire à la TNC, la fibronectine et le TGF β i présentent tous deux une localisation non uniforme, avec un renforcement autour des cellules tumorales (**Figure 25C et D**) (Costanza *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2019), au même niveau que le marquage α SMA (**Figure 25E**) (Armstrong *et al.*, 2004). Enfin, le dépôt de périostine au cours de la carcinogenèse pancréatique a été analysé chez l'Homme à différents stades de PanIN et dans l'ADKP. Ces travaux ont montré une localisation dynamique de la périostine, d'abord absente autour de lésions de bas grade (PanINs 1 et 2). Son expression augmente ensuite, à proximité directe des lésions de haut grade (PanIN3), avant de devenir quasi-uniforme dans l'ADKP (**Figure 25F**) (Shi *et al.*, 2014). Dans ce même article, l'organisation des fibres de collagène semble indiquer un alignement correct au stade PanIN, qui se désorganise ensuite (fibres enchevêtrées), avec cependant certaines zones où les fibres restent alignées, ce qui suggère une nouvelle fois deux environnements matriciels différents, autant temporellement que spatialement.

Ainsi, il apparaît que plusieurs compartiments stromaux, et plusieurs types de MEC, pourraient coexister et/ou se succéder au cours du développement et de la progression de l'ADKP. Cependant, la composition de ces différentes matrices, ainsi que leur rôle restent à élucider. Les patrons d'expression de la périostine, de la fibronectine et de la TNC sont particulièrement intéressants. En effet, la périostine est connue pour interagir avec la fibronectine et la TNC, et pour réguler l'organisation de la matrice, dont notamment la fibrillogenèse et l'incorporation de la TNC (Norris *et al.*, 2007). Elle a de plus été montrée comme marqueur de mauvais pronostic dans l'ADKP et est associée à une forte prolifération et invasion des cellules tumorales pancréatiques (Ben *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017). Si l'on regarde la localisation et les fonctions de ces trois protéines (périostine, TNC et fibronectine), il apparaît que toutes se trouvent à proximité directe des lésions (pré)tumorales, et ont des fonctions pro-tumorales, ce qui suggère qu'il existerait une matrice protumorale mise en place au cours de la carcinogenèse à proximité des cellules tumorales. A l'inverse, l'hypothèse posée au cours de mes travaux de thèse est que le tissu environnant réagit, avec la mise en place d'une seconde matrice, autour ou poussée par la première, qui pourrait avoir un rôle opposé. Actuellement, peu de données permettent de connaître plus en détails la composition et la localisation précise des molécules de la MEC les unes par rapport aux autres, ainsi que leur cinétique de dépôt au cours du développement de l'ADKP, car la plupart des études portant sur les stades précoces de la carcinogenèse pancréatique sont des analyses bioinformatiques (Binkley *et al.*, 2004; Buchholz *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Luan *et al.*, 2020).

L'idée d'un rôle double pour la MEC, et donc l'existence d'une matrice protectrice, qui n'est qu'une hypothèse dans le cancer du pancréas, a été démontrée dans plusieurs autres cancers, dont les cancers du sein, du foie, du colon et les mélanomes (Sala, Ros and Saltel, 2020). En effet, dans ces tumeurs, une matrice protectrice est mise en place dans les phases précoces du développement tumoral, lorsque la tumeur n'est pas encore invasive. Elle est alors considérée comme une barrière physique, dans laquelle certaines protéines (les collagènes de types I et IV notamment) sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire. Dans l'ADKP, plusieurs protéines matricielles (collagène de type XV, biglycane, lumican) ont aussi été décrites comme pouvant avoir un rôle anti-tumoral individuellement, mais n'ont pas été étudiées conjointement (Liot *et al.*, 2021). Dans les tumeurs mammaires, du foie, du colon et les mélanomes, cette matrice protectrice est ensuite remodelée par les cellules tumorales elles-mêmes et par les cellules stromales pour devenir permissive à l'invasion tumorale au fur et à mesure de la carcinogenèse. Il est d'ailleurs à noter que la réaction desmoplasique est un marqueur de mauvais pronostic dans de nombreux cancers où elle a lieu. En outre, des structures particulières au sein de la MEC ont été caractérisées comme des « rails » pour la migration des cellules notamment. Ces « ECM tracks » ont un aspect fibrillaire, en tube, dans lesquelles la TNC co-localise avec la fibronectine et le collagène de type I, dans un modèle de

mélanome invasif et métastasé (Kääriäinen *et al.*, 2006), ainsi que dans des insulinomes et cancers intestinaux (Spénlé, Saupe, *et al.*, 2015). Ces « rails » seraient des structures favorisant la migration et l'invasion des cellules tumorales. Ces observations pourraient être cohérentes avec les localisations assez précises de ces protéines matricielles, notamment la TNC et la fibronectine à proximité des cellules tumorales.

Ainsi, de plus en plus de laboratoires s'intéressent à l'hétérogénéité du stroma présent autour des cellules (pré)tumorales pancréatiques. Ces différentes observations et études suggèrent l'existence de sous-compartiments au sein même du stroma, et qui pourraient avoir des rôles opposés, selon le stade de développement tumoral et la localisation. Le rôle protecteur de la MEC en début de carcinogenèse est peu connu, en comparaison au rôle pro-tumoral de la MEC dans de nombreux cancers. Cette inégalité de connaissance est probablement due à des aspects techniques. En effet, il est souvent plus aisé d'étudier des protéines sur-exprimées, à des stades avancés (qui persistent plus longtemps que les stades précoces, transitoires). Finalement, il semble tout à fait envisageable qu'une telle dualité existe aussi pour la MEC impliquée dans l'ADKP, bien que les protéines matricielles différentiellement régulées ne sont pas les mêmes selon les cancers, et l'importance même de la MEC n'est pas équivalente selon le type de tumeur (Gkretsi *et al.*, 2015).

La compréhension de l'hétérogénéité du stroma de l'ADKP et de sa MEC est donc un enjeu majeur pour la découverte de nouvelles solutions thérapeutiques. Une des perspectives de ce projet de thèse sera donc d'identifier et de localiser les différentes matrices présentes autour des lésions (pré)tumorales pancréatiques, et notamment les protéines matricielles coexprimées et colocalisées avec la TNX. Ainsi, la caractérisation de la « gaine » que nous avons observée grâce à la TNX et du stroma déposé à proximité des lésions pré-néoplasiques (réaction desmoplasique) nous permettra de mieux comprendre la dualité de la MEC impliquée dans la carcinogenèse pancréatique, et par extension, le potentiel rôle de la TNX dans cette gaine. L'analyse des gènes différentiellement exprimés entre les tumeurs $TNXB^{low}$ et $TNXB^{high}$ a mis en évidence des protéines de la matrice, qui pourraient donc être corégulées avec la TNX. En effet, l'élastine et les fibulines 1, 2 et 5 sont sous-exprimées dans les tumeurs à faible taux de TNX, tandis que la fibronectine est sur-exprimée dans ces tumeurs. Ainsi, bien que les données *in silico* ont été obtenues à partir de tumeurs invasives humaines, et non de PanINs murins, nous avons établi grâce à cette cohorte des cibles, qui seront analysées en parallèle de la TNX. Ces protéines matricielles seront marquées sur des PanINs humains et murins, afin d'illustrer la compartimentation matricielle dont nous faisons l'hypothèse. En outre, l'organisation des fibres de collagène sera étudiée par une coloration des biopsies au rouge Picrosirius et observation en lumière polarisée qui permet l'analyse de l'alignement des fibres de collagène.

L'observation, très descriptive pour l'instant, d'un dépôt dynamique de la TNX au cours de la carcinogenèse pancréatique doit donc être complétée. Ainsi, le deuxième article de ce manuscrit de thèse est une ébauche de l'article que nous comptons soumettre. Parmi les expériences complémentaires, nous aimerions réussir à montrer que cette localisation dynamique de TNX est également retrouvée dans des lésions de type PanIN chez l'Homme. Pour cela, nous collaborons avec le Docteur Valérie Hervieu, anatomopathologiste aux Hospices Civils de Lyon, qui a des biopsies de patients présentant un ADKP associé à des lésions de type PanIN à proximité de la tumeur. Bien qu'il ne s'agisse pas exactement de premiers stades de carcinogenèse pancréatique du fait de la tumeur adjacente, ces échantillons nous permettront tout de même de confirmer ou non la présence de TNX autour de lésions pré-tumorales et de potentiellement l'associer à d'autres protéines de la matrice. En outre, nous n'avons pas confirmé histologiquement la perte de TNX dans un modèle murin d'ADKP, de type KPC ou KIC. En effet, les travaux préliminaires à mon projet de thèse ont montré par RT-qPCR, que l'expression de *Tnxb* était drastiquement diminuée dans les pancréas de souris KPC, en comparaison à des souris WT, notamment au point limite, lorsque l'ADKP est bien développé. En revanche, il serait tout de même intéressant de visualiser cela par histologie, afin de savoir si la perte est totale ou s'il reste des zones positives pour la TNX dans les tumeurs murines invasives.

Par ailleurs, il sera nécessaire de déterminer les cellules à l'origine du dépôt de TNX dans le tissu pancréatique sain, et pathologique, et qui pourraient répondre à un tel signal. J'ai pu observer au cours de ma thèse que sur des coupes de pancréas sain humain, la TNX, en plus d'être localisée dans le tissu conjonctif, est fortement marquée dans certaines cellules épithéliales pancréatiques, réparties de manière non-uniforme sur la coupe. Alors que nous pensions que la TNX ne serait exprimée que par des fibroblastes ou les PSCs, il sera donc également intéressant de déterminer l'identité de ces cellules épithéliales. Ce travail a été débuté au cours de cette thèse, mais n'a pu être mené à terme par manque de temps.

Ainsi, les résultats présentés ici, complétés par les données concernant la caractérisation (2) « des » matrices entourant les lésions et (2) des cellules exprimant la TNX à l'état physiologique et pathologique, permettraient de proposer un article plus complet.

A plus long terme, il sera également intéressant de savoir si cette dynamique est généralisable à un grand nombre de tumeurs solides, puisque nous avons montré que la perte d'expression de TNX était observée pour la plupart des cancers, dont notamment les six plus incidents et mortels au monde. Il serait également intéressant de comprendre par quel mécanisme l'expression de la TNX est régulée. En effet, l'idée d'une expression en réaction à une transformation locale implique qu'il pourrait exister une régulation à distance, cytokinique, de l'expression de TNX, qui n'a pour l'instant pas été mise en évidence. Comme discuté dans

les deux premiers articles de ce manuscrit de thèse, peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la régulation de l'expression de la TNX et aucune ne démontre l'implication de cytokines (Chiovaro, Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2015).

Enfin, le rôle oncosuppressif de la TNX, qui devait initialement être déterminé par ces travaux de recherche, reste à élucider, bien que plusieurs pistes aient été soulevées par des analyses bioinformatiques.

B. Conséquences biologiques de la perte de TNX

Afin de mieux comprendre le rôle de la TNX dans la carcinogenèse pancréatique, j'ai comparé les processus dérégulés entre les ADKP à faible ($TNXB^{\text{low}}$) et fort ($TNXB^{\text{high}}$) taux de $TNXB$ (cohorte GSE62452). Pour cela, j'ai comparé les échantillons tumoraux $TNXB^{\text{low}}$ vs $TNXB^{\text{high}}$ grâce à l'outil GEO2R et ai analysé les gènes différentiellement exprimés par *Gene Ontology* et *Reactome*. Ces deux approches permettent de mettre en évidence les processus biologiques enrichis dans une liste de gènes, selon les processus dans lesquels ces gènes sont impliqués.

1. Une prolifération augmentée

Cette analyse m'a permis de mettre en évidence deux grands processus dérégulés en fonction de la présence ou non de TNX dans la tumeur. D'une part, de nombreux termes associés au cycle cellulaire, et notamment à la mitose, sont retrouvés en analysant la liste des gènes sur-exprimés dans les tumeurs pauvres en $TNXB$, suggérant que l'absence de TNX est associée à une prolifération importante. Ce résultat corrobore un potentiel rôle protecteur de la TNX, qui pourrait restreindre la prolifération des cellules (pré)tumorale. Malheureusement, je n'ai pu confirmer ce résultat expérimentalement. En effet, le co-marquage Ki67-TNX dans les souris KC n'a donné aucune corrélation entre la quantité (aire ou intensité) de TNX et le nombre de noyaux Ki67⁺ (données non montrées). En outre, aucune différence de prolifération n'a été observée dans les lésions pancréatiques de souris KC déficientes ou non en TNX, comme cela sera détaillé par la suite. Cependant, dans les deux cas, il était difficile de discriminer cellules épithéliales et stromales lors des quantifications, il s'agit donc ici d'un index de prolifération global. En outre, Ki67 est un marqueur de prolifération bien spécifique, pas toujours retrouvé dans les lésions de bas grade, notamment dans les modèles murins (Aichler *et al.*, 2012; Guo, Xie and Zheng, 2016). Enfin, le marquage Ki67 demande peut-être encore une meilleure mise au point, avec l'introduction d'une étape d'amplification supplémentaire pour une détection plus sensible. Ainsi, le lien entre TNX et prolifération reste à établir expérimentalement. Très prochainement, un nouveau marquage Ki67 est envisagé en parallèle du marquage de TNX à la fois sur les échantillons murins, après une nouvelle mise au point, mais surtout sur des PanINs humains, puisque les données sur la prolifération ont été obtenues à partir d'échantillons humains. D'autres marqueurs de prolifération pourront être testés (PCNA, par exemple) si la mise au point de Ki67 venait à ne pas fonctionner.

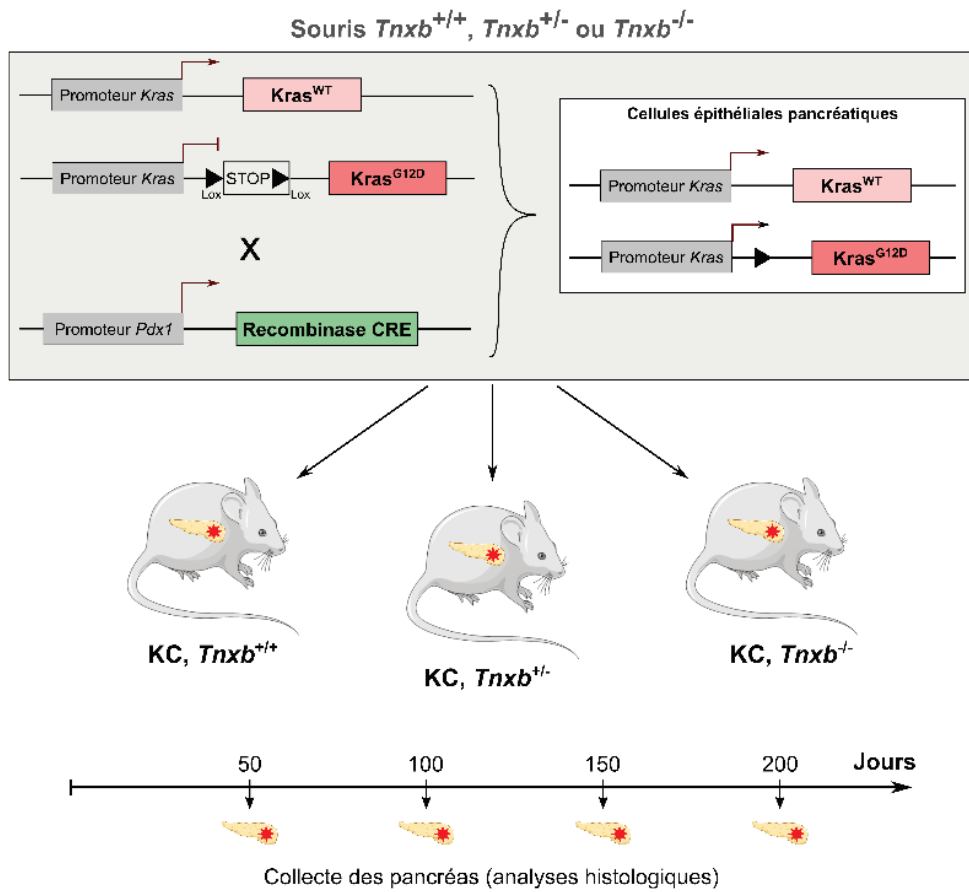


Figure 26 : Modèle murin utilisé au cours de cette étude et cinétique d'analyse.

2. Perturbation de l'inflammation

Le système immunitaire semble également dérégulé dans les tumeurs $TNXB^{low}$, dont notamment les voies de signalisation des InterLeukines (IL) IL4 et IL13, impliquées dans l'inflammation, qui sont sous-exprimées dans les tumeurs $TNXB^{low}$. Ce résultat suggère que la TNX pourrait être impliquée dans la régulation de l'inflammation et du système immunitaire, mais ce lien reste à élucider. De manière intéressante, nous avons mis en évidence que le marquage de la TNX était renforcé autour des cellules en ADM dans le modèle murin KC. Cette métaplasie, processus majeur de plasticité cellulaire, est fortement impliquée dans la pancréatite, une inflammation du pancréas. En outre, il est intéressant de noter que la TNC est régulée par des Interleukines pro- (IL1 α et 1 β) et anti- (IL4 et IL13) inflammatoires (Chiovaro, Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2015), ce qui suggère qu'un lien pourrait exister entre inflammation, TNC et TNX dans le pancréas. En parallèle de la carcinogenèse, il serait donc intéressant d'étudier l'implication de la TNX (et de la TNC) dans les pancréatites (aigüe et chronique), grâce au modèle d'injection de céruléine, par exemple, dans la souris sauvage ou déficiente en TNX. Par ailleurs, une caractérisation du compartiment immunitaire est envisagée dans la cinétique des souris KC, afin de déterminer si l'environnement immunitaire est impacté par la présence plus ou moins forte de TNX autour des lésions.

La TNX semble donc être impliquée dans plusieurs processus liés à la carcinogenèse, et qui pourraient être cohérents avec un rôle protecteur. Il convient tout de même de noter que les résultats obtenus *in silico* ont été obtenus sur des tumeurs déjà invasives, tandis que la cinétique observée dans notre étude se déroule en cours de carcinogenèse. Malheureusement, l'analyse *in vivo* du développement de lésions pré-tumorales dans des souris KC déficientes ou non en TNX n'a pu mettre en évidence de rôle oncosuppressif de la TNX, ni de différence dans la prolifération des lésions en présence ou en absence de TNX.

C. Etude *in vivo* du rôle oncosuppressif de la TNX

L'objectif initial de mon projet de thèse était l'élucidation du rôle de la TNX dans la carcinogenèse pancréatique. L'hypothèse de départ était que la TNX pouvait jouer un rôle oncosuppressif dans le développement tumoral. Elle était basée sur plusieurs résultats préliminaires et notamment sur les résultats *in vivo* obtenus sur une cohorte pilote avant mon arrivée au laboratoire, dans laquelle les souris $KC;Tnxb^{+/-}$ et $KC;Tnxb^{-/-}$ présentaient une médiane de survie à 190 jours, comme présenté en préambule du deuxième article de ce manuscrit de thèse, avec un développement rapide des lésions et des lésions de plus haut grade. Nous attendions potentiellement un nombre plus élevé de souris développant un ADKP invasif (>10%), plus tôt (< 1 an). Pour conforter ces résultats préliminaires, dès mon arrivée au laboratoire, j'ai établi une stratégie expérimentale très précise. Nous avons ainsi généré des souris KC (LSL: $Kras^{G12D};Pdx1-CRE$;) sauvages ($Tnxb^{+/+}$), hétérozygotes ($Tnxb^{+/-}$) ou déficientes ($Tnxb^{-/-}$) pour la TNX, et collecté leur pancréas à 50, 100, 150 et 200 jours post-parturition, afin de comparer la cinétique d'évolution des lésions (**Figure 26**).

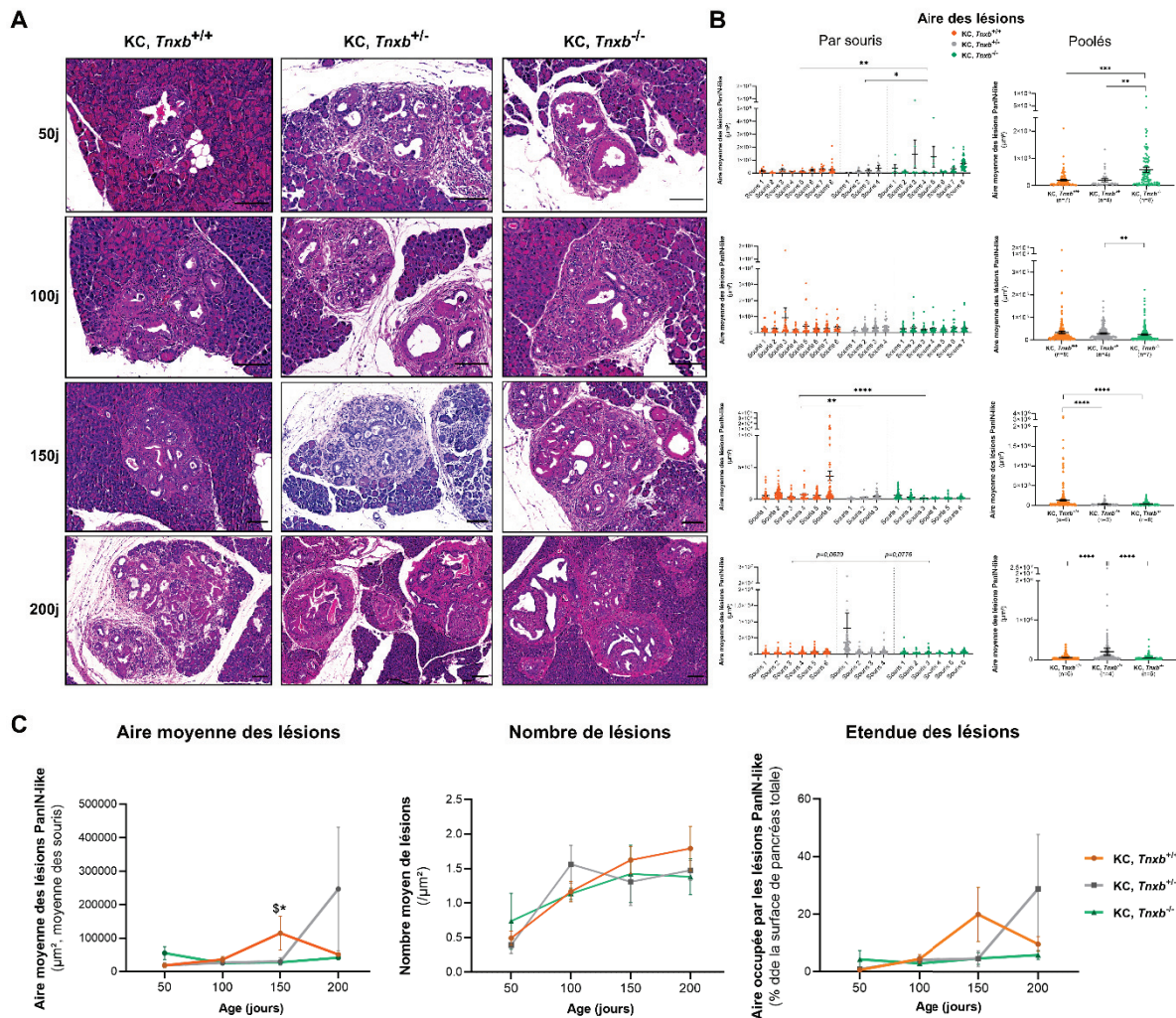


Figure 27: Analyse de l'étendue des lésions. A : Images représentatives des lésions pancréatiques retrouvées aux différents temps et génotypes (H&E), barre d'échelle = 100µm. B : Quantification de l'aire des lésions, par souris (1 point = 1 lésion) et en regroupant toutes les lésions (des 4 à 8 souris). C : Evolution dans le temps de l'aire des lésions, de leur nombre et de leur étendue (aire de pancréas occupée par des lésions), moyenne des 4 à 8 souris, \pm SEM.

Dans cette nouvelle cohorte, nous avons augmenté le nombre d'animaux par condition, afin de faire une étude *in vivo* robuste, avec n=6 à 8 souris KC;*Tnxb*^{+/+} et KC;*Tnxb*^{-/-} et n=4 souris KC;*Tnxb*^{+/-}, pour chaque point de cinétique. Nous avons également collecté le pancréas de différentes souris contrôles (*Pdx1*-CRE,*Tnxb*^{-/-} et LSL:*Kras*^{G12D},*Tnxb*^{-/-}) pour écarter tous biais expérimentaux. De plus, suite à l'avertissement d'un collaborateur sur la potentielle fuite de la CRE recombinase dans les souris femelles, les croisements ont tous été effectués de manière à ce que la CRE soit apportées par des mâles.

Les pancréas prélevés ont été divisés en plusieurs parties dont une a été incluse en paraffine pour cette étude. Les blocs ainsi obtenus ont été coupés au microtome (3 à 4µm) avant d'être analysés par colorations histologiques ou marquages immunohistochimiques (IHC) sur coupes sériées afin d'analyser les mêmes lésions entre les différents marqueurs. Enfin, les coupes ont été intégralement numérisées afin de pratiquer l'analyse d'image sur un large champ.

Dans un premier temps, j'ai effectué une analyse histologique quantitative des pancréas (après coloration à l'Hématoxyline-Eosine (H&E)), afin de déterminer l'étendue des lésions. Dans ce cadre, j'ai déterminé sur chaque coupe (1 coupe par souris) : (1) l'aire moyenne des différentes lésions trouvées, (2) le nombre de lésions et (3), l'étendue des lésions au total, *i.e.* l'aire de pancréas total occupée par des lésions sur la coupe. La figure 27 présente les résultats obtenus, avec des images représentatives des lésions rencontrées dans chaque génotype, aux différents temps (**Figure 27A**), la quantification de l'aire moyenne des lésions avec le détail par souris ou en regroupant toutes les lésions des différentes souris (« poolés ») (**Figure 27B**), et l'évolution des différents paramètres mesurés (1 point = moyenne des 4 à 8 souris) (**Figure 27C**). Comme montré par les images et les différentes quantifications, il ne semble pas que les souris KC;*Tnxb*^{+/+} et KC;*Tnxb*^{-/-} développent des lésions plus rapidement, ou un plus grand nombre de lésions. En effet, l'aire des lésions semble stable, au cours du temps, sans grande différence entre les différents génotypes. En outre, le nombre de lésions par souris augmente de la même manière pour les trois groupes, et la résultante (aire totale de lésions par pancréas) ne montre pas plus de différence (**Figure 27C**). L'analyse plus précise par souris, possible uniquement pour l'aire moyenne des lésions confirme ce résultat, tout comme l'analyse des lésions regroupées indépendamment des souris. Il est à noter que ce regroupement a été fait en deuxième temps, lorsque nous nous sommes rendus compte qu'aucun résultat ne sortait en faisant la moyenne des moyennes d'aire de lésions pour chaque souris (**Figure 27B**). En effet, il est parfois suggéré que chaque lésion pourrait être considérée individuellement comme une entité. Ceci permet d'augmenter le nombre d'« événements » analysés. Cependant, il est aussi important de garder en mémoire qu'au sein d'une même souris, chaque lésion influence les lésions voisines au travers de signaux paracrines. Dans cette analyse, bien que les tests statistiques donnent certaines différences, notamment à 50 et 150 jours, je n'ai pas pu mettre en évidence de tendance claire quant à

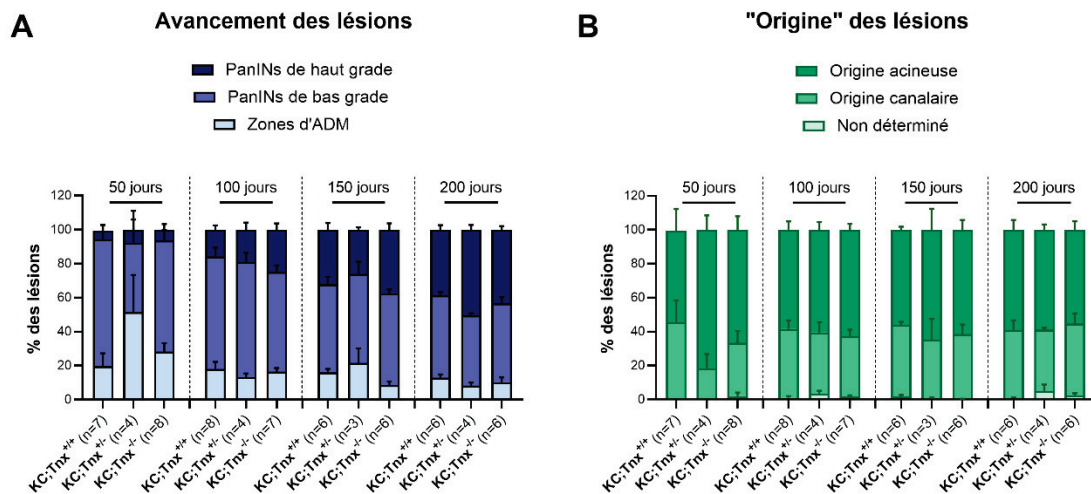


Figure 28 : Gradation des lésions rencontrées dans les pancréas des différents génotypes, à 50, 100, 150 et 200 jours post-parturition. A : Stade d'avancement des lésions (ADM, PanIN de bas grade, PanIN de haut grade). B : Origine possible des lésions (cellules acineuses (ADM et « dérivés ») ou canalaire (canaux hyperplasiques)).

l'évolution des lésions. En effet, alors que les lésions semblent plus importantes dans les pancréas provenant de souris $KC;Tnxb^{-/-}$ en comparaison aux souris $KC;Tnxb^{+/+}$ à 50 jours, le résultat est l'exact opposé à 150 jours (**Figure 27B**), ce qui ne nous permet pas de conclure quant à un réel effet de l'absence de TNX sur le développement de lésions pré-néoplasiques. En outre, l'évolution de l'aire des lésions tous génotypes confondus est surprenante, car elle n'augmente que très peu, alors que nous nous attendions à une augmentation dans le temps, comme pour le nombre de lésions. Cette observation remet malheureusement en doute le modèle utilisé, ainsi que cette quantification.

En parallèle, j'ai tenté de définir le stade de chaque lésion (ADM, PanIN de bas grade, PanIN de haut grade) sur ces coupes histologiques (H&E), par comparaison avec les marquages immunohistochimiques sur coupes sériées réalisés avec les anticorps anti-CK19 (cellules canalaire) et α Amy (cellules acineuses) (**Figure 28A**). Malheureusement, cette gradation n'a pas non plus révélé de réelle différence dans l'avancement des lésions entre les souris $KC;Tnxb^{+/+}$ et $KC;Tnxb^{-/-}$. En outre, les lésions paraissaient parfois d'origine très canalaire, tandis que d'autres semblaient clairement provenir d'une transformation du compartiment acineux. De telles diversités en termes d'origine des lésions sont possibles dans le modèle KC, au vu de l'expression très précoce du gène *Pdx1* au cours du développement pancréatique. J'ai ainsi tenté d'évaluer l'origine possible de chaque lésion selon son histologie (**Figure 28B**), mais cela n'a pas non plus permis de montrer de différence entre les souris $KC;Tnxb^{+/+}$ et $KC;Tnxb^{-/-}$. Ces gradations restent cependant assez complexes, et ces résultats sont donc à prendre avec certaines précautions. Il est cependant intéressant de noter que la quantité de lésions de haut grade, faible à 50 jours augmente progressivement en même temps que diminuent les zones d'ADM et les lésions de bas grade, ce qui permet de conforter cette caractérisation des lésions.

Ainsi, il semblerait que la cinétique de développement des lésions de type PanINs ne soit pas altérée (accélérée) par l'absence de TNX. En outre, les lésions semblent se développer de la même manière entre les différents génotypes (progression dans les stades de PanINs, origine, etc). Néanmoins, j'ai poursuivi les investigations, car la différence pourrait se situer ailleurs, et notamment dans des caractéristiques précises de ces lésions, telles que la fibrose, la réaction stromale ou encore la prolifération.

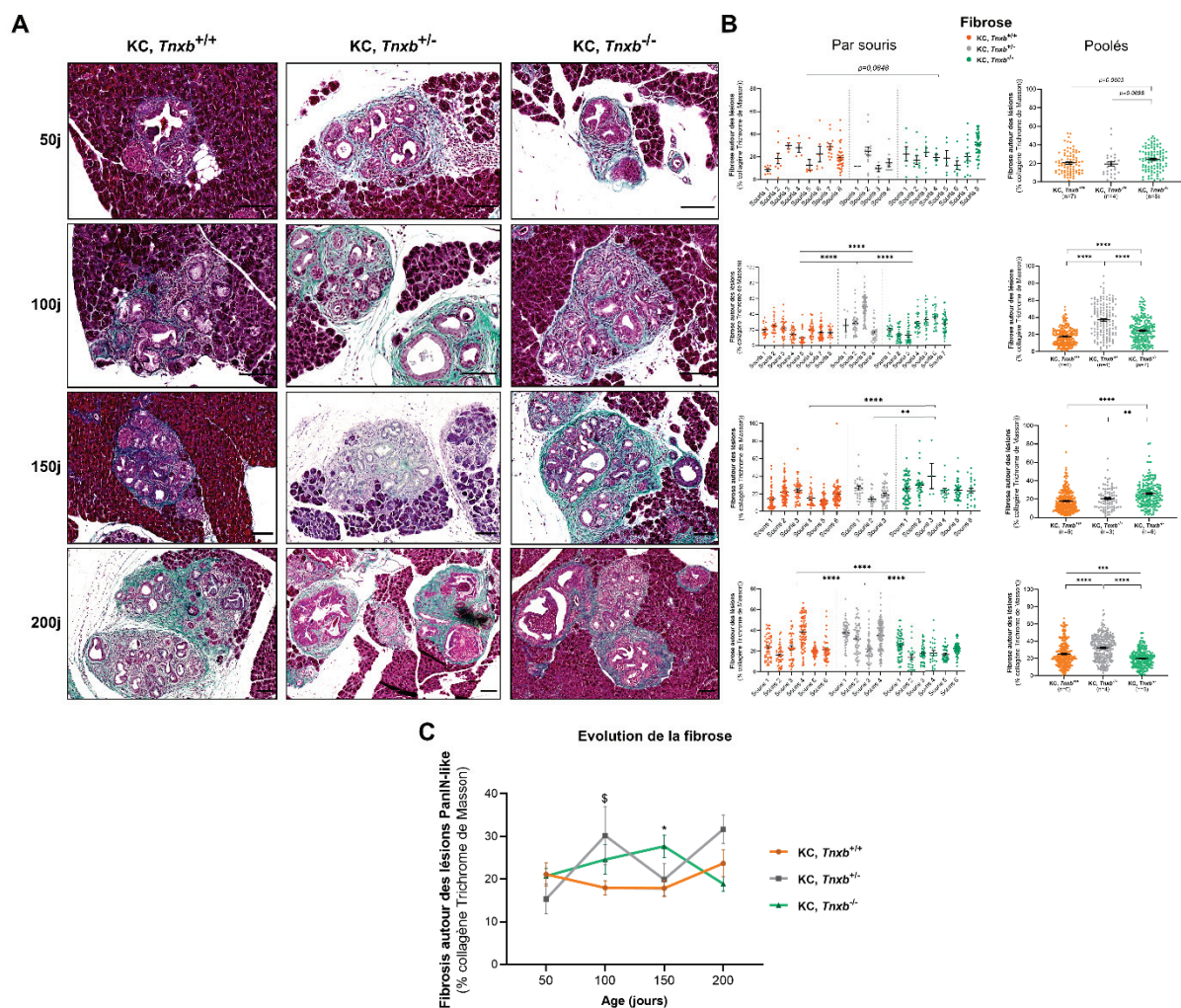


Figure 29 : Analyse de la fibrose. A : Images représentatives de la fibrose autour des lésions pancréatiques retrouvées aux différents temps et génotypes (Trichrome de Masson), barre d'échelle = 100 μ m. B : Quantification de l'aire de fibrose (vert) autour des lésions, par souris (1 point = 1 lésion) et en regroupant toutes les lésions (des 4 à 8 souris). C : Evolution dans le temps de l'aire de fibrose autour des lésions, moyenne des 4 à 8 souris, \pm SEM.

Par la suite, j'ai donc analysé la fibrose autour de chaque lésion grâce à une coloration au Trichrome de Masson, qui permet de colorer le collagène en vert. Ainsi, après avoir identifié chaque lésion au sein d'une coupe, j'ai sélectionné chacune avec son stroma et ai mesuré l'aire occupée par le vert, à l'aide d'une macro sous le logiciel Fiji. La figure 29 présente la coloration au Trichrome de Masson des lésions présentées dans la figure 27 (**Figure 29A**), ainsi que l'aire de fibrose autour de chaque lésion : par souris ou en rassemblant toutes les lésions des souris dans chaque condition (« poolés ») (**Figure 29B**). Comme précédemment, cette représentation a été faite après l'analyse plus globale présentée en **Figure 29C**, où les mesures correspondent à la moyenne générale des moyennes des différentes lésions par souris, comme précédemment. De manière intéressante, la fibrose semble plus importante à 100 et 150 jours dans les pancréas de souris *KC;Tnxb^{-/-}*, puis la tendance s'inverse à 200 jours, ce qui m'a, de prime abord, fait douter de la robustesse de ces résultats. Cependant, cette fibrose, qui semble dynamique, pourrait être liée au dépôt dynamique de TNX dans les souris *KC;Tnxb^{+/+}*, qui est inexistant dans les souris *KC;Tnxb^{-/-}*. Ainsi, en présence de TNX, la fibrose pourrait être restreinte, avant d'augmenter lors de la perte de TNX dans des stades avancés de carcinogenèse, mais ce lien reste à démontrer.

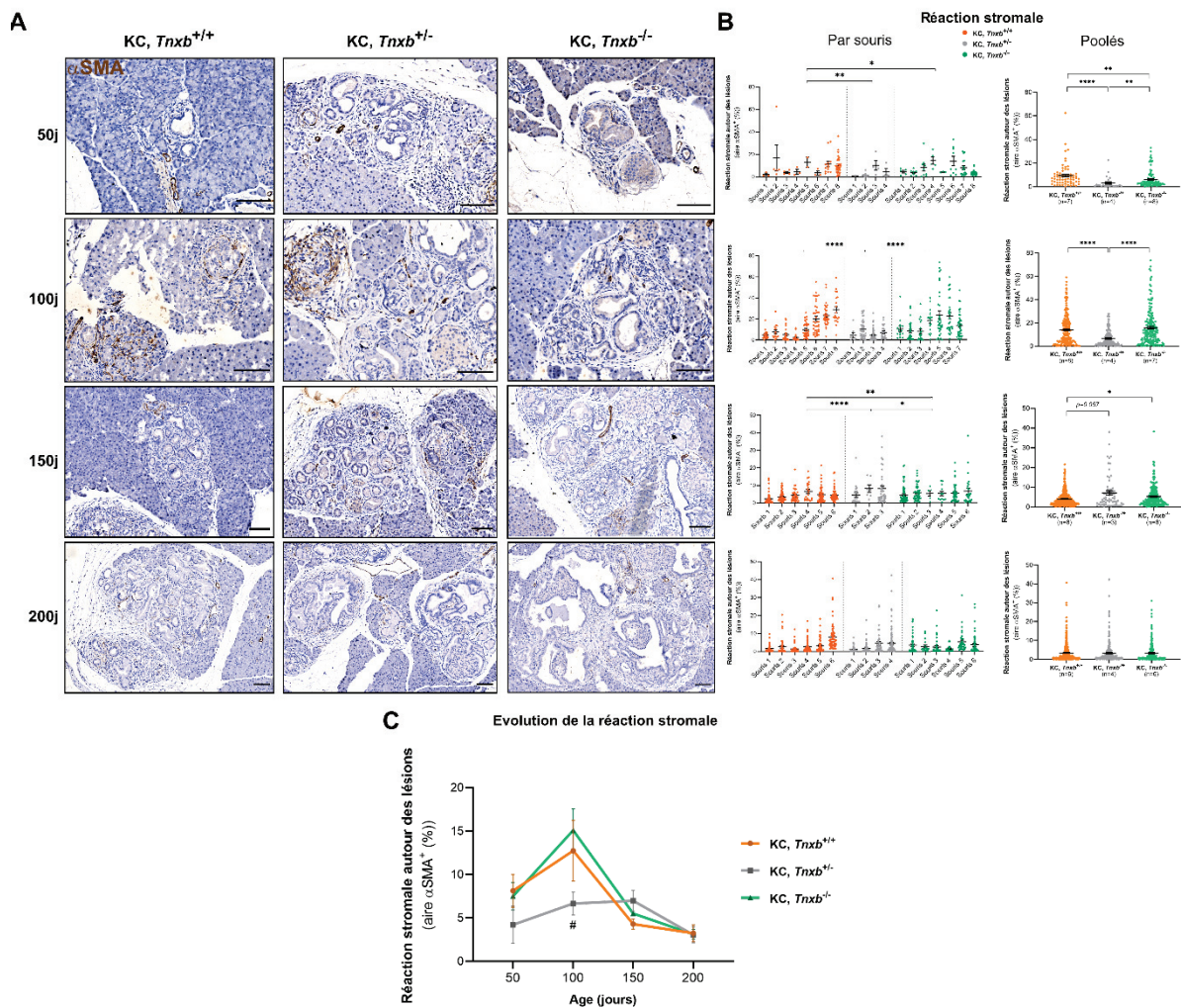


Figure 30 : Analyse de l'activation des fibroblastes (réaction stromale). A : Images représentatives du marquage α SMA (réaction stromale) autour des lésions pancréatiques retrouvées aux différents temps et génotypes, barre d'échelle = 100 μ m. B : Quantification de l'aire occupée par α SMA (marron) autour des lésions, par souris (1 point = 1 lésion) et en regroupant toutes les lésions (des 4 à 8 souris). C : Evolution dans le temps de l'aire de α SMA (réaction stromale) autour des lésions, moyenne des 4 à 8 souris, \pm SEM.

La réaction desmoplastique a également été étudiée par IHC, grâce au marqueur α SMA, qui identifie les CAFs activés et caractérise donc la réaction stromale autour des lésions. De la même manière que pour la fibrose, l'aire α SMA⁺ a été quantifiée autour de chaque lésion par analyse d'image grâce à une macro Fiji. La figure 30 présente le marquage α SMA pour les lésions présentées précédemment (**Figure 30A**) et les différentes manières de représenter les mesures obtenues (**Figure 30B et C**). De nouveau, ces résultats ne sont pas concluants, avec une réaction stromale assez similaire entre les différents génotypes aux temps étudiés. L'analyse en regroupant toutes les lésions donne des résultats statistiquement significatifs mais non cohérents entre les différents jours et avec finalement aucune différence à 200 jours (**Figure 30B**). Il est également à noter que l'évolution du marquage α SMA, *i.e.* de la réaction stromale, est intrigante, tous génotypes confondus. Elle semble en effet plus importante dans les souris à 50 et 100 jours, avant de diminuer à 150 et 200 jours (**Figure 30C**). En outre, lors de l'analyse lésion par lésion, j'ai pu constater que la réaction stromale était très variable, et que finalement peu de lésions présentaient un fort marquage α SMA, ce qui questionne le modèle utilisé. Cet aspect sera abordé par la suite, dans une discussion concernant le choix du modèle.

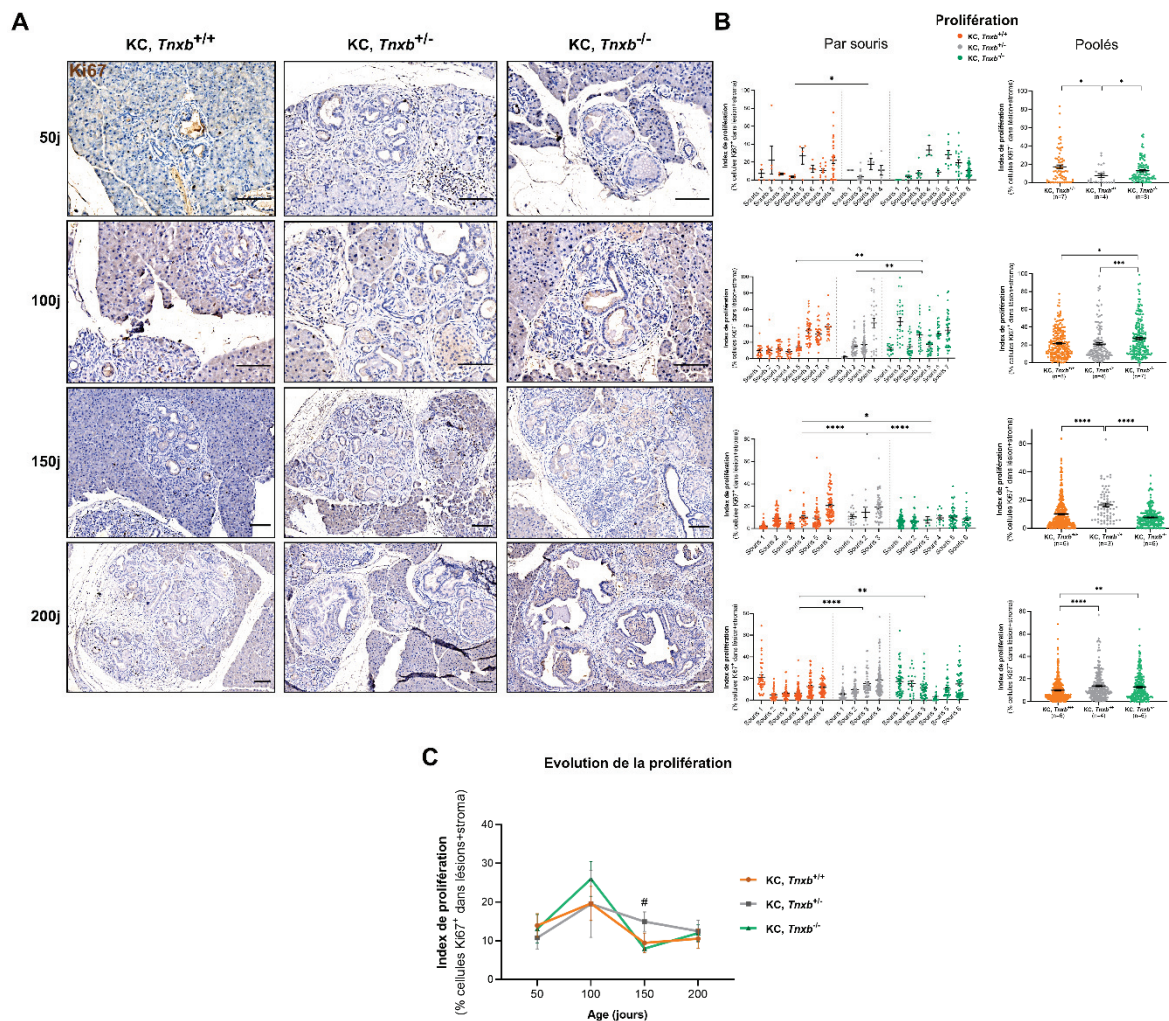


Figure 31 : Analyse de la prolifération. A : Images représentatives du marquage Ki67 (prolifération) dans les lésions pancréatiques retrouvées aux différents temps et génotypes, barre d'échelle = 100 μ m. B : Quantification du nombre de noyaux Ki67⁺ dans les lésions et leur stroma, par souris (1 point = 1 lésion) et en regroupant toutes les lésions (n=4 à 8 souris). C : Evolution dans le temps du nombre de noyaux Ki67⁺ dans les lésions et leur stroma, moyenne des 4 à 8 souris, \pm SEM.

Enfin, au vu des informations intéressantes tirées des analyses de *Gene Ontology* à propos de la prolifération, j'ai effectué des marquages immunohistochimiques permettant de marquer les cellules en prolifération grâce au marqueur Ki67. La figure 31 présente ces résultats, avec des images représentatives (mêmes lésions que précédemment grâce aux coupes sériées, **Figure 31A**) et la quantification des cellules Ki67⁺ (**Figure 31B et C**). Dans ce cas, après délimitation de chaque lésion, le nombre de noyaux total par lésion ainsi que le nombre de noyaux Ki67⁺ ont été déterminés grâce au logiciel QuPath. De nouveau, les résultats sont présentés par souris ou « poolés » (**Figure 31B**), et en évolution, par analyse globale (moyenne des moyennes des lésions de chaque souris, **Figure 31C**). De manière encore plus marquante ici que pour les autres caractérisations, aucune différence de prolifération entre les souris des différents génotypes n'a pu être mise en évidence. Plusieurs éléments sont cependant à souligner ici, et remettent de nouveau en question ce modèle et cette quantification. D'une part, il apparaît que la prolifération, finalement assez faible dans ces lésions (entre 10 et 20% des cellules), présente également une évolution que je n'attendais pas. En effet, après avoir augmenté entre 50 et 100 jours, elle diminue à 150 et 200 jours, alors que j'imaginai une augmentation progressive de la prolifération au fil de l'évolution des lésions, et donc du temps. En outre, l'index de prolifération correspond ici à la somme des cellules en prolifération dans la partie épithéliale et dans la partie stromale de la lésion. En effet, je n'ai pas pu discriminer de manière correcte et reproductible les 2 compartiments, et n'est donc pas exclu que l'absence de TNX agisse sur la prolifération des cellules du compartiment stromal ou du compartiment épithélial.

De manière générale, aucun phénotype clair n'a donc pu être identifié pour les souris KC;*Tnxb*^{+/-} ou les souris KC;*Tnxb*^{-/-}. Parfois, certains marqueurs présentent une différence en comparaison aux souris KC;*Tnxb*^{+/+}, mais celle-ci ne persiste jamais dans le temps, voire parfois s'inverse, ce qui ne peut nous permettre de statuer de manière robuste sur l'effet de l'absence de TNX sur la carcinogenèse pancréatique.

Au cours de cette étude *in vivo*, nous avons fait face à plusieurs problématiques inhérentes à l'expérimentation animale. En effet, j'ai pu observer une variabilité importante entre les différentes souris, pourtant de même génotype et âge, et hébergées dans la même animalerie. Cela est particulièrement notable lorsque l'on analyse des graphes par souris. Il est assez intéressant de voir que vers la fin de l'étude les valeurs sont globalement plus importantes pour les marqueurs Ki67 et α SMA, mais uniquement pour les souris KC, observation que je ne saurais expliquer. Plusieurs mesures ont pourtant été prises afin de limiter ces effets. D'une part, toutes les IHC et colorations ont été faites dans une fenêtre de temps assez courte, et non au fur et à mesure de l'obtention des souris. Cela nous a de plus permis de faire les expériences sur les trois génotypes en parallèle (au sein d'un même jeu d'expérimentation).

En outre, j'ai pu observer plusieurs souris dont le pancréas était particulièrement altéré, sans raison évidente. Afin d'éliminer tout effet de développement potentiel de tumeur thymique (qui semble accélérer la carcinogenèse pancréatique) après le temps de mise à mort, j'ai génotypé les thymus de toutes les souris de ma cohorte, et éliminé les souris pour lesquelles une recombinaison de la cassette STOP en amont de *Kras*^{G12D} avait eu lieu dans le thymus (trois souris : deux KC;*Tnxb*^{+/-} à 50 et 150 jours, et une KC;*Tnxb*^{-/-} à 100 jours). Cela n'a cependant pas enlevé toutes les souris présentant un pancréas particulièrement atteint, ce qui indique que cette variabilité doit être due à d'autres facteurs, environnementaux ou intrinsèques à ces souris.

Enfin, des résultats non publiés du laboratoire semblent indiquer que les souris *Tnxb*^{-/-} utilisées ici présentent un taux de TGFβ circulant (dans le sérum) plus important que les souris *Tnxb*^{+/+}. Connaissant le rôle très important du TGFβ dans la carcinogenèse en générale, et notamment dans l'ADKP, il pourrait y avoir ici un biais, notamment sur la prolifération. En effet, alors que le TGFβ entraîne la cytotase (inhibition de la prolifération cellulaire) dans les premiers stades de carcinogenèse, la TNX est également suspectée d'inhiber la prolifération cellulaire, selon nos résultats bioinformatiques. Ainsi, alors que nous attendions un taux élevé de prolifération dans les souris KC;*Tnxb*^{-/-}, il se pourrait que celle-ci ait été partiellement effacée par l'effet du TGFβ. Il n'est donc pas exclu que l'effet de l'absence de TNX soit compensé par d'autres processus ou potentiellement par l'expression d'autres protéines de la matrice. Ainsi, les Ténascines présentant des fonctions communes, nous pouvons supposer que la perte induite de TNX pourrait être compensée par la surexpression d'autres Ténascines, qu'il faudrait mettre en évidence. J'ai profité de la génération de ma cohorte pour collecter de nombreux tissus, autres que le pancréas et j'ai notamment collecté le sérum des souris. Il sera ainsi facile d'étudier finement la sécrétion de TGFβ dans le sérum, mais aussi la présence de fragments de collagène qui peuvent être libérés et alimenter la tumeur pancréatique (Olivares *et al.*, 2017).

Enfin, l'analyse menée ici est une analyse en cinétique. Cependant, dans les pancréas collectés aux différents temps, un large spectre de lésions est présent, de l'ADM à des PanINs de plus haut grade, ce qui pourrait gommer l'effet de l'absence de TNX, du fait du dépôt dynamique de TNX observé dans les souris KC;*Tnxb*^{+/+}. Malheureusement, une gradation a été effectuée sur les lésions sériées analysées, mais la comparaison des différents génotypes selon l'avancement des lésions n'a pas donné plus de résultats (données non montrées).

Finalement, ces résultats, bien que décevants, soulèvent de nombreuses questions. Bien sûr, le rôle oncosuppressif de la TNX reste à démontrer, ce qui pourra d'abord être fait *in vitro*, dans un modèle que j'ai mis au point au cours de ma thèse et qui sera présenté par la suite. Ils nous invitent également à nous questionner sur le choix du modèle utilisé lors d'une étude *in vivo*, et sur le design expérimental, qui auraient pu être différents ici, *a posteriori*. Par ailleurs, des effets indésirables sont parfois observés *in vivo*, ce qui fut le cas dans ce modèle d'expression de *Kras^{G12D}* sous le contrôle du promoteur *Pdx1*. Ces artefacts expérimentaux qui n'avaient jamais été décrits jusqu'à présent, ont notamment interféré avec l'interprétation des résultats préliminaires de cette étude. Le modèle murin, bien qu'étant un outil puissant, est donc un modèle sensible, qui doit être utilisé avec précautions.

III. L'importance du choix des modèles

Dans la conception de travaux de recherche, le choix des modèles est primordial pour répondre à la question posée. C'est ce que j'ai pu apprendre au cours de cette thèse, avec un effet indésirable observé *in vivo*, d'une part, et des résultats surprenants et qui refondent les idées préconçues, d'autre part. Dans cette partie, les résultats du troisième article de ce manuscrit de thèse seront discutés, ainsi que le choix initial du modèle murin. En outre, un modèle organotypique *in vitro* mis en place pendant cette thèse sera présenté.

A. Observation d'un effet indésirable dans le modèle génétiquement modifié utilisé

1. 10% des souris KC développent une masse thymique

Au cours de l'établissement de ma cohorte de souris KC déficientes ou non en TNX, nous avons suivi le poids et les signes de souffrance des souris dans le respect des bonnes pratiques en expérimentation animale. Ainsi, toutes les souris dont le pancréas allait être collecté à 150 et 200 jours ont été pesées à partir de 100 jours post-parturition (temps à partir duquel le poids devient stable). De manière surprenante, certaines souris se sont subitement mises à perdre beaucoup de poids (jusqu'à 4 grammes en 1 semaine), et à développer des signes de souffrance respiratoire, la plupart du temps entre 120 et 150 jours. Face à ces alertes, nous avons donc dû mettre à mort ces souris avant la date définie. A la dissection, elles présentaient toutes une très grosse masse thymique, souvent associée à un écrasement des poumons, du cœur et de l'œsophage pouvant expliquer les symptômes. Nous avons également retrouvé une telle masse dans une souris n'ayant présenté aucun signe avant-coureur, à 100j post-parturition.

Nous avons commencé l'étude *in vivo* décrite précédemment dans une animalerie située assez loin du laboratoire (ALECS, site de Laennec), et avons donc tenté, en début de thèse, de redévelopper la lignée dans une animalerie plus proche (PBES, ENS de Lyon).

Malheureusement, suite à la collecte des pancréas provenant des souris du PBES, nous avons observé que la pénétrance des lésions n'était pas la même que celle observée dans les pancréas provenant de souris élevées à ALECS, et était donc influencée par l'environnement. Nous avons donc décidé de ne pas poursuivre cette deuxième cohorte, et d'analyser uniquement les souris générées à ALECS. En revanche, parmi les souris nées au PBES, plusieurs ont aussi développé des signes similaires à ceux décrits précédemment, avec développement d'une masse thymique. Cette manifestation ne semble donc pas due à l'environnement, mais bien à un problème intrinsèque aux souris.

Ainsi, à la fin de l'étude *in vivo*, nous avons dénombré le nombre de souris atteintes par ce problème comme suit (**Tableau 9**), et avons montré que l'incidence est située autour de 10%, ce qui n'est pas négligeable. Il est à noter que ce phénomène ne semble pas restreint à un seul génotype, et ne semble donc pas mettre en jeu la TNX.

	Sans les souris provenant du PBES			Avec les souris provenant du PBES		
	KC;Tnxb ^{+/+}	KC;Tnxb ^{-/-}	Toutes les souris (avec KC;Tnxb ^{+/+})	KC;Tnxb ^{+/+}	KC;Tnxb ^{-/-}	Toutes les souris (avec KC;Tnxb ^{+/+})
Souris présentant une masse thymique	4	3	7	5	4	9
Nombre total de souris étudiées	32	31	80	38	34	89
Incidence (%)	12,5	9,7	8,8	13,2	11,8	10,1

Tableau 9 : Calcul de l'incidence des souris présentant une masse thymique à la dissection, avec inclusion ou non des animaux développés au PBES, et selon le génotype des souris.

Ces observations ont été décrites dans le troisième article de ce manuscrit de thèse, dans lequel nous avons tenté (1) de comprendre le développement de ces masses thymiques et (2) d'en décrire les effets associés. En effet, nous ne pouvions pas ne pas signaler cet effet indésirable qui peut être manqué si la dissection ne va pas jusqu'à l'ouverture de la cage thoracique.

2. Hypothèses sur le(s) mécanisme(s) pouvant mener aux tumeurs thymiques

De prime abord, mon hypothèse était que des cellules épithéliales thymiques pourraient exprimer le gène *Pdx1* de manière transitoire, afin d'éduquer les lymphocytes à ne pas agir contre les antigènes du soi (rôle premier du thymus). Dans cette idée, l'expression de *Pdx1* entraînerait l'activation transcriptionnelle de l'oncogène *Kras* muté, à l'origine des masses thymiques observées, avec une incidence « faible » car l'expression serait transitoire. Cependant, les expériences menées par la suite semblent indiquer une autre possibilité. En effet, nous avons histologiquement suggéré que ces masses thymiques pourraient se rapprocher de lymphomes thymiques avancés, avec une forte quantité de lymphocytes présents, et une désorganisation de l'organisation tissulaire (perte du cortex) (Pearse, 2006), mais cela reste cependant à confirmer par immunomarquage CD45 (cellules immunitaires),

CD3 (lymphocytes T) ou CK19 (cellules épithéliales), par exemple. En outre, nous avons procédé à une PCR permettant de mettre en évidence la recombinaison au niveau de la cassette STOP présente en amont de l'allèle muté *Kras*^{G12D}. Nous avons ainsi montré que cette recombinaison a lieu dans les tumeurs thymiques (et pas dans les thymus normaux), et de manière totale (pas ou très peu de bandes correspondant à l'allèle possédant encore la cassette STOP). Cela a été confirmé par immunomarquage de KRAS^{G12D} qui a révélé que la plupart des cellules présentes dans ces masses thymiques exprimaient l'oncogène muté. Ainsi, il semble que les lymphocytes, prédominants dans les masses thymiques observées, expriment aussi l'oncogène *Kras* muté, ce qui ne colle pas avec l'hypothèse initiale.

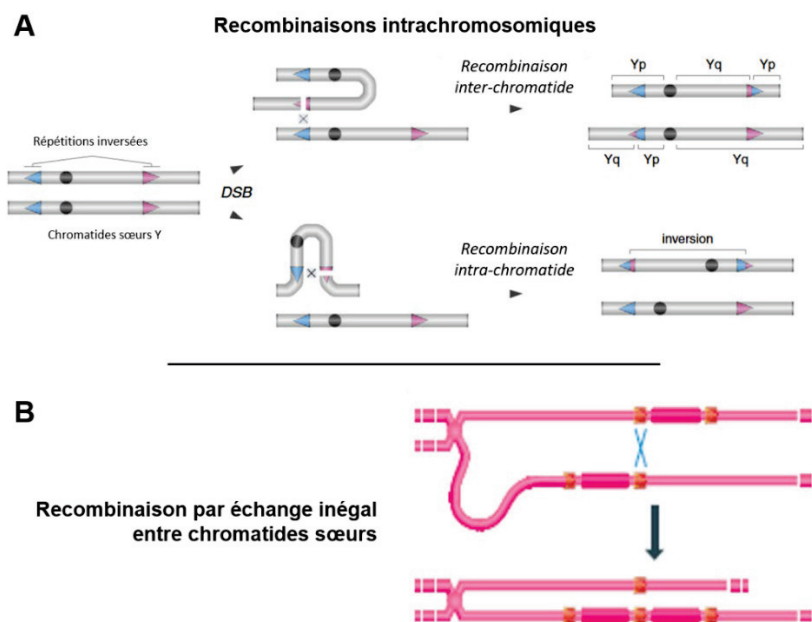


Figure 32 : Schéma explicatif des recombinaisons intrachromosomiques (A, modifié de (Lange et al., 2013)) et par échange inégal de chromatide sœurs (B, <https://sciknowledge.wordpress.com/2013/01/06/genome-evolution>)

Le modèle de souris *Kras*^{G12D} a été mis au point en 2001, d'abord sans la séquence Lox-STOP-Lox, modèle qui permettait de déterminer les organes enclins à des recombinaisons sporadiques de type recombinaison intrachromosomique ou échange inégal de chromatides sœurs (**Figure 32**), après injection de cellules ES contenant une ou deux version(s) mutée(s) de l'oncogène *Kras* dans des blastocytes de souris C57bl6 (Johnson et al., 2001). Le développement de tumeurs a été suivi dans ces souris chimères et a montré que celles-ci développaient des tumeurs pulmonaires (100%), accompagnées de lymphomes thymiques (20 à 50% en présence d'un ou deux allèles *Kras*^{G12D} exprimés, respectivement) et de papillomes (environ 25%). Ainsi, les auteurs ont conclu que les poumons, le thymus et la peau étaient des organes enclins à la recombinaison sporadique de *Kras*^{G12D}, et étaient sensibles à

cette mutation. La susceptibilité du compartiment immun, et notamment des lymphocytes, à l'expression de l'allèle *Kras*^{G12D}, a de plus été montrée plus récemment, dans un modèle de transplantation de cellules de moëlle osseuse exprimant *Kras*^{G12D} (Kindler *et al.*, 2008). En effet, les souris transplantées ont montré une augmentation de la taille de leur thymus ainsi que du poids de leur rate (dont nous avons aussi noté l'augmentation de taille associée au développement d'une masse thymique).

Le modèle *Lox-STOP-Lox-Kras*^{G12D} (*LSL:Kras*^{G12D}) a également été créé en 2001, et permet l'induction de la recombinaison de la cassette STOP de manière contrôlée par la CRE recombinase, entraînant l'expression de l'oncogène *Kras* muté (Jackson *et al.*, 2001). Cette lignée murine a ensuite été utilisée pour la mise en place du modèle KC par Hingorani et collègues, en 2003, modèle d'expression conditionnelle de l'oncogène *Kras* muté (*Kras*^{G12D}) sous le contrôle du promoteur *Pdx1* (Hingorani *et al.*, 2003).

Comme discuté dans le troisième article ma thèse, 10% des souris KC que nous avons générées ont développé des tumeurs de type lymphomes thymiques, ce qui ne saurait que rappeler les observations de Johnson et collaborateurs. Nous avons également retrouvé de nombreuses souris ayant développé des papillomes, souvent sans conséquence. En outre, certaines souris présentant une tumeur thymique ont aussi révélé des amas cellulaires très prolifératifs dans le poumon, positifs pour *KRAS*^{G12D}, évoquant une recombinaison dans le poumon également. La nature métastatique (provenant du pancréas) de ces amas a été écartée par le fait que les cellules n'expriment pas CK19, que leur morphologie était éloignée de celle de l'ADKP et que leur présence et leur sévérité n'étaient pas corrélées à l'étendue des lésions pancréatiques. Ces observations semblent conforter l'hypothèse d'une recombinaison sporadique entraînant l'expression de l'allèle *Kras*^{G12D}. Cependant, l'hypothèse d'une expression ectopique du gène *Pdx1* (et donc de la recombinase CRE) n'est pas encore exclue. En effet, outre le pancréas et le duodénum, le gène *Pdx1* serait exprimé dans la peau, ce qui pourrait aussi expliquer le développement fréquent de papillomes (Mazur *et al.*, 2010). En revanche, pour l'heure, aucune preuve de l'expression de *Pdx1* dans le thymus n'a été apportée (Brimnes *et al.*, 2002; Noso *et al.*, 2010). Parmi les bases de données existantes concernant l'expression de gènes/protéines dans les tissus (*GTex*, *The Human Protein Atlas*, *GeneCards*, *Ensembl*, etc), aucune ne mentionne l'existence d'une telle expression, bien que le thymus soit souvent absent des analyses. En complément de ce travail, il serait donc intéressant de détecter l'expression de *Pdx1* dans les thymus normaux et les tumeurs thymiques, afin de pouvoir conclure entre une recombinaison sporadique ou induite par l'expression de la CRE recombinase sous le contrôle du promoteur *Pdx1*. Cependant, cette expression pourrait être très transitoire et donc complexe à mettre en évidence.

3. Les tumeurs thymiques observées sont associées à une accélération de la carcinogenèse pancréatique

En conséquence du développement de ces tumeurs thymiques, nous avons mis en évidence que les pancréas de ces souris étaient plus atteints que ceux des souris ne présentant pas de problème au niveau du thymus. En effet, l'aire totale occupée par les lésions est augmentée, et les lésions paraissent plus avancées. Le développement d'un lymphome thymique subséquent à la recombinaison de *Kras*^{G12D} dans le thymus semble donc influencer sur la prédisposition au cancer du pancréas, en accélérant la progression des lésions pré-tumorales. L'hypothèse émise ici serait un déséquilibre immunitaire qui pourrait modifier le stroma tumoral et le rendre plus permissif (absence d'un système immunitaire suppresseur de tumeur en début de carcinogenèse?). Dans ces pancréas, nous n'avons pas noté d'aberration en termes d'expression de l'oncogène muté. En effet, KRAS^{G12D} est présent dans les îlots, dans les lésions pré-tumorales, comme attendu au regard de l'expression du gène *Pdx1* dans les îlots de Langherans, les canaux et faiblement dans les acini à l'état physiologique (Melloul, Marshak and Cerasi, 2002; Hingorani *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2011), ainsi que dans les lésions précurseurs d'ADKP (Park *et al.*, 2011). De manière intéressante, les acini à proximité des lésions et semblant entrer en métaplasie se sont également révélés positifs pour KRAS^{G12D}, suggérant que l'expression de *Pdx1* pourrait être induite par la présence de lésions adjacentes.

Cette analyse approfondie indique qu'il faut être prudent lors de l'utilisation du modèle KC, et des modèles animaux génétiquement modifiés en général. Il nous paraissait important de ne pas occulter les résultats présentés ici, et d'en faire une publication, afin que cet effet indésirable, qui peut être manqué si la dissection n'est pas poussée jusqu'à la cage thoracique, soit connu. A notre échelle, ce biais expérimental a faussé la cohorte pilote et le design de l'étude *in vivo* menée au cours de ma thèse, et pourrait donc affecter les résultats de nombreuses études. Comme précédemment indiqué, j'ai aussi analysé la recombinaison de *Kras*^{G12D} dans les thymus de toutes les souris de la cohorte, et mis en évidence 3 souris supplémentaires que j'ai éliminées dans l'étude *in vivo* de carcinogenèse pancréatique, dans lesquelles l'oncogène *Kras* muté était exprimé dans le thymus, ce qui pourrait influencer sur la cinétique de carcinogenèse pancréatique.

B. Un modèle adapté ?

Outre le problème de développement de lymphomes thymiques, le modèle que nous avons utilisé pour cette étude pourrait ne pas être adapté au mécanisme étudié. Initialement, cette étude *in vivo* a été basée sur deux résultats : (1) la perte de TNX dans les échantillons tumoraux humains, et (2) les résultats de survie et histologiques obtenus lors de la cohorte pilote, qui semblaient montrer un phénotype assez clair de l'absence de TNX sur l'avancée des lésions avec une médiane de survie des souris déficientes en TNX autour de 190 jours. Ainsi, nous avons conservé le même modèle que précédemment établi et avons défini des points de cinétique autour de cette médiane de survie. Par ailleurs, ce modèle KC d'évolution lente des lésions de type PanINs aurait pu nous permettre d'identifier un rôle précoce de la TNX suggéré par l'absence de TNX dans les tumeurs avancées. En mettant en regard les résultats des deuxième et troisième articles de ce manuscrit et les résultats obtenus *in vivo*, ces bases semblent discutables.

En effet, j'ai mis en évidence dans le deuxième article de ce manuscrit de thèse que le dépôt de TNX était dynamique au cours de la carcinogenèse, et non pas progressivement diminué. Ainsi, alors que nous avons choisi le modèle KC car nous voulions étudier les étapes précoces de la carcinogenèse, cette dynamique suggère maintenant que la TNX pourrait avoir un rôle d'inhibition de la transformation maligne et de l'agressivité des lésions, qui auraient des conséquences plus tardives, au moment du passage de PanIN à ADKP. Or, dans le modèle KC, très peu de souris développent un ADKP (<10%) et dans un temps très long (>1 an). L'idée d'étudier la cinétique de dépôt de la TNX était présente tout au long de ma thèse, et dès le début du projet. Cependant, il a fallu du temps pour trouver un anticorps anti-TNX qui reconnaisse la glycoprotéine murine, et pour mettre au point les conditions d'immunomarquage. Ainsi, ce n'est que ces derniers mois que j'ai obtenu ces résultats, finalement très primordiaux pour le design même de l'étude.

En outre, dans la cohorte pilote, certaines souris prises en compte avaient également développé une tumeur thymique, qui, comme montré dans le troisième article de cette thèse, semble être associée à une accélération de la carcinogenèse pancréatique. Cette cohorte pourrait donc avoir été compromise par ce biais expérimental qui n'était alors pas décrit dans la littérature, et a modifié la courbe de survie (et donc la cinétique d'étude) de manière non négligeable.

Enfin, le modèle KC présente certains inconvénients connus mais qui pourraient aussi avoir gêné cette étude *in vivo*. D'une part, le modèle KC sous le contrôle du promoteur *Pdx1* entraîne une expression de *Kras*^{G12D} dès le stade prénatal, et empêche l'identification des cellules à l'origine des lésions. En conséquence, nous avons observé des lésions très variables, avec des origines sûrement différentes. Au vu de la réaction tissulaire et du dépôt de TNX autour des acini en métaplasie (renforcement autour de chaque acinus) qui semble différent de celui autour des canaux hyperplasiques (fine couche de matrice), il se pourrait que l'effet

de la TNX soit différent selon le type et l'origine des lésions. D'autre part, dans une étude sur le développement des lésions dans le modèle KC sous le contrôle du promoteur *Ptf1a*, Aichler et collaborateurs ont montré que la prolifération et la réaction stromale étaient relativement faibles dans les lésions de type PanINs développées par ce modèle murin, comparativement aux PanINs humains (Aichler *et al.*, 2012). En revanche, ils ont souligné une forte prolifération au niveau de lésions dérivées d'ADM (qu'ils appellent « atypical flat lesions »), que j'ai pu observer également. En effet, dans ma cohorte, j'ai remarqué une évolution étonnante de la prolifération, avec un pic maximal à 100 jours puis une diminution, qui peut être liée à l'occurrence de l'ADM en début de cinétique. En outre, j'ai observé un nombre relativement faible de lésions positives pour α SMA, ce qui semble cohérent avec les travaux d'Aichler et collègues. Ainsi, les caractéristiques des lésions dans le modèle KC-*Ptf1a* semblent se retrouver dans le modèle KC-*Pdx1*, et pourraient corroborer les propos exposés ci-dessus. Enfin, l'analyse des biomarqueurs de la carcinogenèse pancréatique semble indiquer que Ki67, marqueur de prolifération que j'ai utilisé dans cette étude, soit plutôt un marqueur des PanINs de haut grade, peu fréquents dans le pancréas de souris KC (promoteur *Pdx1*) (Guo, Xie and Zheng, 2016). Ayant mis en évidence que la TNX pourrait avoir un effet sur la prolifération cellulaire, il semble donc complexe de valider expérimentalement ce résultat de bioinformatique avec le modèle *in vivo* KC, et le choix du marqueur Ki67 semble désormais moins pertinent. Enfin, la cinétique d'évolution des lésions de type PanINs dans le modèle KC a été peu décrite dans la littérature, les auteurs se basant souvent à un time-point précis. Cela me donne donc peu de point de comparaison afin de valider la bonne quantification et caractérisation des lésions observées au cours de mon étude.

Ainsi, entre la cinétique que nous avons suivie et la latence et les inconvénients du modèle KC, il est possible que celui-ci ne permette pas de mettre en évidence le rôle de la TNX au cours de la carcinogenèse pancréatique, qui pourrait être subtil et ne pas donner un phénotype fort. Dans la suite de ce projet, il serait pertinent d'établir une nouvelle cohorte de souris qui progressent plus rapidement en ADKP, par exemple les souris KPC (qui conduisent à la formation d'ADKP invasif et métastatique dans 100% des souris en quelques mois). Cette cinétique rapide permettrait aussi de faciliter la génération de données robustes et convaincantes sur le temps d'une thèse et d'analyser l'évolution des lésions pancréatiques en présence ou en absence de TNX.

Finalement, nous avons mis en évidence ici que la TNX n'influe pas sur l'apparition et les premières étapes de la carcinogenèse pancréatique, et que les patients souffrant d'une délétion du gène *TNXB* (et manifestant un Syndrome d'Ehlers-Danlos classical-like) ne devraient pas présenter un plus fort risque de développement d'un ADKP. Le rôle potentiellement oncosuppressif de la TNX reste à être entièrement démontré, ce qui pourrait également être fait dans un modèle *in vitro*.

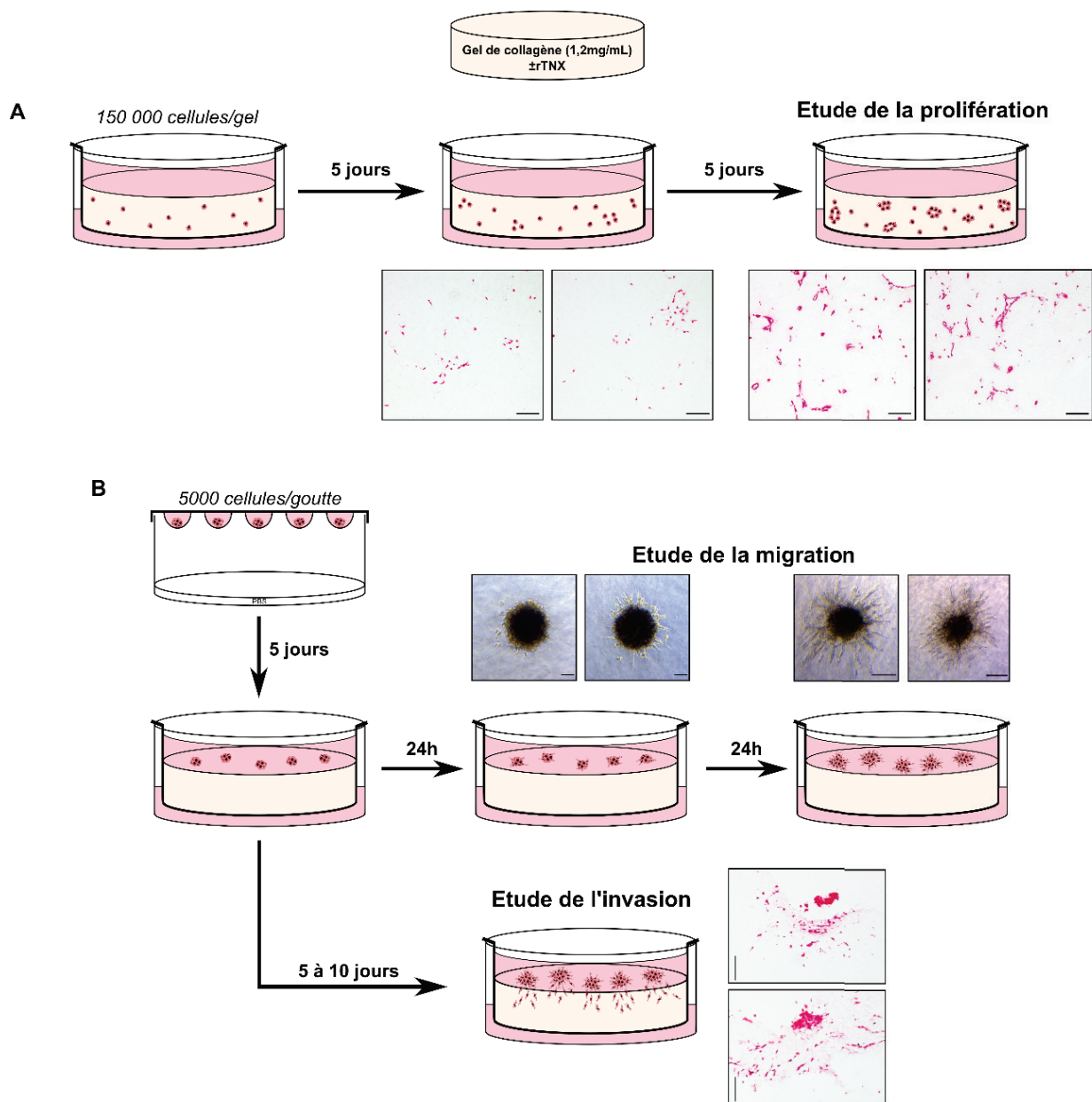


Figure 33 : Mise au point d'un modèle organotypique pour l'étude in vitro du rôle de la TNX sur des cellules tumorales pancréatiques. A : Protocole et résultats pour l'étude de la prolifération. B : Protocole et résultats pour l'étude de la migration et de l'invasion. Les gels de collagènes ne sont pas ici supplémentés en rTNX mais pourront l'être par la suite. Barre d'échelle = 100 μ m.

C. Mise en place d'un modèle organotypique *in vitro* pour l'étude en 3D du rôle de la TNX sur des cellules tumorales pancréatiques

Au cours de cette thèse, un dernier axe était prévu afin de montrer *in vitro* le rôle oncosuppressif de la TNX, dans le but de présenter la TNX comme un potentiel outil thérapeutique. Mon plan de thèse était ambitieux et j'ai rencontré différents verrous scientifiques présentés précédemment qui ont modifié la physionomie de cette thèse. Par ailleurs, cette partie *in vitro* a été parsemée de différents problèmes expérimentaux qui sont exposés ci-après. Je n'ai donc pu réaliser que la mise au point du modèle *in vitro* qui sera, je l'espère, utilisé par la suite.

L'étude des protéines de la MEC, dont l'aspect tri-dimensionnel est particulièrement important, nécessite l'utilisation de modèles dits organotypiques (Herrmann *et al.*, 2014). Dans ces modèles, les cellules sont cultivées dans ou sur des matrices reconstituées, le plus souvent des gels de collagène de type I ou du Matrigel, mélange de protéines gélatineuses sécrétées par des cellules de sarcome, se rapprochant de la composition de la lame basale. Le rôle architectural de la TNX dans l'espacement des fibres de collagène souligne également l'intérêt de se placer dans un modèle en trois dimensions, et il semblait donc essentiel de nous placer en gel de collagène de type I pour l'étude des effets cellulaires de la TNX *in vitro*. Dans le laboratoire, d'anciennes études non publiées avaient montré que la migration de cellules HT1080 était diminuée dans des gels de collagène de type I supplémentés en TNX. Malheureusement, ces résultats n'ont pu être reproduits récemment, et j'ai donc dû revoir le modèle utilisé pour mon étude.

Sur cette base, ainsi que grâce aux données de *Gene Ontology* présentées dans le deuxième article de ce manuscrit, j'ai donc construit 2 modèles *in vitro*, permettant d'étudier le rôle de la TNX sur la prolifération, d'une part, et sur la migration et l'invasion cellulaire, d'autre part (**Figure 33**). Ces modèles sont le résultat de la combinaison de modèles préexistants dans la littérature (Froeling, Marshall and Kocher, 2010; Coleman, 2014; Zeeberg *et al.*, 2016; Puls *et al.*, 2017) et de tentatives successives (composition des gels, dispositifs, *etc*). Les protocoles finaux sont présentés en **Annexe 1**.

Afin d'analyser la prolifération cellulaire, des cellules tumorales pancréatiques (lignée PANC-1) sont incluses dans un gel de collagène de type I à 1,2mg/ml coulé dans un insert et qui polymérise à 37°C. Une fois polymérisé, le gel est placé dans un puit contenant du milieu complet (DMEM, 10% SVF) et est également recouvert de milieu complet. Après 10 jours de culture (avec changement de milieu tous les 2 à 3 jours), les gels sont fixés puis déshydratés rapidement pour être ensuite inclus en paraffine et coupés afin de procéder à une coloration H&E classique. Cette coloration ne permet de distinguer que les cellules (le gel n'est pas ou

peu coloré), mais malheureusement, les autres colorations essayées (Trichrome de Masson, Bleu de toluidine), qui permettent normalement de colorer le collagène, n'ont pas fonctionné sur ces gels. Un schéma du protocole, ainsi que des photos des résultats que j'ai pu obtenir sont présentés en **Figure 33A**.

Ce protocole est difficile à reproduire. En effet, je n'ai pour l'instant réussi à l'appliquer qu'une seule fois avec le résultat présenté en figure 33A. Lors de cet essai, les cellules se sont regroupées et ont formé des structures, qui parfois peuvent ressembler à des « canaux », avec une lumière au centre, qui pourraient retranscrire la physiopathologie *in vivo*. Dans d'autres essais, la modification de la durée de la culture et/ou du nombre initial de cellules par gel n'ont pas permis de retrouver un tel résultat, avec des cellules qui restaient isolées. Ainsi, cette technique n'est pas encore à 100% reproductible au laboratoire, et devra encore être validée, mais elle représente une bonne perspective pour l'étude de la prolifération cellulaire, par un marquage Ki67 sur les coupes de gel, par exemple. En revanche, elle rend complexe la co-culture avec d'autres types cellulaires (fibroblastiques, par exemple), qui ne se distingueraient pas bien sans marquage spécifique.

L'analyse de la migration cellulaire a nécessité plus de mise au point. En effet, le protocole initial (consistant à déposer des cellules en monocouche sur un gel de collagène) et ayant été mis au point il y a plusieurs années au laboratoire n'est plus reproductible. Je me suis donc intéressée à d'autres manières de pouvoir étudier la migration et l'invasion cellulaire *in vitro*. L'étude de la littérature m'a finalement poussée à considérer un modèle sphéroïde, combiné à un modèle organotypique (Moutasim, Nystrom and Thomas, 2011; Shoval *et al.*, 2017; Lim, Kang and Lee, 2020). En effet, les cellules d'un sphéroïde posé à la surface d'un gel de collagène du type I vont avoir tendance à s'échapper du sphéroïde, par migration à la surface du gel puis par invasion du gel. J'ai donc formé des sphéroïdes par la technique de « *hanging-drop* » (ou goutte suspendue), qui permet de cultiver les cellules (lignée PANC-1) hors plastique, de manière à ce qu'elles soient jointives entre elles. Après 5 jours, les sphéroïdes ont été ensemencés sur des gels de collagène de type I à 1,2mg/ml (même protocole pour l'étude de la prolifération) qui ont été placés dans des puits contenant du milieu complet et recouverts de milieu sans sérum, afin d'induire l'invasion du gel, et laissés en culture pendant 10 jours. Il est ainsi possible (1) d'analyser indirectement la migration cellulaire en quantifiant l'étendue des sphéroïdes à 24 et 48h post ensemencement, sans arrêt de la culture, et (2) d'analyser l'invasion des cellules dans le gel après fixation, inclusion en paraffine, coupe et coloration (H&E) du gel, après 10 jours de culture (**Figure 33B**). Les résultats présentés montrent bien l'échappement des cellules des sphéroïdes à 24 et 48h, ainsi que la pénétration des cellules dans le gel (invasion) après 10 jours de culture.

La limite de ce modèle reste cependant la difficulté à trouver le bon nombre de sphéroïde à ensemercer. En effet, si ce nombre est trop grand, les sphéroïdes se touchent, empêchant ainsi une bonne analyse de la migration des cellules sur le gel. En revanche, si ce nombre est trop faible, il devient alors très complexe de retrouver des sphéroïdes lors de la coupe au microtome, après inclusion du gel en paraffine. En outre, ce modèle ne fonctionne pas avec toutes les lignées tumorales pancréatiques. En effet, j'ai essayé ce protocole avec trois lignées différentes : BxPC-3, très épithéliales, MiaPaCa-2, plutôt mésenchymateuses, et PANC-1, de phénotype intermédiaire. Alors que des sphéroïdes bien ronds sont formées par les cellules BxPC-3, et presque aussi bien par les cellules PANC-1, il est impossible de former des sphéroïdes avec les cellules MiaPaCa-2, du fait des faibles jonctions cellule-cellule qu'elles établissent (elles forment plutôt un tapis cellulaire concave).

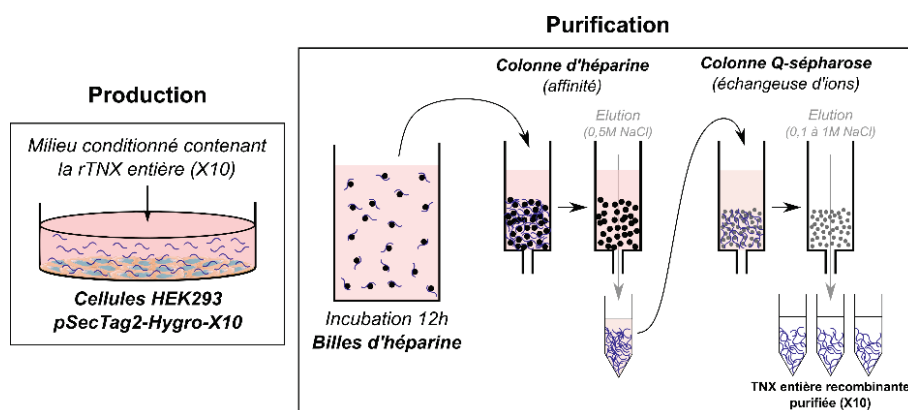


Figure 34 : Protocole de production et purification de la TNX entière recombinante (bovine).

Ainsi, j'ai pu mettre au point deux techniques de culture organotypique qui permettront, à terme, d'étudier les effets cellulaires de la TNX. Cependant, par manque de temps, ces expériences n'ont pu être répétées en nombre suffisant pour les rendre reproductibles (certains gels ne gélifiaient pas parfois, les cellules restaient isolées, etc) et nécessitent donc encore quelques ajustements. En outre, des problèmes de production de TNX recombinante (rTNX) m'ont empêchée de pousser plus loin ces expériences. Au laboratoire, la rTNX est produite par culture à confluence de cellules HEK293 contenant le plasmide de sécrétion de la TNX bovine entière (pSecTag2-Hygro-X10), et récupération des milieux conditionnés (contenant la rTNX) tous les 2 à 3 jours. La rTNX est ensuite purifiée par colonne d'affinité (la TNX est connue pour interagir avec l'héparine) puis les contaminants sont éliminés par colonne Q-sépharose (échangeuse d'ions) (**Figure 34**). Cependant, au cours de ma thèse, la quantité de TNX produite par les cellules, et donc purifiée, était très faible, malgré la sélection en Hygromycine des cellules possédant le plasmide de sécrétion. Des essais de nouvelle transfection se sont de plus soldés par un échec, probablement du fait (1) de la grande taille du plasmide, et (2) des propriétés anti-adhésives de la TNX. En outre, il est à garder en tête que la rTNX que nous produisons est de nature bovine, ce qui ne représente pas le meilleur

modèle pour l'étude de cellules humaines (dans un gel de collagène provenant de rat, de surcroît). Cependant, les TNX recombinantes humaines disponibles dans le commerce ne sont pas de qualité suffisante (~85% de pureté) et présentent une taille de 90kDa contre 450 normalement. Ainsi, je n'ai donc malheureusement pu compléter les gels de collagène de type I en rTNX afin d'étudier son rôle sur des cellules tumorales pancréatiques invasives.

IV. Conclusions

Au cours de ma thèse, j'ai donc pu montrer que la TNX était perdue dans la plupart des tumeurs solides humaines, dont l'ADKP. En outre, j'ai, pour la première fois, montré qu'elle était déposée de manière dynamique au cours de la carcinogenèse pancréatique *in vivo*, dans un modèle murin, dont l'impact sur les cellules (pré)tumoral reste à élucider. Mes travaux de recherche sont donc finalement une ouverture sur de nombreuses questions. En effet, ils suggèrent que différentes matrices puissent être déposées au cours du développement tumoral pancréatique : (1) une MEC de « réaction » tissulaire au dommage qu'est l'apparition de cellules pré-tumorales, et (2) un stroma desmoplasique qui favoriserait la progression tumorale. Cette hypothèse demande à présent de plus amples recherches et caractérisations. De plus, le rôle oncosuppressif de la TNX reste possible mais doit encore être démontré, dans un autre modèle murin, ou *in vitro*, dans un modèle organotypique.

A courts termes, le deuxième papier de ce manuscrit de thèse sera complété par l'étude de coupes de patients présentant des lésions pré-néoplasiques pancréatiques humaines, dans lesquels la TNX, d'autres protéines de la matrice (collagène de type I, élastine, fibronectine) ainsi que Ki67 seront marqués. Ces échantillons de pancréas de patients seront obtenus au travers de la collaboration mise en place avec Valérie Hervieu (HCL).

La perte de TNX devra également être confirmée dans un modèle murin d'ADKP invasif, en collaboration avec Anca Hennino et Philippe Bertolino (CRCL). En outre, d'autres protéines matricielles seront étudiées, afin de les localiser dans les lésions pancréatiques pré-tumorales murines, au regard de la localisation de TNX et de différents types de CAFs. Enfin, une nouvelle tentative de marquage de la prolifération cellulaire sera également effectuée sur les lésions murines, afin de pallier aux problèmes expérimentaux rencontrés.

A plus longs termes, il sera intéressant de déterminer la nature des cellules exprimant la TNX, dans le pancréas sain ainsi que dans les lésions (pré)néoplasiques, dans des échantillons humains et murins. Afin de conclure sur un rôle oncosuppressif de la TNX, et pour pouvoir la proposer comme potentiel outil thérapeutique, il conviendra également de comprendre les effets cellulaires de celle-ci *in vitro*, dans le modèle organotypique mis en place au cours de cette thèse. Par la suite, le rôle oncosuppressif de la TNX pourra de nouveau être questionné *in vivo*, dans un modèle plus invasif, de type KPC, ou par une technique d'injection

orthotopique ou sous-cutanée de cellules tumorales pancréatiques dans des souris déficientes ou non en TNX. Enfin, il sera intéressant de creuser le lien entre TNX et inflammation, notamment dans un modèle de pancréatite.

Finalement, ces travaux de thèse ne sont que le début de la caractérisation d'un phénomène dynamique jusqu'alors inconnu. Ils pourraient participer à mieux comprendre l'implication du stroma, et plus particulièrement de la MEC, au cours de la carcinogenèse pancréatique, et pourraient être généralisables à d'autres types de tumeurs, au vu de la diminution d'expression de TNX que nous avons montrée dans de nombreux cancers.

ANNEXES

ANNEXE 1 - PROTOCOLE DE CULTURE ORGANOTYPIQUE

From (Qu and Konieczny, 2013)

Etude de la prolifération/croissance cellulaire : inclusion de cellules isolées en gel de collagène

1) Préparation du gel de « pré-coating »

Cette fine couche de gel de collagène (à 2,4mg/ml) évite que les cellules allant au fond du gel en cours de gélification par sédimentation n'entrent en contact avec le fond de l'insert

- Mettre tous les réactifs dans la glace avant de commencer (et toujours les garder bien au froid)
- Mélanger les réactifs dans l'ordre indiqué (éviter la formation de bulles à l'ajout du collagène)

Pour 1 fond de gel :

DMEM 10x, 2% NaHCO₃	25µl
Bicarbonate NaHCO₃ 4,2%	25µl
Collagène de type I (rat, 3mg/ml initial) <i>(Gibco A10483-01)</i>	225µl
Vf	275µl

- Couler le gel dans un insert (posé dans une plaque 12 puits)
- Laisser polymériser 1h à 37°C



2) Préparation des cellules (PANC-1) :

- Trypsiner et reprendre les cellules en DMEM 1X, 10%SVF, 1%P/S
- Compter les cellules
- Préparer une suspension cellulaire de manière à avoir 150 000 cellules/250µl (ce qui équivaut à 1 gel)

3) Préparation de la solution de collagène pour ensemencement des cellules

- Mettre tous les réactifs dans la glace avant de commencer (et toujours les garder bien au froid)
- Mélanger les réactifs dans l'ordre indiqué, toujours en glace (éviter la formation de bulles à l'ajout du collagène)

Pour 1 gel :

DMEM 10x, 2% NaHCO₃	25µl
Bicarbonate NaHCO₃ 4,2%	25µl
Collagène de type I (rat, 3mg/ml initial) <i>(Gibco A10483-01)</i>	225µl
Vf	275µl

Ce gel est alors à une concentration en collagène de 2,4mg/ml mais sera ensuite à 1,2mg/ml après mélange avec les cellules

4) Ensemencement

- Mélanger les cellules et la solution de collagène vol:vol (250µl suspension cellulaire : 250µl solution de collagène)
- Couler le gel dans l'insert contenant le gel de « pré-coating »
- Laisser polymériser 1h à 37°C
- Ajouter du milieu complet (DMEM 1X, 10% SVF, 1%P/S) sur le gel (1mL) et dans le puits sous l'insert (2ml)
- Changer le milieu tous les 2 à 3 jours puis fixer et inclure le gel après 10 jours de culture (voir plus loin)

Etude de la migration et de l'invasion : ensemencement de sphéroïdes sur des gels de collagène

1) Préparation des sphéroïdes

- Trypsiner et reprendre les cellules en DMEM 1X, 10%SVF, 1%P/S
- Compter les cellules
- Préparer une suspension cellulaire de manière à avoir 5000 cellules/30µl (ce qui équivaut à 1 goutte). Prévoir environ 24 gouttes par couvercle de boîte de 100mm de diamètre, et 1 à 2 boîtes par gel qui sera ensemencé
- Mettre 5ml de PBS dans le fond d'une boîte 100mm de diamètre
- Déposer des gouttes de 30µl sur l'intérieur du couvercle de la boîte (environ 24 par couvercle)
- Retourner d'un geste rapide le couvercle sur la boîte, vérifier la présence des cellules et laisser dans l'incubateur 5 jours sans toucher

2) J+5 : Préparation du gel de collagène

- Mettre tous les réactifs dans la glace avant de commencer (et toujours les garder bien au froid)
- Mélanger les réactifs dans l'ordre indiqué, toujours en glace (éviter la formation de bulles à l'ajout du collagène)

Pour 1 gel :

DMEM 10x, 2% NaHCO3	25µl
Bicarbonate NaHCO3 4,2%	25µl
Collagène de type I (rat, 3mg/ml initial) (Gibco A10483-01)	225µl
Vf	275µl

- Afin de garder la même composition de gel que pour l'étude de la prolifération, mélanger cette solution vol:vol avec du milieu complet (DMEM 1X, 10% SVF, 1% P/S)
- Couler le gel dans un insert (posé dans une plaque 12 puits)
- Laisser polymériser 1h à 37°C



3) J+5 : Ensemencement des sphéroïdes

- Récupérer les sphéroïdes dans le couvercle en ajoutant 5-6ml de milieu DMEM 1X, 1%P/S dans le couvercle, pencher le couvercle puis aspirer avec une pipette assez large (généralement les pipettes 5ml ou 25ml sont bien)
- Transférer les sphéroïdes dans un falcon 50 et laisser sédimenter. Faire de même avec une deuxième boîte et rajouter les sphéroïdes aux premières. Prévoir 1 falcon 50 par gel.
- Lorsque les sphéroïdes ont sédimené, retirer le milieu et reprendre les sphéroïdes dans 1ml de DMEM 1X, 1% P/S (sans SVF). *Eviter de faire des aller-retours avec la pipette pour ne pas abimer les sphéroïdes, ajouter le milieu dans le falcon puis récupérer tout de suite le tout.*
- Déposer les sphéroïdes sur les gels polymérisés et mettre 2ml de milieu DMEM 1X, 10%SVF, 1% P/S sous chaque insert.

4) J+6 et 7 : Photos à 24 et 48h

- Prendre des photos en contraste de phase a24 et 48h post-ensemencement (*assez rapidement pour ne pas trop perturber la culture*)

5) J+5 à J+15

- Changer le milieu tous les 2-3 jours
- Fixer et inclure le gel après 10 jours de culture (voir ci-dessous)

Fixation et inclusion des gels

- Fixer les gels en PFA 4% pendant 1 nuit à 4°C. *Il est possible d'ajouter de l'éosine dans le PFA afin de mieux distinguer les gels, cependant cette coloration disparaît pendant la déshydratation pré-inclusion*
- Décoller les gels des inserts (en coupant la membrane au fond) et les mettre en cassette
- Procéder à une déshydratation comme suit
 - o 2 rinçages rapides en PBS 1X
 - o 5min en H₂O milliQ
 - o 15min en EtOH 30%
 - o 15min en EtOH 50%
 - o 15min en EtOH 70%. *Les gels peuvent être conservés à 4°C à cette étape*
- Passage en HISTO 55, en suivant le programme 1mm – Up to 55 cassettes – EtOH-Isoprop
 - o 10 min EtOH 95%
 - o 16min EtOH 100%
 - o 16min EtOH 100%:Butanol (vol:vol)
 - o 16min Butanol
 - o 16min Butanol:Methylcyclohexane (vol:vol)
 - o 16min MethylCyclohexane
 - o Ne pas faire la vaporisation (essuyer simplement les cassettes)
 - o 23 min Paraffine
- Couper les gels en deux et les déposer de manière verticale dans un moule. Ajouter de la paraffine liquide et laisser polymériser au froid
- Couper les blocs à 5µm

ANNEXE 2 - PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications liées au sujet de thèse

- Liot, S. *et al.* **Stroma involvement in pancreatic ductal adenocarcinoma: an overview focusing on extracellular matrix proteins.** *Front. Immunol.* **12**, (2021). doi: 10.3389/fimmu.2021.612271
- Aubert A *et al.* **Latent TGF- β activation is a hallmark of the Tenascin family.** *Front. Immunol.* (2021). En révision
- Liot, S. *et al.* **Loss of Tenascin-X expression during tumor progression: A new pan-cancer marker.** *Matrix Biology Plus* 100021 (2020) doi:10.1016/j.mbplus.2020.100021.

Communications liées au sujet de thèse

Communications orales

- **9 Oct. 2019 : 24ème Journée Scientifique de l'EDISS, Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé, Lyon, France.** "Loss of Tenascin-X expression during tumor progression : a new pan-cancer signature."
- **12-13 Sept. 2019 : 34ème réunion du CFP, Club Français du Pancréas, Lyon, France.** "Oncosuppressive role of Tenascin-X in pancreatic carcinogenesis."
- **20 Nov. 2018 : 4ème Journée Scientifique de l'AFRCP, Association Française pour la Recherche sur le Cancer du Pancréas, Paris, France.** "Oncosuppressive role of Tenascin-X in pancreatic carcinogenesis - From patient cohort analysis to mechanistic study on mouse model".

Communications affichées

- **25-26 Mars 2020 : Forum de la Recherche en Cancérologie, Cancéropôle CLARA, Lyon, France.** "Loss of Tenascin-X expression during tumor progression : a new pan-cancer marker." (Annulé)
- **23-24 Oct. 2019 : International Pancreatic Cancer Symposium, Association Française pour la Recherche sur le Cancer du Pancréas, Toulouse, France.** "Tenascin-X, a key player in controlling desmoplastic reaction during pancreatic carcinogenesis".
- **12 Fév. 2019 : 5ème Journée du LBTI, Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique, Lyon, France.** "Oncosuppressive role of Tenascin-X in pancreatic carcinogenesis."

Publications indépendantes du sujet de thèse

- Desgeorges, T. *et al.* **Open-CSAM, a new tool for semi-automated analysis of myofiber cross-sectional area in regenerating adult skeletal muscle.** *Skelet Muscle* **9**, (2019).
- Lukjanenko, L. *et al.* **Aging Disrupts Muscle Stem Cell Function by Impairing Matricellular WISP1 Secretion from Fibro-Adipogenic Progenitors.** *Cell Stem Cell* **24**, 433-446.e7 (2019).
- Connor, B. *et al.* **Conversion of adult human fibroblasts into neural precursor cells using chemically modified mRNA.** *Heliyon* **4**, (2018).
- Latroche, C. *et al.* **Coupling between Myogenesis and Angiogenesis during Skeletal Muscle Regeneration Is Stimulated by Restorative Macrophages.** *Stem Cell Reports* **9**, 2018–2033 (2017).

Loss of Tenascin-X expression during cancer progression

A new pan-cancer marker



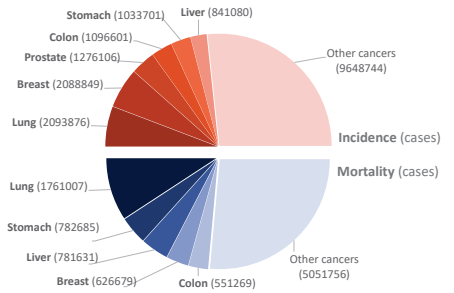
Sophie LIOT^{1, #}, Alexandre AUBERT¹, Valérie HERVIEU², Naïma EL KHOLTI¹, Joost SCHALKWIJK³, Perrine MERCIER-GOUY¹, Bernard VERRIER¹, Ulrich VALCOURT^{1, *} and Elise LAMBERT^{1, *}

¹ Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTi), CNRS UMR 5305, Université de Lyon, Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), Lyon, F-69367, France; ² Hospices Civils de Lyon, Service Central d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Lyon, France; ³ Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Faculty of Medical Sciences, 370 Geert Grooteplein-Zuid 26 28, 6525 GA Nijmegen, Netherlands

* Co-senior authors; # Corresponding author: sophie.liot@ibcp.fr

Introduction

Desmoplastic reaction, characterized by high fibroblast proliferation and abundant extracellular matrix (ECM) deposition, is a process widely observed during solid tumor progression. Beyond its architectural role, ECM is involved in cancer progression by modifying tumor cell behavior (proliferation, survival, migration...), either directly through ECM-cell interactions or indirectly by being a reservoir for cytokines. Among ECM glycoproteins, tenascins (TNs) are a family of 4 members (TNC, TNR, TNW and TNX) sharing a common modular structure, but having specific expression patterns. While the involvement of TNC and TNW in different cancers has been extensively studied, showing that their reexpressions during tumorigenesis, the status of TNR and TNX remain to be clarified. Herein, we thus analyzed Tenascin-X expression in different solid tumors, and notably the 6 cancers with the highest incidence and mortality worldwide (lung, breast, prostate, colon, stomach, liver).



Cancers with highest incidence and mortality worldwide, Global Cancer Observatory, 2018 >

Methodology

Analysis at the mRNA level (bioinformatic analyses)

1a- Search for array- and/or sequence-based datasets for each cancer



1b- Analysis of TCGA database



2- Dataset selection

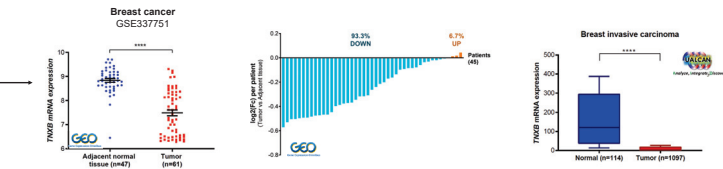
- Recent datasets (<10 years)
- Normal Adjacent or equivalent normal tissue available
- Number of samples (normal and tumoral)
- Clinical data (Survival and Stage/Grade)

3- Comparison of gene expression between normal & tumoral samples

Ex: Breast cancer

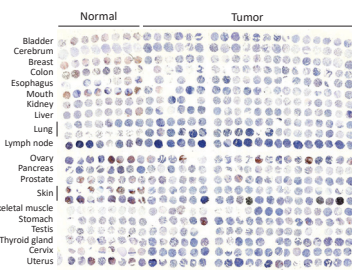
GSE	# of cases	Adjac.	# of cases	Cancer type	TNX expression (GSE33751)			Survival	Study/Grade	Database	Date
					adj.pval	logFC	Variation				
GSE33751	47	yes	37	Adenocarcinoma	1.55E-10	-5.43E-01	DOWN	no	GDC	TCGA: Adipos (G2602) Whole Human Genome Reciprocity Array (G4113) (Breast Number version)	2011
GSE14899	144	no	144	Adenocarcinoma	2.19E-18	-2.12E-01	DOWN	no	GDC	TCGA: Adipos (G2602) Reciprocity (2) Human Genome Reciprocity Array (Breast Number version)	2011
GSE14899	143	no	42	IBC	4.73E-18	-2.18E-01	DOWN	no	GDC	TCGA: PMS (G1133) Plus_2 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2009
GSE14899	143	no	42	IBC	4.73E-18	-2.18E-01	DOWN	no	GDC	TCGA: PMS (G1133) Plus_2 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2009
GSE14899	143	no	42	IBC	2.79E-11	-0.39E-01	DOWN	no	GDC	TCGA: PMS (G1133) Plus_2 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2009
GSE14899	143	no	42	IBC	2.79E-11	-0.39E-01	DOWN	no	GDC	TCGA: PMS (G1133) Plus_2 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2009
GSE14899	143	no	42	IBC	2.79E-11	-0.39E-01	DOWN	no	GDC	TCGA: PMS (G1133) Plus_2 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2009
GSE14899	143	no	42	IBC	2.79E-11	-0.39E-01	DOWN	no	GDC	TCGA: PMS (G1133) Plus_2 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2009
GSE14899	143	no	42	IBC	2.79E-11	-0.39E-01	DOWN	no	GDC	TCGA: PMS (G1133) Plus_2 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	2009

Data extraction from selected dataset :

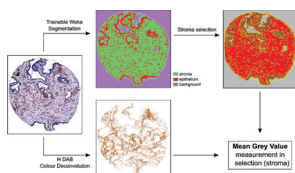


Analysis at the protein level (Tissue MicroArray analyses)

1- TNX protein detection

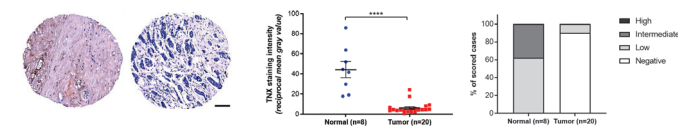


2- Core analysis



3- Results

Ex: Breast cancer



Results

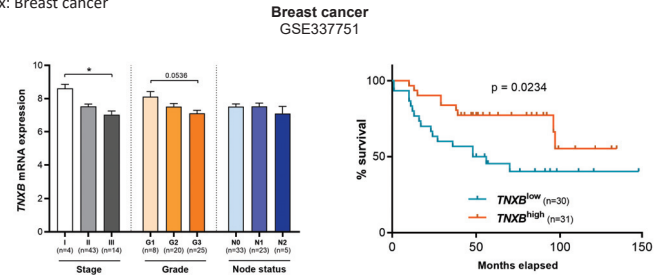
TNX expression status in cancers

Cancer type	Bioinformatic analyses			Tissue MicroArray analyses	
	Literature	G.E.O. results	UALCAN results	TMA quantification	Clinical scoring
Lung adenocarcinoma					
Breast cancer					
Prostate cancer					
Colon adenocarcinoma					
Stomach adenocarcinoma					
Liver hepatocellular carcinoma					
Kidney clear cell carcinoma					
Glioma					
Ovarian cancer					
Melanoma of skin					
Leiomyoma					
Malignant mesothelioma					
Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor					

Legend: Down regulation (teal), Down regulation tendency (light teal), Up regulation (orange), Up regulation tendency (light orange), Non significant (yellow), No data available (grey).

Loss of TNX expression is correlated with tumor progression, poor prognosis and high proliferation in breast (and lung) cancers

Ex: Breast cancer



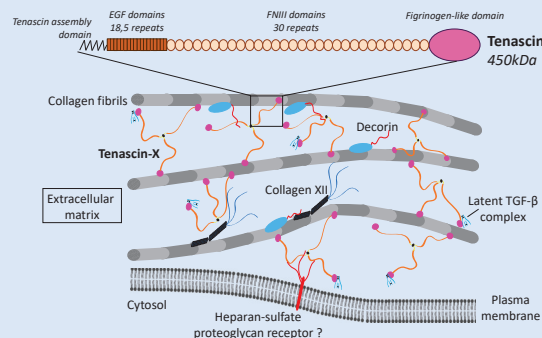
Conclusions and project in progress

Herein, we demonstrated that TNX expression is gradually lost during tumor progression both at the mRNA and protein levels. This TNX downregulation is observed in all analyzed solid tumors except brain tumors for which an upregulation has been detected. We also highlighted that low expression of TNXB gene in tumor is associated with poor prognosis for the patient. This work, published in Matrix Biology Plus (Liot et al., 2020), shows that loss of TNX can be considered as a new pan-cancer marker. A deeper study is currently in progress in the laboratory, focusing on the role of TNX expression during pancreatic carcinogenesis and the mechanism by which TNX can exert its onco-suppressive role. This large study encompasses different strategies: *in silico*, *in vitro* (development of 3D models) and *in vivo* (transgenic mouse models) analyses. Ultimately, this project could lead to the emergence of TNX as a new therapeutic target.

INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an aggressive cancer characterized by a desmoplastic reaction, *i.e.* an excessive extracellular matrix (ECM) deposition, thus preventing the access of classical chemotherapies to tumor cells. Beyond its structural role, ECM is also involved in cancer progression by modifying tumor cell behavior (proliferation, survival, migration...). Among matrix glycoproteins, tenascins (TNs) are a group of 4 matricellular proteins (TNX, TNC, TNW, TNR) sharing a common structure. Whereas TNC¹ and TNW² have already been shown to be involved in cancers and notably PDAC, the role of TNX and TNR remains unclear. In our group, we study the role played by the TNX, known to be expressed in the digestive tract³.

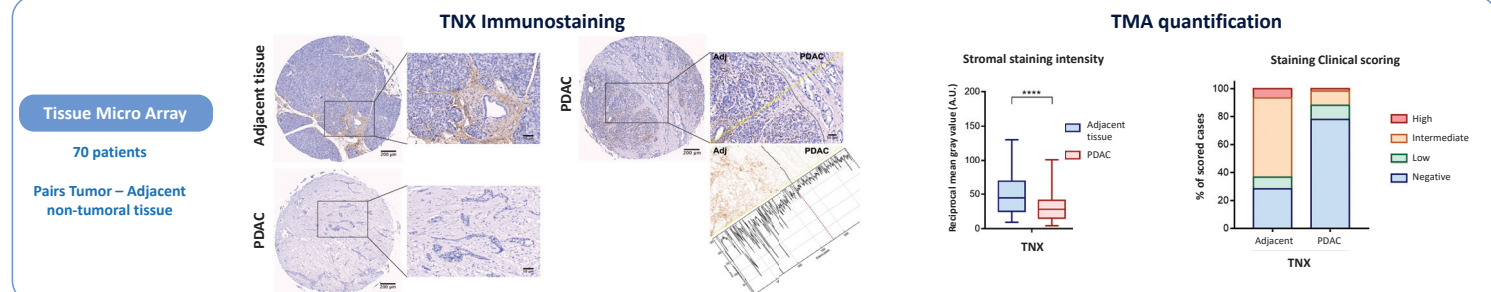
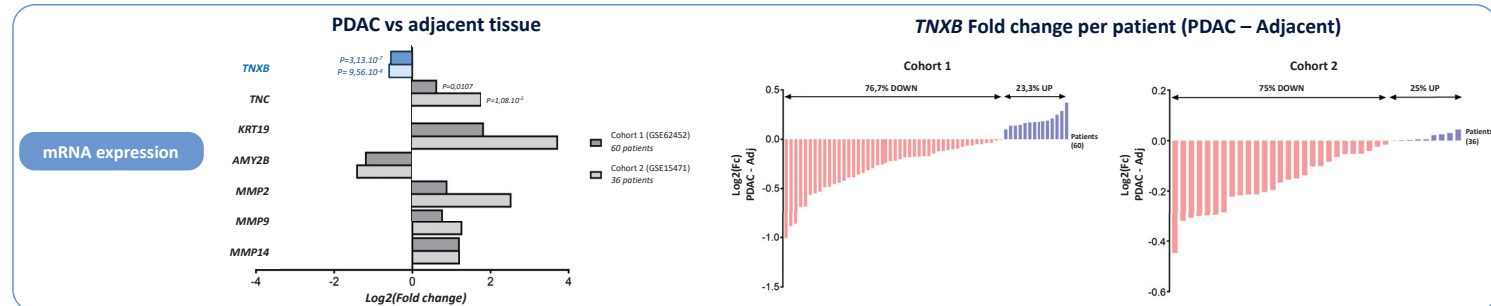
¹ Esposito, I. et al. (2006), *Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis*. J. Pathol.
² Brellier et al. (2012) *Tenascin-W is a better cancer biomarker than tenascin-C for most human solid tumors*. BMC Clinical Pathology.
³ Valcourt U. et al. (2015) *Tenascin-X: beyond the architectural function*, Cell Adhesion & Migration.



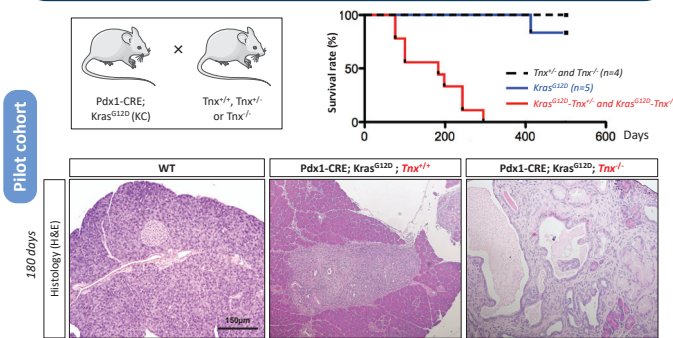
OBJECTIVES The aim of this study is to decipher the role of TNX during pancreatic carcinogenesis, using (1) *in vitro* 3D modelling, (2) mouse model analysis, and (3) *in vivo* and *in silico* study of human tumors

RESULTS

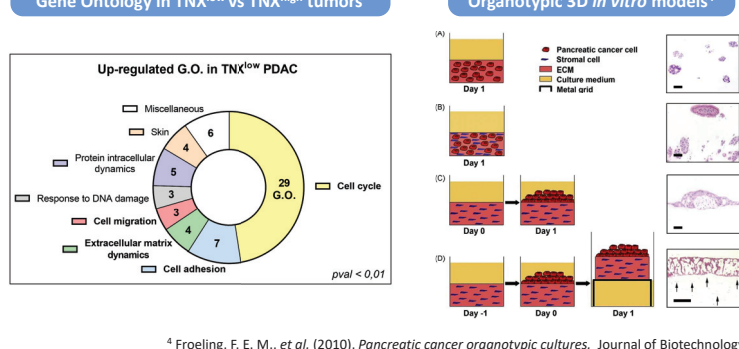
Decreased level of TNX in human pancreatic tumors



TNX deficiency accelerated carcinogenesis in pancreatic cancer predisposition mouse model



In vitro model to decipher oncosuppressive role of TNX

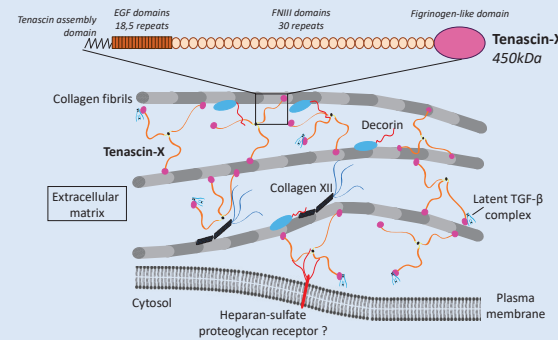


CONCLUSION & PERSPECTIVES

Our results demonstrated a highly significant decrease of *TNXB* gene expression in pancreatic tumors compared to non-tumoral adjacent tissues in the 2 cohorts of PDAC patients. These results were confirmed at the protein level by immunohistochemistry on Tissue Microarray. Although mouse and human pancreas have very different morphologies, genetically engineered mice models are able to develop pancreatic lesions. *In vivo*, we observed that *Tnxb* gene ablation accelerated pancreatic carcinogenesis in the context of *Kras*^{G12D} mutation conditionally expressed in the pancreas (KC mice). After having confirmed these data with a new cohort, we aim at deciphering the molecular pathway responsible for TNX oncosuppressive role *in vitro* thanks to 3D organotypic models.

INTRODUCTION

A normal tissue stroma, composed of cells (fibroblasts, immune and endothelial cells) and extracellular matrix (ECM), is essential to maintain epithelial tissue homeostasis. During cancer progression, this normal stroma evolves into a tumor microenvironment (TME) through the deposition of an excessive and particular ECM. This process named desmoplastic reaction, is particularly intense in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and leads to the formation of a physical barrier against classical chemotherapies. Beyond its architectural role, ECM is also involved in cancer progression by modifying tumor cell behavior (proliferation, survival, migration...), either directly through ECM-cell interactions or indirectly by being a reservoir for cytokines. Among ECM glycoproteins, the tenascins (TN) are a family of 4 members (TNC, TNR, TNW, TNX) sharing a common modular structure. Whereas TNC and TNW have already been shown to be involved in cancers and notably PDAC, the role of TNX and TNR remains unclear.

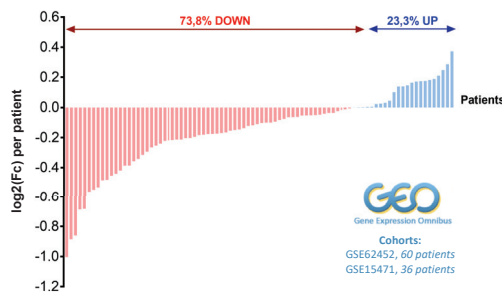


OBJECTIVES The aim of this study is to decipher the role of TNX during pancreatic carcinogenesis, through (1) human tumor studies, (2) *in vivo* mouse model analysis, and (3) *in vitro* 3D modelling.

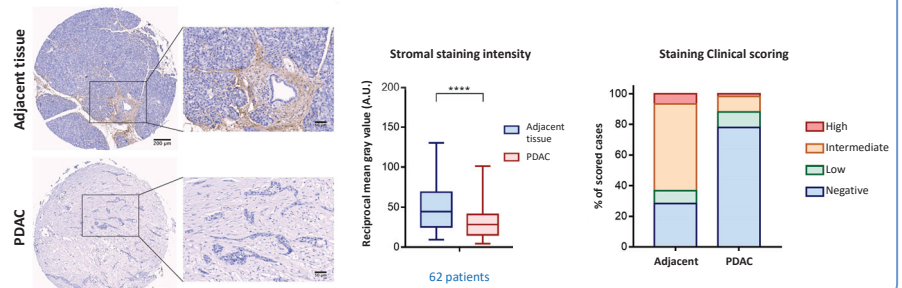
RESULTS

Decreased level of TNX in human pancreatic ductal adenocarcinoma

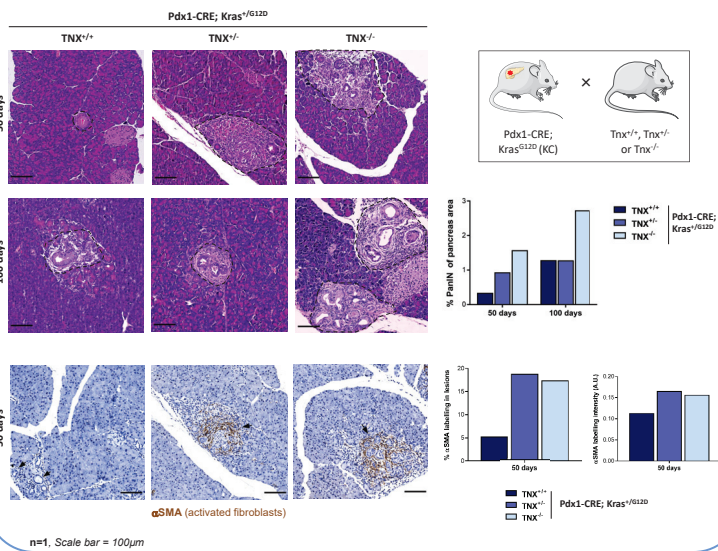
TNXB mRNA expression in human tumors
(*in silico* analysis, PDAC vs adjacent tissue)



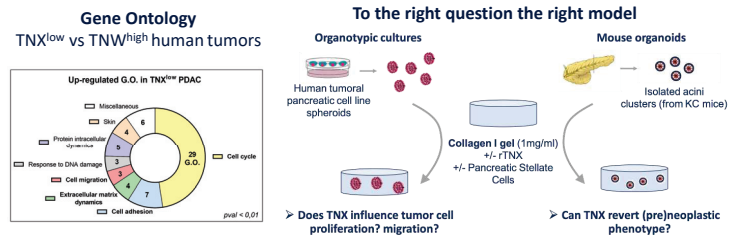
TNX protein level in human samples
(Tissue MicroArray analysis)



Accelerated PanIN development and desmoplastic reaction in TNX^{-/-} KC mice



Deciphering cellular effects of TNX



Loss of TNX in tumor progression – A new pan cancer signature

Cancer type	Literature	<i>In silico</i> analysis (mRNA)		Tissue MicroArray analysis (protein)	
		G.E.O. results	UALCAN results	TMA quantification	Clinical scoring
Lung adenocarcinoma		Green	Green	Green	Green
Breast cancer		Green	Green	Green	Green
Prostate cancer		Green	Green	Green	Green
Colon adenocarcinoma		Green	Green	Green	Green
Stomach adenocarcinoma		Green	Green	Green	Green
Liver hepatocellular carcinoma		Green	Green	Green	Green
Kidney clear cell carcinoma		Green	Green	Green	Green
Glioma		Green	Green	Green	Green
Ovarian cancer		Green	Green	Green	Green
Melanoma of skin		Green	Green	Green	Green
Liposarcoma		Green	Green	Green	Green
Malignant mesothelioma		Green	Green	Green	Green
Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor		Green	Green	Green	Green

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Our results demonstrated a highly significant decrease of *TNXB* gene expression in pancreatic tumors compared to non-tumoral adjacent tissues in the 2 cohorts of PDAC patients, that we confirmed at the protein level by immunohistochemistry on Tissue Microarray. *In vivo*, we observed that *Tnxb* gene ablation accelerated the development of PanINs at early stages in a *Kras*^{G12D} context. Moreover, we observed that pancreatic lesions were surrounded by a highly activated stroma in absence of tenascin-X. Finally, we aim at deciphering *in vitro* the cellular effects of TNX responsible for its oncosuppressive role thanks to 3D models. Additionally, we recently performed a meta-analysis of TNX status in a large panel of cancers. This study allowed us to show that TNX is downregulated in most cancers, except brain tumors, and that high level of TNX could be considered as a good prognosis marker.

ANNEXE 3 - ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT ET D'ENCADREMENT

Activités d'enseignement

- **Activité complémentaire d'enseignement**, *Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.*
Dispense de Travaux Dirigés et Travaux Pratiques de Biologie Cellulaire en L1 et L3
64h/an sur 3 ans (années 2017 à 2020)
- **Poste d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche**, *Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.*
Dispense de Travaux Dirigés et Travaux Pratiques de Biologie Cellulaire en L3
96h sur 1 an (année 2020/2021)

Activités d'encadrement

- **Encadrement d'un stagiaire de Master 1 – Master 2**, *LBTI, CNRS UMR5305, UCBL1, Lyon, France.*
Stage de 6 mois d'un étudiant en M1-M2 recherche Cancer (Mai-Oct 2019)
- **Encadrement d'un stagiaire de Master 2**, *LBTI, CNRS UMR5305, UCBL1, Lyon, France.*
Stage de 4 mois d'un étudiant en M2 recherche Cancer (Fév-Mai 2020)
- **Encadrement d'une stagiaire de Master 1**, *LBTI, CNRS UMR5305, UCBL1, Lyon, France.*
Stage de 4 mois d'une étudiant en M1 Biosciences (ENS de Lyon) (Fév-Juin 2021)

BIBLIOGRAPHIE

- Aaltonen, L. A. *et al.* (eds) (2000) *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*. Lyon : Oxford: IARC Press ; Oxford University Press (distributor,) (World Health Organization classification of tumours).
- Abel, E. V. and Simeone, D. M. (2013) 'Biology and Clinical Applications of Pancreatic Cancer Stem Cells', *Gastroenterology*, 144(6), pp. 1241–1248. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.072.
- Adams, J. C. (2018) 'Chapter Two - Matricellular Proteins: Functional Insights From Non-mammalian Animal Models', in Litscher, E. S. and Wassarman, P. M. (eds) *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press (Extracellular Matrix and Egg Coats), pp. 39–105. doi: 10.1016/bs.ctdb.2018.02.003.
- Adamska, A., Domenichini, A. and Falasca, M. (2017) 'Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7). doi: 10.3390/ijms18071338.
- Adler, G., Hupp, T. and Kern, H. F. (1979) 'Course and spontaneous regression of acute pancreatitis in the rat', *Virchows Archiv A*, 382(1), pp. 31–47. doi: 10.1007/BF01102739.
- Aguirre, A. J. *et al.* (2003) 'Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma', *Genes & Development*, 17(24), pp. 3112–3126. doi: 10.1101/gad.1158703.
- Ahmed, S. *et al.* (2017) 'The TGF- β /Smad4 Signaling Pathway in Pancreatic Carcinogenesis and Its Clinical Significance', *Journal of Clinical Medicine*, 6(1). doi: 10.3390/jcm6010005.
- Aichler, M. *et al.* (2012) 'Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues', *The Journal of Pathology*, 226(5), pp. 723–734. doi: <https://doi.org/10.1002/path.3017>.
- Aiello, N. M. *et al.* (2016) 'Metastatic progression is associated with dynamic changes in the local microenvironment', *Nature Communications*, 7, p. 12819. doi: 10.1038/ncomms12819.
- Akanuma, N. *et al.* (2017) 'Paracrine Secretion of TGF- β by Ductal Cells Promotes Acinar-to-Ductal Metaplasia in Cultured Human Exocrine Pancreas Tissues', *Pancreas*, 46(9), pp. 1202–1207. doi: 10.1097/MPA.0000000000000913.
- Akhtar, M. *et al.* (2019) 'Paget's "Seed and Soil" Theory of Cancer Metastasis: An Idea Whose Time has Come', *Advances in Anatomic Pathology*, 26(1), pp. 69–74. doi: 10.1097/PAP.0000000000000219.
- Aktar, R. *et al.* (2018) 'The extracellular matrix glycoprotein tenascin-X regulates peripheral sensory and motor neurones', *The Journal of Physiology*, 596(17), pp. 4237–4251. doi: 10.1113/JP276300.
- Aktar, R. *et al.* (2019) 'A novel role for the extracellular matrix glycoprotein-Tenascin-X in gastric function', *The Journal of Physiology*, 597(6), pp. 1503–1515. doi: 10.1113/JP277195.
- Alcaraz, L. B. *et al.* (2014) 'Tenascin-X promotes epithelial-to-mesenchymal transition by activating latent TGF- β ', *The Journal of Cell Biology*, 205(3), pp. 409–428. doi: 10.1083/jcb.201308031.
- Alexandrova, A. Y. (2008) 'Evolution of cell interactions with extracellular matrix during carcinogenesis', *Biochemistry (Moscow)*, 73(7), pp. 733–741. doi: 10.1134/S0006297908070018.
- Alhamdani, M. S. S. *et al.* (2012) 'Immunoassay-based proteome profiling of 24 pancreatic cancer cell lines', *Journal of Proteomics*, 75(12), pp. 3747–3759. doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.042.
- Alison, M. R. (2020) 'The cellular origins of cancer with particular reference to the gastrointestinal tract', *International Journal of Experimental Pathology*, 101(5), pp. 132–151. doi: 10.1111/iep.12364.
- Allen, M. and Jones, J. L. (2011) 'Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer', *The Journal of Pathology*, 223(2), pp. 163–177. doi: 10.1002/path.2803.

- Allen, P. J. *et al.* (2017) 'Multi-Institutional validation study of the American Joint Commission on Cancer (8th edition) changes for T and N staging in patients with pancreatic adenocarcinoma', *Annals of surgery*, 265(1), pp. 185–191. doi: 10.1097/SLA.0000000000001763.
- Alrawashdeh, W. *et al.* (2019) 'Perineural invasion in pancreatic cancer: proteomic analysis and in vitro modelling', *Molecular Oncology*, 13(5), pp. 1075–1091. doi: 10.1002/1878-0261.12463.
- Amin, M. B. *et al.* (2017) 'The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(2), pp. 93–99. doi: 10.3322/caac.21388.
- Amrutkar, M. *et al.* (2019) 'Secretion of fibronectin by human pancreatic stellate cells promotes chemoresistance to gemcitabine in pancreatic cancer cells', *BMC cancer*, 19(1), p. 596. doi: 10.1186/s12885-019-5803-1.
- Andriani, F. *et al.* (2018) 'Diagnostic role of circulating extracellular matrix-related proteins in non-small cell lung cancer', *BMC Cancer*, 18(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12885-018-4772-0.
- Angelov, D. N. *et al.* (1998) 'Tenascin-R Is Antiadhesive for Activated Microglia that Induce Downregulation of the Protein after Peripheral Nerve Injury: a New Role in Neuronal Protection', *Journal of Neuroscience*, 18(16), pp. 6218–6229. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-16-06218.1998.
- Anlar, B. and Gunel-Ozcan, A. (2012) 'Tenascin-R: Role in the central nervous system', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(9), pp. 1385–1389. doi: 10.1016/j.biocel.2012.05.009.
- Annes, J. P. (2003) 'Making sense of latent TGFbeta activation', *Journal of Cell Science*, 116(2), pp. 217–224. doi: 10.1242/jcs.00229.
- Ansari, D. *et al.* (2016) 'Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow', *Future Oncology*, 12(16), pp. 1929–1946. doi: 10.2217/fon-2016-0010.
- Ansari, D. *et al.* (2017) 'Pancreatic cancer stroma: controversies and current insights', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 52(6–7), pp. 641–646. doi: 10.1080/00365521.2017.1293726.
- Aparecida de Aro, A., de Campos Vidal, B. and Pimentel, E. R. (2012) 'Biochemical and anisotropic properties of tendons', *Micron*, 43(2), pp. 205–214. doi: 10.1016/j.micron.2011.07.015.
- Apostolova, I., Irintchev, A. and Schachner, M. (2006) 'Tenascin-R Restricts Posttraumatic Remodeling of Motoneuron Innervation and Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Adult Mice', *The Journal of Neuroscience*, 26(30), pp. 7849–7859. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1526-06.2006.
- Apte, M., Pirola, R. and Wilson, J. (2012) 'Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas', *Frontiers in Physiology*, 3. doi: 10.3389/fphys.2012.00344.
- Apte, M. V. *et al.* (1998) 'Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture', *Gut*, 43(1), pp. 128–133. doi: 10.1136/gut.43.1.128.
- Apte, M. V. *et al.* (2013) 'Extracellular matrix composition significantly influences pancreatic stellate cell gene expression pattern: role of transgelin in PSC function', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(6), pp. G408–G417. doi: 10.1152/ajpgi.00016.2013.
- Apte, M. V. *et al.* (2015) 'Pancreatic cancer: The microenvironment needs attention too!', *Pancreatology*, 15(4, Supplement), pp. S32–S38. doi: 10.1016/j.pan.2015.02.013.
- Ariston Gabriel, A. N. *et al.* (2020) 'Differences between KC and KPC pancreatic ductal adenocarcinoma mice models, in terms of their modeling biology and their clinical relevance', *Pancreatology*, 20(1), pp. 79–88. doi: 10.1016/j.pan.2019.11.006.
- Armstrong, T. *et al.* (2004) 'Type I Collagen Promotes the Malignant Phenotype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Clinical Cancer Research*, 10(21), pp. 7427–7437. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0825.
- Arneth, B. (2019) 'Tumor Microenvironment', *Medicina*, 56(1). doi: 10.3390/medicina56010015.
- Arseni, L., Lombardi, A. and Orioli, D. (2018) 'From Structure to Phenotype: Impact of Collagen Alterations on Human Health', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5). doi: 10.3390/ijms19051407.

- Asahina, K. *et al.* (2009) 'Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development', *Hepatology*, 49(3), pp. 998–1011. doi: 10.1002/hep.22721.
- Awaji, M. and Singh, R. K. (2019) 'Cancer-Associated Fibroblasts' Functional Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Cancers*, 11(3). doi: 10.3390/cancers11030290.
- Ayachi, I. E. *et al.* (2011) 'Spatiotemporal distribution of tenascin-R in the developing human cerebral cortex parallels neuronal migration', *Journal of Comparative Neurology*, 519(12), pp. 2379–2389. doi: 10.1002/cne.22632.
- Ayres Pereira, M. and Chio, I. I. C. (2020) 'Metastasis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current Standing and Methodologies', *Genes*, 11(1), p. 6. doi: 10.3390/genes11010006.
- Bachem, M. G. *et al.* (1998) 'Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans', *Gastroenterology*, 115(2), pp. 421–432. doi: 10.1016/S0016-5085(98)70209-4.
- Bachem, M. G. *et al.* (2005) 'Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells', *Gastroenterology*, 128(4), pp. 907–921. doi: 10.1053/j.gastro.2004.12.036.
- Bachmann, M. *et al.* (2019) 'Cell Adhesion by Integrins', *Physiological Reviews*, 99(4), pp. 1655–1699. doi: 10.1152/physrev.00036.2018.
- Baer, R. *et al.* (2014) 'Pancreatic cell plasticity and cancer initiation induced by oncogenic Kras is completely dependent on wild-type PI 3-kinase p110 α ', *Genes & Development*, 28(23), pp. 2621–2635. doi: 10.1101/gad.249409.114.
- Baeyens, L. and Bouwens, L. (2009) 'Cellular plasticity of the pancreas', *Biological Chemistry*, 390(10), pp. 995–1001. doi: 10.1515/BC.2009.117.
- Bahrami, A. *et al.* (2017) 'Targeting stroma in pancreatic cancer: Promises and failures of targeted therapies', *Journal of Cellular Physiology*, 232(11), pp. 2931–2937. doi: 10.1002/jcp.25798.
- Bailey, J. M., DelGiorno, K. E. and Crawford, H. C. (2014) 'The secret origins and surprising fates of pancreas tumors', *Carcinogenesis*, 35(7), pp. 1436–1440. doi: 10.1093/carcin/bgu056.
- Balic, A. *et al.* (2012) 'Stem cells as the root of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Experimental Cell Research*, 318(6), pp. 691–704. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.11.007.
- Balkwill, F. R., Capasso, M. and Hagemann, T. (2012) 'The tumor microenvironment at a glance', *Journal of Cell Science*, 125(23), pp. 5591–5596. doi: 10.1242/jcs.116392.
- Ban, S. *et al.* (2006) 'Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas: its histopathologic difference between 2 major types', *The American Journal of Surgical Pathology*, 30(12), pp. 1561–1569. doi: 10.1097/01.pas.0000213305.98187.d4.
- Bardeesy, N. *et al.* (2006) 'Both p16Ink4a and the p19Arf-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(15), pp. 5947–5952. doi: 10.1073/pnas.0601273103.
- Bardeesy, N. and DePinho, R. A. (2002) 'Pancreatic cancer biology and genetics', *Nature Reviews Cancer*, 2(12), pp. 897–909. doi: 10.1038/nrc949.
- Barone, E. *et al.* (2016) 'Environmental risk factors for pancreatic cancer: an update', *Archives of Toxicology*, 90(11), pp. 2617–2642. doi: 10.1007/s00204-016-1821-9.
- Bartholin, L. (2012) 'Pancreatic cancer and the tumor microenvironment: Mesenchyme's role in pancreatic carcinogenesis', in Grippo, P. J. and Munshi, H. G. (eds) *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Trivandrum (India): Transworld Research Network. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98929/> (Accessed: 16 April 2020).
- Basturk, O. *et al.* (2015) 'A revisited classification system and recommendations from the Baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas', *The American journal of surgical pathology*, 39(12), pp. 1730–1741. doi: 10.1097/PAS.0000000000000533.

- Bateman, J. F., Boot-Handford, R. P. and Lamandé, S. R. (2009) 'Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations', *Nature Reviews Genetics*, 10(3), pp. 173–183. doi: 10.1038/nrg2520.
- Bazzichetto, C. *et al.* (2019) 'Advances in Tumor-Stroma Interactions: Emerging Role of Cytokine Network in Colorectal and Pancreatic Cancer', *Journal of Oncology*, 2019, p. 5373580. doi: 10.1155/2019/5373580.
- Bazzichetto, C. *et al.* (2020) 'From Genetic Alterations to Tumor Microenvironment: The Ariadne's String in Pancreatic Cancer', *Cells*, 9(2). doi: 10.3390/cells9020309.
- Beer, R. L., Parsons, M. J. and Rovira, M. (2016) 'Centroacinar cells: At the center of pancreas regeneration', *Developmental Biology*, 413(1), pp. 8–15. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.02.027.
- Beerling, E. *et al.* (2016) 'Intravital characterization of tumor cell migration in pancreatic cancer', *Intravital*, 5(3), p. e1261773. doi: 10.1080/21659087.2016.1261773.
- Begum, A. *et al.* (2017) 'The extracellular matrix and focal adhesion kinase signaling regulate cancer stem cell function in pancreatic ductal adenocarcinoma', *PLOS ONE*, 12(7), p. e0180181. doi: 10.1371/journal.pone.0180181.
- Begum, A. *et al.* (2019) 'Direct Interactions With Cancer-Associated Fibroblasts Lead to Enhanced Pancreatic Cancer Stem Cell Function', *Pancreas*, 48(3), pp. 329–334. doi: 10.1097/MPA.0000000000001249.
- Behrens, D., Walther, W. and Fichtner, I. (2017) 'Pancreatic cancer models for translational research', *Pharmacology & Therapeutics*, 173, pp. 146–158. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.013.
- Ben, Q.-W. *et al.* (2011) 'Periostin, a matrix specific protein, is associated with proliferation and invasion of pancreatic cancer', *Oncology Reports*, 25(3), pp. 709–716. doi: 10.3892/or.2011.1140.
- Berchtold, S. *et al.* (2015) 'Collagen type V promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Cancer Letters*, 356(2, Part B), pp. 721–732. doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.020.
- Berger, C. *et al.* (2020) 'Matrix decoded – A pancreatic extracellular matrix with organ specific cues guiding human iPSC differentiation', *Biomaterials*, 244, p. 119766. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119766.
- Berman, J. J. *et al.* (2006) 'Precancer: A conceptual working definition: Results of a Consensus Conference', *Cancer Detection and Prevention*, 30(5), pp. 387–394. doi: 10.1016/j.cdp.2006.09.002.
- Bhattacharyya, S. *et al.* (2016) 'Tenascin-C drives persistence of organ fibrosis', *Nature Communications*, 7(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/ncomms11703.
- Bhaw-Luximon, A. and Jhurry, D. (2015) 'New avenues for improving pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) treatment: Selective stroma depletion combined with nano drug delivery', *Cancer Letters*, 369(2), pp. 266–273. doi: 10.1016/j.canlet.2015.09.007.
- Binkley, C. E. *et al.* (2004) 'The Molecular Basis of Pancreatic Fibrosis: Common Stromal Gene Expression in Chronic Pancreatitis and Pancreatic Adenocarcinoma', *Pancreas*, 29(4), pp. 254–263.
- Biondani, G. *et al.* (2018) 'Extracellular matrix composition modulates PDAC parenchymal and stem cell plasticity and behavior through the secretome', *The FEBS Journal*, 285(11), pp. 2104–2124. doi: 10.1111/febs.14471.
- Bisht, S. and Feldmann, G. (2019) 'Animal models for modeling pancreatic cancer and novel drug discovery', *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(2), pp. 127–142. doi: 10.1080/17460441.2019.1566319.
- Blaine, S. A. *et al.* (2010) 'Adult pancreatic acinar cells give rise to ducts but not endocrine cells in response to growth factor signaling', *Development*, 137(14), pp. 2289–2296. doi: 10.1242/dev.048421.
- Bockman, D. E. (1997) 'Morphology of the exocrine pancreas related to pancreatitis', *Microscopy Research and Technique*, 37(5–6), pp. 509–519. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19970601)37:5/6<509::AID-JEMT13>3.0.CO;2-U.
- Bogusiewicz, M. *et al.* (2012) 'Expression of matricellular proteins in human uterine leiomyomas and normal myometrium', *Histology and Histopathology*, 27(11), pp. 1495–1502. doi: 10.14670/HH-27.1495.

- Boj, S. F. *et al.* (2015) 'Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer', *Cell*, 160(1–2), pp. 324–338. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.021.
- Boj, S. F. *et al.* (2016) 'Model organoids provide new research opportunities for ductal pancreatic cancer', *Molecular & Cellular Oncology*, 3(1), p. e1014757. doi: 10.1080/23723556.2015.1014757.
- Bokas, A. *et al.* (2020) 'Mechanisms of the Antitumor Activity of Low Molecular Weight Heparins in Pancreatic Adenocarcinomas', *Cancers*, 12(2). doi: 10.3390/cancers12020432.
- Bonnans, C., Chou, J. and Werb, Z. (2014) 'Remodelling the extracellular matrix in development and disease', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(12), pp. 786–801. doi: 10.1038/nrm3904.
- Bornstein, P. and Sage, E. H. (2002) 'Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function', *Current Opinion in Cell Biology*, 14(5), pp. 608–616. doi: 10.1016/S0955-0674(02)00361-7.
- Bosman, F. T. and Stamenkovic, I. (2003) 'Functional structure and composition of the extracellular matrix', *The Journal of Pathology*, 200(4), pp. 423–428. doi: 10.1002/path.1437.
- Brauchle, E. *et al.* (2018) 'Biomechanical and biomolecular characterization of extracellular matrix structures in human colon carcinomas', *Matrix Biology*, 68–69, pp. 180–193. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.016.
- Bray, F. *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), pp. 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
- Brellier, F., Martina, E., Degen, M., *et al.* (2012) 'Tenascin-W is a better cancer biomarker than tenascin-C for most human solid tumors', *BMC clinical pathology*, 12, p. 14. doi: 10.1186/1472-6890-12-14.
- Brellier, F., Martina, E., Chiquet, M., *et al.* (2012) 'The adhesion modulating properties of tenascin-W', *International Journal of Biological Sciences*, 8(2), pp. 187–194. doi: 10.7150/ijbs.8.187.
- Brellier, F. and Chiquet-Ehrismann, R. (2012) 'How do tenascins influence the birth and life of a malignant cell?', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(1), pp. 32–40. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01360.x.
- Brellier, F., Tucker, R. P. and Chiquet-Ehrismann, R. (2009) 'Tenascins and their implications in diseases and tissue mechanics', *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 19(4), pp. 511–519. doi: 10.1111/j.1600-0838.2009.00916.x.
- Brimnes, M. K. *et al.* (2002) 'Low Expression of Insulin in the Thymus of Non-obese Diabetic Mice', *Journal of Autoimmunity*, 19(4), pp. 203–213. doi: 10.1006/jaut.2002.0616.
- Briquez, P. S., Hubbell, J. A. and Martino, M. M. (2015) 'Extracellular Matrix-Inspired Growth Factor Delivery Systems for Skin Wound Healing', *Advances in Wound Care*, 4(8), pp. 479–489. doi: 10.1089/wound.2014.0603.
- Bristow, J. *et al.* (1993) 'Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B', *The Journal of Cell Biology*, 122(1), pp. 265–278. doi: 10.1083/jcb.122.1.265.
- Bristow, J. *et al.* (2005) 'Tenascin-X, collagen, elastin, and the Ehlers–Danlos syndrome', *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 139C(1), pp. 24–30. doi: 10.1002/ajmg.c.30071.
- Brizzi, M. F., Tarone, G. and Defilippi, P. (2012) 'Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche', *Current Opinion in Cell Biology*, 24(5), pp. 645–651. doi: 10.1016/j.ceb.2012.07.001.
- Brosens, L. A. A. *et al.* (2015) 'Pancreatic adenocarcinoma pathology: changing “landscape”', *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 6(4), pp. 358–374. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.032.
- Brösicke, N. and Faissner, A. (2015) 'Role of tenascins in the ECM of gliomas', *Cell Adhesion & Migration*, 9(1–2), pp. 131–140. doi: 10.1080/19336918.2014.1000071.
- Browning, K. N. (2018) 'Extracellular matrix proteins in the gastrointestinal tract: more than a supporting role', *The Journal of Physiology*, 596(17), pp. 3831–3832. doi: 10.1113/JP276661.

- Brückner, G. *et al.* (2000) 'Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R', *The Journal of Comparative Neurology*, 428(4), pp. 616–629. doi: 10.1002/1096-9861(20001225)428:4<616::aid-cne3>3.0.co;2-k.
- Buc, E. *et al.* (2014) 'Adenocarcinoma of the pancreas: Does prognosis depend on mode of lymph node invasion?', *European Journal of Surgical Oncology*, 40(11), pp. 1578–1585. doi: 10.1016/j.ejso.2014.04.012.
- Buchholz, M. *et al.* (2005) 'Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: organ-specific variations of a common transcriptional phenotype', *Journal of Molecular Medicine*, 83(10), pp. 795–805. doi: 10.1007/s00109-005-0680-2.
- Burch, G. H. *et al.* (1995) 'Embryonic expression of tenascin-X suggests a role in limb, muscle, and heart development', *Developmental Dynamics*, 203(4), pp. 491–504. doi: 10.1002/aja.1002030411.
- Burch, G. H. *et al.* (1997) 'Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome', *Nature Genetics*, 17(1), pp. 104–108. doi: 10.1038/ng0997-104.
- Burclaff, J. and Mills, J. C. (2018) 'Plasticity of differentiated cells in wound repair and tumorigenesis, part I: stomach and pancreas', *Disease Models & Mechanisms*, 11(7). doi: 10.1242/dmm.033373.
- Burris 3rd, H. A. *et al.* (2016) 'Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial.', *Journal of Clinical Oncology*. doi: 10.1200/JCO.1997.15.6.2403.
- Buscail, L., Bournet, B. and Cordelier, P. (2020) 'Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer', *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 17(3), pp. 153–168. doi: 10.1038/s41575-019-0245-4.
- Bynigeri, R. R. *et al.* (2017) 'Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology', *World Journal of Gastroenterology*, 23(3), pp. 382–405. doi: 10.3748/wjg.v23.i3.382.
- Byrne, A. T. *et al.* (2017) 'Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts', *Nature Reviews. Cancer*, 17(4), pp. 254–268. doi: 10.1038/nrc.2016.140.
- Cai, J. *et al.* (2017) 'Tenascin-C induces migration and invasion through JNK/c-Jun signalling in pancreatic cancer', *Oncotarget*, 8(43), pp. 74406–74422. doi: 10.18632/oncotarget.20160.
- Cai, J. *et al.* (2018) 'Tenascin-C Modulates Cell Cycle Progression to Enhance Tumour Cell Proliferation through AKT/FOXO1 Signalling in Pancreatic Cancer', *Journal of Cancer*, 9(23), pp. 4449–4462. doi: 10.7150/jca.25926.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: andrew_aguirre@dfci.harvard.edu and Cancer Genome Atlas Research Network (2017) 'Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Cancer Cell*, 32(2), pp. 185–203.e13. doi: 10.1016/j.ccell.2017.07.007.
- Cannon, A. *et al.* (2018) 'Desmoplasia in pancreatic ductal adenocarcinoma: insight into pathological function and therapeutic potential', *Genes & Cancer*, 9(3–4), pp. 78–86. doi: 10.18632/genesandcancer.171.
- Carnemolla, B. *et al.* (1996) 'Human Tenascin-R COMPLETE PRIMARY STRUCTURE, PRE-mRNA ALTERNATIVE SPLICING AND GENE LOCALIZATION ON CHROMOSOME 1q23-q24', *Journal of Biological Chemistry*, 271(14), pp. 8157–8160. doi: 10.1074/jbc.271.14.8157.
- Carrato Mena, A. *et al.* (2018) '195P - Symptoms at diagnosis of (metastatic) pancreatic adenocarcinoma ([m]PAC) in routine practice and frequency variation across Europe', *Annals of Oncology*, 29, pp. ix61–ix62. doi: 10.1093/annonc/mdy432.047.
- Carrière, C. *et al.* (2009) 'Acute pancreatitis markedly accelerates pancreatic cancer progression in mice expressing oncogenic Kras', *Biochemical and biophysical research communications*, 382(3), pp. 561–565. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.03.068.
- Castellanos, J. A., Merchant, N. B. and Nagathihalli, N. S. (2013) 'Emerging targets in pancreatic cancer: epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells', *OncoTargets and Therapy*, 6, pp. 1261–1267. doi: 10.2147/OTT.S34670.

- Chang, T. T., Thakar, D. and Weaver, V. M. (2017) 'Force-dependent breaching of the basement membrane', *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 57–58, pp. 178–189. doi: 10.1016/j.matbio.2016.12.005.
- Chatterjee, D. *et al.* (2017) 'Prognostic Significance of New AJCC Tumor Stage in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Treated With Neoadjuvant Therapy', *The American Journal of Surgical Pathology*, 41(8), pp. 1097–1104. doi: 10.1097/PAS.0000000000000887.
- Chen, H.-Y. *et al.* (2019) 'Mesenterico-portal vein invasion should be an important factor in TNM staging for pancreatic ductal adenocarcinoma: Proposed modification of the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer staging system', *World Journal of Gastroenterology*, 25(46), pp. 6752–6766. doi: 10.3748/wjg.v25.i46.6752.
- Chen, R. *et al.* (2005) 'Pancreatic Cancer Proteome: The Proteins That Underlie Invasion, Metastasis, and Immunologic Escape', *Gastroenterology*, 129(4), pp. 1187–1197. doi: 10.1053/j.gastro.2005.08.001.
- Cheng, X.-B. *et al.* (2016) 'Hyaluronan stimulates pancreatic cancer cell motility', *Oncotarget*, 7(4), pp. 4829–4840. doi: 10.18632/oncotarget.6617.
- Chermnykh, E., Kalabusheva, E. and Vorotelyak, E. (2018) 'Extracellular Matrix as a Regulator of Epidermal Stem Cell Fate', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). doi: 10.3390/ijms19041003.
- Chhoda, A. *et al.* (2019) 'Current Approaches to Pancreatic Cancer Screening', *The American Journal of Pathology*, 189(1), pp. 22–35. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.09.013.
- Chiovaro, F., Chiquet-Ehrismann, R. and Chiquet, M. (2015) 'Transcriptional regulation of tenascin genes', *Cell Adhesion & Migration*, 9(1–2), pp. 34–47. doi: 10.1080/19336918.2015.1008333.
- Chiquet, M. (1992) 'Tenascin: An extracellular matrix protein involved in morphogenesis of epithelial organs', *Kidney International*, 41(3), pp. 629–631. doi: 10.1038/ki.1992.96.
- Chiquet-Ehrismann, R. *et al.* (1986) 'Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis', *Cell*, 47(1), pp. 131–139. doi: 10.1016/0092-8674(86)90374-0.
- Chiquet-Ehrismann, R. (2004) 'Tenascins', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(6), pp. 986–990. doi: 10.1016/j.biocel.2003.12.002.
- Chiquet-Ehrismann, R. *et al.* (2014) 'Tenascins in stem cell niches', *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 37, pp. 112–123. doi: 10.1016/j.matbio.2014.01.007.
- Chiquet-Ehrismann, R. and Chiquet, M. (2003) 'Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress', *The Journal of Pathology*, 200(4), pp. 488–499. doi: 10.1002/path.1415.
- Chiquet-Ehrismann, R. and Tucker, R. P. (2004) 'Connective tissues: signalling by tenascins', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(6), pp. 1085–1089. doi: 10.1016/j.biocel.2004.01.007.
- Chiquet-Ehrismann, R. and Tucker, R. P. (2011) 'Tenascins and the importance of adhesion modulation', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(5). doi: 10.1101/cshperspect.a004960.
- Cho, S.-Y. *et al.* (2016) 'An Integrative Approach to Precision Cancer Medicine Using Patient-Derived Xenografts', *Molecules and Cells*, 39(2), pp. 77–86. doi: 10.14348/molcells.2016.2350.
- Chong, H. C. *et al.* (2012) *Matricellular Proteins: A Sticky Affair with Cancers*, *Journal of Oncology*. Hindawi. doi: <https://doi.org/10.1155/2012/351089>.
- Chouat, E. *et al.* (2018) 'Tumor budding is a prognostic factor linked to epithelial mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma. Study report and literature review', *Pancreatology*, 18(1), pp. 79–84. doi: 10.1016/j.pan.2017.11.010.
- Chronopoulos, A. *et al.* (2016) 'ATRA mechanically reprograms pancreatic stellate cells to suppress matrix remodelling and inhibit cancer cell invasion', *Nature Communications*, 7, p. 12630. doi: 10.1038/ncomms12630.
- Chun, Y. S., Pawlik, T. M. and Vauthey, J.-N. (2018) '8th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Pancreas and Hepatobiliary Cancers', *Annals of Surgical Oncology*, 25(4), pp. 845–847. doi: 10.1245/s10434-017-6025-x.

- Chuvin, N. *et al.* (2017) 'Acinar-to-Ductal Metaplasia Induced by Transforming Growth Factor Beta Facilitates KRASG12D-driven Pancreatic Tumorigenesis', *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 4(2), pp. 263–282. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.05.005.
- Clementz, A. G. *et al.* (2013) 'Collagen XV inhibits epithelial to mesenchymal transition in pancreatic adenocarcinoma cells', *PLoS One*, 8(8), p. e72250. doi: 10.1371/journal.pone.0072250.
- Cleveland, M. H. *et al.* (2012) 'Exocrine ontogenies: on the development of pancreatic acinar, ductal and centroacinar cells', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(6), pp. 711–719. doi: 10.1016/j.semcd.2012.06.008.
- Coleman, S. J. (2014) 'Pancreatic cancer organotypics: High throughput, preclinical models for pharmacological agent evaluation', *World Journal of Gastroenterology*, 20(26), p. 8471. doi: 10.3748/wjg.v20.i26.8471.
- Coleman, S. J. *et al.* (2014) 'The ins and outs of fibroblast growth factor receptor signalling', *Clinical Science*, 127(4), pp. 217–231. doi: 10.1042/CS20140100.
- Collisson, E. A. *et al.* (2019) 'Molecular subtypes of pancreatic cancer', *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(4), pp. 207–220. doi: 10.1038/s41575-019-0109-y.
- Conroy, T. *et al.* (2005) 'Irinotecan Plus Oxaliplatin and Leucovorin-Modulated Fluorouracil in Advanced Pancreatic Cancer—A Groupe Tumeurs Digestives of the Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer Study', *Journal of Clinical Oncology*, 23(6), pp. 1228–1236. doi: 10.1200/JCO.2005.06.050.
- Constantin, V. D. *et al.* (2015) 'Relevant infrastructural alterations in invasive pancreatic ductal adenocarcinoma', *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie*, 56(1), pp. 207–222.
- Cooper, C. L., O'Toole, S. A. and Kench, J. G. (2013) 'Classification, morphology and molecular pathology of premalignant lesions of the pancreas', *Pathology*, 45(3), pp. 286–304. doi: 10.1097/PAT.0b013e32835f2205.
- Cornish, T. C. and Hruban, R. H. (2011) 'Pancreatic Intraepithelial Neoplasia', *Surgical Pathology Clinics*, 4(2), pp. 523–535. doi: 10.1016/j.path.2011.03.005.
- Costanza, B. *et al.* (2019) 'Transforming growth factor beta-induced, an extracellular matrix interacting protein, enhances glycolysis and promotes pancreatic cancer cell migration', *International Journal of Cancer*, 145(6), pp. 1570–1584. doi: 10.1002/ijc.32247.
- Couchman, J. R. and Pataki, C. A. (2012) 'An Introduction to Proteoglycans and Their Localization', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 60(12), pp. 885–897. doi: 10.1369/0022155412464638.
- Cowan, R. W. and Maitra, A. (2014) 'Genetic Progression of Pancreatic Cancer', *The Cancer Journal*, 20(1), pp. 80–84. doi: 10.1097/PPO.000000000000011.
- Cozzitorto, C. and Spagnoli, F. M. (2019) 'Chapter Seven - Pancreas organogenesis: The interplay between surrounding microenvironment(s) and epithelium-intrinsic factors', in Wellik, D. M. (ed.) *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press (Organ Development), pp. 221–256. doi: 10.1016/bs.ctdb.2018.12.005.
- Crawford, H. C. *et al.* (2002) 'Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas', *The Journal of Clinical Investigation*, 109(11), pp. 1437–1444. doi: 10.1172/JCI15051.
- Crippa, S. *et al.* (2012) 'Poorly differentiated resectable pancreatic cancer: Is upfront resection worthwhile?', *Surgery*, 152(3, Supplement), pp. S112–S119. doi: 10.1016/j.surg.2012.05.017.
- Crippa, S. *et al.* (2017) 'Pancreatic ductal adenocarcinoma in 2017: Time to change the therapeutic algorithm?', *Endoscopic Ultrasound*, 6(Suppl 3), pp. S62–S65. doi: 10.4103/eus.eus_61_17.
- Criscimanna, A. *et al.* (2011) 'Duct Cells Contribute to Regeneration of Endocrine and Acinar Cells Following Pancreatic Damage in Adult Mice', *Gastroenterology*, 141(4), pp. 1451–1462.e6. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.003.

- Crossin, K. L. (1996) 'Tenascin: A multifunctional extracellular matrix protein with a restricted distribution in development and disease', *Journal of Cellular Biochemistry*, 61(4), pp. 592–598. doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(19960616)61:4<592::AID-JCB13>3.0.CO;2-I.
- Crotti, S. *et al.* (2017) 'Extracellular Matrix and Colorectal Cancer: How Surrounding Microenvironment Affects Cancer Cell Behavior?', *Journal of Cellular Physiology*, 232(5), pp. 967–975. doi: 10.1002/jcp.25658.
- Cui, N., Hu, M. and Khalil, R. A. (2017) 'Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases', *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 147, pp. 1–73. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.
- D'Agosto, S. *et al.* (2019) 'Preclinical Modelling of PDA: Is Organoid the New Black?', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11). doi: 10.3390/ijms20112766.
- De La O, J.-P. *et al.* (2008) 'Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), pp. 18907–18912. doi: 10.1073/pnas.0810111105.
- De Laporte, L. *et al.* (2013) 'Tenascin C promiscuously binds growth factors via its fifth fibronectin type III-like domain', *PLoS One*, 8(4), p. e62076. doi: 10.1371/journal.pone.0062076.
- Deckner, M. *et al.* (2000) 'Differential expression of tenascin-C, tenascin-R, tenascin/J1, and tenascin-X in spinal cord scar tissue and in the olfactory system', *Experimental Neurology*, 166(2), pp. 350–362. doi: 10.1006/exnr.2000.7543.
- DeClerck, Y. A. (2012) 'Desmoplasia: A Response or a Niche?', *Cancer Discovery*, 2(9), pp. 772–774. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0348.
- Decoster, C. *et al.* (2016) 'Heterogeneity of metastatic pancreatic adenocarcinoma: Lung metastasis show better prognosis than liver metastasis—a case control study', *Oncotarget*, 7(29), pp. 45649–45655. doi: 10.18632/oncotarget.9861.
- Deer, E. L. *et al.* (2010) 'Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines', *Pancreas*, 39(4), pp. 425–435. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181c15963.
- Degen, M. *et al.* (2007) 'Tenascin-W is a novel marker for activated tumor stroma in low-grade human breast cancer and influences cell behavior', *Cancer Research*, 67(19), pp. 9169–9179. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0666.
- Degen, M. *et al.* (2008) 'Tenascin-W, a new marker of cancer stroma, is elevated in sera of colon and breast cancer patients', *International Journal of Cancer*, 122(11), pp. 2454–2461. doi: 10.1002/ijc.23417.
- Demcollari, T. I., Cujba, A.-M. and Sancho, R. (2017) 'Phenotypic plasticity in the pancreas: new triggers, new players', *Current Opinion in Cell Biology*, 49, pp. 38–46. doi: 10.1016/j.ceb.2017.11.014.
- Denton, A. E., Roberts, E. W. and Fearon, D. T. (2018) 'Stromal Cells in the Tumor Microenvironment', in Owens, B. M. J. and Lakins, M. A. (eds) *Stromal Immunology*. Cham: Springer International Publishing (Advances in Experimental Medicine and Biology), pp. 99–114. doi: 10.1007/978-3-319-78127-3_6.
- Derr, L. B., McKae, L. A. and Tucker, R. P. (1998) 'The distribution of tenascin-R in the developing avian nervous system', *The Journal of Experimental Zoology*, 280(2), pp. 152–164.
- Desai, B. M. *et al.* (2007) 'Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet β cell, regeneration', *Journal of Clinical Investigation*, 117(4), pp. 971–977. doi: 10.1172/JCI29988.
- Deschênes-Simard, X., Mizukami, Y. and Bardeesy, N. (2013) 'Macrophages in pancreatic cancer: Starting things off on the wrong track', *Journal of Cell Biology*, 202(3), pp. 403–405. doi: 10.1083/jcb.201307066.
- Dey, P. *et al.* (2014) 'PD2/Paf1 depletion in pancreatic acinar cells promotes acinar-to-ductal metaplasia', *Oncotarget*, 5(12), pp. 4480–4491.
- Di Maggio, F. *et al.* (2016) 'Pancreatic stellate cells regulate blood vessel density in the stroma of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, 16(6), pp. 995–1004. doi: 10.1016/j.pan.2016.05.393.

- Diab, M. *et al.* (2019) 'Pharmacotherapeutic strategies for treating pancreatic cancer: advances and challenges', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(5), pp. 535–546. doi: 10.1080/14656566.2018.1561869.
- Dick, M. K., Miao, J. H. and Limaiem, F. (2020) 'Histology, Fibroblast', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541065/> (Accessed: 26 March 2020).
- Dickson, I. (2017) 'PDAC metastases show identical known driver gene mutations', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(3), pp. 138–138. doi: 10.1038/nrgastro.2017.9.
- van Dijk, M., Göransson, S. A. and Strömblad, S. (2013) 'Cell to extracellular matrix interactions and their reciprocal nature in cancer', *Experimental Cell Research*, 319(11), pp. 1663–1670. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.02.006.
- Ding, Y. *et al.* (2010) 'Modeling pancreatic cancer in vivo: from xenograft and carcinogen-induced systems to genetically engineered mice', *Pancreas*, 39(3), pp. 283–292. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181c15619.
- Ding, Z. *et al.* (2009) 'Glial fibrillary acidic protein promoter targets pancreatic stellate cells', *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 41(3), pp. 229–236. doi: 10.1016/j.dld.2008.05.001.
- Dolenšek, J., Rupnik, M. S. and Stožer, A. (2015) 'Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas', *Islets*, 7(1), p. e1024405. doi: 10.1080/19382014.2015.1024405.
- Dorado, J. *et al.* (2011) 'Pancreatic cancer stem cells: new insights and perspectives', *Journal of Gastroenterology*, 46(8), pp. 966–973. doi: 10.1007/s00535-011-0422-x.
- Drifka, C. R., Loeffler, A. G., Mathewson, K., *et al.* (2016) 'Highly aligned stromal collagen is a negative prognostic factor following pancreatic ductal adenocarcinoma resection', *Oncotarget*, 7(46), pp. 76197–76213. doi: 10.18632/oncotarget.12772.
- Drifka, C. R., Loeffler, A. G., Esquibel, C. R., *et al.* (2016) 'Human pancreatic stellate cells modulate 3D collagen alignment to promote the migration of pancreatic ductal adenocarcinoma cells', *Biomedical Microdevices*, 18(6), p. 105. doi: 10.1007/s10544-016-0128-1.
- Dubost, A. *et al.* (2016) 'New insight of some extracellular matrix molecules in beef muscles. Relationships with sensory qualities', *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 10(5), pp. 821–828. doi: 10.1017/S1751731115002396.
- Ducreux, M. *et al.* (2015) 'Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up', *Annals of Oncology*, 26(suppl_5), pp. v56–v68. doi: 10.1093/annonc/mdv295.
- Dufau, I. *et al.* (2012) 'Multicellular tumor spheroid model (Capan2) to evaluate spatio-temporal dynamics effect of chemotherapeutics: application to the gemcitabine/CHK1 inhibitor combination in pancreatic cancer', *BMC Cancer*, 12(1), p. 15. doi: 10.1186/1471-2407-12-15.
- Dunér, S. *et al.* (2011) 'Pancreatic Cancer: The Role of Pancreatic Stellate Cells in Tumor Progression', *Pancreatology*, 10(6), pp. 673–681. doi: 10.1159/000320711.
- Durbeej, M. (2009) 'Laminins', *Cell and Tissue Research*, 339(1), p. 259. doi: 10.1007/s00441-009-0838-2.
- Egerbacher, M. and Böck, P. (1997) 'Morphology of the pancreatic duct system in mammals', *Microscopy Research and Technique*, 37(5–6), pp. 407–417. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19970601)37:5/6<407::AID-JEMT5>3.0.CO;2-A.
- Egging, D. *et al.* (2007) 'Wound healing in tenascin-X deficient mice suggests that tenascin-X is involved in matrix maturation rather than matrix deposition', *Connective Tissue Research*, 48(2), pp. 93–98. doi: 10.1080/03008200601166160.
- Egging, D. F. *et al.* (2006) 'Dermal connective tissue development in mice: an essential role for tenascin-X', *Cell and Tissue Research*, 323(3), pp. 465–474. doi: 10.1007/s00441-005-0100-5.
- Elaileh, A. *et al.* (2019) 'Promising new treatments for pancreatic cancer in the era of targeted and immune therapies', *American Journal of Cancer Research*, 9(9), pp. 1871–1888.
- Elefteriou, F. *et al.* (1997) 'Characterization of the Bovine Tenascin-X', *Journal of Biological Chemistry*, 272(36), pp. 22866–22874. doi: 10.1074/jbc.272.36.22866.

- Elefteriou, F. *et al.* (1999) 'Cell adhesion to tenascin-X mapping of cell adhesion sites and identification of integrin receptors', *European Journal of Biochemistry*, 263(3), pp. 840–848. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00563.x.
- Elefteriou, F. *et al.* (2001) 'Binding of tenascin-X to decorin', *FEBS letters*, 495(1–2), pp. 44–47.
- Erdogan, B. *et al.* (2017) 'Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin', *The Journal of Cell Biology*, 216(11), pp. 3799–3816. doi: 10.1083/jcb.201704053.
- Erickson, H. P. (1993) 'Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions', *Current Opinion in Cell Biology*, 5(5), pp. 869–876.
- Erickson, H. P. and Bourdon, M. A. (1989) 'Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors', *Annual Review of Cell Biology*, 5, pp. 71–92. doi: 10.1146/annurev.cb.05.110189.000443.
- Erkan, M. *et al.* (2008) 'The Activated Stroma Index Is a Novel and Independent Prognostic Marker in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 6(10), pp. 1155–1161. doi: 10.1016/j.cgh.2008.05.006.
- Erkan, M. *et al.* (2012) *The Impact of the Activated Stroma on Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Biology and Therapy Resistance*, *Current Molecular Medicine*. Available at: <http://www.eurekaselect.com/76372/article> (Accessed: 9 March 2018).
- Erkan, M. (2013) 'Understanding the stroma of pancreatic cancer: co-evolution of the microenvironment with epithelial carcinogenesis', *The Journal of Pathology*, 231(1), pp. 4–7. doi: 10.1002/path.4213.
- Esposito, I. *et al.* (2006) 'Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis', *The Journal of Pathology*, 208(5), pp. 673–685. doi: 10.1002/path.1935.
- Fan, J. *et al.* (2020) 'Current advances and outlooks in immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma', *Molecular Cancer*, 19(1), pp. 1–22. doi: 10.1186/s12943-020-01151-3.
- Farran, B. and Nagaraju, G. P. (2019) 'The dynamic interactions between the stroma, pancreatic stellate cells and pancreatic tumor development: Novel therapeutic targets', *Cytokine & Growth Factor Reviews*. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.07.001.
- Fejes-Tóth, G. and Náray-Fejes-Tóth, A. (2007) 'Early Aldosterone-Regulated Genes in Cardiomyocytes: Clues to Cardiac Remodeling?', *Endocrinology*, 148(4), pp. 1502–1510. doi: 10.1210/en.2006-1438.
- Felsenstein, M., Hruban, R. H. and Wood, L. D. (2018) 'New Developments in the Molecular Mechanisms of Pancreatic Tumorigenesis', *Advances in Anatomic Pathology*, 25(2), pp. 131–142. doi: 10.1097/PAP.000000000000172.
- Fendrich, V. *et al.* (2008) 'Hedgehog Signaling Is Required for Effective Regeneration of Exocrine Pancreas', *Gastroenterology*, 135(2), pp. 621–631.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2008.04.011.
- Ferde, P. E. and Jakubowska, M. A. (2017) 'Biology of pancreatic stellate cells-more than just pancreatic cancer', *Pflugers Archiv: European Journal Of Physiology*, 469(9), pp. 1039–1050. doi: 10.1007/s00424-017-1968-0.
- Fiorino, S. *et al.* (2018) 'Matricellular proteins and survival in patients with pancreatic cancer: A systematic review', *Pancreatology*, 18(1), pp. 122–132. doi: 10.1016/j.pan.2017.11.001.
- Fischer, C. G. and Wood, L. D. (2018) 'From somatic mutation to early detection: insights from molecular characterization of pancreatic cancer precursor lesions', *The Journal of Pathology*, 246(4), pp. 395–404. doi: 10.1002/path.5154.
- Fischer, D. *et al.* (1997) 'Concerted action of tenascin-C domains in cell adhesion, anti-adhesion and promotion of neurite outgrowth', *Journal of Cell Science*, 110(13), pp. 1513–1522.
- Fluck, M., Tunc-Civelek, V. and Chiquet, M. (2000) 'Rapid and reciprocal regulation of tenascin-C and tenascin-Y expression by loading of skeletal muscle', *Journal of Cell Science*, 113(20), pp. 3583–3591.
- Fokas, E. *et al.* (2015) 'Pancreatic ductal adenocarcinoma: From genetics to biology to radiobiology to oncoimmunology and all the way back to the clinic', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1855(1), pp. 61–82. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.12.001.

- Folli, F. *et al.* (2018) 'Pancreatic islet of Langerhans' cytoarchitecture and ultrastructure in normal glucose tolerance and in type 2 diabetes mellitus', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20(S2), pp. 137–144. doi: 10.1111/dom.13380.
- Foster, J. R. (2014) 'A Review of Animal Models of Nonneoplastic Pancreatic Diseases', *Toxicologic Pathology*, 42(1), pp. 243–259. doi: 10.1177/0192623313508479.
- Foucher, E. D. *et al.* (2018) 'Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Strong Imbalance of Good and Bad Immunological Cops in the Tumor Microenvironment', *Frontiers in Immunology*, 9, p. 1044. doi: 10.3389/fimmu.2018.01044.
- Franco-Barraza, J. *et al.* (2017) 'Matrix-regulated integrin $\alpha\beta 5$ maintains $\alpha 5\beta 1$ -dependent desmoplastic traits prognostic of neoplastic recurrence', *eLife*, 6. doi: 10.7554/eLife.20600.
- Franklin, O. *et al.* (2019) 'Novel prognostic markers within the CD44-stromal ligand network in pancreatic cancer', *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 5(2), pp. 130–141. doi: 10.1002/cjp2.122.
- Franz, M. *et al.* (2015) 'Tenascin-C in cardiovascular remodeling: potential impact for diagnosis, prognosis estimation and targeted therapy', *Cell Adhesion & Migration*, 9(1–2), pp. 90–95. doi: 10.1080/19336918.2014.1000075.
- Freitag, S., Schachner, M. and Morellini, F. (2003) 'Behavioral alterations in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R', *Behavioural Brain Research*, 145(1), pp. 189–207. doi: 10.1016/S0166-4328(03)00109-8.
- Friedlander, S. Y. G. *et al.* (2009) 'Context-Dependent Transformation of Adult Pancreatic Cells by Oncogenic K-Ras', *Cancer Cell*, 16(5), pp. 379–389. doi: 10.1016/j.ccr.2009.09.027.
- Froeling, F. E. M. *et al.* (2009) 'Organotypic Culture Model of Pancreatic Cancer Demonstrates that Stromal Cells Modulate E-Cadherin, β -Catenin, and Ezrin Expression in Tumor Cells', *The American Journal of Pathology*, 175(2), pp. 636–648. doi: 10.2353/ajpath.2009.090131.
- Froeling, F. E. M. and Kocher, H. M. (2015) 'Homeostatic Restoration of Desmoplastic Stroma Rather Than Its Ablation Slows Pancreatic Cancer Progression', *Gastroenterology*, 148(4), pp. 849–850. doi: 10.1053/j.gastro.2015.02.043.
- Froeling, F. E. M., Marshall, J. F. and Kocher, H. M. (2010) 'Pancreatic cancer organotypic cultures', *Journal of Biotechnology*, 148(1), pp. 16–23. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.01.008.
- Fu, Y. *et al.* (2018) 'The critical roles of activated stellate cells-mediated paracrine signaling, metabolism and onco-immunology in pancreatic ductal adenocarcinoma', *Molecular Cancer*, 17(1), p. 62. doi: 10.1186/s12943-018-0815-z.
- Fujie, S. *et al.* (2009) 'Tenascin-X Induces Cell Detachment through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(10), pp. 1795–1799. doi: 10.1248/bpb.32.1795.
- Fujita, H. *et al.* (2009) 'Tumor–stromal interactions with direct cell contacts enhance proliferation of human pancreatic carcinoma cells', *Cancer Science*, 100(12), pp. 2309–2317. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01317.x.
- Fuss, B. *et al.* (1993) 'Molecular characterization and in situ mRNA localization of the neural recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to tenascin', *The Journal of Cell Biology*, 120(5), pp. 1237–1249. doi: 10.1083/jcb.120.5.1237.
- Gandhi, N. S. and Mancera, R. L. (2008) 'The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins', *Chemical Biology & Drug Design*, 72(6), pp. 455–482. doi: 10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x.
- Gannon, M., Herrera, P.-L. and Wright, C. V. E. (2000) 'Mosaic Cre-mediated recombination in pancreas using the pdx-1 enhancer/promoter', *genesis*, 26(2), pp. 143–144. doi: 10.1002/(SICI)1526-968X(200002)26:2<143::AID-GENE13>3.0.CO;2-L.
- Gao, H. *et al.* (2015) 'High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response', *Nature Medicine*, 21(11), pp. 1318–1325. doi: 10.1038/nm.3954.
- Garcia, P. E. *et al.* (2020) 'Differential Contribution of Pancreatic Fibroblast Subsets to the Pancreatic Cancer Stroma', *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 10(3), pp. 581–599. doi: 10.1016/j.jcmgh.2020.05.004.

- García-Carracedo, D. *et al.* (2015) 'Smad4 Loss Synergizes with TGF α Overexpression in Promoting Pancreatic Metaplasia, PanIN Development, and Fibrosis', *PLOS ONE*, 10(3), p. e0120851. doi: 10.1371/journal.pone.0120851.
- García-Pravia, C. *et al.* (2013) 'Overexpression of COL11A1 by cancer-associated fibroblasts: clinical relevance of a stromal marker in pancreatic cancer', *PloS One*, 8(10), p. e78327. doi: 10.1371/journal.pone.0078327.
- García-Silva, S., Frias-Aldeguer, J. and Heesch, C. (2013) 'Stem cells & pancreatic cancer', *Pancreatology*, 13(2), pp. 110–113. doi: 10.1016/j.pan.2012.12.003.
- Gasparini, G. *et al.* (2019) 'Nerves and Pancreatic Cancer: New Insights into a Dangerous Relationship', *Cancers*, 11(7). doi: 10.3390/cancers11070893.
- Geffrotin, C. *et al.* (1995) 'Distinct Tissue Distribution in Pigs of Tenascin-X and Tenascin-C Transcripts', *European Journal of Biochemistry*, 231(1), pp. 83–92. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.0083f.x.
- Geffrotin, C. *et al.* (2000) 'Opposite regulation of tenascin-C and tenascin-X in MeLiM swine heritable cutaneous malignant melanoma', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1524(2–3), pp. 196–202.
- Geiger, B. *et al.* (2001) 'Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(11), pp. 793–805. doi: 10.1038/35099066.
- Geiger, B. and Yamada, K. M. (2011) 'Molecular Architecture and Function of Matrix Adhesions', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(5). doi: 10.1101/cshperspect.a005033.
- Gelse, K., Pöschl, E. and Aigner, T. (2003) 'Collagens—structure, function, and biosynthesis', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), pp. 1531–1546. doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002.
- Gerrits, K. H. L. *et al.* (2013) 'Neuromuscular properties of the thigh muscles in patients with Ehlers-Danlos syndrome', *Muscle & Nerve*, 47(1), pp. 96–104. doi: 10.1002/mus.23482.
- Geutskens, S. B. *et al.* (2004) 'Extracellular matrix distribution and islet morphology in the early postnatal pancreas: anomalies in the non-obese diabetic mouse', *Cell and Tissue Research*, 318(3), pp. 579–589. doi: 10.1007/s00441-004-0989-0.
- Gharibi, A. *et al.* (2017) 'ITGA1 is a pre-malignant biomarker that promotes therapy resistance and metastatic potential in pancreatic cancer', *Scientific Reports*, 7(1), p. 10060. doi: 10.1038/s41598-017-09946-z.
- Gharibi, A., Adamian, Y. and Kelber, J. A. (2016) 'Cellular and molecular aspects of pancreatic cancer', *Acta histochemica*, 118(3), pp. 305–316. doi: 10.1016/j.acthis.2016.01.009.
- Giblin, S. P. and Midwood, K. S. (2015) 'Tenascin-C: Form versus function', *Cell Adhesion & Migration*, 9(1–2), pp. 48–82. doi: 10.4161/19336918.2014.987587.
- Gidekel Friedlander, S. Y. *et al.* (2009) 'Context-Dependent Transformation of Adult Pancreatic Cells by Oncogenic K-Ras', *Cancer cell*, 16(5), pp. 379–389. doi: 10.1016/j.ccr.2009.09.027.
- Giovannetti, E. *et al.* (2017) 'Never let it go: Stopping key mechanisms underlying metastasis to fight pancreatic cancer', *Seminars in Cancer Biology*, 44, pp. 43–59. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.04.006.
- Giroux, V. and Rustgi, A. K. (2017) 'Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia–cancer sequence', *Nature Reviews Cancer*, 17(10), pp. 594–604. doi: 10.1038/nrc.2017.68.
- Gitelman, S. E., Bristow, J. and Miller, W. L. (1992) 'Mechanism and consequences of the duplication of the human C4/P450c21/gene X locus.', *Molecular and Cellular Biology*, 12(7), pp. 3313–3314. doi: 10.1128/MCB.12.7.3313-b.
- Giussani, M. *et al.* (2019) 'Tumor Extracellular Matrix Remodeling: New Perspectives as a Circulating Tool in the Diagnosis and Prognosis of Solid Tumors', *Cells*, 8(2), p. 81. doi: 10.3390/cells8020081.
- Gkretsi, V. *et al.* (2015) 'Remodeling Components of the Tumor Microenvironment to Enhance Cancer Therapy', *Frontiers in Oncology*, 5. doi: 10.3389/fonc.2015.00214.
- Gobin, E. *et al.* (2019) 'A pan-cancer perspective of matrix metalloproteases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential', *BMC Cancer*, 19(1), p. 581. doi: 10.1186/s12885-019-5768-0.

- Gocheva, V. *et al.* (2017) 'Quantitative proteomics identify Tenascin-C as a promoter of lung cancer progression and contributor to a signature prognostic of patient survival', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(28), pp. E5625–E5634. doi: 10.1073/pnas.1707054114.
- Gopinathan, A. *et al.* (2015) 'GEMMs as preclinical models for testing pancreatic cancer therapies', *Disease Models & Mechanisms*, 8(10), pp. 1185–1200. doi: 10.1242/dmm.021055.
- Gore, J. and Korc, M. (2014) 'Pancreatic Cancer Stroma: Friend or Foe?', *Cancer Cell*, 25(6), pp. 711–712. doi: 10.1016/j.ccr.2014.05.026.
- Gouirand, V. and Vasseur, S. (2018) 'Fountain of youth of pancreatic cancer cells: the extracellular matrix', *Cell Death Discovery*, 4. doi: 10.1038/s41420-017-0004-7.
- Gout, J. *et al.* (2013) 'The conditional expression of KRAS G12D in mouse pancreas induces disorganization of endocrine islets prior the onset of ductal pre-cancerous lesions', *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, 13(3), pp. 191–195. doi: 10.1016/j.pan.2013.02.001.
- Graham, J. S. *et al.* (2015) 'Pancreatic cancer genomics: where can the science take us?', *Clinical Genetics*, 88(3), pp. 213–219. doi: 10.1111/cge.12536.
- Grant, T. J., Hua, K. and Singh, A. (2016) 'Chapter Six - Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer', in Pruitt, K. (ed.) *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Academic Press (Molecular and Cellular Changes in the Cancer Cell), pp. 241–275. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.09.008.
- Grapin-Botton, A. (2005) 'Ductal cells of the pancreas', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(3), pp. 504–510. doi: 10.1016/j.biocel.2004.07.010.
- Greenhalf, W. *et al.* (2009) 'Screening of High-Risk Families for Pancreatic Cancer', *Pancreatology*, 9(3), pp. 215–222. doi: 10.1159/000210262.
- Gremlich, S. *et al.* (2020) 'Tenascin-C inactivation impacts lung structure and function beyond lung development', *Scientific Reports*, 10(1), p. 5118. doi: 10.1038/s41598-020-61919-x.
- Gress, D. M. *et al.* (2017) 'Principles of Cancer Staging', in Amin, M. B. *et al.* (eds) *AJCC Cancer Staging Manual*. Cham: Springer International Publishing, pp. 3–30. doi: 10.1007/978-3-319-40618-3_1.
- Grippo, P. J. *et al.* (2011) 'Visualization of Mouse Pancreas Architecture Using MR Microscopy', *The American Journal of Pathology*, 179(2), pp. 610–618. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.04.007.
- Grützmann, R. *et al.* (2010) 'Intraductal Papillary Mucinous Tumors of the Pancreas: Biology, Diagnosis, and Treatment', *The Oncologist*, 15(12), pp. 1294–1309. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0151.
- Grzesiak, J. J. and Bouvet, M. (2006) 'The alpha2beta1 integrin mediates the malignant phenotype on type I collagen in pancreatic cancer cell lines', *British Journal of Cancer*, 94(9), pp. 1311–1319. doi: 10.1038/sj.bjc.6603088.
- Guerra, C. and Barbacid, M. (2013) 'Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma', *Molecular Oncology*, 7(2), pp. 232–247. doi: 10.1016/j.molonc.2013.02.002.
- Guo, J., Xie, K. and Zheng, S. (2016) 'Molecular Biomarkers of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Their Implications in Early Diagnosis and Therapeutic Intervention of Pancreatic Cancer', *International Journal of Biological Sciences*, 12(3), pp. 292–301. doi: 10.7150/ijbs.14995.
- Gupta, S. *et al.* (2010) 'Risk of pancreatic cancer by alcohol dose, duration, and pattern of consumption, including binge drinking: a population-based study', *Cancer Causes & Control*, 21(7), pp. 1047–1059. doi: 10.1007/s10552-010-9533-6.
- Gustafsson, E. and Fässler, R. (2000) 'Insights into Extracellular Matrix Functions from Mutant Mouse Models', *Experimental Cell Research*, 261(1), pp. 52–68. doi: 10.1006/excr.2000.5042.
- Habbe, N. *et al.* (2008) 'Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), pp. 18913–18918. doi: 10.1073/pnas.0810097105.
- Habener, J. F., Kemp, D. M. and Thomas, M. K. (2005) 'Minireview: Transcriptional Regulation in Pancreatic Development', *Endocrinology*, 146(3), pp. 1025–1034. doi: 10.1210/en.2004-1576.

- Haerberle, L. and Esposito, I. (2019) 'Pathology of pancreatic cancer', *Translational Gastroenterology and Hepatology*, 4, p. 50. doi: 10.21037/tgh.2019.06.02.
- Halbrook, C. J. *et al.* (2016) 'Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Activity Maintains Acinar-to-Ductal Metaplasia and Is Required for Organ Regeneration in Pancreatitis', *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 3(1), pp. 99–118. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.09.009.
- Hale, M. A. *et al.* (2005) 'The homeodomain protein PDX1 is required at mid-pancreatic development for the formation of the exocrine pancreas', *Developmental Biology*, 286(1), pp. 225–237. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.07.026.
- Hamacher, R. *et al.* (2008) 'Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma', *Molecular Cancer*, 7, p. 64. doi: 10.1186/1476-4598-7-64.
- Hamada, S. *et al.* (2012) 'Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 421(2), pp. 349–354. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.014.
- Hamada, S. and Masamune, A. (2018) 'Elucidating the link between collagen and pancreatic cancer: what's next?', *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, pp. 1–3. doi: 10.1080/17474124.2018.1448268.
- Hamada, S., Masamune, A. and Shimosegawa, T. (2013) 'Alteration of pancreatic cancer cell functions by tumor-stromal cell interaction', *Frontiers in Physiology*, 4, p. 318. doi: 10.3389/fphys.2013.00318.
- Hanada, K. *et al.* (2015) 'Diagnostic strategies for early pancreatic cancer', *Journal of Gastroenterology*, 50(2), pp. 147–154. doi: 10.1007/s00535-014-1026-z.
- Hasegawa, K. *et al.* (1997) 'Differential expression of tenascin-C and tenascin-X in human astrocytomas', *Acta Neuropathologica*, 93(5), pp. 431–437. doi: 10.1007/s004010050636.
- Hashimoto, K. *et al.* (2018) 'Wound healing-related properties detected in an experimental model with a collagen gel contraction assay are affected in the absence of tenascin-X', *Experimental Cell Research*, 363(1), pp. 102–113. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.12.025.
- Hassan, M. M. *et al.* (2007) 'Risk Factors for Pancreatic Cancer: Case-Control Study', *The American journal of gastroenterology*, 102(12), pp. 2696–2707. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01510.x.
- Hauge, A. and Rofstad, E. K. (2020) 'Antifibrotic therapy to normalize the tumor microenvironment', *Journal of Translational Medicine*, 18(1), p. 207. doi: 10.1186/s12967-020-02376-y.
- Haugk, B. (2010) 'Pancreatic intraepithelial neoplasia – can we detect early pancreatic cancer?', *Histopathology*, 57(4), pp. 503–514. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03610.x.
- Hayden, M. R. *et al.* (2008) 'Attenuation of Endocrine-Exocrine Pancreatic Communication in Type 2 Diabetes: Pancreatic Extracellular Matrix Ultrastructural Abnormalities', *Journal of the cardiometabolic syndrome*, 3(4), pp. 234–243. doi: 10.1111/j.1559-4572.2008.00024.x.
- van Heek, N. T. *et al.* (2002) 'Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia', *The American Journal of Pathology*, 161(5), pp. 1541–1547. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64432-X.
- Hegyí, P. and Petersen, O. H. (2013) 'The exocrine pancreas: the acinar-ductal tango in physiology and pathophysiology', *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 165, pp. 1–30. doi: 10.1007/112_2013_14.
- Heinemann, V. *et al.* (2008) 'Meta-analysis of randomized trials: evaluation of benefit from gemcitabine-based combination chemotherapy applied in advanced pancreatic cancer', *BMC Cancer*, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/1471-2407-8-82.
- Heisenberg, C.-P. and Fässler, R. (2012) 'Cell–cell adhesion and extracellular matrix: diversity counts', *Current Opinion in Cell Biology*, 24(5), pp. 559–561. doi: 10.1016/j.ceb.2012.09.002.
- Helms, E., Onate, M. K. and Sherman, M. H. (2020) 'Fibroblast Heterogeneity in the Pancreatic Tumor Microenvironment', *Cancer Discovery*. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-1353.
- Henke, E., Nandigama, R. and Ergün, S. (2020) 'Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6. doi: 10.3389/fmolb.2019.00160.

- Henry, B. M. *et al.* (2019) 'Development of the human pancreas and its vasculature — An integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects', *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 221, pp. 115–124. doi: 10.1016/j.aanat.2018.09.008.
- Herreros-Villanueva, M. *et al.* (2012) 'Mouse models of pancreatic cancer', *World Journal of Gastroenterology*, 18(12), pp. 1286–1294. doi: 10.3748/wjg.v18.i12.1286.
- Herrmann, D. *et al.* (2014) 'Three-dimensional cancer models mimic cell–matrix interactions in the tumour microenvironment', *Carcinogenesis*, 35(8), pp. 1671–1679. doi: 10.1093/carcin/bgu108.
- Hessmann, E. *et al.* (2018) 'Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer', *Gut*, 67(3), pp. 497–507. doi: 10.1136/gutjnl-2016-311954.
- Hidalgo, M. *et al.* (2014) 'Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research', *Cancer Discovery*, 4(9), pp. 998–1013. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0001.
- Hidalgo, M. *et al.* (2015) 'Addressing the challenges of pancreatic cancer: Future directions for improving outcomes', *Pancreatology*, 15(1), pp. 8–18. doi: 10.1016/j.pan.2014.10.001.
- Hingorani, S. R. *et al.* (2003) 'Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse', *Cancer Cell*, 4(6), pp. 437–450. doi: 10.1016/S1535-6108(03)00309-X.
- Hingorani, S. R. *et al.* (2005) 'Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice', *Cancer Cell*, 7(5), pp. 469–483. doi: 10.1016/j.ccr.2005.04.023.
- Hirata, E. and Sahai, E. (2017) 'Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(7), p. a026781. doi: 10.1101/cshperspect.a026781.
- Hoang, C. Q. *et al.* (2016) 'Transcriptional Maintenance of Pancreatic Acinar Identity, Differentiation, and Homeostasis by PTF1A', *Molecular and Cellular Biology*, 36(24), pp. 3033–3047. doi: 10.1128/MCB.00358-16.
- Hohenester, E. (2019) 'Structural biology of laminins', *Essays in Biochemistry*, 63(3), pp. 285–295. doi: 10.1042/EBC20180075.
- Holly, E. A. *et al.* (2004) 'Signs and symptoms of pancreatic cancer: a population-based case-control study in the San Francisco Bay area', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2(6), pp. 510–517. doi: 10.1016/S1542-3565(04)00171-5.
- Houbracken, I. *et al.* (2011) 'Lineage Tracing Evidence for Transdifferentiation of Acinar to Duct Cells and Plasticity of Human Pancreas', *Gastroenterology*, 141(2), pp. 731-741.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.050.
- Hruban, R. H. *et al.* (2000) 'Progression Model for Pancreatic Cancer', *Clinical Cancer Research*, 6(8), pp. 2969–2972.
- Hruban, R. H. *et al.* (2001) 'Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: A New Nomenclature and Classification System for Pancreatic Duct Lesions', *The American Journal of Surgical Pathology*, 25(5), pp. 579–586.
- Hruban, R. H. *et al.* (2004) 'An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms', *The American Journal of Surgical Pathology*, 28(8), pp. 977–987. doi: 10.1097/01.pas.0000126675.59108.80.
- Hruban, R. H. *et al.* (2007) 'Clinical importance of precursor lesions in the pancreas', *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 14(3), pp. 255–263. doi: 10.1007/s00534-006-1170-9.
- Hruban, R. H. *et al.* (2019) 'Why is pancreatic cancer so deadly? The pathologist's view', *The Journal of Pathology*, 248(2), pp. 131–141. doi: 10.1002/path.5260.
- Hruban, R. H., Maitra, A. and Goggins, M. (2008) 'Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 1(4), pp. 306–316.
- Hruban, R. H., Wilentz, R. E. and Maitra, A. (2005) 'Identification and analysis of precursors to invasive pancreatic cancer', *Methods in Molecular Medicine*, 103, pp. 1–13. doi: 10.1385/1-59259-780-7:001.
- Hsia, H. C. and Schwarzbauer, J. E. (2005) 'Meet the Tenascins: Multifunctional and Mysterious', *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), pp. 26641–26644. doi: 10.1074/jbc.R500005200.

- Hu, D. *et al.* (2019) 'Stromal fibronectin expression in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma', *World Journal of Surgical Oncology*, 17(1), p. 29. doi: 10.1186/s12957-019-1574-z.
- Huang, W. *et al.* (2001) 'Interference of Tenascin-C with Syndecan-4 Binding to Fibronectin Blocks Cell Adhesion and Stimulates Tumor Cell Proliferation', *Cancer Research*, 61(23), pp. 8586–8594.
- Huang, W. *et al.* (2009) 'Tenascin-R distinct domains modulate migration of neural stem/progenitor cells in vitro', *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 45(1), pp. 10–14. doi: 10.1007/s11626-008-9145-6.
- Hughes, S. J. *et al.* (2005) 'Comparison of the Collagen VI Content Within the Islet-Exocrine Interface of the Head, Body, and Tail Regions of the Human Pancreas', *Transplantation Proceedings*, 37(8), pp. 3444–3445. doi: 10.1016/j.transproceed.2005.09.027.
- Humphrey, J. D., Dufresne, E. R. and Schwartz, M. A. (2014) 'Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), pp. 802–812. doi: 10.1038/nrm3896.
- Hwang, H. J. *et al.* (2019) 'Multiplex quantitative analysis of stroma-mediated cancer cell invasion, matrix remodeling, and drug response in a 3D co-culture model of pancreatic tumor spheroids and stellate cells', *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), p. 258. doi: 10.1186/s13046-019-1225-9.
- Hwang, R. F. *et al.* (2008) 'Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression', *Cancer Research*, 68(3), pp. 918–926. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5714.
- Hynes, R. O. (2009) 'The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils', *Science*, 326(5957), pp. 1216–1219. doi: 10.1126/science.1176009.
- Hynes, R. O. and Naba, A. (2012) 'Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1). doi: 10.1101/cshperspect.a004903.
- Ijichi, H. *et al.* (2006) 'Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor- β signaling in cooperation with active Kras expression', *Genes & Development*, 20(22), pp. 3147–3160. doi: 10.1101/gad.1475506.
- Ijichi, H. (2011) 'Genetically-engineered mouse models for pancreatic cancer: Advances and current limitations', *World Journal of Clinical Oncology*, 2(5), pp. 195–202. doi: 10.5306/wjco.v2.i5.195.
- Ikejiri, N. (1990) 'The vitamin A-storing cells in the human and rat pancreas', *The Kurume Medical Journal*, 37(2), pp. 67–81. doi: 10.2739/kurumemedj.37.67.
- Ikuta, T. *et al.* (1998) 'Structural analysis of mouse tenascin-X: evolutionary aspects of reduplication of FNIII repeats in the tenascin gene family', *Gene*, 217(1–2), pp. 1–13.
- Ikuta, T., Ariga, H. and Matsumoto, K. (2000) 'Extracellular matrix tenascin-X in combination with vascular endothelial growth factor B enhances endothelial cell proliferation', *Genes to Cells*, 5(11), pp. 913–927. doi: 10.1046/j.1365-2443.2000.00376.x.
- Ikuta, T., Ariga, H. and Matsumoto, K. (2001) 'Effect of Tenascin-X Together with Vascular Endothelial Growth Factor A on Cell Proliferation in Cultured Embryonic Hearts', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(11), pp. 1320–1323. doi: 10.1248/bpb.24.1320.
- Imanaka-Yoshida, K. *et al.* (2003) 'The dynamic expression of tenascin-C and tenascin-X during early heart development in the mouse', *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 71(4–5), pp. 291–298.
- Imanaka-Yoshida, K. and Matsumoto, K.-I. (2018) 'Multiple Roles of Tenascins in Homeostasis and Pathophysiology of Aorta', *Annals of Vascular Diseases*, 11(2), pp. 169–180. doi: 10.3400/avd.ra.17-00118.
- Imura, K. and Sato, I. (2009) 'Identification of the novel localization of tenascinX in the monkey choroid plexus and comparison with the mouse', *European journal of histochemistry: EJH*, 53(4), p. e27. doi: 10.4081/ejh.2009.e27.
- Iozzo, R. V. and Gubbiotti, M. A. (2018) 'Extracellular Matrix: The driving force of mammalian diseases', *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 71–72, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.023.

- Iozzo, R. V. and Schaefer, L. (2015) 'Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans', *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 42, pp. 11–55. doi: 10.1016/j.matbio.2015.02.003.
- Isaji, S. *et al.* (2018) 'International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017', *Pancreatology*, 18(1), pp. 2–11. doi: 10.1016/j.pan.2017.11.011.
- Ishitsuka, T. *et al.* (2009) 'Serum Tenascin-X Strongly Binds to Vascular Endothelial Growth Factor', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(6), pp. 1004–1011. doi: 10.1248/bpb.32.1004.
- Izeradjene, K. *et al.* (2007) 'KrasG12D and Smad4/Dpc4 Haploinsufficiency Cooperate to Induce Mucinous Cystic Neoplasms and Invasive Adenocarcinoma of the Pancreas', *Cancer Cell*, 11(3), pp. 229–243. doi: 10.1016/j.ccr.2007.01.017.
- Jackson, E. L. *et al.* (2001) 'Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras', *Genes & Development*, 15(24), pp. 3243–3248. doi: 10.1101/gad.943001.
- Jacobetz, M. A. *et al.* (2013) 'Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer', *Gut*, 62(1), pp. 112–120. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302529.
- Jahkola, T. *et al.* (1998) 'Tenascin-C expression in invasion border of early breast cancer: a predictor of local and distant recurrence.', *British Journal of Cancer*, 78(11), pp. 1507–1513.
- Jakovcevski, I. *et al.* (2013) 'Tenascins and inflammation in disorders of the nervous system', *Amino Acids*, 44(4), pp. 1115–1127. doi: 10.1007/s00726-012-1446-0.
- Jakubowska, M. A. *et al.* (2016) 'Nitric oxide signals are interlinked with calcium signals in normal pancreatic stellate cells upon oxidative stress and inflammation', *Open Biology*, 6(8). doi: 10.1098/rsob.160149.
- Janson, I. A. and Putnam, A. J. (2015) 'Extracellular matrix elasticity and topography: Material-based cues that affect cell function via conserved mechanisms', *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(3), pp. 1246–1258. doi: 10.1002/jbm.a.35254.
- Jennings, R. E. *et al.* (2015) 'Human pancreas development', *Development*, 142(18), pp. 3126–3137. doi: 10.1242/dev.120063.
- Jensen, J. N. *et al.* (2005) 'Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration', *Gastroenterology*, 128(3), pp. 728–741. doi: 10.1053/j.gastro.2004.12.008.
- Jiang, Y. and Lu, S. (2013) 'Exploring the dermal “template effect” and its structure', *Molecular Biology Reports*, 40(8), pp. 4837–4841. doi: 10.1007/s11033-013-2580-9.
- Jiang, Y., Tong, Y. and Lu, S. (2014) 'Visualizing the three-dimensional mesoscopic structure of dermal tissues', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(10), pp. 794–800. doi: 10.1002/term.1579.
- Jin, G. *et al.* (2020) 'Molecular Mechanism of Pancreatic Stellate Cells Activation in Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer', *Journal of Cancer*, 11(6), pp. 1505–1515. doi: 10.7150/jca.38616.
- Jin, K. and Xiang, M. (2019) 'Transcription factor Ptf1a in development, diseases and reprogramming', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(5), pp. 921–940. doi: 10.1007/s00018-018-2972-z.
- Jodele, S. *et al.* (2006) 'Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression', *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(1), pp. 35–43. doi: 10.1007/s10555-006-7887-8.
- Joester, A. and Faissner, A. (2001) 'The structure and function of tenascins in the nervous system', *Matrix Biology*, 20(1), pp. 13–22. doi: 10.1016/S0945-053X(00)00136-0.
- Johnson, B. L. *et al.* (2019) 'Desmoplasia and oncogene driven acinar-to-ductal metaplasia are concurrent events during acinar cell-derived pancreatic cancer initiation in young adult mice', *PLOS ONE*, 14(9), p. e0221810. doi: 10.1371/journal.pone.0221810.
- Johnson, L. *et al.* (2001) 'Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice', *Nature*, 410(6832), pp. 1111–1116. doi: 10.1038/35074129.
- Jones, F. S. *et al.* (1989) 'A detailed structural model of cytotactin: protein homologies, alternative RNA splicing, and binding regions', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(6), pp. 1905–1909. doi: 10.1073/pnas.86.6.1905.

- Jones, P. L. and Jones, F. S. (2000) 'Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function', *Matrix Biology*, 19(7), pp. 581–596. doi: 10.1016/S0945-053X(00)00106-2.
- Junliang, L. *et al.* (2019) 'High-molecular-weight hyaluronan produced by activated pancreatic stellate cells promotes pancreatic cancer cell migration via paracrine signaling', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 515(3), pp. 493–498. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.05.167.
- Juuti, A. (2004) 'Tenascin C expression is upregulated in pancreatic cancer and correlates with differentiation', *Journal of Clinical Pathology*, 57(11), pp. 1151–1155. doi: 10.1136/jcp.2003.015818.
- Kääriäinen, E. *et al.* (2006) 'Switch to an invasive growth phase in melanoma is associated with tenascin-C, fibronectin, and procollagen-I forming specific channel structures for invasion', *The Journal of Pathology*, 210(2), pp. 181–191. doi: 10.1002/path.2045.
- Kadry, Y. A. and Calderwood, D. A. (2020) 'Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(5), p. 183206. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183206.
- Kai, F., Drain, A. P. and Weaver, V. M. (2019) 'The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey', *Developmental Cell*, 49(3), pp. 332–346. doi: 10.1016/j.devcel.2019.03.026.
- Kajitani, N. *et al.* (2019) 'TNX deficiency results in bone loss due to an increase in multinucleated osteoclasts', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 512(4), pp. 659–664. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.134.
- Kalli, M. *et al.* (2018) 'Solid Stress Facilitates Fibroblasts Activation to Promote Pancreatic Cancer Cell Migration', *Annals of Biomedical Engineering*, 46(5), pp. 657–669. doi: 10.1007/s10439-018-1997-7.
- Kamarajah, S. K. *et al.* (2017) 'Validation of the American Joint Commission on Cancer (AJCC) 8th Edition Staging System for Patients with Pancreatic Adenocarcinoma: A Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Analysis', *Annals of Surgical Oncology*, 24(7), pp. 2023–2030. doi: 10.1245/s10434-017-5810-x.
- Karamanos, N. K. *et al.* (2018) 'Proteoglycan Chemical Diversity Drives Multifunctional Cell Regulation and Therapeutics', *Chemical Reviews*, 118(18), pp. 9152–9232. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00354.
- Karamanos, N. K. (2019) 'Extracellular matrix: key structural and functional meshwork in health and disease', *The FEBS Journal*, 286(15), pp. 2826–2829. doi: 10.1111/febs.14992.
- Karamitopoulou, E. (2013) 'Tumor budding cells, cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition-type cells in pancreatic cancer', *Frontiers in Oncology*, 2. doi: 10.3389/fonc.2012.00209.
- Karnevi, E. *et al.* (2016) 'Impact by pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer cell invasion: Adding a third dimension in vitro', *Experimental Cell Research*, 346(2), pp. 206–215. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.07.017.
- Karsdal, M. A. *et al.* (2020) 'Collagen biology and non-invasive biomarkers of liver fibrosis', *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 40(4), pp. 736–750. doi: 10.1111/liv.14390.
- Kato, A. *et al.* (2008) 'Induction of truncated form of tenascin-X (XB-S) through dissociation of HDAC1 from SP-1/HDAC1 complex in response to hypoxic conditions', *Experimental Cell Research*, 314(14), pp. 2661–2673. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.05.019.
- Katz, E. and Streuli, C. H. (2007) 'The extracellular matrix as an adhesion checkpoint for mammary epithelial function', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(4), pp. 715–726. doi: 10.1016/j.biocel.2006.11.004.
- Kechagia, J. Z., Ivaska, J. and Roca-Cusachs, P. (2019) 'Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(8), pp. 457–473. doi: 10.1038/s41580-019-0134-2.
- Keleg, S. *et al.* (2003) 'Invasion and metastasis in pancreatic cancer', *Molecular Cancer*, 2, p. 14. doi: 10.1186/1476-4598-2-14.
- Khan, M. A. *et al.* (2017) 'Molecular Drivers of Pancreatic Cancer Pathogenesis: Looking Inward to Move Forward', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), p. 779. doi: 10.3390/ijms18040779.

- Kibe, S. *et al.* (2019) 'Cancer-associated acinar-to-ductal metaplasia within the invasive front of pancreatic cancer contributes to local invasion', *Cancer Letters*, 444, pp. 70–81. doi: 10.1016/j.canlet.2018.12.005.
- Kikuta, K. *et al.* (2010) 'Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 403(3), pp. 380–384. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.040.
- Kim, M. P. *et al.* (2009) 'Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice', *Nature Protocols*, 4(11), pp. 1670–1680. doi: 10.1038/nprot.2009.171.
- Kim, S. K. and MacDonald, R. J. (2002) 'Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis', *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(5), pp. 540–547. doi: 10.1016/S0959-437X(02)00338-6.
- Kim, S.-H., Turnbull, J. and Guimond, S. (2011) 'Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor', *Journal of Endocrinology*, 209(2), pp. 139–151. doi: 10.1530/JOE-10-0377.
- Kim, Yikwon *et al.* (2014) 'Comparative Proteomic Profiling of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines', *Molecules and Cells*, 37(12), pp. 888–898. doi: 10.14348/molcells.2014.0207.
- Kimura, H. *et al.* (2007) 'Tenascin-W inhibits proliferation and differentiation of preosteoblasts during endochondral bone formation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(4), pp. 935–941. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.071.
- Kindler, T. *et al.* (2008) 'K-RasG12D-induced T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemias harbor Notch1 mutations and are sensitive to γ -secretase inhibitors', *Blood*, 112(8), pp. 3373–3382. doi: 10.1182/blood-2008-03-147587.
- Kirkegård, J. *et al.* (2018) 'Acute Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Nationwide Matched-Cohort Study in Denmark', *Gastroenterology*, 154(6), pp. 1729–1736. doi: 10.1053/j.gastro.2018.02.011.
- Kirkegård, J., Mortensen, F. V. and Cronin-Fenton, D. (2017) 'Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis', *The American Journal of Gastroenterology*, 112(9), pp. 1366–1372. doi: 10.1038/ajg.2017.218.
- Kleeff, J. *et al.* (2007) 'Pancreatic cancer microenvironment', *International Journal of Cancer*, 121(4), pp. 699–705. doi: 10.1002/ijc.22871.
- Kleeff, J. *et al.* (2016) 'Pancreatic cancer', *Nature Reviews Disease Primers*, 2, p. 16022. doi: 10.1038/nrdp.2016.22.
- Kleeff, J. *et al.* (2017) 'Chronic pancreatitis', *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, p. 17060. doi: 10.1038/nrdp.2017.60.
- Klein, W. M. *et al.* (2002) 'Direct Correlation between Proliferative Activity and Dysplasia in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN): Additional Evidence for a Recently Proposed Model of Progression', *Modern Pathology*, 15(4), pp. 441–447. doi: 10.1038/modpathol.3880544.
- Knapinska, A. M., Estrada, C.-A. and Fields, G. B. (2017) 'Chapter Nine - The Roles of Matrix Metalloproteinases in Pancreatic Cancer', in Khalil, R. A. (ed.) *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Academic Press (Matrix Metalloproteinases and Tissue Remodeling in Health and Disease: Target Tissues and Therapy), pp. 339–354. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.03.004.
- Koikawa, K. *et al.* (2018) 'Pancreatic stellate cells reorganize matrix components and lead pancreatic cancer invasion via the function of Endo180', *Cancer Letters*, 412, pp. 143–154. doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.010.
- Kojima, K. *et al.* (2007) 'Inactivation of Smad4 Accelerates KrasG12D-Mediated Pancreatic Neoplasia', *Cancer Research*, 67(17), pp. 8121–8130. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4167.
- Kong, B. *et al.* (2011) 'From tissue turnover to the cell of origin for pancreatic cancer', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8(8), pp. 467–472. doi: 10.1038/nrgastro.2011.114.
- Kong, B., Michalski, C. W. and Kleeff, J. (2009) 'Tumor initiating cells in pancreatic cancer: A critical view', *World Journal of Stem Cells*, 1(1), pp. 8–10. doi: 10.4252/wjsc.v1.i1.8.
- Kong, K. *et al.* (2020) 'Progress in Animal Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Journal of Cancer*, 11(6), pp. 1555–1567. doi: 10.7150/jca.37529.

- Königer, J. *et al.* (2004) 'Pancreatic tumor cells influence the composition of the extracellular matrix', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(3), pp. 943–949. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.008.
- Kopp, J. L. *et al.* (2012) 'Identification of Sox9-Dependent Acinar-to-Ductal Reprogramming as the Principal Mechanism for Initiation of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Cancer Cell*, 22(6), pp. 737–750. doi: 10.1016/j.ccr.2012.10.025.
- Kopp, J. L., Grompe, M. and Sander, M. (2016) 'Stem cells versus plasticity in liver and pancreas regeneration', *Nature Cell Biology*, 18(3), pp. 238–245. doi: 10.1038/ncb3309.
- Korc, M. *et al.* (2017) 'Tobacco and alcohol as risk factors for pancreatic cancer', *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 31(5), pp. 529–536. doi: 10.1016/j.bpg.2017.09.001.
- Kozlova, N. *et al.* (2020) 'The Interplay of the Extracellular Matrix and Stromal Cells as a Drug Target in Stroma-Rich Cancers', *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(3), pp. 183–198. doi: 10.1016/j.tips.2020.01.001.
- Krah, N. M. *et al.* (2015) 'The acinar differentiation determinant PTF1A inhibits initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma', *eLife*. Edited by M. R. Green, 4, p. e07125. doi: 10.7554/eLife.07125.
- Kramer, M. *et al.* (2015) *Secretome Identifies Tenascin-X as a Potent Marker of Ovarian Cancer*, *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2015/208017.
- Krempley, B. D. and Yu, K. H. (2017) 'Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Chinese Clinical Oncology*, 6(3). doi: 10.21037/cco.v6i3.15430.
- Kular, J. K., Basu, S. and Sharma, R. I. (2014) 'The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering', *Journal of Tissue Engineering*, 5, p. 2041731414557112. doi: 10.1177/2041731414557112.
- Kusiak, A. A. *et al.* (2020) 'Signaling in the Physiology and Pathophysiology of Pancreatic Stellate Cells – a Brief Review of Recent Advances', *Frontiers in Physiology*, 11. doi: 10.3389/fphys.2020.00078.
- Lachowski, D. *et al.* (2017) 'Substrate Rigidity Controls Activation and Durotaxis in Pancreatic Stellate Cells', *Scientific Reports*, 7(1), p. 2506. doi: 10.1038/s41598-017-02689-x.
- Lai, E. *et al.* (2019) 'New therapeutic targets in pancreatic cancer', *Cancer Treatment Reviews*, 81. doi: 10.1016/j.ctrv.2019.101926.
- Lam, D. *et al.* (2019) 'Tissue-specific extracellular matrix accelerates the formation of neural networks and communities in a neuron-glia co-culture on a multi-electrode array', *Scientific Reports*, 9(1), p. 4159. doi: 10.1038/s41598-019-40128-1.
- Lambert, E. *et al.* (2004) 'TIMPs as multifacial proteins', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 49(3), pp. 187–198. doi: 10.1016/j.critrevonc.2003.09.008.
- Lampi, M. C. and Reinhart-King, C. A. (2018) 'Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: From molecular mechanisms to clinical trials', *Science Translational Medicine*, 10(422). doi: 10.1126/scitranslmed.aao0475.
- Lange, J. *et al.* (2013) 'Intrachromosomal homologous recombination between inverted amplicons on opposing Y-chromosome arms', *Genomics*, 102(4), pp. 257–264. doi: 10.1016/j.ygeno.2013.04.018.
- Langevin, H. M., Nedergaard, M. and Howe, A. K. (2013) 'Cellular control of connective tissue matrix tension', *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(8), pp. 1714–1719. doi: 10.1002/jcb.24521.
- Langley, R. R. and Fidler, I. J. (2011) 'The seed and soil hypothesis revisited—The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs', *International Journal of Cancer*, 128(11), pp. 2527–2535. doi: 10.1002/ijc.26031.
- Langlois, B. *et al.* (2014) 'AngioMatrix, a signature of the tumor angiogenic switch-specific matrisome, correlates with poor prognosis for glioma and colorectal cancer patients', *Oncotarget*, 5(21), pp. 10529–10545. doi: 10.18632/oncotarget.2470.
- Large, T. Y. S. L. *et al.* (2020) 'Microdissected pancreatic cancer proteomes reveal tumor heterogeneity and therapeutic targets', *JCI Insight*. doi: 10.1172/jci.insight.138290.

- Larsen, H. L. and Grapin-Botton, A. (2017) 'The molecular and morphogenetic basis of pancreas organogenesis', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 66, pp. 51–68. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.01.005.
- Larsen, M. *et al.* (2006) 'The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling', *Current Opinion in Cell Biology*, 18(5), pp. 463–471. doi: 10.1016/j.ceb.2006.08.009.
- Lazzari, G. *et al.* (2018) 'Multicellular spheroid based on a triple co-culture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity', *Acta Biomaterialia*, 78, pp. 296–307. doi: 10.1016/j.actbio.2018.08.008.
- Le Large, T. Y. S. *et al.* (2017) 'Key biological processes driving metastatic spread of pancreatic cancer as identified by multi-omics studies', *Seminars in Cancer Biology*, 44, pp. 153–169. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.03.008.
- Lee, A. Y. L. *et al.* (2018) 'Cell of origin affects tumour development and phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma', *Gut*. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314426.
- Lee, J. W. *et al.* (2016) 'Genetically Engineered Mouse Models of Pancreatic Cancer: The KPC Model (LSL-KrasG12D/+;LSL-Trp53R172H/+;Pdx-1-Cre), Its Variants and Their Application in Immuno-oncology Drug Discovery', *Current protocols in pharmacology / editorial board, S.J. Enna (editor-in-chief) ... [et al.]*, 73, p. 14.39.1-14.39.20. doi: 10.1002/cpph.2.
- Lee, S. O. *et al.* (2008) 'Tenascin-X and leukemia inhibitory factor receptor are down-regulated in leiomyoma compared with normal myometrium', *Journal of Gynecologic Oncology*, 19(2), pp. 139–144. doi: 10.3802/jgo.2008.19.2.139.
- Lei, F. *et al.* (2019) 'Combination Therapies and Drug Delivery Platforms in Combating Pancreatic Cancer', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 370(3), pp. 682–694. doi: 10.1124/jpet.118.255786.
- Leins, A. *et al.* (2003) 'Expression of tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma', *Cancer*, 98(11), pp. 2430–2439. doi: 10.1002/cncr.11796.
- Leiphrakpam, P. D. *et al.* (2019) 'Role of keratan sulfate expression in human pancreatic cancer malignancy', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-019-46046-6.
- Leong, N. L. *et al.* (2020) 'Tendon and Ligament Healing and Current Approaches to Tendon and Ligament Regeneration', *Journal of Orthopaedic Research*, 38(1), pp. 7–12. doi: 10.1002/jor.24475.
- Leppänen, J. *et al.* (2019) 'Tenascin C, Fibronectin, and Tumor-Stroma Ratio in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Pancreas*, 48(1), pp. 43–48. doi: 10.1097/MPA.0000000000001195.
- Lethias, C. *et al.* (1996) 'Flexilin: a new extracellular matrix glycoprotein localized on collagen fibrils', *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 15(1), pp. 11–19.
- Lethias Claire *et al.* (2006) 'A model of tenascin-X integration within the collagenous network', *FEBS Letters*, 580(26), pp. 6281–6285. doi: 10.1016/j.febslet.2006.10.037.
- Lévy, P. *et al.* (2007) 'Microarray-Based Identification of Tenascin C and Tenascin XB, Genes Possibly Involved in Tumorigenesis Associated with Neurofibromatosis Type 1', *Clinical Cancer Research*, 13(2), pp. 398–407. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0182.
- Li, C. *et al.* (2020) 'Pancreatic Stellate Cells Promote Tumor Progression by Promoting an Immunosuppressive Microenvironment in Murine Models of Pancreatic Cancer', *Pancreas*, 49(1), pp. 120–127. doi: 10.1097/MPA.0000000000001464.
- Li, N., Zhao, X. and You, S. (2019) 'Identification of key regulators of pancreatic ductal adenocarcinoma using bioinformatics analysis of microarray data', *Medicine*, 98(2), p. e14074. doi: 10.1097/MD.00000000000014074.
- Li, T. F. *et al.* (2000) 'Distribution of tenascin-X in different synovial samples and synovial membrane-like interface tissue from aseptic loosening of total hip replacement', *Rheumatology International*, 19(5), pp. 177–183. doi: 10.1007/s002960000044.
- Li, W.-C. *et al.* (2010) 'Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats', *Journal of Cell Science*, 123(16), pp. 2792–2802. doi: 10.1242/jcs.065268.

- Li, X. *et al.* (2014) 'Extracellular lumican inhibits pancreatic cancer cell growth and is associated with prolonged survival after surgery', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(24), pp. 6529–6540. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0970.
- Li, X. *et al.* (2017) 'Prolonged exposure to extracellular lumican restrains pancreatic adenocarcinoma growth', *Oncogene*, 36(38), pp. 5432–5438. doi: 10.1038/onc.2017.125.
- Li, Z.-L. *et al.* (2020) 'Changes in extracellular matrix in different stages of colorectal cancer and their effects on proliferation of cancer cells', *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 12(3), pp. 267–275. doi: 10.4251/wjgo.v12.i3.267.
- Liang, C. *et al.* (2017) 'Complex roles of the stroma in the intrinsic resistance to gemcitabine in pancreatic cancer: where we are and where we are going', *Experimental & Molecular Medicine*, 49(12), p. e406. doi: 10.1038/emm.2017.255.
- Liao, H. *et al.* (2005) 'Tenascin-R Plays a Role in Neuroprotection via Its Distinct Domains That Coordinate to Modulate the Microglia Function', *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), pp. 8316–8323. doi: 10.1074/jbc.M412730200.
- Lightner, V. A. and Erickson, H. P. (1990) 'Binding of hexabrachion (tenascin) to the extracellular matrix and substratum and its effect on cell adhesion', *Journal of Cell Science*, 95(2), pp. 263–277.
- Ligorio, M. *et al.* (2019) 'Stromal Microenvironment Shapes the Intratumoral Architecture of Pancreatic Cancer', *Cell*, 178(1), pp. 160–175.e27. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.012.
- Lim, G., Kang, S.-J. and Lee, J. Y. (2020) 'Novel invasion indices quantify the feed-forward facilitation of tumor invasion by macrophages', *Scientific Reports*, 10, p. 718. doi: 10.1038/s41598-020-57517-6.
- Liot, S. *et al.* (2020) 'Loss of Tenascin-X expression during tumor progression: A new pan-cancer marker', *Matrix Biology Plus*, p. 100021. doi: 10.1016/j.mbplus.2020.100021.
- Liot, S. *et al.* (2021) 'Stroma involvement in pancreatic ductal adenocarcinoma: an overview focusing on extracellular matrix proteins', *Frontiers in Immunology*, 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.612271.
- Liou, G.-Y. *et al.* (2013) 'Macrophage-secreted cytokines drive pancreatic acinar-to-ductal metaplasia through NF- κ B and MMPs', *Journal of Cell Biology*, 202(3), pp. 563–577. doi: 10.1083/jcb.201301001.
- Liu, C. *et al.* (2018) 'Application of the Eighth Edition of the American Joint Committee on Cancer Staging for Pancreatic Adenocarcinoma', *Pancreas*, 47(6), pp. 742–747. doi: 10.1097/MPA.0000000000001073.
- Liu, J. *et al.* (2016) 'TGF- β 1 promotes acinar to ductal metaplasia of human pancreatic acinar cells', *Scientific Reports*, 6(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep30904.
- Liu, T. *et al.* (2019) 'Cancer-Associated Fibroblasts Build and Secure the Tumor Microenvironment', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. doi: 10.3389/fcell.2019.00060.
- Liu, Y. *et al.* (2017) 'Role of microenvironmental periostin in pancreatic cancer progression', *Oncotarget*, 8(52), pp. 89552–89565. doi: 10.18632/oncotarget.11533.
- Löhr, M. *et al.* (1996) 'Expression and Function of Receptors for Extracellular Matrix Proteins in Human Ductal Adenocarcinomas of the Pancreas', *Pancreas*, 12(3), pp. 248–259.
- Lonardo, E. *et al.* (2012) 'Pancreatic stellate cells form a niche for cancer stem cells and promote their self-renewal and invasiveness', *Cell Cycle*, 11(7), pp. 1282–1290. doi: 10.4161/cc.19679.
- Longati, P. *et al.* (2013) '3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing', *BMC cancer*, 13, p. 95. doi: 10.1186/1471-2407-13-95.
- Longnecker, D. S. (2014) 'Anatomy and Histology of the Pancreas', *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*. doi: 10.3998/panc.2014.3.
- Longnecker, D. S., Shinozuka, H. and Dekker, A. (1980) 'Focal acinar cell dysplasia in human pancreas', *Cancer*, 45(3), pp. 534–540. doi: 10.1002/1097-0142(19800201)45:3<534::AID-CNCR2820450320>3.0.CO;2-G.
- Longo, V. *et al.* (2016) 'Angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma: A controversial issue', *Oncotarget*, 7(36), pp. 58649–58658. doi: 10.18632/oncotarget.10765.

- Lowy, C. M. and Oskarsson, T. (2015) 'Tenascin C in metastasis: A view from the invasive front', *Cell Adhesion & Migration*, 9(1–2), pp. 112–124. doi: 10.1080/19336918.2015.1008331.
- Lu, P. *et al.* (2011) 'Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), p. a005058. doi: 10.1101/cshperspect.a005058.
- Lu, P., Weaver, V. M. and Werb, Z. (2012) 'The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression', *Journal of Cell Biology*, 196(4), pp. 395–406. doi: 10.1083/jcb.201102147.
- Luan, H. *et al.* (2020) *Identification of Key Prognostic Biomarker and Its Correlation with Immune Infiltrates in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Disease Markers*. Hindawi. doi: <https://doi.org/10.1155/2020/8825997>.
- Lunardi, S., Muschel, R. J. and Brunner, T. B. (2014) 'The stromal compartments in pancreatic cancer: Are there any therapeutic targets?', *Cancer Letters*, 343(2), pp. 147–155. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.039.
- Luo, G. *et al.* (2012) 'Stroma and pancreatic ductal adenocarcinoma: An interaction loop', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1826(1), pp. 170–178. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.04.002.
- Lüttges, J. *et al.* (2000) 'The grade of pancreatic ductal carcinoma is an independent prognostic factor and is superior to the immunohistochemical assessment of proliferation', *The Journal of Pathology*, 191(2), pp. 154–161. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200006)191:2<154::AID-PATH603>3.0.CO;2-C.
- Lv, K. *et al.* (2019) 'Identification of key candidate genes for pancreatic cancer by bioinformatics analysis', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(1), pp. 451–458. doi: 10.3892/etm.2019.7619.
- Ma, F. *et al.* (2019) 'In Depth Quantification of Extracellular Matrix Proteins from Human Pancreas', *Journal of proteome research*, 18(8), pp. 3156–3165. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00241.
- Ma, Y. *et al.* (2019) 'Identification of potential hub genes associated with the pathogenesis and prognosis of pancreatic duct adenocarcinoma using bioinformatics meta-analysis of multi-platform datasets', *Oncology Letters*, 18(6), pp. 6741–6751. doi: 10.3892/ol.2019.11042.
- MacDonald, R. J., Swift, G. H. and Real, F. X. (2010) 'Chapter 1 - Transcriptional Control of Acinar Development and Homeostasis', in Kaestner, K. H. (ed.) *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Academic Press (Development, Differentiation and Disease of the Para-Alimentary Tract), pp. 1–40. doi: 10.1016/B978-0-12-385233-5.00001-5.
- Mace, T. A., Bloomston, M. and Lesinski, G. B. (2013) 'Pancreatic cancer-associated stellate cells: A viable target for reducing immunosuppression in the tumor microenvironment', *Oncoimmunology*, 2(7), p. e24891. doi: 10.4161/onci.24891.
- Mackie, E. J., Halfter, W. and Liverani, D. (1988) 'Induction of tenascin in healing wounds', *The Journal of Cell Biology*, 107(6 Pt 2), pp. 2757–2767. doi: 10.1083/jcb.107.6.2757.
- Magnuson, M. A. and Osipovich, A. B. (2013) 'Pancreas-specific Cre driver lines and considerations for their prudent use', *Cell metabolism*, 18(1), pp. 9–20. doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.011.
- Maitra, A. and Hruban, R. H. (2008) 'Pancreatic Cancer', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 3(1), pp. 157–188. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154305.
- Maitra, A., Kern, S. E. and Hruban, R. H. (2006) 'Molecular pathogenesis of pancreatic cancer', *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 20(2), pp. 211–226. doi: 10.1016/j.bpg.2005.10.002.
- Makohon-Moore, A. and Iacobuzio-Donahue, C. A. (2016) 'Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective', *Nature Reviews Cancer*, 16(9), pp. 553–565. doi: 10.1038/nrc.2016.66.
- Makohon-Moore, A. P. *et al.* (2017) 'Limited heterogeneity of known driver gene mutations among the metastases of individual patients with pancreatic cancer', *Nature Genetics*, 49(3), pp. 358–366. doi: 10.1038/ng.3764.
- Mann, K. M. *et al.* (2016) 'KRAS-related proteins in pancreatic cancer', *Pharmacology & Therapeutics*, 168, pp. 29–42. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.09.003.
- Mao, J. R. *et al.* (2002) 'Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition', *Nature Genetics*, 30(4), pp. 421–425. doi: 10.1038/ng850.
- Margaron, Y. *et al.* (2010) 'Tenascin-X increases the stiffness of collagen gels without affecting fibrillogenesis', *Biophysical Chemistry*, 147(1–2), pp. 87–91. doi: 10.1016/j.bpc.2009.12.011.

- Martina, E., Degen, M., Rüegg, C., *et al.* (2010) 'Tenascin-W is a specific marker of glioma-associated blood vessels and stimulates angiogenesis in vitro', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(3), pp. 778–787. doi: 10.1096/fj.09-140491.
- Martina, E., Degen, M., Ruegg, C., *et al.* (2010) 'Tenascin-W is a specific marker of glioma-associated blood vessels and stimulates angiogenesis in vitro', *The FASEB Journal*, 24(3), pp. 778–787. doi: 10.1096/fj.09-140491.
- Martina, E., Chiquet-Ehrismann, R. and Brellier, F. (2010) 'Tenascin-W: an extracellular matrix protein associated with osteogenesis and cancer', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(9), pp. 1412–1415. doi: 10.1016/j.biocel.2010.06.004.
- Marzoq, A. J. *et al.* (2019) 'Impact of the secretome of activated pancreatic stellate cells on growth and differentiation of pancreatic tumour cells', *Scientific Reports*, 9(1), p. 5303. doi: 10.1038/s41598-019-41740-x.
- Masamune, A. *et al.* (2008) 'Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(4), pp. G709–G717. doi: 10.1152/ajpgi.90356.2008.
- Masamune, A. and Shimosegawa, T. (2015) 'Pancreatic stellate cells: A dynamic player of the intercellular communication in pancreatic cancer', *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 39, pp. S98–S103. doi: 10.1016/j.clinre.2015.05.018.
- Massagué, J. (2008) 'TGF β in Cancer', *Cell*, 134(2), pp. 215–230. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.001.
- Mato, E. *et al.* (2009) 'Identification of a pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in the pancreas', *Biochemical Journal*, 421(2), pp. 181–191. doi: 10.1042/BJ20081466.
- Matsuda, Y. (2019) 'Age-related morphological changes in the pancreas and their association with pancreatic carcinogenesis', *Pathology International*, 69(8), pp. 450–462. doi: 10.1111/pin.12837.
- Matsumoto, K. *et al.* (1994) 'The distribution of tenascin-X is distinct and often reciprocal to that of tenascin-C', *The Journal of Cell Biology*, 125(2), pp. 483–493.
- Matsumoto, K. *et al.* (2001) 'Tumour invasion and metastasis are promoted in mice deficient in tenascin-X', *Genes to Cells*, 6(12), pp. 1101–1111. doi: 10.1046/j.1365-2443.2001.00482.x.
- Matsumoto, K.-I., Sawa, H., *et al.* (2002) 'Distribution of extracellular matrix tenascin-X in sciatic nerves', *Acta Neuropathologica*, 104(5), pp. 448–454. doi: 10.1007/s00401-002-0577-x.
- Matsumoto, K.-I., Takahashi, K., *et al.* (2002) 'Invasion of melanoma in double knockout mice lacking tenascin-X and tenascin-C', *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 93(9), pp. 968–975.
- Matsumoto, K.-I. *et al.* (2004) 'Induction of matrix metalloproteinase-2 by tenascin-X deficiency is mediated through the c-Jun N-terminal kinase and protein tyrosine kinase phosphorylation pathway', *Experimental Cell Research*, 297(2), pp. 404–414. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.03.041.
- Matsumoto, K.-I. *et al.* (2012) 'Noticeable decreased expression of tenascin-X in calcific aortic valves', *Connective Tissue Research*, 53(6), pp. 460–468. doi: 10.3109/03008207.2012.702818.
- Mauch, C., Krieg, T. and Bauer, E. A. (1994) 'Role of the extracellular matrix in the degradation of connective tissue', *Archives of Dermatological Research*, 287(1), pp. 107–114. doi: 10.1007/BF00370728.
- Mazur, P. K. *et al.* (2010) 'Identification of Epidermal Pdx1 Expression Discloses Different Roles of Notch1 and Notch2 in Murine KrasG12D-Induced Skin Carcinogenesis In Vivo', *PLOS ONE*, 5(10), p. e13578. doi: 10.1371/journal.pone.0013578.
- Mazur, P. K. *et al.* (2015) 'Current Methods in Mouse Models of Pancreatic Cancer', in Eferl, R. and Casanova, E. (eds) *Mouse Models of Cancer: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer (Methods in Molecular Biology), pp. 185–215. doi: 10.1007/978-1-4939-2297-0_9.
- Mazur, P. K. and Siveke, J. T. (2012) 'Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology', *Gut*, 61(10), pp. 1488–1500. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300756.

- McCarroll, J. A. *et al.* (2014) 'Role of pancreatic stellate cells in chemoresistance in pancreatic cancer', *Frontiers in Physiology*, 5, p. 141. doi: 10.3389/fphys.2014.00141.
- McNiven, M. A. (2013) 'Breaking Away: Matrix Remodeling From the Leading Edge', *Trends in cell biology*, 23(1), pp. 16–21. doi: 10.1016/j.tcb.2012.08.009.
- Means, A. L. *et al.* (2005) 'Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates', *Development*, 132(16), pp. 3767–3776. doi: 10.1242/dev.01925.
- Mecham, R. P. (2012) 'Overview of Extracellular Matrix', *Current Protocols in Cell Biology*, 57(1), p. 10.1.1-10.1.16. doi: 10.1002/0471143030.cb1001s57.
- Mei, L., Du, W. and Ma, W. W. (2016) 'Targeting stromal microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma: controversies and promises', *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 7(3), pp. 487–494.
- Melloul, D., Marshak, S. and Cerasi, E. (2002) 'Regulation of pdx-1 Gene Expression', *Diabetes*, 51(suppl 3), pp. S320–S325. doi: 10.2337/diabetes.51.2007.S320.
- Meloty-Kapella, C. V. *et al.* (2006) 'Avian tenascin-W: Expression in smooth muscle and bone, and effects on calvarial cell spreading and adhesion in vitro', *Developmental Dynamics*, 235(6), pp. 1532–1542. doi: 10.1002/dvdy.20731.
- Meloty-Kapella, C. V. *et al.* (2008) 'Effects of tenascin-W on osteoblasts in vitro', *Cell and Tissue Research*, 334(3), p. 445. doi: 10.1007/s00441-008-0715-4.
- Menke, A. *et al.* (2001) 'Down-Regulation of E-Cadherin Gene Expression by Collagen Type I and Type III in Pancreatic Cancer Cell Lines', *Cancer Research*, 61(8), pp. 3508–3517.
- Midwood, K. *et al.* (2009) 'Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease', *Nature Medicine*, 15(7), pp. 774–780. doi: 10.1038/nm.1987.
- Midwood, K. S. *et al.* (2011) 'Advances in tenascin-C biology', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 68(19), pp. 3175–3199. doi: 10.1007/s00018-011-0783-6.
- Midwood, K. S. *et al.* (2016) 'Tenascin-C at a glance', *Journal of Cell Science*, 129(23), pp. 4321–4327. doi: 10.1242/jcs.190546.
- Midwood, K. S. and Orend, G. (2009) 'The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis', *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3(3), pp. 287–310. doi: 10.1007/s12079-009-0075-1.
- Midwood, K. S., Williams, L. V. and Schwarzbauer, J. E. (2004a) 'Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(6), pp. 1031–1037. doi: 10.1016/j.biocel.2003.12.003.
- Midwood, K. S., Williams, L. V. and Schwarzbauer, J. E. (2004b) 'Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(6), pp. 1031–1037. doi: 10.1016/j.biocel.2003.12.003.
- Mihaljevic, A. L. *et al.* (2010) 'Molecular mechanism of pancreatic cancer—understanding proliferation, invasion, and metastasis', *Langenbeck's Archives of Surgery*, 395(4), pp. 295–308. doi: 10.1007/s00423-010-0622-5.
- Miller, W. L. (2021) 'Tenascin-X—Discovery and Early Research', *Frontiers in Immunology*, 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.612497.
- Minamitani, T. *et al.* (2004) 'Modulation of collagen fibrillogenesis by tenascin-X and type VI collagen', *Experimental Cell Research*, 298(1), pp. 305–315. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.04.030.
- Minamitani, T., Ariga, H. and Matsumoto, K. (2002) 'Adhesive Defect in Extracellular Matrix Tenascin-X-Null Fibroblasts: A Possible Mechanism of Tumor Invasion', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(11), pp. 1472–1475. doi: 10.1248/bpb.25.1472.
- Minamitani, T., Ariga, H. and Matsumoto, K. (2000) 'Transcription factor Sp1 activates the expression of the mouse tenascin-X gene', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267(2), pp. 626–631. doi: 10.1006/bbrc.1999.2006.

- Mithieux, S. M. and Weiss, A. S. (2005) 'Elastin', in *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press (Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers), pp. 437–461. doi: 10.1016/S0065-3233(05)70013-9.
- Miura, F. *et al.* (2006) 'Diagnosis of pancreatic cancer', *HPB*, 8(5), pp. 337–342. doi: 10.1080/13651820500540949.
- Miyai, Y. *et al.* (2020) 'Cancer-associated fibroblasts that restrain cancer progression: Hypotheses and perspectives', *Cancer Science*, 111(4), pp. 1047–1057. doi: 10.1111/cas.14346.
- Miyatsuka, T. *et al.* (2006) 'Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation', *Genes & Development*, 20(11), pp. 1435–1440. doi: 10.1101/gad.1412806.
- Mizutani, Y. *et al.* (2019) 'Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit Pancreatic Carcinogenesis', *Cancer Research*, 79(20), pp. 5367–5381. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0454.
- Mohan, V., Das, A. and Sagi, I. (2020) 'Emerging roles of ECM remodeling processes in cancer', *Seminars in Cancer Biology*, 62, pp. 192–200. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.004.
- Moir, J. A. G., Mann, J. and White, S. A. (2015) 'The role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer', *Surgical Oncology*, 24(3), pp. 232–238. doi: 10.1016/j.suronc.2015.05.002.
- Molina-Montes, E. *et al.* (2020) 'Pancreatic cancer risk in relation to lifetime smoking patterns, tobacco type, and dose-response relationships', *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-1027.
- Mollenhauer, J., Roether, I. and Kern, H. F. (1987) 'Distribution of Extracellular Matrix Proteins in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Influence on Tumor Cell Proliferation in Vitro', *Pancreas*, 2(1), pp. 14–24.
- Mongiat, M. *et al.* (2019) 'Extracellular matrix: the gatekeeper of tumor angiogenesis', *Biochemical Society Transactions*, 47(5), pp. 1543–1555. doi: 10.1042/BST20190653.
- Monti, P. *et al.* (2004) 'A comprehensive in vitro characterization of pancreatic ductal carcinoma cell line biological behavior and its correlation with the structural and genetic profile', *Virchows Archiv*, 445(3), pp. 236–247. doi: 10.1007/s00428-004-1053-x.
- Morawski, M. *et al.* (2014) 'Tenascin-R promotes assembly of the extracellular matrix of perineuronal nets via clustering of aggrecan', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1654), p. 20140046. doi: 10.1098/rstb.2014.0046.
- Moreira, L. *et al.* (2018) 'Pancreas 3D Organoids: Current and Future Aspects as a Research Platform for Personalized Medicine in Pancreatic Cancer', *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 5(3), pp. 289–298. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.12.004.
- Morris, J. P., Wang, S. C. and Hebrok, M. (2010) 'KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Nature Reviews Cancer*, 10, pp. 683–695. doi: 10.1038/nrc2899.
- Morton, J. P. *et al.* (2010) 'LKB1 haploinsufficiency cooperates with Kras to promote pancreatic cancer through suppression of p21-dependent growth arrest', *Gastroenterology*, 139(2), pp. 586–597, 597.e1–6. doi: 10.1053/j.gastro.2010.04.055.
- Mössner, J. (2010) 'New Advances in Cell Physiology and Pathophysiology of the Exocrine Pancreas', *Digestive Diseases*, 28(6), pp. 722–728. doi: 10.1159/000324279.
- Motta, P. M. *et al.* (1997) 'Histology of the exocrine pancreas', *Microscopy Research and Technique*, 37(5–6), pp. 384–398. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19970601)37:5/6<384::AID-JEMT3>3.0.CO;2-E.
- Moutasim, K. A., Nystrom, M. L. and Thomas, G. J. (2011) 'Cell Migration and Invasion Assays', in Cree, I. A. (ed.) *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology), pp. 333–343. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_27.
- Mulhaupt, H. A. B. *et al.* (2016) 'Extracellular matrix component signaling in cancer', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, pp. 28–40. doi: 10.1016/j.addr.2015.10.013.
- Munasinghe, A. *et al.* (2020) 'Fibronectin acts as a molecular switch to determine SPARC function in pancreatic cancer', *Cancer Letters*, 477, pp. 88–96. doi: 10.1016/j.canlet.2020.02.031.

- Muncie, J. M. and Weaver, V. M. (2018) 'The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate', *Current topics in developmental biology*, 130, pp. 1–37. doi: 10.1016/bs.ctdb.2018.02.002.
- Munger, J. S. and Sheppard, D. (2011) 'Cross Talk among TGF- β Signaling Pathways, Integrins, and the Extracellular Matrix', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), p. a005017. doi: 10.1101/cshperspect.a005017.
- Murakami, T. *et al.* (2019) 'Role of the tumor microenvironment in pancreatic cancer', *Annals of Gastroenterological Surgery*, 3(2), pp. 130–137. doi: 10.1002/ags3.12225.
- Murphy-Ullrich, J. E. and Sage, E. H. (2014) 'Revisiting the matricellular concept', *Matrix Biology*, 37, pp. 1–14. doi: 10.1016/j.matbio.2014.07.005.
- Murtaugh, L. C. (2014) 'Pathogenesis of pancreatic cancer: lessons from animal models', *Toxicologic Pathology*, 42(1), pp. 217–228. doi: 10.1177/0192623313508250.
- Murtaugh, L. C. and Keefe, M. (2015) 'Regeneration and Repair of the Exocrine Pancreas', *Annual review of physiology*, 77, pp. 229–249. doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071727.
- Muschler, G. F. and Midura, R. J. (2002) 'Connective Tissue Progenitors: Practical Concepts for Clinical Applications', *A Publication of The Association of Bone and Joint Surgeons® | CORR®*, 395, pp. 66–80.
- Muthuswamy, S. K. (2017) 'Bringing together the organoid field: from early beginnings to the road ahead', *Development*, 144(6), pp. 963–967. doi: 10.1242/dev.144444.
- Naba, A. *et al.* (2016) 'The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era', *Matrix Biology*, 49, pp. 10–24. doi: 10.1016/j.matbio.2015.06.003.
- Nagara, T. S. and Wang, H. (2019) 'Modification of the 8 th AJCC staging system of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 9(1), pp. 95–97–97. doi: 10.21037/hbsn.2019.08.01.
- Nagtegaal, I. D. *et al.* (2020) 'The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system', *Histopathology*, 76(2), pp. 182–188. doi: 10.1111/his.13975.
- Najafi, M., Farhood, B. and Mortezaee, K. (2019) 'Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers', *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(3), pp. 2782–2790. doi: 10.1002/jcb.27681.
- Nakajima, Y., Yamada, T. and Sho, M. (2010) 'Malignant potential of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas', *Surgery Today*, 40(9), pp. 816–824. doi: 10.1007/s00595-009-4227-y.
- Nakayama, K. *et al.* (2019) 'Tenascin XB Is a Novel Diagnostic Marker for Malignant Mesothelioma', *Anticancer Research*, 39(2), pp. 627–633. doi: 10.21873/anticancer.13156.
- Nallanthighal, S., Heiserman, J. P. and Cheon, D.-J. (2019) 'The Role of the Extracellular Matrix in Cancer Stemness', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. doi: 10.3389/fcell.2019.00086.
- Naudin, S. *et al.* (2019) 'Healthy lifestyle and the risk of pancreatic cancer in the EPIC study', *European Journal of Epidemiology*. doi: 10.1007/s10654-019-00559-6.
- Nazemi, M. and Rainero, E. (2020) 'Cross-Talk Between the Tumor Microenvironment, Extracellular Matrix, and Cell Metabolism in Cancer', *Frontiers in Oncology*, 10. doi: 10.3389/fonc.2020.00239.
- Neesse, A. *et al.* (2015) 'Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm', *Gut*, 64(9), pp. 1476–1484. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309304.
- Neidhardt, J. *et al.* (2003) 'Tenascin-N: characterization of a novel member of the tenascin family that mediates neurite repulsion from hippocampal explants', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 23(2), pp. 193–209. doi: 10.1016/S1044-7431(03)00012-5.
- Neri, S. *et al.* (2016) 'Cancer cell invasion driven by extracellular matrix remodeling is dependent on the properties of cancer-associated fibroblasts', *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 142(2), pp. 437–446. doi: 10.1007/s00432-015-2046-7.
- Neuzillet, C. *et al.* (2014) 'Perspectives of TGF- β inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas', *Oncotarget*, 5(1), pp. 78–94. doi: 10.18632/oncotarget.1569.

- Neuzillet, C. *et al.* (2018) 'Pancreatic cancer: French clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, ACHBT, AFC)', *Digestive and Liver Disease*, 50(12), pp. 1257–1271. doi: 10.1016/j.dld.2018.08.008.
- Neuzillet, C. *et al.* (2019) 'Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma', *The Journal of Pathology*, 248(1), pp. 51–65. doi: 10.1002/path.5224.
- Nezwek, T. A. and Varacallo, M. (2020) 'Physiology, Connective Tissue', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542226/> (Accessed: 24 March 2020).
- Ni, W.-D. *et al.* (2017) 'Tenascin-C is a potential cancer-associated fibroblasts marker and predicts poor prognosis in prostate cancer', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(3), pp. 607–612. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.021.
- Nielsen, M. F. B., Mortensen, M. B. and Detlefsen, S. (2016) 'Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells', *World Journal of Gastroenterology*, 22(9), pp. 2678–2700. doi: 10.3748/wjg.v22.i9.2678.
- Nielsen, M. F. B., Mortensen, M. B. and Detlefsen, S. (2017) 'Identification of markers for quiescent pancreatic stellate cells in the normal human pancreas', *Histochemistry And Cell Biology*, 148(4), pp. 359–380. doi: 10.1007/s00418-017-1581-5.
- Nielsen, M. F. B., Mortensen, M. B. and Detlefsen, S. (2018) 'Typing of pancreatic cancer-associated fibroblasts identifies different subpopulations', *World Journal of Gastroenterology*, 24(41), pp. 4663–4678. doi: 10.3748/wjg.v24.i41.4663.
- Nies, D. E. *et al.* (1991) 'The complete cDNA sequence of human hexabrachion (Tenascin). A multidomain protein containing unique epidermal growth factor repeats.', *Journal of Biological Chemistry*, 266(5), pp. 2818–2823.
- Nishimori, H. *et al.* (2001) 'A new peritoneal dissemination model established from the human pancreatic cancer cell line', *Pancreas*, 22(4), pp. 348–356. doi: 10.1097/00006676-200105000-00003.
- Nörenberg, U. *et al.* (1992) 'The chicken neural extracellular matrix molecule restrictin: similarity with EGF-, fibronectin type III-, and fibrinogen-like motifs', *Neuron*, 8(5), pp. 849–863. doi: 10.1016/0896-6273(92)90199-n.
- Nörenberg, U., Hubert, M. and Rathjen, F. G. (1996) 'Structural and Functional Characterization of Tenascin-R (restrictin), an Extracellular Matrix Glycoprotein of Glial Cells and Neurons', *International Journal of Developmental Neuroscience*, 14(3), pp. 217–231. doi: 10.1016/0736-5748(96)00009-3.
- Norris, R. A. *et al.* (2007) 'Periostin Regulates Collagen Fibrillogenesis and the Biomechanical Properties of Connective Tissues', *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(3), pp. 695–711. doi: 10.1002/jcb.21224.
- Noso, S. *et al.* (2010) 'Insulin Transactivator MafA Regulates Intrathymic Expression of Insulin and Affects Susceptibility to Type 1 Diabetes', *Diabetes*, 59(10), pp. 2579–2587. doi: 10.2337/db10-0476.
- Nyström, M. L. *et al.* (2005) 'Development of a quantitative method to analyse tumour cell invasion in organotypic culture', *The Journal of Pathology*, 205(4), pp. 468–475. doi: 10.1002/path.1716.
- Obberghen-Schilling, E. V. *et al.* (2011) 'Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth', *International Journal of Developmental Biology*, 55(4–5), pp. 511–525. doi: 10.1387/ijdb.103243eo.
- Ogawa, Y. *et al.* (2020) 'Three distinct stroma types in human pancreatic cancer identified by image analysis of fibroblast subpopulations and collagen', *Clinical Cancer Research*, p. clincanres.2298.2020. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2298.
- Öhlund, D. *et al.* (2013) 'Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop', *BMC Cancer*, 13(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/1471-2407-13-154.
- Öhlund, D. *et al.* (2017) 'Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer', *The Journal of Experimental Medicine*, 214(3), pp. 579–596. doi: 10.1084/jem.20162024.

- Olivares, O. *et al.* (2017) 'Collagen-derived proline promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell survival under nutrient limited conditions', *Nature Communications*, 8, p. 16031. doi: 10.1038/ncomms16031.
- Olive, K. P. (2015) 'Stroma, Stroma Everywhere (Far More Than You Think)', *Clinical Cancer Research*, 21(15), pp. 3366–3368. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0416.
- Omary, M. B. *et al.* (2007) 'The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases', *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), pp. 50–59. doi: 10.1172/JCI30082.
- Orend, G. and Chiquet-Ehrismann, R. (2000) 'Adhesion Modulation by Antiadhesive Molecules of the Extracellular Matrix', *Experimental Cell Research*, 261(1), pp. 104–110. doi: 10.1006/excr.2000.5041.
- Orend, G. and Chiquet-Ehrismann, R. (2006) 'Tenascin-C induced signaling in cancer', *Cancer Letters*, 244(2), pp. 143–163. doi: 10.1016/j.canlet.2006.02.017.
- Oskarsson, T. *et al.* (2011) 'Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs', *Nature Medicine*, 17(7), pp. 867–874. doi: 10.1038/nm.2379.
- Oskarsson, T. and Massagué, J. (2012) 'Extracellular matrix players in metastatic niches', *The EMBO Journal*, 31(2), pp. 254–256. doi: 10.1038/emboj.2011.469.
- Ottenhof, N. A. *et al.* (2009) 'Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Pancreatic Tumorigenesis: Of Mice and Men', *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 133(3), pp. 375–381. doi: 10.1043/1543-2165-133.3.375.
- Özdemir, B. C. *et al.* (2014) 'Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival', *Cancer Cell*, 25(6), pp. 719–734. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.005.
- Pan, F. C. and Brissova, M. (2014) 'Pancreas development in humans', *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 21(2), pp. 77–82. doi: 10.1097/MED.0000000000000047.
- Pan, F. C. and Wright, C. (2011) 'Pancreas organogenesis: From bud to plexus to gland', *Developmental Dynamics*, 240(3), pp. 530–565. doi: 10.1002/dvdy.22584.
- Pandiri, A. R. (2014) 'Overview of Exocrine Pancreatic Pathobiology', *Toxicologic pathology*, 42(1), pp. 207–216. doi: 10.1177/0192623313509907.
- Pandol, S. J. (2010) *The Exocrine Pancreas*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences (Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54128/> (Accessed: 11 February 2020).
- Pannala, R. *et al.* (2009) 'New-onset Diabetes: A Potential Clue to the Early Diagnosis of Pancreatic Cancer', *The lancet oncology*, 10(1), p. 88. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70337-1.
- Paolillo, M. and Schinelli, S. (2019) 'Extracellular Matrix Alterations in Metastatic Processes', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), p. 4947. doi: 10.3390/ijms20194947.
- Park, J. Y. *et al.* (2011) 'Pdx1 Expression in Pancreatic Precursor Lesions and Neoplasms', *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, 19(5), pp. 444–449. doi: 10.1097/PAI.0b013e318206d958.
- Paron, I. *et al.* (2011) 'Tenascin-C Enhances Pancreatic Cancer Cell Growth and Motility and Affects Cell Adhesion through Activation of the Integrin Pathway', *PLOS ONE*, 6(6), p. e21684. doi: 10.1371/journal.pone.0021684.
- Parsa, I. *et al.* (1985) 'Ductal Metaplasia of Human Exocrine Pancreas and Its Association with Carcinoma', *Cancer Research*, 45(3), pp. 1285–1290.
- Pastushenko, I. and Blanpain, C. (2019) 'EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis', *Trends in Cell Biology*, 29(3), pp. 212–226. doi: 10.1016/j.tcb.2018.12.001.
- Patel, V. N., Pineda, D. L. and Hoffman, M. P. (2017) 'The function of heparan sulfate during branching morphogenesis', *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 57–58, pp. 311–323. doi: 10.1016/j.matbio.2016.09.004.
- Paternoster, S. and Falasca, M. (2020) 'The intricate relationship between diabetes, obesity and pancreatic cancer', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1873(1), p. 188326. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.188326.

- Patman, G. (2015) 'From normal to metastases—a whole gamut of pancreatic organoids', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(2), pp. 61–61. doi: 10.1038/nrgastro.2015.1.
- Pearse, G. (2006) 'Histopathology of the Thymus', *Toxicologic Pathology*, 34(5), pp. 515–547. doi: 10.1080/01926230600978458.
- Pereira, B. A. *et al.* (2019) 'CAF Subpopulations: A New Reservoir of Stromal Targets in Pancreatic Cancer', *Trends in Cancer*, 5(11), pp. 724–741. doi: 10.1016/j.trecan.2019.09.010.
- Pereira, S. P. *et al.* (2020) 'Early detection of pancreatic cancer', *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 0(0). doi: 10.1016/S2468-1253(19)30416-9.
- Pérez–Mancera, P. A. *et al.* (2012) 'What We Have Learned About Pancreatic Cancer From Mouse Models', *Gastroenterology*, 142(5), pp. 1079–1092. doi: 10.1053/j.gastro.2012.03.002.
- Perusina Lanfranca, M. *et al.* (2020) 'Interleukin 22 Signaling Regulates Acinar Cell Plasticity to Promote Pancreatic Tumor Development in Mice', *Gastroenterology*, 158(5), pp. 1417–1432.e11. doi: 10.1053/j.gastro.2019.12.010.
- Pesheva, P. *et al.* (1994) 'Tenascin-R (J1 160/180 inhibits fibronectin-mediated cell adhesion—functional relatedness to tenascin-C', *Journal of Cell Science*, 107(8), pp. 2323–2333.
- Pesheva, P. *et al.* (1997) 'Tenascin-R is an intrinsic autocrine factor for oligodendrocyte differentiation and promotes cell adhesion by a sulfatide-mediated mechanism', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(12), pp. 4642–4651.
- Pesheva, P., Gloor, S. and Probstmeier, R. (2001) 'Tenascin-R as a regulator of CNS glial cell function', in *Progress in Brain Research*. Elsevier (Glial cell function), pp. 103–114. doi: 10.1016/S0079-6123(01)32069-1.
- Pesheva, P. and Probstmeier, R. (2000) 'The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology', *Progress in Neurobiology*, 61(5), pp. 465–493. doi: 10.1016/S0301-0082(99)00061-1.
- Peters, M. L. B. *et al.* (2018) 'Progression to pancreatic ductal adenocarcinoma from pancreatic intraepithelial neoplasia: Results of a simulation model', *Pancreatology*, 18(8), pp. 928–934. doi: 10.1016/j.pan.2018.07.009.
- Petersen, G. M. (2015) 'Familial Pancreatic Adenocarcinoma', *Hematology/oncology clinics of North America*, 29(4), pp. 641–653. doi: 10.1016/j.hoc.2015.04.007.
- Phillips, P. (2012) 'Pancreatic stellate cells and fibrosis', in Grippo, P. J. and Munshi, H. G. (eds) *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Trivandrum (India): Transworld Research Network. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98937/> (Accessed: 16 April 2020).
- Phillips, P. A. *et al.* (2003) 'Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover', *Gut*, 52(2), pp. 275–282. doi: 10.1136/gut.52.2.275.
- Phillips, P. A. *et al.* (2010) 'Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), pp. 17397–17402. doi: 10.1073/pnas.1000359107.
- Pickup, M. W., Mouw, J. K. and Weaver, V. M. (2014) 'The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer', *EMBO reports*, 15(12), pp. 1243–1253. doi: 10.15252/embr.201439246.
- Piersma, B., Hayward, M. K. and Weaver, V. M. (2020) 'Fibrosis and cancer: A strained relationship', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1873(2), p. 188356. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188356.
- Pihlak, R. *et al.* (2018) 'Advances in Molecular Profiling and Categorisation of Pancreatic Adenocarcinoma and the Implications for Therapy', *Cancers*, 10(1), p. 17. doi: 10.3390/cancers10010017.
- Pinho, A. V. *et al.* (2011) 'Adult pancreatic acinar cells dedifferentiate to an embryonic progenitor phenotype with concomitant activation of a senescence programme that is present in chronic pancreatitis', *Gut*, 60(7), pp. 958–966. doi: 10.1136/gut.2010.225920.
- Pitarresi, J. R. and Rustgi, A. K. (2019) 'Mechanisms Underlying Metastatic Pancreatic Cancer', in Rhim, J. S., Dritschilo, A., and Kremer, R. (eds) *Human Cell Transformation: Advances in Cell Models for the Study*

- of Cancer and Aging*. Cham: Springer International Publishing (Advances in Experimental Medicine and Biology), pp. 3–10. doi: 10.1007/978-3-030-22254-3_1.
- Pittman, M. E., Rao, R. and Hruban, R. H. (2017) 'Classification, Morphology, Molecular Pathogenesis, and Outcome of Premalignant Lesions of the Pancreas', *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 141(12), pp. 1606–1614. doi: 10.5858/arpa.2016-0426-RA.
- Porta, M. *et al.* (2005) 'Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage', *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 7(5), pp. 189–197. doi: 10.1007/bf02712816.
- Pothula, S. P. *et al.* (2020) 'Pancreatic stellate cells: Aiding and abetting pancreatic cancer progression', *Pancreatology*, 20(3), pp. 409–418. doi: 10.1016/j.pan.2020.01.003.
- Pozzi, A., Yurchenco, P. D. and Iozzo, R. V. (2017) 'The nature and biology of basement membranes', *Matrix Biology*, 57–58, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.matbio.2016.12.009.
- Prévot, P.-P. *et al.* (2012) 'Role of the ductal transcription factors HNF6 and Sox9 in pancreatic acinar-to-ductal metaplasia', *Gut*, 61(12), pp. 1723–1732. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300266.
- Principe, D. R. *et al.* (2014) 'TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis', *Journal of the National Cancer Institute*, 106(2), p. djt369. doi: 10.1093/jnci/djt369.
- Principe, D. R. *et al.* (2016) 'TGF β Signaling in the Pancreatic Tumor Microenvironment Promotes Fibrosis and Immune Evasion to Facilitate Tumorigenesis', *Cancer Research*, 76(9), pp. 2525–2539. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1293.
- Probstmeier, R. *et al.* (2001) 'Tenascin-R is expressed by Schwann cells in the peripheral nervous system', *Journal of Neuroscience Research*, 64(1), pp. 70–78. doi: 10.1002/jnr.1055.
- Procacci, P. *et al.* (2018) 'Tumor-Stroma Cross-Talk in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Focus on the Effect of the Extracellular Matrix on Tumor Cell Phenotype and Invasive Potential', *Cells*, 7(10). doi: 10.3390/cells7100158.
- Pu, N. *et al.* (2019) 'Optimized modification of the eighth edition of AJCC TNM staging system for resected pancreatic ductal adenocarcinoma', *Future Oncology (London, England)*, 15(30), pp. 3457–3465. doi: 10.2217/fon-2019-0264.
- Puls, T. J. *et al.* (2017) '3D collagen fibrillar microstructure guides pancreatic cancer cell phenotype and serves as a critical design parameter for phenotypic models of EMT', *PloS One*, 12(11), p. e0188870. doi: 10.1371/journal.pone.0188870.
- Puri, S., Folias, A. E. and Hebrok, M. (2015) 'Plasticity and Dedifferentiation within the Pancreas: Development, Homeostasis, and Disease', *Cell Stem Cell*, 16(1), pp. 18–31. doi: 10.1016/j.stem.2014.11.001.
- Putthoff, P. *et al.* (2003) 'Structure of the murine tenascin-R gene and functional characterisation of the promoter', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308(4), pp. 940–949. doi: 10.1016/S0006-291X(03)01506-7.
- Qian, W. *et al.* (2018) 'Metformin suppresses tumor angiogenesis and enhances the chemosensitivity of gemcitabine in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer', *Life Sciences*, 208, pp. 253–261. doi: 10.1016/j.lfs.2018.07.046.
- Qian, Z. R. *et al.* (2018) 'Association of Alterations in Main Driver Genes With Outcomes of Patients With Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *JAMA Oncology*, 4(3), pp. e173420–e173420. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.3420.
- Qu, C. and Konieczny, S. F. (2013) 'Pancreatic Acinar Cell 3-Dimensional Culture', *Bio-protocol*, 3(19). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4957951/> (Accessed: 20 March 2020).
- Quante, A. S. *et al.* (2016) 'Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030', *Cancer Medicine*, 5(9), pp. 2649–2656. doi: 10.1002/cam4.767.
- Ragan, C. (1952) 'The Physiology of the Connective Tissue (Loose Areolar)', *Annual Review of Physiology*, 14(1), pp. 51–72. doi: 10.1146/annurev.ph.14.030152.000411.

- Rahib, L. *et al.* (2014) 'Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States', *Cancer Research*, 74(11), pp. 2913–2921. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0155.
- Raimondi, S. *et al.* (2010) 'Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection', *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 24(3), pp. 349–358. doi: 10.1016/j.bpg.2010.02.007.
- Ram Makena, M. *et al.* (2019) 'Wnt/ β -Catenin Signaling: The Culprit in Pancreatic Carcinogenesis and Therapeutic Resistance', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17). doi: 10.3390/ijms20174242.
- Randles, M. J., Humphries, M. J. and Lennon, R. (2017) 'Proteomic definitions of basement membrane composition in health and disease', *Matrix Biology*, 57–58, pp. 12–28. doi: 10.1016/j.matbio.2016.08.006.
- Räsänen, K. and Vaheri, A. (2010) 'Activation of fibroblasts in cancer stroma', *Experimental Cell Research*, 316(17), pp. 2713–2722. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.04.032.
- Rasheed, Z. A., Matsui, W. and Maitra, A. (2012) 'Pathology of pancreatic stroma in PDAC', in Grippo, P. J. and Munshi, H. G. (eds) *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Trivandrum (India): Transworld Research Network. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98933/> (Accessed: 16 April 2020).
- Rathjen, F. G., Wolff, J. M. and Chiquet-Ehrismann, R. (1991) 'Restrictin: a chick neural extracellular matrix protein involved in cell attachment co-purifies with the cell recognition molecule F11', *Development*, 113(1), pp. 151–164.
- Rawla, P., Sunkara, T. and Gaduputi, V. (2019) 'Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors', *World Journal of Oncology*, 10(1), pp. 10–27. doi: 10.14740/wjon1166.
- Rawla, P., Thandra, K. C. and Sunkara, T. (2019) 'Pancreatic cancer and obesity: epidemiology, mechanism, and preventive strategies', *Clinical Journal of Gastroenterology*, 12(4), pp. 285–291. doi: 10.1007/s12328-019-00953-3.
- Reader, C. S. *et al.* (2019) 'The integrin $\alpha\beta 6$ drives pancreatic cancer through diverse mechanisms and represents an effective target for therapy', *The Journal of Pathology*, 249(3), pp. 332–342. doi: 10.1002/path.5320.
- Regel, I. *et al.* (2012) 'Energy metabolism and proliferation in pancreatic carcinogenesis', *Langenbeck's Archives of Surgery*, 397(4), pp. 507–512. doi: 10.1007/s00423-012-0933-9.
- Reichert, M. *et al.* (2016) *Developmental Pathways Direct Pancreatic Cancer Initiation from Its Cellular Origin*, *Stem Cells International*. doi: 10.1155/2016/9298535.
- Reilly, G. C. and Engler, A. J. (2010) 'Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation', *Journal of Biomechanics*, 43(1), pp. 55–62. doi: 10.1016/j.jbiomech.2009.09.009.
- Ren, B., Liu, X. and Suriawinata, A. A. (2019) 'Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions: Histopathology, Cytopathology, and Molecular Pathology', *The American Journal of Pathology*, 189(1), pp. 9–21. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.10.004.
- Renehan, A. G. *et al.* (2008) 'Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies', *The Lancet*, 371(9612), pp. 569–578. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60269-X.
- Rhim, A. D. *et al.* (2012) 'EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation', *Cell*, 148(1–2), pp. 349–361. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.025.
- Rhim, A. D. *et al.* (2014) 'Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma', *Cancer Cell*, 25(6), pp. 735–747. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.021.
- Ricard-Blum, S. (2011) 'The Collagen Family', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), p. a004978. doi: 10.1101/cshperspect.a004978.
- Ricard-Blum, S. and Salza, R. (2014) 'Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix', *Experimental Dermatology*, 23(7), pp. 457–463. doi: 10.1111/exd.12435.

- Ricard-Blum, S. and Vallet, S. D. (2016) 'Proteases decode the extracellular matrix cryptome', *Biochimie*, 122, pp. 300–313. doi: 10.1016/j.biochi.2015.09.016.
- Ricard-Blum, S. and Vallet, S. D. (2019) 'Fragments generated upon extracellular matrix remodeling: Biological regulators and potential drugs', *Matrix Biology*, 75–76, pp. 170–189. doi: 10.1016/j.matbio.2017.11.005.
- Riopel, M. M. *et al.* (2013) 'β 1 integrin–extracellular matrix interactions are essential for maintaining exocrine pancreas architecture and function', *Laboratory Investigation*, 93(1), pp. 31–40. doi: 10.1038/labinvest.2012.147.
- Risch, H. A. (2019) 'Diabetes and Pancreatic Cancer: Both Cause and Effect', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 111(1), pp. 1–2. doi: 10.1093/jnci/djy093.
- Roalsø, M., Aunan, J. R. and Søreide, K. (2020) 'Refined TNM-staging for pancreatic adenocarcinoma – Real progress or much ado about nothing?', *European Journal of Surgical Oncology*, 0(0). doi: 10.1016/j.ejso.2020.02.014.
- Rocheftort, M. M. *et al.* (2013) 'Impact of Tumor Grade on Pancreatic Cancer Prognosis: Validation of a Novel TNMG Staging System', *Annals of Surgical Oncology*, 20(13), pp. 4322–4329. doi: 10.1245/s10434-013-3159-3.
- Rodeck, U. (2004) 'Extracellular Matrix Composition Modulates Cell Cycle Checkpoint Control: A New Twist to Radiation Sensitivity', *Cancer Biology & Therapy*, 3(1), pp. 54–54. doi: 10.4161/cbt.3.1.682.
- van Roessel, S. *et al.* (2018) 'International Validation of the Eighth Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging System in Patients With Resected Pancreatic Cancer', *JAMA Surgery*, 153(12). doi: 10.1001/jamasurg.2018.3617.
- Roll, L. and Faissner, A. (2018) 'Tenascins in CNS lesions', *Seminars in Cell & Developmental Biology*. doi: 10.1016/j.semcd.2018.09.012.
- Roma-Rodrigues, C. *et al.* (2019) 'Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), p. 840. doi: 10.3390/ijms20040840.
- Rooman, I. and Real, F. X. (2012) 'Pancreatic ductal adenocarcinoma and acinar cells: a matter of differentiation and development?', *Gut*, 61(3), pp. 449–458. doi: 10.1136/gut.2010.235804.
- Roy, I. *et al.* (2017) 'Cancer cell chemokines direct chemotaxis of activated stellate cells in pancreatic ductal adenocarcinoma', *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 97(3), pp. 302–317. doi: 10.1038/labinvest.2016.146.
- Rozario, T. and DeSimone, D. W. (2010) 'The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view', *Developmental Biology*, 341(1), pp. 126–140. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.026.
- Rubio-Viqueira, B. *et al.* (2006) 'An In vivo Platform for Translational Drug Development in Pancreatic Cancer', *Clinical Cancer Research*, 12(15), pp. 4652–4661. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0113.
- Runa, F. *et al.* (2017) 'Tumor microenvironment heterogeneity: challenges and opportunities', *Current molecular biology reports*, 3(4), pp. 218–229. doi: 10.1007/s40610-017-0073-7.
- Sada, M. *et al.* (2016) 'Hypoxic stellate cells of pancreatic cancer stroma regulate extracellular matrix fiber organization and cancer cell motility', *Cancer Letters*, 372(2), pp. 210–218. doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.016.
- Saga, Y. *et al.* (1992) 'Mice develop normally without tenascin.', *Genes & Development*, 6(10), pp. 1821–1831. doi: 10.1101/gad.6.10.1821.
- Sainio, A. (2013) 'Extracellular Matrix Macromolecules in Tumour Microenvironment with Special Reference to Desmoplastic Reaction and the Role of Matrix Proteoglycans and Hyaluronan', *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, S13. doi: 10.4172/2157-2518.S13-002.
- Sakaguchi, T. *et al.* (2020) 'The past, present, and future status of multimodality treatment for resectable/borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma', *Surgery Today*. doi: 10.1007/s00595-020-01963-2.
- Sakai, H. *et al.* (2017) 'A potential contribution of tenascin-X to blood vessel formation in peripheral nerves', *Neuroscience Research*, 124, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.neures.2017.06.003.

- Sakai, T. *et al.* (1996) 'Tenascin-X expression in tumor cells and fibroblasts: glucocorticoids as negative regulators in fibroblasts', *Journal of Cell Science*, 109(8), pp. 2069–2077.
- Sakiyama, T. *et al.* (2015) 'Recurrent gastrointestinal perforation in a patient with Ehlers-Danlos syndrome due to tenascin-X deficiency', *The Journal of Dermatology*, 42(5), pp. 511–514. doi: 10.1111/1346-8138.12829.
- Sala, M., Ros, M. and Saltel, F. (2020) 'A Complex and Evolutive Character: Two Face Aspects of ECM in Tumor Progression', *Frontiers in Oncology*, 10, p. 1620. doi: 10.3389/fonc.2020.01620.
- Salem, A. A. and Mackenzie, G. G. (2018) 'Pancreatic cancer: A critical review of dietary risk', *Nutrition Research*, 52, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.nutres.2017.12.001.
- Saloman, J. L. *et al.* (2019) 'Animal Models: Challenges and Opportunities to Determine Optimal Experimental Models of Pancreatitis and Pancreatic Cancer', *Pancreas*, 48(6), pp. 759–779. doi: 10.1097/MPA.0000000000001335.
- Sandgren, E. P. *et al.* (1990) 'Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast', *Cell*, 61(6), pp. 1121–1135. doi: 10.1016/0092-8674(90)90075-p.
- Sanvito, F. *et al.* (1994) 'TGF-beta 1 influences the relative development of the exocrine and endocrine pancreas in vitro', *Development*, 120(12), pp. 3451–3462.
- Sarper, M. *et al.* (2016) 'ATRA modulates mechanical activation of TGF- β by pancreatic stellate cells', *Scientific Reports*, 6, p. 27639. doi: 10.1038/srep27639.
- Sato, N. *et al.* (2016) 'Role of hyaluronan in pancreatic cancer biology and therapy: Once again in the spotlight', *Cancer Science*, 107(5), pp. 569–575. doi: 10.1111/cas.12913.
- Sato, T., Shibata, W. and Maeda, S. (2019) 'Adhesion molecules and pancreatitis', *Journal of Gastroenterology*, 54(2), pp. 99–107. doi: 10.1007/s00535-018-1500-0.
- Satoh, K. *et al.* (2010) 'Increased Expression of Tenascin-X in Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysm Tissues', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(11), pp. 1898–1902. doi: 10.1248/bpb.33.1898.
- Satoh, K., Hamada, S. and Shimosegawa, T. (2015) 'Involvement of epithelial to mesenchymal transition in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Journal of Gastroenterology*, 50(2), pp. 140–146. doi: 10.1007/s00535-014-0997-0.
- Sawai, H. *et al.* (2008) 'Basement Membrane Proteins Play an Important Role in the Invasive Processes of Human Pancreatic Cancer Cells', *Journal of Surgical Research*, 144(1), pp. 117–123. doi: 10.1016/j.jss.2007.03.023.
- Sawey, E. T., Johnson, J. A. and Crawford, H. C. (2007) 'Matrix metalloproteinase 7 controls pancreatic acinar cell transdifferentiation by activating the Notch signaling pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), pp. 19327–19332. doi: 10.1073/pnas.0705953104.
- Schalkwijk, J. *et al.* (2001) *A Recessive Form of the Ehlers–Danlos Syndrome Caused by Tenascin-X Deficiency*, <http://dx.doi.org/insb.bib.cnrs.fr/10.1056/NEJMoa002939>. Massachusetts Medical Society. doi: 10.1056/NEJMoa002939.
- Schenk, S. *et al.* (1995) 'Tenascin-C in serum: A questionable tumor marker', *International Journal of Cancer*, 61(4), pp. 443–449. doi: 10.1002/ijc.2910610402.
- Schenk, S. and Chiquet-Ehrismann, R. (1994) 'Tenascins', *Methods in Enzymology*, 245, pp. 52–61.
- Scherberich, A. *et al.* (2004) 'Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development', *Journal of Cell Science*, 117(4), pp. 571–581. doi: 10.1242/jcs.00867.
- Scherberich, A. *et al.* (2005) 'Tenascin-W is found in malignant mammary tumors, promotes alpha8 integrin-dependent motility and requires p38 MAPK activity for BMP-2 and TNF-alpha induced expression in vitro', *Oncogene*, 24(9), pp. 1525–1532. doi: 10.1038/sj.onc.1208342.
- Schiarea, S. *et al.* (2010) 'Secretome Analysis of Multiple Pancreatic Cancer Cell Lines Reveals Perturbations of Key Functional Networks', *Journal of Proteome Research*, 9(9), pp. 4376–4392. doi: 10.1021/pr1001109.

- Schlitter, A. M. *et al.* (2017) 'pT but not pN stage of the 8th TNM classification significantly improves prognostication in pancreatic ductal adenocarcinoma', *European Journal of Cancer*, 84, pp. 121–129. doi: 10.1016/j.ejca.2017.06.034.
- Schmid, R. M. (2002) 'Acinar-to-ductal metaplasia in pancreatic cancer development', *The Journal of Clinical Investigation*, 109(11), pp. 1403–1404. doi: 10.1172/JCI15889.
- Schneider, E. *et al.* (2001) 'Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 281(2), pp. C532–C543. doi: 10.1152/ajpcell.2001.281.2.C532.
- Schnittert, J. *et al.* (2019) 'Integrin α 11 in pancreatic stellate cells regulates tumor stroma interaction in pancreatic cancer', *The FASEB Journal*, 33(5), pp. 6609–6621. doi: 10.1096/fj.201802336R.
- Schnyder, B. *et al.* (1997) 'Distribution pattern of tenascin-C in normal and neoplastic mesenchymal tissues', *International Journal of Cancer*, 72(2), pp. 217–224. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19970717)72:2<217::AID-IJC3>3.0.CO;2-U.
- Schober, M. *et al.* (2014) 'Desmoplasia and Chemoresistance in Pancreatic Cancer', *Cancers*, 6(4), pp. 2137–2154. doi: 10.3390/cancers6042137.
- Schorn, S. *et al.* (2017) 'The influence of neural invasion on survival and tumor recurrence in pancreatic ductal adenocarcinoma – A systematic review and meta-analysis', *Surgical Oncology*, 26(1), pp. 105–115. doi: 10.1016/j.suronc.2017.01.007.
- Scott, J. E. (1988) 'Proteoglycan-fibrillar collagen interactions.', *Biochemical Journal*, 252(2), pp. 313–323.
- Scott, L. E., Weinberg, S. H. and Lemmon, C. A. (2019) 'Mechanochemical Signaling of the Extracellular Matrix in Epithelial-Mesenchymal Transition', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. doi: 10.3389/fcell.2019.00135.
- Sereti, E. *et al.* (2018) 'Patient Derived Xenografts (PDX) for personalized treatment of pancreatic cancer: emerging allies in the war on a devastating cancer?', *Journal of Proteomics*. doi: 10.1016/j.jprot.2018.01.012.
- Sergeant, G. *et al.* (2009) 'Role of cancer stem cells in pancreatic ductal adenocarcinoma', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(10), pp. 580–586. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.127.
- Seymour, P. A. and Serup, P. (2019) 'Mesodermal induction of pancreatic fate commitment', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 92, pp. 77–88. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.08.008.
- Shan, T. *et al.* (2017) 'Prometastatic mechanisms of CAF-mediated EMT regulation in pancreatic cancer cells', *International Journal of Oncology*, 50(1), pp. 121–128. doi: 10.3892/ijo.2016.3779.
- Shekhter, A. B. (1986) 'Connective tissue as an integral system: role of cell-cell and cell-matrix interactions', *Connective Tissue Research*, 15(1–2), pp. 23–31. doi: 10.3109/03008208609001970.
- Shen, W. *et al.* (2017) 'TGF- β in pancreatic cancer initiation and progression: two sides of the same coin', *Cell & Bioscience*, 7(1), p. 39. doi: 10.1186/s13578-017-0168-0.
- Sherman, M. H. (2018) 'Stellate Cells in Tissue Repair, Inflammation, and Cancer', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 34(1), pp. 333–355. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062855.
- Shi, C. *et al.* (2014) 'Fibrogenesis in pancreatic cancer is a dynamic process regulated by macrophage-stellate cell interaction', *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 94(4), pp. 409–421. doi: 10.1038/labinvest.2014.10.
- Shi, G. *et al.* (2013) 'Maintenance of acinar cell organization is critical to preventing Kras-induced acinar-ductal metaplasia', *Oncogene*, 32(15), pp. 1950–1958. doi: 10.1038/onc.2012.210.
- Shi, S. *et al.* (no date) 'Proposed Modification of the 8th Edition of the AJCC Staging System for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Annals of Surgery*. doi: 10.1097/SLA.0000000000002668.
- Shieh, A. C. (2011) 'Biomechanical Forces Shape the Tumor Microenvironment', *Annals of Biomedical Engineering*, 39(5), pp. 1379–1389. doi: 10.1007/s10439-011-0252-2.
- Shields, M. A. *et al.* (2011) 'Pancreatic cancer cells respond to type I collagen by inducing snail expression to promote membrane type 1 matrix metalloproteinase-dependent collagen invasion', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(12), pp. 10495–10504. doi: 10.1074/jbc.M110.195628.

- Shields, M. A. *et al.* (2012) 'Biochemical role of the collagen-rich tumour microenvironment in pancreatic cancer progression', *Biochemical Journal*, 441(2), pp. 541–552. doi: 10.1042/BJ20111240.
- Shih, H. P. *et al.* (2016) 'ECM Signaling Regulates Collective Cellular Dynamics to Control Pancreas Branching Morphogenesis', *Cell Reports*, 14(2), pp. 169–179. doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.027.
- Shih, H. P., Wang, A. and Sander, M. (2013) 'Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29(1), pp. 81–105. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122405.
- Shimizu, K. *et al.* (2005) 'Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells', *Gastroenterology*, 128(7), pp. 2105–2118. doi: 10.1053/j.gastro.2005.03.025.
- Shin, E. J. and Canto, M. I. (2012) 'Pancreatic Cancer Screening', *Gastroenterology clinics of North America*, 41(1), pp. 143–157. doi: 10.1016/j.gtc.2011.12.001.
- Shoval, H. *et al.* (2017) 'Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids', *Scientific Reports*, 7(1), p. 10428. doi: 10.1038/s41598-017-10699-y.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. (2018) 'Cancer statistics, 2018', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), pp. 7–30. doi: 10.3322/caac.21442.
- Sikdar, N. *et al.* (2018) 'Genetic Alterations of Periampullary and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: An Overview', *Current Genomics*, 19(6), pp. 444–463. doi: 10.2174/1389202919666180221160753.
- Singh, P., Carraher, C. and Schwarzbauer, J. E. (2010) 'Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix', *Annual review of cell and developmental biology*, 26, pp. 397–419. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104020.
- Siri, A. *et al.* (1991) 'Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitopes recognized by two monoclonal antibodies.', *Nucleic Acids Research*, 19(3), pp. 525–531.
- Skhinas, J. N. and Cox, T. R. (2018) 'The interplay between extracellular matrix remodelling and kinase signalling in cancer progression and metastasis', *Cell Adhesion & Migration*, 12(6), pp. 529–537. doi: 10.1080/19336918.2017.1405208.
- Skoulidis, F. *et al.* (2010) 'Germline Brca2 Heterozygosity Promotes KrasG12D -Driven Carcinogenesis in a Murine Model of Familial Pancreatic Cancer', *Cancer Cell*, 18(5), pp. 499–509. doi: 10.1016/j.ccr.2010.10.015.
- Slapak, E. J. *et al.* (2020) 'Matrix Metalloproteases in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Key Drivers of Disease Progression?', *Biology*, 9(4), p. 80. doi: 10.3390/biology9040080.
- Smukler, S. R. *et al.* (2011) 'The Adult Mouse and Human Pancreas Contain Rare Multipotent Stem Cells that Express Insulin', *Cell Stem Cell*, 8(3), pp. 281–293. doi: 10.1016/j.stem.2011.01.015.
- Socovich, A. M. and Naba, A. (2019) 'The cancer matrisome: From comprehensive characterization to biomarker discovery', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 89, pp. 157–166. doi: 10.1016/j.semcd.2018.06.005.
- Sommers, S. C., Murphy, S. A. and Warren, S. (1954) 'Pancreatic Duct Hyperplasia and Cancer', *Gastroenterology*, 27(5), pp. 629–640. doi: 10.1016/S0016-5085(19)36105-0.
- Sonbol, H. S. (2018) 'Extracellular Matrix Remodeling in Human Disease', *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 6(3), pp. 123–128. doi: 10.4103/JMAU.JMAU_4_18.
- Song, I. and Dityatev, A. (2018) 'Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons', *Brain Research Bulletin*, 136, pp. 101–108. doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.03.003.
- Song, M. *et al.* (2018) 'Evaluation of the prognostic value of the new AJCC 8th edition staging system for patients with pancreatic adenocarcinoma; a need to subclassify stage III?', *European Journal of Cancer*, 104, pp. 62–69. doi: 10.1016/j.ejca.2018.08.027.
- Sorrell, J. M. and Caplan, A. I. (2004) 'Fibroblast heterogeneity: more than skin deep', *Journal of Cell Science*, 117(5), pp. 667–675. doi: 10.1242/jcs.01005.
- Sparmann, G. *et al.* (2010) 'Bone marrow-derived pancreatic stellate cells in rats', *Cell Research*, 20(3), pp. 288–298. doi: 10.1038/cr.2010.10.

- Speek, M., Barry, F. and Miller, W. L. (1996) 'Alternate Promoters and Alternate Splicing of Human Tenascin-X, a Gene with 5' and 3' Ends Buried in Other Genes', *Human Molecular Genetics*, 5(11), pp. 1749–1758. doi: 10.1093/hmg/5.11.1749.
- Spel , C., Gasser, I., *et al.* (2015) 'Spatial organization of the tenascin-C microenvironment in experimental and human cancer', *Cell Adhesion & Migration*, 9(1–2), pp. 4–13. doi: 10.1080/19336918.2015.1005452.
- Spel , C., Saupe, F., *et al.* (2015) 'Tenascin-C: Exploitation and collateral damage in cancer management', *Cell Adhesion & Migration*, 9(1–2), pp. 141–153. doi: 10.1080/19336918.2014.1000074.
- Sprenger, C. C., Plymate, S. R. and Reed, M. J. (2010) 'Aging-related alterations in the extracellular matrix modulate the microenvironment and influence tumor progression', *International Journal of Cancer*, 127(12), pp. 2739–2748. doi: 10.1002/ijc.25615.
- Spring, J., Beck, K. and Chiquet-Ehrismann, R. (1989) 'Two contrary functions of tenascin: Dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments', *Cell*, 59(2), pp. 325–334. doi: 10.1016/0092-8674(89)90294-8.
- Sriramarao, P. and Bourdon, M. A. (1993) 'A novel tenascin type III repeat is part of a complex of tenascin mRNA alternative splices.', *Nucleic Acids Research*, 21(1), pp. 163–168.
- Stamenkovic, I. (2003) 'Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases', *The Journal of Pathology*, 200(4), pp. 448–464. doi: 10.1002/path.1400.
- Stanger, B. Z. and Dor, Y. (2006) 'Dissecting the Cellular Origins of Pancreatic Cancer', *Cell Cycle*, 5(1), pp. 43–46. doi: 10.4161/cc.5.1.2291.
- Stanger, B. Z. and Hebrok, M. (2013) 'Control of cell identity in pancreas development and regeneration', *Gastroenterology*, 144(6), pp. 1170–1179. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.074.
- Stone, M. L. and Beatty, G. L. (2019) 'Cellular determinants and therapeutic implications of inflammation in pancreatic cancer', *Pharmacology & Therapeutics*, 201, pp. 202–213. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.05.012.
- Storz, P. (2017) 'Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 14(5), pp. 296–304. doi: 10.1038/nrgastro.2017.12.
- Streuli, C. (1999) 'Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation', *Current Opinion in Cell Biology*, 11(5), pp. 634–640. doi: 10.1016/S0955-0674(99)00026-5.
- Strobel, O. *et al.* (2016) 'Isolation and culture of primary human pancreatic stellate cells that reflect the context of their tissue of origin', *Langenbeck's Archives of Surgery*, 401(1), pp. 89–97. doi: 10.1007/s00423-015-1343-6.
- Stylianou, A. *et al.* (2019) 'Collagen content and extracellular matrix cause cytoskeletal remodelling in pancreatic fibroblasts', *Journal of The Royal Society Interface*, 16(154), p. 20190226. doi: 10.1098/rsif.2019.0226.
- Stylianou, A., Gkretsi, V. and Stylianopoulos, T. (2018) 'Transforming growth factor- β modulates pancreatic cancer associated fibroblasts cell shape, stiffness and invasion', *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects*, 1862(7), pp. 1537–1546. doi: 10.1016/j.bbagen.2018.02.009.
- Suklabaidya, S. *et al.* (2018) 'Experimental models of pancreatic cancer desmoplasia', *Laboratory Investigation*, 98(1), pp. 27–40. doi: 10.1038/labinvest.2017.127.
- Sumi, S. and Tamura, K. (2000) 'Frontiers of pancreas regeneration', *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 7(3), pp. 286–294. doi: 10.1007/s005340070050.
- Sumioka, T. *et al.* (2018) 'Loss of tenascin X gene function impairs injury-induced stromal angiogenesis in mouse corneas', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(2), pp. 948–956. doi: 10.1111/jcmm.13397.
- Sun, Q. *et al.* (2018) 'The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer', *Theranostics*, 8(18), pp. 5072–5087. doi: 10.7150/thno.26546.
- Sun, X.-J. *et al.* (2016) 'Role of the tumor microenvironment in pancreatic adenocarcinoma', *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 21, pp. 31–41.

- Sun, Y. (2016) 'Tumor microenvironment and cancer therapy resistance', *Cancer Letters*, 380(1), pp. 205–215. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.044.
- Sun, Z. *et al.* (2019) 'Tenascin-C increases lung metastasis by impacting blood vessel invasions', *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 83, pp. 26–47. doi: 10.1016/j.matbio.2019.07.001.
- Swayden, M., Soubeyran, P. and Iovanna, J. (2020) 'Upcoming Revolutionary Paths in Preclinical Modeling of Pancreatic Adenocarcinoma', *Frontiers in Oncology*, 9. doi: 10.3389/fonc.2019.01443.
- Swindle, C. S. *et al.* (2001) 'Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor', *Journal of Cell Biology*, 154(2), pp. 459–468. doi: 10.1083/jcb.200103103.
- Takahashi, K. *et al.* (2018) 'Pancreatic tumor microenvironment confers highly malignant properties on pancreatic cancer cells', *Oncogene*, 37(21), pp. 2757–2772. doi: 10.1038/s41388-018-0144-0.
- Tang, D. *et al.* (2013a) 'Persistent activation of pancreatic stellate cells creates a microenvironment favorable for the malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma', *International Journal of Cancer*, 132(5), pp. 993–1003. doi: 10.1002/ijc.27715.
- Tang, D. *et al.* (2013b) 'Persistent activation of pancreatic stellate cells creates a microenvironment favorable for the malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma', *International Journal of Cancer*, 132(5), pp. 993–1003. doi: 10.1002/ijc.27715.
- Tempero, M. A. *et al.* (2019) 'NCCN Guidelines Insights: Pancreatic Adenocarcinoma, Version 1.2019: Featured Updates to the NCCN Guidelines', *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 17(3), pp. 202–210. doi: 10.6004/jnccn.2019.0014.
- Tesfaye, A. A. *et al.* (2018) 'The evolution into personalized therapies in pancreatic ductal adenocarcinoma: challenges and opportunities', *Expert Review of Anticancer Therapy*, 18(2), pp. 131–148. doi: 10.1080/14737140.2018.1417844.
- Theocharis, A. D. *et al.* (2016) 'Extracellular matrix structure', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, pp. 4–27. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
- Theocharis, A. D., Manou, D. and Karamanos, N. K. (2019) 'The extracellular matrix as a multitasking player in disease', *The FEBS Journal*, 286(15), pp. 2830–2869. doi: 10.1111/febs.14818.
- Thomas, D. and Radhakrishnan, P. (2019) 'Tumor-stromal crosstalk in pancreatic cancer and tissue fibrosis', *Molecular Cancer*, 18(1), p. 14. doi: 10.1186/s12943-018-0927-5.
- Thomas, S. K., Lee, J. and Beatty, G. L. (2020) 'Paracrine and cell autonomous signalling in pancreatic cancer progression and metastasis', *EBioMedicine*, 53, p. 102662. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102662.
- Tian, C. *et al.* (2019) 'Proteomic analyses of ECM during pancreatic ductal adenocarcinoma progression reveal different contributions by tumor and stromal cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(39), pp. 19609–19618. doi: 10.1073/pnas.1908626116.
- Tian, L. *et al.* (2016) 'Activation of pancreatic stellate cells involves an EMT-like process', *International Journal of Oncology*, 48(2), pp. 783–792. doi: 10.3892/ijo.2015.3282.
- Tilghman, R. W. *et al.* (2010) 'Matrix Rigidity Regulates Cancer Cell Growth and Cellular Phenotype', *PLOS ONE*, 5(9), p. e12905. doi: 10.1371/journal.pone.0012905.
- Tiriac, H. *et al.* (2019) 'Organoid models for translational pancreatic cancer research', *Current Opinion in Genetics & Development*, 54, pp. 7–11. doi: 10.1016/j.gde.2019.02.003.
- Tjomsland, V. *et al.* (2016) 'Profile of MMP and TIMP Expression in Human Pancreatic Stellate Cells: Regulation by IL-1 α and TGF β and Implications for Migration of Pancreatic Cancer Cells', *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 18(7), pp. 447–456. doi: 10.1016/j.neo.2016.06.003.
- Tod, J. *et al.* (2013) 'Tumor-stromal interactions in pancreatic cancer', *Pancreatology*, 13(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.pan.2012.11.311.
- Tomasek, J. J. *et al.* (2002) 'Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(5), pp. 349–363. doi: 10.1038/nrm809.
- Topalovski, M. and Brekken, R. A. (2016) 'Matrix control of pancreatic cancer: New insights into fibronectin signaling', *Cancer Letters*, 381(1), pp. 252–258. doi: 10.1016/j.canlet.2015.12.027.

- Tran, K. T., Griffith, L. and Wells, A. (2004) 'Extracellular matrix signaling through growth factor receptors during wound healing', *Wound Repair and Regeneration*, 12(3), pp. 262–268. doi: 10.1111/j.1067-1927.2004.012302.x.
- Trebaul, A., Chan, E. K. and Midwood, K. S. (2007) 'Regulation of fibroblast migration by tenascin-C', *Biochemical Society Transactions*, 35(4), pp. 695–697. doi: 10.1042/BST0350695.
- Tsai, H.-J. and Chang, J. S. (2019) 'Environmental Risk Factors of Pancreatic Cancer', *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), p. 1427. doi: 10.3390/jcm8091427.
- Tsang, K. Y. *et al.* (2009) 'The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation', *Cell and Tissue Research*, 339(1), p. 93. doi: 10.1007/s00441-009-0893-8.
- Tucker, R. P. *et al.* (2013) 'Tenascin-C and tenascin-W in whisker follicle stem cell niches: possible roles in regulating stem cell proliferation and migration', *Journal of Cell Science*, 126(22), pp. 5111–5115. doi: 10.1242/jcs.134650.
- Tucker, R. P. and Chiquet-Ehrismann, R. (2009) 'The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793(5), pp. 888–892. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.12.012.
- Tucker, R. P. and Chiquet-Ehrismann, R. (2015) 'Tenascin-C: Its functions as an integrin ligand', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 65, pp. 165–168. doi: 10.1016/j.biocel.2015.06.003.
- Tucker, R. P. and Degen, M. (2019) 'The Expression and Possible Functions of Tenascin-W During Development and Disease', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. doi: 10.3389/fcell.2019.00053.
- Tuori, A. *et al.* (1999) 'The Expression of Tenascin-X in Developing and Adult Rat and Human Eye', *The Histochemical Journal*, 31(4), pp. 245–252. doi: 10.1023/A:1003665712063.
- Tuveson, D. A. *et al.* (2006) 'Mist1-KrasG12D knock-in mice develop mixed differentiation metastatic exocrine pancreatic carcinoma and hepatocellular carcinoma', *Cancer Research*, 66(1), pp. 242–247. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2305.
- Tuveson, D. A. and Hingorani, S. R. (2005) 'Ductal Pancreatic Cancer in Humans and Mice', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 70, pp. 65–72. doi: 10.1101/sqb.2005.70.040.
- Tzanakakis, G. *et al.* (2018) 'Role of the extracellular matrix in cancer-associated epithelial to mesenchymal transition phenomenon', *Developmental Dynamics*, 247(3), pp. 368–381. doi: 10.1002/dvdy.24557.
- Vaccaro, V. *et al.* (2015) 'Metastatic pancreatic cancer: Is there a light at the end of the tunnel?', *World Journal of Gastroenterology*, 21(16), pp. 4788–4801. doi: 10.3748/wjg.v21.i16.4788.
- Vaccaro, V., Sperduti, I. and Milella, M. (2011) 'FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer', *The New England Journal of Medicine*, 365(8), pp. 768–769; author reply 769. doi: 10.1056/NEJMc1107627.
- Valcourt, U. *et al.* (2015) 'Tenascin-X: beyond the architectural function', *Cell Adhesion & Migration*, 9(1–2), pp. 154–165. doi: 10.4161/19336918.2014.994893.
- Valle, S. *et al.* (2018) 'The Ever-Evolving Concept of the Cancer Stem Cell in Pancreatic Cancer', *Cancers*, 10(2), p. 33. doi: 10.3390/cancers10020033.
- Van Lommel, A. T. L. (2003) *From Cells to Organs*. Boston, MA: Springer US. doi: 10.1007/978-1-4615-0353-8.
- Vaquero, E. C. *et al.* (2003) 'Extracellular matrix proteins protect pancreatic cancer cells from death via mitochondrial and nonmitochondrial pathways', *Gastroenterology*, 125(4), pp. 1188–1202. doi: 10.1016/S0016-5085(03)01203-4.
- Varol, C. and Sagi, I. (2018) 'Phagocyte—extracellular matrix crosstalk empowers tumor development and dissemination', *The FEBS Journal*, 285(4), pp. 734–751. doi: 10.1111/febs.14317.
- Vedoy, C. G. and Sogayar, M. C. (2002) 'Isolation and characterization of genes associated with the anti-tumor activity of glucocorticoids', *Molecular Brain Research*, 106(1), pp. 57–69. doi: 10.1016/S0169-328X(02)00410-2.

- Veenstra, V. L. *et al.* (2018) 'Extracellular Influences: Molecular Subclasses and the Microenvironment in Pancreatic Cancer', *Cancers*, 10(2), p. 34. doi: 10.3390/cancers10020034.
- Veit, G. *et al.* (2006) 'Collagen XII Interacts with Avian Tenascin-X through Its NC3 Domain', *Journal of Biological Chemistry*, 281(37), pp. 27461–27470. doi: 10.1074/jbc.M603147200.
- Vennin, C. *et al.* (2018) 'Reshaping the Tumor Stroma for Treatment of Pancreatic Cancer', *Gastroenterology*, 154(4), pp. 820–838. doi: 10.1053/j.gastro.2017.11.280.
- Vigier, S. *et al.* (2017) 'Composition and organization of the pancreatic extracellular matrix by combined methods of immunohistochemistry, proteomics and scanning electron microscopy', *Current Research in Translational Medicine*, 65(1), pp. 31–39. doi: 10.1016/j.retram.2016.10.001.
- Vincent, A. *et al.* (2011) 'Pancreatic cancer', *Lancet (London, England)*, 378(9791), pp. 607–620. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62307-0.
- Voermans, N. C. *et al.* (2007) 'Ehlers-Danlos syndrome due to tenascin-X deficiency: muscle weakness and contractures support overlap with collagen VI myopathies', *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 143A(18), pp. 2215–2219. doi: 10.1002/ajmg.a.31899.
- Voermans, N. C. *et al.* (2011) 'Mild muscular features in tenascin-X knockout mice, a model of Ehlers-danlos syndrome', *Connective Tissue Research*, 52(5), pp. 422–432. doi: 10.3109/03008207.2010.551616.
- Von Hoff, D. D. *et al.* (2013) 'Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine', *New England Journal of Medicine*, 369(18), pp. 1691–1703. doi: 10.1056/NEJMoa1304369.
- Vonderheide, R. H. and Bayne, L. J. (2013) 'Inflammatory networks and immune surveillance of pancreatic carcinoma', *Current Opinion in Immunology*, 25(2), pp. 200–205. doi: 10.1016/j.coi.2013.01.006.
- Vonlaufen, A. *et al.* (2008) 'Pancreatic Stellate Cells and Pancreatic Cancer Cells: An Unholy Alliance', *Cancer Research*, 68(19), pp. 7707–7710. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1132.
- Vonlaufena, A. *et al.* (2010) 'Isolation of Quiescent Human Pancreatic Stellate Cells: A Promising in vitro Tool for Studies of Human Pancreatic Stellate Cell Biology', *Pancreatology*, 10(4), pp. 434–443. doi: 10.1159/000260900.
- Wagner, M. *et al.* (1998) 'Malignant transformation of duct-like cells originating from acini in transforming growth factor α transgenic mice', *Gastroenterology*, 115(5), pp. 1254–1262. doi: 10.1016/S0016-5085(98)70098-8.
- Wagner, M. *et al.* (2001) 'A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease', *Genes & Development*, 15(3), pp. 286–293. doi: 10.1101/gad.184701.
- Walker, C., Mojares, E. and Del Río Hernández, A. (2018) 'Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), p. 3028. doi: 10.3390/ijms19103028.
- Walsh, N. *et al.* (2009) 'Alterations in integrin expression modulates invasion of pancreatic cancer cells', *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 28, p. 140. doi: 10.1186/1756-9966-28-140.
- Walter, F. M. *et al.* (2016) 'Symptoms and patient factors associated with diagnostic intervals for pancreatic cancer (SYMPTOM pancreatic study): a prospective cohort study', *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 1(4), pp. 298–306. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30079-6.
- Wang, L., Xie, D. and Wei, D. (2019) 'Pancreatic Acinar-to-Ductal Metaplasia and Pancreatic Cancer', in Su, G. H. (ed.) *Pancreatic Cancer: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer (Methods in Molecular Biology), pp. 299–308. doi: 10.1007/978-1-4939-8879-2_26.
- Wang, S., Huang, S. and Sun, Y. L. (2017) *Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer: A Review*, *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2017/2646148.
- Wang, T. *et al.* (2020) 'Mechanophysical Cues in Extracellular Matrix Regulation of Cell Behavior', *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 21(9), pp. 1254–1264. doi: 10.1002/cbic.201900686.
- Ware, M. J. *et al.* (2016) 'Generation of an in vitro 3D PDAC stroma rich spheroid model', *Biomaterials*, 108, pp. 129–142. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.041.

- Wasif, N. *et al.* (2010) 'Impact of tumor grade on prognosis in pancreatic cancer: should we include grade in AJCC staging?', *Annals of Surgical Oncology*, 17(9), pp. 2312–2320. doi: 10.1245/s10434-010-1071-7.
- Watari, N., Hotta, Y. and Mabuchi, Y. (1982) 'Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration', *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 58(4–6), pp. 837–858. doi: 10.2535/ofaj1936.58.4-6_837.
- Waters, A. M. and Der, C. J. (2017) 'KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. doi: 10.1101/cshperspect.a031435.
- Weber, C. K. *et al.* (2001) 'Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines', *Gastroenterology*, 121(3), pp. 657–667. doi: 10.1053/gast.2001.27222.
- Weber, P. *et al.* (1998) 'Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family', *Journal of Neurobiology*, 35(1), pp. 1–16.
- Weber, P. *et al.* (1999) 'Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(11), pp. 4245–4262.
- Wehr, A. Y. *et al.* (2011) 'Analysis of the Human Pancreatic Stellate Cell Secreted Proteome', *Pancreas*, 40(4), pp. 557–566. doi: 10.1097/MPA.0b013e318214efaf.
- Weiherrmann, A. C. *et al.* (2017) 'Elastin structure and its involvement in skin photoageing', *International Journal of Cosmetic Science*, 39(3), pp. 241–247. doi: 10.1111/ics.12372.
- Weissensteiner, T. and Lanchbury, J. s. (1997) 'Allelic Polymorphism of Two Multifunctional Regions in the Central Human Mhc: Tenascin X, Xb-S and Yb, and Their Duplicated Fragments Xa and Ya', *European Journal of Immunogenetics*, 24(3), pp. 201–209. doi: 10.1111/j.1365-2370.1997.00260.x.
- Weller, A., Beck, S. and Ekblom, P. (1991) 'Amino acid sequence of mouse tenascin and differential expression of two tenascin isoforms during embryogenesis', *The Journal of Cell Biology*, 112(2), pp. 355–362. doi: 10.1083/jcb.112.2.355.
- Wen, J. *et al.* (2019) 'The eighth edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) distant metastases (M) stage classification for metastatic pancreatic neuroendocrine tumors might be feasible for metastatic pancreatic ductal adenocarcinomas', *Neuroendocrinology*. doi: 10.1159/000502382.
- Weng, C.-C., Lin, Y.-C. and Cheng, K.-H. (2019) 'The Use of Genetically Engineered Mouse Models for Studying the Function of Mutated Driver Genes in Pancreatic Cancer', *Journal of Clinical Medicine*, 8(9). doi: 10.3390/jcm8091369.
- Weniger, M., Honselmann, K. C. and Liss, A. S. (2018) 'The Extracellular Matrix and Pancreatic Cancer: A Complex Relationship', *Cancers*, 10(9), p. 316. doi: 10.3390/cancers10090316.
- Wescott, M. P. *et al.* (2009) 'Pancreatic ductal morphogenesis and the Pdx1 homeodomain transcription factor', *Molecular Biology of the Cell*, 20(22), pp. 4838–4844. doi: 10.1091/mbc.e09-03-0203.
- Westphalen, C. B. and Olive, K. P. (2012) 'Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer', *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 18(6), pp. 502–510. doi: 10.1097/PPO.0b013e31827ab4c4.
- Whatcott, C. *et al.* (2013) 'Tumor-stromal interactions in pancreatic cancer', *Critical Reviews in Oncogenesis*, 18(1–2), pp. 135–151. doi: 10.1615/critrevoncog.v18.i1-2.80.
- Whatcott, C. J. *et al.* (2012) 'Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer', in Grippo, P. J. and Munshi, H. G. (eds) *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Trivandrum (India): Transworld Research Network. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98939/> (Accessed: 23 April 2020).
- Whatcott, C. J. *et al.* (2015) 'Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(15), pp. 3561–3568. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1051.
- Whatcott, C. J., Han, H. and Von Hoff, D. D. (2015) 'Orchestrating the Tumor Microenvironment to Improve Survival for Patients With Pancreatic Cancer: Normalization, Not Destruction', *The Cancer Journal*, 21(4), p. 299. doi: 10.1097/PPO.000000000000140.

- Whipple, C. and Korc, M. (2008) 'Targeting angiogenesis in pancreatic cancer: rationale and pitfalls', *Langenbeck's Archives of Surgery*, 393(6), pp. 901–910. doi: 10.1007/s00423-008-0280-z.
- Whittle, M. C. and Hingorani, S. R. (2019) 'Fibroblasts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Biological Mechanisms and Therapeutic Targets', *Gastroenterology*, 156(7), pp. 2085–2096. doi: 10.1053/j.gastro.2018.12.044.
- Wight, T. N. and Potter-Perigo, S. (2011) 'The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis?', *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301(6), pp. G950-955. doi: 10.1152/ajpgi.00132.2011.
- Wijesuriya, S. D., Bristow, J. and Miller, W. L. (2002) 'Localization and analysis of the principal promoter for human tenascin-X', *Genomics*, 80(4), pp. 443–452.
- Wilgus, T. A. (2012) 'Growth Factor–Extracellular Matrix Interactions Regulate Wound Repair', *Advances in Wound Care*, 1(6), pp. 249–254. doi: 10.1089/wound.2011.0344.
- Williams, J. A. (2010) 'Regulation of acinar cell function in the pancreas', *Current Opinion in Gastroenterology*, 26(5), pp. 478–483. doi: 10.1097/MOG.0b013e32833d11c6.
- Willis, A. L. *et al.* (2013) 'Extracellular matrix determinants and the regulation of cancer cell invasion stratagems', *Journal of Microscopy*, 251(3), pp. 250–260. doi: 10.1111/jmi.12064.
- Wilson, J. S., Pirola, R. C. and Apte, M. V. (2014) 'Stars and stripes in pancreatic cancer: role of stellate cells and stroma in cancer progression', *Frontiers in Physiology*, 5, p. 52. doi: 10.3389/fphys.2014.00052.
- Wolf, K. and Friedl, P. (2011) 'Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration', *Trends in Cell Biology*, 21(12), pp. 736–744. doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.006.
- Wong, C.-H., Li, Y.-J. and Chen, Y.-C. (2016) 'Therapeutic potential of targeting acinar cell reprogramming in pancreatic cancer', *World Journal of Gastroenterology*, 22(31), pp. 7046–7057. doi: 10.3748/wjg.v22.i31.7046.
- Wood, L. D., Yurgelun, M. B. and Goggins, M. G. (2019) 'Genetics of Familial and Sporadic Pancreatic Cancer', *Gastroenterology*, 156(7), pp. 2041–2055. doi: 10.1053/j.gastro.2018.12.039.
- Woodworth, A. *et al.* (2004) 'Neuronal-specific synthesis and glycosylation of tenascin-R', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(11), pp. 10413–10421. doi: 10.1074/jbc.M312466200.
- Xu, J.-C. *et al.* (2014) 'The extracellular matrix glycoprotein tenascin-R regulates neurogenesis during development and in the adult dentate gyrus of mice', *Journal of Cell Science*, 127(3), pp. 641–652. doi: 10.1242/jcs.137612.
- Xu, Y. *et al.* (2019) 'Ductal vs. acinar? Recent insights into identifying cell lineage of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Annals of pancreatic cancer*, 2. doi: 10.21037/apc.2019.06.03.
- Xu, Z. *et al.* (2010) 'Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis', *The American Journal of Pathology*, 177(5), pp. 2585–2596. doi: 10.2353/ajpath.2010.090899.
- Yachida, S. and Iacobuzio-Donahue, C. (2013) 'Evolution and dynamics of pancreatic cancer progression', *Oncogene*, 32(45). doi: 10.1038/onc.2013.29.
- Yamaguchi, J. *et al.* (2018) 'Cells of origin of pancreatic neoplasms', *Surgery Today*, 48(1), pp. 9–17. doi: 10.1007/s00595-017-1501-2.
- Yamamoto, G. *et al.* (2017) 'Pancreatic Stellate Cells Have Distinct Characteristics From Hepatic Stellate Cells and Are Not the Unique Origin of Collagen-Producing Cells in the Pancreas', *Pancreas*, 46(9), pp. 1141–1151. doi: 10.1097/MPA.0000000000000901.
- Yamauchi, M. *et al.* (2018) 'The fibrotic tumor stroma', *The Journal of Clinical Investigation*, 128(1), pp. 16–25. doi: 10.1172/JCI93554.
- Yang, Z. *et al.* (2017) 'Tenascin C is a prognostic determinant and potential cancer-associated fibroblasts marker for breast ductal carcinoma', *Experimental and Molecular Pathology*, 102(2), pp. 262–267. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.02.012.
- Yen, T. W. F. *et al.* (2002) 'Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas', *Surgery*, 131(2), pp. 129–134. doi: 10.1067/msy.2002.119192.

- Yoneura, N. *et al.* (2018) 'Expression of annexin II and stromal tenascin C promotes epithelial to mesenchymal transition and correlates with distant metastasis in pancreatic cancer', *International Journal of Molecular Medicine*. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2018.3652/abstract> (Accessed: 15 May 2018).
- Yu, X.-X. *et al.* (2019) 'Defining multistep cell fate decision pathways during pancreatic development at single-cell resolution', *The EMBO Journal*, 38(8), p. e100164. doi: 10.15252/embj.2018100164.
- Yuan, Y. *et al.* (2009) 'Tenascin-X is a novel diagnostic marker of malignant mesothelioma', *The American journal of surgical pathology*, 33(11), pp. 1673–1682. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181b6bde3.
- Yue, B. (2014) 'Biology of the Extracellular Matrix: An Overview', *Journal of glaucoma*, pp. S20–S23. doi: 10.1097/IJG.000000000000108.
- Yuen, A. and Díaz, B. (2014) 'The impact of hypoxia in pancreatic cancer invasion and metastasis', *Hypoxia (Auckland, N.Z.)*, 2, pp. 91–106. doi: 10.2147/HP.S52636.
- Yule, D. I. (2010) 'Pancreatic acinar cells: Molecular insight from studies of signal-transduction using transgenic animals', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(11), pp. 1757–1761. doi: 10.1016/j.biocel.2010.07.007.
- Zacharias, U. and Rauch, U. (2006) 'Competition and cooperation between tenascin-R, lecticans and contactin 1 regulate neurite growth and morphology', *Journal of Cell Science*, 119(16), pp. 3456–3466. doi: 10.1242/jcs.03094.
- Zeeberg, K. *et al.* (2016) 'Assessment of different 3D culture systems to study tumor phenotype and chemosensitivity in pancreatic ductal adenocarcinoma', *International Journal of Oncology*, 49(1), pp. 243–252. doi: 10.3892/ijo.2016.3513.
- Zeltz, C. *et al.* (2019) 'α11β1 Integrin is Induced in a Subset of Cancer-Associated Fibroblasts in Desmoplastic Tumor Stroma and Mediates In Vitro Cell Migration', *Cancers*, 11(6). doi: 10.3390/cancers11060765.
- Zeltz, C. *et al.* (2020) 'Cancer-associated fibroblasts in desmoplastic tumors: emerging role of integrins', *Seminars in Cancer Biology*, 62, pp. 166–181. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.08.004.
- Zhan, H. *et al.* (2017) 'Crosstalk between stromal cells and cancer cells in pancreatic cancer: New insights into stromal biology', *Cancer Letters*, 392, pp. 83–93. doi: 10.1016/j.canlet.2017.01.041.
- Zhang, Y. *et al.* (2017) 'Epithelial-Myeloid cell crosstalk regulates acinar cell plasticity and pancreatic remodeling in mice', *eLife*. Edited by S. Rath, 6, p. e27388. doi: 10.7554/eLife.27388.
- Zhao, L. *et al.* (2016) 'Modified methods for isolation of pancreatic stellate cells from human and rodent pancreas', *Journal of Biomedical Research*, 30(6), pp. 510–516. doi: 10.7555/JBR.30.20160033.
- Zhao, L. and Burt, A. D. (2007) 'The diffuse stellate cell system', *Journal of Molecular Histology*, 38(1), pp. 53–64. doi: 10.1007/s10735-007-9078-5.
- Zheng, X. *et al.* (2015) 'Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer', *Nature*, 527(7579), pp. 525–530. doi: 10.1038/nature16064.
- Zhou, B. *et al.* (2019) 'Obesity and pancreatic cancer: An update of epidemiological evidence and molecular mechanisms', *Pancreatology*, 19(7), pp. 941–950. doi: 10.1016/j.pan.2019.08.008.
- Zhou, Y., Zhou, Q. and Chen, R. (2012) 'Pancreatic stellate cells promotes the perineural invasion in pancreatic cancer', *Medical Hypotheses*, 78(6), pp. 811–813. doi: 10.1016/j.mehy.2012.03.017.
- Zhu, L. *et al.* (2004) 'Inhibition of Mist1 Homodimer Formation Induces Pancreatic Acinar-to-Ductal Metaplasia', *Molecular and Cellular Biology*, 24(7), pp. 2673–2681. doi: 10.1128/MCB.24.7.2673-2681.2004.
- Zhu, L. *et al.* (2007) 'Acinar Cells Contribute to the Molecular Heterogeneity of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia', *The American Journal of Pathology*, 171(1), pp. 263–273. doi: 10.2353/ajpath.2007.061176.
- Zimmermann, A. *et al.* (2002) 'Pancreatic stellate cells contribute to regeneration early after acute necrotising pancreatitis in humans', *Gut*, 51(4), pp. 574–578. doi: 10.1136/gut.51.4.574.
- Zinger, A. *et al.* (2019) 'Collagenase Nanoparticles Enhance the Penetration of Drugs into Pancreatic Tumors', *ACS Nano*, 13(10), pp. 11008–11021. doi: 10.1021/acsnano.9b02395.

- Ziv, O., Glaser, B. and Dor, Y. (2013) 'The Plastic Pancreas', *Developmental Cell*, 26(1), pp. 3–7. doi: 10.1016/j.devcel.2013.06.013.
- Zollinger, A. J. and Smith, M. L. (2017) 'Fibronectin, the extracellular glue', *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 60–61, pp. 27–37. doi: 10.1016/j.matbio.2016.07.011.
- Zweers, M. C. *et al.* (2003) 'Haploinsufficiency of TNXB Is Associated with Hypermobility Type of Ehlers-Danlos Syndrome', *The American Journal of Human Genetics*, 73(1), pp. 214–217. doi: 10.1086/376564.
- Zweers, M. C., van Vlijmen-Willems, I. M., *et al.* (2004) 'Deficiency of tenascin-X causes abnormalities in dermal elastic fiber morphology', *The Journal of Investigative Dermatology*, 122(4), pp. 885–891. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.22401.x.
- Zweers, M. C., Hakim, A. J., *et al.* (2004) 'Joint hypermobility syndromes: the pathophysiologic role of tenascin-X gene defects', *Arthritis and Rheumatism*, 50(9), pp. 2742–2749. doi: 10.1002/art.20488.
- Zweers, M. C. *et al.* (2006) 'Abdominal Aortic Aneurysm Is Associated With High Serum Levels of Tenascin-X and Decreased Aneurysmal Tissue Tenascin-X', *Circulation*, 113(13), pp. 1702–1707. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.513820.

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	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
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)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

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	Administrateur Provisoire : 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