



HAL
open science

Rôle de la boucle de régulation négative MUC4-miR-210-3p dans la cancérogenèse pancréatique et la chimio-résistance

Nihad Boukrout

► **To cite this version:**

Nihad Boukrout. Rôle de la boucle de régulation négative MUC4-miR-210-3p dans la cancérogenèse pancréatique et la chimio-résistance. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILS003 . tel-03900642

HAL Id: tel-03900642

<https://theses.hal.science/tel-03900642v1>

Submitted on 15 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.



Université de Lille
Thèse de doctorat d'université



Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Rôles de la boucle de régulation négative MUC4-miR-210-3p dans la cancérogenèse pancréatique et la chimiorésistance

Présentée par

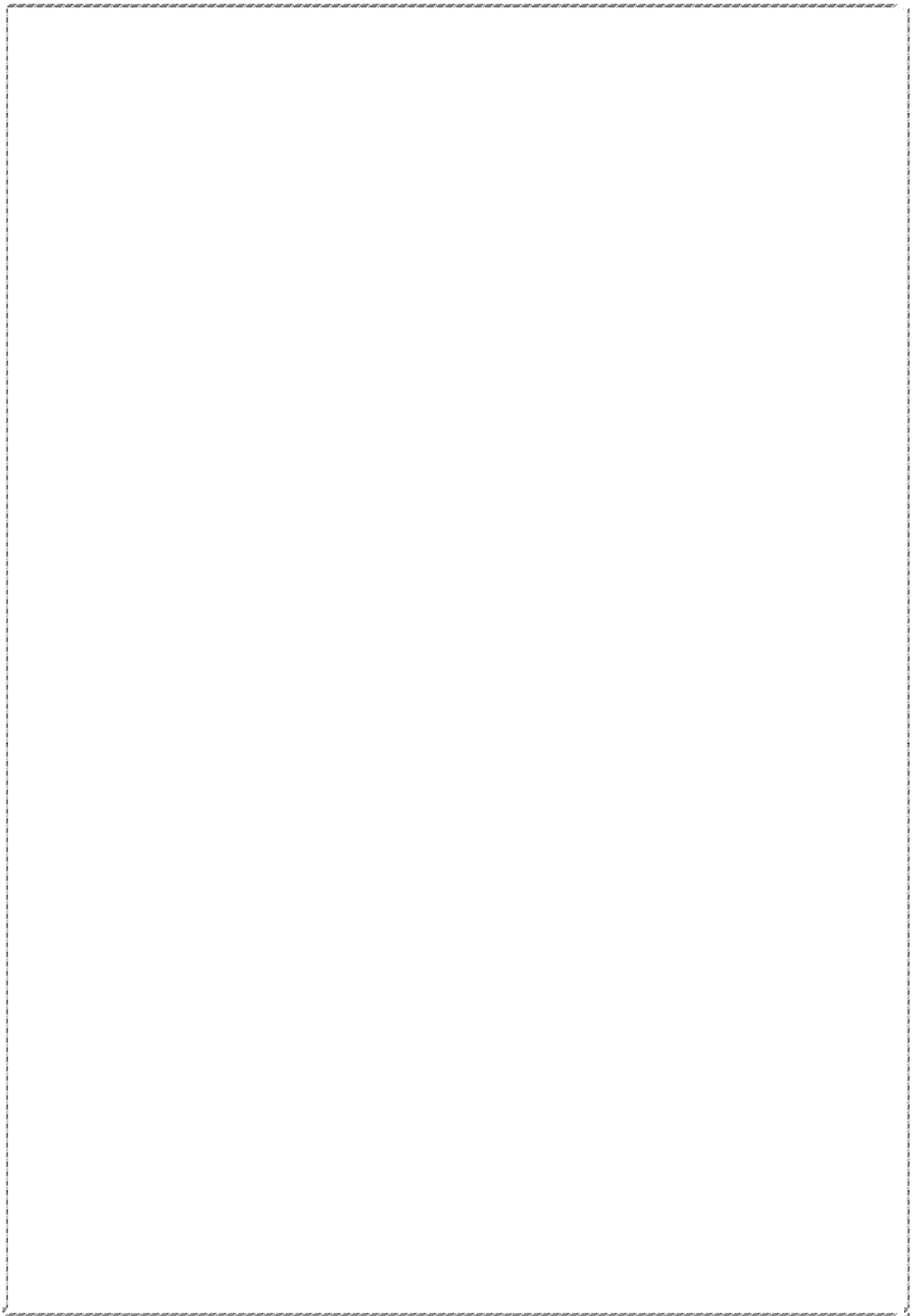
Nihad BOUKROUT

Thèse dirigée par le Docteur Nicolas JONCKHEERE

Présidente : Docteur Isabelle VAN SEUNINGEN

Rapporteurs : Docteur Cecile HAUMAITRE
Docteur Christophe François GROSSET





Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude à

Madame le **Docteur Cecile HAUMAITRE** et à monsieur le **Docteur Christophe François GROSSET** d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Madame la directrice de l'UMR CANTHER (UMR9020 CNRS – U1277 INSERM) « Hétérogénéité, Plasticité et Résistance aux Thérapies des Cancers », le **Docteur Isabelle VAN SEUNINGEN**. Je vous remercie de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de votre équipe « Mucines, cancer et résistance aux drogues », pour votre disponibilité, pour votre écoute, vos conseils, votre bienveillance et votre soutien.

Mon directeur de thèse, monsieur le **Docteur Nicolas JONCKHEERE**, de m'avoir permis d'intégrer son groupe de recherche travaillant sur la caractérisation des rôles de MUC4 dans la cancérogenèse pancréatique et chimiorésistance. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée, sa compréhension, sa bonne humeur et sa sympathie.

Mon partenaire de manip, monsieur le futur Docteur **Mouloud SOUIDI**, d'avoir partagé ses connaissances et son expérience scientifique et technique, d'avoir guidé mon travail, d'avoir passé des journées, des soirées et des week-ends de travail ensemble pour ce projet. Merci de m'avoir soutenue et épaulée, de m'avoir poussée à me surpasser. Je lui suis très reconnaissante.

Je remercie aussi

Madame le **Docteur Audrey VINCENT** pour sa disponibilité, son soutien, ses conseils, et sa confiance. Merci de croire en moi.

Monsieur le **Docteur Michael PERRAIS**, son aide, sa bienveillance, et sa sympathie.

Madame **Belinda DUCHENE** de m'avoir accompagné dans mes premières expériences scientifiques, pour son aide technique et sa gentillesse.

Madame **Marie-Paule DUCOUROUBLE**, pour sa disponibilité, son écoute et sa gentillesse.

Tous les membres de l'équipe « Mucines, cancer et résistance aux drogues » et plus particulièrement à madame le **Docteur Bernadette NEVE** pour son aide, et les anciens : **Romain, Kelly, Elodie, Aicha, Amandine, Marie** pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

L'ensemble du personnel administratif de l'UMR CANTHER pour leur disponibilité, leur réactivité et leur gentillesse.

L'ensemble du personnel administratif du Centre Lille Neurosciences et cognition et particulièrement madame le **Docteur Céline BRAND**, une personne dévouée et très gentille. Merci pour ta disponibilité, pour ton soutien et ton aide.

En plus d'être une expérience scientifique, cette thèse a été pour moi une aventure humaine au cours de laquelle j'ai rencontré des personnes formidables avec qui je me suis liée d'amitié et sans lesquelles je n'aurais pas pu aboutir.

Je remercie

Mes piliers, mes sœurs et complices, madame le **Docteur Fatima LAHDAOUI**, et madame **Marjolaine BAUZONE**. Je suis très heureuse d'avoir croisé leur chemin. Nos fous rires, nos pleurs, nos joies et nos peines, je n'oublierai aucun des souvenirs partagés avec elles. Merci d'avoir été là pour moi.

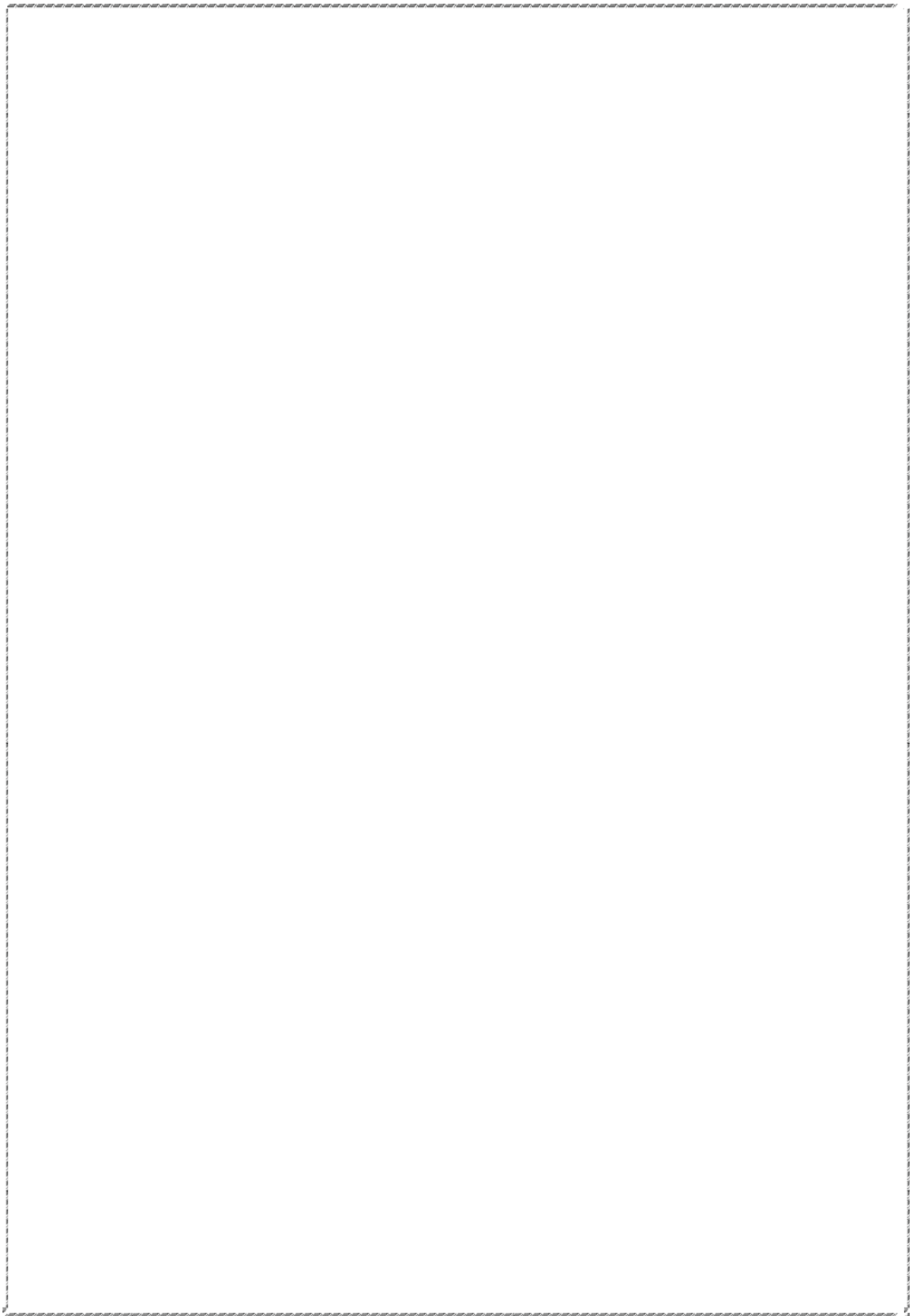
Mes amis, monsieur le Docteur **Thomas SWIERCZEWSKI**, monsieur le Docteur **Edouard ROUSSEL** et monsieur **Quentin CROIN**, Je n'oublierai jamais ces années partagées avec eux. Merci pour tout.

Mon rayon de soleil madame **Elsa HADJ BACHIR**, d'apporter de la bonne humeur et de l'énergie dans mon quotidien, son arrivée au laboratoire m'a redonné un nouveau souffle.

Monsieur Folfirinox le Docteur **Charles POIRAUD**, une personne en or et une très belle rencontre. Je n'oublierai jamais ce qu'il a fait pour moi. Merci beaucoup.

Le mystérieux monsieur **Nicolas STOUP**, une personne très intentionnée, gentille, serviable et à l'écoute. Merci pour tout.

Enfin, je remercie mes parents et ma sœur grâce auxquels j'en suis là aujourd'hui. Merci pour tout ce que vous faites pour moi. Je vous aime.



Résumé

Contexte : l'adénocarcinome pancréatique (PDAC) est un cancer mortel dont le pronostic est extrêmement sombre. La mucine membranaire MUC4 est néoexprimée dans les lésions néoplasiques pancréatiques précoces et est associée à la progression du PDAC et à la chimiorésistance. Dans les cancers, les microARNs (miARNs, petits ARNs non codants) sont des régulateurs cruciaux de la cancérogenèse, de la réponse aux chimiothérapies et même des processus métastatiques. Dans cette étude, nous avons voulu caractériser les miARNs activés en aval de la signalisation associée à MUC4 dans l'adénocarcinome pancréatique et de mettre en évidence leurs rôles dans la cancérogenèse pancréatique et la résistance aux chimiothérapies.

Méthodes : Afin d'identifier les miARNs potentiellement régulés par MUC4, un *miRnome* a été réalisé sur les cellules cancéreuses invalidées pour MUC4 (MUC4-KD) et leurs contrôles Mock. Nous avons sélectionné, pour cette étude, le miR-210-3p qui est sous exprimé suite à l'invalidation de MUC4. Nous avons ensuite voulu déterminer ses rôles biologiques dans les PDACs. Le niveau d'expression de miR-210-3p a été analysé par RT-qPCR dans des lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques (PANC89, PANC89 Mock et MUC4-KD, PANC-1 et MiaPACA-2), ainsi que dans des tissus de souris et de patients. La régulation réciproque entre MUC4 et miR-210-3p a été étudiée par des tests fonctionnels tels que des mesures d'activité luciférase et des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine. Des lignées cellulaires exprimant stablement le miR-210-3p ou un anti-miR-210-3p ont été établies en utilisant la technologie Crispr/Cas9 ou la transduction lentivirale. Nous avons évalué l'activité biologique de miR-210-3p *in vitro* en mesurant la prolifération et la migration cellulaire et *in vivo* en mesurant la croissance tumorale après xénogreffe sous-cutanée des cellules Capan-1 LV-miR-210-3p. Enfin, nous avons évalué l'effet de miR-210-3p sur la réponse aux chimiothérapies gemcitabine et FOLFIRINOX par la réalisation de tests MTT.

Résultats : L'invalidation de MUC4 induit une baisse significative de l'expression de miR-210-3p dans les cellules cancéreuses pancréatiques PANC89 MUC4-KD. Le miR-210-3p est surexprimé dans les PDACs et son expression est

corrélée à l'expression de MUC4 dans les cellules cancéreuses pancréatiques, dans des échantillons de tissus PDAC humains, ainsi que dans des tissus murins du modèle préclinique Pdx1-Cre ; LstopL-KrasG12D développant des lésions PanINs. MUC4 active transcriptionnellement l'expression de miR-210-3p *via* l'altération de la voie de signalisation NF- κ B. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré la liaison de la sous-unité p50 de NF- κ B sur les régions promotrices du miR-210-3p. Nous avons mis en évidence une régulation réciproque puisque le miR-210-3p réprime l'expression de MUC4 transcriptionnellement *via* l'inhibition de la voie du TGF- β SMAD dépendante et post-transcriptionnellement *via* le 3'UTR. La surexpression transitoire et stable de miR-210-3p dans les cellules PANC89, PANC-1 et MIA PaCa-2 conduit à une baisse significative de la prolifération et de la migration cellulaire. En revanche l'anti-miR-210-3p induit les effets inverses. Enfin, nous avons montré que le miR-210-3p inhibe la croissance et la prolifération des tumeurs pancréatiques *in vivo*. Nos résultats préliminaires suggèrent également un rôle de miR-210-3p dans la réponse aux chimiothérapies.

Conclusion : Nous avons mis en évidence pour la première fois l'existence d'une boucle de régulation entre une mucine et un miARN. En effet, nous avons caractérisé la boucle de régulation négative MUC4-miR-210-3p dès les stades précoces de cancérogenèse pancréatique, mais nous avons également révélé un rôle anti-tumoral de miR-210-3p *via* l'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses pancréatiques *in vitro* et *in vivo*, suggérant un équilibre complexe entre les rôles pro-oncogéniques de MUC4 et les effets anti-tumoraux du miR-210-3p.

Mots clés : cancer du pancréas, MUC4, miR-210-3p, miR anti-tumoral

Abstract

Background: Pancreatic adenocarcinoma (PDAC) is a deadly cancer with an extremely poor prognosis. MUC4 membrane-bound mucin is neoexpressed in early pancreatic neoplastic lesions and is associated with PDAC progression and chemoresistance. In cancers, miRNA (small noncoding RNAs) are crucial regulators of carcinogenesis, chemotherapy response and even metastatic processes. In this study, we aimed at identifying and characterizing miRNAs activated downstream of MUC4-associated signaling in pancreatic adenocarcinoma. *MiRnome* analysis comparing MUC4-KD versus Mock cancer cells showed that MUC4 inhibition impaired miR-210-3p expression. Therefore, we aimed to better understand the miR-210-3p biological roles.

Methods: miR-210-3p expression level was analyzed by RT-qPCR in PDAC-derived cell lines (PANC89 Mock and MUC4-KD, PANC-1 and MiaPACA-2), as well as in mice's and patients' tissues. The MUC4-miR-210-3p regulation was investigated using luciferase reporter construct and chromatin immunoprecipitation experiments. Stable cell lines expressing miR-210-3p or anti-miR-210-3p were established using Crispr/Cas9 technology or lentiviral transduction. We evaluated the biological activity of miR-210-3p in vitro by measuring cell proliferation and migration and in vivo using a model of subcutaneous xenograft.

Results: miR-210-3p expression is correlated with MUC4 expression in PDAC-derived cells and human samples, and in pancreatic PanIN lesions of Pdx1-Cre; LstopL-KrasG12D mice. MUC4 enhances miR-210-3p expression levels *via* alteration of the NF- κ B signaling pathway. Chromatin immunoprecipitation experiments showed p50 NF- κ B subunit binding on miR-210-3p promoter regions. We established a reciprocal regulation since miR-210-3p repressed MUC4 expression *via* its 3'-UTR. MiR-210-3p transient transfection of PANC89, PANC-1 and MiaPACA-2 cells led to a decrease in cell proliferation and migration. These biological effects were validated in cells overexpressing or knocked-down for miR-210-3p. Finally, we showed that miR-210-3p inhibits pancreatic tumor growth and proliferation in vivo.

Conclusion: We identified a MUC4-miR-210-3p negative feedback loop in early-onset PDAC, but also revealed new functions of miR-210-3p in both in vitro and in vivo proliferation and migration of pancreatic cancer cells, suggesting a complex balance between MUC4 pro-oncogenic roles and miR-210-3p anti-tumoral effects.

Keywords: pancreatic cancer; MUC4; miR-210-3p; anti-tumoral miR

Valorisation des travaux

Mes travaux de thèse ont principalement fait l'objet de :

Article publié

Antagonistic roles of the tumor suppressor miR-210-3p and oncomucin MUC4 forming a negative feedback loop in pancreatic adenocarcinoma

Nihad Boukrout, Mouloud Souidi, Fatima Lahdaoui, Belinda Duchêne, Bernadette Neve, Lucie Coppin, Emmanuelle Leteurtre, Jérôme Torrisani, Isabelle Van Seuningen and Nicolas Jonckheere

Cancers (Basel). 09 decembre 2021. (L'article est joint à la fin du manuscrit).

Communications orales

38^{ème} réunion du Club d'Etude des Cellules Epitheliales Digestives (CECED). Format digital. (mars 2021)

Journée de l'Axe 1 du Cancéropôle Nord-Ouest. France. Format digital. (Novembre 2020).

La 19^{ème} édition de la journée des doctorants de l'Ecole doctorale Biologie Santé de Lille. Journée André Verbert. (septembre 2019).

15th international workshop on carcinoma-associated mucins. Robinson College, Cambridge, UK. (juillet-aout 2019)

Communications par affiche

Rôles de MUC4-miR-210 dans la cancérogenèse pancréatique et la résistance aux chimiothérapies.

12^e Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. France. (mai 2019).

11^e Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. France. (mai 2018).

Journée scientifique de l'association française de la recherche sur le cancer pancréatique AFRC. France. (septembre 2017).

Autres articles publiés

J'ai également participé à d'autres travaux au sein du laboratoire. Je suis coauteur de deux autres publications intitulées :

Unsupervised Hierarchical Clustering of Pancreatic Adenocarcinoma Dataset from TCGA Defines a Mucin Expression Profile that Impacts Overall Survival.

Nicolas Jonckheere, Julie Auwercx, Elsa Hadj Bachir, Lucie Coppin, Nihad Boukrout, Audrey Vincent, Bernadette Neve, Mathieu Gautier, Victor Treviño, Isabelle Van Seuningen

Cancers (Basel). 9 novembre 2020, doi: 10.3390/cancers12113309

TGF- β RII Knock-down in Pancreatic Cancer Cells Promotes Tumor Growth and Gemcitabine Resistance. Importance of STAT3 Phosphorylation on S727.

Drubay V, Skrypek N, Cordiez L, Vasseur R, Schulz C, Boukrout N, Duchêne B, Coppin L, Van Seuningen I, Jonckheere N.

Cancers (Basel). 31 juillet 2018, doi: 10.3390/cancers10080254.

Table des matières

Abréviations	1
Introduction	5
I. Le pancréas	7
I.1. Historique	7
I.2. Anatomie du pancréas.....	7
I.3. Fonctions.....	8
I.3.1. Pancréas endocrine.....	8
I.3.1.a. Architecture cellulaire et fonction.....	8
I.3.1.b. Pathologies associées.....	10
<u>1)</u> Maladies métaboliques	10
Le diabète	10
L'obésité :.....	11
<u>2)</u> Tumeurs neuroendocrines pancréatiques.....	11
I.3.2. Pancréas exocrine.....	12
I.3.2.a. Architecture cellulaire et fonction.....	12
I.3.2.b. Pathologies associés.....	14
<u>1)</u> Pancréatite.....	14
<u>2)</u> Cancers du pancréas exocrine	15
II. Cancer du pancréas	17
II.1. Cancérogenèse pancréatique	17
II.1.1. Lésions précancéreuses pancréatiques	17
<u>A.</u> Lésions macroscopiques	17
A.1. Néoplasmes intra-canalaires, papillaires et mucineux (IPMNs).....	17
A.2. Néoplasmes mucineux kystiques (MCN).....	19
A.3. Néoplasmes intra-canalaires tubulopapillaires (ITPNs)	19
A.4. Néoplasmes intra-canalaires, oncocytaires et papillaires (IOPNs)	20

<u>B.</u> Lésions microscopiques.....	20
B.1. Néoplasie intraépithéliale pancréatique (PanINs).....	20
B.1.1. Modifications cytologiques et architecturales des PanINs	22
B.1.2. Modifications moléculaires des PanINs	22
II.1.2. Adénocarcinome pancréatique canalaire	24
<u>A.</u> Classification histopathologique du PDAC.....	26
<u>B.</u> Classification moléculaire du PDAC.....	27
II.1.3. Métastases	30
II.2. Epidémiologie du cancer du pancréas.....	32
II.3. Facteurs de risque.....	32
II.3.1. Facteurs de risques irréversibles d'ordre génétiques	32
II.3.1. Facteurs de risques réversibles d'ordre environnemental	34
II.4. Diagnostic.....	35
II.4.1. Examens morphologiques	35
II.4.2. Examens biologiques	36
II.5. Traitements	37
II.5.1. Molécules chimiothérapeutiques	38
Gemcitabine.....	38
Nab-paclitaxel	39
FOLFIRINOX	39
II.5.2. Schémas de prises en charge thérapeutique	40
II.5.2.1. Tumeurs résécables	40
II.5.2.2. Tumeurs borderline et localement avancées.....	41
II.5.2.3. Tumeurs métastatiques	41
II.5.2.4. Perspectives pour les chimiothérapies PDACs	42
II.5.3. Résistance aux chimiothérapies	43

III. Les mucines	44
III.1. Structure des mucines	44
<u>1)</u> Apomucine	44
<u>2)</u> Chaînes oligosaccharidiques	45
III.2. Familles des mucines	45
III.2.1. Les mucines sécrétées	45
III.2.2. Les mucines transmembranaires	46
III.3. Fonctions physiologiques des mucines	48
III.4. Mucines et cancers	48
III.5. Mucines et cancers du pancréas	50
III.6. La mucine transmembranaire 4 « MUC4 »	50
III.6.1. Structure	51
III.6.2. Régulation de l'expression de MUC4 dans les PDACs	53
III.6.2.1. Régulation épigénétique	53
III.6.2.2. Régulation transcriptionnelle	53
III.6.2.3. Régulation post-transcriptionnelle	54
III.6.3. Fonctions de MUC4 au cours de la cancérogenèse pancréatique	55
III.6.4. Partenaires de MUC4	56
III.6.4.1. Récepteurs de la famille ErbB	56
<u>A)</u> Généralité	56
<u>B)</u> Complexe MUC4-ErbB2	58
<u>C)</u> Complexe MUC4-ErbB3	59
III.6.4.2. Galectines	60
<u>A)</u> Généralités	60
<u>B)</u> Complexe MUC4-Galectine-3	60
III.6.5. MUC4 module des mécanismes cellulaires oncogéniques dans les PDACs	60

III.6.5.1. Prolifération et croissance tumorale	61
III.6.5.2. Migration invasion et métastase	61
III.6.5.3. Chimiorésistance	63
IV. Les Micro-ARNs	65
IV.1. Les longs ARNnc	66
IV.2. Les petits ARNnc	66
IV.3. Les microARNs	67
IV.3.1. Découverte des miARNs	67
IV.3.2. Biogenèse des miARNs	67
IV.3.2.1. Voie de biogenèse canonique	68
IV.3.2.1. Voie de biogenèse non canonique	68
IV.3.3. Les miARNs régulateurs de l'expression génique	70
IV.3.3.1. Sélection du brin guide	70
IV.3.3.2. Distribution subcellulaire des miARNs	70
IV.3.3.3. Les miARNs régulateurs transcriptionnels	71
IV.3.3.4. Les miARNs régulateurs post-transcriptionnels	71
IV.3.4. Rôles physiopathologiques des miARNs	73
IV.3.5. MiARNs et cancers	73
IV.3.6. MiR-210 et PDACs	76
IV.3.7. Les miARNs outils thérapeutiques dans les cancers	77
Objectifs de la thèse	80
Résultats	82
1. Sélection des microARNs d'intérêt	83
2. Caractérisation de la boucle de régulation MUC4-miR-210-3p	89
2.1. MiR-210-3p est surexprimé dans les PDACs	900
2.2. L'expression de miR-210-3p est positivement corrélée avec l'expression de Muc4 au cours de la carcinogenèse pancréatique.	91

2.3. MUC4 régule l'expression de miR-210 au niveau transcriptionnel	94
2.4. MiR-210-3p réprime l'expression de MUC4 dans les cellules cancéreuses pancréatiques.....	96
3. Etude des rôles de miR-210-3p dans les cellules cancéreuses pancréatiques.....	101
3.1. MiR-210-3p inhibe la prolifération et la migration des cellules cancéreuses pancréatiques <i>in vitro</i>	102
3.2. MiR-210-3p inhibe la croissance des tumeurs pancréatiques <i>in vivo</i>	108
4. Etude des effets de miR-210-3p sur la réponse aux chimiothérapies	110
Le miR-210-3p est associé à la réponse aux chimiothérapies des PDACs....	112
Discussion	114
Contexte d'étude	115
Boucle de rétro-régulation négative MUC4-miR-210-3p.....	116
Rôles de miR-210-3p dans la cancérogenèse pancréatique	120
Conclusions et perspectives	122
Conclusion générale.....	124
Perspectives d'étude	124
Appendice technique	127
Tissus et cellules utilisés	128
Tissus de patients	128
Modèle murin <i>Pdx-1 –Cre/KrasG12D</i>	128
Lignées cellulaires pancréatiques humaines:.....	129
Établissement de lignées cellulaires stables miR-210.....	131
Traitements chimiothérapeutiques	133
Transfection cellulaire	134
Test MTT	134
Prolifération cellulaire	135
Test de migration par fermeture de blessure.....	135

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	135
Extraction d'ARN et RT-qPCR.....	137
Western blotting	138
Test d'activité luciférase	139
Xénogreffes	140
Immunohistochimie	140
Manuelle.....	140
Automate	141
Prédiction des miARNs ciblant potentiellement MUC4.....	142
Analyse des données GEO	142
Tests statistiques.....	142
Bibliographie	143
Article	170

Liste des figures

Introduction

Chapitre 1 : Le pancréas

Figure 1. Localisation du pancréas dans l'appareil digestif	6
Figure 2. Le pancréas est une glande mixte	9
Figure 3. Le pancréas endocrine.....	9
Figure 4. Le pancréas exocrine.....	13
Figure 5. Représentation schématique des deux types de pancréatite	15

Chapitre 2 : Cancer du pancréas

Figure 6. Lésions précancéreuses pancréatiques.....	16
Figure 7. Sous-classification histologique des IPMNs.....	18
Figure 8. Changements histologiques et altérations moléculaires des PanINs	23
Figure 9. Caractéristiques macroscopiques et histologiques du PDAC et de ses variantes.....	25
Figure 10. Grades histologiques du PDAC.....	26
Figure 11. Processus de métastase du cancer pancréatique.....	31
Figure 12. Incidence et mortalité du PDAC	33
Figure 13. Spectre du cancer du pancréas localisé	37
Figure 14. Métabolisme et mode d'action de la gemcitabine.....	38
Figure 15. Résection chirurgicale du pancréas	40

Chapitre 3 : Mucines

Figure 16. Schéma représentatif des structures de mucines secrétées et membranaires et leurs différents domaines	46
Figure 17. Expressions des mucines dans les lésions précancéreuses du PDAC	49
Figure 18: Représentation schématique de la structure de MUC4.....	52
Figure 19. Rôles de la mucine MUC4 dans le cancer	55
Figure 20. Récepteurs de la famille ErbB.....	57
Figure 21. Interaction MUC4-ErbB2	58

Figure 22. Mécanismes associés à la métastase des cellules cancéreuses pancréatiques médiée par l'interaction galectine-3-MUC4	62
Figure 23. Représentation schématique des mécanismes de chimiorésistance à la gemcitabine dans les cellules cancéreuses pancréatiques	64

Chapitre 4 : Les microARNs

Figure 24. Voies de biogenèse des miARNs.....	69
Figure 25. Les miARNs régulateurs de l'expression génique.....	72
Figure 26. Mécanismes de régulation de l'expression des miARNs dans les cancers.....	74
Figure 27. Applications thérapeutiques potentielles des miARNs	79

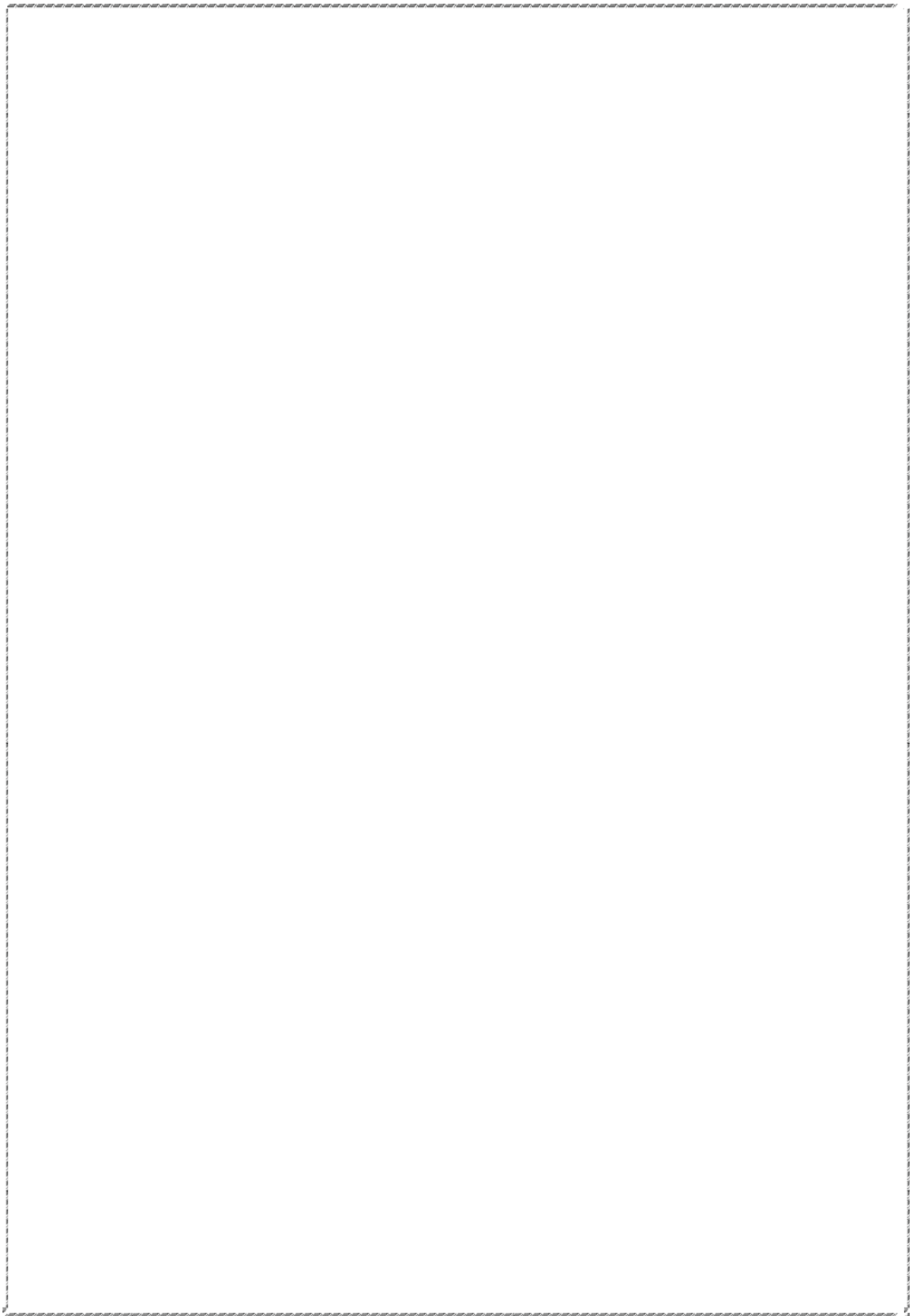
Résultats

Figure 28. Validation de la baisse d'expression des miR-96-5p, miR-132-3p, et miR-210-3p dans les cellules cancéreuses 647-V MUC4-KD	84
Figure 29. Validation de la baisse d'expression de miR-210-3p dans les cellules cancéreuses pancréatiques PANC89 MUC4-KD	87
Figure 30. Expressions des miR-96-5p, miR-132-3p et miR-210-3p dans les PDACs	87
Figure 31. MiR-210-3p est surexprimé dans les tissus de PDACs et les lignées cellulaires de cancer du pancréas.....	90
Figure 32. L'expression de MiR-210-3p est corrélée à l'expression de Muc4 dans les lésions PanINs.....	92
Figure 33. MUC4 régule l'expression de miR-210 <i>via</i> la voie de NF- κ B.....	95
Figure 34. MiR-210-3p réprime l'expression de MUC4 <i>via</i> son 3'-UTR.....	97
Figure 35. Mécanismes de régulation de MUC4 par miR-210-3p	99
Figure 36. Boucle miR-210-3p-MUC4 en conditions hypoxiques	100
Figure 37. L'expression transitoire de miR-210-3p inhibe la prolifération et la migration des cellules cancéreuses pancréatiques	104
Figure 38. La surexpression stable de miR-210-3p et de l'anti-miR-210-3p régule la prolifération et la migration des cellules cancéreuses pancréatiques	106
Figure 39. MiR-210-3p inhibe la croissance des tumeurs pancréatiques <i>in vivo</i>	107

Figure 40. L'expression de miR-210-3p est altérée dans les cellules
cancéreuses pancréatiques résistantes aux chimiothérapies 111

Conclusion

Figure 41. Représentation schématique des effets de miR-210-3p dans les
PDACs 123



Liste des tableaux

Introduction

Chapitre 2 : Cancer du pancréas

Tableau 1. Caractéristiques des lésions précancéreuses pancréatiques.....	21
Tableau 2. Variantes du PDAC	25
Tableau 3. Les caractéristiques des grades histologiques du PDAC	26
Tableau 4. Classification moléculaire du PDAC	29

Chapitre 4 : Les microARNs

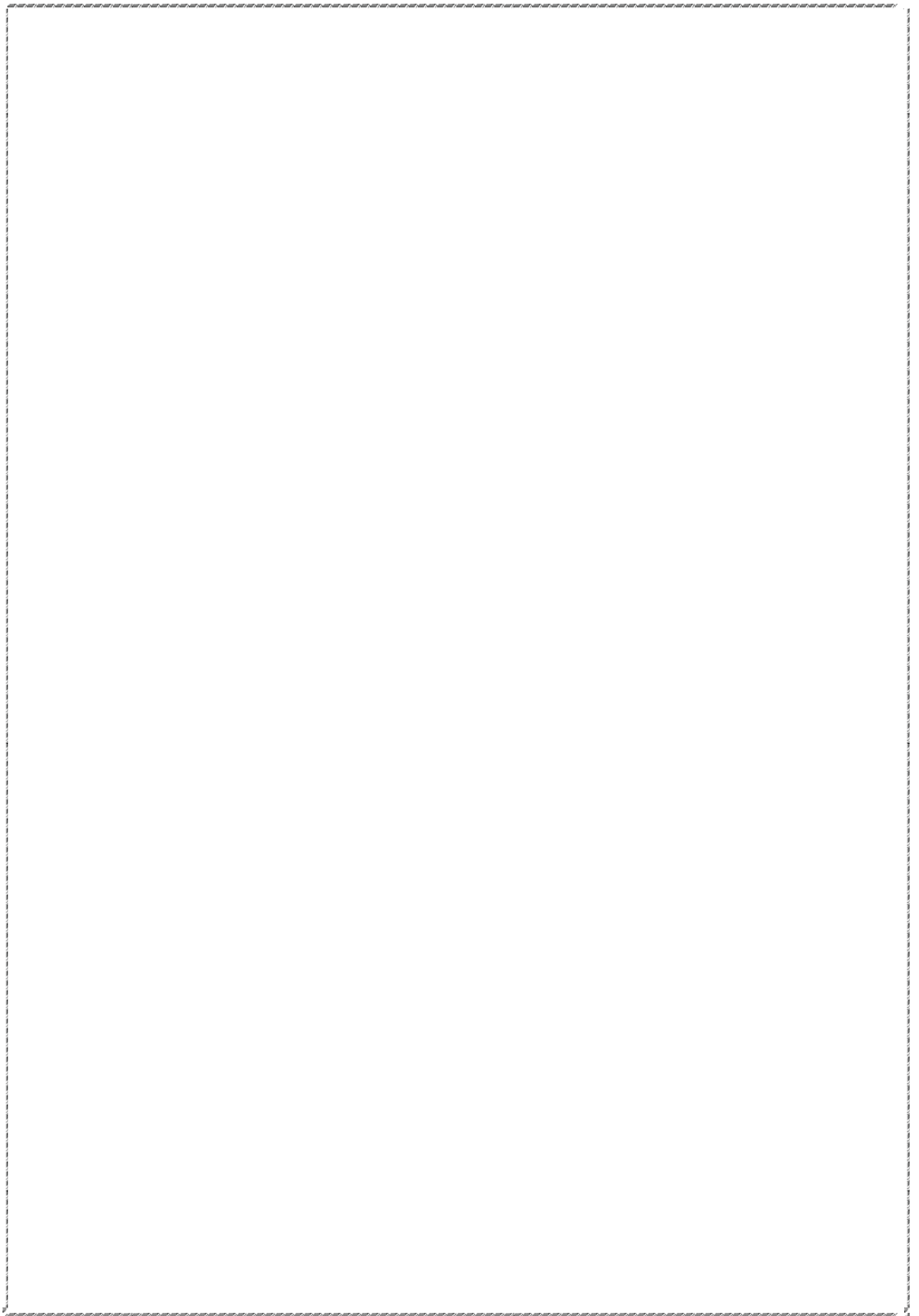
Tableau 5. Exemples de miARNs dérégulés avec leurs cibles potentielles et leurs fonctions biologiques suggérées	76
---	----

Résultats

Tableau 6. Liste des miARNs dérégulés dans les cellules 647-V MUC4-KD .	85
---	----

Appendice technique

Tableau 7. Caractéristiques des lignées cancéreuses pancréatiques.....	130
Tableau 8. Composition milieu de culture des différentes lignées cellulaires	131
Tableau 9. Séquences de blocks d'ADN utilisés pour l'établissement des lignées stables	133
Tableau 10. Liste des amorces utilisées pour les expériences de CHIP	137
Tableau 11. Composition du SDS-loading-buffer 2X.....	138
Tableau 12. Composition du gel d'agarose 2 % pour western blot MUC4 ...	139
Tableau 13. Listes des anticorps pour western blot	139



Abréviations

- 3'-UTR** : 3' *Untranslated region*
- 5'-UTR** : 5' *Untranslated region*
- 5-FU** : 5-Fluorouracile
- ADEX** : *Aberrantly Differentiated Endocrine Exocrine*
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ADNc** : ADN complémentaire
- AGO** : Argonaute
- Akt** : *v-akt murine thymoma viral oncogene*
- AMOP** : *Associated Domain in MUC4 and Other Proteins,*
- ARN** : Acide Ribonucléique
- ARNm** : ARN messenger
- ARNnc** : ARN non codants
- BCA** : *BiCinchoninic Acid Assay*
- BSA** : Sérum-Albumine Bovine
- CA 19-9** : Antigène glucidique 19-9.
- CDK** : *Cyclin-Dependent Kinase*
- ChIP** : Immunoprécipitation de la Chromatine
- CK** : Cystine Knot
- CO₂** : Dioxyde de carbon
- Ct** : *Threshold Cycle*
- CTCs** : Cellules Cancéreuses Circulantes
- Cter** : Carboxy-terminal
- DAB** : 3,3–Diaminobenzidine
- dATP** : *Désoxyadénine Tri-Phosphate*
- dFdCDP** : Nucleosides gemcitabine diphosphate
- dFdCTP** : Nucleosides gemcitabine triphosphate
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- DNAses** : Désoxyribonucléases
- D-PBS** : *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*
- DT2** : Diabète de type 2

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

EGF : *Epidermal Growth Factor*

EGFR : *EGF receptor*

ErbB2 : *Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2*

Gal3 : Galectine-3

GAPDH : Glycéraldéhyde 3-Phosphate Déshydrogénase

GDPH : Glycine/Aspartate/Proline/Histidine

GEO : *Gene Expression Omnibus*

GSK 3 β : *Glycogen Synthase Kinase-3 beta*

hCNT1 : *human Concentrative Nucleoside Transporter 1*

hENT1 : human Equilibrative Nucleoside Transporter 1

HIF : *Hypoxia Inducible Factor*

HPDE : *Human Pancreatic Ductal Epithelial Cells*

HPF : High-Power Field.

IC50 : *Inhibitory Concentration 50*

IHC : Immunohistochimie

IMC : Indice de Masse Corporelle

IOPN : Néoplasmes Intra-canaliaires, Oncocytaires et Papillaires

IPMN : Néoplasmes Intra-canaliaires, Papillaires et Mucineux

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ITPN : Néoplasmes Intra-canaliaires TubuloPapillaires

JNK : *Jun N-terminal Kinase*

KC : *Pdx1-Cre;K-rasG12D*

KD : *Knock-Down*

KRAS : *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

KSF : *Keratinocyte Serum Free*

LNA : *Locked Nucleic Acid*

LncARNs : Longs ARNs non codants

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinases*

MCN : Néoplasmes Mucineux Kystiques

MEC : Matrice Extracellulaire

miARN : microARN

miRISC : *miRNA Silencing Complex*

MMP : Métalloprotéinase

MRE : *miRNA Response Element*

MTT : *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, sel de tétrazolium

MUC : Gene de mucine

MUC4-KD : *MUC4 Knocked Down*

MUC4 : Mucine 4

MUCtm : Mucines transmembranaires

NFκB : *Nuclear Factor-kappa B*.

NIDO : *Nidogen*,

Nter : Amino-terminal

O₂ : Oxygen

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PA : Pancréatite aiguë

PanINs : *Pancreatic Intraepithelial Neoplasia*

Pb : Paires de base

P-bodies : *Processing bodies*

PC : Pancréatite Chronique

PDAC : Adénocarcinome Pancréatique Canalaire Invasif

PEA3 : *Polyomavirus Enhancer Activator-3*

pARNnc : Petits ARNnc

PI3K : Phosphoinositide-3-Kinase

PKA : Protéine Kinase A

PMN : Niche Pré-Métastatique

PNET : Pancreatic Neuroendocrine Tumors

POLO : *Pancreas Olaparib Ongoing*

Pré-miR : Pré-miARN, Précurseur de miARN

Pri-miR : Pri-miRNA, Transcrit primaire de miARN

PTS : Proline/Thréonine/Sérine

RISC : *RNA-Induced Silencing Complex*

RNase : Ribonucléase

RT : Rétrotranscription

RTK : Récepteur à activité Tyrosine Kinase

RT-PCR : *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

SD : *Standard Deviation*

SDS : *Sodium dodecyl sulfate*
SEA : *Sea-urchin Sperm protein, enterokinase*
SG : *Survie Globale*
SMAD : *Mothers Against Decapentaplegic*
SPARC : *Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*
STAT : *Signal Transduction and Activator of Transcription*
SVF : *Sérum de Vœu Fœtal*
TBS-T : *Tris Buffer Saline Tween*
TCGA : *The Cancer Genome Atlas*
TEM : *Transition-Epithélio-Mésenchymateuse*
TGF- β : *Transforming Growth Factor- β*
TM : *Domaine Transmembranaire*
TR : *Tandem Repeat*
VNTR : *Variable Number of Tandem Repeat*
vWF : *von Willebrand Factor*
WB : *Western Blot*
WT : *Wild Type, Pdx1-Cre;K-rasWT*

Introduction

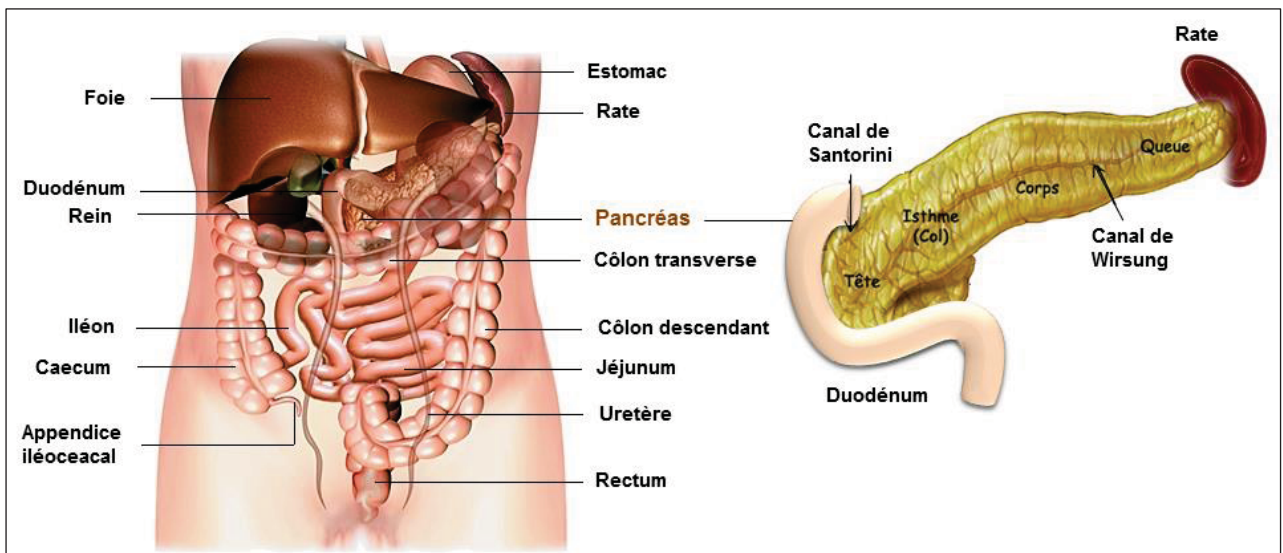


Figure 1 : Localisation du pancréas dans l'appareil digestif.
Adapté du dictionnaire Larousse.

I. Le pancréas

I.1. Historique

Cet organe, dit ermite, a longtemps été ignoré et ne suscitait pas l'intérêt des chirurgiens de l'antiquité. Les Grecs sont les premiers à l'avoir reconnu comme un organe distinct. Ce n'est que vers 300 av J-C qu'Hérophile de Chalcédoine, le père de l'anatomie grecque de l'époque, a fourni une première description de ce dernier. Le nom « pancréas » (πάγκρεας) lui a été attribué par l'anatomiste grec Rufus d'Ephèse vers 100 après J-C. Ce mot vient du grec ancien πᾶν (pan) qui signifie tous et de κρέας (kréas) qui signifie chair ou viande. Le pancréas, littéralement tout en chair ou en viande, a probablement été nommé ainsi au vu de sa composition et de sa consistance relativement uniformes et dépourvues d'os ou de cartilage. Il a fallu attendre le XVIIème siècle pour avoir une description des fonctions sécrétoires du pancréas grâce aux travaux de Wirsung, Graaf et Brunner. Des centaines d'années plus tard, la mise en évidence des fonctions du pancréas lui ont permis de s'imposer comme élément indispensable de l'appareil digestif (Busnardo *et al.*, 1983).

I.2. Anatomie du pancréas

Le pancréas est un organe plein, mesurant environ 20 cm de long et 2 cm d'épaisseur, pesant entre 60 et 80 grammes, de couleur jaunâtre-blanchâtre, de consistance ferme et d'aspect granuleux. Il est logé au plus profond de la partie postérieure de la cavité abdominale. Il a une forme triangulaire, allongé transversalement et un peu aplatie d'avant en arrière. Il comporte 4 portions anatomiques. De droite à gauche on distingue : la tête, qui représente la partie la plus volumineuse du pancréas et qui est enchâssée dans le cadre duodénal, l'isthme ou col pancréatique faisant office de jonction entre la tête et le corps, le corps qui s'étend transversalement à travers la paroi postérieure de l'abdomen, et enfin la queue, se terminant au contact de la rate.

Le pancréas est parcouru sur toute sa longueur par un canal principal nommé le canal de Wirsung. Il part de la queue, traverse le corps et forme un coude avant de pénétrer dans la tête. Chez certains individus, il existe une autre voie canalaire accessoire nommée canal de Santorini qui part du coude du canal principal et n'est

présent que dans la tête du pancréas. Ces canaux constituent un système de drainage permettant l'écoulement des sécrétions pancréatiques dans le duodénum (Figure 1).

I.3. Fonctions :

Le pancréas est la deuxième plus grande glande extrapariétale du système gastro-intestinal. Cette glande amphicrine hétérotypique est formée de deux compartiments (exocrine et endocrine), de compositions cellulaires et de fonctions différentes, jouant des rôles essentiels dans le métabolisme glucidique et la digestion alimentaire (Figure 2).

I.3.1. Pancréas endocrine :

I.3.1.a. Architecture cellulaire et fonction

Cette unité fonctionnelle représente seulement 1 à 2 % de la masse totale du pancréas. Elle est constituée d'agglomérats pluricellulaires hautement vascularisés appelés îlots de Langerhans. Chaque îlot pancréatique est composé en moyenne de 3 000 cellules subdivisées en quatre principaux types cellulaires, caractérisés par des profils d'expression hormonale spécifiques. Les cellules β représentent les composantes cellulaires majoritaires des îlots (environ 70 %). Elles sécrètent principalement l'insuline. Les cellules α (10 %) sécrètent le glucagon. Les cellules PP (15 %) sécrètent le polypeptide pancréatique. Les cellules δ (5 %) sécrètent la somatostatine. Enfin, les cellules ϵ (1 %) sécrètent la ghréline (Rorsman and Huising, 2018, Campbell and Newgard, 2021).

Une des principales fonctions des glandes pancréatiques endocrines est la régulation du métabolisme glucidique. En effet, le taux sanguin de glycémie est maintenu en équilibre grâce aux effets de l'insuline et du glucagon. L'hyperglycémie active la sécrétion d'insuline qui (1) favorise la glycolyse qui conduit au stockage du glucose sous forme de glycogène (glycogénèse), ainsi que la conversion du glucose en triglycérides dans le foie et (2) stimule l'absorption et le stockage du glucose par les cellules musculaires squelettiques et les adipocytes.

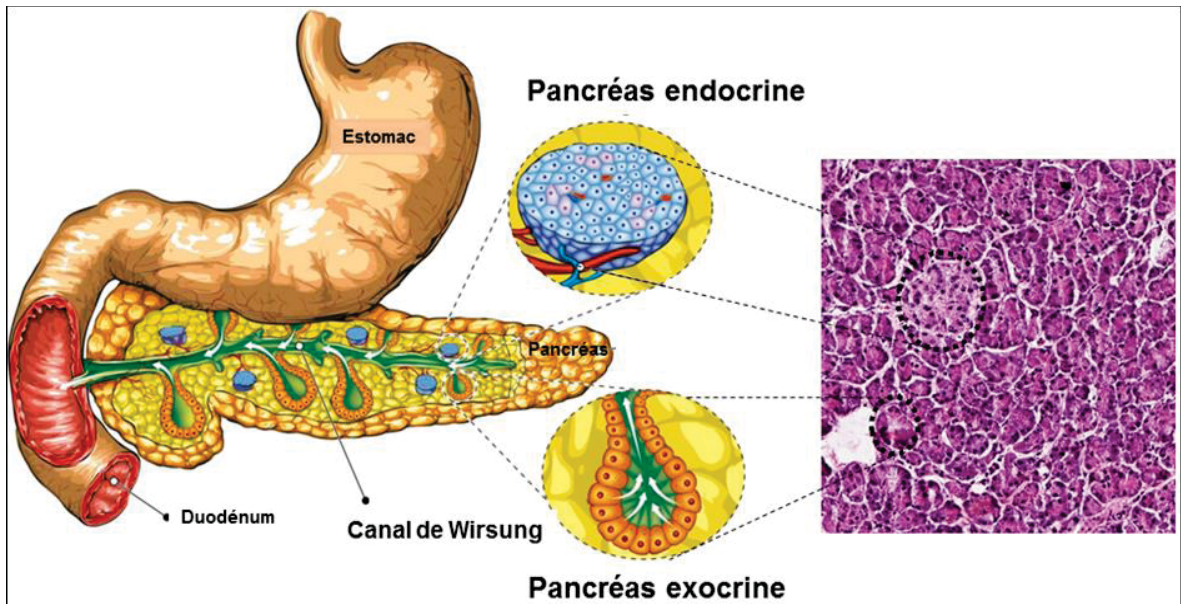


Figure 2 : Le pancréas est une glande mixte.

Le panel de gauche est un schéma représentatif des compartiments endocrine et exocrine du pancréas. Le panel de droite représente une coloration hématoxyline éosine réalisée sur une coupe de pancréas sain. Image issue de la plateforme protéine atlas.

(<https://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/pancreas>).

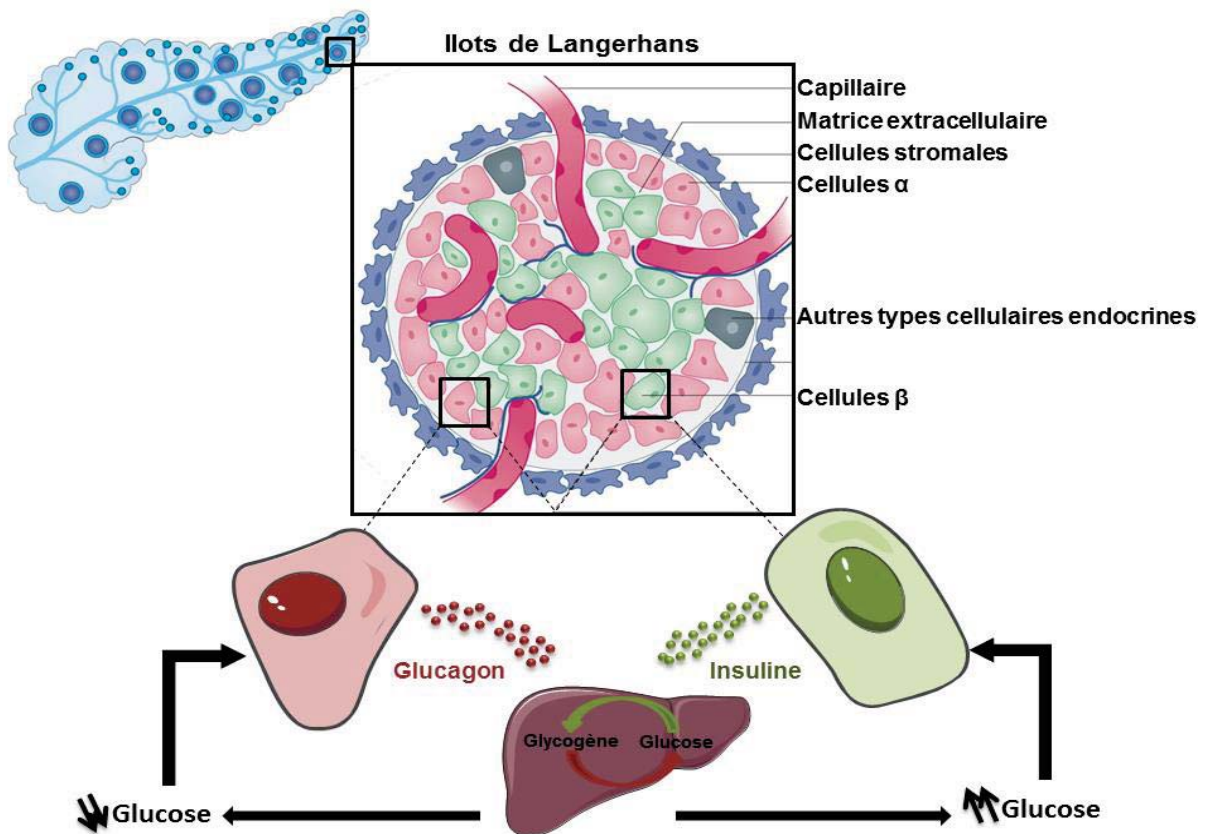


Figure 3 : Le pancréas endocrine.

Représentation schématique de la composition cellulaire de l'unité fonctionnelle pancréatique endocrine appelée Ilots de Langerhans.

Adapté de (Siehler *et al.*, 2021).

En revanche, une hypoglycémie entraîne la sécrétion de glucagon (antagoniste de l'insuline) qui stimule la glyco­géné­lyse et la néogluco­gène­se au niveau hépatique (Vasiljević *et al.*, 2020). (**Figure 3**).

Les cellules pancréatiques endocrines exercent une régulation paracrine les unes sur les autres. En effet, il a été décrit que la somatostatine et la ghréline inhibaient la sécrétion d'insuline (Rorsman and Huisin­g, 2018). Enfin, la fonction du polypeptide pancréatique n'est pas encore bien comprise (El Sayed and Mukherjee, 2021).

I.3.1.b. Pathologies associées

Un dysfonctionnement des cellules endocrines pancréatiques conduit à la perturbation de l'homéostasie glucidique et énergétique et est à l'origine de l'apparition de pathologies métaboliques complexes telles que le diabète ou encore l'obésité. Les cellules endocrines peuvent également être le foyer de formes rares de cancers dits neuroendocrines PNET.

1) Maladies métaboliques

Le diabète

Le diabète sucré est défini par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme un désordre métabolique chronique, caractérisé par une hyperglycémie et une dérégulation du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Il est caractérisé par une glycémie à jeun supérieure à 7,0 mmol/l ou 1,2 g/l. Cette pathologie multifactorielle à composante environnementale et génétique, touche plus de 460 millions de personnes dans le monde (www.who.int). Il existe différents types de diabète dont les 3 principaux sont : (1) le diabète de type 2 (diabète insulino-indépendant, DT2) qui représente 90% des cas de diabète causé par l'épuisement et le dysfonctionnement des cellules pancréatiques β conduisant à une diminution de la sécrétion de l'insuline et à une insulino-résistance des tissus périphériques ; (2) le diabète de type 1 (diabète insulino-dépendant) causé par la destruction auto-immune des cellules pancréatiques β et se caractérise par une insuffisance de production d'insuline compensée par l'administration quotidienne de celle-ci dans le but de

réguler la glycémie ; et (3) le diabète gestationnel résultant de l'apparition d'un état hyperglycémique décelé durant la grossesse.(Siehler *et al.*, 2021).

Les complications du diabète peuvent conduire au développement d'autres maladies vasculaires (cardiovasculaires et artérielles) et cancéreuse (hépatocellulaire, hépatobiliaire, pancréas, sein, ovaire, endométriale et gastro-intestinale). (Khan *et al.*, 2019, Suh and Kim, 2019).

L'obésité :

D'après la définition de L'OMS, l'obésité est une accumulation anormale et excessive de graisse présentant un risque pour la santé. En 2016, environ 13 % de la population adulte mondiale étaient obèses. Cette pathologie multifactorielle peut être causée par des altérations génétiques, des stimuli environnementaux, et par un bilan énergétique positif chronique, c'est-à-dire lorsque l'apport énergétique alimentaire d'un individu dépasse sa dépense énergétique continuellement. L'énergie excédentaire est convertie en triglycérides, qui sont stockés dans le tissu adipeux, ce qui accroît la masse grasse corporelle et entraîne une prise de poids. L'adiposité globale du corps est indiquée par l'indice de masse corporelle (IMC), calculé en divisant le poids corporel en kilogrammes par le carré de la taille en mètres. Un adulte présentant un $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ est classé comme obèse, alors qu'un $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ est associé à une obésité sévère. L'obésité représente un des facteurs de risque majeurs pour un certain nombre de maladies chroniques telles que des maladies cardiovasculaires, le DT2, et certains cancers (www.who.int, Xu and Mishra, 2018, Chooi *et al.*, 2019).

2) Tumeurs neuroendocrines pancréatiques

Les tumeurs neuroendocrines pancréatiques (PNET) sont relativement rares et représentent 1 à 2 % de toutes les tumeurs pancréatiques (Dasari *et al.*, 2017). Au cours de la dernière décennie, l'incidence des PNET, a considérablement augmenté probablement grâce à l'amélioration des outils de diagnostic (Kuo and Salem, 2013). Il existe deux groupes distincts de PNET (1) les PNET fonctionnelles associées à un dérèglement sécrétoire comprennent l'insulinome, le glucagonome et d'autres syndromes d'hypersécrétion hormonale spécifiques plus au moins rares, (2) les PNET non fonctionnelles constituent le groupe majoritaire de PNET et ne produisent

pas de syndromes d'excès hormonaux. La morbidité et la mortalité des PNET est associée à leur capacité d'invasion locale et de propagation à distance.

Il n'y a pas de différences claires dans l'épidémiologie des PNET en fonction de la race, du sexe, de la zone géographique ou du statut socio-économique. La majorité des PNET sont modérément malins, mais ils peuvent présenter un comportement très variable, allant de presque bénin à extrêmement agressif. Les piliers du traitement des néoplasmes neuro-endocriniens du pancréas comprennent la chirurgie et l'utilisation d'analogues de la somatostatine (Mihalache *et al.*, 2019, Hain *et al.*, 2019, Mpilla *et al.*, 2020).

I.3.2. Pancréas exocrine

I.3.2.a. Architecture cellulaire et fonction

L'unité exocrine est le compartiment majoritaire du tissu pancréatique (95-99%) et est responsable de la production d'enzymes impliquées dans la digestion alimentaire. Elle est formée d'acini ; des structures en forme de grappe de raisin centrées autour d'un réseau canalaire et séparées les unes des autres par un tissu conjonctif lâche. On y distingue principalement 3 types cellulaires : (1) Les cellules acineuses ; sécrétrices d'enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidase), de ribonucléases (RNase), de désoxyribonucléases (DNases), d'une lipase et d'une amylase. (2) Des cellules canalaire, sécrétrices de solution hydrolytique riche en bicarbonates jouent un rôle de tampon en neutralisant l'acidité du chyme stomacal. (3) Des cellules centro-acinaires à l'interface entre les cellules acineuses et les cellules canalaire ; elles aussi sécrétrices de bicarbonates, et possédant des caractéristiques à la fois de cellules acineuses, canalaire, et progénitrices (**Figure 4**).

Les enzymes sécrétées sous forme inactives sont déversées dans les canaux pancréatiques, où sont sécrétés des bicarbonates, l'ensemble débouchant dans le duodénum au niveau des canaux de Wirsung et Santorini. Au niveau du duodénum, les pro-enzymes pancréatiques sont activées par les sucs gastriques.

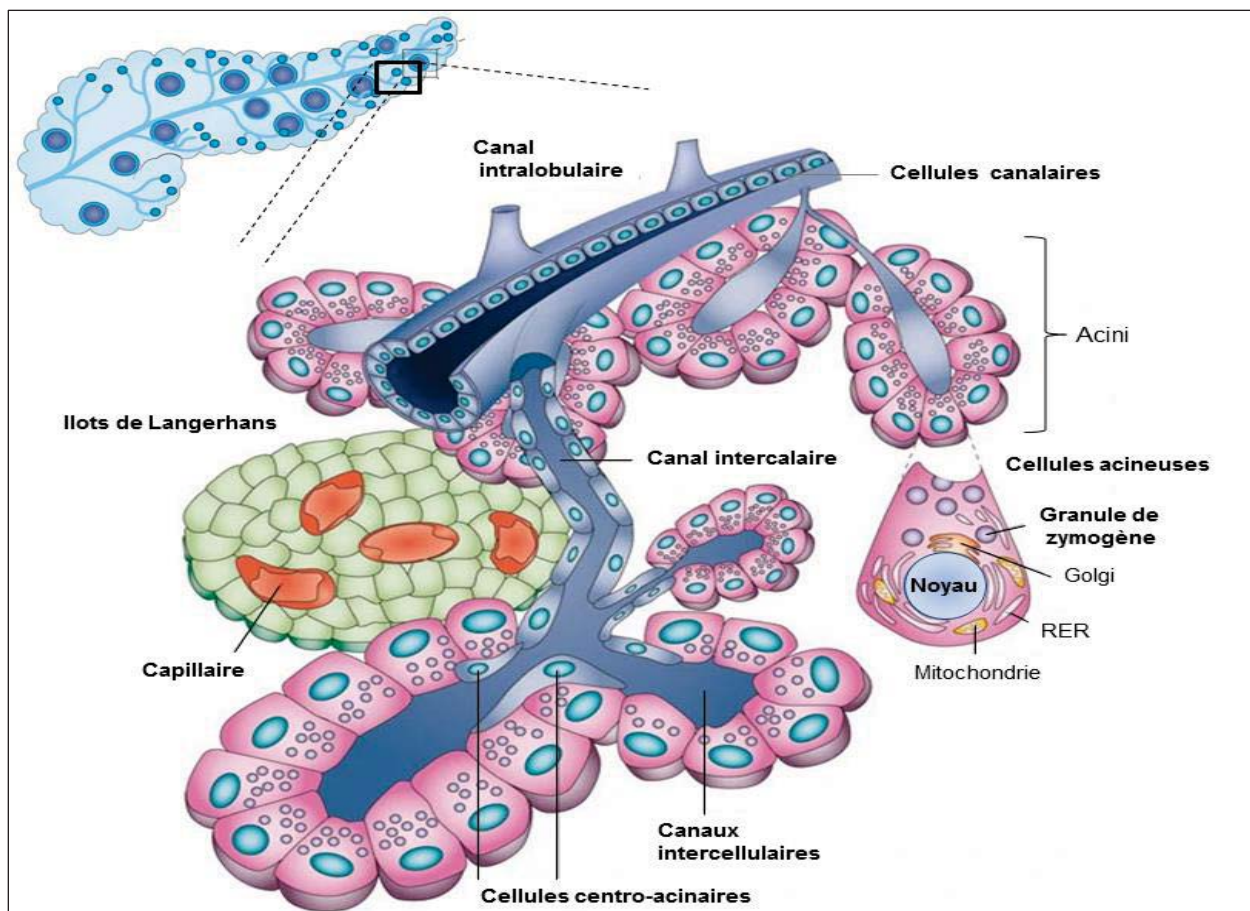


Figure 4 : Le pancréas exocrine.

Représentation schématique de l'unité fonctionnelle pancréatique exocrine.
Adapté de Logsdon and Ji, 2013.

I.3.2.b. Pathologies associées

De multiples pathologies peuvent se développer au sein du pancréas exocrine. Elles peuvent être causées par des altérations génétiques ou des stimuli environnementaux causant une perturbation de la fonction exocrine. La plupart de ces atteintes pancréatiques conduisent à une dégradation de l'état général des patients et peuvent même être mortelles. Parmi ces pathologies nous distinguons principalement les pancréatites et les cancers du pancréas.

1) La pancréatite

La pancréatite est une pathologie inflammatoire complexe causée par un dysfonctionnement de l'unité exocrine. Des anomalies génétiques ou des stimuli environnementaux agressifs peuvent promouvoir le développement de lésions au niveau des cellules acineuses pancréatiques induisant une activation prématurée des enzymes digestives et de ce fait une autodigestion du pancréas. La présence anormale d'enzymes actives induit un recrutement de cellules immunitaires et stimule la production de cytokines pro-inflammatoires et active une réponse inflammatoire systémique (Manohar *et al.*, 2017).

Il existe deux formes de pancréatite, (1) une forme dite aiguë (PA), qui se développe rapidement et se résorbe généralement en quelques jours et (2) une forme dite chronique (PC) qui se développe lentement et progressivement, et persiste au niveau du pancréas. A la différence de la PA, la PC se caractérise par un dysfonctionnement irréversible des glandes endocrines et exocrines suite à une inflammation progressive et à une fibrose chronique des acini pancréatiques accompagnées de calcifications pancréatiques. En outre, il a été décrit qu'environ 36 % des formes sévères et récurrentes de PA associées à une consommation chronique et abusive de tabac et d'alcool, évoluent en PC (Sankaran *et al.*, 2015, Ahmed Ali *et al.*, 2016).

Par ailleurs, les dysfonctionnements pancréatiques causés par la pancréatite sont associés à l'apparition d'autres pathologies du pancréas telles que le diabète et le cancer. En effet, il est décrit que la PC est liée à un risque accru de cancer du pancréas. L'incidence du cancer du pancréas est huit fois plus élevée chez les patients atteints de pancréatite chronique à un âge avancé, et la prévalence

augmente avec le tabagisme et la consommation d'alcool (Kirkegård *et al.*, 2017, Raimondi *et al.*, 2010, Pinho *et al.*, 2014). (Figure 5).

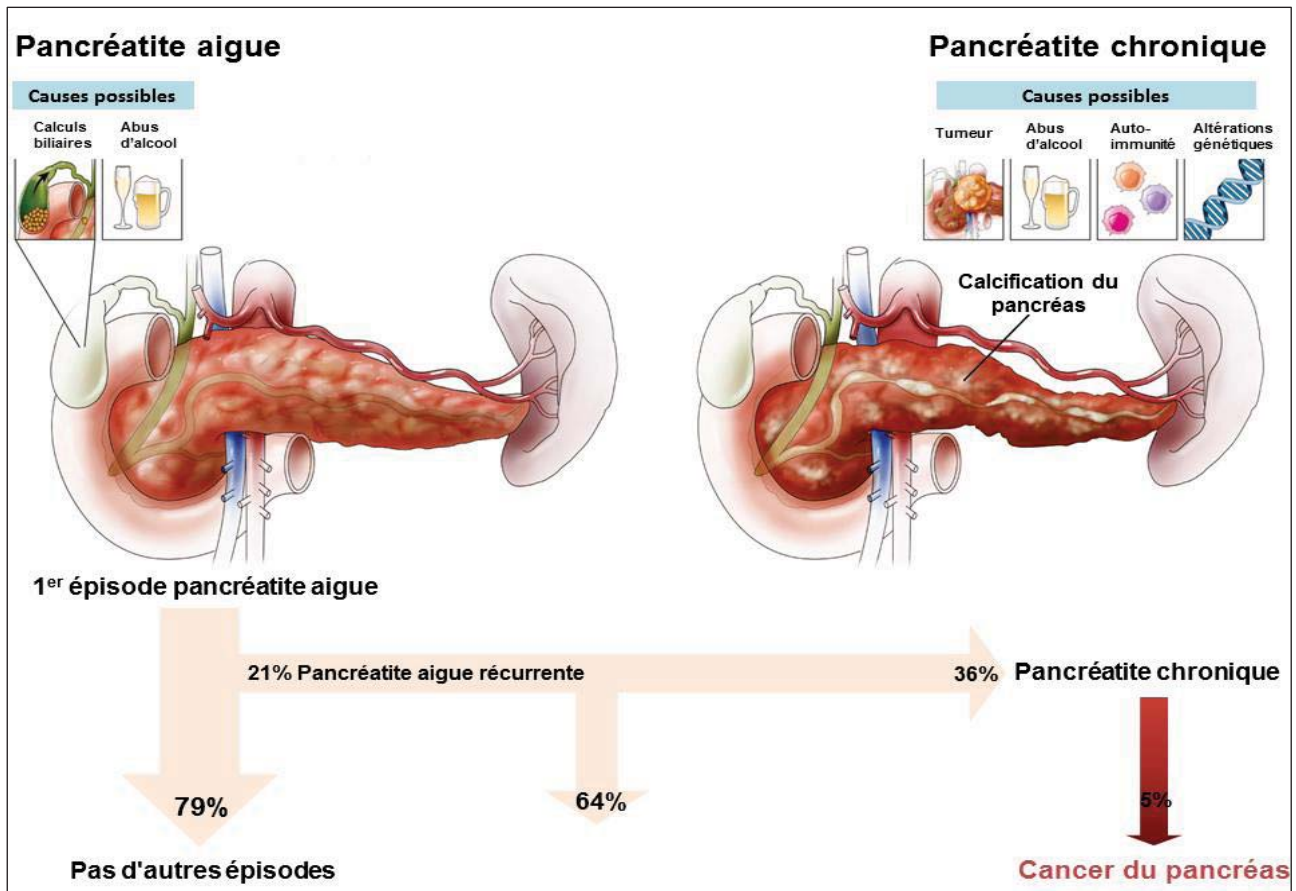


Figure 5 : Représentation schématique des deux types de pancréatite (aiguë et chronique). Adapté de ("Pancreatitis," 2019).

2) Cancers du pancréas exocrine

Les tumeurs pancréatiques malignes exocrines représentent les tumeurs les plus fréquentes et les plus mortelles du pancréas. Dans ce manuscrit nous allons principalement nous focaliser sur l'adénocarcinome pancréatique canalaire (PDAC), qui représente la forme majoritaire des cancers du pancréas exocrine (90 % des cas diagnostiqués).

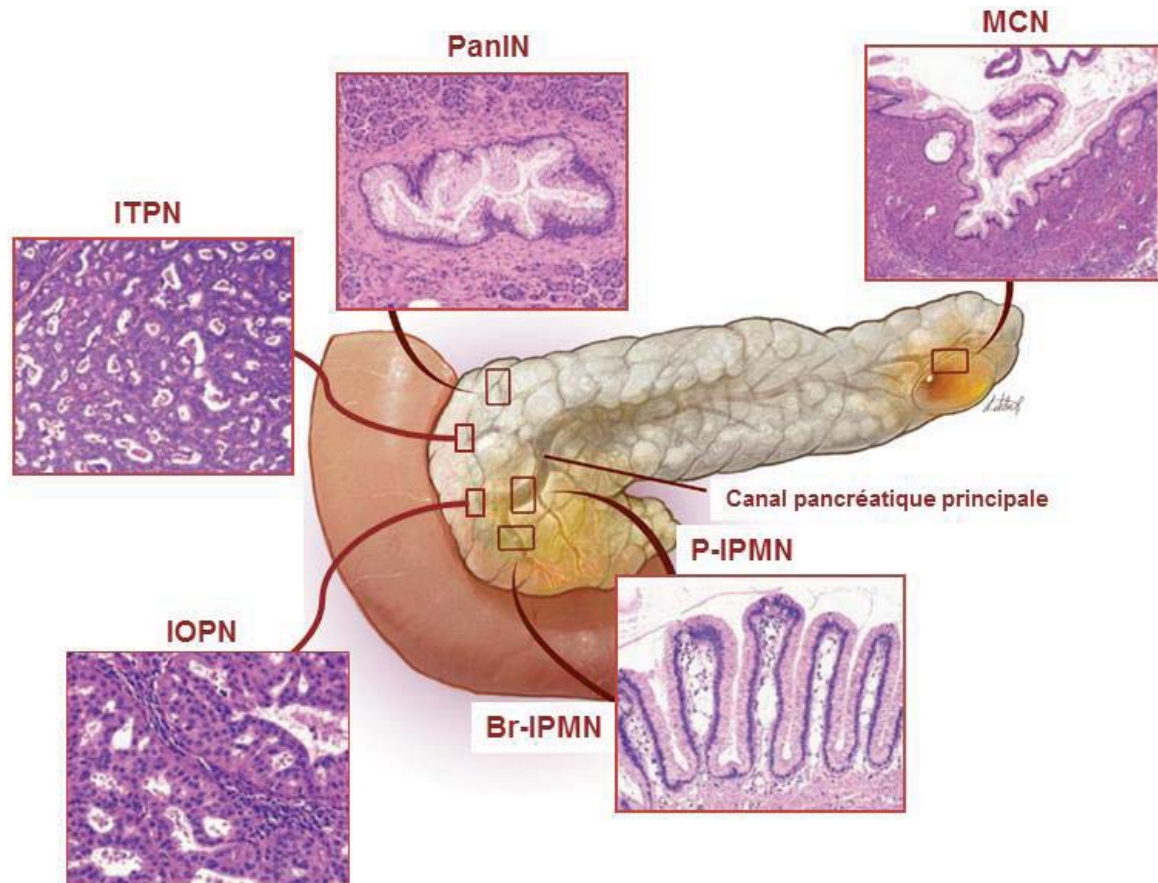


Figure 6 : Lésions précancéreuses pancréatiques.

Il existe 5 types de lésions précurseurs du cancer du pancréas :

Les IPMNs : Néoplasmes intra-canaliaires, papillaires et mucineux (P pour canal principal et Br ou branches secondaires)

Les MCNs : Néoplasmes mucineux kystiques

Les ITPNs : Néoplasmes intra-canaliaires tubulopapillaires

Les IOPNs : Néoplasmes intra-canaliaires, oncocytaires et papillaires

Les PanINs : Néoplasie intraépithéliale pancréatique

Adapté de Hingorani, 2007 et Kim and Hong, 2018.

II. Cancer du pancréas

II.1. Cancérogenèse pancréatique

Le processus de cancérogenèse pancréatique débute par la formation de lésions précancéreuses constituées de dysplasies de bas grade puis de haut grade évoluant en adénocarcinomes *in situ* puis en PDACs invasifs.

II.1.1. Lésions précancéreuses pancréatiques

L'initiation de cancérogenèse est une des étapes déterminantes du développement, de l'agressivité, du pronostic du PDAC et du devenir du patient. Le point de départ de cette pathologie maligne résulte d'une accumulation d'altérations génétiques et moléculaires se traduisant par l'apparition de lésions précancéreuses pancréatiques. A ce jour, cinq types de lésions ont été identifiés et bien caractérisés. Elles se distinguent les unes des autres par des critères histopathologiques, génétiques et cliniques propres (**Figure 6**).

En fonction de leur taille, les lésions précancéreuses pancréatiques sont subdivisées en deux classes ; les lésions de grandes tailles dites macroscopiques, et les lésions de petites tailles dites microscopiques.

A. Lésions macroscopiques

A.1. Néoplasmes intra-canalaire, papillaires et mucineux (IPMNs)

Ces lésions précurseurs du PDAC sont considérées comme les kystes pancréatiques les plus fréquemment développés (Tanaka *et al.*, 2012, Tanaka *et al.*, 2017). Les IPMNs sont des néoplasmes épithéliaux kystiques producteurs de mucines et visibles à l'œil nu (>1cm de diamètre). Ils siègent dans le canal pancréatique principal et/ou au niveau de ses ramifications et sont le plus souvent observés dans la tête du pancréas, bien qu'ils puissent se produire dans toutes les parties de l'organe (Rezaee *et al.*, 2016). Les IPMNs se produisent aussi bien chez les hommes que chez les femmes âgés de 60 à 70 ans. Ils sont classés en gastrique, intestinal et pancréatobiliaire en fonction des types cellulaires prédominants (**Figure 7**). Chacune de ces classes se distingue par une évolution clinique bien distincte.

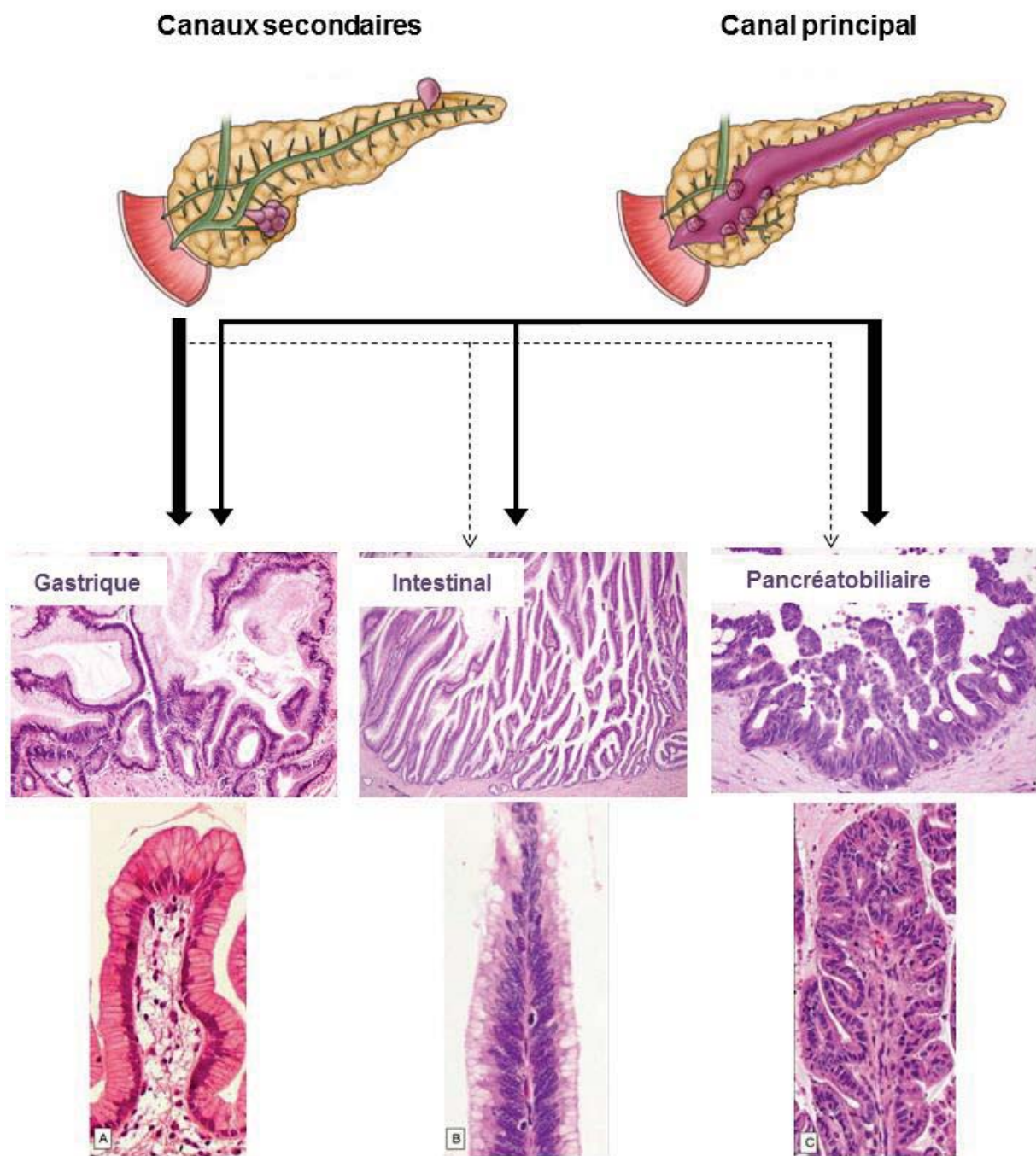


Figure 7. Sous-classification histologique des IPMNs.

Le type gastrique présente des cellules cylindriques hautes avec des noyaux orientés basalement et un cytoplasme mucineux pâle abondant. Le type intestinal est composé de papilles hautes tapissées de cellules cylindriques avec des noyaux pseudostratifiés et un cytoplasme basophile avec des quantités variables de mucines au pôle apical. Le type pancréatobiliaire présente des papilles fines et ramifiées avec une dysplasie de haut grade. Les cellules sont cuboïdales et ont des noyaux ronds hyperchromatiques, des nucléoles proéminents, et un cytoplasme modérément amphophile avec un aspect moins mucineux.

Adapté de (Basturk *et al.*, 2010).

En effet, les IPMNs de type intestinal et pancréatobiliaire sont fréquemment observées dans le canal pancréatique principal, et évoluent vers des PDACs. En revanche, les IPMNs de type gastrique se produisent surtout dans les canaux secondaires, et présentent un faible risque d'évolution vers des PDACs (Distler *et al.*, 2013, Klöppel *et al.*, 2014).

A.2. Néoplasmes mucineux kystiques (MCN)

Ce sont des lésions typiquement solitaires formant des kystes uni-ou multi-lobulaires avec une hyalinisation ou une calcification focale du stroma contenant soit un mucus épais, soit un mélange de mucines et de nécrose hémorragique. Elles se développent principalement au niveau du corps ou de la queue du pancréas sans être reliées au système canalaire pancréatique (Thompson *et al.*, 1999). Il est vrai que les MCNs ne possèdent pas des caractéristiques cytologiques propres ni de mutations génétiques spécifiques. Néanmoins, ces néoplasmes kystiques se caractérisent par une composition histologique singulière associant un revêtement épithélial recouvert de cellules colonnaires productrices de mucines et de cellules épithéliales plates ou cuboïdales non mucineuses (Zhelmin *et al.*, 2017) avec un stroma sous-épithélial de type ovarien (Fléjou, 2011). Les MCNs sont retrouvés presque exclusivement chez les femmes de 40-50 ans (rapport homme/femme, 1:20). Enfin, contrairement aux IPMNs, les MCNs sont beaucoup moins susceptibles d'évoluer vers un cancer et ont un meilleur pronostic.

A.3. Néoplasmes intra-canalaire tubulopapillaires (ITPNs)

Les ITPNs sont les lésions précancéreuses les plus rares et sont responsables du développement de moins de 1 % des tumeurs exocrines du pancréas (Yamaguchi *et al.*, 2011). Ces néoplasmes sont constitués de cellules tumorales tubulaires formant une masse nodulaire solide avec peu de kystes et produisant peu ou pas de mucines (Rooney and Shi, 2016). Ils se manifestent majoritairement au sein d'un canal pancréatique distendu de la tête du pancréas, mais sont également retrouvés dans le corps ou la queue pancréatique. Les ITPNs sont observés chez les individus ayant un âge moyen de 55 ans avec une légère prédominance féminine. Plus de la moitié des ITPNs sont associées à des PDACs (Basturk *et al.*, 2017).

A.4. Néoplasmes intra-canalaire, oncocytaires et papillaires (IOPNs)

Les IOPNs sont les lésions précancéreuses pancréatiques les plus récemment classées par l'OMS. Ce sont des néoplasmes nodulaires ou papillaires kystiques, ayant des caractéristiques oncocytaires. Ces néoplasmes macroscopiques (> 1 cm) se développent principalement au niveau du canal pancréatique principal. Il a été décrit que 60 % des lésions IOPNs sont associées aux PDACs (Marchegiani *et al.*, 2015).

B. Lésions microscopiques

B.1. Néoplasie intraépithéliale pancréatique (PanIN)

Les PanINs représentent les principales lésions précurseurs des PDACs invasifs. Décrites pour la première fois il y a un peu plus d'un siècle (Hulst SPL, 1905), les PanINs sont aujourd'hui très bien caractérisés. Ce sont des néoplasmes épithéliaux microscopiques (< 0,5 cm de diamètre), présentant des degrés d'atypies cytologiques et architecturales variables et évolutifs. Ces lésions se nichent le plus souvent dans les canaux pancréatiques au niveau de la tête du pancréas aussi bien chez les hommes que chez les femmes. La fréquence d'apparition des PanINs augmente significativement avec l'âge des individus (âge moyen 62.5 ans). De plus, il a été montré que plus de 80 % des lésions PanINs sont observées dans des pancréas de patients atteints d'adénocarcinomes invasifs (Andea *et al.*, 2003).

Les caractéristiques des lésions précancéreuses pancréatiques sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des lésions précancéreuses pancréatiques.
Adapté de Kim and Hong, 2018.

Lésions précurseurs	Age (ans)	Sexe ratio F/H	Localisation principale	Caractéristiques macroscopiques	Structure cellulaire	Caractéristiques microscopiques	Carcinomes associés
PanIN	62,5	1/1	Tête	Indetectable < 0,5 cm	Colonnaire / Papillaire	Cellules cuboïdales/colonnaires	PDAC
IPMN	60 -70	2/3	Tête	Canaux pancréatiques dilatés Mucines abondantes	Plate / Papillaire	Gastrique	Faible risque de progression en PDAC
						Intestinale	Carcinome colloïdal (variant PDAC)
						Pancréatobiliaire	Risque élevé de progression en PDAC
ITPN	55	1/1	Tête	Masses nodulaires solides dans les canaux, pas de mucine.	Cribriforme	Tubules compacts, éosinophiles/ cytoplasme amphophile	>50 % PDAC
IOPN			Tête	Nodules kystiques	Arborisation complexe papille/cribriforme	Cytoplasme éosinophile abondant, noyaux ronds, nucléoles proéminents	60 % PDAC
MCN	40-50	20/1	Corps /Queue	Kystes bien définis à paroi épaisse contenant des mucines	Stroma de type ovarien	Cellules colonnaires productrices de mucine Cellules non-mucineuses plates/cuboïdales	16% PDAC et variants de PDAC

L'initiation et la progression des PanINs s'accompagnent par une accumulation d'altérations génétiques et de déstructurations cytologiques et architecturales du tapis épithélial.

B.1.1. Modifications cytologiques et architecturales des PanINs

Les PanINs sont constitués de cellules épithéliales cuboïdales et se caractérisent par une production de quantités variables de mucines. En fonction du degré le plus élevé d'atypies structurelles et cytologiques, les PanINs sont classés en bas ou haut grade (Basturk *et al.*, 2015). Les PanINs de bas grade (précédemment classés en PanIN-1 et/ou PanIN-2) sont des lésions plates ou papillaires avec des noyaux principalement situés au pôle basal des cellules et présentant des atypies cytologiques légères à modérées. En revanche, les PanINs de haut grade (précédemment classés en PanIN-3) sont généralement des lésions papillaires présentant une perte de polarité, une stratification irrégulière, des atypies cytologiques sévères et des mitoses et nécrose intraluminales occasionnelles (Hruban *et al.*, 2004, Basturk *et al.*, 2015). (**Figure 8**).

B.1.2. Modifications moléculaires des PanINs

A ce jour, de nombreuses anomalies génétiques ont été identifiées et associées à la genèse et à la progression des PanINs dont notamment, les modifications d'expressions géniques, les aberrations du nombre de copies de gènes, les réarrangements chromosomiques et les altérations épigénétiques.

L'évènement génétique initiateur de la cancérogenèse pancréatique, est la mutation du gène *KRAS* (Bailey *et al.*, 2016). Un gène codant la protéine oncogénique RAS une petite protéine G impliquée dans l'activation des voies de signalisation cellulaires RAF/MAPK et PI3K, médiatrices des processus cellulaires dont la prolifération et la survie. La majorité des PanINs de bas grade (> 90 %) contiennent des mutations de *KRAS*. De plus, la fréquence des allèles mutants augmente de manière significative dans les PanINs de haut grade (Singh *et al.*, 2021). Néanmoins, la mutation de *KRAS* semble être nécessaire mais insuffisante pour le développement du cancer du pancréas.

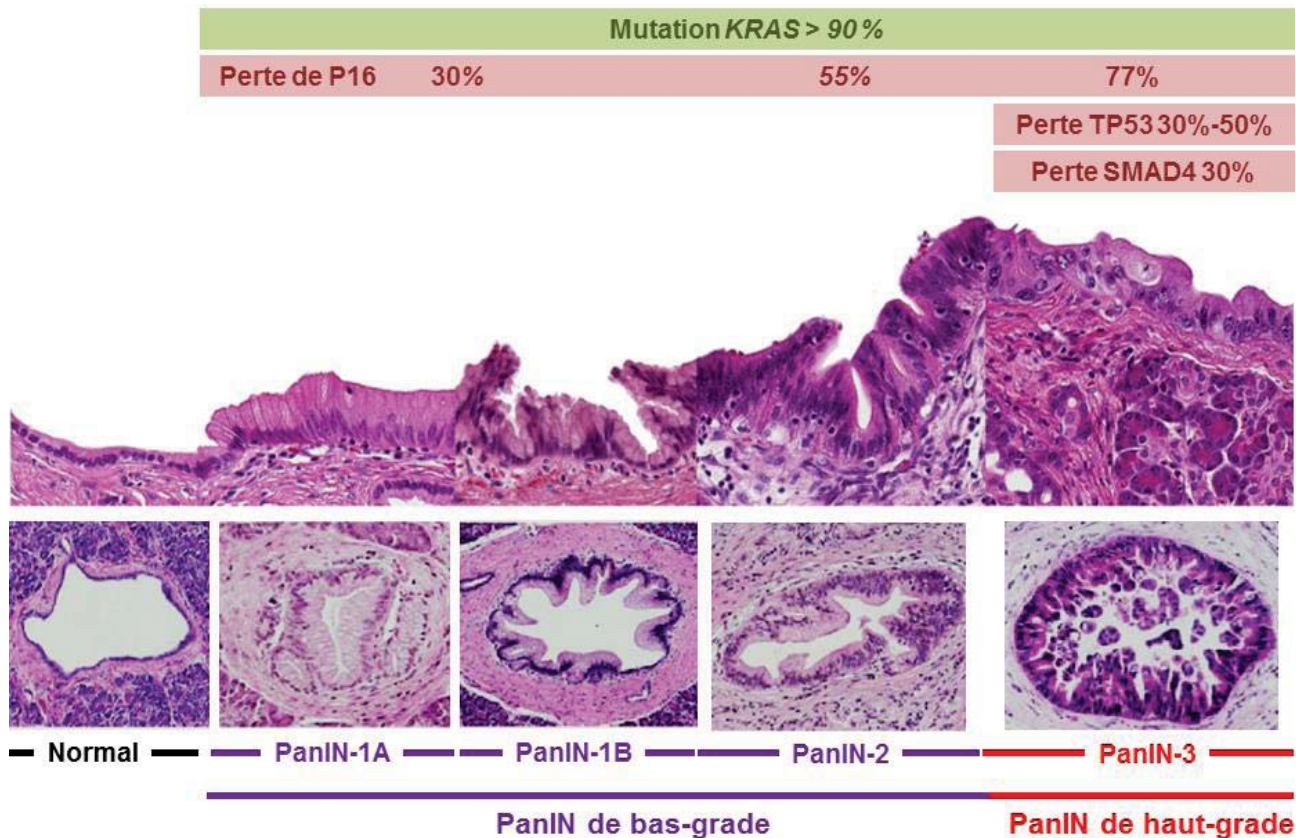


Figure 8 : Changements histologiques et altérations moléculaires des PanINs.

La progression des PanINs est associée à une augmentation des atypies cellulaires et à une accumulation de mutations génétiques. Les PanIN-1 et PanIN-2 sont tous les deux regroupés sous le terme de PanIN de bas grade. Le PanIN-1 présente des atypies nucléaires minimales. PanIN-1A a un modèle de croissance plat, alors que PanIN-1B montre la formation de micropapilles. Le PanIN-2 présente une perte de polarité cellulaire. Le PanIN-3 ou PanIN de haut grade présente les atypies nucléaires et architecturales les plus sévères. La lésion PanIN-3 présentée ici est la variante à architecture plate. Adapté de Noë and Brosens, 2016, Koorstra *et al.*, 2008.

D'autres altérations génétiques, dont notamment l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, sont donc indispensables à la progression des PanINs en PDACs. Une des plus fréquentes est la mutation du gène *CDKN2A*/ p16 codant une protéine de la famille des CDK (cyclin-dependent kinase) régulatrice du cycle cellulaire. La perte de l'expression de *CDKN2A*/ p16 entraîne une perte de régulation des points de contrôle du cycle cellulaire CDK4 et de la CDK6 et, par conséquent, une dérégulation du cycle cellulaire favorisant la carcinogenèse. Cette mutation est détectée dès les PanINs de bas grade et est retrouvée dans 46 à 60 % des cancers du pancréas (Mizrahi *et al.*, 2020).

Les PanINs présentent fréquemment une inactivation du gène *TP53*, ce qui entrave la reconnaissance des dommages à l'ADN et bloque l'arrêt du cycle cellulaire, permettant aux cellules de contourner les points de contrôle du cycle cellulaire et d'échapper aux signaux apoptotiques (Mizrahi *et al.*, 2020).

En outre, 31 à 38 % des cancers du pancréas présentent des mutations du gène *SMAD4*, codant le facteur de transcription SMAD4 (Waddell *et al.*, 2015). Dans les PanINs de haut grade, la perte fréquente de l'expression de *SMAD4* par délétion ou mutation homozygote entraîne une diminution de l'inhibition de l'activité du facteur de croissance TGF- β et la promotion de la signalisation TGF- β non canonique, facilitant ainsi les réponses pro-tumorigènes (Wang *et al.*, 2021).

Plusieurs autres gènes sont mutés au cours de ce processus avec une fréquence moindre comparée aux altérations suscitées. Parmi elles on retrouve, l'amplification du gène *ERBB2* et l'inactivation du gène *BRCA2* (4 à 7 % des cas) (Holter *et al.*, 2015).

II.1.2. Adénocarcinome pancréatique canalaire

En général, le PDAC est une lésion solitaire, mais il peut aussi se présenter occasionnellement comme une maladie multifocale (Bosman *et al.*, 2010). Les PDACs sont des masses fermes, dures, sclérosées et mal définies, qui remplacent l'architecture lobulaire normale de la glande pancréatique. La plupart des PDACs de la tête mesurent entre 1,5 et 5,0 cm, tandis que les PDACs du corps et de la queue sont généralement plus grands. Les PDACs de la tête envahissent généralement le canal biliaire commun et/ou le canal de Wirsung produisant une sténose qui entraîne une dilatation proximale des deux systèmes canaux et dans des cas plus avancés ils atteignent la paroi duodénale. Dans le corps et ou la queue, le PDAC provoque généralement une obstruction du canal de Wirsung (Luchini *et al.*, 2016). Il existe plusieurs variantes du PDAC conventionnel (**Tableau 2**) qui présentent des aspects macroscopiques particuliers (**Figure 9**).

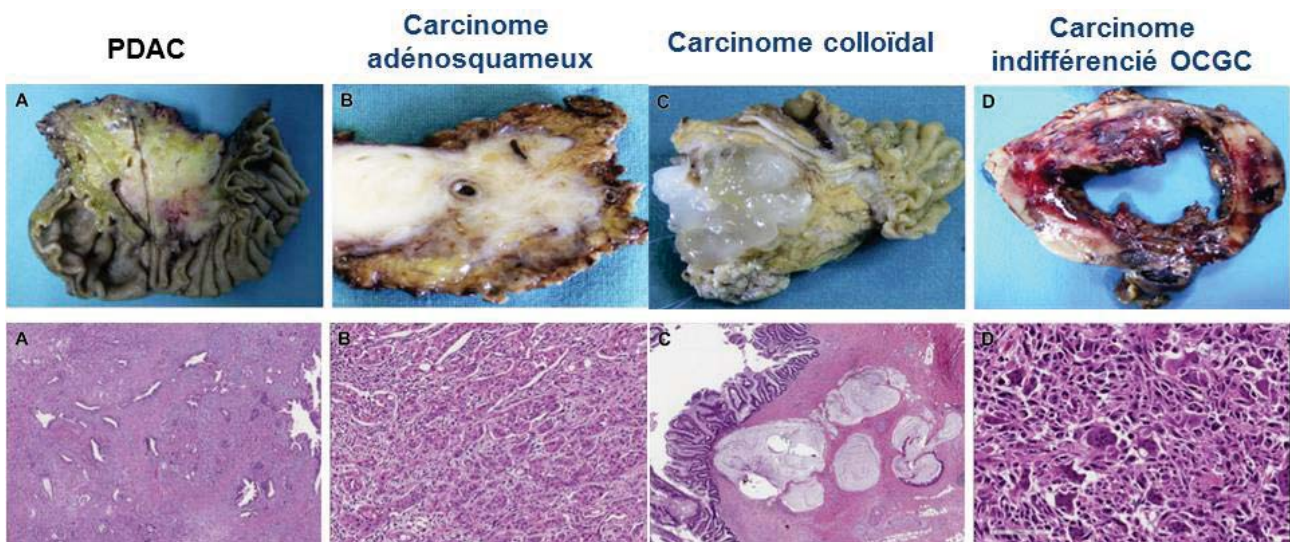


Figure 9 : Caractéristiques macroscopiques et histologiques du PDAC et de ses variantes. Adapté de Luchini *et al.*, 2016.

(A) PDAC conventionnel de la tête du pancréas représenté par une masse ferme, dure, sclérosée et mal définie qui envahit le canal biliaire commun et le canal de Wirsung avec une sténose. L'immunohistochimie révèle une croissance cellulaire désordonnée ainsi qu'une réaction stromale desmoplastique classique. (B) La variante adénosquameuse est généralement une masse ferme et multinodulaire de couleur blanc-gris, souvent plus grande que le PDAC conventionnel. L'immunohistochimie révèle une différenciation canalaire et squameuse des cellules. (C) Le carcinome colloïdal se distingue par de grandes réserves de mucines. L'immunohistochimie révèle la présence de grandes flaques de mucines stromales extracellulaires. (D) Le carcinome indifférencié à cellules géantes de type ostéoclaste a très souvent plusieurs foyers d'hémorragie et de nécrose, et peut montrer un aspect kystique. Il est composé de 2 types cellulaires : des cellules fusiformes et pléomorphes, les véritables cellules néoplasiques, et des cellules géantes de type ostéoclaste, qui peuvent avoir plus de 20 noyaux chacune, mais sans comportement malin.

Tableau 2 : Variantes du PDAC. Adapté de Luchini *et al.*, 2016.

Variants PDAC	Caractéristiques	Pronostic
Le carcinome adénosquameux	Masse ferme et multinodulaire	Défavorable
Le carcinome colloïdal	Grandes masses mucineuses	Meilleur que les PDACs
Le carcinome indifférencié ou anaplasique	Plus grand que le PDAC conventionnel Caractéristiques macroscopiques très similaires au PDAC	Très mauvais
Carcinome indifférencié à cellules géantes de type ostéoclastes	Présente très souvent plusieurs foyers d'hémorragie et de nécrose	Très mauvais
Le carcinome à cellules en bague à chaton	Très similaires au PDAC conventionnel Masses blanc-jaunâtre, multilobées	Très mauvais
Le carcinome médullaire	Très similaires au PDAC conventionnel Masses blanc-jaunâtre, multilobées	Meilleur que les PDACs
Les carcinomes mixtes	Grandes masses avec des foyers nécrotiques	

A. Classification histopathologique du PDAC

La plupart des PDACs sont composés de structures glandulaires et canalaire (1) bien, (2) modérément ou (3) faiblement différenciées, infiltrant le parenchyme pancréatique. Ils sont caractérisés par un schéma de croissance désordonné et sont associés à une réaction stromale desmoplastique (**Figure 10**). Ces tumeurs produisent des mucines possédant des groupements sulfate et acide sialique. Basé sur l'évaluation combinée des caractéristiques histologiques et cytologiques et de l'activité mitotique, les PDACs sont subdivisés en 3 grades (**Tableau 3**).

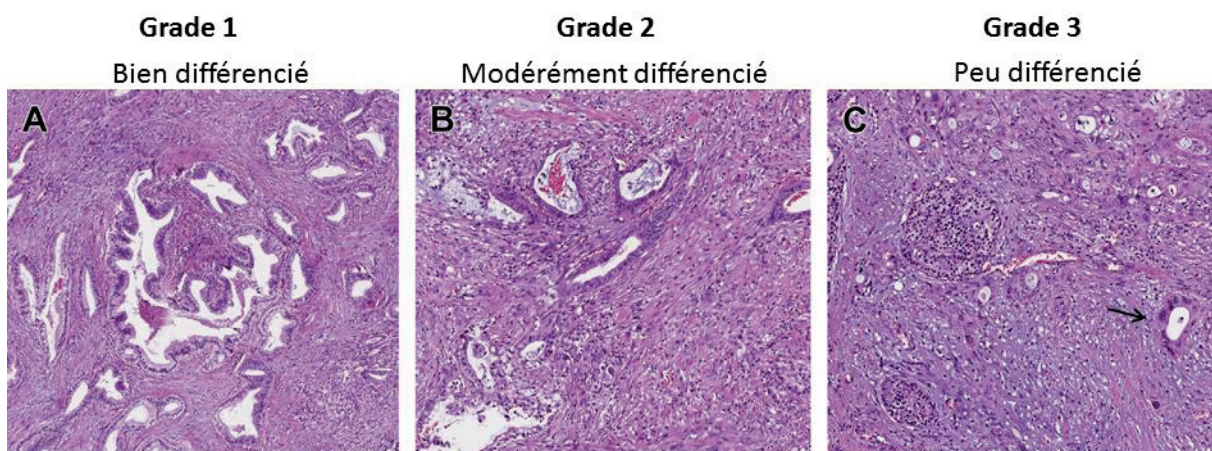


Figure 10 : Grades histologiques du PDAC.

Immunohistochimies représentatives des grades du PDAC (A) Bien différencié. (B) Modérément différencié. (C) Peu différencié (il n'y a qu'une seule glande, très atypique indiquée par la flèche noire). Ces images sont issues de Luchini *et al.*, 2016.

Tableau 3 : Les caractéristiques des grades histologiques du PDAC. Adapté de Luchini *et al.*, 2016.

Grade tumoral	Différenciation glandulaire/ canaulaire	Production de mucines	Atypies nucléaires
1	Glandes canalaire bien différenciées	Intensive et diffuse	Atypies légères
2	Glandes canalaire et glandes tubulaires modérément différenciées	Irrégulière et focale	Pléomorphisme modéré
3	Glandes peu différenciées, nids solides, cellules uniques infiltration, structures pléomorphes	Abortive	Pléomorphisme marqué et augmentation de la taille des noyaux, énormes nucléoles proéminents.

Abréviation : HPF, high-power field.

B. Classification moléculaire du PDAC

Durant la dernière décennie, grâce à l'avènement du séquençage à haut débit, plusieurs études ont mis en évidence l'hétérogénéité et la complexité des altérations géniques du PDAC. Ces travaux ont permis d'identifier des signatures moléculaires permettant une classification des tumeurs pancréatiques dans le but d'optimiser la prise en charge des patients. Cependant, la grande majorité des sous-types moléculaires de PDAC décrits semble être biaisée par la présence (1) d'un stroma abondant (2) de cellules pancréatiques endocrines et exocrines normales et (3) d'une proportion minoritaire de cellules pancréatiques cancéreuses. Cette composition complexe de la masse tumorale rend particulièrement difficile la collecte d'informations moléculaires spécifiques aux tumeurs.

En 2015, Moffitt et collaborateurs (Moffitt *et al.*, 2015) sont les premiers à avoir surmonté ce problème en réalisant une étude transcriptomique basée sur une microdissection virtuelle des données. Grâce à cette approche, ils ont pu distinguer les altérations moléculaires spécifiques des cellules tumorales de celles spécifiques du stroma et classer les tumeurs en deux sous-types (1) le sous-type classique caractérisé par une expression de gènes épithéliaux et est associé à un bon pronostic (2) le sous-type basal similaire à celui décrit dans les cancers du sein et de la vessie et est associé à un mauvais pronostic du PDAC. Ils représentent les deux sous-types moléculaires prédominants du PDAC, validés par de nombreuses études d'analyses transcriptomiques à grande échelle (Collisson *et al.*, 2011, Bailey *et al.*, 2016, Puleo *et al.*, 2018, Chan-Seng-Yue *et al.*, 2020) (**Tableau 4**). Ces deux sous-types peuvent coexister au sein de la même tumeur.

En revanche, l'existence des sous-types exocrine-like/*aberrantly differentiated endocrine exocrine* (ADEX) et immunogénique, qui ont été proposés par Collisson, Bailey et leurs collaborateurs, a été controversée. En effet, le projet Cancer Genome Atlas (TCGA) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2017) a révélé que le sous-type ADEX et le sous-type immunogénique étaient associés à une faible cellularité, représentant probablement des cellules non transformées.

Plus tard, Puleo et collaborateurs ont confirmé que le sous-type ADEX résultait de la contamination de leurs composants exocrine et endocrine pancréatiques par des cellules acineuses pancréatiques normales adjacentes.

Tableau 4: Classification moléculaire du PDAC. Adapté de Espiau-Romera *et al.*, 2020.

Etude	Méthode d'étude	Cohorte d'étude	Classification	Caractéristiques	Prognostic
Collisson et al., 2011	Analyse transcriptomique	1. Ensembles de données de microarray d'échantillons cliniques Microdissection (n = 27) GSE15471 (n = 36) GSE11838 (n = 107) GSE16515 (n = 52) E-MEXP-950 (n = 50) 2. Validation : Lignées cellulaires de souris (n = 15) Lignées cellulaires humaines (n = 19)	Classique	Expression de gènes épithéliaux tels que <i>GATA6</i>	Bon
			Mésenchymateux	Expression de gènes mésenchymateux	Mauvais
			Exocrine	Expression des gènes acinaires	
Moffit et al., 2015	Microdissection virtuelle de données transcriptomiques	1. Données des biopuces Tumeur primaire (n = 145) Tumeur métastatique (n = 61) Lignées cellulaires (n = 17) Échantillons normaux du pancréas (n = 46) Échantillons adjacents de sites distants (n = 88) 2. Validation Tumeurs primaires (n = 15) PDXs (n = 37) Lignées cellulaires (n = 3) Lignées CAF (n = 6)	Classique	Similaire au sous-type classique Collisson ((↑) gènes associés à l'adhésion (<i>GATA6</i>)) et <i>SMAD4</i>	Bon
			Basal	(↑) Gènes également fortement exprimés dans les tumeurs basales des cancers de la vessie et du sein.	Mauvais
			Stroma normal	(↑) Cellules stellaires pancréatiques, des marqueurs α -SMA, vimentine et desmine	Bon
			Stroma activé	(↑) Macrophages, et des gènes associés à l'activation des fibroblastes	Mauvais
Bailey et al., 2016	Analyse génomique, mutationnelle Séquençage d'exome	Tumeurs primaires de PDAC + rares carcinomes à cellules acineuses (n = 382) Exomes de PDAC (n = 74)	Progéniteur pancréatique	(↑) Gènes du développement précoce du pancréas (<i>FOXA2/3</i> , <i>PDX1</i>)	Bon
			Squameux	Hyperméthylation et (↓) gènes du destin des cellules endodermiques pancréatiques. (↑) mutations <i>TP53</i> , <i>KDM6A</i> et <i>TP63ΔN</i>	Mauvais
			ADEX	(↑) Activation de <i>KRAS</i> et gènes de développement tardif et de différenciation du pancréas.	
			Immunogénique	Forte inflammation + forte infiltration de cellules lymphocytaires B et T	
Puleo et al., 2018	Analyse génomique, Analyse transcriptomique	Tumeurs primaires de PDAC fixés au formol et inclus en paraffine (312) Séquençage du génome (279) Puces à ARN (309)	Classique pur	Faible signal stromal Mutation <i>KRAS</i> Gly12Arg, (↑) <i>hENT1</i>	Bon
			Basal-like pur	Faible signal stromal, Significativement associé à la propagation métastatique Mutation <i>KRAS</i> Gly12Asp et Gly12Val Mutation des gènes <i>CDKN2A</i> et <i>TP53</i>	Très mauvais
			Classique immunitaire	(↑) Gènes de réponse immunitaire (<i>CD37</i> , <i>CD53</i> , <i>CD4</i> , <i>CSF1R</i>) (↑) Infiltration des cellules lymphocytaires B et T, lignées monocytaires et cellules dendritiques myéloïdes)	Bon
			Stroma activé	(↑) Gène d'adhésion à la MEC (<i>SPARC</i>), gènes associés à l'activation des fibroblastes (<i>FAP</i>), <i>ACTA2</i> et de α -SMA	Mauvais
			Stroma desmoplastique	Stroma massif, faible composante tumorale (↑) IL-6, macrophages (↑) Expression des composantes du stroma structurel et vascularisé	Mauvais
Chan-Sang-Yue et al., 2020	Analyse génomique Analyse transcriptomique	Microdissection par capture laser de PDAC de stade avancé. 1. Séquencage génome entier (n = 314) 2. RNAseq tumeurs (n = 248) 3. Single-cell RNAseq unicellulaire (n = 15)	Classique A and B	(↑) Altérations de <i>SMAD4</i> et <i>GATA6</i>	Bon
			Basal-like A and B	(↑) Voies TEM et TGF- β , perte de <i>CDKN2A</i> , mutations <i>TP53</i> , déséquilibre <i>K-RAS</i>	Mauvais

II.1.3. Métastases

Une des caractéristiques majeures du PDAC est sa capacité de discrimination accrue qui est responsable du décès d'environ 80 % de patients atteints de PDAC. Tôt ou tard, au cours du développement du cancer du pancréas, la masse tumorale primaire génère des cellules pionnières qui envahissent les tissus adjacents et circulent vers des organes distants où elles peuvent former des colonies secondaires. Certaines études suggèrent que les métastases pouvaient survenir avant même la formation d'une masse tumorale primaire (Grünwald *et al.*, 2016) (**Figure 11**).

Conceptuellement, le processus métastatique se déroule selon trois phases principales : 1) l'intravasation des cellules tumorales dans la circulation sanguine, 2) la dissémination et la survie des cellules tumorales circulantes dans la circulation sanguine, et 3) l'extravasation et la colonisation des cellules disséminées dans un des sites distants préférentiels (**Figure 11**). Le foie représente le foyer le plus fréquent des métastases de PDAC, (plus de 60 % des patients), suivi par les poumons et le péritoine (environ 30 %) et enfin les os et les glandes surrénales (environ 10 %). (Sahin *et al.*, 2018, Ayres Pereira and Chio, 2019).

Comme lors du processus de cancérogenèse, le mécanisme métastatique s'enclenche suite à une accumulation séquentielle d'altérations génétiques et épigénétiques (Stratton, 2011). De nombreuses études d'analyse génomique et transcriptomique ont entrepris l'identification d'une signature de gènes pro-métastatiques ainsi que d'un modèle de mutations favorisant les métastases sans avoir eu des résultats probants (Campbell *et al.*, 2010). Néanmoins, il est suggéré que les lésions métastatiques évoluent à partir des cellules tumorales primaires suite à l'acquisition de mutations génétiques distinctes (Yachida *et al.*, 2010).

Plusieurs facteurs contribuent à la formation de métastases. Le microenvironnement de la tumeur pancréatique est indispensable à la progression du cancer du pancréas. Brièvement, la communication réciproque entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales induit une dégradation de la matrice extracellulaire et une perte des capacités d'adhésion des cellules tumorales, favorisant ainsi l'initiation du mécanisme métastatique (Fink *et al.*, 2016). Les

tumeurs primaires préparent leur implantation dans les foyers secondaires *via* la sécrétion de facteurs solubles et d'exosomes contenant un cargo modulateur du microenvironnement local de l'organe cible, créant ainsi une niche pré-métastatique propice à la colonisation par les tumeurs pancréatiques (Ray, 2015, Giovannetti *et al.*, 2017).

Il a été estimé que le processus de cancérogenèse dure environ dix ans jusqu'à l'établissement d'une tumeur primaire non métastatique et cinq ans pour la formation de métastases. À partir de ce moment, l'espérance de vie des patients est réduite à environ deux ans (Yachida *et al.*, 2010).

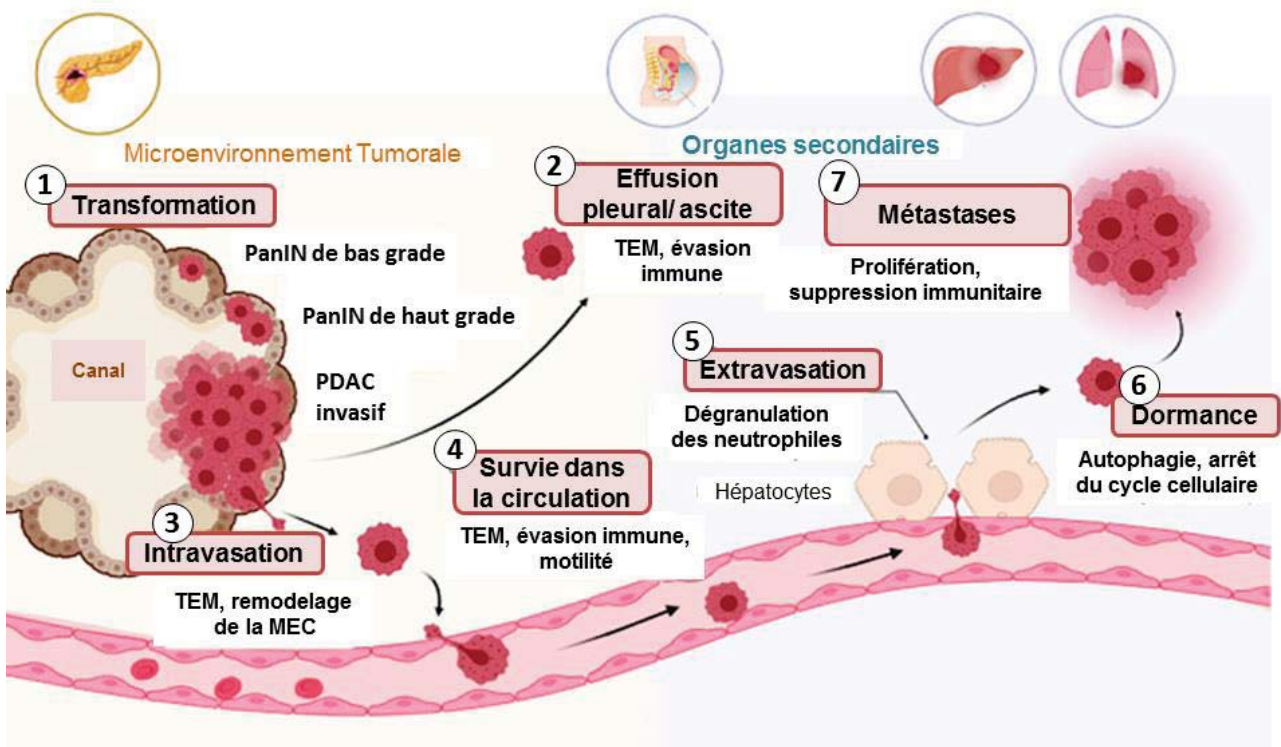


Figure 11 : Processus de métastase du cancer pancréatique.

(1) Les cellules épithéliales normales du canal pancréatique acquièrent un phénotype agressif suite à l'acquisition séquentielle de mutations qui les transforment d'abord en PanIN et ensuite en PDAC. (2) Les cellules transformées sont capables de se détacher et de coloniser le péritoine en formant une ascite ou un épanchement pleural. (3) Les cellules cancéreuses pancréatiques ont une motilité accrue due au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui leur permet d'envahir les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. (4) Les cellules cancéreuses circulantes (CTCs) sont abondantes, mais seules quelques-unes survivent à cette pression. (5) Plusieurs CTCs ont un tropisme pour la niche pré-métastatique (PMN) et sont capables d'extravaser vers un organe secondaire où elles peuvent rester dormantes (6) pendant plusieurs années et finalement rechuter et former des métastases manifestes (7). D'après Miquel *et al.*, 2021.

. II.2. Epidémiologie du cancer du pancréas

Bien qu'il ne soit pas un des cancers les plus fréquents au monde (12^{ème} rang d'incidence dans le monde et 7^{ème} en France), l'adénocarcinome pancréatique représente actuellement la 3^{ème} cause de mortalité par cancer dans les pays occidentaux après le cancer du poumon et le cancer colorectal. Son incidence est en continuelle hausse et est quasi-identique à son taux de mortalité. En 2018, 495 773 nouveaux cas par an, tous sexes confondus, ont été enregistrés dans le monde dont 14 461 en France contre 466 003 décès dont 13 793 en France (GLOBOCAN 2020 **Figure 12**).

Le PDAC est légèrement plus fréquent chez les hommes (262 865 cas dans le monde) que chez les femmes (232 908 cas dans le monde) avec un sexe ratio autour de 1,5. Les personnes essentiellement atteintes ont généralement plus de 65 ans et très rarement moins de 55 ans. En raison de son agressivité accrue et de sa forte chimiorésistance, le pronostic est extrêmement sombre avec un taux de survie à 5 ans très faible (<10%) et une médiane de survie de moins de 6 mois. Le PDAC est de ce fait prédit comme la 1^{ère} cause de mortalité par cancer digestif en 2030 (Rahib *et al.*, 2014).

II.3. Facteurs de risque

II.3.1. Facteurs de risques irréversibles d'ordre génétique

Le cancer pancréatique héréditaire désigne les tumeurs associées à des mutations germinales pathogènes connues. En effet, les patients atteints de certains syndromes héréditaires rares sont prédisposés au développement des PDACs et représentent 3 % de tous les cancers pancréatiques. On retrouve, classé par % de risque de développer le PDAC au cours de sa vie le plus élevé au plus faible ; la pancréatite héréditaire (mutations *PRSS1* et *SPINK1*, 25-40 %), le syndrome de Peutz-Jeghers (mutation *STK11*, 11-32 %), le syndrome du mélanome multiple familial (mutation *CDKN2A/p16INK4A*, 17 %), syndrome de Lynch (*MLH1*, 8.6 %), syndrome héréditaire du cancer du sein et de l'ovaire (mutations *BRCA1*, *BRCA2*, 3-8 %) et enfin la polypose adénomateuse familiale avec un risque de 1.7 % (Abe *et al.*, 2021).

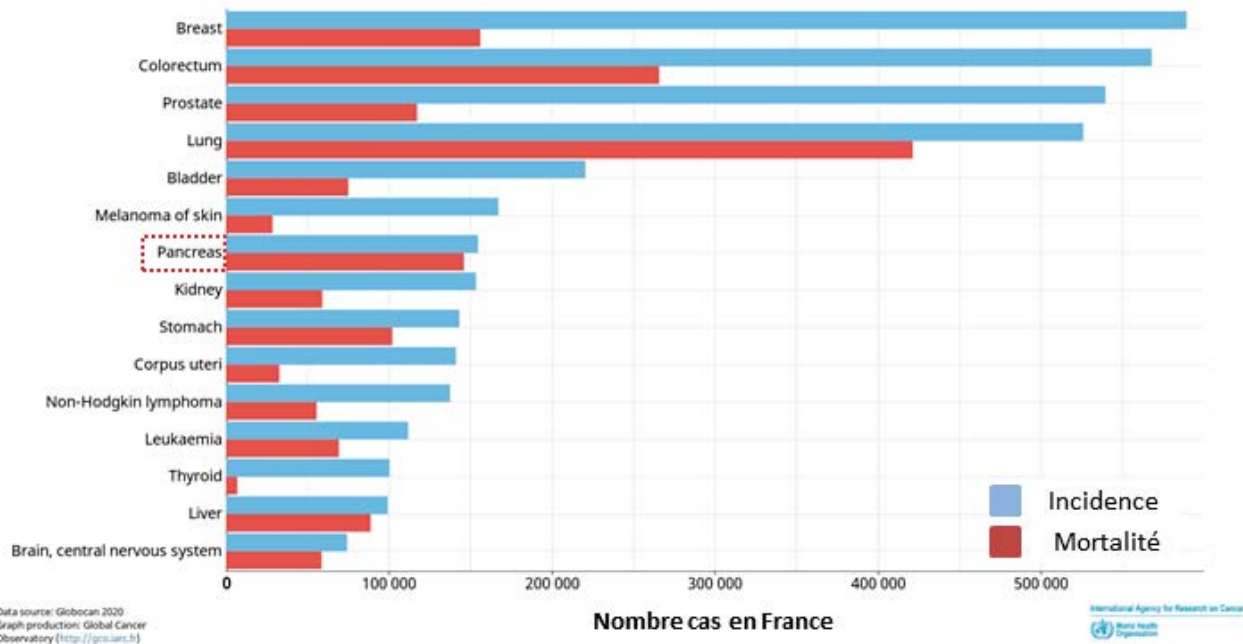
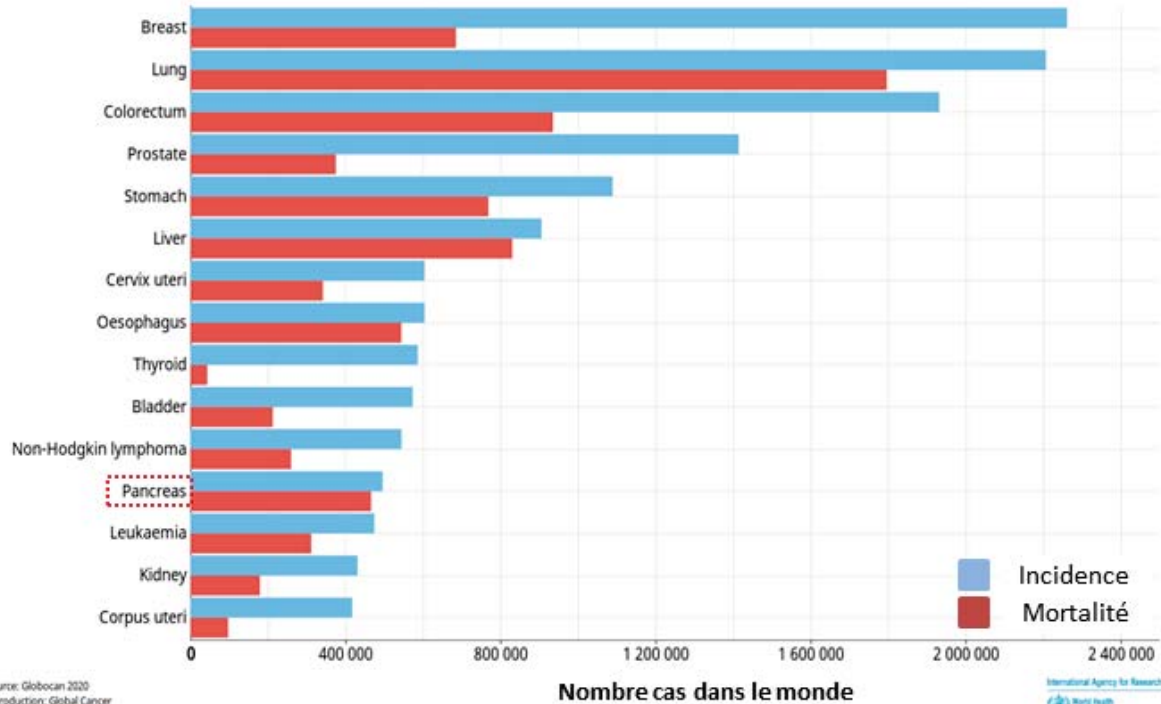


Figure 12 : Incidence et mortalité du PDAC.

Incidence et mortalité dans le monde (haut) et en France (bas), tous âges et tous sexes confondus. Adapté de Globocan 2020 (<https://gco.iarc.fr/>)

Le cancer du pancréas familial exclut les individus présentant un des syndromes héréditaires suscités. Actuellement, aucune mutation génétique associée à son développement n'a pu être déterminée. Toutefois, ce risque est défini en fonction du nombre de membres atteints de la famille. Les risques relatifs et à vie chez les individus ayant deux parents atteints, sont respectivement de 6,4 % et de plus de 20 %. Par ailleurs, ils atteignent respectivement 32 % et 40 % chez les individus ayant trois membres de la famille atteints de PDAC (Llach *et al.*, 2020).

La composante génétique est responsable de l'apparition d'environ 10 % des cancers du pancréas. Ce scénario suggère l'existence de facteurs supplémentaires génétiques méconnus, épigénétiques ou environnementaux pouvant contribuer au développement des PDACs.

II.3.1. Facteurs de risques réversibles d'ordre environnemental

Le tabagisme est le principal facteur de risque environnemental, tous cancers confondus. En effet, la consommation de tabac multiplie par deux le risque de développer un cancer du pancréas et peut accélérer son apparition. De plus l'usage du tabac peut augmenter d'un facteur 3 le risque de développement d'un cancer du pancréas familial chez les patients (19,2 % contre 6,25 % chez les non-fumeurs) et réduire l'âge d'apparition des PDACs d'environ 10 ans. Le même effet a été observé chez les patients atteints de pancréatite héréditaire (Pandol *et al.*, 2012 Llach *et al.*, 2020).

D'autres facteurs de risques ont également été décrits dont notamment, la consommation chronique d'alcool ou de viande rouge, l'exposition à certaines substances chimiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques, insecticides...) qui pourraient être responsables de 5 % des cancers pancréatiques.

Certaines pathologies pancréatiques, et notamment le diabète, l'obésité et les pancréatites représentent également des facteurs de risques du développement du PDAC, comme décrit dans le chapitre précédent.

II.4. Diagnostic

Actuellement, une des grandes limites thérapeutiques du PDAC est l'impossibilité de le détecter à des stades potentiellement curables. En effet, au moment du diagnostic plus de 80 % des patients ont d'emblée atteint les stades métastatiques les plus agressifs de la maladie (Vincent *et al.*, 2011). Plusieurs facteurs sont à l'origine de ce diagnostic tardif : (1) Durant les étapes précoces de la cancérogenèse pancréatique les patients présentent un état clinique asymptomatique. De plus, les premiers symptômes sont non seulement aspécifiques mais aussi souvent masqués par une altération de l'état général des patients. (2) Les technologies d'examens actuellement utilisées ne sont pas assez sensibles pour détecter les lésions pancréatiques précoces qui sont souvent inaccessibles. (3) Le manque de biomarqueurs validés du PDAC précoce. En effet, aucun des biomarqueurs disponibles ne possède une spécificité et une précision suffisante pour être mis en œuvre pour le dépistage, même chez les patients à haut risque (Chari *et al.*, 2015).

Lorsque la consultation médicale conduit à une suspicion d'atteinte de PDAC plusieurs examens morphologiques et biologiques sont prescrits aux patients afin d'établir le diagnostic.

II.4.1. Examens morphologiques

Afin de balayer tous les champs de possibilités de détection de tumeurs localisées ou métastatiques, trois examens d'imageries sont effectués.

Le scanner abdomino-pelvien (tomodensitométrie) est recommandé en première intention. En plus de sa précision diagnostique (90 %), il permet d'évaluer le degré de contact entre les masses tumorales et les vaisseaux sanguins locaux et de déterminer le stade de la maladie. Ces informations sont importantes pour définir le traitement optimal. Bien que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) présente une sensibilité et une spécificité similaire à celle du scanner, elle est utile pour l'identification de petites tumeurs mal caractérisées par la tomodensitométrie et déterminer la nature métastatique de lésions hépatiques initialement indéterminées. Enfin, l'écho-endoscopie permet d'apporter des informations sur l'extension tumorale

au niveau vasculaire locorégional, et de réaliser une biopsie nécessaire pour établir un diagnostic cytologique ou histologique et moléculaire (Aslanian *et al.*, 2020).

II.4.2. Examens biologiques

Au fil des dernières années, plusieurs études ont entrepris l'identification de potentiels biomarqueurs de diagnostic du PDAC. L'un des mieux caractérisés est l'antigène glucidique 19-9 (CA 19-9). Malgré une sensibilité et une spécificité élevées (83 % et 75 %, respectivement) (Ahmed Ali *et al.*, 2016) observées chez des patients atteints de PDAC symptomatiques, le CA-19-9 présente une très faible valeur prédictive (Huang and Liu, 2014). Ce marqueur est donc inadapté comme outil de dépistage du PDAC puisque son expression est également associée à d'autres maladies telles que la pancréatite aiguë ou le cancer colorectal et au contraire indétectable chez 5 à 10 % des patients atteints de PDAC.

De nombreux autres marqueurs sont décrits dans la littérature sans pour autant être utilisés en pratique clinique. Les plus étudiés sont les ADNs tumoraux circulants, les cellules tumorales circulantes, les microARNs et les vésicules extracellulaires telles que les exosomes.

II.5. Traitements

Le schéma thérapeutique et ou chirurgical diffère en fonction de la localisation de la masse tumorale et de son contact avec les structures vasculaires veineuses ou artérielles adjacentes ainsi qu'avec le canal biliaire. D'après la classification du *National Comprehensive Cancer Network* les tumeurs sont définies comme ; résécables, à la limite de la résécabilité (*borderline*), localement avancées et métastatiques inopérables (**Figure 13**) (Vauthey and Dixon, 2009). La prise en charge des patients atteints de PDAC est donc très complexe et variée. Elle est basée sur deux modalités de traitement, la chirurgie et la chimiothérapie (néoadjuvante, adjuvante ou palliative). Actuellement, plusieurs molécules chimiothérapeutiques sont utilisées en cliniques.

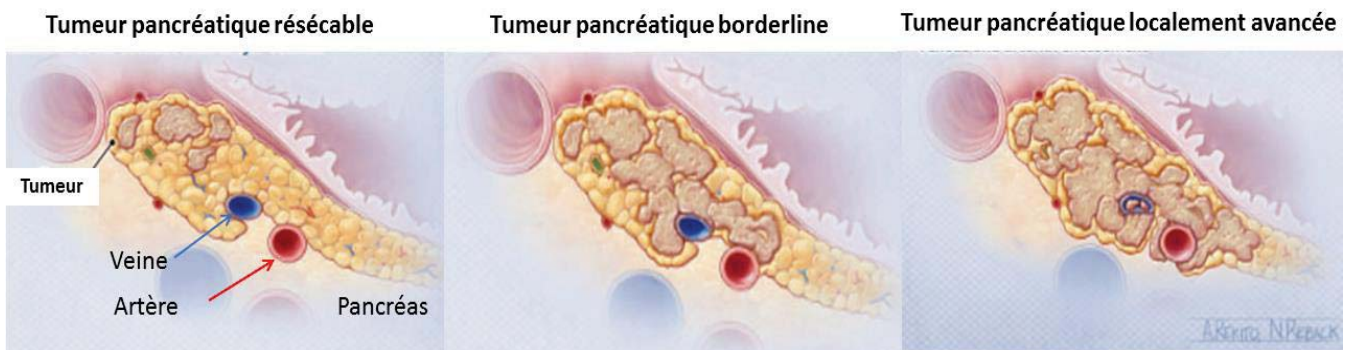


Figure 13 : Spectre du cancer du pancréas localisé.

La tumeur résécable ne présente aucun contact artériel ou veineux. La tumeur *borderline* présente un contact artériel et veineux $<180^\circ$, sans envahissement des vaisseaux. La tumeur localement avancée présente un contact artériel $>180^\circ$ avec envahissement aortique et veineux sans possibilité de reconstruction. Adapté de Park *et al.*, 2021.

II.5.1. Molécules chimiothérapeutiques

Gemcitabine

La gemcitabine, également connue sous le nom de dFdC : 2',2'-difluoro-2'-désoxycytidine (dFdC), est un antimétabolite, analogue nucléosidique de la désoxycytidine. Cette molécule cytotoxique s'introduit au sein des cellules tumorales *via* les transporteurs nucléosidiques spécifiques dont notamment le récepteur hCNT1 (human Concentrative Nucleoside Transporter 1) ou encore le récepteur hENT1 (human Equilibrative Nucleoside Transporter 1). Une fois dans le cytoplasme cellulaire, la gemcitabine est phosphorylée par des nucléosides kinases en nucléosides di-(dFdCDP) et triphosphate (dFdCTP). Le dFdCDP inhibe la ribonucléase réductase bloquant ainsi la synthèse des désoxyribonucléotides et la synthèse d'ADN par la même occasion. Quant au dFdCTP, il est incorporé dans l'ADN et empêche son élongation (**Figure 14**).

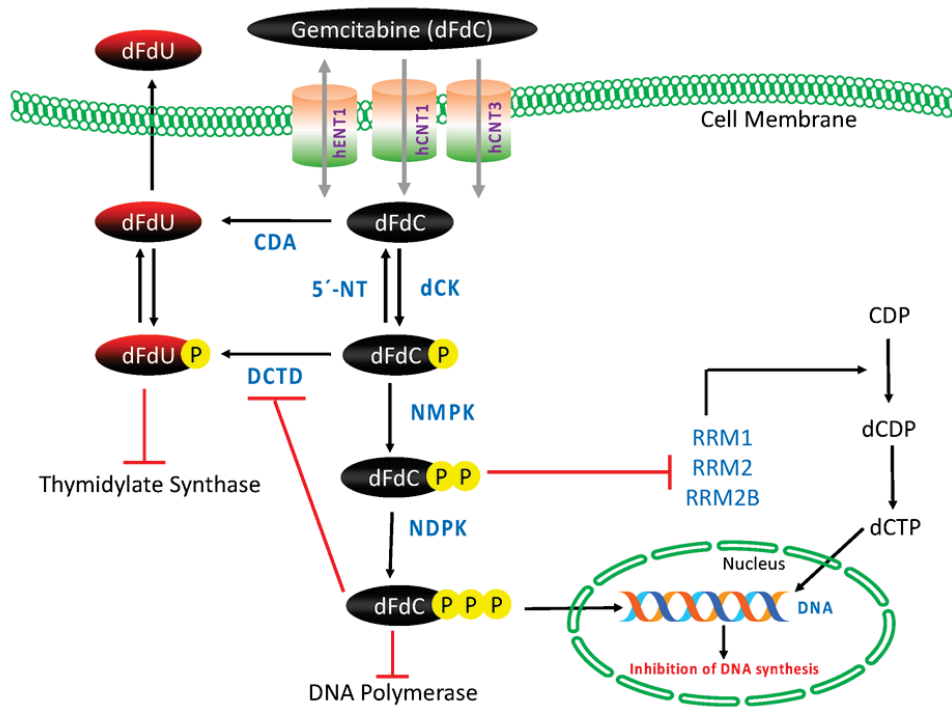


Figure 14 : Métabolisme et mode d'action de la gemcitabine.

Abréviations : CDA : cytidine désaminase, dCK : désoxycytidine kinase, DCTD : désoxycytidylate désaminase, dFdC : 2',2'-difluorodésoxycytidine, dFdU : 2',2'-difluorodésoxyuridine, hENTs et hCNTs : transporteurs de nucléosides humains, NDPK : nucléoside diphosphate kinase, NMPK : nucléoside monophosphate kinase, RR(M1/M2), ribonucléotide réductase, 5'-NT : 5'-nucléotidase. D'après Amrutkar and Gladhaug, 2017.

Nab-paclitaxel

Le nab-paclitaxel est constitué de nanosphères d'albumine contenant l'agent antimicrotubulaire paclitaxel. La capsule d'albumine facilite le transport de l'agent anticancéreux hydrophobe à travers les cellules endothéliales, favorisant son absorption par les cellules tumorales. De plus, l'albumine assure un ciblage spécifique de la tumeur grâce à la liaison spécifique à la protéine SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*) surexprimée dans les PDACs. Une fois introduit dans les cellules, le paxlitaxel stimule l'assemblage des dimères de tubuline en microtubules et stabilise les microtubules en empêchant leur dépolymérisation. Cette stabilité inhibe la réorganisation dynamique normale du réseau de microtubules au cours du cycle cellulaire inhibant ainsi la mitose et la croissance cellulaire.

FOLFIRINOX

Le protocole FOLFIRINOX est une poly-chimiothérapie associant quatre molécules :

Le 5-fluorouracile (5-FU) appartient à la classe des anti-métabolites de type analogue de pyrimidines. Son principal mécanisme d'action se base sur le blocage la méthylation de l'uracile en thymine *via* l'inhibition de l'enzyme responsable la *thymidylate synthase* aboutissant à une inhibition de la synthèse de l'ADN. Il peut aussi s'incorporer à l'ARN et perturber le mécanisme de transcription.

La leucovorine ou acide folinique utilisé comme traitement adjuvant. Il permet de potentialiser les effets thérapeutiques du 5-FU en bloquant l'action de la thymidylate synthase.

L'oxaliplatine, une drogue dérivée de platine, ayant une action alkylante aboutissant à la formation de liaisons covalentes entre deux molécules de guanine ou d'arginine adjacentes. Cette action conduit à l'inhibition de la transcription et de la synthèse d'ADN.

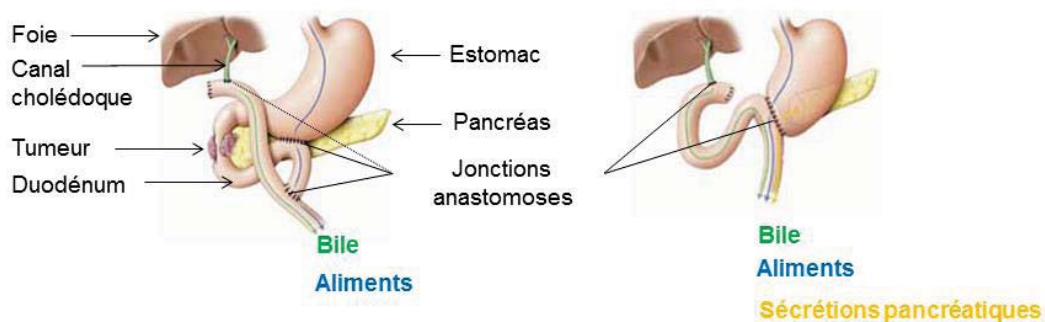
L'irinotecan est une prodrogue métabolisée au niveau hépatique en agent actif le SN38, qui est un inhibiteur de la topoisomérase de type I impliquée dans les mécanismes de synthèse et de réparation de l'ADN.

II.5.2. Schémas de prises en charge thérapeutique

II.5.2.1. Tumeurs résécables

La chirurgie reste le seul traitement potentiellement curatif du PDAC. Cependant, peu de patients peuvent en bénéficier (10 % environ). Elle n'est pratiquée d'emblée que chez des patients présentant des tumeurs localisées ayant peu ou pas de contact avec la vasculature adjacente et assurant une résection complète. En général, les tumeurs situées au niveau de la tête du pancréas nécessitent une duodéno pancréatectomie, tandis que les tumeurs situées dans le col du pancréas, le corps et la queue nécessitent une spléno pancréatectomie gauche (**Figure 15**). Pour pallier aux comorbidités associées, il est conseillé d'effectuer ces d'opérations dans des grands centres hospitaliers et offrant une prise en charge par des chirurgiens très expérimentés en chirurgie du PDAC (El Amrani *et al.*, 2018).

➤ La duodéno pancréatectomie céphalique



➤ La spléno pancréatectomie gauche

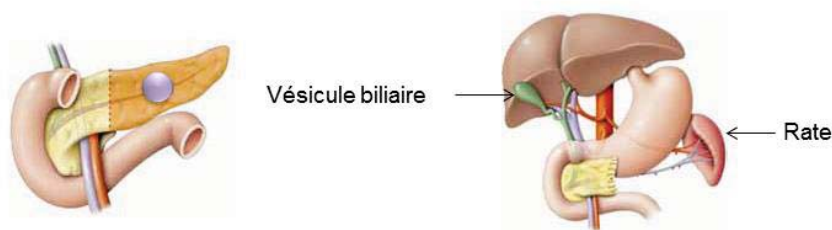


Figure 15 : Résection chirurgicale du pancréas.

La duodéno pancréatectomie céphalique consiste en l'ablation de la tête du pancréas, du cadre duodénal et de la voie biliaire principale intra-pancréatique.

La pancréatectomie gauche consiste en l'ablation du pancréas corporeo-caudal, le parenchyme étant sectionné et suturé au niveau de l'isthme.

Durant ces 20 dernières années, plusieurs études cliniques ont mis en évidence l'implication de la chimiothérapie adjuvante dans l'amélioration des chances de survie des patients atteints de PDAC résécable. Récemment, l'étude PRODIGE-24 a démontré une meilleure survie globale des patients traités en adjuvant par le

FOLFIRINOX modifié (54,4 mois) comparé aux patients traités par la gemcitabine (35 mois) (Conroy *et al.*, 2018). Sur la base de ces résultats, le FOLFIRINOX modifié est aujourd'hui recommandé comme traitement adjuvant standard chez les personnes présentant un excellent état fonctionnel après une résection chirurgicale du PDAC. A l'inverse, les patients pour lesquels le traitement par FOLFIRINOX modifié n'est pas adapté peuvent être proposés pour un traitement par gemcitabine/capécitabine ou gemcitabine seule (Neoptolemos *et al.*, 2010, Neoptolemos *et al.*, 2017).

Depuis peu, d'autres études cliniques explorent l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques néoadjuvants, visant à augmenter le nombre de patients éligibles à la chirurgie et à occulter la propagation métastatique du PDAC. Les résultats sont en cours d'évaluation.

II.5.2.2. Tumeurs « borderline » et localement avancées

A ce stade de la maladie, les tumeurs sont d'emblée inopérables. Seul 20 % des patients répondent suffisamment aux thérapies néoadjuvantes et deviennent éligible à la chirurgie. La majorité des patients atteints de PDAC localement avancé sont généralement soumis à des régimes de chimiothérapie, tels que le FOLFIRINOX modifié ou le nab-paclitaxel ou encore la gemcitabine (Sultana *et al.*, 2007 (Mukherjee *et al.*, 2013).

II.5.2.3. Tumeurs métastatiques

Le PDAC métastatique est la forme la plus agressive et la plus fréquemment diagnostiquée du cancer du pancréas (80 % des patients). Cette propagation de la tumeur dans des sites secondaires tels que le foie (site préférentiel 90 %) limite drastiquement les chances de survie des patients et réduit les traitements proposés à un schéma uniquement palliatif. Les pratiques cliniques et le choix d'une chimiothérapie seule ou combinée en première ou en deuxième intention diffèrent en fonction de l'état général du patient et des réglementations nationales du pays procurant les soins. Les chimiothérapies les plus communément utilisées comme premières lignes de traitement sont la gemcitabine et la poly-chimiothérapie FOLFIRINOX permettant de décaler la médiane de survie à 6,8 et 11,1 mois respectivement (Conroy *et al.*, 2011) ou encore le nab-paclitaxel. Des associations de chimiothérapies sont aussi prescrites et notamment la combinaison gemcitabine

plus nab-paclitaxel offrant environ 2 mois de survie médiane comparé à la gemcitabine seule (8,5 versus 6,7 mois respectivement) (Von Hoff *et al.*, 2013). Le choix de ces chimiothérapies est indépendant de toutes altérations génétiques du PDAC.

En revanche, dans l'essai clinique POLO (*Pancreas Olaparib Ongoing*) la variation germinale de *BRCA1/2* a été validée comme biomarqueur génétique du PDAC et a orienté le choix du traitement proposé. En effet, il a été montré que l'administration de l'Olaparib, un inhibiteur de la poly (ADP-ribose) polymérase, à des patients atteints de PDAC métastatique préalablement traités par un dérivé de platine et présentant une variation germinale de *BRCA1/2* offre un avantage significatif de survie sans progression par rapport au placebo (7,4 contre 3,8 mois) (Golan *et al.*, 2019).

En cas d'échec de la première ligne thérapeutique proposée, l'utilisation d'un traitement de seconde ligne pourrait être bénéfique à certains patients sélectionnés qui conservent un bon état général. Pour ces patients, l'association de l'irinotecan liposomal (nal-IRI) plus 5-FU est actuellement approuvée par les directives américaines et européennes (Ueno *et al.*, 2020). Bien que les données sur le FOLFIRINOX en deuxième ligne soient limitées, il pourrait être une option, de même que la gemcitabine plus nab-paclitaxel après un traitement de première ligne à base de platine (Lellouche *et al.*, 2021).

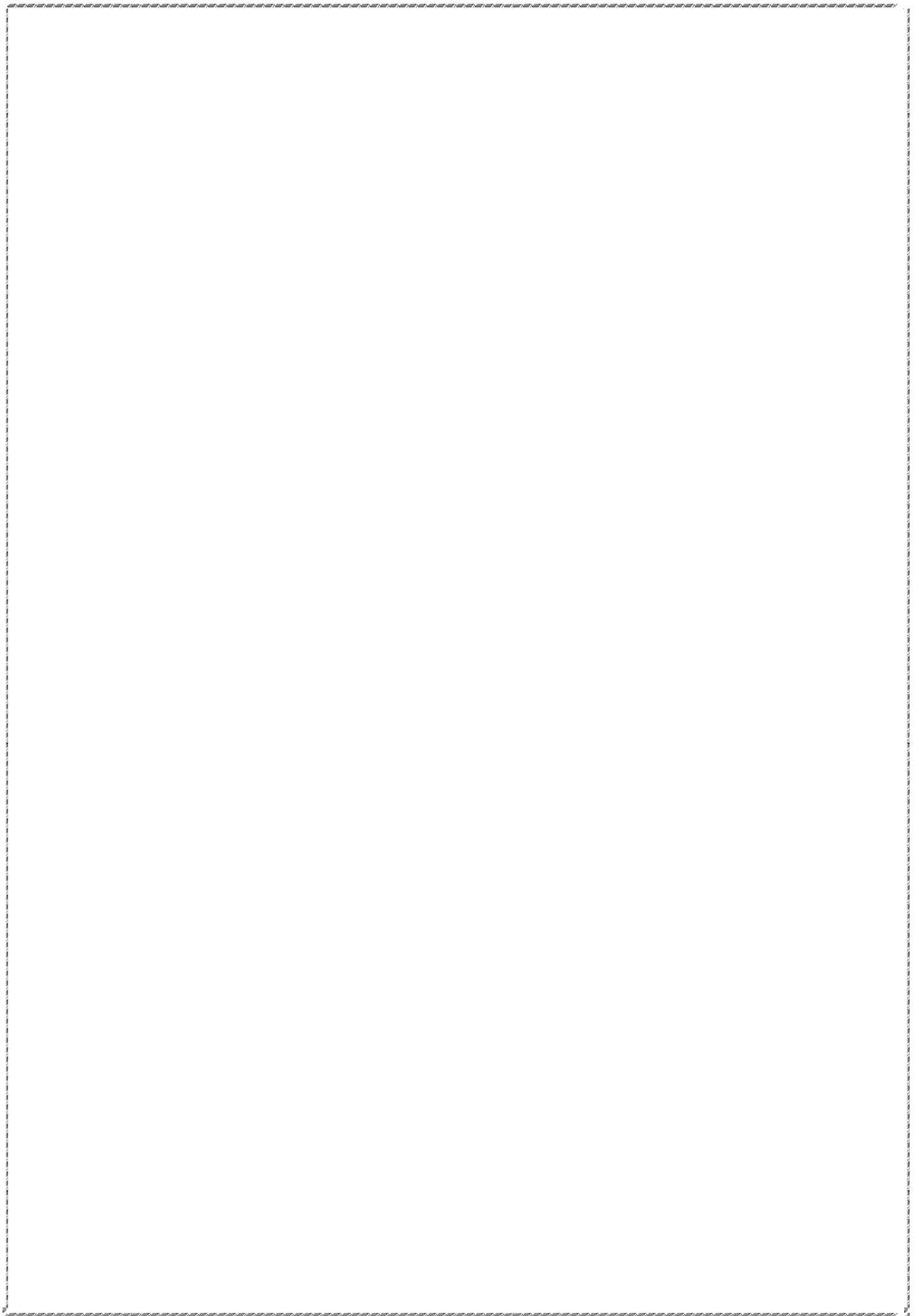
II.5.2.4. Perspectives pour les chimiothérapies des PDACs

Enfin, de nouvelles stratégies de prise en charge des patients atteints de PDAC métastatiques associés à des altérations géniques sont en cours d'essai. Ces essais cliniques se basent sur l'utilisation de thérapies ciblées ou des combinaisons d'inhibiteurs de *check-point* immunitaires utilisés pour d'autres cancers présentant les mêmes altérations (Park *et al.*, 2021).

II.5.3. Résistance aux chimiothérapies

Bien que les patients atteints de PDACs soient traités par plusieurs molécules thérapeutiques, le développement de mécanismes de chimiorésistance limite fortement leur efficacité. Il est indéniable que les cellules cancéreuses pancréatiques sont l'une des plus résistantes aux traitements. Actuellement, les mécanismes sous-jacents au développement de cette résistance restent flous. De ce fait, diverses pistes sont étudiées, incluant des anomalies épigénétiques et génétiques, le métabolisme des drogues, les médiateurs extracellulaires, le processus de transition épithélio-mésenchymateuse...

Depuis plusieurs années, notre équipe de recherche, s'est focalisée sur l'investigation des rôles des mucines dans la cancérogenèse pancréatique et à leur implication dans la chimiorésistance des PDACs.



III. Les mucines

Historiquement, le terme mucine désignait les composants fonctionnels majeurs du mucus (Gottschalk, 1960). Le mucus, est un fluide biologique recouvrant le pôle apical de l'ensemble des surfaces épithéliales des voies respiratoires, gastro-intestinales et reproductives des mammifères et représente une des premières barrières de défense immunitaire contre les agents pathogènes. Au fil du temps, avec l'avènement des technologies et des outils de biologie moléculaire, plusieurs études ont entrepris l'identification des gènes de mucines et la caractérisation de leurs structures et de leurs fonctions physiopathologiques. Aujourd'hui, cette grande famille d'O-glycoprotéines de masse moléculaire élevée regroupe 21 mucines présentant des similitudes et des différences structurelles et fonctionnelles.

III.1. Structure des mucines

Bien que toutes les mucines soient codées par des gènes différents, leurs structures protéiques primaires présentent certaines caractéristiques similaires. En effet, chaque mucine est composée d'une longue chaîne peptidique appelée apomucine sur laquelle sont greffées plusieurs milliers de chaînes oligosaccharidiques. (Desseyn *et al.*, 2008, Jonckheere and Van Seuning, 2008).

1) Apomucine

A la différence des autres O-glycoprotéines, le squelette peptidique d'une mucine se caractérise par une composition unique. On y distingue un grand nombre de séquences répétées en tandem appelées *Variable Number of Tandem Repeat* (VNTR). La singularité structurelle et la masse moléculaire de chaque mucine sont déterminées en grande partie par la séquence et la taille du VNTR qui peuvent varier respectivement de 5 à 375 résidus d'acides aminés et de 5 à 395 répétitions. De plus, ces séquences sont riches en résidus de proline, sérine et/ou thréonine (PTS), servant d'ancrage aux chaînes oligosaccharidiques.

2) Chaînes oligosaccharidiques

L'apomucine est recouverte par de multiples chaînes de glycanes qui représentent 50 à 90 % du poids total de la glycoprotéine. Parmi les chaînes glycaniques les plus importantes on distingue :

(1) Les chaînes O-glycaniques, prédominantes et fixées aux résidus de sérine et/ou de thréonine du domaine VNTR. La O-glycosylation des mucines se caractérise par une grande diversité. En effet, ces chaînes sont composées d'un éventail de motif glycaniques ayant des territoires d'expression tissu-spécifique.

(2) Les chaînes N-glycaniques sont beaucoup moins abondantes et réparties au niveau des résidus d'asparagine dans la séquence Asn-X-Ser/Th des extrémités N-terminales (Nter) et C-terminales (Cter). Elles jouent un rôle dans la maturation, la sécrétion et la conformation des mucines (Groux-Degroote *et al.*, 2021).

III.2. Familles des mucines

En fonction de leur structure et de leur localisation subcellulaire, ces protéines ont été réparties en deux sous-familles (1) les mucines sécrétées, dépourvues de domaine transmembranaire et sécrétées dans la lumière des épithéliums et (2) les mucines transmembranaires, ancrées à la membrane, possédant de courts domaines cytoplasmiques en extrémité Cter et un vaste domaine extracellulaire en extrémité Nter.

III.2.1. Les mucines sécrétées

Synthétisées spécifiquement par les cellules caliciformes mucipare. Initialement découvertes dans le mucus, les mucines sécrétées s'organisent en réseaux filamenteux formant un gel viscoélastique présent principalement à la surface des muqueuses. D'un point de vue structure, de part et d'autre de leur VNTR, les monomères de mucines sécrétées possèdent des domaines cystine knot (CK) et von Willebrand (vWF) riches en résidus cystéine leurs permettant de se dimeriser en Nter et de s'oligomériser en Cter par la formation de ponts disulfures (**Figure 16**). Contrairement aux mucines MUC2, MUC5AC, MUC5B et MUC6, il existe d'autres mucines sécrétées dépourvues des domaines de dimérisation et d'oligomérisation et qui ne sont pas des composants du mucus. C'est le cas des

mucines 7 et 9 qui sont secrétées exclusivement dans l'épithélium salivaires, bronchiques et la trompe de Fallope (Porchet and Aubert, 2004, Lagow *et al.*, 1999).

III.2.2. Les mucines transmembranaires

Les mucines transmembranaires (MUCtm) sont des glycoprotéines monomériques typiques formant la sous-famille majoritaire de mucines. On y retrouve principalement les mucines MUC1, MUC4, MUC13, MUC16, MUC17 et MUC20. Au contraire des mucines sécrétées, les MUCtm sont exprimées au pôle apical de l'ensemble des cellules épithéliales et forment aussi une barrière protectrice contre les pathogènes. La structure des MUCtm se caractérise par la présence d'un domaine VNTR extracellulaire O-glycosylé, d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique.

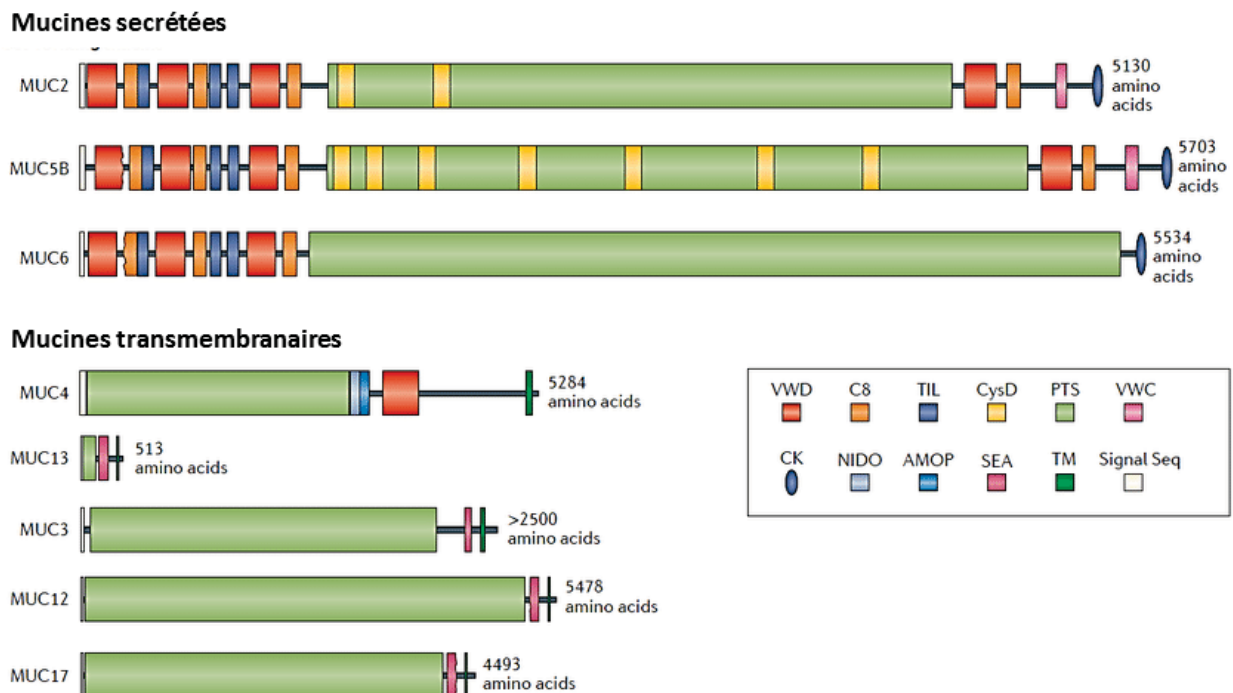


Figure 16 : Schéma représentatif des structures de mucines sécrétées et membranaires et leurs différents domaines.

Abréviations : vWD : domaine D de von Willebrand, C8 : domaine riche en cystéine
 TIL : domaine riche en cystéine semblable à l'inhibiteur de trypsine, CysD : domaine riche en résidus de cystéine, vWC : domaine C de von Willebrand, PTS : domaines Pro/Thr/Ser, CK : domaines cystine knot, NIDO : *Nidogen*, AMOP : *Associated domain in MUC4 and Other Proteins*, SEA : *sea-urchin sperm protein, enterokinase*, TM : domaine transmembranaire.

D'après Collado-González *et al.*, 2019.

Les régions non glycosylées des mucines abritent de nombreux domaines fonctionnels. En effet, la majorité des MUCtm possèdent en plus des domaines PTS des domaines de type *Epidermal Growth Factor* (EGF) et de type *sea-urchin sperm protein, enterokinase* (SEA). Les domaines O-glycosylés agissent comme des capteurs du microenvironnement et sont impliqués dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Le domaine SEA est impliqué à la fois dans le clivage et dans l'association des sous-unités de mucines. Les domaines EGF jouent le rôle de ligands et sont impliqués dans l'hétérodimérisation des mucines avec des récepteurs membranaires tels que récepteurs de la famille des ErbB. (Liberelle *et al.*, 2019, Liberelle *et al.*, 2020, Stoup *et al.*, 2021). Enfin, il existe d'autres domaines exclusifs à une seule mucine (MUC4) que nous détaillerons plus loin dans ce chapitre.

Les queues cytoplasmiques de certaines MUCtm possèdent des sites de phosphorylation et des motifs d'interaction protéine-protéine. Elles peuvent jouer un rôle dans la signalisation cellulaire, en interagissant avec des kinases et avec d'autres protéines associées au cytosquelette. Leur taille et leur composition en acides aminés et leurs rôles varient considérablement, d'une mucine à une autre (**Figure 16**).

III.3. Fonctions physiologiques des mucines

Le profil d'expression des mucines est spécifique aux tissus. Ces glycoprotéines participent à des fonctions essentielles telles que la protection, la lubrification des surfaces épithéliales, le maintien des caractéristiques épithéliales, l'adhésion cellulaire, la différenciation et l'immunité. Les MUC_{tm} fonctionnent comme des récepteurs de surface cellulaire, qui en réponse à divers stimuli externes activent des voies de signalisation permettant de réguler différents processus tel que la croissance cellulaire, la différenciation, la prolifération et l'apoptose... Les mucines membranaires et sécrétées jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire.

III.4. Mucines et cancers

De nombreuses études décrivent une altération de l'expression des mucines sécrétées comme membranaires dans diverses pathologies épithéliales allant des maladies inflammatoires de l'intestin aux cancers. En effet, une hyper-sécrétion de certaines mucines est associée à la progression et à l'agressivité tumorale et ce à différents niveaux. Les caractéristiques biochimiques des mucines leur confèrent la possibilité (1) d'interagir avec les cellules et les facteurs solubles du microenvironnement et traduire le stimulus en signalisation cellulaire pro-oncogénique, (2) de constituer une barrière physique empêchant l'accès des molécules thérapeutiques anti-cancéreuses et induisant un mécanisme de chimiorésistance, et (3) d'interagir avec des molécules d'adhésion suite à l'altération des motifs de glycosylation et favoriser de ce fait la migration et l'invasion cellulaires et la formation de métastases (Rahn *et al.*, 2005, Senapati *et al.*, 2011). La compréhension des mécanismes d'action des mucines et l'identification des différents médiateurs impliqués constituent des éléments clés dans l'amélioration de la prise en charge des patients.

Actuellement, les mucines représentent d'une part, de potentiels marqueurs de diagnostic ou de pronostic et d'autre part des cibles thérapeutiques intéressantes (Kufe, 2009, Jonckheere *et al.*, 2021).

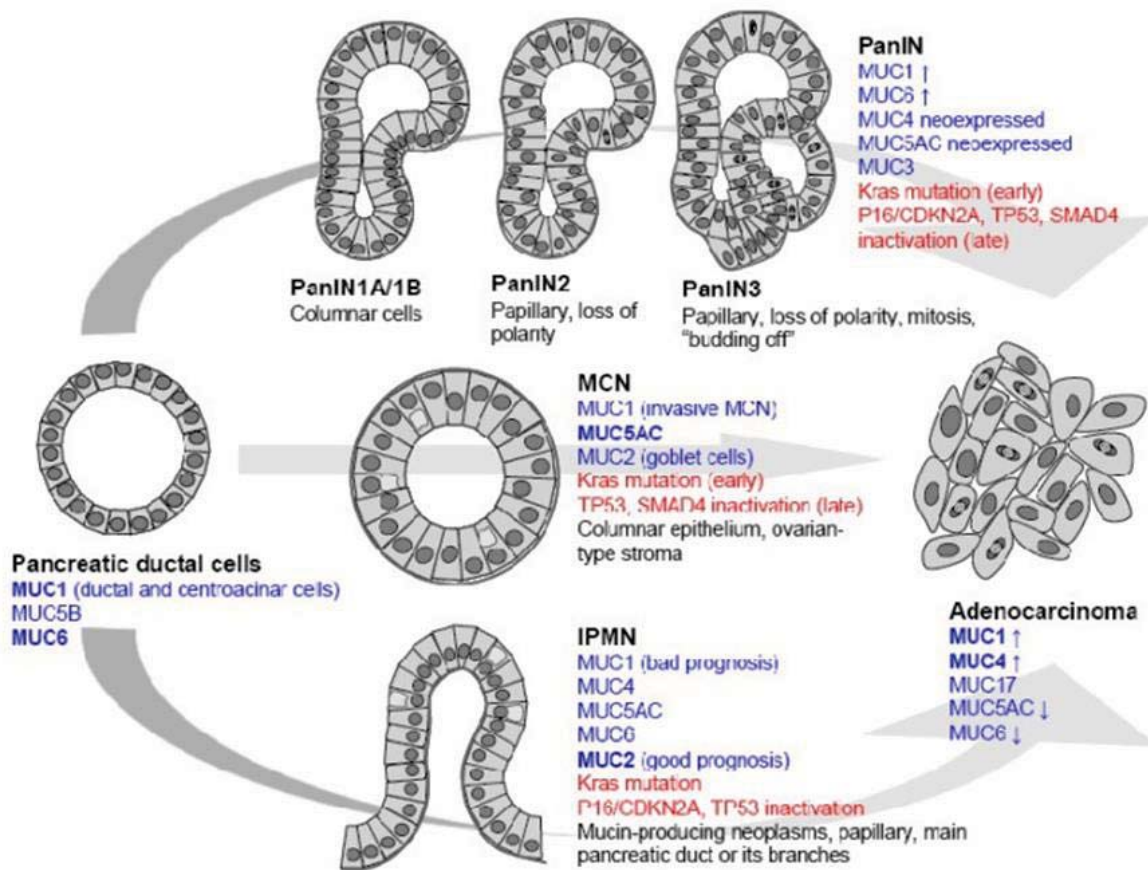


Figure 17: Expressions des mucines dans les lésions précancéreuses du PDAC.

Néoplasie intraépithéliale pancréatique (PanIN), néoplasme mucineux papillaire intra-canaulaire (IPMN) et néoplasme kystique mucineux (MCN).

D'après Jonckheere *et al.*, 2010.

III.5. Mucines et cancers du pancréas

Plusieurs études décrivent l'implication des mucines dans la cancérogenèse pancréatique. En effet, l'apparition et la progression des PanINs est accompagnée par une expression altérée des mucines sécrétées (MUC2, MUC5AC et MUC6) et des mucines membranaires (MUC1, MUC4, MUC13, MUC16, MUC17 et MUC20) (Jonckheere *et al.*, 2010) (**Figure 17**). Notre groupe de recherche s'intéresse particulièrement à MUC4, une mucine transmembranaire non exprimée dans le pancréas sain et dont la néoexpression dans les PDACs est associée à la progression et à l'agressivité de la maladie. De plus, plusieurs études suggèrent l'utilisation de MUC4 comme marqueur pronostique. En effet, la survie des patients atteints de PDAC présentant une faible expression de MUC4 est significativement plus élevée que celle des patients présentant au contraire une forte expression de MUC4 (Saitou *et al.*, 2005). De manière intéressante, une analyse des données transcriptomiques (RNAseq) de la base de données publique TCGA, a permis d'observer que l'expression de MUC4 et de la combinaison MUC4/MUC16/MUC20 est une signature associée à un mauvais pronostic du PDAC (Jonckheere *et al.*, 2020).

Dans la suite du manuscrit nous allons introduire des généralités sur la mucine 4, sur ses fonctions physiopathologiques et détailler ses rôles dans les PDACs.

III.6. La mucine transmembranaire 4 « MUC4 »

SMC/rMuc4 est une protéine homologue de MUC4, qui a initialement été identifiée et caractérisée en 1980, dans une lignée d'adénocarcinome mammaire de rat (Sherblom and Carraway, 1980). Ce n'est que 11 ans plus tard, que fut découvert le gène *MUC4* humain au sein du laboratoire à partir d'une banque d'ADNc issue de muqueuse trachéo-bronchique humaine (Porchet *et al.*, 1991). Il est maintenant clairement établi que l'expression de MUC4 est cellule- et tissu-spécifique. Chez l'adulte sain, elle est exprimée au pôle apical des cellules épithéliales au niveau du tractus respiratoire et digestif, des glandes lacrymales, salivaires et mammaires et absente dans d'autres glandes telles que le pancréas (Corfield *et al.*, 2001, Bafna *et al.*, 2010).

III.6.1. Structure

MUC4 est une mucine transmembranaire hétérodimerique, dont l'apomucine est de 930 kDa environ, ayant une partie extracellulaire volumineuse estimée à 2,12 μm de long. Elle est composée de deux sous unités MUC4 α au niveau Nter et MUC4 β au niveau Cter associées par une liaison non covalente.

La sous-unité de type mucinique MUC4 α , représente la partie extracellulaire hyperglycosylée. Elle contient plusieurs domaines structuraux et fonctionnels de MUC4. D'abord, cités dans l'ordre de l'extrémité Nter à l'extrémité Cter, un domaine de type VNTR, ensuite, trois domaines MUC4 spécifiques. (1) Le domaine AMOP, *Adhesion-associated domain present in MUC4 and Other Proteins*, hypothétiquement impliqué dans des mécanismes d'adhésion cellulaire et ou d'angiogenèse. (2) Le domaine NIDO, *Nidogen Domain*, impliqué dans l'interaction avec des éléments de la matrice extracellulaire. (3) Les domaines vWF participent généralement à la formation de liaisons disulfures. Cependant, les résidus de cystéine, conservés dans les mucines sécrétées, ne sont pas présents dans MUC4, ce qui suggère une perte de fonction de ce domaine dans les mucines membranaires au cours de l'évolution.

La sous-unité transmembranaire MUC4 β , constituée de (1) trois domaines de type EGF, nécessaires à l'interaction avec d'autres récepteurs membranaires, (2) un domaine transmembranaire et enfin (3) une courte queue cytoplasmique de 22 aa (Jonckheere *et al.*, 2013) (**Figure 18**).

Ces deux sous-unités peuvent potentiellement être dissociées *via* le site de clivage de type GDPH (Glycine-Acide aspartique-Proline-Histidine) (Sheng, 1990) présent au niveau de l'extrémité inférieure de MUC4 α .

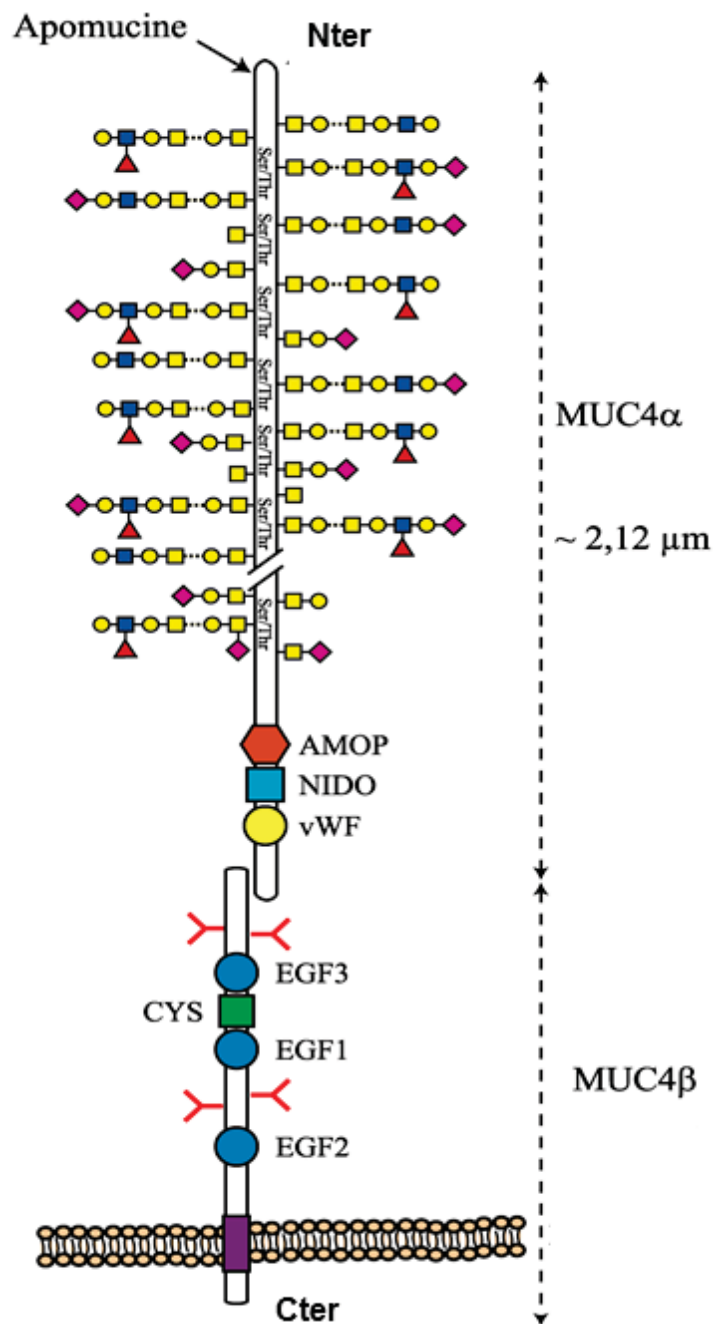


Figure18: Représentation schématique de la structure de MUC4.

Abréviations : EGF : *Epidermal Growth Factor*; AMOP : *Associated domain in MUC4 and Other Proteins*, NIDO : *Nidogen Domain* ; vWF : *von Willebrand Factor*, GDPH : *Glycine-Acide aspartique-Proline-Histidine*.
D'après Jonckheere et al., 2012.

III.6.2. Régulation de l'expression de MUC4 dans les PDACs

L'expression de MUC4 est fortement régulée dans les cellules pancréatiques cancéreuses. De nombreux travaux au sein du laboratoire ont porté sur l'identification des mécanismes de régulation transcriptionnelle et épigénétique de MUC4.

III.6.2.1. Régulation épigénétique

Le gène *MUC4* fait 62,24 kb et est localisé en position 29 du bras court du chromosome 3 (3q29). Il a été montré que ce gène est verrouillé épigénétiquement dans les cellules pancréatiques normales et cancéreuses (PANC-1 et MIA PaCa-2). En effet, selon le modèle proposé par Vincent et Van Seuningen (Vincent *et al.*, 2008), la répression de l'expression de MUC4 est la conséquence de la méthylation des îlots CpG associée à la désacétylation des histones de sa région promotrice. Ces marques épigénétiques maintiennent cette portion de la chromatine dans un état fermé inaccessible à la machinerie transcriptionnelle. Inversement, une forte expression de MUC4 dans les cellules cancéreuses est en partie due à hypométhylation de certains îlots CpG présents dans la région 5' du gène *MUC4*. Dans ce cas de figure la chromatine est dans une configuration dite ouverte et accessible à transcription.

III.6.2.2. Régulation transcriptionnelle

Des études fonctionnelles de la région promotrice de *MUC4* dans les cellules cancéreuses du pancréas ont mis en évidence que la transcription de *MUC4* est contrôlée par deux régions régulatrices, proximale (-219/-145) et distale (-2781/-2572) (Perrais *et al.*, 2001a). Ces régions contiennent de multiples sites potentiels de fixation de facteurs activateurs ou inhibiteurs de transcription. Dans le cancer pancréatique, deux types de régulation transcriptionnelle de MUC4 ont été décrits, (1) une régulation activatrice résultante de l'activation de voies de signalisation en aval par des facteurs tels que l'EGF, le *Transforming Growth Factor* β (TGF- β), l'interféron- γ et l'acide rétinoïque (Andrianifahanana *et al.*, 2005) (Andrianifahanana *et al.*, 2007), et (2) une régulation répressive notamment *via* la fixation du facteur AP-2 (Fauquette *et al.*, 2007).

La régulation transcriptionnelle de MUC4 représente un processus complexe. En effet, un stimulus peut activer l'expression de MUC4 *via* différentes signalisations. Il est décrit qu'une coordination entre plusieurs facteurs de transcription est nécessaire pour induire l'expression de cette mucine telle que mise en évidence au laboratoire pour la régulation *via* le TGF- β . La fixation du TGF- β sur son récepteur conduit à l'activation de deux voies distinctes. (1) La voie canonique « voie des SMAD » qui est fonctionnelle uniquement dans les cellules qui expriment le gène *SMAD4* non muté. Elle implique l'activation des facteurs de transcription SMAD2, SMAD3 et SMAD4 qui forment un complexe et se fixent au niveau des éléments de réponse SMAD4 situés le long du promoteur proximal et distal de MUC4. (2) La voie non canonique « SMAD indépendante » impliquant notamment les voies de signalisation de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), de la phosphoinositide-3 kinase (PI3K) et de la protéine kinase A (PKA) (Jonckheere *et al.*, 2004).

III.6.2.3. Régulation post-transcriptionnelle

En plus de la régulation directe *via* le promoteur ou l'ARNm de MUC4, d'autres processus sont mis en place par les cellules cancéreuses pancréatiques dans le but de bloquer des inhibiteurs de MUC4. Cela concerne principalement les microARNs (miARNs). En effet, par opposition à la forte expression de MUC4 dans les PDACs, certains miARNs potentiellement régulateurs de MUC4 sont à l'inverse régulés à la baisse. Il a été montré qu'une surexpression ectopique des miR-150 et miR-219-1-3p dans des cellules cancéreuses pancréatiques conduit à la répression de l'expression protéique de MUC4 suite à une interaction directe entre ces miARNs et le 3'-UTR de MUC4 (Srivastava *et al.*, 2011, Lahdaoui *et al.*, 2015).

III.6.3. Fonctions de MUC4 au cours de la cancérogenèse pancréatique

Il est maintenant bien connu que MUC4 joue un rôle important dans la cancérogenèse et l'agressivité des PDACs. Cette mucine a la capacité de moduler des signalisations complexes de régulation des propriétés prolifératives, migratoires, invasives, métastatiques et de chimiorésistance dans le cancer du pancréas (**Figure 19**). Ces effets sont partiellement dus à sa capacité d'interagir avec des partenaires membranaires ou extracellulaires *via* ses motifs fonctionnels. Ces interactions sont rendues possibles suite à des modifications métaboliques et architecturales des cellules cancéreuses épithéliales. En effet, au cours de la cancérogenèse (1) les cellules épithéliales cancéreuses sont dépolarisées ce qui conduit à une délocalisation circonférentielle de MUC4 et à l'augmentation de son accessibilité, (2) le processus de O-glycosylation est perturbé et conduit à l'apparition de glycanes spécifiques aux cancers.

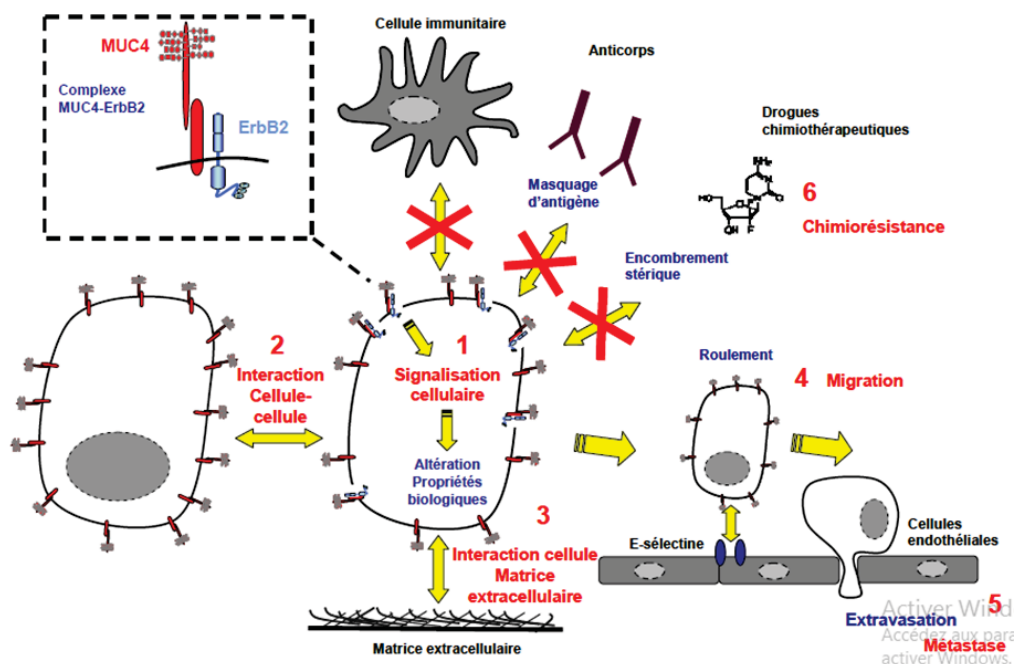


Figure 19 : Rôles de la mucine MUC4 dans le cancer.

La mucine MUC4 est impliquée dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. MUC4 interagit avec le récepteur ErbB2 et affecte ses voies de signalisation altérant ainsi les propriétés biologiques des cellules. De par son encombrement stérique, MUC4 empêche la reconnaissance des cellules cancéreuses par le système immunitaire et par les anticorps. La mucine MUC4 jouerait également un rôle dans le processus de métastase par son interaction avec l'E-sélectine qui permet le roulement et l'extravasation de la cellule cancéreuse. D'après Jonckheere and Van Seuning, 2008.

Ces dernières années, plusieurs études se sont intéressées à l'identification des partenaires de MUC4 ainsi qu'aux mécanismes activés en aval de ces interactions. Dans ce manuscrit nous allons détailler les plus pertinents.

III.6.4. Partenaires de MUC4

III.6.4.1. Récepteurs de la famille ErbB

A) Généralités

Les récepteurs ErbB sont une famille particulière de récepteurs à tyrosine kinase (RTKs), constituée de quatre membres EGFR/HER1/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3, et HER4/ErbB4 (Yarden and Sliwkowski, 2001). Ils se composent d' (1) un domaine extracellulaire Nter, contenant des sites servant à la fixation du ou des ligands et d'autres impliqués dans la dimérisation des récepteurs, (2) d'un domaine transmembranaire et enfin (3) d'un domaine cytoplasmique contenant un domaine tyrosine kinase suivi d'un domaine régulateur en Cter (Kovacs *et al.*, 2015). En réponse à une stimulation par un ligand, les récepteurs changent de conformation pour dévoiler le site de dimérisation et permettre l'homo ou l'hétérodimérisation des récepteurs. (Heldin, 1995, Marmor *et al.*, 2004, Citri and Yarden, 2006, Carraway and Cantley, 1994). Une fois activés, les récepteurs ErbB se lient à de nombreuses protéines adaptatrices et stimulent l'activation de nombreuses voies de signalisation, notamment les voies Ras -Raf -Mek -ERK, PI3K -Akt -Tor, PLC- γ 1, ainsi que les facteurs de transcription STAT et Src (Yarden and Pines, 2012), tous essentiels au maintien de l'homéostasie cellulaire. Il est aujourd'hui bien décrit qu'une activation aberrante de l'activité kinase des récepteurs ErbB contribue à la tumorigenèse et à la progression de nombreux cancers, y compris le cancer du pancréas (Arteaga and Engelman, 2014).

Parmi les récepteurs ErbB, deux possèdent des caractéristiques uniques et spécifiques qui les différencient des autres TRKs. D'un côté, le récepteur ErbB2 qui même en absence de ligand, présente une conformation ouverte éligible à la dimérisation et à l'activation des signalisations cellulaires en aval. D'un autre côté, le récepteur ErbB3 possède une activité kinase très faible. Toutefois, pour l'un comme pour l'autre, l'hétérodimérisation avec l'un de leurs corécepteurs ErbB entraîne une

activation puissante de la signalisation en aval impliquée dans la tumorigenèse (Avraham and Yarden, 2011) (**Figure 20**).

Il a été démontré que l'amplification et/ou la surexpression de ErbB2 sont impliquées dans la progression et l'évolution de divers cancers, dont le cancer du pancréas (Chaturvedi *et al.*, 2008). De même, ErbB3 est également surexprimé et a été associé à un mauvais pronostic du cancer du pancréas (Hirakawa *et al.*, 2011, Thomas *et al.*, 2014). De façon intéressante, plusieurs études ont montré que suite à la dépolarisation des cellules épithéliales, ces deux co-récepteurs pouvaient interagir avec MUC4 et ainsi activer des signalisations cellulaires oncogéniques.

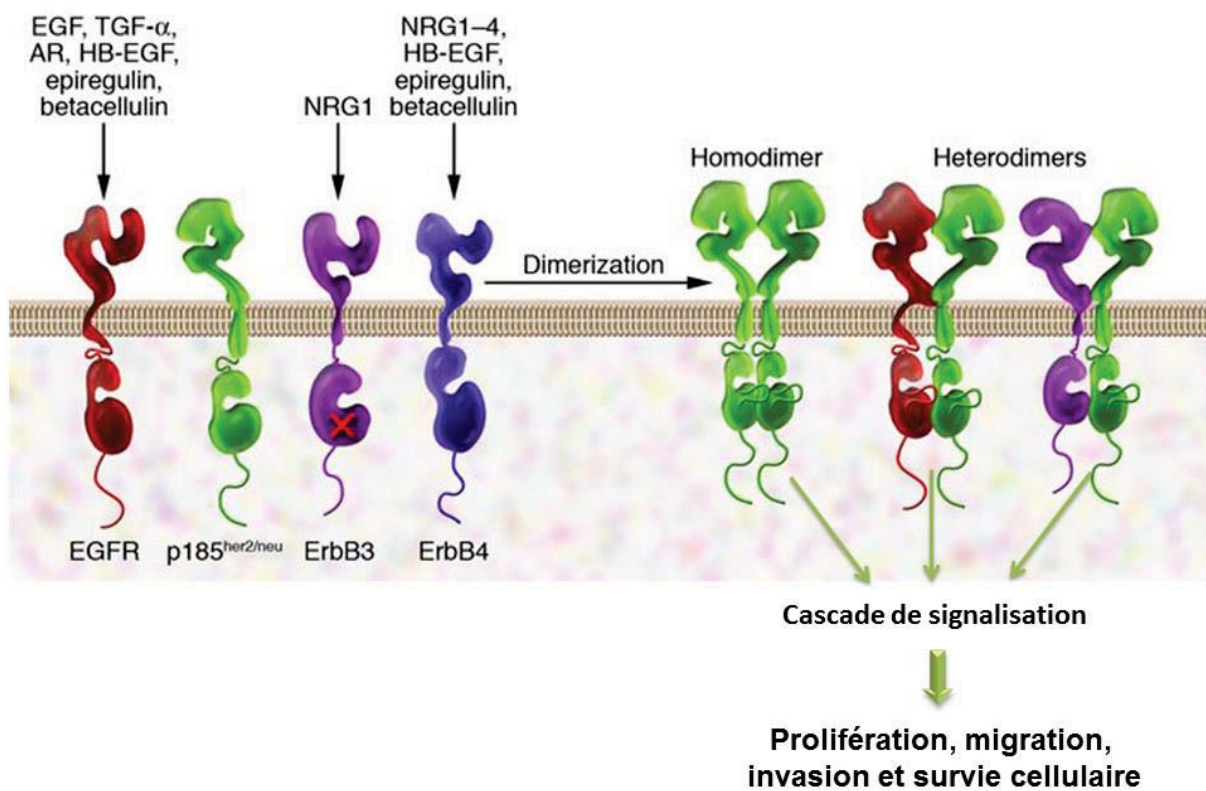


Figure 20 : Récepteurs de la famille ErbB.

Les quatre membres de la famille des récepteurs ErbB partagent une grande homologie dans le domaine extracellulaire et le domaine kinase. Cependant, ErbB3 n'est pas actif en tant que kinase. Jusqu'à présent, aucun ligand n'a été trouvé pour p185^{her2/neu} (ErbB2), qui s'est avéré être le partenaire de dimérisation préférentiel des autres récepteurs. Seuls quelques exemples de dimères de récepteurs sont présentés ici. NRG1, neureguline. D'après Zhang *et al.*, 2007.

B) Complexe MUC4-ErbB2

En 1998, l'équipe de Carraway (Price-Schiavi *et al.*, 1998) a mis en évidence pour la première fois la capacité de la mucine rMuc4 à interagir avec le récepteur ErbB2 *via* son domaine EGF1. Ensuite, plusieurs autres études ont confirmé ces observations et ont également montré que rMuc4 module l'activité de ce récepteur (Carraway *et al.*, 2001, Yokoyama *et al.*, 2007). Depuis, des expériences d'immunoprécipitation et d'immunohistochimie ont permis de démontrer l'existence de ce complexe dans différentes cellules humaines dérivées de cancer de la vésicule biliaire, de cancer des ovaires, de cancer du sein, de cancer du poumon non à petites cellules ainsi que dans le cancer du pancréas (Miyahara *et al.*, 2008, Ponnusamy *et al.*, 2008, Nagy *et al.*, 2005, Chaturvedi *et al.*, 2008). Récemment, au laboratoire nos travaux ont permis de fournir de nouvelles preuves concernant l'importance des domaines de type EGF de MUC4 dans cette interaction (Liberelle *et al.*, 2019). En effet, les auteurs montrent que la combinaison EGF3-EGF1-EGF2 de MUC4 à elle seule est suffisante pour assurer une interaction efficace avec ErbB2 (Figure 21).

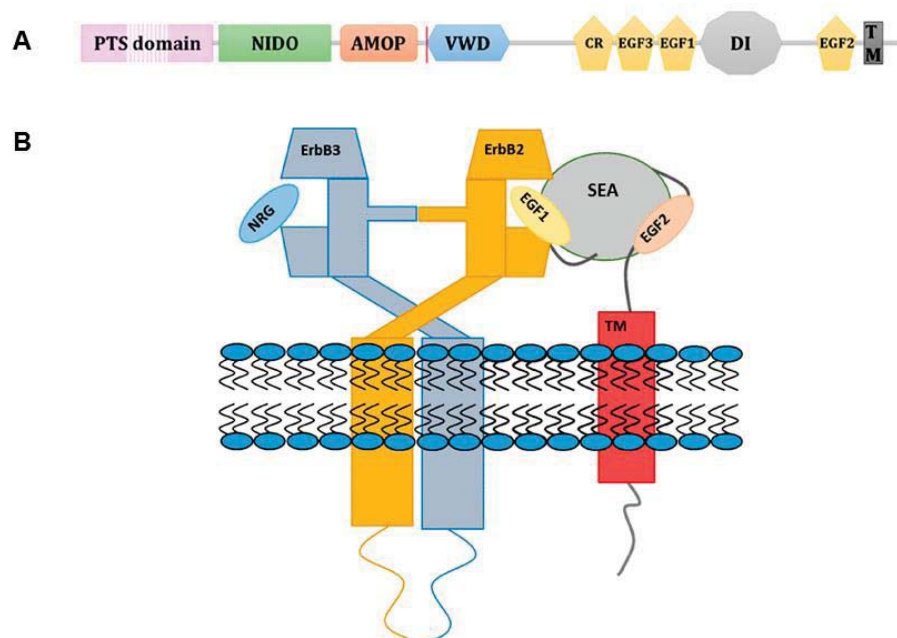


Figure 21 : Interaction MUC4-ErbB2

Représentation schématisée (A) des domaines fonctionnels de MUC4 et (B) de l'interaction MUC4-ErbB2 impliquant les domaines EGF de MUC4.

Abréviations : TR : *Tandem Repeat*, PTS : *Pro/Thr/Ser* ; EGF : *Epidermal Growth Factor*, AMOP : *Associated domain in MUC4 and Other Proteins*, NIDO : *Nidogen Domain*, wWF : *von Willebrand factor*, SEA : *sea-urchin sperm protein, enterokinase*. Adapté de Liberelle *et al.*, 2020.

Par ailleurs, la spécificité des voies de signalisation intracellulaires activées en aval de la formation du complexe MUC4-ErbB2 dépend aussi des composants du dimère des récepteurs ErbB (Avraham and Yarden, 2011). De plus, il est maintenant établi que la fonction oncogénique d'ErbB2 nécessite une interaction avec d'autres membres de la famille EGFR, notamment ErbB3. De manière intéressante, il a été démontré que MUC4 stabilisait le dimère ErbB2- ErbB3 en régulant sa localisation et en empêche son internalisation (Carraway *et al.*, 2009, Funes *et al.*, 2006, Theodoropoulos *et al.*, 2009).

Tous ces résultats mettent en évidence l'importance de MUC4 comme modulateur des récepteurs ErbB et ainsi des processus cellulaires ErbB2 dépendants.

D'autres études se sont ensuite intéressées à MUC4 comme modulateur et activateur potentiel d'autres récepteurs de la famille ErbB *via* ses domaines EGF.

C) Complexe MUC4-ErbB3

L'interaction MUC4-ErbB3 est très peu décrite dans la littérature. Il semblerait qu'elle ne soit observée que dans un modèle cellulaire exprimant faiblement ErbB2. En effet, les travaux de Lakshmanan *et al.*, 2015 montrent que l'invalidation d'ErbB2 dans les cellules cancéreuses pancréatiques conduit à une surexpression significative de ErbB3. Dans ces conditions, des expériences d'immunoprécipitation réciproques et d'immunofluorescence mettent en évidence la formation d'un complexe protéique MUC4-ErbB3 capable d'activer d'une signalisation cellulaire.

III.6.4.2. Galectines

A) Généralités

Les galectines constituent un groupe de protéines de liaison aux glucides appartenant à la famille des lectines animales solubles et non glycosylées (Li *et al.*, 2021). Chez l'homme ce groupe est composé de 11 membres différents partageant la même structure générale (Varki *et al.*, 2015). Elles possèdent toutes au moins un domaine fonctionnel de reconnaissance des sucres leur conférant la capacité de se lier aux glucides, et particulièrement aux résidus de β -galactose (Li *et al.*, 2021). Ces protéines ubiquitaires sont omniprésentes dans le cytosol, le noyau, la membrane plasmique ainsi qu'au niveau extracellulaire (Popa *et al.*, 2018). En fonction de leur localisation cellulaire, les galectines peuvent être impliquées dans différentes fonctions, notamment la signalisation apoptotique, l'endocytose, l'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire (Di Lella *et al.*, 2011). Au niveau extracellulaire, les galectines peuvent se lier aux glycanes présents sur les récepteurs membranaires glycosylés et les protéines de la matrice extracellulaire.

B) Complexe MUC4-Galectine-3

En raison de la présence de nombreuses chaînes glycaniques à sa surface, MUC4 est un partenaire de liaison potentiel de ces protéines et notamment de la galectine-3 (Gal3). De plus, tout comme MUC4, Gal3 n'est pas détectée dans le pancréas normal mais est surexprimée dans le PDAC (Xie *et al.*, 2012, Manero-Rupérez *et al.*, 2020), et corrélée avec sa progression (Jiang *et al.*, 2014). De manière intéressante, Gal3 est principalement exprimée au niveau cytoplasmique des cellules tumorales épithéliales pancréatiques (Xie *et al.*, 2012, Manero-Rupérez *et al.*, 2020). Une étude récente a révélé pour la première fois, par des expériences de co-immunoprécipitation, que MUC4 et la galectine-3 interagissaient *via* les structures glucidiques (antigènes T) présentes sur MUC4 (Senapati *et al.*, 2011).

III.6.5. MUC4 module des mécanismes cellulaires oncogéniques dans les PDACs

Plusieurs études ont entrepris la caractérisation des effets oncogéniques de MUC4 dans les PDACs ainsi que la mise en évidence des mécanismes sous-jacents impliqués dépendants ou pas de ces partenaires.

III.6.5.1. Prolifération et croissance tumorale

La faculté de MUC4 à interagir avec d'autres récepteurs et d'activer des voies de signalisation lui confère le pouvoir de moduler divers processus cellulaires dont la prolifération. Des travaux précédents du laboratoire ont permis de montrer que l'invalidation de MUC4 conduit à une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses pancréatiques. Selon le modèle proposé par cette étude, (1) MUC4 régule l'expression de son partenaire ErbB2 ainsi que de la protéine du cycle cellulaire cycline D1 *via* l'activation de la voie pro-proliférative et anti-apoptotique JNK. Une fois le récepteur ErbB2 exprimé et actif, il active à son tour la voie de la protéine kinase activée par des agents mitogènes MAPK afin de favoriser l'expression de MUC4 et d'optimiser la transition G1-S *via* l'activation transcriptionnelle de cycline D1. Ces observations ont été validées *in vivo* par des expériences de xénogreffes de cellules cancéreuses pancréatiques invalidées pour MUC4 (Jonckheere *et al.*, 2012). Enfin, d'autres études ont également confirmé ces effets pro-prolifératifs et pro-tumoraux de MUC4, et ont caractérisé d'autres voies de signalisations médiées par le complexe MUC4-ErbB2, dont notamment les voies FAK/Src et ERK (Rachagani *et al.*, 2012, Zhi *et al.*, 2014, Stoup *et al.*, 2021).

Par ailleurs, les cellules cancéreuses pancréatiques exprimant faiblement ErbB2, surexpriment ErbB3, qui en interagissant à MUC4 active la voie de signalisation PI3K/ERK/c-Myc et induit la prolifération cellulaire et la croissance tumorale (Lakshmanan *et al.*, 2015).

III.6.5.2. Migration, invasion et métastase

La faculté de MUC4 à interagir avec des éléments de la MEC et de moduler ainsi l'adhérence cellulaire confère aux cellules tumorales un mécanisme d'échappement du site tumoral primaire et facilite leur dissémination dans la circulation sanguine puis la formation de métastases. En effet, le cancer du pancréas est très invasif. Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui contribuent à cette cascade d'événements conduisant à l'invasion tumorale locale et à la formation de métastases à distance restent peu connus. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) joue un rôle essentiel dans la cascade d'invasion et métastase. De façon intéressante, MUC4 module l'expression des marqueurs membranaires E-cadhérine

et vimentine ainsi que celles des facteurs de transcription régulateurs de la TEM, TWIST, SNAIL et SLUG, dans les cellules cancéreuses pancréatiques. Les métastases hématogènes représentent un processus se développant en plusieurs étapes, incluant le détachement et la libération des cellules tumorales dans la circulation, leur adhésion à la paroi endothéliale, puis leur croissance locale ou leur invasion à travers la paroi microvasculaire et leur prolifération dans le parenchyme de l'organe cible. L'activation des voies FAK et Src par MUC4-ErbB2, entraîne la dégradation lysosomale de la E-cadhérine libérant ainsi les unités de β -caténine qui y sont fixées. Ensuite, la translocation de la β -caténine vers le noyau active l'expression de certains gènes cibles dont notamment la métalloprotéinase MMP-9 impliquée dans le mécanisme d'invasion et de formation de métastase dépendantes de MUC4 (Zhi *et al.*, 2014). De plus, il a été démontré que les interactions MUC4-galectine-3 sont susceptibles de jouer un rôle majeur dans l'adhésion globale des cellules tumorales pancréatiques aux cellules endothéliales.

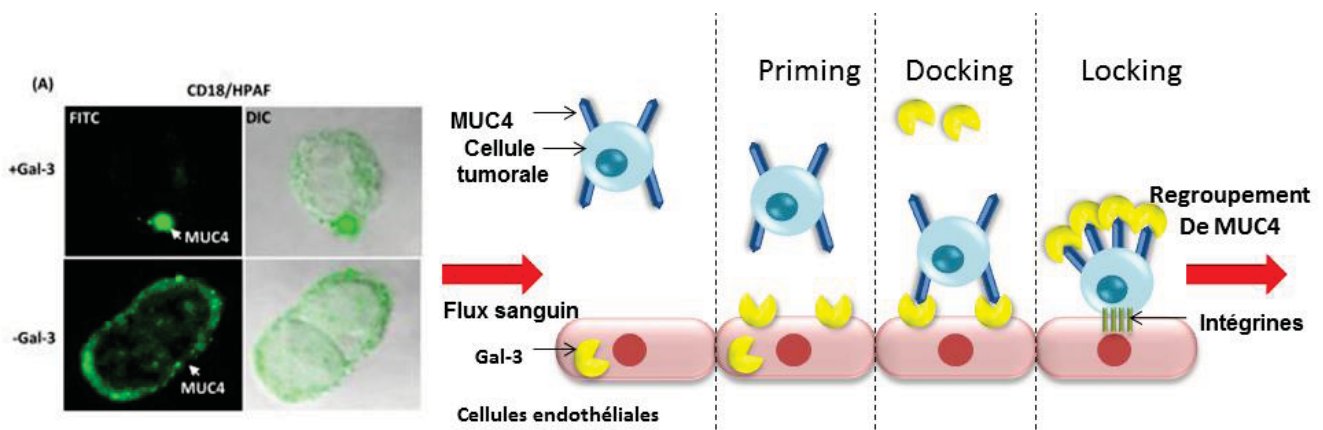


Figure 22 : Mécanismes associés à la métastase des cellules cancéreuses pancréatiques médiée par l'interaction galectine-3-MUC4.

(A) Analyse par immunofluorescence de la localisation de MUC4. En présence de la galectine-3 exogène, MUC4 est regroupé à la surface des cellules. (B) Représentation schématique du processus d'interaction galectine-3-MUC4. Les cellules tumorales circulantes exprimant MUC4 aident à amorcer les cellules endothéliales en induisant la mobilisation de la galectine-3 intracellulaire vers la surface cellulaire des cellules endothéliales. En outre, MUC4 interagit avec la galectine-3 présente à la surface des cellules endothéliales. Cette interaction temporaire et réversible facilite la fixation des cellules tumorales sur les cellules endothéliales. La liaison de la galectine-3 circulante entraîne une relocalisation de MUC4 à la surface des cellules cancéreuses, ce qui conduit à l'exposition de molécules d'adhésion comme les intégrines, qui contribuent à l'adhésion irréversible des cellules tumorales aux cellules endothéliales. Adapté de Senapati *et al.*, 2011.

Selon le schéma proposé par Senapati et collaborateurs (Senapati *et al.*, 2011), MUC4 déclenche la dissociation des cellules tumorales du site primaire puis son interaction avec les molécules de galectine-3 présentes à la surface des cellules endothéliales favorisant la fixation des cellules cancéreuses métastatiques sur l'endothélium vasculaire. Enfin les molécules de galectine-3 sériques regroupent les protéines MUC4 à la surface des cellules cancéreuses afin d'exposer d'autres molécules d'adhésion telles que les intégrines, qui sont responsables d'une forte fixation des cellules tumorales aux cellules endothéliales (**Figure 22**).

III.6.5.3. Chimiorésistance

De par sa conformation et l'encombrement stérique généré par ses longues chaînes glycaniques, la mucine MUC4 représente une barrière stérique pouvant bloquer l'accès à la surface cellulaire. La mucine MUC4 permet ainsi à la cellule d'échapper à la surveillance du système immunitaire et de masquer les épitopes antigéniques pouvant être reconnus par des anticorps thérapeutiques. Dans le cancer du sein par exemple, la surexpression de la mucine MUC4 est corrélée à la résistance au trastuzumab (Herceptin®), un anticorps dirigé contre ErbB2.

L'étude de Bafna et collaborateurs a montré que la diminution d'expression de MUC4 rend les cellules plus sensibles à la gemcitabine en activant la protéine pro-apoptotique Bad induisant ainsi l'apoptose (Bafna *et al.*, 2009). Néanmoins les mécanismes responsables ne sont pas élucidés. Récemment dans le laboratoire, il a été montré que les mécanismes de résistance des cellules cancéreuses pancréatiques à la gemcitabine exercée par MUC4 étaient médiés par la voie NF- κ B qui régule l'apoptose et l'expression du transporteur hCNT1 (Skrypek *et al.*, 2013). De plus, il a été montré pour la première fois que l'expression de MUC4 pouvait jouer un rôle prédictif de réponse à la gemcitabine dans le contexte clinique. En effet, il a été démontré qu'une faible expression de MUC4 était associée à une meilleure survie chez les patients atteints d'un cancer du pancréas résécable et traités en adjuvant par la gemcitabine (Urey *et al.*, 2017).

Dans ce travail nous nous intéressons à l'identification et à la caractérisation des mécanismes activés en aval des signalisations cellulaires régulées par MUC4 dans les cellules cancéreuses pancréatiques. Nous supposons que de la même

manière que pour la régulation de gènes codant pour des protéines, MUC4 pourrait également réguler l'expression de gènes codants des ARNs non codants et plus particulièrement des microARNs.

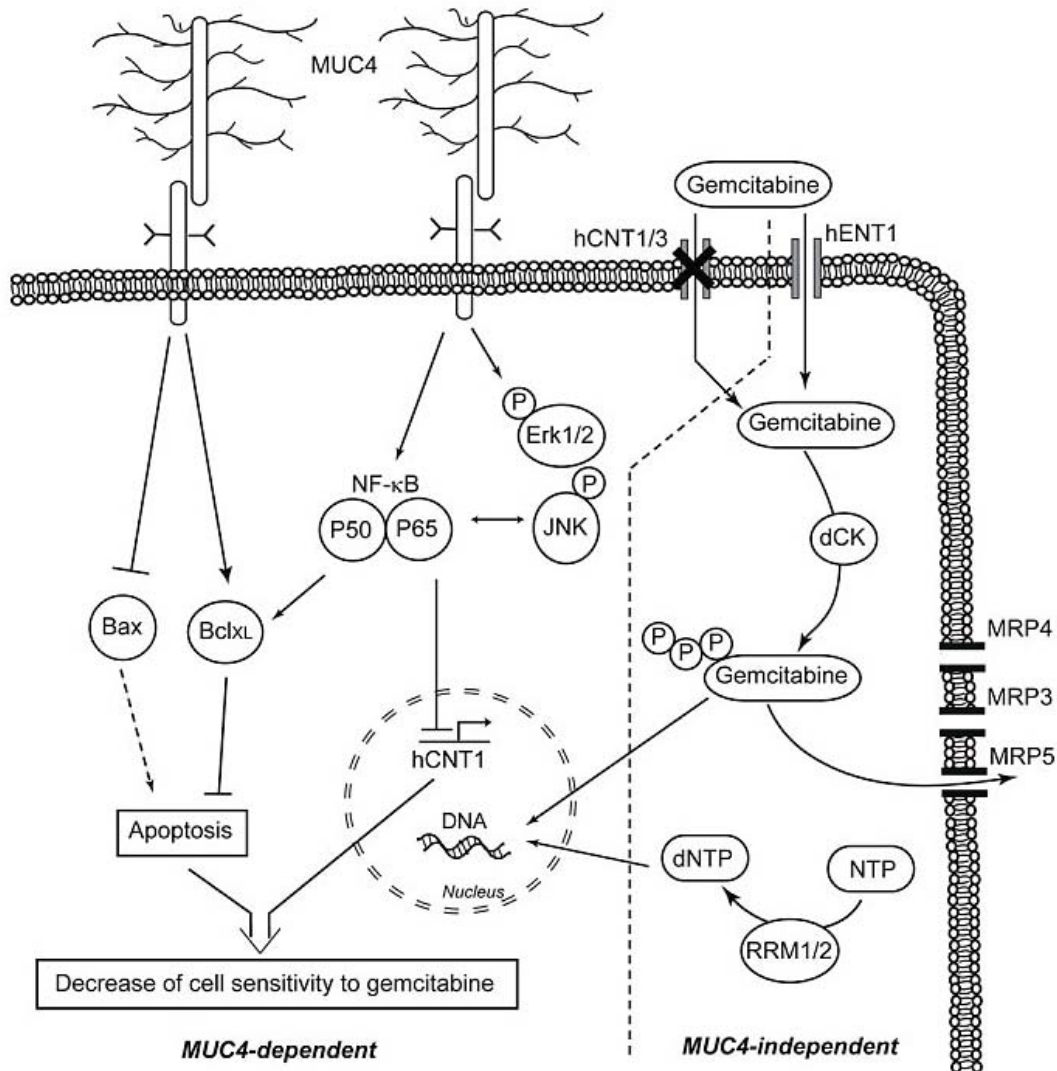


Figure 23 : Représentation schématique des mécanismes de chimiorésistance à la gemcitabine dans les cellules cancéreuses pancréatiques.

Panneau de gauche : mécanismes dépendants de MUC4 impliquant soit une diminution de l'expression du transporteur de nucléosides hCNT1 *via* la voie NF- κ B, soit une modification du rapport Bax/BclXL (régulation positive de l'expression de BclXL et régulation négative de l'expression de Bax).

Panneau de droite : mécanismes indépendants de MUC4. Le canal MRP4 augmente la sensibilité des cellules à la gemcitabine par un mécanisme inconnu alors que MRP3 n'est pas impliqué. MRP5 est connu pour diminuer la sensibilité des cellules à la gemcitabine ainsi que pour modifier la désoxycytidine kinase (dCK) et la ribonucléotide réductase (RRM1/2).

D'après Skrypek *et al.*, 2013.

IV. Les MicroARNs

Autrefois, les protéines étaient considérées comme les seules molécules effectrices et régulatrices des fonctions biologiques. D'un point de vue moléculaire, elles sont codées par des séquences nucléotidiques, dites gènes, séparées entre elles par de longues étendues d'ADN non codant, incohérentes, inutiles et inertes dites «ADN poubelle», et pourtant représentant environ 98 % du génome humain. Selon le dogme central de la biologie moléculaire proposé par Francis Crick à la fin des années 50 (Crick, 1958), les acides ribonucléiques ARNs représentaient de simples transcrits des gènes codants jouant uniquement un rôle d'intermédiaires dans la synthèse protéique (Jacob and Monod, 1961).

Loin d'être de modestes messagers, les ARNs se sont ensuite avérés comme de puissants acteurs moléculaires ayant des fonctions variées, extrêmement complexes et indispensables à l'activité cellulaire. En effet, à partir des années 90, le développement du séquençage à haut débit et l'avènement des technologies génomiques à grande échelle ont révélé qu'environ 90% du génome est transcrit et est majoritairement non codant et fonctionnel. Une minorité de ces ARNs non codants « ARNnc » est bien caractérisée moléculairement et fonctionnellement et est représentée par (1) les ARNnc à fonctions enzymatique dits ribozymes, ainsi que (2) les ARNnc structuraux ou adaptateurs tels que les ARNs ribosomaux et les ARNs de transfert. Par ailleurs, la plus grande partie du transcriptome est constituée d'ARNnc dits régulateurs. Cette découverte récente a révolutionné les fondements de la biologie moléculaire et suscite de plus en plus l'intérêt des scientifiques depuis une vingtaine d'année.

Les ARNnc régulateurs sont des éléments endogènes indispensables pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ils jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel ainsi que dans le maintien de la stabilité génomique. En fonction leur taille, ils sont répartis en deux grandes familles ; (1) les longs ARNnc « LncARNs » > 200 nucléotides et (2) les petits ARNnc « pARNnc » < 200 nucléotides. De plus, chacun de ces deux groupes se caractérise par une configuration génique propre, une structure particulière, et un mode d'action différent (Cech and Steitz, 2014).

IV.1. Les longs ARNnc

Les LncARNs représentent une famille de molécules hétérogènes dotées de structures et de fonctions extrêmement variées. Ils sont transcrits majoritairement par l'ARN polymérase II à partir de (1) séquences intergéniques localisées dans des régions totalement indépendantes des gènes codants, ou de (2) séquences intragéniques chevauchant des gènes codants de diverses façons et dans différentes orientations. De même que les ARNm, les transcrits primaires des LncARNs sont pris en charge par la machinerie d'épissage et sont coiffés en 5' et polyadénylés. Les LncARNs matures sont des structures complexes linéaires ou circulaires constituées de tiges boucles qui ont la capacité de s'apparier spécifiquement avec d'autres ARNs, avec des séquences d'ADN, et d'interagir avec des protéines. Ces complexes sont impliqués dans la régulation de l'expression génique selon plusieurs schémas mécanistiques. (1) Les LncARNs peuvent servir d'échafaudages, en recrutant des facteurs de transcription ou des acteurs de la modification de la chromatine, favorisant ou réprimant ainsi la transcription de gènes cibles. (2) Certains LncARNs peuvent agir comme des leurres, en piégeant des protéines et les empêchant temporairement d'effectuer leurs fonctions. (3) Enfin, les interactions avec d'autres ARNs leur permettent de réguler post-transcriptionnellement le niveau d'expression des ARNm en augmentant ou diminuant leur stabilité. Ils peuvent également interagir avec des petits ARNs tels que les microARNs (miARNs) et les séquestrer, afin d'empêcher leur interaction avec leurs ARNm d'intérêts et d'inhiber leurs actions. Dans ce cas de figure les LncARNs sont appelés « éponges à miARN » (Kazimierczyk *et al.*, 2020).

IV.2. Les petits ARNnc

Bien-que cette catégorie d'ARNnc soit constituée de plusieurs familles (micro-ARN, siARN, P-ARN) ayant, des processus de biogenèses différents, des territoires d'expression uniques, ainsi que des cibles spécifiques, elles partagent néanmoins le même mécanisme d'action basé sur l'ARN interférence. Autrement dit, ce sont des ARNnc pouvant s'apparier spécifiquement à des ARNm conduisant ainsi à leur dégradation ou à l'inhibition de leur traduction. Ce phénomène, a été découvert accidentellement dans les années 1990, lorsque l'équipe de Richard Jorgensen a voulu accentuer la couleur mauve des fleurs de pétunias, en y introduisant des

copies exogènes du gène de la chalcone synthase, l'enzyme responsable de la pigmentation. Paradoxalement, cette expérience a entraîné la perte de la pigmentation des pétales par un phénomène appelé co-suppression. Trois ans plus tard, d'autres chercheurs travaillant cette fois-ci sur des nématodes, ont découvert l'existence de petits ARNs endogènes de 18 à 24 nucléotides exerçant une régulation négative de l'expression de leurs ARNm cibles par ARN interférence. Ces molécules furent appelées microARNs et représentent actuellement la famille dominante et la mieux décrite des petits ARNnc.

IV.3. Les microARNs

IV.3.1. Découverte des miARNs

Les miARNs ont été découverts au début des années 1990 chez un mutant du ver *Caenorhabditis elegans*. En effet, l'équipe de Victor Ambros a mis en évidence l'existence d'un petit ARN non codant d'une vingtaine de nucléotides codé par le gène *lin-4*. Cette étude décrit une interaction par complémentarité de séquence entre l'ARN *lin-4* et le 3'-UTR de l'ARNm *lin-14* entraînant l'inhibition de sa traduction et causant ainsi un blocage du développement larvaire (Lee et al., 1993). Par-ailleurs, ce mode d'action fut considéré comme étant exceptionnel puisqu'aucune homologie de séquence avec le gène *lin-4* n'a pu être identifiée chez d'autres espèces. En l'an 2000, il a été montré que l'expression d'un autre gène *lin-41* impliqué dans le développement larvaire est aussi régulé post-transcriptionnellement par un miARN, *let-7* (Reinhart *et al.*, 2000) ayant cette fois-ci des homologues chez d'autres espèces et notamment chez l'Homme (Pasquinelli *et al.*, 2000). Cette découverte a suggéré l'existence d'autres miARNs et a permis de généraliser ce mécanisme de répression génique aux autres organismes vivants y compris chez l'homme.

Aujourd'hui, on dénombre plus de 2654 séquences de miARNs matures, identifiés, séquencés et annotés dans le génome humain (www.mirbase.org).

IV.3.2. Biogenèse des miARNs

Les miARNs sont codés par des séquences nucléotidiques réparties sur l'ensemble du génome, dans des régions intergéniques, introniques ou exoniques aussi bien de gènes codants des ARNs codants que non codants. Ces séquences peuvent être organisées en unités transcriptionnelles individuelles ou former des

clusters regroupant les miARNs de la même fonction (Bartel, 2004). Plusieurs processus de biogenèse des miARNs sont décrits dans la littérature dont une voie majoritaire dite canonique et d'autres voies moins fréquentes dites non canonique.

IV.3.2.1. Voie de biogenèse canonique

Les miARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II ou III en longs transcrits primaires (les pri-miARNs) de plusieurs kilobases possédant une coiffe m7G en 5' et une polyadénylation en 3'. Ces derniers ont une structure typique composée d'une tige d'environ 33 paires de bases, une boucle terminale reliant les 2 brins de la tige, ainsi que des séquences flanquantes simple-brin (Bartel, 2018). La maturation des pri-miARNs débute au niveau nucléaire. Sous l'action du microprocesseur, un complexe hétérotrimérique constitué d'une enzyme Drosha (RNase III) et de sa protéine partenaire, DGCR8 (Nguyen *et al.*, 2015), le pri-miARNs est clivé pour libérer des structures tiges-boucles d'environ 60 nucléotides qui constituent les précurseurs des miARNs nommés pré-miARNs (Lee *et al.*, 2003). Ces derniers sont exportés au niveau cytoplasmique *via* l'exportine-5 (Yi *et al.*, 2003) où ils sont reconnus puis clivés par une autre RNase de classe III, nommée Dicer (Hutvagner *et al.*, 2001). Un double brin mature appelé duplex miARN-3p/miARN-5p d'environ 22 nucléotides est généré (**Figure 24**).

IV.3.2.1. Voie de biogenèse non canonique

Outre la voie canonique de biogenèse décrite ci-dessus, divers mécanismes alternatifs, indépendants de Drosha et ou de Dicer, ont récemment été mis en évidence (Abdelfattah *et al.*, 2014). En effet, il existe une sous-classe de pré-miARNs introniques dite mirtron générée par la machinerie d'épissage d'ARN plutôt que par Drosha. Les mirtrons sont dérivés de certains introns ramifiés qui se replient en structures en épingle à cheveux, imitant les caractéristiques structurales des pré-miARNs et servant de précurseur de biogenèse des miARNs. Cette catégorie de pré-miARN est également transférée vers le cytoplasme et maturée de la même manière que les miARNs issus de biogenèse canonique (Westholm and Lai, 2011, Saliminejad *et al.*, 2019). Néanmoins, il est intéressant de noter que les miARNs introniques qui possèdent leurs propre unité transcriptionnelle sont indépendants de

leurs gènes hôtes et sont générés par la voie de biogenèse canonique (Bartel, 2004) (Figure 24).

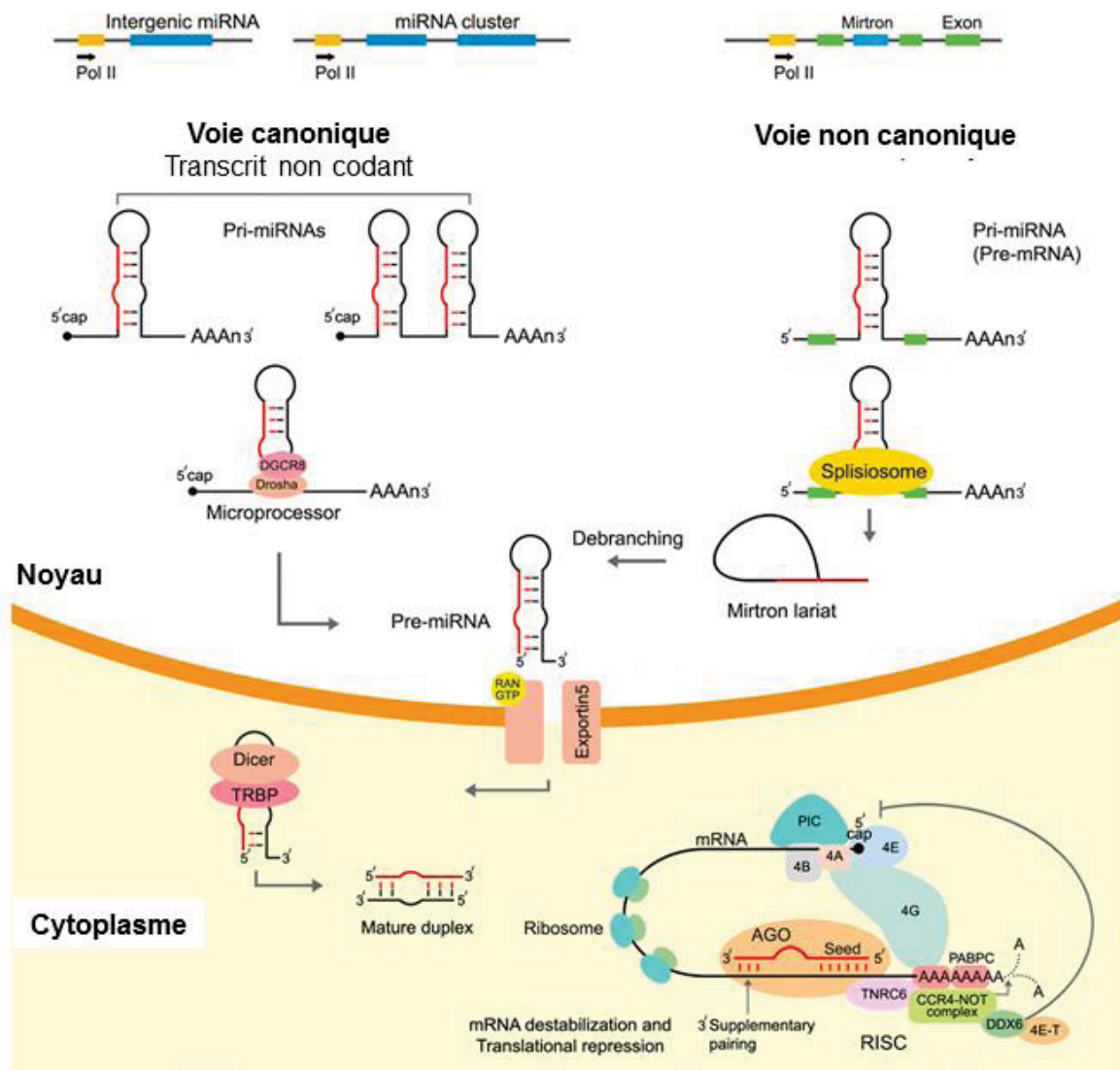


Figure 24 : Voies de biogenèse des miARNs.

A gauche est représentée la voie de biogenèse canonique. Au niveau du noyau cellulaire, les pri-miARNs sont clivés en pré-miARNs par Drosha. Les pré-miARNs sont exportés vers le cytoplasme par l'exportine-5 où ils sont clivés en petits ARNs doubles brins par Dicer. Ensuite, le complexe RISC reconnaît l'ARNm cible et régule son expression. A droite est représentée la voie de biogenèse non canonique (mirtron). Dans ce cas, le clivage normalement médié par Drosha est remplacé par le processus d'épissage. Les pri-miARNs (pré-ARNms) sont transformés en pré-miARNs par la machinerie du splicéosome. Par la suite, l'ARN produit par épissage adopte une forme semblable à celle des pré-miARNs, et est transféré dans le cytoplasme par l'exportine-5 pour poursuivre sa maturation suivant les mêmes étapes que dans la voie canonique.

Abréviations : miRNA : microARN, mRNA : ARN messager, pre-miRNA : ARN précurseur, pri-miRNA : ARN primaire, Pol II : polymérase II, RISC : *RNA-induced silencing complex*, TRBP : protéine de liaison à l'ARN TAR.

D'après Saliminejad *et al.*, 2019.

IV.3.3. Les miARNs régulateurs de l'expression génique

La régulation de l'expression génétique est un processus complexe et séquentiel. La production d'une protéine fonctionnelle passe par plusieurs étapes allant de la transcription d'un gène à la traduction de son ARNm et aux modifications post-traductionnelles de la protéine. Les miARNs sont impliqués dans la plupart de ces processus et jouent des rôles pivots dans ce système d'expression génique hautement complexe. Cette régulation miARN dépendante est médiée par un complexe appelée *miRNA-induced silencing complex* « miRISC » constitué de deux principaux acteurs. D'une part, les miARNs matures représentant les guides de reconnaissance spécifique des cibles à réguler, et d'autre part, le complexe protéique effecteur de la répression des ARNm constitué des protéines de la famille Argonaute (AGO) et de leurs partenaires (Bartel, 2009).

IV.3.3.1. Sélection du brin guide

Le duplex de miARN généré par Dicer est pris en charge par la protéine AGO2 et ses partenaires. Seul un des deux brins du duplex est gardé et sert de guide au complexe miRISC tandis que le second est dégradé. La sélection du brin guide est complexe et dépend de plusieurs paramètres dont la stabilité thermodynamique de chaque brin, les modifications post-transcriptionnelles du duplex et de la protéine Ago2 et ses partenaires (Hu et al., 2009, *Granados-López et al.*, 2017). Par ailleurs, les deux brins (3p et 5p) peuvent être exprimés et fonctionnels au sein d'une même cellule. L'abondance des deux brins 3p et 5p varie en fonction du type cellulaire et du stimulus (Meijer et al., 2014). Dans certains tissus, les deux brins peuvent être simultanément exprimés et fonctionnels, alors que dans d'autres tissus, il y a une forte préférence pour l'un des deux brins (Biasiolo et al., 2011, Zhou et al., 2012, Ro et al., 2007, Bortoluzzi et al., 2012).

IV.3.3.2. Distribution subcellulaire des miARNs

La distribution subcellulaire des miARNs est déterminante de leurs rôles dans la régulation des fonctions cellulaires. Il a été démontré que le miRISC était retrouvé principalement au niveau cytoplasmique et plus particulièrement dans des foci cytoplasmiques appelé *Processing body* (P-body) composés de nombreuses enzymes impliquées dans le catabolisme et le stockage des ARNm non traduits

(Gibbins *et al.*, 2009). Outre le P-body, les miARNs ont été observés dans (1) plusieurs organites cytoplasmiques, tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique, le Golgi, le lysosome (Pu *et al.*, 2019, Song *et al.*, 2019) (2) dans des vésicules extracellulaires et particulièrement les exosomes (Zhang *et al.*, 2015) et enfin (3) dans le noyau (Tang *et al.*, 2012). De plus, des recherches plus poussées ont indiqué que les composants du miRISC, notamment les protéines AGO2, Dicer1, et d'autres partenaires, se trouvaient tous dans le noyau des mammifères et pouvaient former des miRISC fonctionnels (Gagnon *et al.*, 2014).

IV.3.3.3. Les miARNs régulateurs transcriptionnels

Depuis peu, la caractérisation des miARNs nucléaires a permis de mettre en évidence leur implication dans la régulation transcriptionnelle des gènes. De nombreuses études ont démontré qu'une fixation de miARN au niveau de régions promotrices par complémentarité de séquence partielle ou complète avec des ARNs associés aux promoteurs ou des sites de fixation putatifs leurs permettait (1) d'induire une répression transcriptionnelle de gènes *via* la diminution de l'activité de l'ARN Pol-II, le recrutement de corépresseur ou la stabilisation d'un complexe répresseur préexistant et l'induction de modifications épigénétiques répressives (Catalanotto *et al.*, 2016, Stavast and Erkeland, 2019, Pu *et al.*, 2017) et (2) d'induire l'activation transcriptionnelle de gènes *via* la fixation aux séquences amplificatrices et le recrutement de complexes protéiques activateurs de transcription (Huang *et al.*, 2012, Pu *et al.*, 2019).

IV.3.3.4. Les miARNs régulateurs post-transcriptionnels

Les miARNs interviennent majoritairement dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes par le biais de plusieurs mécanismes non mutuellement exclusifs qui ciblent la synthèse des protéines à différents niveaux. Chaque miARN possède une séquence "seed" positionnée à l'extrémité 5' entre les nucléotides 2-8. Cette séquence *seed* permet au miARN de se lier spécifiquement à des éléments de réponse aux miARNs (MRE) présent souvent au niveau des 3'-UTR des ARNm cibles (Bartel, 2009, Pasquinelli, 2012) mais également dans les régions 5'-UTR et les régions codantes des transcrits (Ørom *et al.*, 2008, Forman *et al.*, 2008, Bajan and Hutvagner, 2014). De nombreuses études démontrent que cette interaction

conduit à une inhibition de l'expression des gènes cibles (1) en bloquant l'initiation et ou l'élongation de leur traduction et (2) en favorisant la désadénylation des ARNm induisant leur dégradation et/ou leur séquestration au niveau des P-body (Meister *et al.*, 2004, Fabian *et al.*, 2010). Il est intéressant de noter que certains miARNs ciblant aussi bien des 3'-UTR que des 5'-UTR d'ARNm peuvent également être à l'origine d'une régulation positive de l'expression génique, notamment *via* la stabilisation des ARNm cibles ou l'activation de leur traduction (Ørom *et al.*, 2008, Vasudevan, 2012). (Figure 25).

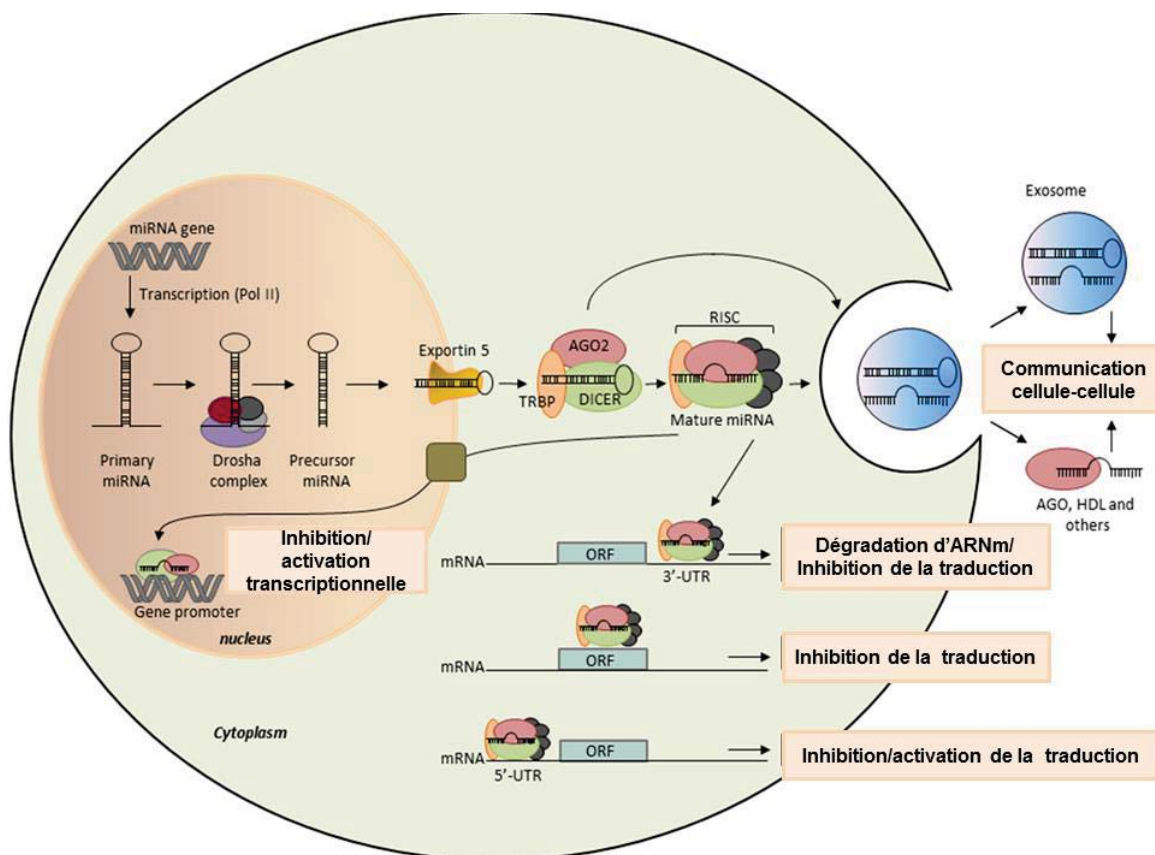


Figure 25 : Les miARNs régulateurs de l'expression génique

Après maturation, un brin du miARN mature est sélectivement chargé dans le complexe miRISC. Dans le cytoplasme, les miARNs matures se lient essentiellement au 3'-UTR de l'ARNm cible et répriment son expression à la fois par répression de la traduction et par la dégradation de l'ARNm. Il a été démontré que certains miARNs se lient au cadre de lecture ouvert (ORF) et au 5'-UTR de l'ARNm cible, et activent ou répriment son efficacité de traduction. Dans le noyau, il a été démontré que les miARNs se lient au promoteur du gène cible pour réguler son expression. Les miARNs sont également libérés dans l'espace extracellulaire et sont probablement impliqués dans la communication intercellulaire lorsqu'ils sont transférés vers des cellules cibles. Les miARNs extracellulaires sont encapsulés dans des microvésicules, comme les exosomes, ou liés à des protéines liant les ARN, comme l'AGO2, ou à des lipoprotéines, comme le HDL. D'après Cherradi, 2016.

Outre la séquence *seed*, plusieurs études ont démontré que l'extrémité 3' ou la région centrale des miRNAs peuvent également interagir avec les différentes régions de l'ARNm cible (3'-UTR, 5'-UTR, et région codante) ou la région promotrice du gène cible (Pu *et al.*, 2017, Pu *et al.*, 2019).

IV.3.4. Rôles physiopathologiques des miARNs

Le rôle des miARNs dans la cellule varie en fonction, du contexte cellulaire et tissulaire, des stimuli environnementaux, de l'expression spatiotemporelle du miARN et des ARNm cibles. En effet, Il est décrit qu'un miARN peut réguler une centaine de gènes, et à l'inverse un seul gène peut être régulé par plusieurs miARNs différents. Chez les mammifères, les prédictions bioinformatiques indiquent que les miARNs peuvent réguler jusqu'à 30 % de tous les gènes codants pour des protéines (Lewis *et al.*, 2005). Leur faculté de régulation complexe de l'expression des gènes fait des miARNs des facteurs cellulaires importants, et leur confère la capacité de moduler des processus biologiques allant du développement embryonnaire à l'initiation et progression de pathologies dont le cancer.

IV.3.5. miARNs et cancers

Au cours de la cancérogenèse, l'expression des miARNs est dérégulée et leurs fonctions sont détournées au profit des cellules tumorales. Plusieurs mécanismes de régulation d'expression des miARNs ont été décrits, notamment les délétions ou amplifications des loci des miARNs, la mutation des gènes des miARNs, la régulation épigénétique, transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Lee and Dutta, 2009) (**Figure 26**).

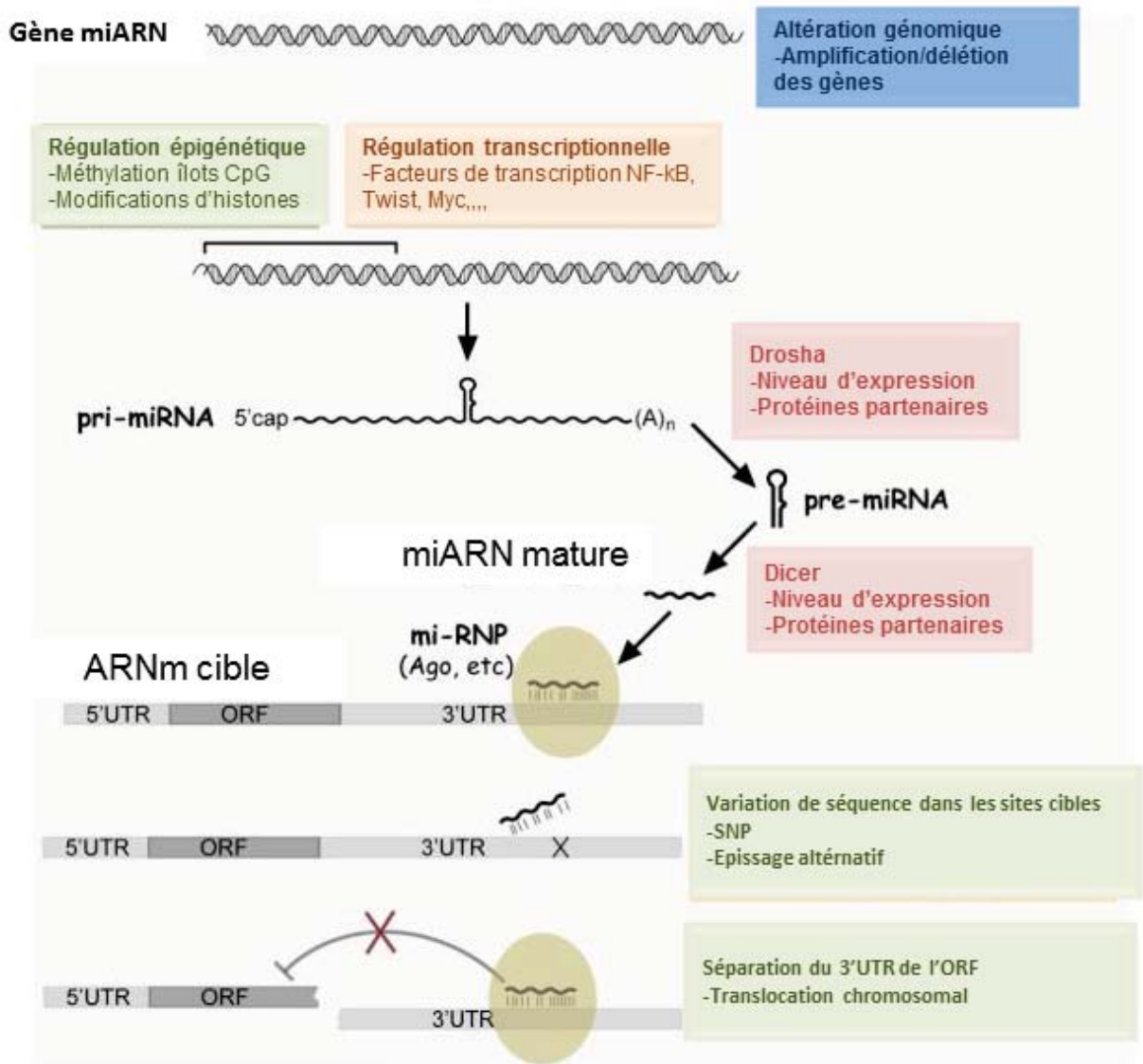


Figure 26 : Mécanismes de régulation de l'expression des miARNs dans les cancers.
 Abréviations : miRNP, *ribonucleoprotein complex containing miRNA*, ORF, *open reading frame*, SNP : *single nucleotide polymorphism*, UTR, *untranslated region*.
 D'après Lee and Dutta, 2009.

Les miARNs ont une grande stabilité et peuvent facilement être isolés à partir de fluides corporels (sérum, plasma, urine ou salive), d'échantillons de tissus frais ou inclus en paraffine puis mesurés par qPCR ou par des puces à ARN (Kakimoto *et al.*, 2015, Zhao *et al.*, 2021). Grâce à ces caractéristiques, de nombreuses études ont mis en évidence des profils d'expression de miARNs variables et différents entre les cellules cancéreuses et les cellules normales, ainsi qu'entre les fluides corporels de patients cancéreux et d'individus sains. Des signatures d'expression uniques de miARNs ont ensuite été identifiées et associées au diagnostic, au pronostic ou à la réponse aux chimiothérapies dans divers cancers.

Les miARNs jouent un rôle important dans les processus de cancérogenèse et cela dès les stades précoces et jusqu'à la progression métastatique. Ils sont également impliqués dans les mécanismes de résistance aux thérapies anti-cancéreuses. En fonction de leur gènes cibles et leur taux d'expression, les miARNs sont classés comme oncogènes (oncomiRs), ou miARNs suppresseurs de tumeurs. Les oncomiRs sont régulés à la hausse dans le cancer et inhibent l'expression de leurs gènes cibles suppresseurs de tumeurs. En revanche, les miARNs suppresseurs de tumeurs sont régulés à la baisse dans les tumeurs malignes et, par conséquent, leurs cibles oncogéniques sont surexprimées. Certains miARNs, par exemple miR-7, peuvent être simultanément des miARNs oncogènes ou suppresseurs de tumeurs (Svoronos *et al.*, 2016). Dans les PDACs plusieurs miARNs sont dérégulés et décrits comme régulateurs des processus biologiques tumoraux tels que la prolifération l'apoptose et l'invasion cellulaire (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Exemples de miARNs dérégulés avec leurs cibles potentielles et leurs fonctions biologiques suggérées. Adapté de Tesfaye *et al.*, 2019.

miARNs	Expression	Cibles potentielles	Fonctions biologiques
<i>miR-34a</i>	Sous-exprimé	Bcl-2/Notch1/Notch2	Inhibe la prolifération et l'invasion et induit l'apoptose.
<i>miR-221/222</i>	Surexprimé	MMP-2 et MMP-9	Favorise l'invasion cellulaire
<i>miR-320a</i>	Surexprimé	PDCD4	Réduit l'apoptose et favorise la TEM
<i>miR-365</i>	Surexprimé	SHC1/BAX	Réduit l'apoptose
<i>miR-21</i>	Surexprimé	PI3K/AKT/PTEN, PDCD4, et Bcl-2/FasL	Réduit l'apoptose et favorise la prolifération
<i>miR-29a</i>	Surexprimé	Wnt/ β -catenin	Régule des facteurs de transcriptions
<i>miR-210</i>	Surexprimé	Cellules stellaires pancréatiques	Favorise l'invasion et la TEM
<i>miR-100</i>	Sous-exprimé	FGFR3	Inhibe la prolifération
<i>miR-146a</i>	Sous-exprimé	MAPK/Kras/EGFR/IRAK/MTA-2	Inhibe l'invasion
<i>miR-145/143</i>	Sous-exprimé	KRAS	Inhibe la croissance tumorale
<i>miR-33a</i>	Sous-exprimé	AKT/ β -catenin et Pim-kinase	Inhibe la prolifération
<i>Let-7</i>	Sous-exprimé	N-cadherin/ZEB1	Réverse la TEM et inhibe l'invasion

Abréviations : TEM : transition épithélio-mésenchymateuse, MMP : métalloprotéinase matricielle, MTA-1, protéine 1 associée aux métastases ; PDCD4, mort cellulaire programmée 4, RRM1 : grande sous-unité de la ribonucléoside-diphosphate réductase, SHC1 : protéine SHC transformique 1.

IV.3.6. MiR-210 et PDACs

Le miR-210, est l'un des miARNs les plus fréquemment dérégulés dans les PDACs (Sohrabi *et al.*, 2021). Il est fortement exprimé dans les tissus cancéreux pancréatiques (Szabo *et al.*, 2020, Greither *et al.*, 2010), ainsi que dans le plasma des patients (Wang *et al.*, 2009, Yu *et al.*, 2017). La surexpression de miR-210 dans des échantillons issus de tissus de PDAC a été montrée comme prédicteur de mauvais pronostic (Greither *et al.*, 2010), tandis qu'un niveau plasmatique élevé de miR-210 est plutôt associé à une meilleure survie des patients (Yu *et al.*, 2017). De plus, la concentration plasmatique de miR-210 a une bonne valeur diagnostique pour le PDAC (Liu *et al.*, 2020, Wu *et al.*, 2020). Le miR-210 est également surexprimé dans des cellulaires cancéreuses pancréatiques résistantes à la gemcitabine et

semble être impliqué dans le transfert de cette chimiorésistance des cellules résistantes aux cellules sensibles (Dhayat *et al.*, 2015,.Yang *et al.*, 2020).

Le gène miR-210 est situé dans un intron d'un gène codant un long ARN non codant, nommé miR210HG, situé sur le chromosome 11p15.5 (NCBI, gène, 406992). Dans les cellules cancéreuses, le miR-210-3p est la forme majoritaire et la plus étudiée par rapport à la forme miR-210-5p. MiR-210-3p a été initialement décrit dans le cancer de l'ovaire comme acteur crucial dans l'initiation tumorale et comme régulateur clé de la réponse à l'hypoxie (Giannakakis *et al.*, 2008). Plusieurs travaux mettent en évidence que miR-210-3p est un miARN activé en hypoxie dans de multiples cancers, dont le cancer du pancréas. En effet, en réponse à une diminution du taux d'oxygène (1-2 %), le facteur de transcription HIF1- α est activé et se fixe sur le promoteur de miR-210 afin d'induire sa transcription. Une fois exprimé, miR-210-3p stabilise l'expression de HIF1- α en inhibant l'expression de protéines impliquées dans sa dégradation en normoxie (taux normal d'oxygène entre 19 et 21 %) (Zhu *et al.*, 2017). En plus de son rôle de régulateur de l'hypoxie, miR-210-3p est également exprimé dans des conditions de normoxie et module l'initiation tumorale (Huang *et al.*, 2009).

IV.3.7. Les miARNs outils thérapeutiques dans les cancers

Depuis peu, de nombreuses études ont mis en évidence un potentiel thérapeutique des miARNs dans plusieurs pathologies y compris dans les cancers. En fonction de l'expression des miARNs et de leurs rôles oncogéniques ou suppresseurs de tumeurs, deux approches thérapeutiques opposées ont été développées.

1. Une approche visant à remplacer des miARNs suppresseurs de tumeurs et à restaurer leurs fonctions, en utilisant des constructions d'oligonucléotides synthétiques dites miARNs mimiques qui imitent la fonction d'un miARN endogène (Bouchie, 2013).

2. Une approche visant à inhiber des oncomiRs et à supprimer leurs fonctions. Plusieurs stratégies d'inhibition ont été décrites. Certains inhibiteurs, sous forme d'oligonucléotides simple brin anti-sens nommés les antagomiRs, agissent en séquestrant directement les miARNs d'intérêt par complémentarité de séquences, alors que d'autres interfèrent avec l'activité régulatrice des miARNs en interagissant avec leurs cibles (To *et al.*, 2020) (**Figure 27**).

Bien que les thérapies anticancéreuses à base de miARNs soient de nouvelles modalités de traitement prometteuses, leurs premières applications cliniques ont été entravées par certains obstacles. En 2013, a été lancé l'un des premiers essais cliniques de phase I basé sur l'utilisation d'un miARN mimique, le MRX34 (Mirna Therapeutics), visant à restaurer l'expression du miARN suppresseur de tumeur miR-34, chez des patients atteints de différents types de cancers dont le cancer du pancréas. Cependant, la toxicité et les réactions immunitaires indésirables ont empêché la poursuite de son développement jusqu'à la phase II (Beg *et al.*, 2017).

Plus récemment, deux autres thérapies basées sur l'utilisation de construction inhibitrices des miARNs de type antagomiR ont également fait l'objet d'essais cliniques de phase I. Le MRG-106 (miRagen Therapeutics, Inc), cible le miR-155 pour le traitement d'un large éventail de leucémies et de lymphomes (*Clinical Trials.gov identifier* : NCT03713320, NCT03837457, NCT02580552). Le RG012 (Regulus Therapeutics, Inc.) cible le miR-21 pour traiter le syndrome d'Alport (*ClinicalTrials.gov identifier* : nct03713320).

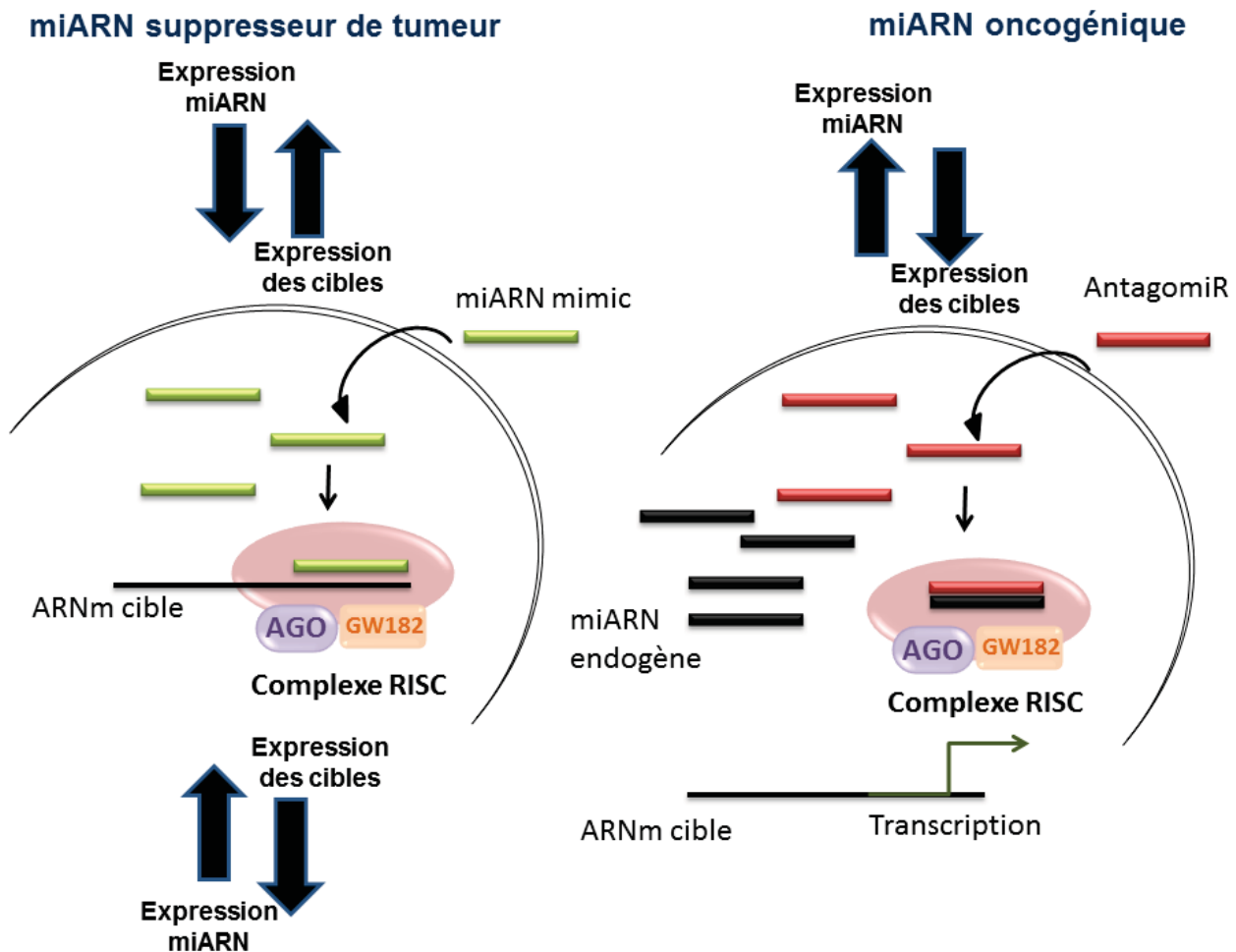
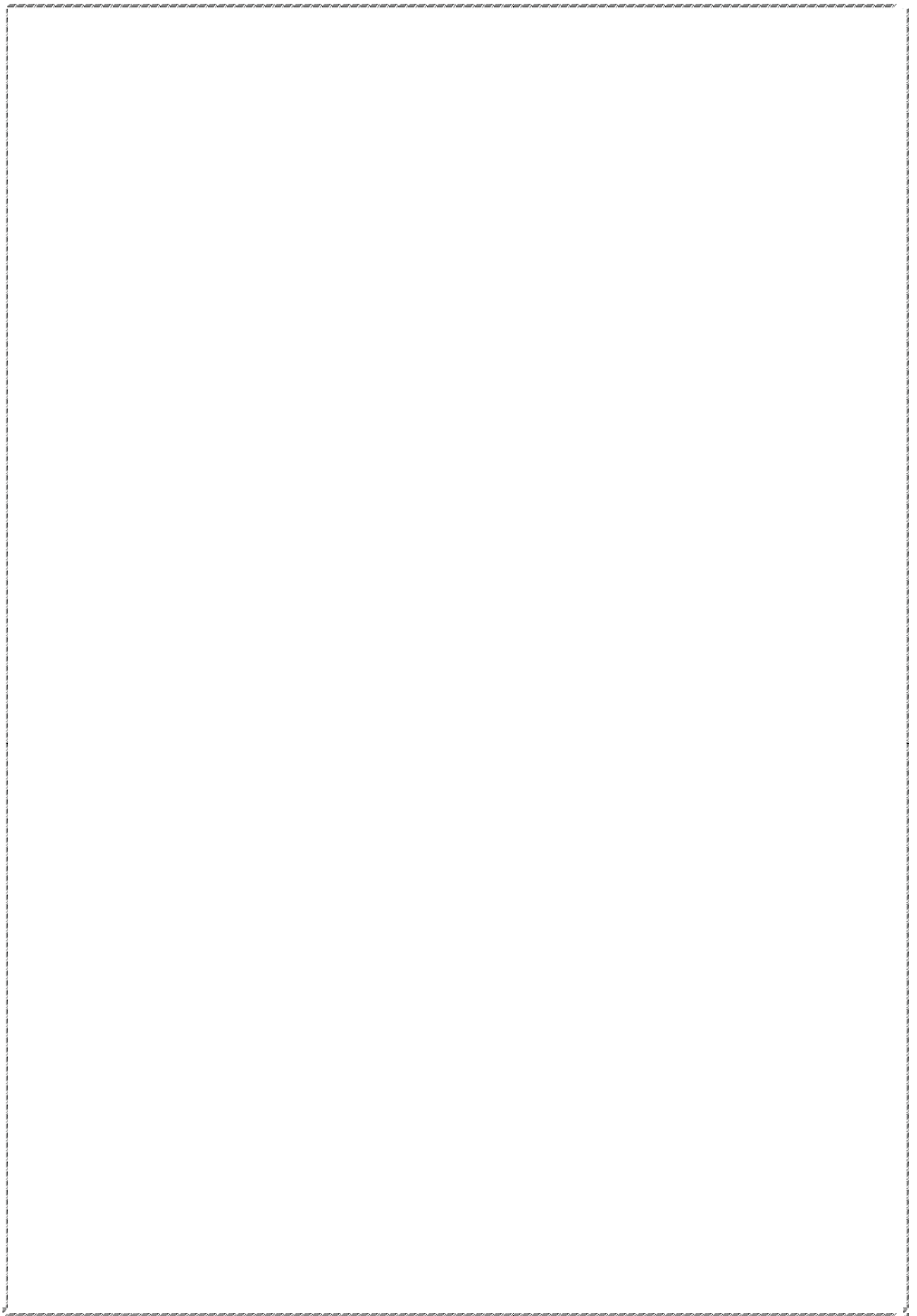


Figure 27 : Applications thérapeutiques potentielles des miARNs.

L'introduction d'un miARN mimique (mimic) permet de restaurer les fonctions d'un miARN sous exprimé dans les cellules cancéreuses et de réprimer l'expression de ses ARNm cibles, qui sont surexprimés. En revanche, l'utilisation d'inhibiteur de type antagomiR ou miARN éponge permet de réprimer les fonctions des miARNs oncogéniques et de restaurer l'expression de leurs ARNm cibles. Abréviations : miRNA : microARN, RISC : *RNA-induced silencing complex*, AGO : argonaute. Adapté de Hum *et al.*, 2021.

Objectifs de la thèse

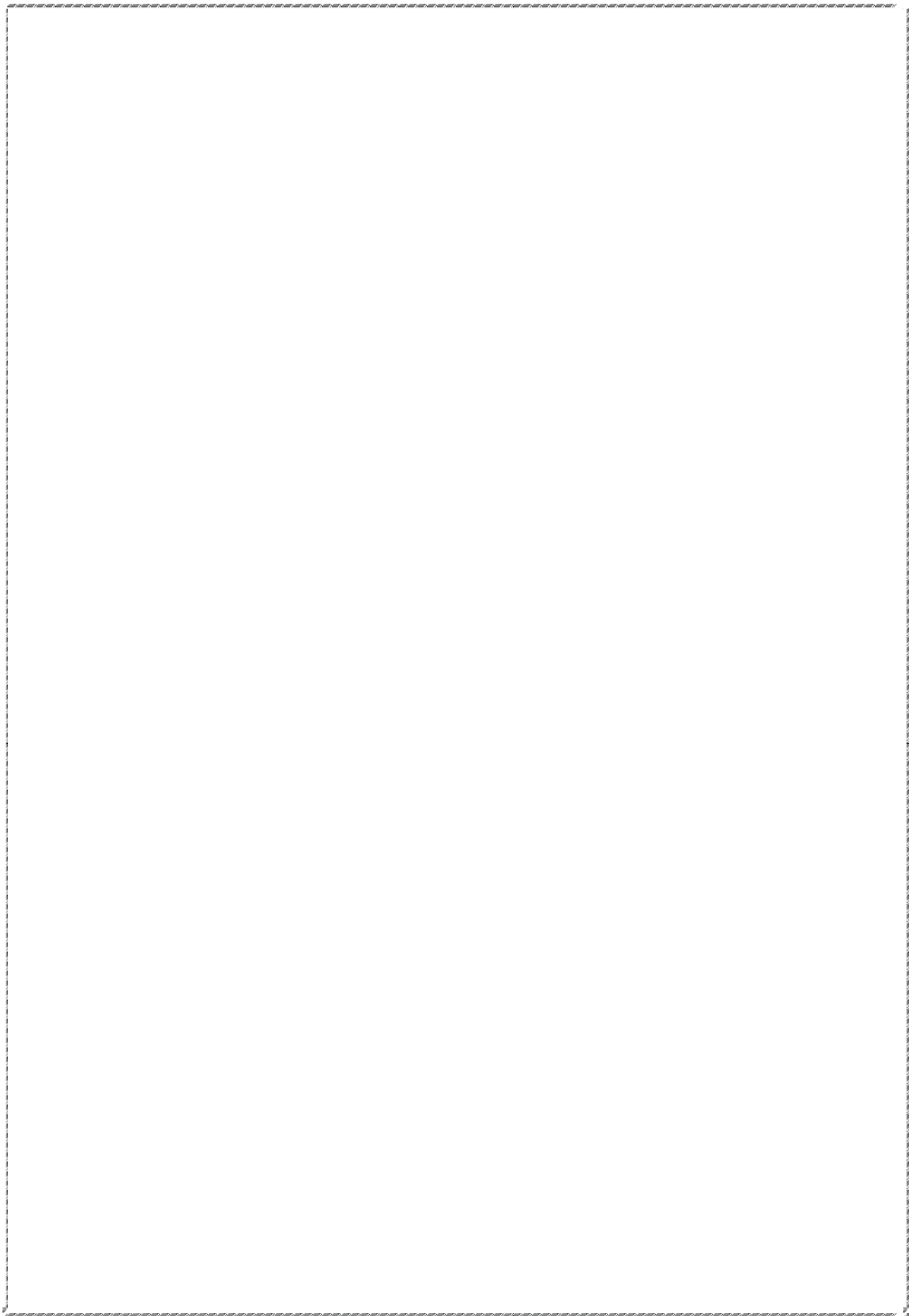


Les objectifs de la thèse

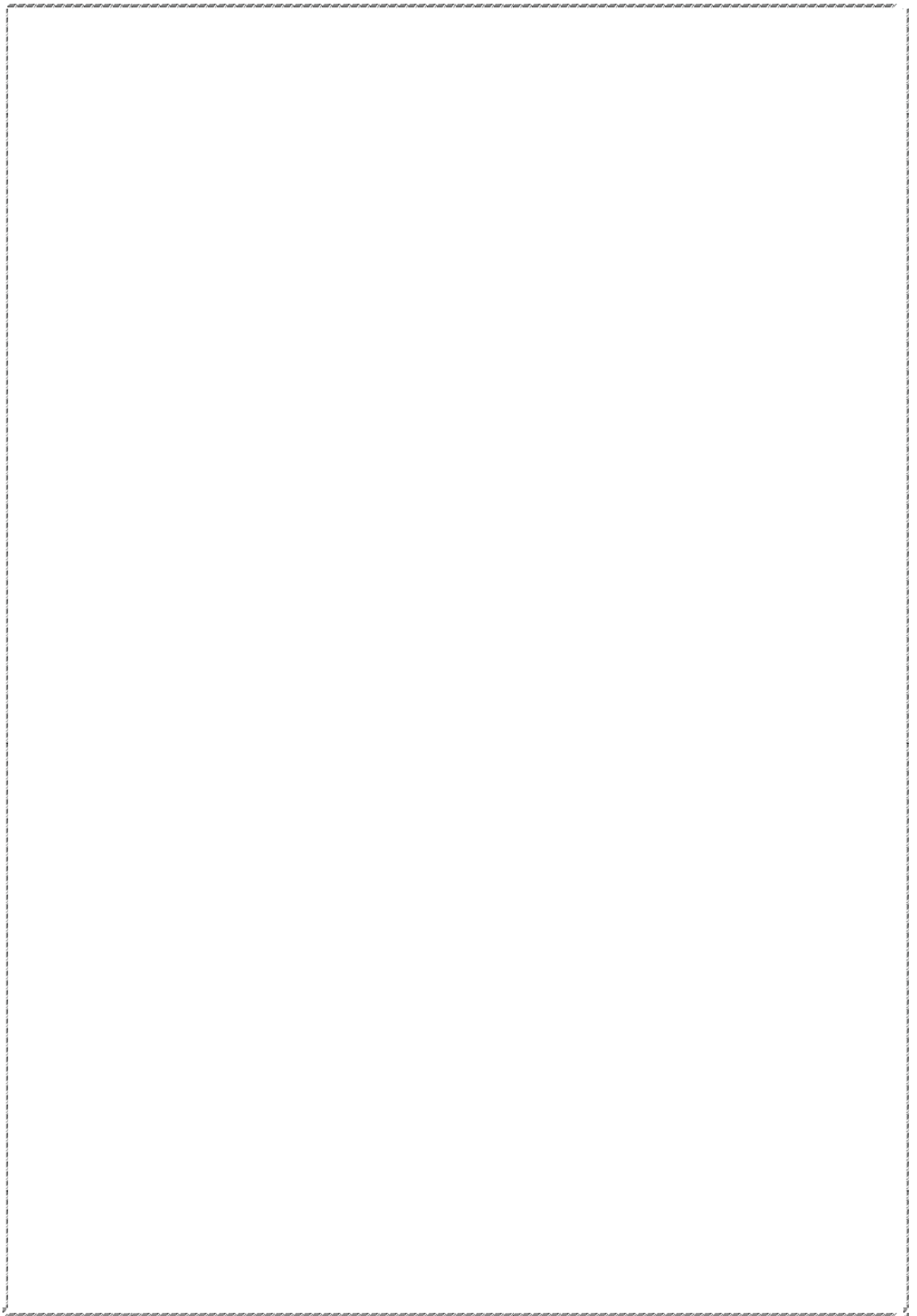
Comme décrit dans l'introduction générale, l'adénocarcinome pancréatique canalaire se caractérise par une agressivité accrue et une forte chimiorésistance. L'absence de marqueurs précoces de diagnostic et le manque de thérapies efficaces représentent des facteurs limitant la prise en charge clinique des patients. Dans l'optique de proposer une nouvelle cible thérapeutique, notre équipe de recherche étudie la mucine 4, qui est néoexprimée dès les stades précoces des lésions précancéreuses pancréatiques PanINs.

Des travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence que MUC4 joue un rôle important dans la cancérogenèse pancréatique et est impliquée dans l'acquisition de chimiorésistance. MUC4 régule diverses voies de signalisations et favorise des processus cancéreux tels que la prolifération, migration, invasion et chimiorésistance. Notre projet vise à étudier les microARNs comme une nouvelle voie régulée par MUC4 et impliquée dans l'activation des mécanismes cellulaires sus-cités.

Au cours de ma thèse, j'avais comme objectifs (1) d'identifier les miARNs potentiellement régulés par MUC4. (2) D'étudier la régulation de l'expression des miARNs sélectionnés. (3) De caractériser leurs rôles au cours de la cancérogenèse pancréatique et leurs effets sur les réponses aux traitements chimiothérapeutiques *in vitro* et *in vivo*.



Résultats



1. Sélection des microARNs d'intérêt

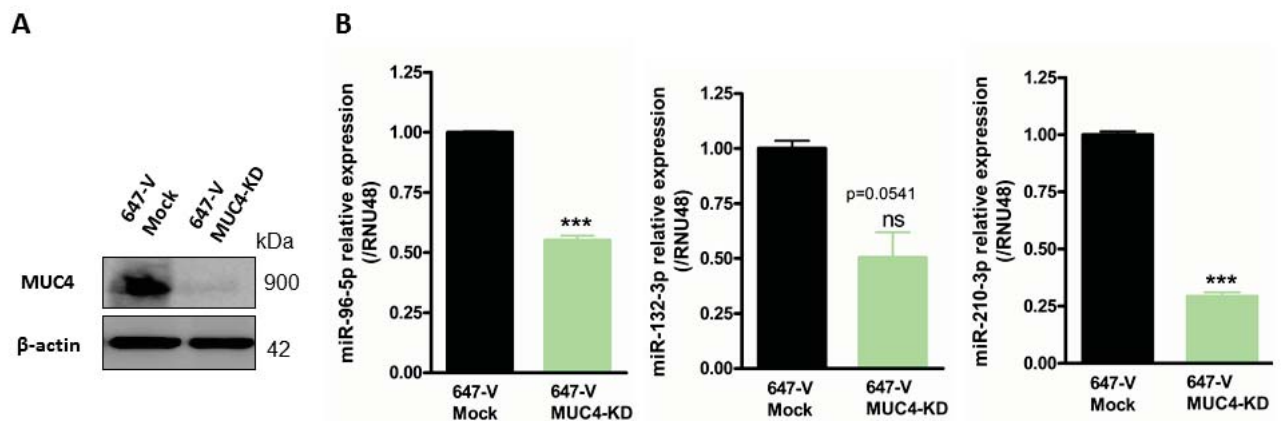


Figure 28 : Validation de la baisse d'expression des miR-96-5p, miR-132-3p, et miR-210-3p dans les cellules cancéreuses 647-V MUC4-KD.

(A) Analyse par western blot de l'expression protéique de MUC4 et de la β -actine dans les cellules 647-V Mock et MUC4-KD. (B) Analyse par RT-qPCR de l'expression relative des miR-96-5p, miR-132-3p et miR-210-3p dans les cellules cancéreuses 647-V MUC4-KD et leurs contrôles Mock. Les expressions ont été déterminées selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ miR-X} - Ct \text{ RNU48}) - Ct \text{ Mock}$). Trois expériences indépendantes ont été réalisées. *** $p < 0.001$ indique une différence statistiquement significative par rapport à la condition contrôle Mock. Au moins 3 expériences indépendantes ont été réalisées.

Sélection des microARNs d'intérêt

La sélection des miARNs potentiellement régulés par MUC4 a été réalisée en plusieurs étapes.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un modèle cellulaire de cancer de la vessie (647-V), qui exprime stablement un vecteur shARN ciblant MUC4 (MUC4-KD) ou exprimant un vecteur vide pRetroSuper (Mock), précédemment établis au laboratoire. Nous avons réalisé un *miRnome* dans le but d'évaluer la différence d'expression des miARNs suite à la répression de l'expression de MUC4 (données non publiées, GSE137130).

Après analyse du *miRnome*, nous avons identifié plusieurs miARNs dont l'expression a été altérée en réponse à la répression de l'expression de MUC4. Dans cette étude, nous nous sommes principalement focalisés sur les miARNs sous-exprimés dans les cellules MUC4-KD et qui sont présentés dans le (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Liste des miARNs dérégulés dans les cellules 647-V MUC4-KD.

miARN	Expression dans MUC4 KD (vs Mock)
hsa-miR-23b	Sous-exprimé
hsa-miR-31	Sous-exprimé
hsa-miR-210-3p	Sous-exprimé
hsa-let-7d	Sous-exprimé
hsa-miR-148a	Sous-exprimé
hsa-let-7f	Sous-exprimé
hsa-miR-7	Sous-exprimé
hsa-miR-27b	Sous-exprimé
hsa-miR-455-3p	Sous-exprimé
hsa-miR-96-5p	Sous-exprimé
hsa-miR-132-3p	Sous-exprimé
hsa-miR-195	Surexprimé
hsa-miR-185	Surexprimé
hsa-miR-342-3p	Surexprimé
hsa-miR-130b	Surexprimé

Nous avons ensuite confirmé par RT-qPCR la baisse d'expression des miR-96-5p, miR-132-3p et miR-210-3p dans les cellules 647-V MUC4-KD comparée aux cellules contrôles 647-V Mock (**Figure.28**).

Dans le but de valider ces observations dans des modèles cellulaires du cancer du pancréas, nous avons établi une lignée pancréatique stablement invalidée pour MUC4 par la stratégie ShARN (PANC89 MUC4-KD) et une lignée contrôle exprimant un vecteur pRetroSuper vide (PANC89 Mock). Nous avons validé l'efficacité d'inhibition de MUC4 par shRNA dans les cellules PANC89 MUC4-KD par western blot (**Figure 29 A**).

Ce modèle cellulaire nous a permis de mettre en évidence une diminution significative du niveau d'expression relative de miR-210-3p dans les cellules PANC89 MUC4-KD par rapport aux cellules contrôles Mock, (évaluée par RT-qPCR, $p < 0.001$). Néanmoins, nous n'avons pas pu valider la variation de l'expression des miR-96-5p et miR-132-3p (**Figure 29 B**).

Afin d'affiner notre sélection, nous avons évalué l'expression de ces miARNs dans des tissus PDAC issus de patients traités ou pas à la chimiothérapie gemcitabine. Pour cela, nous avons analysé des données brutes de *miRnomes* disponibles dans la base de données publique *Gene Expression Omnibus (GEO)* à l'aide de l'outil *GEO2R analyser*. Parmi les trois miARNs présélectionnés, seul le miR-210-3p s'est avéré significativement surexprimé dans les tissus de patients issus de tumeurs primaires de PDACs (augmentation de $4,2 \pm 4,9$ fois, $p = 0,0320$) comparé aux tissus sains adjacents non tumoraux (normaux) (*miRnome GSE41369*, Adam E. Frampton *et al.*, 2014). De plus, nous avons constaté une tendance à la surexpression de miR-210-3p dans des tissus de patients traités à la gemcitabine et ayant survécu moins de 12 mois post-chimiothérapies (courte survie), comparée à des patients ayant survécu plus de 30 mois post-traitement (longue survie). (*miRnome GSE38781*, Giovannetti *et al.*, 2012). En revanche, aucun changement significatif de l'expression des miR-96-5p et miR-132-3p n'a été observé dans ces jeux de données (**Figure 30**).

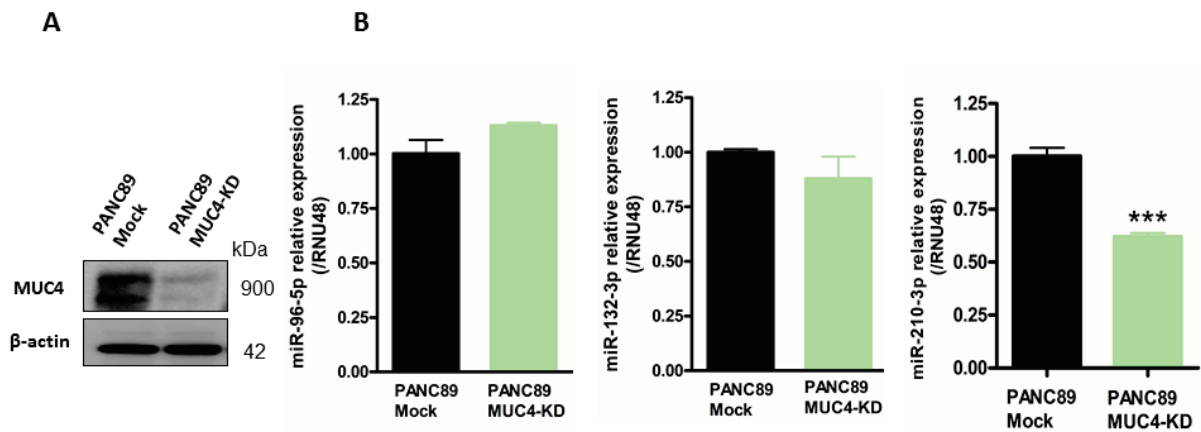


Figure 29 : Validation de la baisse d'expression de miR-210-3p dans les cellules cancéreuses pancréatiques PANC89 MUC4-KD.

(A) Analyse par western blot de l'expression protéique de MUC4 et de la β -actine dans les cellules cancéreuses pancréatiques PANC89 Mock et MUC4-KD. (B) Analyse par RT-qPCR de l'expression relative des miR-96-5p, miR-132-3p et miR-210-3p dans les cellules PANC89 MUC4-KD et leurs contrôles Mock. Les expressions ont été déterminées selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ miR-X} - Ct \text{ RNU48}) - Ct \text{ Mock}$). Trois expériences indépendantes ont été réalisées. *** $p < 0.001$ indique une différence statistiquement significative par rapport à la condition contrôle Mock. Au moins 3 expériences indépendantes ont été réalisées.

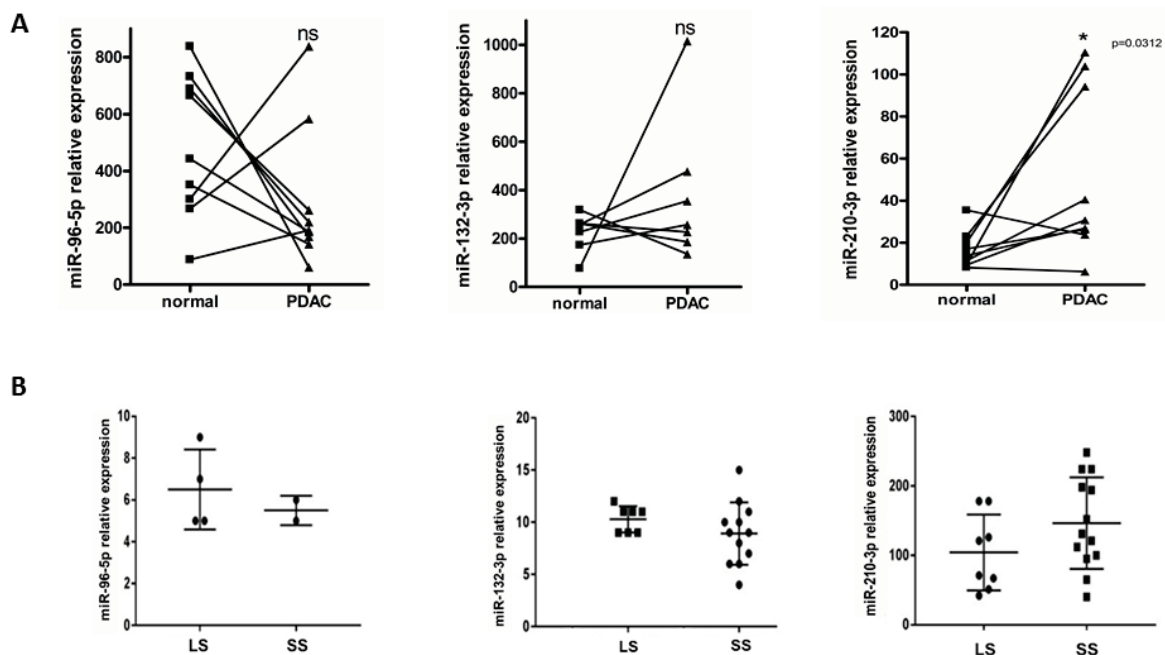


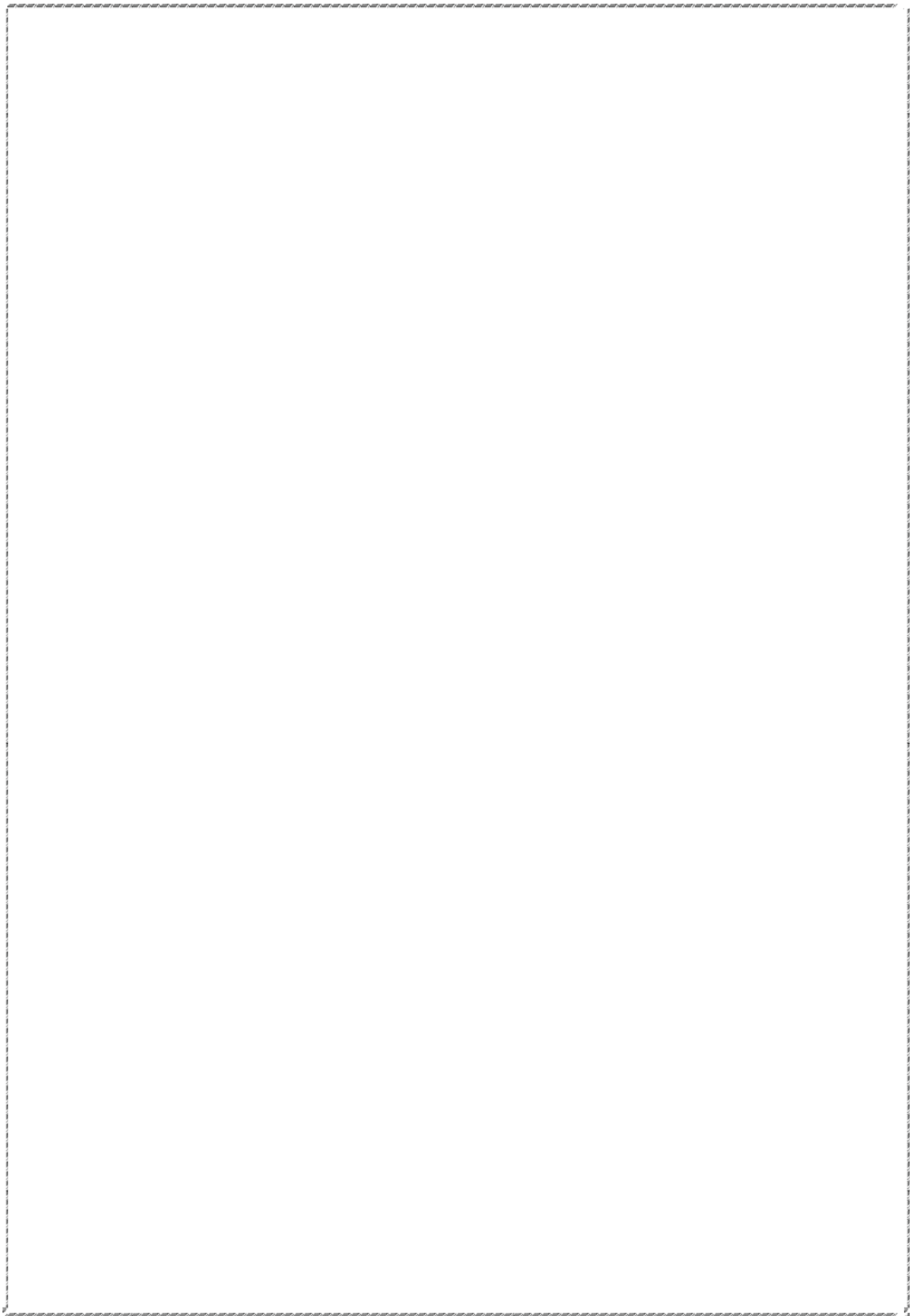
Figure 30 : Expressions des miR-96-5p, miR-132-3p et miR-210-3p dans les PDACs.

Analyse de l'expression des miR-96-5p, miR-132-3p et miR-210-3p (A) dans des tissus tumoraux pancréatiques *versus* des tissus sains adjacents (GSE41369) et (B) dans des tissus de patients atteints de PDAC, traités à la gemcitabine et ayant eu une courte survie globale (SS) *versus* ceux ayant eu une longue survie globale (LS) (GSE38781). Les analyses ont été effectuées à l'aide de l'outil bioinformatique *GEO2R analyser*. * $p < 0,05$ indique une différence statistiquement significative par rapport aux tissus normaux.

Ces résultats suggèrent que miR-210-3p pourrait être impliqué dans la cancérogenèse pancréatique, ainsi que dans la mise en place de mécanismes de chimiorésistance. De plus, les données de la littérature révèlent un potentiel diagnostique et pronostique du miR-210 dans les PDACs ainsi qu'une association de son expression à la chimiorésistance et notamment à la résistance à la gemcitabine.

Basé sur l'ensemble de ces observations, nous avons choisi d'étudier le miR-210-3p, de valider sa régulation par MUC4 et d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués en plus de caractériser ses rôles dans la cancérogenèse pancréatique et dans la chimiorésistance.

2. Caractérisation de la boucle de régulation MUC4-miR-210-3p



2.1. MiR-210-3p est surexprimé dans les PDACs

L'expression relative de miR-210-3p a été évaluée par RT-qPCR dans (1) des tissus de 9 patients appariés (tissus PDACs *versus* tissus sains adjacents) ainsi que dans (2) un panel de lignées cancéreuses pancréatiques humaines; PANC89, PANC-1 et MIA PaCa-2 et dans la lignée pancréatique normale immortalisée HPDE. Nos résultats montrent une surexpression significative de miR-210-3p dans les tissus de PDACs par rapport aux tissus sains adjacents ($4,7 \pm 3,8$ fois plus, $p=0,0112$, **Figure 31 A**). En outre, une surexpression de miR-210-3p a été observée dans les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques PANC89 et PANC-1 comparée à la lignée cellulaire normale canalaire pancréatique humaine HPDE (**Figure 31 B**). De façon intéressante, le plus haut taux d'expression de miR-210-3p ($5,93 \pm 0,73$) a été observé dans les cellules PANC89 qui expriment MUC4 par rapport aux cellules PANC-1 et MIA PaCa-2 qui ne l'expriment pas ($1,8 \pm 0,05$, et $0,43 \pm 0,02$, respectivement, **Figure 31 B-C**).

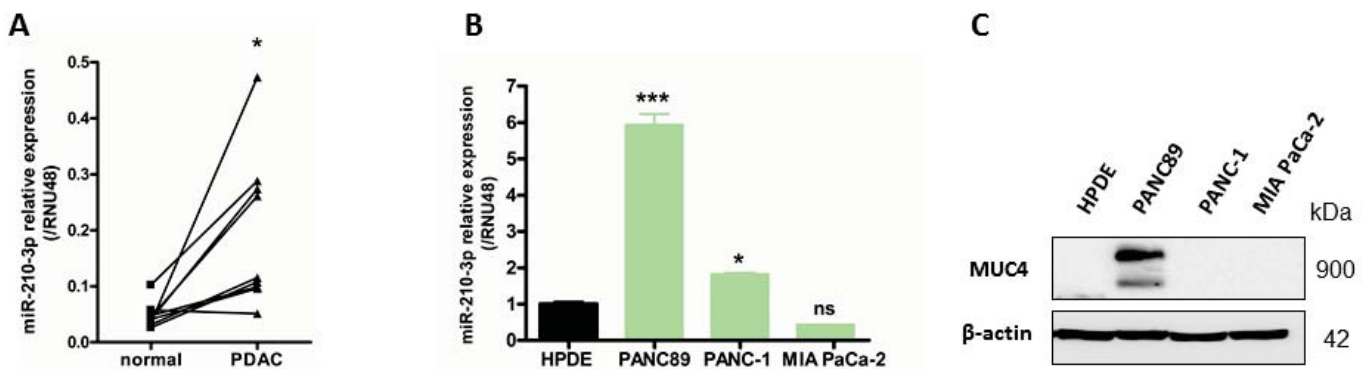


Figure 31 : MiR-210-3p est surexprimé dans les tissus de PDACs et dans les lignées cellulaires de cancer du pancréas.

(A) Analyse par RT-qPCR du niveau d'expression relative de miR-210-3p dans 9 tissus de cancers du pancréas humains et dans les tissus adjacents non tumoraux correspondants (CHU Lille). Les niveaux d'expression sont évalués par la méthode $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct \text{ miR-210} - Ct \text{ RNU48}$). (B) Analyse par RT-qPCR de l'expression relative de miR-210-3p dans les cellules cancéreuses pancréatiques PANC89, PANC-1 et MIA PaCa-2, et les cellules canalaire pancréatiques humaines normales HPDE. Les expressions ont été déterminées selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ miR-210} - Ct \text{ RNU48}) - Ct \text{ HPDE}$). Trois expériences indépendantes ont été réalisées. (C) Analyse par western blot de l'expression de MUC4 et de la β -actine dans les cellules PANC89, PANC-1, MIA PaCa-2 et HPDE. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Au moins 3 expériences indépendantes ont été réalisées.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent une surexpression de miR-210-3p dans les échantillons issus de PDACs et suggèrent une association entre l'expression de MUC4 et celle de miR-210-3p dans les cellules dérivées de PDACs.

2.2. L'expression de miR-210-3p est positivement corrélée avec l'expression de Muc4 au cours de la carcinogenèse pancréatique

Afin d'établir un lien entre MUC4 et miR-210-3p dès les stades précoces du PDAC, nous avons évalué le niveau d'expression de miR-210-3p par RT-qPCR et mesuré de scores d'immunomarquages de Muc4 par immunohistochimie (IHC) dans le modèle de souris transgénique *Pdx1-Cre;K-rasG12D* (KC) qui est le modèle préclinique de référence du cancer du pancréas. Les souris KC ont la particularité de former des PanINs qui augmentent en taille et en nombre au fil du temps (dès l'âge de 3 mois) (**Figure 32 A**). Comme prévu, nous n'avons pas observé de lésions PanINs dans le pancréas des souris témoins *Pdx1-Cre;K-rasWT* (WT). Les injections intrapéritonéales chroniques de céruléine permettent d'accentuer le remodelage de l'histologie exocrine normale et de favoriser la progression des PanINs vers des lésions cancéreuses plus avancées, comme décrit précédemment par Guerra et al., 2007.

Nous avons confirmé l'expression soutenue de Muc4 à la membrane cellulaire dans les lésions précancéreuses PanINs, à tous les âges comme précédemment observé au laboratoire (Vasseur *et al.*, 2015) et également dans le pancréas de souris KC traitées à la céruléine. Contrairement au miR-210-3p, nous n'avons pas observé d'expression basale de Muc4 dans le pancréas normal des souris WT. Les scores d'immunomarquage de Muc4 ont montré une augmentation statistiquement significative de l'expression de Muc4 chez les souris âgées de 12 mois et celles traitées à la céruléine par rapport aux souris WT (**Figure 32 B**). De manière intéressante, comme observé pour Muc4, une analyse par RT-qPCR a démontré que l'expression de miR-210-3p est également significativement augmentée chez les souris âgées de 12 mois et chez les souris traitées à la céruléine (**Figure 32 C**). Les scores d'immunomarquage de Muc4 et les niveaux d'expression relative de miR-210-3p ont été positivement corrélés avec des valeurs des coefficients de corrélation de Pearson et de Spearman supérieures à 0,7 (**Figure 32 D**).

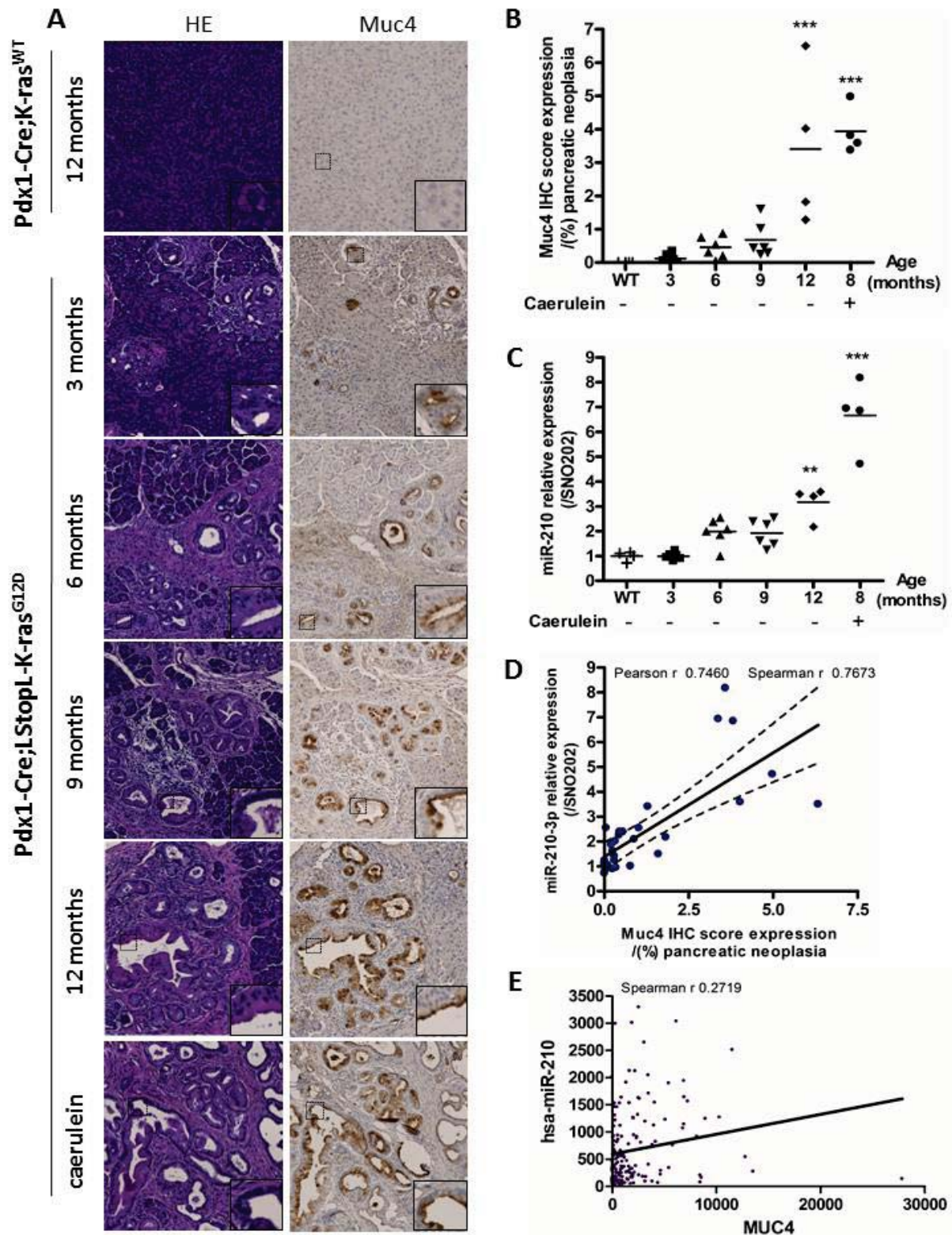


Figure 32 : L'expression de miR-210-3p est corrélée à l'expression de Muc4 dans les lésions PanINs.

(A) Des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine (panneaux de gauche) et des marquages immunohistochimiques de Muc4 (panneaux de droite) ont été réalisés dans des tissus pancréatiques de souris *Pdx1-Cre;LStopL-K-rasG12D* (KC) (âgées de 3, 6, 9, 12 mois et 8 mois traitées à la céruleïne) et de souris témoins *Pdx1-Cre;K-rasWT* (WT) (12 mois). Chaque groupe est constitué de six souris. (B) Un score d'immunomarquage de l'expression de Muc4 a été calculé

dans les lésions PanINs des souris KC traitées ou non à la céruléine. ** $p < 0,01$ indique une différence statistiquement significative par rapport aux souris WT. (C) Les niveaux d'expression relative de miR-210-3p ont été évalués par RT-qPCR dans les tissus pancréatiques de PanINs provenant de souris KC traitées ou non à la céruléine et de souris témoins WT. Les données sont exprimées selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ miR-210-3p} - Ct \text{ SNO202}) - Ct \text{ WT}$). L'expression de miR-210-3p dans les pancréas de souris témoins WT a été arbitrairement fixée à 1. *** $p < 0,001$ indique une différence statistiquement significative par rapport aux souris WT. (D) Analyse de corrélation entre l'expression de miR-210-3p et l'expression de Muc4 dans les lésions PanINs (coefficients de corrélation de Pearson et de Spearman $r = 0,7460$, $r = 0,7673$, respectivement, $p < 0,0001$). (E) Les niveaux d'expression de MUC4 et de miR-210-3p sont corrélés dans le jeu de données TCGA-PAAD. Les niveaux d'expression relative de miR-210 (RPM) et de l'ARNm de MUC4 (RSEM) ont été extraits en utilisant www.linkedomics.org. Des tests de corrélation de Spearman ont été ensuite effectués.

En outre, nous avons également montré une corrélation positive entre les niveaux d'expression relative de l'ARNm de MUC4 et de miR-210-3p issus de tissus de patients atteints de PDAC retrouvés dans la banque de données publics TCGA-PAAD (Spearman $r = 0,2719$, $p < 0,001$) (**Figure 32 E**).

Dans l'ensemble, nos résultats mettent en évidence une corrélation positive entre les niveaux d'expression de MUC4 et de miR-210-3p dans les échantillons néoplasiques et cancéreux issus respectivement de souris et de patients. Nos données suggèrent une implication potentielle de MUC4 dans la régulation de miR-210-3p.

2.3. MUC4 régule l'expression de miR-210 au niveau transcriptionnel

Des travaux antérieurs du laboratoire ont précédemment démontré l'implication de MUC4 dans la régulation transcriptionnelle des gènes *via* la modulation de voies de signalisation et en particulier de la voie NF- κ B (Skrypek *et al.*, 2013). Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que miR-210-3p pouvait également être soumis à ce mécanisme de régulation transcriptionnelle médiée par MUC4 en impliquant la voie de signalisation NF- κ B.

Nous avons dans un premier temps confirmé l'effet de MUC4 sur l'activité de la voie NF- κ B dans les cellules PANC89. Pour cela ces cellules ont été transfectées avec un vecteur d'expression de la luciférase placée sous le contrôle d'un promoteur possédant des éléments de réponses NF- κ B. En effet, nous avons montré que l'inactivation de MUC4 dans les cellules PANC89 induit une diminution significative de $57,4 \pm 9,9$ % de l'activité luciférase par rapport aux cellules contrôles PANC89 Mock ($p < 0,0001$, **Figure 33 A**). Nous avons ensuite réalisé une inhibition transitoire de NF- κ B dans les cellules PANC89 et validé, par une analyse western blot, l'efficacité du siARN ciblant NF- κ B-p50 qui induit une forte baisse de l'expression de la sous-unité p50 de NF- κ B (41 %, $p < 0,001$, **Figure 33 B**). Nous avons ensuite observé que l'inactivation de la sous-unité p50 de NF- κ B induit une diminution significative du niveau d'expression de miR-210-3p dans les cellules PANC89 exprimant le siARN NF- κ B-p50 par rapport aux cellules contrôles exprimant le siARN non ciblé (NT) (diminution de $62,7 \pm 3,0$ %, $p < 0,0001$, **Figure 33 C**).

Nous avons ensuite émis l'hypothèse que le facteur de transcription NF- κ B peut réguler à la hausse l'expression de miR-210-3p en se fixant directement au niveau de son promoteur afin d'augmenter son activité transcriptionnelle. En utilisant la base de données des promoteurs eucaryotes (*the eucaryotic promoter database*, <https://epd.epfl.ch//index.php>), nous avons analysé *in silico* le promoteur de miR-210 et identifié de nombreux sites de liaison putatifs de NF- κ B. Nous avons étudié la fixation directe de la sous-unité p50 de NF- κ B sur le promoteur de miR-210 à l'aide d'expériences d'immuno-précipitation de la chromatine. Dans les cellules PANC89 Mock, nous avons mis en évidence un enrichissement de la fixation de la sous-unité p50 du facteur de transcription NF- κ B par rapport au contrôle négatif IgG au niveau

de quatre régions promotrices de miR-210 (P1-P4) englobant sept sites de liaison de NF-κB-p50 (Figure 33 D).

De façon intéressante, nous avons montré que l'inactivation de MUC4 conduisait à la perte totale de ces interactions entre la sous-unité p50 de NF-κB et le promoteur de miR-210.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que MUC4 régule transcriptionnellement l'expression de miR-210-3p *via* l'activation de la voie NF-κB, et que le facteur de transcription NF-κB se lie directement à des sites spécifiques retrouvés au niveau du promoteur de miR-210 afin de recruter la machinerie transcriptionnelle et d'induire son expression.

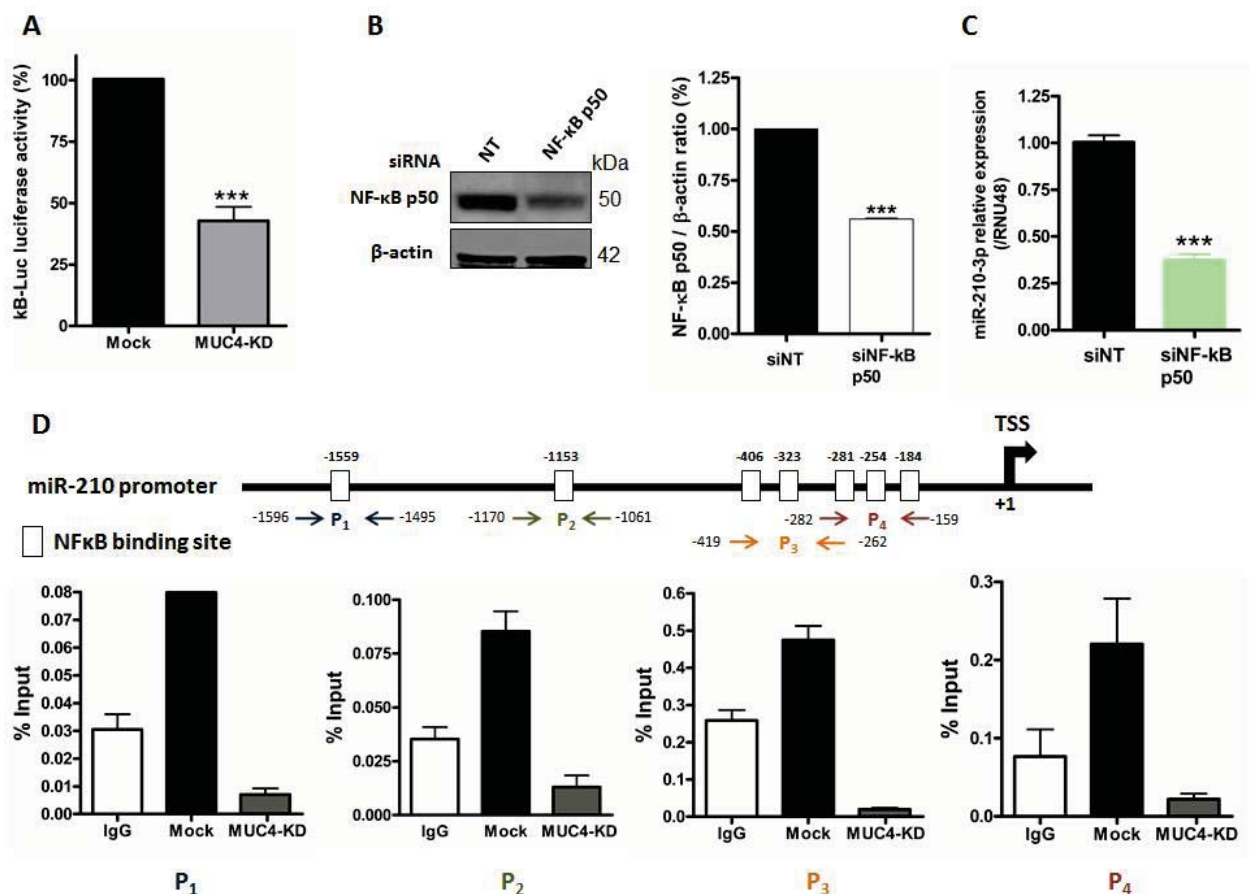


Figure 33 : MUC4 régule l'expression de miR-210 *via* la voie NF-κB.

(A) L'activité luciférase de la construction rapporteur synthétique κB-Luc a été mesurée 48 heures après transfection transitoire dans les cellules PANC89 Mock et MUC4-KD. L'activité luciférase dans les cellules Mock a été fixée à 100 %. ***p indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules Mock ($p < 0,001$). Trois expériences indépendantes ont été réalisées. (B) Analyse par western blot de l'expression de NF-κB p50 et de la β-actine dans les cellules transfectées par le siNF-κB p50 et le contrôle correspondant siNT. Le rapport NF-κB P50/β-actine est représenté sous forme d'histogrammes. (C) Analyse par RT-qPCR de l'expression relative de miR-210-3p dans les cellules PANC89 transfectées par le siRNA ciblant la sous unité p50 de NF-κB

(siNF- κ B p50). L'expression dans les cellules contrôle siNT a été arbitrairement fixée à 1. ***p indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules témoins siNT ($p < 0,001$). Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

(D) Représentation schématique du promoteur de miR-210. Les sites de liaison prédits de NF- κ B sont indiqués par des cases blanches. Quatre paires d'amorces (P) ont été utilisées pour les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et sont indiquées par des flèches colorées. (E) ChIP de la chromatine des régions promotrices de miR-210 (P1 - 1596/- 1496, P2 - 1070/- 1061, P3 - 419/- 262 et P4- 282/- 159) avec NF- κ B p50. L'enrichissement de la chromatine a été normalisé par rapport à l'input. Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

2.4. MiR-210-3p réprime l'expression de MUC4 dans les cellules cancéreuses pancréatiques.

Après avoir démontré que MUC4 régule l'expression de miR-210 et élucidé le mécanisme impliqué (**Figure 33**), nous avons souhaité déterminer l'existence d'une régulation réciproque de MUC4 par le miR-210-3p.

De manière intéressante, en utilisant la base de données *MicroCosm Targets miRNA*, (European Bioinformatic institute), nous avons identifié *in silico* trois sites de liaison putatifs de miR-210-3p sur le 3'-UTR de MUC4 aux positions 219-240 (site #1), 159-182 (site #2) et 248-268 (site #3) (**Figure 34 A**) suggérant une régulation potentielle de MUC4 par miR-210-3p.

Afin d'étudier cette régulation, nous avons généré des lignées cellulaires stables PANC89 AAVS1 exprimant miR-210-3p, anti-miR-210-3p ou leurs contrôles correspondants miR-scramble et anti-miR-control, par la stratégie de modification génique Crispr/Cas9. Nous avons validé que nos modèles cellulaires présentaient une augmentation de l'expression relative de miR-210-3p dans les cellules AAVS1-miR-210-3p par rapport aux cellules contrôles miR-scramble (3 fois plus) et une diminution de cette expression dans les cellules AAVS1-anti-miR-210-3p (diminution de 54%) par rapport aux cellules contrôles AAVS1-anti-miR-control (**Figure 34 B**).

L'analyse par western blot a montré une forte inhibition de l'expression de MUC4 dans les cellules PANC89 AAVS1-miR-210-3p (diminution de 91%, $p < 0.001$, **Figure 34 C**) par rapport aux cellules AAVS1-miR-scramble. Au contraire, l'anti-miR-210-3p a induit une augmentation significative du niveau d'expression de MUC4 (1,9 fois, $p < 0,01$) par rapport aux cellules contrôles AAVS1- anti-miR-control.

L'inhibition de l'expression de MUC4 a aussi été confirmée suite à la surexpression transitoire du miR-210-3p dans d'autres lignées cellulaires exprimant MUC4, dont les cellules cancéreuses pancréatiques BxPc3 et les cellules cancéreuses de vessie 647-V (**Figure 34 D**).

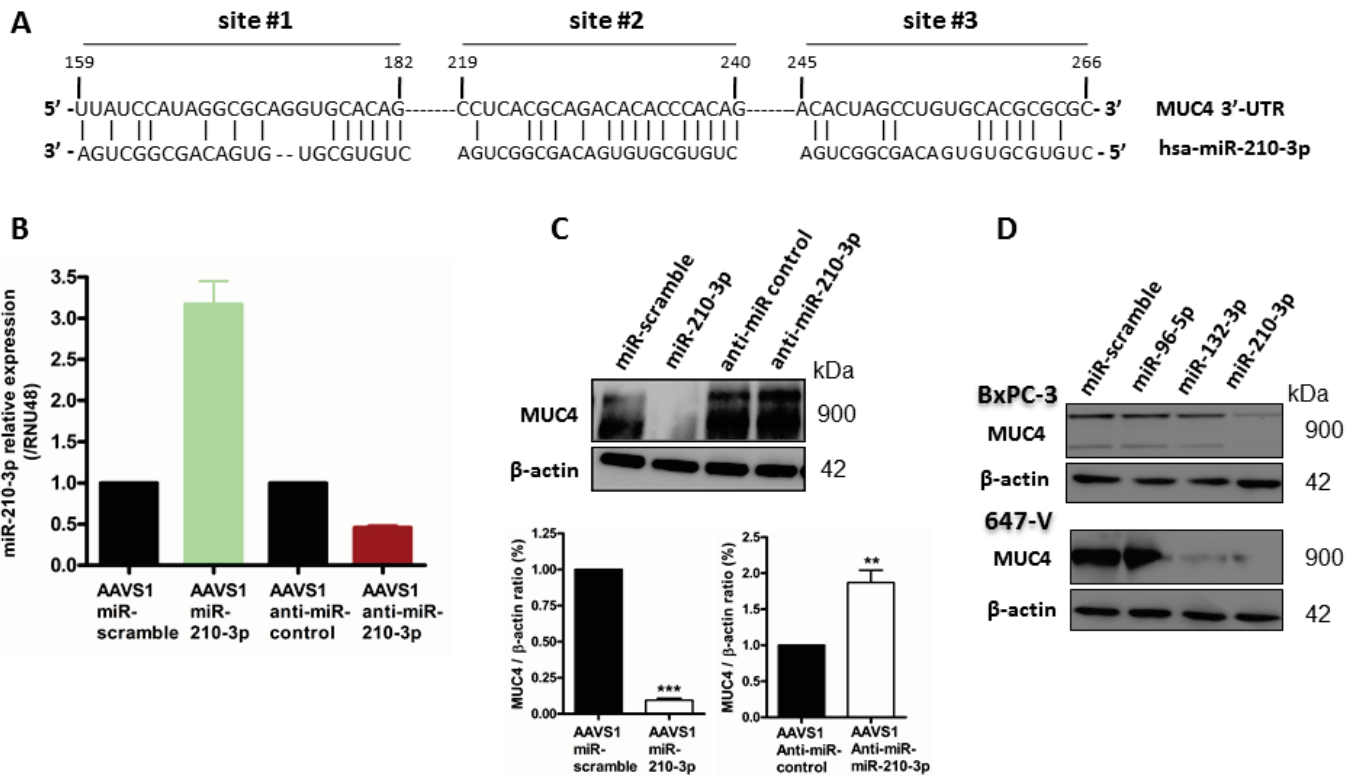


Figure 34 : MiR-210-3p réprime l'expression de MUC4 via son 3'-UTR.

(A) Identification de trois sites de liaison putatifs de miR-210-3p sur le 3'-UTR de MUC4 aux positions 219-240 (site #1), 159-182 (site #2) et 248-268 (site #3).

(B) Analyse par RT-qPCR du niveau d'expression relative de miR-210-3p dans les cellules PANC89 stablement transfectées avec le miR-210-3p ou l'anti-miR-210-3p et leurs contrôles respectifs miR-scramble et anti-miR-control. Les niveaux d'expression sont évalués par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ miR-210} - Ct \text{ RNU48}) - (Ct \text{ miR-scramble} - Ct \text{ miR-control})$).

Analyse par western blot de l'expression de MUC4 et de la β -actine dans (C) les cellules PANC89 AAVS1-miR-210-3p, PANC89 AAVS1-antimiR-210-3p et leurs contrôles PANC89 miR-scramble et PANC89 anti-miR-control et dans (D) les cellules BxPC-3 et 647-V transfectées transitoirement avec le miR-210-3p ou le miR-scramble. La densité de chaque bande a été mesurée à l'aide du logiciel imageJ et la densité des contrôles a été arbitrairement fixée à 1. Les rapports MUC4/ β -actine sont représentés sous forme d'histogrammes. Trois expériences indépendantes ont été réalisées.* $p < 0,05$ indique une variation statistiquement significative par rapport aux cellules miR-scramble ($p = 0,0215$). ** p indique $p < 0,01$; *** p indique $p < 0,001$. Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

Nous avons voulu ensuite identifier le ou les mécanismes de régulation de l'expression de MUC4 par le miR-210-3p. Il est clairement établi que la régulation post-transcriptionnelle *via* le 3'-UTR est un des mécanismes les plus communément décrits pour la plupart des miARNs. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons effectué une co-transfection du vecteur rapporteur MUC4 3'-UTR-luciférase et de miR-210-3p dans les cellules PANC-1. Nous avons fait le choix de la lignée PANC-1 afin d'éviter l'interférence de l'ARNm MUC4 endogène. Nous avons observé une réduction significative de l'activité luciférase dans les cellules PANC-1 surexprimant le miR-210-3p par rapport aux cellules PANC-1 miR-scramble (34.4 ± 9.3 % de diminution, $p=0.0215$, **Figure 35 A**).

De manière intéressante, nous avons identifié SMAD2 et SMAD3, les effecteurs de la voie TGF- β ; comme des cibles potentielles du miR-210-3p (TargetScan), suggérant que ce dernier peut également exercer une régulation transcriptionnelle de l'expression de MUC4. En effet, Il avait été montré précédemment que la voie du TGF- β SMAD dépendante est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de MUC4 dans les cellules cancéreuses qui expriment le gène *SMAD4* non muté. Nous avons mis en évidence par des analyses par western blot une diminution significative (de 45 % $p=0.0387$) de l'expression de SMAD2/3, dans les cellules PANC89 surexprimant transitoirement le miR-210-3p (**Figure 35 B-C**).

L'ensemble de ces résultats suggère que le miR-210-3p réprime l'expression de MUC4 (1) transcriptionnellement *via* l'inhibition de SMAD2 et SMAD3 et le blocage de la voie du TGF- β SMAD dépendante et (2) post-transcriptionnellement *via* le 3'-UTR de MUC4.

MiR-210-3p a également été décrit comme un régulateur clé de la réponse à l'hypoxie. Nous avons de ce fait voulu étudier la boucle MUC4-miR-210-3p dans des conditions hypoxiques. Nous avons donc analysé les niveaux d'expression relative de MUC4 et de miR-210-3p dans des cellules MUC4-KD et Mock cultivées en hypoxie avec un taux d'oxygène (O_2) fixé à 1 %, suivant une cinétique de 30 min, 1 h, 2 h et 6 h.

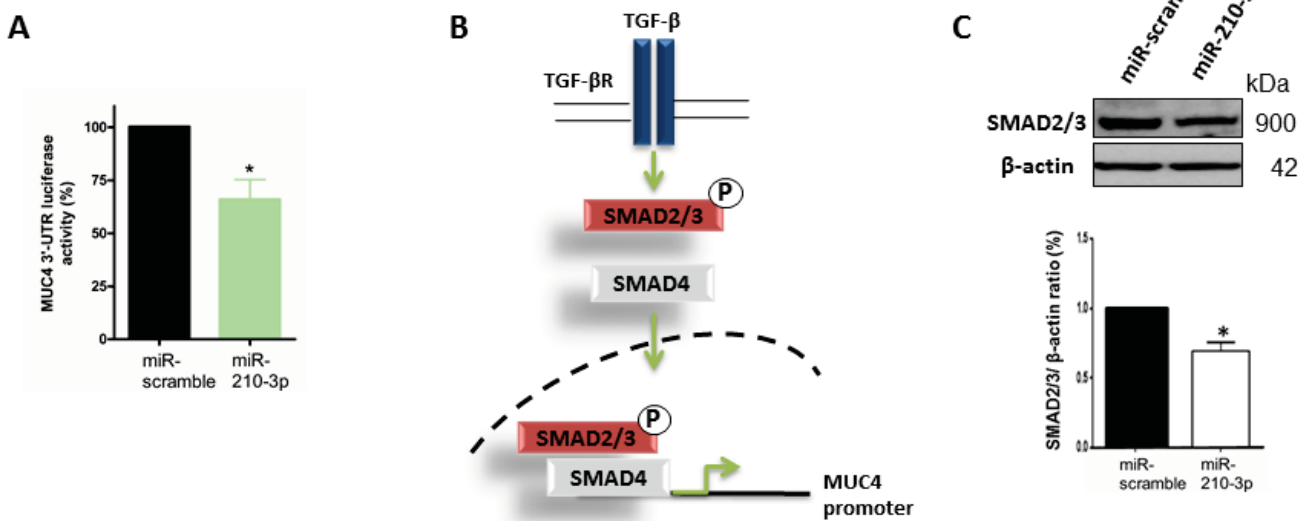


Figure 35 : Mécanismes de régulation de MUC4 par miR-210-3p.

(A) Les cellules PANC-1 ont été co-transfectées avec le vecteur rapporteur pGL3-MUC4-3'-UTR et le miR-210-3p ou le miR-scramble. L'activité luciférase a été mesurée 48 h après la transfection et fixée à 100 % dans les cellules transfectées par le miR-scramble. (B) Représentation schématique de la voie TGF- β SMAD dépendante. (C) Analyse par western blot de l'expression de MUC4 et de la β -actine dans les cellules PANC89 surexprimant miR-210-3p, ou le miR-scramble. La densité de chaque bande a été mesurée à l'aide du logiciel imageJ et la densité des contrôles a été arbitrairement fixée à 1. Les rapports MUC4/ β -actine sont représentés sous forme d'histogrammes. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. * $p < 0,05$ indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules contrôles miR-scramble. Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

Nous avons observé une augmentation séquentielle du niveau d'expression protéique du facteur de transcription de l'hypoxie HIF1- α ainsi qu'une augmentation significative de l'expression relative de miR-210-3p dans les cellules Mock, après 6h de culture en hypoxie. En revanche, dans les cellules MUC4-KD, nous avons constaté que l'invalidation de MUC4 induit une diminution significative du niveau d'expression relative de miR-210-3p par rapport aux cellules Mock (**Figure 36 A-B**). Ces observations suggèrent que la régulation transcriptionnelle de miR-210-3p par MUC4 est maintenue en hypoxie.

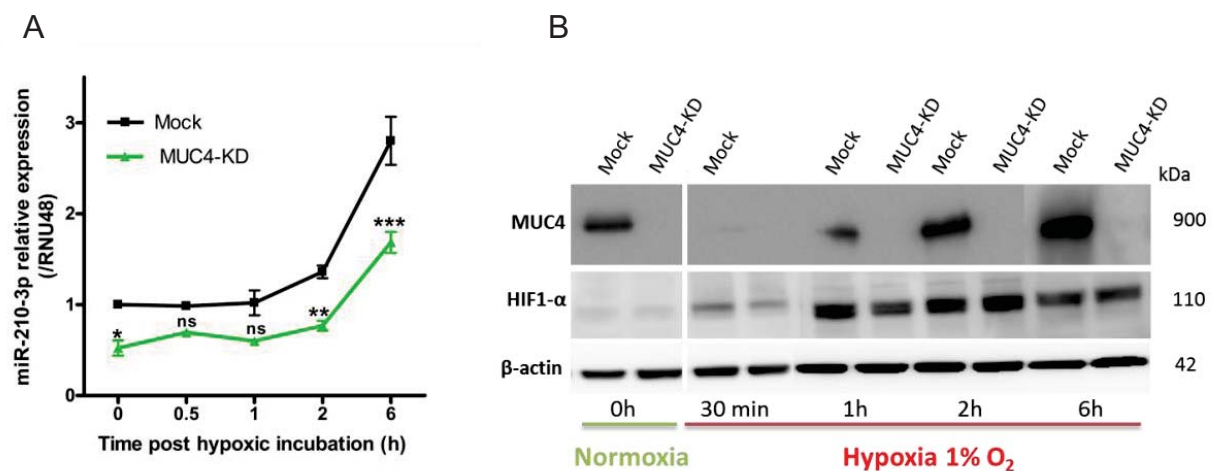
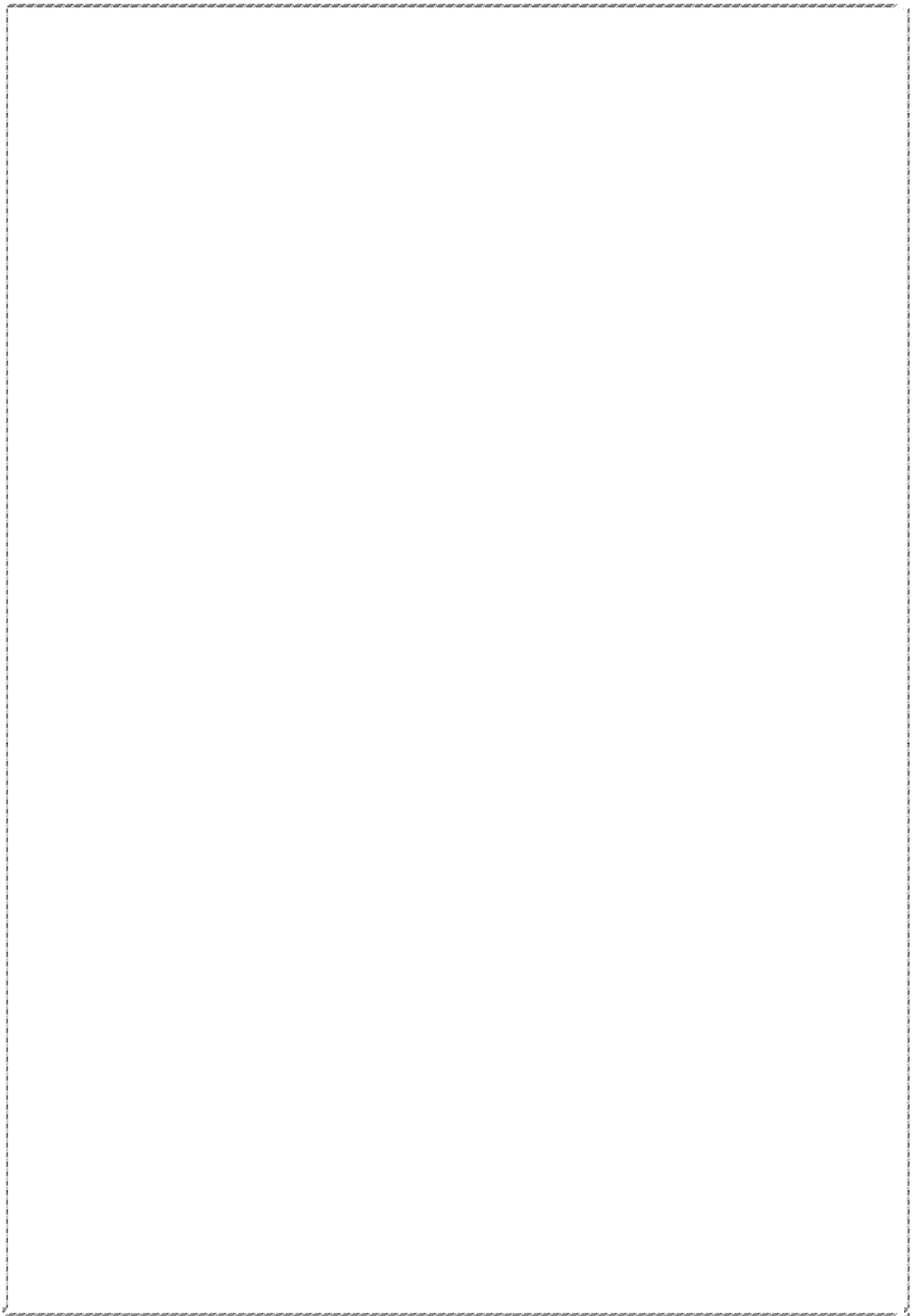


Figure 36 : Boucle miR-210-3p-MUC4 en conditions hypoxiques

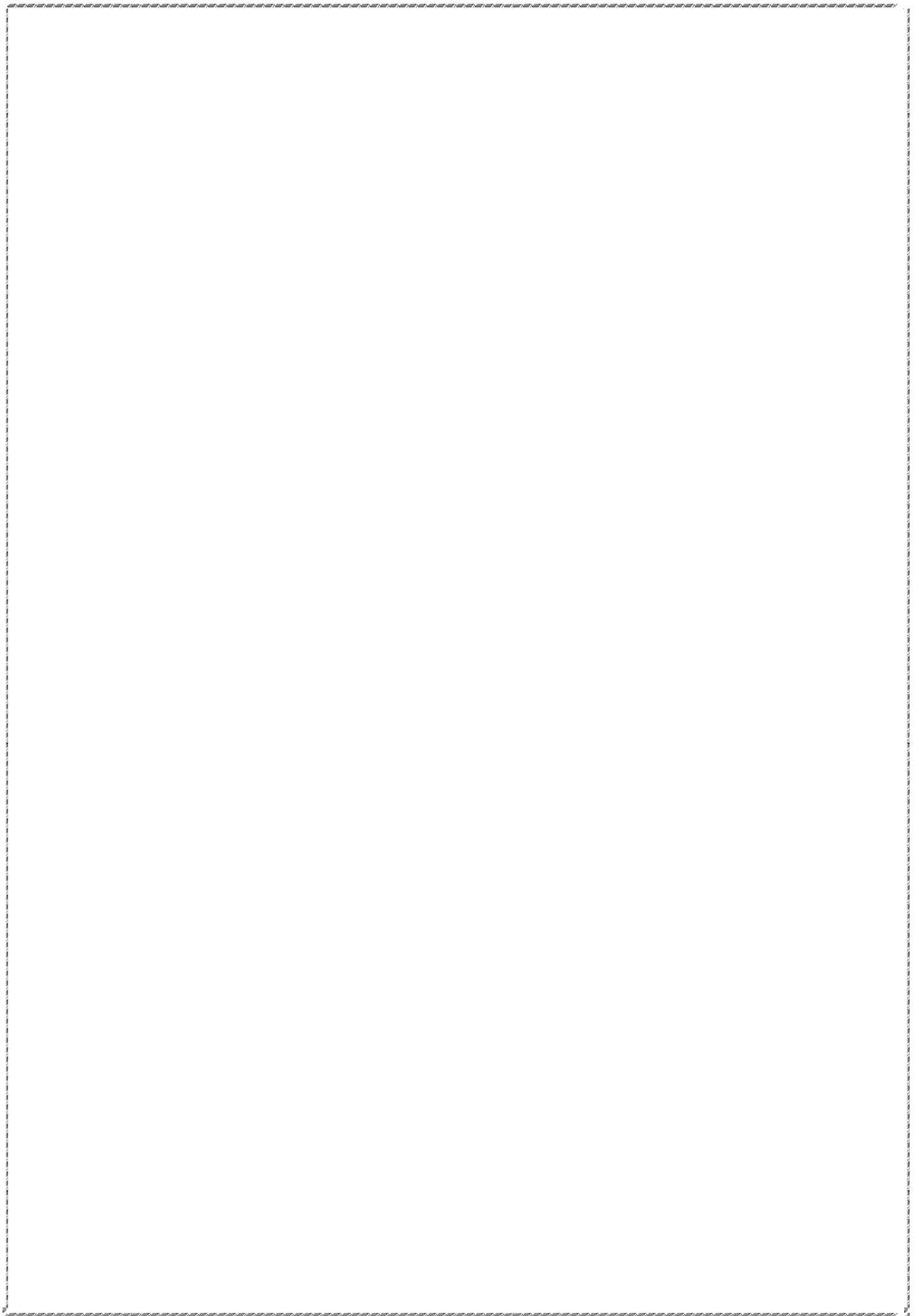
(A) Analyse par RT-qPCR du niveau d'expression relative de miR-210-3p dans les cellules Mock et MUC4-KD au cours d'un cinétique de culture en hypoxie. (B) analyse par western blot de l'expression protéique de MUC4, HIF1- α et la β -actine dans les cellules Mock et MUC4-KD après incubation hypoxique (1% O₂) pendant 30 min, 1, 2 et 6h. ** p<0.01 ; *** p<0.001 indiquent une différence statistiquement significative par rapport aux cellules contrôles Mock.

Néanmoins, la surexpression de miR-210-3p induite en réponse à l'hypoxie, après 2 h à 6 h d'incubation à 1 % de O₂, n'impacte pas l'expression protéique de MUC4, ce qui suggère un échappement de MUC4 à la régulation induite par le miR-210-3p hypoxie dépendant.

Dans l'ensemble, ces résultats soutiennent l'hypothèse que MUC4 est un régulateur clé de la transcription de miR-210-3p depuis l'initiation de la carcinogenèse pancréatique jusqu'à la formation de PDAC hypoxique.



3. Etude des rôles de miR-210-3p dans les cellules cancéreuses pancréatiques.



3.1. MiR-210-3p inhibe la prolifération et la migration des cellules cancéreuses pancréatiques *in vitro*

Nous avons étudié *in vitro* les rôles biologiques de miR-210-3p dans les cellules cancéreuses pancréatiques PANC89 (exprimant MUC4), PANC-1 et MIA PaCa-2 (n'exprimant pas MUC4) en effectuant des expériences de transfections transitoires et de transfections stables (modèles Crispr/Cas9 AAVS1). L'efficacité de la transfection de miR-210-3p a été systématiquement vérifiée par RT-qPCR.

Nous avons d'abord effectué des tests MTT pour évaluer l'effet général de miR-210-3p sur la viabilité cellulaire. Nous avons observé une diminution significative de la viabilité cellulaire dans toutes les cellules surexprimant le miR-210-3p de façon transitoire et stable par rapport aux cellules transfectées avec le miR-scramble (20-40 % de diminution $p < 0.001$, **Figure 37 A**). Au contraire, l'anti-miR-210-3p a induit une augmentation significative de la viabilité cellulaire dans les cellules PANC-1 et PANC89 AAVS1 anti-miR-210-3p par rapport aux cellules AAVS1 anti-miR-control (63.4 ± 0.02 et $72,48 \pm 0.02$ % d'augmentation, respectivement $p < 0.001$ **Figure 38 A**).

Nous avons ensuite étudié les effets de miR-210-3p sur la prolifération cellulaire par la mesure de la confluence cellulaire au cours du temps à l'aide d'un système de suivi en imagerie en temps réel (appareil Incucyte™). La confluence cellulaire est significativement diminuée dans les cellules surexprimant le miR-210-3p alors que son inhibition induit une augmentation significative de la prolifération des cellules PANC89 et PANC-1 par rapport aux conditions contrôles (**Figure 37-38 B**).

Enfin, nous avons effectué des tests de blessures afin d'étudier l'effet de miR-210-3p sur la capacité de migration collective des cellules cancéreuses pancréatiques. Nous avons observé que la surexpression de miR-210-3p réduit significativement la migration cellulaire comparée aux cellules contrôles miR-scramble. De plus, l'anti-miR-210-3p induit une augmentation de la migration cellulaire dans les cellules PANC89 et PANC-1 par rapport aux cellules anti-miR-control (**Figure 37-38 C-D**).

De façon intéressante, nous avons remarqué que les effets les plus importants de miR-210-3p sur la viabilité cellulaire, la prolifération et sur le processus de

migration ont été observés dans les cellules PANC89 exprimant MUC4 par rapport aux cellules PANC-1 et MIA PaCa-2 qui ne l'expriment pas.

Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence les effets anti-tumoraux de miR-210-3p *in vitro* dans les cellules cancéreuses pancréatiques.

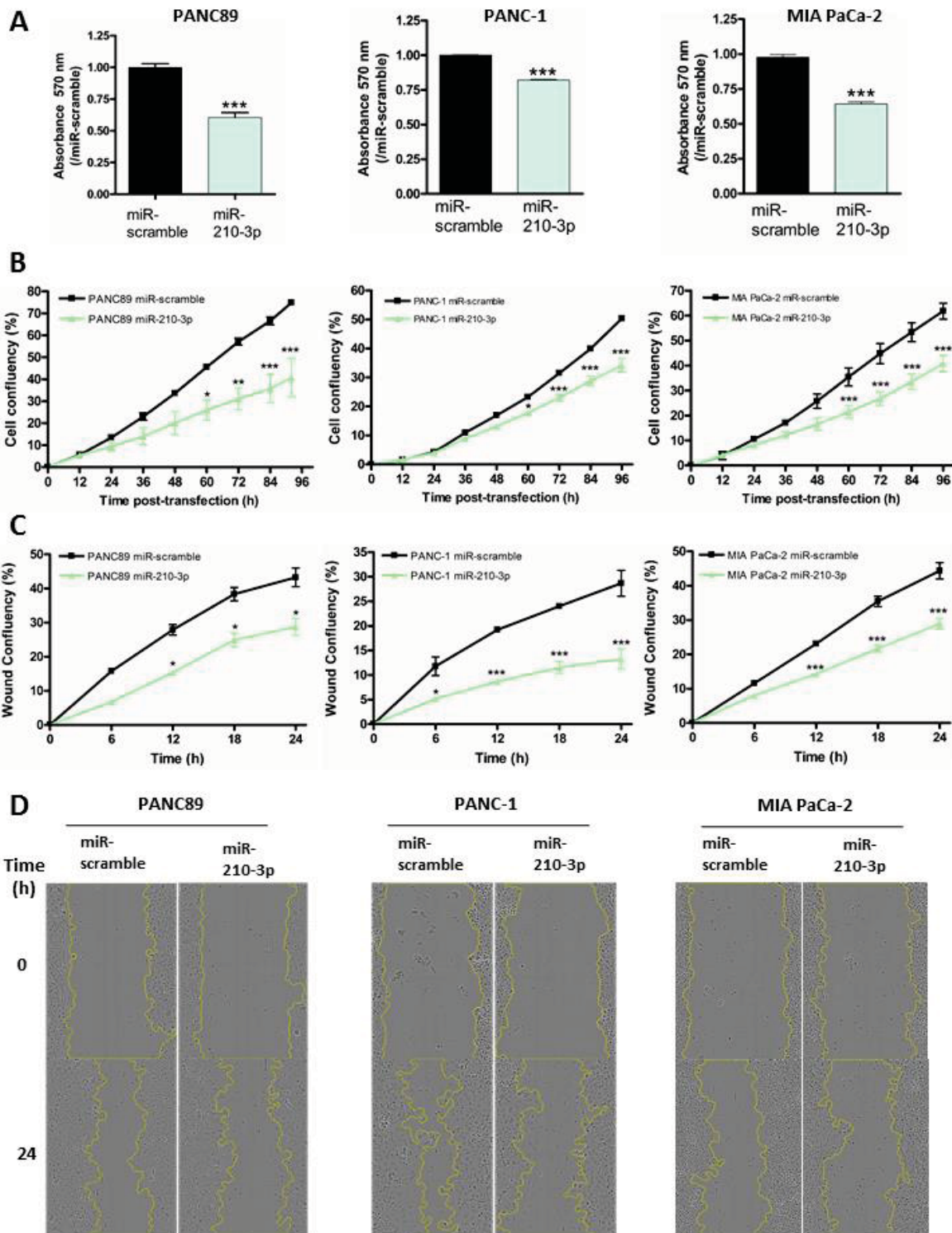


Figure 37 : L'expression transitoire de miR-210-3p inhibe la prolifération et la migration des cellules cancéreuses pancréatiques.

(A) Les cellules PANC89, PANC-1 et MIA PaCa-2 ont été transitoirement transfectées avec le miR-210-3p ou le miR-scramble pendant 96 h. La viabilité des cellules a été évaluée à l'aide de tests MTT. La condition contrôle miR-scramble a été arbitrairement fixée à 1. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. (B) La confluence cellulaire a été évaluée à l'aide de l'appareil Incucyte™ pendant 96 h après transfection transitoire des cellules PANC89, PANC-1 et MIA PaCa-2 avec le miR-210-3p ou le miR-scramble. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. (C) Des tests de blessures ont été effectués sur des cellules

transfectées avec le miR-210-3p ou le miR-scramble. La surface de la plaie a été mesurée toute les 6 h pendant 24 h à l'aide de l'appareil Incucyte™. Les expériences ont été réalisées trois fois. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ indiquent une différence statistiquement significative par rapport à la condition miR-scramble. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. (D) Images représentatives de tests de blessures réalisés dans les cellules PANC89, PANC-1 et MIA PaCa-2.

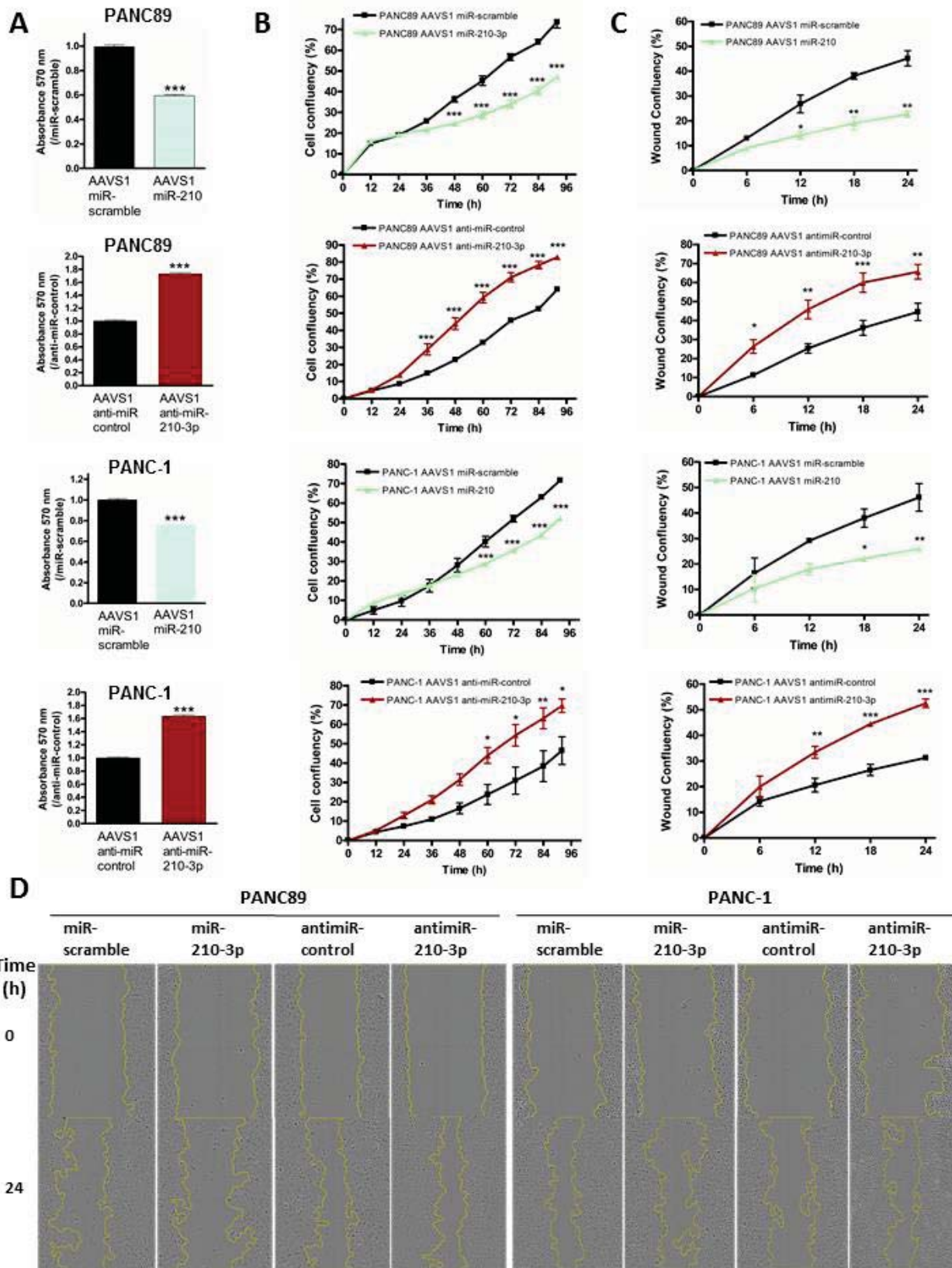


Figure 38 : La surexpression stable de miR-210-3p et de l'anti-miR-210-3p régule la prolifération et la migration des cellules cancéreuses pancréatiques.

Les cellules PANC89 et PANC1 ont été transfectées stablement soit avec le miR-210-3p, l'anti-miR-210-3p ou les contrôles correspondants le miR-scramble et l'anti-miR-scramble. (A) La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide de tests MTT. Les conditions miR-scramble et anti-miR-control ont été arbitrairement fixées à 1. Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

(B) La confluence cellulaire a été évaluée à l'aide de l'appareil Incucyte™ toutes les 12 h pendant 96 h. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. (C) Des tests de blessures ont été réalisés. La surface des blessures a été mesurée toutes les 6 h pendant 24 h en utilisant l'appareil Incucyte™. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. (D) Images représentatives de la fermeture des blessures dans les cellules PANC89 et PANC-1 exprimant miR-210-3p ou anti-miR-210-3p. *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001 indiquent une différence statistiquement significative par rapport au miR-scramble ou à l'anti-miR-control.

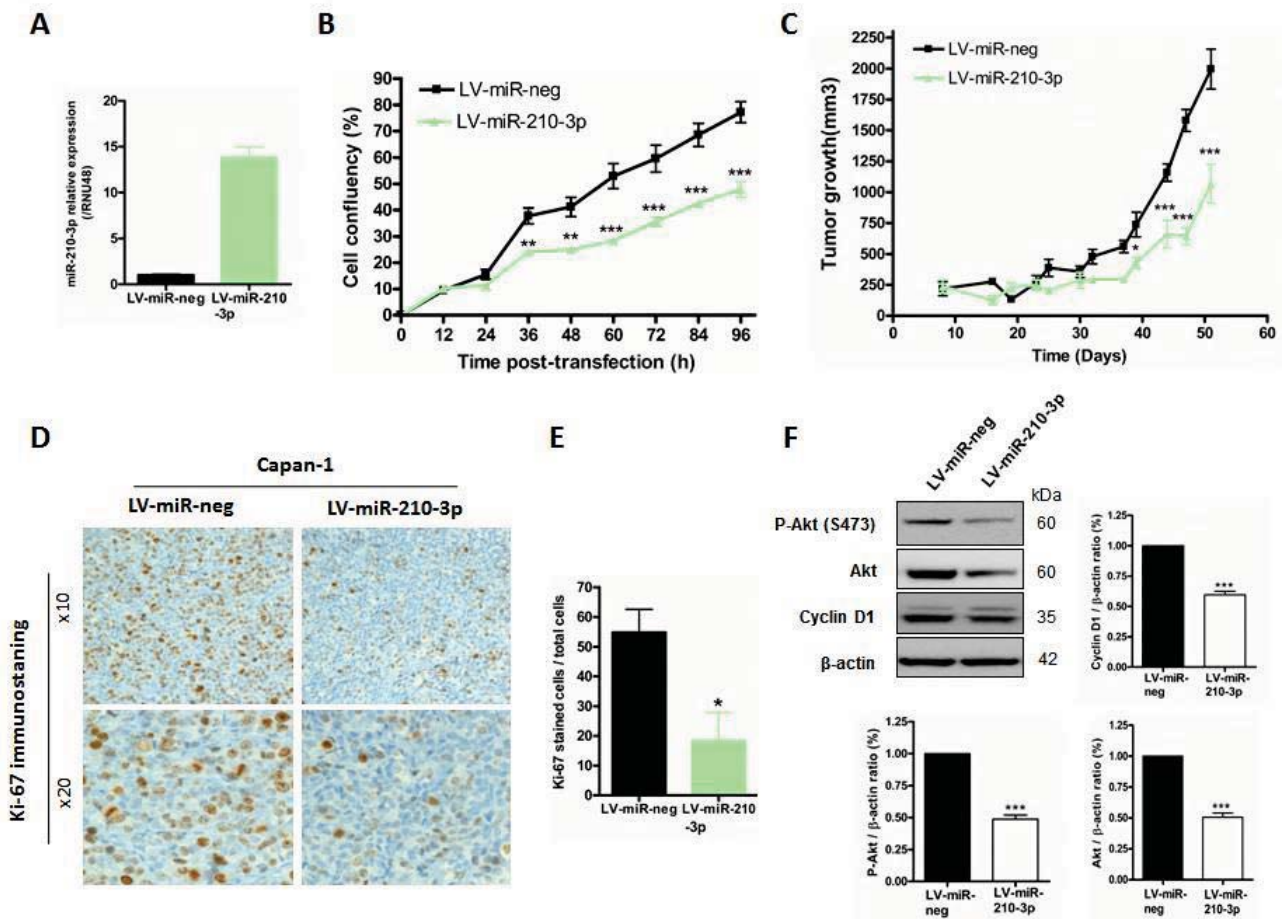


Figure 39 : MiR-210-3p inhibe la croissance des tumeurs pancréatiques *in vivo*.

(A) Analyse par RT-qPCR de l'expression relative de miR-210-3p dans les cellules Capan-1 LV-miR-210 et Capan-1 LV-miR-neg. L'expression de miR-210-3p est évaluée selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ miR-210} - Ct \text{ RNU48}) - Ct \text{ miR-neg}$). L'expression de miR-210-3p dans les cellules témoins Capan-1 LV-miR-neg a été arbitrairement fixée à 1. ***p<0,001 indique la une différence statistiquement significative par rapport aux cellules contrôles Capan-1 LV-miR-neg. (B) Prolifération des cellules Capan-1 LV-miR-210 par rapport à leurs contrôles LV-miR-neg (**p<0,01 ou ***p<0,001). Trois expériences indépendantes ont été réalisées. (C) Xénogreffes sous-cutanées des cellules Capan-1 LV-miR-210-3p et des cellules témoins Capan-1 LV-miR-neg chez des souris *SCID*. La croissance tumorale (mm³) a été évaluée jusqu'à ce que les souris soient euthanasiées. *p<0,05 et ***p<0,001 indiquent une différence statistiquement significative entre la condition miR-210-3p et la condition contrôle miR-neg. (D) Le marquage immunohistochimique Ki-67 a été réalisé sur les tissus des tumeurs xénogreffées. Grossissement original : ×10 (panneau supérieur) et × 20 (panneau inférieur). (E) Le pourcentage de cellules Ki-67 positives (Ki-67+) a été calculé et représenté sous forme d'histogrammes.

*p<0.05 indique une différence statistiquement significative par rapport à la condition contrôle miR-neg. (F) Analyse par western blot de l'expression des protéines S474 phospho-Akt, Akt, Cycline D1 et β -actine dans les cellules Capan-1 LV-miR-210-3p et Capan-1 LV-miR-neg contrôle. Les rapports Akt/ β -actine et Cyclin D1/ β -actine sont représentés sous forme d'histogrammes. Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

3.2. MiR-210-3p inhibe la croissance des tumeurs pancréatiques

in vivo

Afin d'étudier les fonctions de miR-210-3p *in vivo*, nous avons utilisé les cellules cancéreuses pancréatiques Capan-1 ayant été transduites par un vecteur lentiviral codant pour le miR-210-3p (cellules LV-miR-210-3p) et les cellules contrôles (LV-miR-neg).

Nous avons d'abord validé la surexpression de miR-210-3p dans les cellules Capan-1 LV-miR-210-3p par RT-qPCR ($x13,8 \pm 1,2$, $p<0,001$, **Figure 39 A**). Nous avons confirmé l'effet anti-prolifération de miR-210-3p *in vitro* dans les cellules Capan-1 LV-miR-210-3p par rapport aux cellules LV-miR-neg (diminution de 38,1 %, $p<0,001$) (**Figure 39 B**) comme démontré précédemment dans les figures 37 et 38.

Ces cellules ont été xénotransplantées en sous-cutané chez des souris *SCID* et la croissance tumorale a été évaluée pendant 51 jours par la mesure du volume tumoral. Nous avons observé que les tumeurs développées à partir des cellules Capan-1 LV-miR-210-3p sont significativement plus petites que les tumeurs issues des cellules contrôles Capan-1 LV-miR-neg (diminution de 42 %, $p<0,05$) dès 39 jours post-xénotransplantation. La différence des tailles de tumeurs entre les deux conditions s'est maintenue jusqu'à l'euthanasie des souris (**Figure 39 C**). Ensuite, les tumeurs ont été extraites et le facteur de prolifération Ki-67 a été analysé par marquage immunohistochimique (**Figure 39 D-E**). Nous avons observé une diminution statistiquement significative du pourcentage de cellules Ki-67 positives (Ki-67+) dans les tumeurs Capan-1 LV-miR-210-3p (diminution de 66,6 % \pm 18,9, $p=0,0245$) par rapport aux tumeurs contrôles Capan-1 miR-neg.

De plus, l'analyse par western blot des cellules Capan-1 LV-miR-210-3p a montré une diminution des expressions des protéines associées aux voies de signalisation pro-proliférative telles qu'Akt (forme constitutive et phosphorylée en S474) ainsi que la Cycline D1 par rapport aux cellules témoins Capan-1 LV-miR-neg.

Il est intéressant d'observer que le rapport S474 phospho-Akt/Akt est égal à 1 quand on compare les cellules LV-miR-210-3p et le contrôle LV-miR-neg, suggérant que miR-210-3p inhibe l'expression de Akt et non pas son activation par phosphorylation (**Figure 39 F**).

L'ensemble de ces travaux démontrent que la surexpression ectopique de miR-210-3p inhibe la prolifération des cellules Capan-1 et diminue la croissance tumorale *in vivo*.

4. Etude des effets de miR-210-3p sur la réponse aux chimiothérapies.

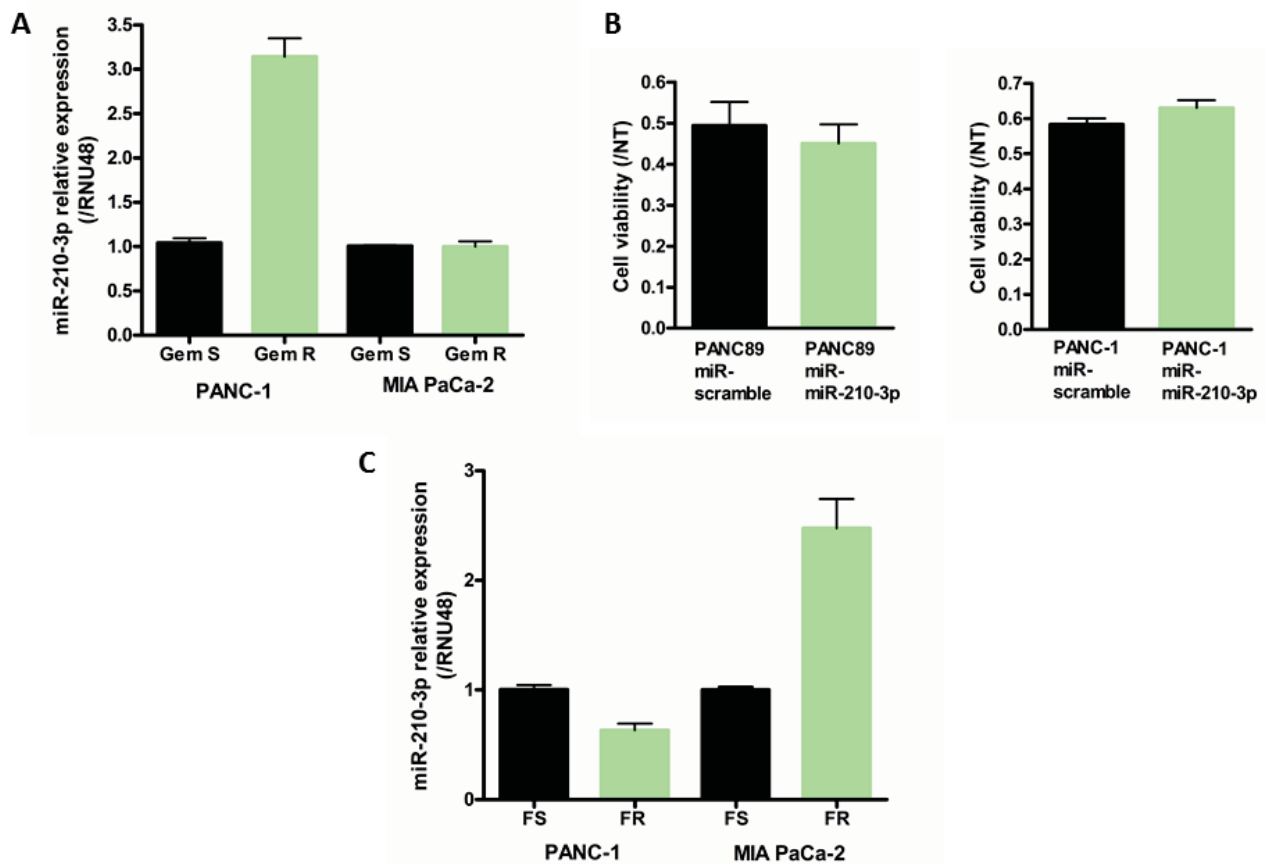


Figure 40 : L'expression de miR-210-3p est altérée dans les cellules cancéreuses pancréatiques résistantes aux chimiothérapies.

(A) Analyse par RT-qPCR de l'expression relative de miR-210-3p dans les lignées cancéreuses pancréatiques humaines PANC-1 et MIA PaCa-2 gemcitabine résistantes (Gem R) et leurs contrôles (Gem S). L'expression de miR-210-3p est évaluée selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ miR-210} - Ct \text{ RNU48}) - Ct \text{ Gem S}$). L'expression de miR-210-3p dans les cellules témoins Gem S a été arbitrairement fixée à 1. (B) Les cellules PANC89 et PANC-1 ont été transfectées transitoirement avec le miR-210-3p ou le miR-scramble puis traitées à la gemcitabine pendant 72 h. La viabilité des cellules a été évaluée à l'aide de tests MTT. Les données ont été normalisées sur les conditions non traitées respectives. (C) Analyse par RT-qPCR de l'expression relative de miR-210-3p dans les lignées cancéreuses pancréatiques humaines PANC-1 et MIA PaCa-2 FOLFIRINOX résistantes (FR) et leurs contrôles (FS). L'expression de miR-210-3p dans les cellules témoins FS a été arbitrairement fixée à 1.

Le miR-210-3p est associé à la réponse aux chimiothérapies des PDACs.

Dans cette partie de notre étude nous nous sommes intéressés aux effets de miR-210-3p sur la réponse aux chimiothérapies conventionnelles.

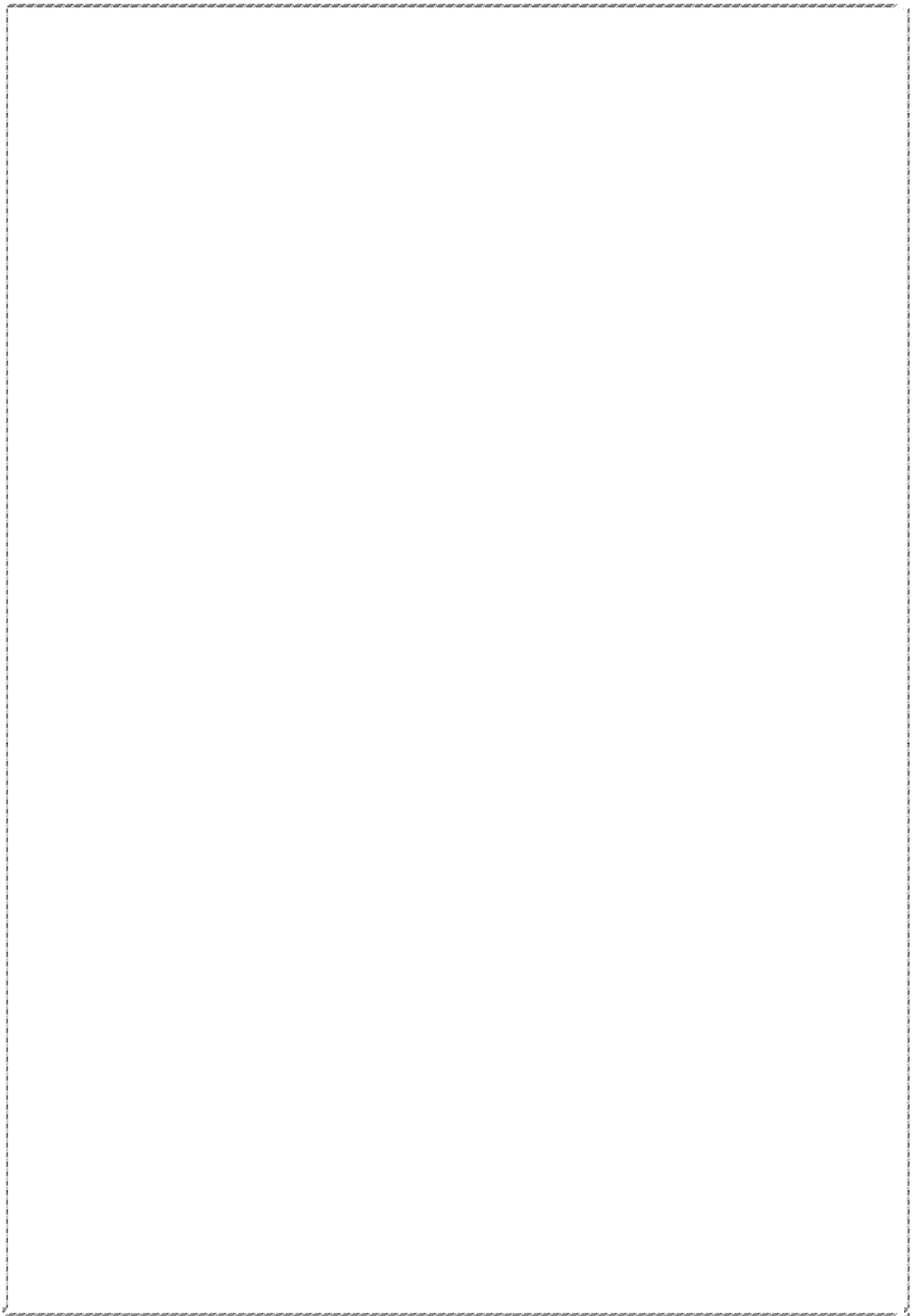
Dans notre équipe, plusieurs projets de recherche s'intéressent à l'étude des mécanismes de chimiorésistance acquise dans le cancer du pancréas. Nous disposons de ce fait de lignées pancréatiques PANC-1 et MIA PaCa-2 rendues résistantes à la gemcitabine par un traitement chronique (El Amrani et al., 2019). Nous avons évalué l'expression relative de miR-210-3p dans ces modèles cellulaires par RT-qPCR. De façon intéressante, nous avons observé une surexpression significative de miR-210-3p dans les PANC-1 résistantes à la gemcitabine (GR) comparé aux cellules PANC-1 contrôles sensibles au traitement (GS). Cependant, nous n'avons pas observé d'altération de l'expression de miR-210-3p dans les cellules MIA PaCa-2 (**Figure 40 A**). Ces résultats suggèrent que l'implication potentielle de miR-210-3p dans la résistance à la gemcitabine est dépendante de la lignée cellulaire et que l'acquisition de la chimiorésistance est un mécanisme complexe pouvant être mis en place de manière indépendante de miR-210-3p.

Nous avons ensuite envisagé d'évaluer l'effet d'une surexpression de miR-210-3p sur la réponse des cellules cancéreuses pancréatiques à la gemcitabine. Pour cela, nous avons surexprimé transitoirement le miR-210-3p dans les cellules PANC89 (phénotype épithélial et exprimant MUC4) et dans les PANC-1 (phénotype mésenchymateux et n'exprimant pas MUC4) puis traité à la gemcitabine (selon l'IC50 préalablement déterminé au laboratoire). L'analyse de viabilité cellulaire après traitement à la gemcitabine n'a révélé aucun effet de miR-210-3p sur la sensibilité des cellules PANC89 et PANC-1 à la gemcitabine (**Figure 40 B**). Ces résultats suggèrent que la surexpression de miR-210-3p à elle seule n'est pas suffisante pour impacter la réponse au traitement et activer le mécanisme de résistance à la gemcitabine.

Récemment, le Dr Poiraud (M2R sous la direction scientifique du Dr Audrey Vincent) a mis en place au laboratoire un modèle de chimiorésistance acquise au FOLFIRINOX, basé sur le protocole de traitement utilisé en clinique, en adaptant la

cinétique et les concentrations de drogues aux cellules pancréatiques (Hadj Bachir et al., 2021). Nous avons évalué par RT-qPCR l'expression relative de miR-210-3p dans les modèles cellulaires PANC-1 et MIA PaCa-2 résistants au FOLFIRINOX (FR). Nous avons observé une surexpression de miR-210-3p dans les cellules MIA PaCa-2 résistantes au FOLFIRINOX comparés aux cellules contrôles non traitées (NT). Cependant, aucun effet de miR-210-3p sur la réponse au FOLFIRINOX n'a pu être observé dans les cellules PANC-1. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une implication, dépendante de la lignée cellulaire, de miR-210-3p dans la résistance acquise au traitement (**Figure 40 C**).

Discussion



Contexte d'étude

L'adénocarcinome du canal pancréatique est un cancer extrêmement agressif et très chimiorésistant. En raison de son pronostic dramatique et de l'échec des thérapies conventionnelles, le PDAC est la troisième cause de décès par cancer aux États-Unis et les prédictions suggèrent qu'il devienne la deuxième cause en 2030. La compréhension des mécanismes de la carcinogenèse du PDAC et l'identification des principaux facteurs responsables de son agressivité et impliqués dans l'acquisition d'une chimiorésistance sont cruciaux pour l'amélioration des soins prodigués aux patients et le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Les lésions précancéreuses pancréatiques sont le point de départ du développement des PDACs.

MUC4 est un acteur clé de la carcinogenèse pancréatique. Dès sa néoexpression dans les stades précoces des PanINs, MUC4 contribue à la progression et à l'agressivité du PDAC. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que MUC4 module la croissance tumorale pancréatique, la prolifération cellulaire, l'invasion et l'apoptose. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents associés à l'expression de MUC4 restent à décrypter. Dans cette étude, nous avons identifié miR-210-3p comme miARN régulé par une signalisation cellulaire activée en aval de MUC4. Nous avons ensuite caractérisé le mécanisme impliqué dans cette régulation, puis étudié les effets du miR-210-3p sur les propriétés biologiques des cellules cancéreuses du pancréas et sur la réponse aux chimiothérapies.

Le miR-210, est l'un des miARNs les plus fréquemment dérégulés dans les PDACs (Sohrabi *et al.*, 2021). Sa surexpression dans des échantillons issus de tissus de PDAC a été associée à un mauvais pronostic du cancer du pancréas (Greither *et al.*, 2010). De plus, miR-210 semble impliqué dans la résistance à la gemcitabine. (Dhayat *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2020). En plus de son rôle bien décrit de régulateur de l'hypoxie, miR-210-3p est également exprimé dans des conditions de normoxie et module l'initiation tumorale (Huang *et al.*, 2009).

Dans cette étude, nous avons voulu élucider les rôles de MUC4-miR-210-3p dans les stades précoces de la formation des tumeurs pancréatiques.

Boucle de rétro-régulation négative MUC4-miR-210-3p

Dans les PDACs, MUC4 et miR-210-3p sont tous les deux surexprimés (Swartz et al., 2002, Szabo et al., 2020, Jonckheere et al., 2010) et associés à un mauvais pronostic (Jonckheere *et al.*, 2021, Greither *et al.*, 2010). Dans cette étude, nous avons révélé une corrélation positive entre l'expression de Muc4 et celle de miR-210-3p au cours de l'initiation des PanINs et leur progression en PDAC. De plus, nous avons observé que l'inactivation de MUC4 dans des conditions normoxiques (21 % O₂) et hypoxiques induit une diminution significative des niveaux d'expression de miR-210-3p dans les cellules cancéreuses.

Nos résultats suggèrent une implication potentielle de MUC4 dans la régulation transcriptionnelle de miR-210-3p. En effet, il est maintenant établi que MUC4 est capable de moduler l'expression de gènes par l'activation de la signalisation cellulaire. Par exemple, nous avons précédemment montré que MUC4 induit une surexpression de hCNT1, dans les cellules cancéreuses pancréatiques, *via* la modulation de la voie NF-κB (Skrypek *et al.*, 2013). NF-κB est une famille de facteurs de transcription dimériques qui jouent un rôle central dans les réponses inflammatoires, immunitaires, la différenciation cellulaire, la prolifération et la survie dans les organismes multicellulaires (Gerondakis *et al.*, 2006). La dérégulation de la voie NF-κB a été impliquée dans un large panel de maladies, y compris les cancers. Dans le PDAC, NF-κB favorise la progression tumorale en régulant les gènes impliqués dans la prolifération, l'angiogenèse et la survie. La voie NF-κB est bien connue pour être activée de manière constitutive dans les PDACs par rapport au pancréas normal (Wang *et al.*, 1999).

Le gène miR-210 est situé dans un intron d'un gène codant un long ARN non codant, nommé miR210HG, situé sur le chromosome 11p15.5 (NCBI, gène, 406992). En 2012, Zhang et ses collaborateurs ont identifié pour la première fois un site fonctionnel de fixation de la sous-unité p50 de NF-κB sur le promoteur de miR-210 lui permettant d'activer transcriptionnellement l'expression de miR-210-3p dans la maladie de la pré-éclampsie (Zhang *et al.*, 2012). Dans notre étude, nous avons observé que l'inhibition de NF-κB dans les cellules cancéreuses pancréatiques PANC89 en utilisant un siARN ciblant la sous unité p50 de NF-κB a induit une diminution significative du niveau d'expression relative de miR-210-3p comparé à la

condition contrôle. Sur la base de ces résultats, nous avons caractérisé l'implication de NF- κ B (p50) sur la régulation transcriptionnelle de miR-210-3p en aval de MUC4 dans les cellules cancéreuses pancréatiques. La cartographie d'une région promotrice centrale de 2 kb immédiatement en amont de la structure en tige-boucle de miR-210, nous a permis d'identifier plusieurs sites de fixation putatifs de NF- κ B. Des études structurales et fonctionnelles nous ont permis de mettre en évidence une interaction directe entre la sous unité p50 de NF- κ B et le promoteur de miR-210 ce qui induit son expression dans les cellules cancéreuses pancréatiques. De manière intéressante, nous avons démontré que la perte de MUC4 abolissait les interactions entre la sous unité p50 de NF- κ B et le promoteur de miR-210 *via* l'inhibition de l'activité NF- κ B. Les mécanismes de régulation de la voie NF- κ B médiée par MUC4 restent à clarifier. Néanmoins, nous avons précédemment montré une accumulation des sous-unités de NF- κ B dans la fraction cytoplasmique des cellules cancéreuses MUC4-KD (Skrypek *et al.*, 2013) et suggérons que MUC4 peut bloquer la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B.

L'analyse *in silico* du 3'-UTR de MUC4 nous a permis d'identifier trois sites de fixation de miR-210-3p. Ce résultat suggère que MUC4 est une cible potentielle de miR-210-3p. La régulation de l'expression de MUC4 dans les PDACs est complexe et opère à différents niveaux (1) au niveau épigénétique *via* la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (Vincent *et al.*, 2008), (2) au niveau transcriptionnel *via* les facteurs EGF (Perrais *et al.*, 2001b), et TGF- β (Andrianifahanana *et al.*, 2005) (Jonckheere *et al.*, 2004) et les voies MAPK et NF- κ B activées par Kras (Vasseur *et al.*, 2015) et enfin (3) au niveau post-transcriptionnel *via* les miARNs. En effet, il est décrit que MUC4 est une cible fonctionnelle de miR-150 (Srivastava *et al.*, 2011) et de miR-219-1-3p dans les PDACs (Lahdaoui *et al.*, 2015). De même, dans notre étude, nous avons démontré que le miR-210-3p est également un régulateur post-transcriptionnel de MUC4. En effet, nos résultats nous ont permis de mettre en évidence une inhibition significative de l'expression de MUC4 induite par miR-210-3p. A l'inverse l'anti-miR-210-3p conduisait à une surexpression de MUC4.

En plus de son implication dans la régulation post-transcriptionnelle de MUC4 *via* son 3'-UTR, nos résultats suggèrent que miR-210-3p pourrait également le réprimer au niveau transcriptionnel *via* l'inhibition de la voie canonique du TGF- β . La voie TGF- β est impliquée dans la progression du cancer du pancréas. L'activation de

la signalisation TGF- β SMAD dépendante est initiée par la fixation du TGF- β sur son récepteur, sérine/thréonine kinase, et l'induction de son oligomérisation. Une fois le complexe ligand-récepteur activé, il phosphoryle les protéines SMAD2 et SMAD3 qui se lie à SMAD4 puis transloquent vers le noyau où ils activent l'expression de gènes cibles dont MUC4 (Jonckheere *et al.*, 2004). Nous avons montré que la surexpression miR-210-3p induisait une inhibition significative de l'expression SMAD2 et SMAD3 conduisant ainsi au blocage de la voie du TGF- β SMAD dépendante et à la répression de l'expression de MUC4.

Dans cette étude, nous avons montré que MUC4 et miR-210-3p se régulent mutuellement. L'activation transcriptionnelle de miR-210-3p par MUC4 semble être maintenue au cours de la carcinogenèse pancréatique puisque leur expression est positivement corrélée et qu'ils sont tous les deux surexprimés dans les cellules et les tissus de PDAC. Inversement, nous avons constaté que MUC4 échappe à la régulation induite par le miR-210-3p (1) dans le modèle de souris KC qui présente un fort immunomarquage de Muc4 et des niveaux d'expression relative élevés de miR-210-3p et (2) dans des conditions d'hypoxie. En effet, nous avons observé que la surexpression du miR-210-3p induite sous culture en hypoxie (1% O₂ pendant 6 h) n'avait aucun effet répressif sur l'expression de MUC4 qui restait fortement exprimé dans ces conditions.

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de l'échappement de MUC4 à la répression transcriptionnelle et post-transcriptionnelle induites par le miR-210-3p dans les PDACs.

La régulation de l'expression de MUC4 est très complexe au cours de la cancérogenèse pancréatique et dans les PDACs invasifs, et implique divers mécanismes déjà élucidés pour certains et d'autres encore inconnus à ce jour. Nous avons suggéré que miR-210-3p pouvait inhiber transcriptionnellement MUC4 *via* le blocage de la voie du TGF- β SMAD dépendante, induit par la répression de SMAD2 et SMAD3. Néanmoins, cette voie est inactivée en conséquence d'une mutation perte de fonction du gène *SMAD4* dans les PanINs de haut grade et dans 31 à 38 % des cancers du pancréas (Waddell N 2015). En parallèle, d'autres mécanismes cellulaires, non régulés par miR-210-3p, favorisent l'expression de MUC4. Ces

évènements peuvent participer à la levée de répression transcriptionnelle de MUC4 par le miR-210-3p dans les PDACs.

Par ailleurs, les changements environnementaux sont des facteurs déterminants des fonctions des miARNs. En effet, en réponse au stress, à l'hypoxie ou encore à d'autres stimuli externes, les cellules activent des signalisations cellulaires spécifiques. En conséquence, l'expression de certains gènes impliqués spécifiquement dans ses réponses cellulaires est modifiée, ce qui génère des profils géniques dépendant du contexte cellulaire. De plus, la cancérogenèse pancréatique se caractérise par une accumulation progressive d'altérations génétiques et moléculaires conduisant à une modification des signalisations cellulaires ainsi que des signatures d'expression géniques associées. Nous suggérons qu'au cours du développement des PDACs, miR-210-3p interagit et régule d'autres cibles surexprimées dans les cellules cancéreuses pancréatiques, libérant ainsi MUC4, un élément important pour la survie, la progression et la résistance cellulaires.

Nous avons comme hypothèse que la boucle de rétro-régulation négative MUC4-miR-210-3p est exclusivement efficace dans les stades précoces du cancer du pancréas afin de maintenir l'homéostasie cellulaire et d'inhiber l'initiation tumorale dans des conditions normoxiques.

Rôles de miR-210-3p dans la cancérogenèse pancréatique

Il est devenu évident que les miARNs sont des régulateurs majeurs des propriétés biologiques des cellules cancéreuses. En fonction de leurs gènes cibles, des conditions cellulaires et environnementales, et de l'expression spatiotemporelle du miARN nous distinguons (1) des miARNs jouant un rôle suppresseurs de tumeurs souvent sous-exprimés dans les cancers et ciblant des oncogènes (2) et des oncomiRs souvent surexprimés dans les cancers et ciblant des gènes suppresseurs de tumeurs.

Afin de caractériser le miR-210-3p et de déterminer son potentiel oncogénique ou anti-tumoral dans les PDACs, nous l'avons surexprimé ou inhibé dans des cellules cancéreuses pancréatiques exprimant ou pas MUC4, puis évalué son effet sur la viabilité cellulaire, la prolifération et la migration cellulaires *in vivo* et *in vitro*.

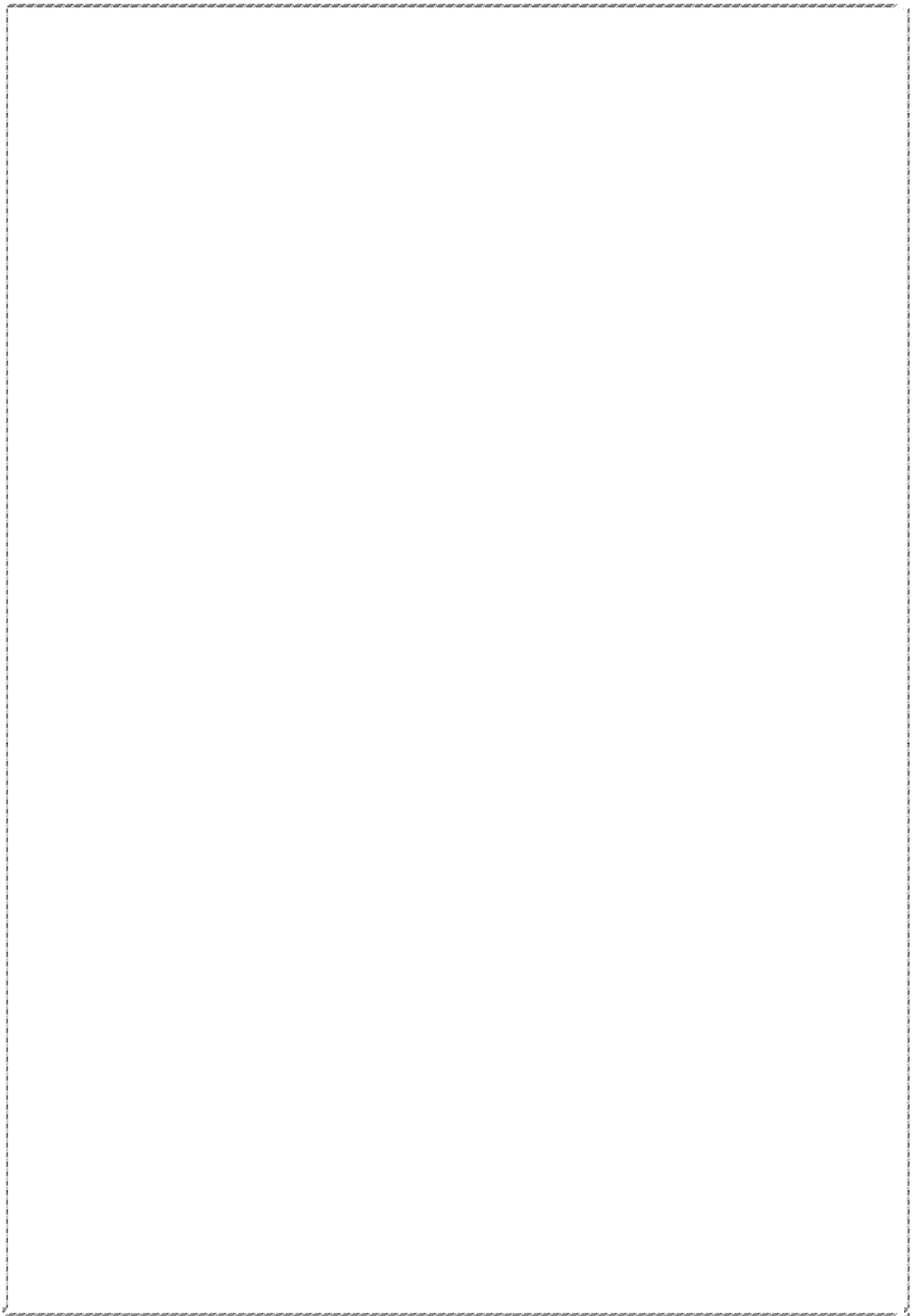
Nous avons montré que l'expression ectopique du miR-210-3p inhibe la prolifération et la migration *in vitro* des cellules cancéreuses du pancréas et la croissance tumorale *in vivo* dans un modèle de xénogreffe. Ces effets anti-tumoraux de miR-210-3p ont été observés aussi bien dans les cellules qui expriment MUC4 que dans celles ne l'exprimant pas. Ces résultats suggèrent que le miR-210-3p régule ces processus indépendamment de MUC4, en réprimant d'autres cibles.

Nous supposons que l'inhibition de la prolifération induite par le miR-210-3p pourrait être due à un blocage de la transition G1/S. En effet, nous avons observé que la surexpression du miR-210-3p induit une diminution de l'expression de la kinase Akt, un facteur de la signalisation régulatrice de la survie et de la prolifération cellulaire. Il a été décrit que Akt stabilise l'expression de la cycline D1, acteur majeur de la régulation du cycle cellulaire, *via* la phosphorylation et l'inactivation de son inhibiteur la protéine kinase *Glycogen synthase kinase-3beta* (GSK 3 β) (Balcazar Morales and Aguilar de Plata, n.d.). En effet, il a été démontré que la protéine kinase GSK 3 β active, phosphoryle la cycline D1 et induit ainsi sa dégradation par le protéasome (Diehl *et al.*, 1998). De plus, nous avons montré que miR-210-3p induit une diminution de l'expression de la Cycline D1. En se basant sur ces faits, nous supposons que dans nos modèles cellulaires, l'effet anti-prolifératif de miR-210-3p est une conséquence de l'inhibition de la voie Akt/ GSK-3 β / Cycline D1.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que miR-210-3p altère la capacité migratoire des cellules cancéreuses pancréatiques *via* l'inhibition de la voie du TGF- β SMAD dépendante. En effet, Il est clairement établi que la voie du TGF- β , favorise la progression du cancer en régulant plusieurs étapes du processus métastatique, notamment la TEM. De, plus il a été montré que la répression des protéines SMAD2 et SMAD3 conduit à la diminution de la migration cellulaire, de l'invasion et de formation de métastases (Wang *et al.*, 2016). Nos données suggèrent que miR-210-3p diminue le potentiel migratoire des cellules cancéreuses pancréatiques *via* la modulation de l'expression de SMAD2 et SMAD3.

Bien que l'expression tissulaire du miR-210 soit inversement corrélée à la survie des patients atteints de PDACs (Greither *et al.*, 2010), nous avons constaté que l'expression ectopique de miR-210-3p induit un effet anti-tumoral aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Plusieurs études montrent des effets controversés du miR-210-3p sur les processus biologiques des cellules cancéreuses du pancréas. Il est bien connu que les miARNs ont des rôles différents selon leur origine, leur expression spatiotemporelle, les stimuli environnementaux et les types de cellules. En effet, plusieurs études ont démontré un effet oncogénique de miR-210-3p. Yang et ses collaborateurs ont suggéré que le miR-210-3p contenu dans les exosomes issus de cellules souches de cancer du pancréas résistantes à la gemcitabine, induit une résistance aux médicaments dans les cellules cancéreuses pancréatiques sensibles à la gemcitabine (Yang *et al.*, 2020). De plus, le miR-210 est impliqué dans l'initiation de la TEM des cellules cancéreuses pancréatiques sous hypoxie (Ni *et al.*, 2019). En revanche, d'autres études ont suggéré que le miR-210-3p a un effet suppresseur de tumeur, car il inhibe la prolifération des cellules pancréatiques (Sun *et al.*, 2018) et réprime l'initiation de la croissance tumorale dans des conditions normoxiques (Huang *et al.*, 2009).

L'équilibre global entre les effets pro- et anti-tumoraux de miR-210-3p peut dépendre de son expression spatio-temporelle (centre ou périphérie de la tumeur, phases précoces ou tardives du cancer), des stimuli environnementaux (tels que l'hypoxie, la chimiothérapie), et enfin de l'expression et de la disponibilité de ses gènes cibles.



Conclusions et perspectives

Normoxia

- Hypoxia
- Drug resistance response
- EMT process

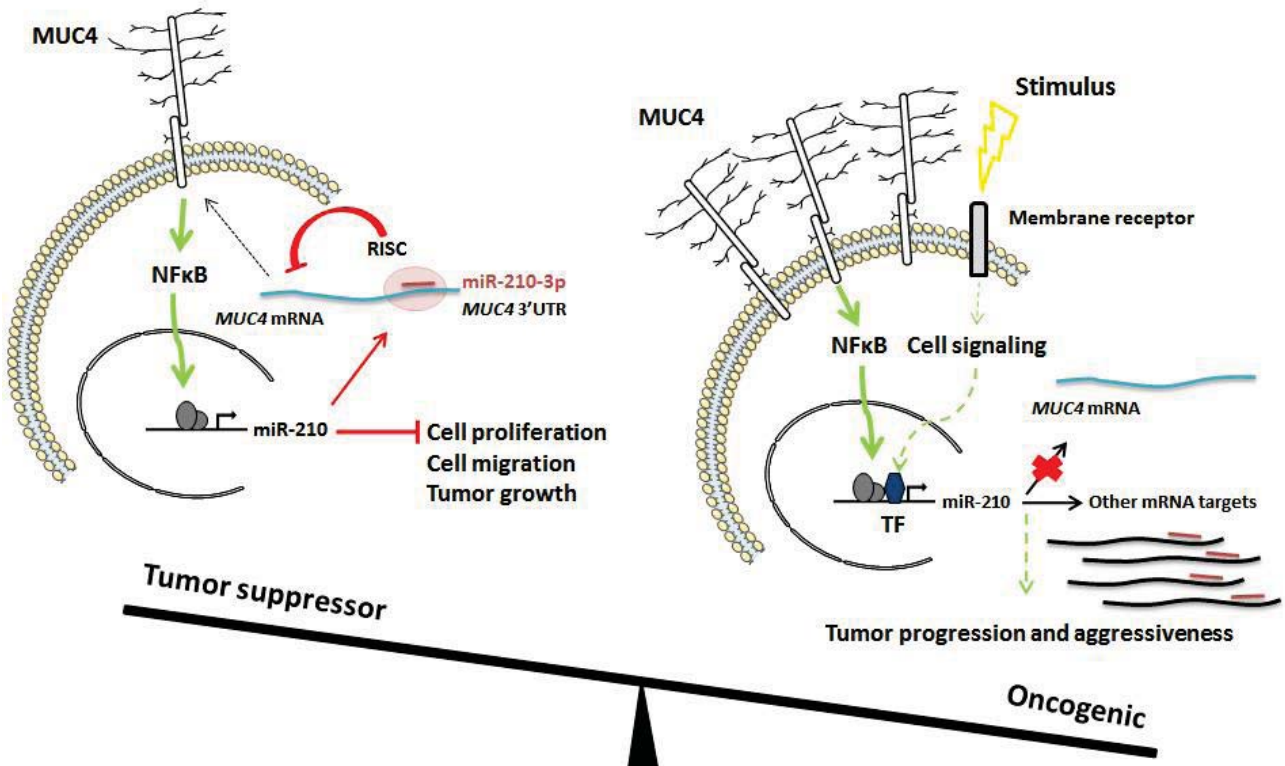


Figure 41 : Représentation schématique des effets de miR-210-3p dans les PDACs.

À gauche : boucle de rétroaction négative MUC4-miR-210-3p que nous avons identifié dans des conditions normoxiques. À droite : modèle hypothétique de la régulation de miR-210-3p et de ses rôles en réponse à divers stimuli tels que l'hypoxie, la résistance aux chimiothérapies et dans le processus métastatique. Les flèches vertes représentent les signaux activateurs. Les flèches rouges représentent les signaux inhibiteurs. La courte ligne rouge représente le miR-210-3p.

Abréviations : TF : facteurs de transcription.

Conclusion générale

Dans le présent travail, nous avons démontré pour la première fois l'existence d'une régulation rétroactive entre une mucine et un microARN. Nous avons identifié et caractérisé une boucle de rétro-régulation négative complexe entre MUC4 et miR-210-3p dans le PDAC. En effet, nous avons observé que MUC4 active l'expression transcriptionnelle de miR-210-3p *via* la modulation de la voie NF- κ B, ce qui induit la surexpression de miR-210-3p dans les cellules et les tissus du cancer du pancréas. En revanche, le miR-210-3p réprime transcriptionnellement et post-transcriptionnellement l'expression de MUC4 respectivement *via* le blocage de la voie du TGF- β SMAD dépendante et *via* l'interaction potentielle avec le 3' UTR de MUC4. Cette régulation dépend des stimuli environnementaux. Cependant, les mécanismes cellulaires favorisant l'expression de MUC4 peuvent surmonter la répression de MUC4 induite par miR-210-3p dans le PDAC. Bien que l'expression du miR-210-3p soit activée par l'oncomucine MUC4 et soit associée à un mauvais pronostic du PDAC, notre travail, dans des conditions de normoxie, révèle *in vitro* et *in vivo* un effet anti-prolifératif et anti-migratoire de miR-210-3p dans le PDAC ce qui suggère un équilibre complexe entre les rôles oncogéniques de MUC4 et les effets anti-tumoraux de miR-210-3p au cours de l'initiation tumorale (**Figure 41**).

Perspectives d'étude

1. La balance miR-210-3p anti-pro-tumoral.

Dans notre étude nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'un équilibre entre les effets pro- et anti-tumoraux de miR-210-3p qui pourrait dépendre de son expression spatiotemporelle (centre ou périphérie de la tumeur, phases précoces ou tardives du cancer), des stimuli environnementaux (tels que l'hypoxie, la chimiothérapie), et enfin de l'expression et de la disponibilité de ses gènes cibles. De plus, nous avons suggéré que miR-210-3p régule plusieurs gènes au cours du développement des PDACs et que ses cibles changent en fonction du stimulus et du contexte cellulaire.

Dans le but de mettre en évidence la transition de miR-210-3p d'anti- à pro-tumoral et le potentiel changement de cibles au cours de la cancérogenèse pancréatique nous allons conceptualiser un modèle d'étude simple basé sur une

variation de stimuli. Etant donné que miR-210-3p est un régulateur clé de l'hypoxie et que le cancer du pancréas est fortement hypoxique, nous avons choisi l'hypoxie comme premier stimulus à tester.

Notre modèle d'étude vise à mimer deux contextes cellulaires importants pour la fonction de miR-210-3p, le premier en condition normoxique, mimant les étapes d'initiation de la cancérogenèse, et le second en condition hypoxique mimant les stades tardifs du PDAC.

Brièvement, notre expérience sera basée sur une adaptation du protocole « *Tandem affinity purification of miRNA target mRNAs* » publié par Nonne et ses collaborateurs en 2010 (Nonne et al., 2010). Elle consiste en (1) la transfection de miR-210-3p biotinylé dans les cellules cancéreuses pancréatiques, PANC89 PANC-1. (2) La mise en culture des cellules transfectées en normoxie (21 % O₂) et en hypoxie (1 % O₂) pendant 48h. (3) La lyse des cellules. (4) La purification du miR-210-3p en complexe avec ses cibles par affinité en utilisant des billes magnétiques couplées à la streptavidine. (5) Le séquençage (RNAseq) et identification des cibles de miR-210-3p.

Les résultats obtenus vont nous permettre (1) de mettre en évidence un changement de cible entre les deux conditions et (2) identifier les cibles de miR-210-3p dans les deux contextes cellulaires et mieux comprendre ses mécanismes d'action et les processus dans lesquels il est impliqué, (3) confirmer l'existence d'une balance pro / anti-tumorale, et enfin (4) ouvrir de nouvelles perspectives d'études de miR-210-3p et de ses cibles dans le PDAC.

2. Caractériser les effets de miR-210-3p sur la réponse aux chimiothérapies.

Bien que nous ayons observé une surexpression de miR-210-3p dans certaines lignées cancéreuses pancréatiques résistantes à la gemcitabine et au FOLFIRINOX, son implication dans la réponse cellulaire aux chimiothérapies reste à élucider.

Au cours de nos expériences nous avons constaté que la surexpression de miR-210-3p n'avait pas d'effet sur la réponse cellulaire suite à des traitements chimiothérapeutiques de courte durée (seulement 72 h de traitement). Pour pallier à cela nous envisageons de traiter de façon chronique les lignées stables AAVS1 miR-210-3p et anti-miR-210-3p et leurs contrôles à la gemcitabine et au

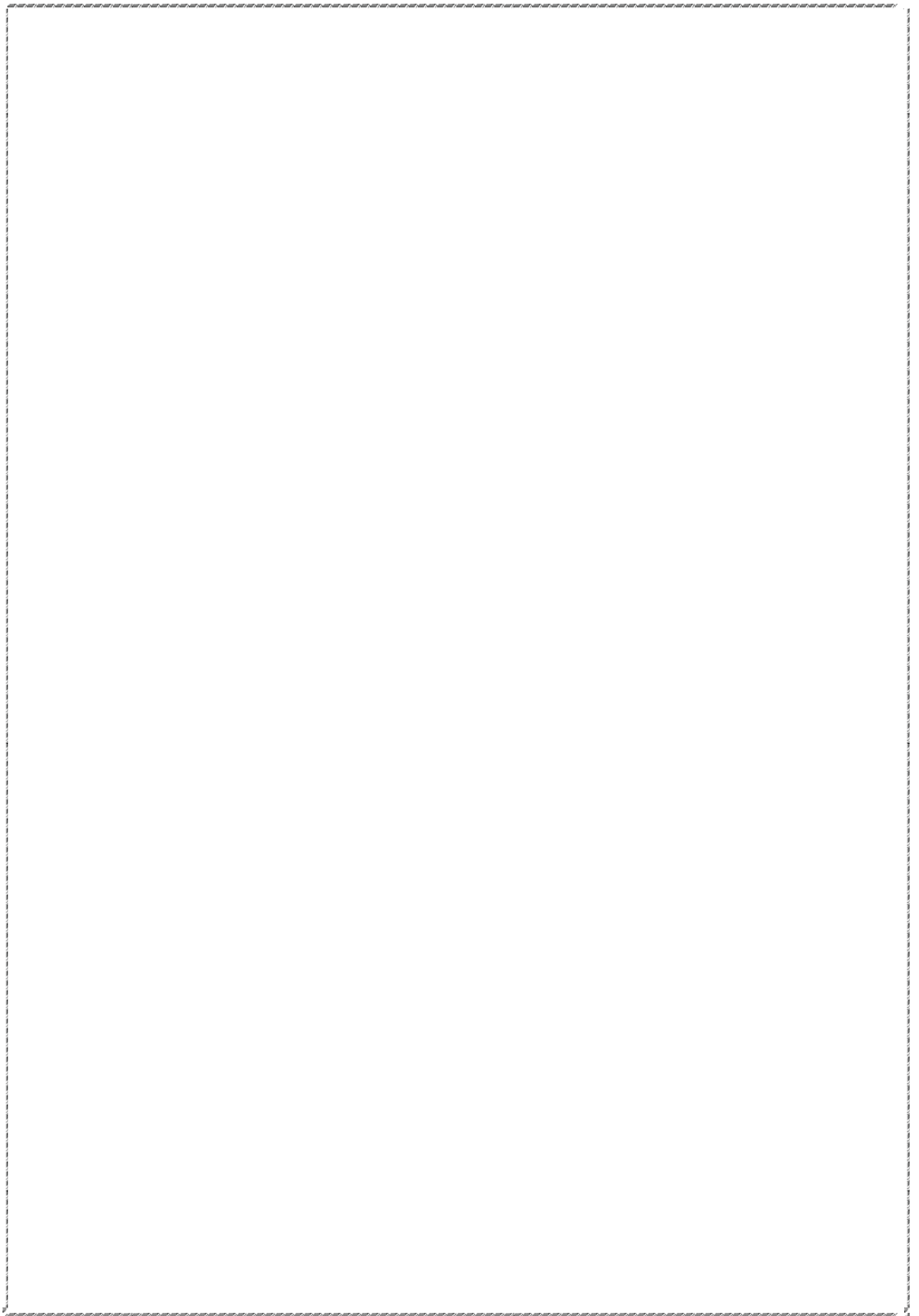
FOLFIRINOX, selon les protocoles mis en place au laboratoire. Dans un premier temps, nous allons réaliser un suivi de l'expression de miR-210-3p à différents cycles du traitement au cours de l'acquisition de la chimiorésistance. Cette expérience nous permettra de mieux comprendre le rôle de miR-210-3p dans la chimiorésistance. Nous supposons, qu'une surexpression précoce ou intermédiaire de miR-210-3p pourrait être associée à la mise en place des mécanismes de résistance, alors qu'une expression tardive serait en faveur d'un rôle de maintien de la chimiorésistance. Dans un second temps, nous allons nous intéresser aux variations des *Inhibitory concentration* (IC50) au cours de l'acquisition de la chimiorésistance dans les cellules surexprimant miR-210-3p ou son inhibiteur anti-miR-210-3p. Ces résultats nous permettront de mettre en évidence le rôle chimiosensibilisateur ou chimiorésistant de miR-210-3p. Ces effets seront ensuite validés en cytométrie en flux (Annexine V).

3. Evaluer *in vivo* le potentiel thérapeutique de miR-210-3p

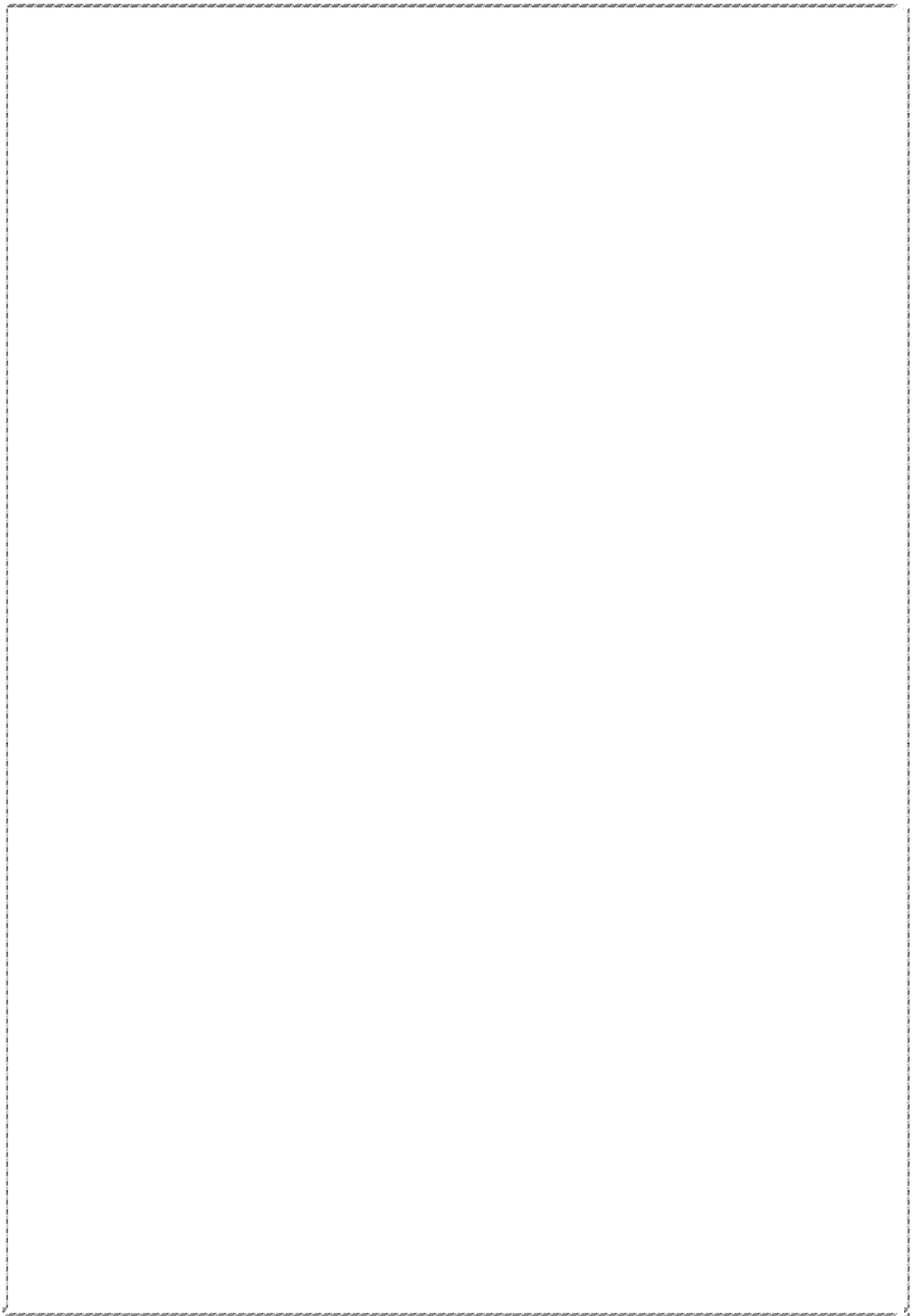
Durant mon travail de thèse, nous avons mis en évidence un potentiel anti-tumoral de miR-210-3p dans notre modèle d'étude. Nous envisageons d'approfondir nos recherches sur le potentiel thérapeutique de miR-210-3p dans le cancer du pancréas. Notre approche *in vivo* consistera en l'injection en intra-tumoral de miR-210-3p dans des tumeurs préalablement greffées sur des souris *C57BL/6*.

Pour cela, nous avons mis au point un modèle d'allogreffes d'organoïdes pancréatiques murins, dans des souris immunocompétentes syngéniques, *C57BL/6*, afin de garder la composante immunitaire et de mimer l'environnement retrouvé dans les tumeurs humaines. En effet, au cours de ma thèse, nous avons réalisé une culture de cellules en 3D dans du Matrigel[®], dite «d'organoïdes», à partir de cellules de pancréas, issues de nos modèles de souris KC traitées à la céruléine. Ensuite, nous avons réalisé des mises au point d'allogreffes d'organoïdes, des souris *C57BL/6* qui n'ont pas été poursuivies en raison du contexte sanitaire lié au Covid-19.

Afin de mettre en évidence le potentiel thérapeutique de miR-210-3p, nous envisageons de réitérer l'expérience, et de réaliser des injections intratumorales d'un vecteur d'expression miR-210, puis d'évaluer ses effets sur la progression carcinogénétique et l'apparition de métastases.



Appendice technique



Tissus et cellules utilisés

Tissus de patients

La cohorte de tissus de patients est constituée de neuf échantillons appariés issus de tumeurs pancréatiques (PDAC) et des tissus sains adjacents correspondants. Les échantillons tissulaires ont été collectés auprès de patients atteints de PDAC à l'hôpital universitaire de Lille (Lille, France) (Tréhoux, 2015). Une partie des tumeurs réséquées a été immédiatement fixée dans le formaldéhyde et incluse en paraffine. Les patients n'avaient reçu aucune chimiothérapie avant la chirurgie. Chaque patient a signé un consentement éclairé de non-opposition à l'utilisation de l'échantillon biologique à des fins de recherche.

Modèle murin *Pdx-1 –Cre/KrasG12D*

Ce modèle préclinique du cancer du pancréas a été développé par Hingorani et collaborateurs (Hingorani, 2003) afin de reproduire les étapes précoces de la cancérogenèse pancréatique. Ils ont utilisé la technologie Cre-Lox, basé sur le principe de la recombinaison homologue, pour générer des souris transgéniques porteuses de la mutation activatrice du gène Kras (G12D) spécifiquement au niveau pancréatique. Pour cela, un croisement a été réalisé entre des souris porteuses de l'allèle *LstopL-KrasG12D* possédant en amont un codon stop flanqué de sites Lox P, avec des souris exprimant une recombinaise CRE sous le contrôle du promoteur Pdx-1, un facteur de transcription exprimé spécifiquement dans les cellules pancréatiques. Les souris *Pdx-1 –Cre/KrasG12D* (KC) expriment la forme mutée Kras G12D, suite à l'excision de la cassette « Stop » par l'action de la recombinaise CRE. Dès l'âge de trois à six semaines, ces souris développent des lésions PanINs semblables aux PanINs humaines avec une progression histologique du stade PanIN de bas grade au stade PanIN de haut grade.

Afin d'induire une progression des PanINs vers un stade PDAC, les souris KC ont été traitées à la céruléine, un agent inducteur de pancréatite aiguë. Des injections intrapéritonéales d'une solution de céruléine à 37,5 µg/ml ont été réalisées sur des souris KC et des souris témoins WT âgées de 6 mois en suivant deux étapes de traitement. D'abord, un traitement aigu avec une injection toutes les heures

pendant 6h (1er jour) suivi d'un traitement chronique avec une injection tous les jours (5 jours par semaine) pendant 59 jours. Les souris sont ensuite sacrifiées et une partie de leurs pancréas est fixée dans du formaldéhyde avant d'être incluse en paraffine. Toutes les procédures étaient conformes aux directives du comité de protection des animaux (#00422.02) suivant la règle des 3R.

Nous avons constitué une cohorte de tissus pancréatiques murins à partir de pancréas de souris KC âgées de 3, 6, 9, 12 mois, de souris traitées à la céruléine, et de souris wild-type (WT) contrôles. Chaque groupe est constitué de 6 souris.

Lignées cellulaires pancréatiques humaines :

Les HPDE

La lignée (*Human Pancreatic Ductal Epithelial Cells*) est dérivée de cellules pancréatiques canalaire humaines non tumorales d'une patiente âgée de 63 ans. Ces cellules sont immortalisées par transduction d'un vecteur rétroviral exprimant les gènes *E6* et *E7* du papilloma virus humain (HPV)-16 (Liu, 1998). Les HPDE ont été obtenues auprès du Dr M.S. Tsao (Centre Médical Universitaire du Nebraska, UNMC, USA).

Les PANC89 ou T3M-4 : (RRID:CVCL_4056)

La lignée cellulaire cancéreuse humaine PANC89 est dérivée de métastase des ganglions lymphatiques d'un patient asiatique âgé de 64 ans. Elles ont été obtenues auprès du Dr FX Real (CNIO, Madrid).

Les PANC-1 (ATCC® CRL-1469™)

La lignée cellulaire cancéreuse humaine PANC-1 est dérivée de tumeur primaire de carcinome épithélioïde d'un patient caucasien âgé de 56 ans.

Les MIA PaCa-2 (ATCC® CRM-CRL-1420™)

La lignée cellulaire cancéreuse MIA PaCa-2 est dérivée de tumeur primaire d'adénocarcinome pancréatique d'un patient caucasien âgé de 65 ans.

Les BxPc-3 (ATCC® CRL-1687™)

La lignée cellulaire cancéreuse BxPC-3 est dérivée d'un adénocarcinome du corps du pancréas d'une femme caucasienne, âgée de 61 ans.

Les 647-V : (RRID:CVCL_1049)

La lignée cellulaire urothéliale, 647-V a été établie à partir de tumeur primaire de carcinome urothélial issue d'un patient caucasien âgé de 59 ans. Les 647-V ont été obtenues auprès du Dr FX Real (CNIO, Madrid). Ces cellules expriment MUC4 et ne sont pas mutées *SMAD4*.

Les modèles cellulaires MUC4-KD

Les modèles cellulaires 647-V et PANC89 *MUC4-KD* ont été établis par ARN interférence (pRetroSuper MUC4 ShRNA). Le modèle contrôle *Mock* a été obtenu par transfection stable du vecteur vide (Jonckheere et al., 2012).

Les caractéristiques et les principales mutations des lignées cellulaires cancéreuses suscitées sont présentées dans le tableau 7. Les lignées cellulaires sont maintenues en culture à 37°C sous 5 % de CO₂. Les conditions de culture sont résumées dans le tableau 8.

Tableau 7 : Caractéristiques des lignées cancéreuses pancréatiques. Adapté de Sipos *et al.*, 2003.

Lignée	Origine	Grade	<i>KRAS</i>	DPC4 <i>SMAD4</i>	MUC4
PANC89	Métastase des ganglions lymphatiques	G2	Muté	WT	Exprimé
BxPc-3	Tumeur primaire	G2	WT	Muté	Exprimé
PANC-1	Tumeur primaire	G3	Muté	WT	Non exprimé
MIA PaCa-2	Tumeur primaire	G3	Muté	WT	Non exprimé

WT: Wild-type (allèle sauvage)

Tableau 8 : Composition du milieu de culture des différentes lignées cellulaires

Lignées cellulaires	Composition du milieu de culture
HPDE	Milieu keratinocyte, 50 µg/mL d'extrait pituitaire bovin ,5 ng/mL d'EGF recombinant, 100 unité/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine
PANC89 / Capan-1	Milieu RPMI 1640, 15 % SVF, 2 mM L-glutamine, 100 u/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine
PANC89 Mock et MUC4-KD	Milieu RPMI 1640, 15% SVF, 2 mM L-glutamine, 100 u/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine, 300 µg/ mL G418
PANC-1/ MIA PaCa-2	DMEM, L-Glutamine 2 mM, 10 % (v/v) SVF 100 u/ml de pénicilline et 100 µg/ml streptomycine
BxPc-3	Milieu RPMI 1640 ,10 % SVF (v/v), 2 mM L-glutamine, 100 u/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine, 1 mM pyruvate
647-V	Milieu RPMI 1640, 10 % SVF (v/v), 2 mM L-glutamine, 100 u/mL pénicilline, 100 µg/mL, streptomycine
647-V Mock et MUC4-KD-	Milieu RPMI 1640, 10 % SVF (v/v), 2 mM L-glutamine, 100 u/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine, 300 µg/ mL G418

Établissement de lignées cellulaires stables miR-210

Avec la collaboration du Dr Mouloud Souidi, ingénieur d'étude au sein de notre laboratoire, nous avons établi des lignées cellulaires stables de surexpression et d'inhibition de miR-210 en utilisant la stratégie d'édition du génome Crispr-Cas9. Le système Crispr-Cas9 est un nouveau système simple, rapide et efficace pour couper l'ADN à un endroit précis du génome, dans n'importe quelle cellule. Il est constitué d'un « ARN guide », qui cible une séquence d'ADN particulière, associé à l'enzyme Cas9, qui, comme des ciseaux moléculaires, coupe l'ADN. En présence d'une séquence d'ADN synthétique apportée expérimentalement dans la cellule, le processus de réparation d'ADN l'intègre au niveau de la coupure.

Nous avons utilisé cette technique afin d'introduire nos constructions d'intérêts dans le site AAVS1 (Adeno-associated virus integration site1) situé au niveau du chromosome 19. Ce site est neutre de toute activité transcriptionnelle. A la différence des stratégies de surexpression basées sur la transduction lentivirale, notre approche exclut le risque de mutagenèse insertionnelle et donc tout faux positif. Globalement, l'établissement des lignées stables AAVS1-miR-210 a nécessité : (1) la synthèse des différentes constructions de façon à ce qu'elles soient présent en charge par la machinerie cellulaire (2) le clonage des constructions dans le vecteur d'intérêt AAVS1 (3) la transfection des constructions dans les différentes lignées

cellulaires. (4) la dilution limite à une cellule par puits et enfin (5) l'obtention de clones que nous avons caractérisés et validés par des expériences de RT-qPCR et wb.

D'un point de vue technique, nous avons établi les lignées cellulaires stables PANC89 et PANC-1 AAVS1 miR-210-3p et anti-miR-210-3p et leurs contrôles correspondants AAVS1 miR-scramble et anti-miR-control. Pour cela, les ADNs codants pour miR-210-3p, anti-miR-210-3p, miR-scramble et anti-miR-control (tableau 9) ont été clonés dans le vecteur d'expression pAAVS1-shRNA (#82697 Addgene), sous le promoteur U6. Le vecteur d'expression a ensuite été co-transfecté avec pCas9_GFP (#44719 Addgene) et l'ARN guide AAVS1 (#41824 Addgene) en utilisant le réactif de transfection Lipofectamine 3000™ (Thermo Fisher Scientific) selon les instructions du fabricant. Les cellules PANC89 et PANC-1 positives ont été sélectionnées en utilisant 2 µg/mL de puromicine (Promega) en traitement chronique. Des expériences de géotypage par PCR ont ensuite été réalisées pour valider l'insertion des constructions. L'expression du miR-210-3p mature a été analysée par RT-qPCR.

Les lignées cellulaires stables Capan-1 LV-miR-neg et Capan-1 LV-miR-210 ont été obtenues par collaboration avec le Dr J. Torrisani (CRCT, Toulouse, France) comme décrit précédemment dans (Lahdaoui et al., 2015).

Tableau 9 : Séquences de blocks d'ADN utilisés pour l'établissement des lignées stables.

Block	Orientation	Séquences (5' -> 3')
miR-scamble	Sens	5'- CCGGTACACCATGTTGCCAGTCTCTAGGTGGGCGTATAGACGTGTTACACTGT GAAGCCACAGATGTGTAACACGTCTATACGCCCATGGCGTCTGGCCCAACCAC ACTTTTTG-3'
	Anti-sens	5'- AATTCAAAAAGTGTGGTTGGGCCAGACGCCATGGGCGTATAGACGTGTTACAC ATCTGTGGCTTCACAGTGTAAACACGTCTATACGCCACCTAGAGACTGGCAAC ATGGTGTA -3'
miR-210-3p	Sens	5'- CCGGTACACCATGTTGCCAGTCTCTAGGAGCCCCTGCCACCGCACACTGTGT GAAGCCACAGATCTGTGCGTGTGACAGCGGCTGATGGCGTCTGGCCCAACCA CACTTTTTG -3'
	Anti-sens	5'- AATTCAAAAAGTGTGGTTGGGCCAGACGCCATCAGCCGCTGTCACACGCACAG ATCTGTGGCTTCACACAGTGTGCGGTGGGCAGGGGCTCCTAGAGACTGGCAA CATGGTGTA-3'
Anti-miR -control	Sens	5'- CCGGTAGAGCTCCCTTCAATCCAAGTGAAGAGCTCCCTTCAATCCAACGCGTA GAGCTCCCTTCAATCAAATCGAGAGCTCCCTTCAATCCAACGCGTAGAGCTC CCTTCAATCCAAGTGAAGAGCTCCCTTCAATCCAACGCGTAGAGCTCCCTTCA ATCCAATCGAGAGCTCCCTTCAATCCAATTTTTG-3'
	Anti-sens	5'- AATTCAAAAATTGGATTGAAGGGAGCTCTCGATTTGGATTGAAGGGAGCTCTAC GCGTTGGATTGAAGGGAGCTCTTCACTTGGATTGAAGGGAGCTCTACGCGTTG GATTGAAGGGAGCTCTCGATTTGGATTGAAGGGAGCTCTACGCGTTGGATTGA AGGGAGCTCTTCACTTGGATTGAAGGGAGCTCTA-3'
Anti-miR- 210-3p	Sens	5'- CCGGTTCAGCCGCTGTCACACGCACAGGTGATCAGCCGCTGTCACACGCACA GCGCGTTCAGCCGCTGTCACACGCACAGATCGTCAGCCGCTGTCACACGCAC AGCGCGTTCAGCCGCTGTCACACGCACAGGTGATCAGCCGCTGTCACACGCAC CAGCGCGTTCAGCCGCTGTCACACGCACAGATCGTCAGCCGCTGTCACACGC ACAGTTTTTG-3'
	Anti-sens	5'- AATTCAAAAAGTGTGCGTGTGACAGCGGCTGACGATCTGTGCGTGTGACAGCG GCTGAACGCGCTGTGCGTGTGACAGCGGCTGATCACCTGTGCGTGTGACAGC GGCTGAACGCGCTGTGCGTGTGACAGCGGCTGACGATCTGTGCGTGTGACAG CGGCTGAACGCGCTGTGCGTGTGACAGCGGCTGATCACCTGTGCGTGTGACA GCGGCTGAA-3'
SgRNA AAVS1		5'-GGGGCCACTAGGGACAGGATTGG-3'

Traitements chimiothérapeutiques

Les cellules sontensemencées en plaque 96 puits à raison de 10^4 cellules par puits et traitées à la gemcitabine pendant 72 h. Les concentrations de drogues IC50 (*Inhibition Concentration 50*) utilisées ont été précédemment déterminées au laboratoire et confirmées par une gamme de concentration croissante de chimiothérapies (20 nM pour les PANC89, 2 μ M pour les PANC-1). La sensibilité de

ces cellules aux traitements chimiothérapeutiques a été évaluée à l'aide de tests MTT.

Transfection cellulaire

La surexpression transitoire de miR-210-3p dans cellules cancéreuses pancréatiques PANC89, PANC-1 et MIA PaCa-2 a été réalisée en utilisant 30 nM de pre-miRTM mimics miR-210 ou miR-scramble contrôle et l'agent de transfection inverse siPORTTM NeoFX (Ambion, Thermo Fisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur. L'efficacité de la transfection a ensuite été évaluée par RT-qPCR.

L'inhibition transitoire de la sous unité p50 de NF- κ B dans les cellules cancéreuses PANC89 a été réalisée en utilisant 5 μ M de siRNA (NF- κ B1, Dharmacon Thermo Fisher Scientific) ou le siRNA contrôle (NT), suivant les instructions du fabricant. L'efficacité de la transfection a ensuite été évaluée par western blot.

La cotransfection de 1 μ g de plasmide rapporteur luciférase contenant le 3'-UTR de MUC4, pGL3-MUC4-3'UTR (Promega), préalablement établi au laboratoire (Lahdaoui et al., 2015), avec 30 nM de pre-miR-210 (Ambion) a été réalisée à l'aide du réactif de transfection Lipofectamine 3000TM (Thermo Fisher Scientific). Une mesure d'activité luciférase a été effectuée 48 h après la transfection.

La transfection du vecteur d'expression luciférase sous le contrôle d'un promoteur synthétique contenant des éléments de réponse NF- κ B (κ B-Luc) a été réalisée avec le réactif de transfection Lipofectamine 3000TM (Thermo Fisher Scientific). Un test d'activité luciférase a été réalisé 48 h après la transfection.

Test MTT

La viabilité cellulaire a été mesurée (1) dans les cellules surexprimant transitoirement ou stablement miR-210-3p, l'anti-miR-210-3p ou leurs contrôles respectifs le miR-scramble et l'anti-miR-control (2) dans des cellules surexprimant transitoirement miR-210-3p ou miR-scramble, traitées ou pas à la gemcitabine. En temps voulu (96 h post transfection et 72 h post traitement à la gemcitabine), 0,5 ng/mL d'une solution de sel de tetrazolium ou MTT (Sigma-Aldrich) est rajouté au

milieu de culture et incubé pendant 1 h. Les cristaux de formazan, formés par le métabolisme du MTT au niveau mitochondrial, ont été dissous à l'aide de 100 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich). La densité optique a été mesurée à 570 nm à l'aide du spectrophotomètre pour microplaques Multiskan™ FC (Thermo Scientific™).

Prolifération cellulaire

L'IncuCyte® (IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System, Essen Bioscience) est un système d'imagerie et d'analyse de cellules vivantes en temps réel qui permet une quantification automatisée et une étude continue du comportement cellulaire. Afin d'étudier la prolifération cellulaire, 10^4 cellules par puits sontensemencées dans des plaques 96 puits puis placées dans l'IncuCyte® à 37 °C en atmosphère humide avec 5 % de CO₂. La confluence cellulaire est mesurée toutes les 12 h pendant 96 h. Les résultats sont normalisés par rapport aux conditions contrôles miR-scramble et anti-miR-210-3p.

Test de migration par fermeture de blessure

Les cellules sontensemencées à 3×10^5 cellules par puits dans des plaques 96 puits à fond plat, adaptées à ce test (ImageLock™ plates, Essen Bioscience) et incubées à 37 °C jusqu'à la formation d'un tapis cellulaire confluent. Les blessures sont générées manuellement et de manière homogène dans tous les puits à l'aide du *96-well Wound Maker* (Essen Bioscience). Les plaques sont ensuite placées dans l'IncuCyte® pendant 24 h. La migration cellulaire est évaluée par la mesure du pourcentage de fermeture de la blessure dans chaque puits toutes les 2 h pendant 24 h. Les résultats sont normalisés par rapport aux conditions contrôles miR-scramble et anti-miR-control.

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Un million de cellules PANC89 Mock ou MUC4-KD ont étéensemencées dans une boîte de 10 cm². La fixation des protéines chromatiniennes à l'ADN a été réalisée par l'ajout de 1 % formaldéhyde suivit d'une incubation de 10 minutes à température ambiante. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 0,125 M de glycine incubé pendant 5 minutes. Les cellules ont été lavées avec du PBS 1X, grattées et collectées par centrifugation. La chromatine a été préparée à partir de noyaux

purifiés par deux étapes d'extraction successives à 4 °C pendant 10 minutes, avec [50 mM Hepes/KOH (pH 7.5) ; 140 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 10% Glycérol ; 0.5 % NP-40 ; 0.25% Triton X-100] et [200 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 0.5 mM EGTA ; 10 mM Tris (pH 8.0)]. Les noyaux ont été remis en suspension dans [50 mM Tris (pH 8,0) ; 0,1% SDS ; 1% NP-40 ; 0,1% Na-Deoxycholate ; 10 mM EDTA ; 150 mM NaCl], complétés par un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma, P8340) et soniqués avec le Bioruptor Power-up (Diagenode), ce qui a permis d'obtenir des fragments d'ADN génomique d'une taille globale de 150-300 pb. La chromatine a été récupérée par centrifugation à 14 000 x g pendant 10 min à 4 °C et l'immunoprécipitation a été réalisée pendant une nuit à 4 °C avec des anticorps spécifiques dirigés contre le facteur de transcription NF- κ B p50 (N-19, sc-1191) et le contrôle IgG non spécifique (IgG-HRP bovine anti-chèvre, sc-2350). Les complexes immuns ont été récupérés en ajoutant des billes magnétiques couplées à la protéine G et incubées pendant 2 h à 4°C. Les billes ont été lavées comme suit : Tampon à faible teneur en sel [0,1 % de SDS ; 1 % de Triton X-100 ; 2 mM d'EDTA ; 20 mM de Tris (pH 8,0) ; 150 mM de NaCl] (x2), tampon à forte teneur en sel [0,1 % de SDS ; 1 % de Triton X-100 ; 2 mM d'EDTA ; 20 mM de Tris (pH 8. 0) ; 500 mM NaCl] (x2), tampon de lavage LiCl [10 mM Tris (pH 8.0) ; 1% Na-deoxycholate ; 1% NP-40, 250 mM LiCl ; 1 mM EDTA] (une fois), et TE complété avec 50 mM NaCl (x2). L'élution des complexes de protéines-ADNs a été effectuée à 65°C en utilisant un tampon d'élution (5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA, 10% (v/v) SDS). Après réversion de la fixation avec 5 M de NaCl et digestion des protéines associées à la chromatine avec la protéase-K (Qiagen), l'ADN a été purifié à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel™). Les analyses par RT-qPCR ont été réalisées sur 1 μ l de chromatine à l'aide du kit SsoFast Evagreen Supermix (BioRad) et du thermocycleur CFX96 (Bio-Rad). Les amorces sont énumérées dans le tableau 10. L'enrichissement de la chromatine a été normalisé par rapport aux Input selon les recommandations de Bio-Rad.

Tableau 10 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de ChIP

Position à partir TSS	Orientation	Séquences (5' -> 3')
-159/-282	Sens	5'-GACCACCTCGGGCCGTACCAT-3'
	Anti-sens	5'-CTTTTCTGCACGTCTGCCCG-3'
-262/-419	Sens	5'-CGGGAAGAGGGGCAGCTC-3'
	Anti-sens	5'-ATGGTACGGCCCGAGGTGGTC-3'
-1061/-1170	Sens	5'-CATGGGCTGGTTCGGAAGCTC-3'
	Anti-sens	5'-CATGACCTCCCTGCCTCGG-3'
-1475/-1596	Sens	5'-GGTGCCTGTGAAATTGGCAGGAC-3'
	Anti-sens	5'-GGGACAAGAAGGGGCAAGAGGAC-3'

Extraction d'ARN et RT-qPCR

L'extraction des ARNs totaux est réalisée à l'aide du kit NucleoSpin[®] miRNA (Macherey-Nagel) selon le protocole préconisé par le fournisseur. Les ARNs sont dosés à l'aide du spectrophotomètre NanoVue[™] Plus. La pureté des ARNs est estimée par le calcul des ratios 260 nm/280 nm et 260 nm/230 nm. La mesure de l'expression de miR-210-3p est effectuée par RT-qPCR à l'aide du protocole *TaqMan MicroRNA Assay* (Thermo Fisher Scientific) sur le thermocycleur *CFX96[™] Real-Time System* (Bio-Rad). Brièvement, les ADNs complémentaires (ADNc) sont synthétisés à partir de 5 ng d'ARNs totaux en utilisant des amorces spécifiques TaqMan et le kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription*. La qPCR est réalisée en *triplicat* sur plaque 96 puits. Un volume de 1,33 µl du produit de RT est ajouté dans un mélange réactionnel contenant 1x de *TaqMan Gene Expression Master Mix*, 10 pM d'amorces spécifiques au miR-210-3p (hsa-miR-210-3p, 000512), RNU48 (001006) et snoRNA202 (001232) (Thermo Fisher Scientific). Le volume final est ajusté à 20 µl avec de l'eau stérile. La réaction d'amplification est réalisée selon le programme suivant : un cycle d'activation de l'enzyme à 95 °C pendant 10 min suivi de 40 cycles comportant chacun une étape de dénaturation à 95 °C pendant 15 secondes (s) et une étape d'hybridation/élongation de 60 s à 60 °C. Les données sont analysées grâce au logiciel Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, V.3.0). Les niveaux d'expression de miR-210-3p ont été normalisés sur celles de RNU48 (cellules et tissus humains) ou celle de snoRNA202 (échantillons de souris). Le niveau d'expression des conditions contrôles a arbitrairement été fixé à 1.

Western blotting

Les cellules sont lysées dans du tampon de lyse RIPA (*Radio Immune Precipitation Assay*, Sigma-Aldrich) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Complete miniprotease inhibitor cocktail*, Roche Applied Science). Après le dosage des protéines effectué à l'aide du protocole Bicinchoninique Acid Assay, BCA, (Thermo Fisher Scientific), 20 µg de protéines de chaque lysat sont dénaturés pendant 5 min à 100 °C en présence d'un volume équivalent de la solution de charge *SDS-loading-buffer 2X* (**Tableau 11**). Le mélange est ensuite déposé sur un gel de polyacrylamide NuPAGE® Bis-Tris 4-12 % (Thermo Fisher Scientific) ou sur un gel d'agarose 2 % pour MUC4 (**Tableau 12**). À la fin de l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µm (Amersham) qui est ensuite saturée avec une solution de PBS 1 X contenant 0,2 % de Tween 20 (TBS-T) ainsi que 5 % de lait écrémé pendant 2 h à 20 °C. La membrane est lavée 3 fois avec du TBS-T 1 X pendant 5 min puis incubée avec l'anticorps primaire (**Tableau 13**) pendant une nuit à 4 °C ou 2 h à 20 °C. Après 3 lavages de 5 min avec du TBS-T 1X, la membrane est mise en contact avec l'anticorps secondaire dilué au 1/10000^e pendant 1 h à 20 °C. Après trois derniers lavages, la révélation est réalisée à l'aide du kit *Super Signal WestPico* (Thermo Fisher Scientific) après 5 min d'exposition. L'acquisition d'image est effectuée sur un appareil LAS 4000 (Fujifilm). La quantification des intensités des bandes détectées est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health). La valeur obtenue pour chaque échantillon est normalisée par rapport à la valeur de la protéine contrôle β-actine.

Tableau 11 : Composition du *SDS-loading-buffer 2X*.

Composé	Quantité
Tris-HCl	0.5 M pH 6.8
SDS	4 % (v/v)
β-mercaptoéthanol	10% (v/v)
Glycérol	20 % (v/v)
Bleu de bromophénol	0.5 % (p/v)

Tableau 12 : Composition du gel d'agarose 2 % pour western blot MUC4.

Composé	Quantité
Agarose	2 % (p/v)
Tris-HCL	0.4 % (v/v) de 3M pH 8,8
Sodium Dodécylsulfate (SDS)	0,05 % (v/v)

Tableau 13 : Listes des anticorps de western blot.

Description	Antigène		Quantité de protéines	Source		Dilution
	Nom	Taille (kDa)		Espèce	Clone et fabricant	
Mucine	MUC4	~900	20 µg	m MAb	Clone 8G7 SCBT	1/200 ^e TBS-T
Voie PI3K/Akt	Phospho-Akt (Ser473)	60		m PAb	p-AKT 587F11 CST	1/500 ^e TBS-T
	Pan-Akt			r PAb	Akt 9272# CST	
Cycle Cellulaire	Cycline D1	35		r PAb	M-20 sc 718 SCBT	1/500 ^e TBS-T
Voie du TGF β	SMAD2/3	55		g PAb	N-19 sc 6030 SCBT	1/500 ^e TBS-T
Protéine contrôle	β actine	42		m MAb	AC-15 SCBT	1/5000 ^e TBS-T

m = mouse, r = rabbit, Mab = Anticorps monoclonal, g = chèvre, PAb = Anticorps polyclonal, sc = Santa Cruz Biotechnology[®], cst = Cell Signaling Technology[®]

Test d'activité luciférase

Les cellules préalablement transfectées avec un vecteur rapporteur luciférase (pGL3 ou kB-LUC) sont lysées par l'ajout de 110 µl du tampon *Reporter Lysis Buffer* (RLB, Promega) suivi d'une incubation 15 minutes à 37°C. Les lysats sont centrifugés à 14 000 x g pendant 2 min à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines totales est récupéré dans un tube de 1,5 ml et un dosage protéique BCA est réalisé sur 4 µl d'échantillon. L'activité luciférase a été évaluée dans 20 µl d'échantillon après apport extemporané de son substrat le *Luciferase Assay Reagent* (Promega) à l'aide du luminomètre Mithras LB 904 (Berthold Technologies). Les activités luciférase mesurées sont rapportées à la quantité de protéines totales de chaque échantillon.

Xénogreffes

Nous avons utilisé comme modèle animal des souris mâles CB17-SCID immuno-déficientes âgées de 7 semaines. Elles sont fournies par JANVIER LABS. Les xénogreffes sont réalisées par injection en sous cutanées de 10^6 cellules Capan-1 LV-miR-neg et LV-miR-210-3p (pLenti4/TO/GFP-miR-210) dans un volume de 200 μ l contenant 100 μ l de Matrigel[®] (Corning) et 100 μ l de milieu de culture RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific). Le volume tumoral de chaque xénogreffe est mesuré deux fois par semaine. Cette procédure est réalisée en accord avec le comité éthique CEEA75 (protocole 12.2012). Nous disposons de 6 souris par condition.

Immunohistochimie

Manuelle

Des sections de 5 μ m de tissus pancréatiques de souris KC et WT âgées de 3 à 12 mois ou traitées à la céruléine ont été utilisées pour réaliser des marquages immunohistochimiques de Muc4. Après déparaffinage et inhibition des peroxydases endogènes Les lames ont été incubées dans du tampon de blocage, *blocking reagent*, fourni dans le kit M.O.M. (Vector Laboratories). Les lames sont incubées 30 min à température ambiante avec un volume de 100 μ l d'anticorps primaire anti-Muc4 (1G8, sc-33654) dilué au 1/200^{ème} dans la solution de dilution commerciale M.O.M (kit M.O.M, Vector Laboratories). Après avoir rincé quatre fois les lames au PBS 1X, un volume de 100 μ l d'anticorps secondaire anti-souris biotinylé (*M.O.M. biotinylated anti-mouse IgG reagent*, kit M.O.M.) est appliqué pendant 10 min à T° ambiante. Quatre lavages de 5 min dans du PBS 1X sont réalisés. Les lames sont incubées pendant 5 min à température ambiante dans la solution VECTASTAIN[®] ABC Reagent (Vector Laboratories) préparée 30 min auparavant selon les instructions du fournisseur. Les lames sont rincées six fois pendant 5 min dans du PBS 1X. Incubation de 2 à 3 min dans la solution chromogène de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich) préparée 1h auparavant selon les instructions du fournisseur. Les lames sont placées à l'abri de la lumière. Le chromogène est oxydé par la peroxydase et donne un précipité brun insoluble dans l'eau et les solvants organiques. Les lames sont ensuite rincées à l'eau déminéralisée afin d'arrêter la réaction. La contre-coloration est réalisée avec la solution d'hématoxyline (Sigma-Aldrich) pendant 1 min. Les lames sont rincées à

l'eau courante puis dans une solution de carbonate de lithium saturée et de nouveau rincées à l'eau courante. La contre-coloration permet de marquer en bleu les noyaux des cellules. Enfin, les lames sont déshydratées, montées et conservées à température ambiante.

Afin de d'établir les scores d'immunomarquages de Muc4 plusieurs mesures ont été réalisées. La surface des PanINs a été mesurée dans chaque section marquée à l'aide du logiciel ImageJ et d'une macro spécifique et rapportée à la surface totale du tissu. L'immunomarquage a été analysé et un score allant de 1 à 3 a été attribué en fonction de l'intensité du marquage ; faible (1), modérée (2) ou forte (3). Le pourcentage de cellules marquées dans les tissus tumorales (surface couverte de PanINs) a été évalué et scoré de 1 à 4 : 1 (0-25 %), 2 (25-50 %), 3 (50-75 %) et 4 (75-100 %). Le score total de marquage Muc4 a été calculé en multipliant les valeurs de surface de PanINs avec les scores d'intensité et de pourcentage de cellules marquées.

Automate

Des sections de 5 µm de tumeurs Capan-1 LV-miR-neg et LV-miT-210-3p incluses en paraffine ont été utilisées pour réaliser des marquages immunohistochimiques à l'aide du kit de détection *NexES iVIEW DAB* sur l'automate BenchMark GX (Ventana®). Après un déparaffinage suivi d'un traitement avec un inhibiteur des peroxydases endogènes (*iVIEW inhibitor*), l'anticorps primaire anti-Ki-67 (NLC KI67p Novocastra, dilué au 1/1000^e) est appliqué pendant 30 min à 37 °C. Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire (*iVIEW biotinylated Ig mouse and rabbit*) avant d'être mises en contact avec de la streptavidine couplée à la peroxydase de Raifort. Le substrat DAB (3,3-diaminobenzidine) est ensuite ajouté. Une contre-coloration à l'hématoxyline plus *bluing reagent* est réalisée. Les tissus sont ensuite déshydratés puis les lames sont montées. Plusieurs photos représentatives de chaque lame sont prises au grossissement : x10 et x20. Le nombre de cellules Ki-67 positives a été mesuré à l'aide du logiciel ImageJ et rapporté au nombre total de cellules.

Prédiction des miARNs ciblant potentiellement MUC4

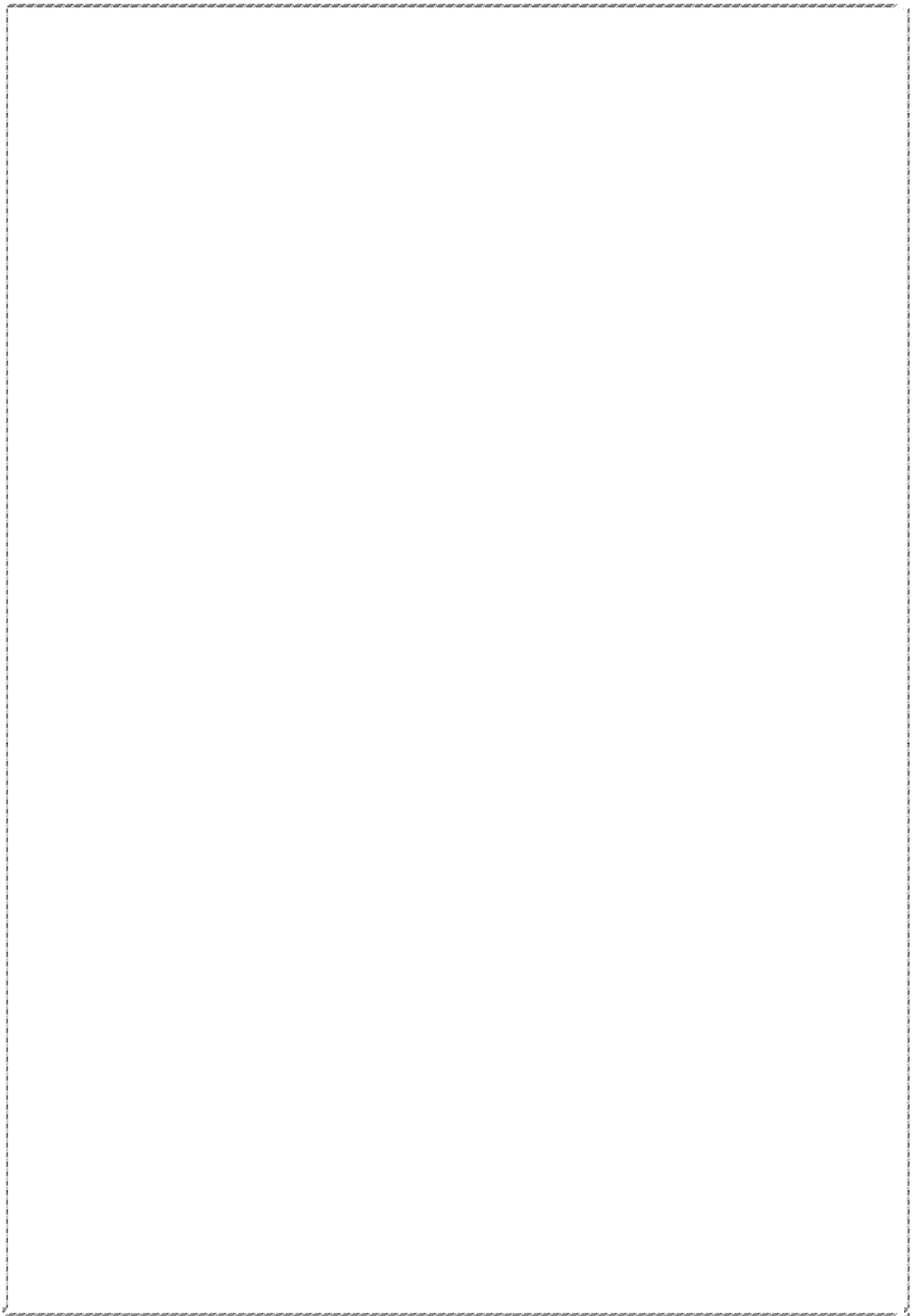
Les prédictions bioinformatiques des cibles potentielles de miR-210-3p ont été effectuées à partir de trois bases de données : *TargetScan* (www.targetscan.org), *Microcosm* (www.ebi.ac.uk/enrightsrv/) *microcosm* et *MiRanda* (www.microrna.org). Les logiciels de prédiction se basent sur plusieurs critères : la complémentarité de la région *seed*, la conservation de cette séquence au cours de l'évolution, et la stabilité de l'interaction.

Analyse des données GEO

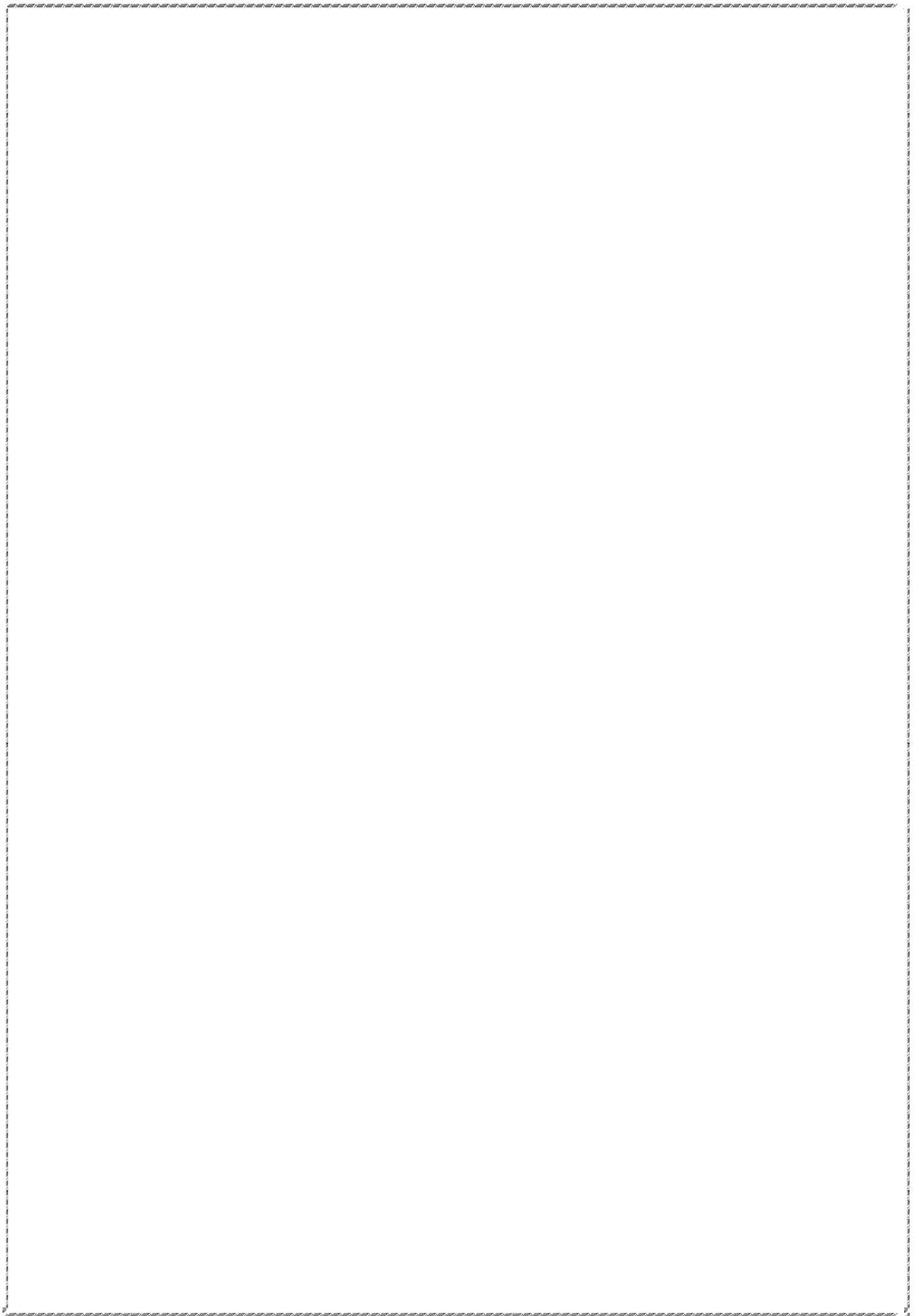
Plusieurs *miRnome* publique du cancer du pancréas ont été analysés à partir de la base de données NCBI *Gene Expression Omnibus* (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Le profil d'expression des miR-96-5p, miR-132-3p et miR-210-3p ont été analysés à l'aide du logiciel *GEO2R analyser*.

Tests statistiques

Les analyses statistiques ANOVA, t-tests et tests de corrélation (Spearman et Pearson) ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 4. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes d'un *triplicat* d'expériences indépendantes.



Bibliographie



A

1. Abdelfattah, A.M., Park, C., Choi, M.Y., 2014. Update on non-canonical microRNAs. *Biomol Concepts* 5, 275–287. <https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0012>
2. Abe, K., Kitago, M., Kitagawa, Y., Hirasawa, A., 2021. Hereditary pancreatic cancer. *Int J Clin Oncol* 26, 1784–1792. <https://doi.org/10.1007/s10147-021-02015-6>
3. Ahmed Ali, U., Issa, Y., Hagensars, J.C., Bakker, O.J., van Goor, H., Nieuwenhuijs, V.B., Bollen, T.L., van Ramshorst, B., Witteman, B.J., Brink, M.A., Schaapherder, A.F., Dejong, C.H., Spanier, B.W.M., Heisterkamp, J., van der Harst, E., van Eijck, C.H., Besselink, M.G., Gooszen, H.G., van Santvoort, H.C., Boermeester, M.A., Dutch Pancreatitis Study Group, 2016. Risk of Recurrent Pancreatitis and Progression to Chronic Pancreatitis After a First Episode of Acute Pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 14, 738–746. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2015.12.040>
4. Amrutkar, M., Gladhaug, I.P., 2017. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers* 9, 157. <https://doi.org/10.3390/cancers9110157>
5. Andea, A., Sarkar, F., Adsay, V.N., 2003. Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 16, 996–1006. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000087422.24733.62>
6. Andrianifahanana, M., Agrawal, A., Singh, A.P., Moniaux, N., van Seuning, I., Aubert, J.-P., Meza, J., Batra, S.K., 2005. Synergistic induction of the MUC4 mucin gene by interferon-gamma and retinoic acid in human pancreatic tumour cells involves a reprogramming of signalling pathways. *Oncogene* 24, 6143–6154. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208756>
7. Andrianifahanana, M., Singh, A.P., Nemos, C., Ponnusamy, M.P., Moniaux, N., Mehta, P.P., Varshney, G.C., Batra, S.K., 2007. IFN-gamma-induced expression of MUC4 in pancreatic cancer cells is mediated by STAT-1 upregulation: a novel mechanism for IFN-gamma response. *Oncogene* 26, 7251–7261. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210532>
8. Arteaga, C.L., Engelman, J.A., 2014. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* 25, 282–303. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.025>
9. Aslanian, H.R., Lee, J.H., Canto, M.I., 2020. AGA Clinical Practice Update on Pancreas Cancer Screening in High-Risk Individuals: Expert Review. *Gastroenterology* 159, 358–362. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.088>

10. Avraham, R., Yarden, Y., 2011. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 104–117. <https://doi.org/10.1038/nrm3048>

11. Ayres Pereira, M., Chio, I.I.C., 2019. Metastasis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current Standing and Methodologies. *Genes (Basel)* 11, 6. <https://doi.org/10.3390/genes11010006>

B

12. Bafna, S., Kaur, S., Batra, S.K., 2010. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene* 29, 2893–2904. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.87>

13. Bailey, P., Chang, D.K., Nones, K., Johns, A.L., Patch, A.-M., Gingras, M.-C., Miller, D.K., Christ, A.N., Bruxner, T.J.C., Quinn, M.C., Nourse, C., Murtaugh, L.C., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourbakhsh, E., Wani, S., Fink, L., Holmes, O., Chin, V., Anderson, M.J., Kazakoff, S., Leonard, C., Newell, F., Waddell, Nick, Wood, S., Xu, Q., Wilson, P.J., Cloonan, N., Kassahn, K.S., Taylor, D., Quek, K., Robertson, A., Pantano, L., Mincarelli, L., Sanchez, L.N., Evers, L., Wu, J., Pinese, M., Cowley, M.J., Jones, M.D., Colvin, E.K., Nagrial, A.M., Humphrey, E.S., Chantrill, L.A., Mawson, A., Humphris, J., Chou, A., Pajic, M., Scarlett, C.J., Pinho, A.V., Giry-Laterriere, M., Rooman, I., Samra, J.S., Kench, J.G., Lovell, J.A., Merrett, N.D., Toon, C.W., Epari, K., Nguyen, N.Q., Barbour, A., Zeps, N., Moran-Jones, K., Jamieson, N.B., Graham, J.S., Duthie, F., Oien, K., Hair, J., Grützmann, R., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C.A., Wolfgang, C.L., Morgan, R.A., Lawlor, R.T., Corbo, V., Bassi, C., Rusev, B., Capelli, P., Salvia, R., Tortora, G., Mukhopadhyay, D., Petersen, G.M., Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Munzy, D.M., Fisher, W.E., Karim, S.A., Eshleman, J.R., Hruban, R.H., Pilarsky, C., Morton, J.P., Sansom, O.J., Scarpa, A., Musgrove, E.A., Bailey, U.-M.H., Hofmann, O., Sutherland, R.L., Wheeler, D.A., Gill, A.J., Gibbs, R.A., Pearson, J.V., Waddell, Nicola, Biankin, A.V., Grimmond, S.M., 2016. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 531, 47–52. <https://doi.org/10.1038/nature16965>

14. Bajan, S., Hutvagner, G., 2014. Regulation of miRNA processing and miRNA mediated gene repression in cancer. *Microna* 3, 10–17. <https://doi.org/10.2174/2211536602666140110234046>

15. Balcazar Morales, N., Aguilar de Plata, C., n.d. Role of AKT/mTORC1 pathway in pancreatic β -cell proliferation. *Colomb Med (Cali)* 43, 235–243.

16. Bartel, D.P., 2018. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173, 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
17. Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
18. Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
19. Basturk, O., Adsay, V., Askan, G., Dhall, D., Zamboni, G., Shimizu, M., Cymes, K., Carneiro, F., Balci, S., Sigel, C., Reid, M.D., Esposito, I., Baldaia, H., Allen, P., Klöppel, G., Klimstra, D.S., 2017. Intraductal Tubulopapillary Neoplasm of the Pancreas: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Analysis of 33 Cases. *Am J Surg Pathol* 41, 313–325. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000782>
20. Basturk, O., Hong, S.-M., Wood, L.D., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A.V., Brosens, L.A.A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R.H., Kato, Y., Klimstra, D.S., Klöppel, G., Krasinskas, A., Longnecker, D.S., Matthaei, H., Offerhaus, G.J.A., Shimizu, M., Takaori, K., Terris, B., Yachida, S., Esposito, I., Furukawa, T., Baltimore Consensus Meeting, 2015. A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am J Surg Pathol* 39, 1730–1741. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000533>
21. Basturk, O., Khayyata, S., Klimstra, D.S., Hruban, R.H., Zamboni, G., Coban, I., Adsay, N.V., 2010. Preferential expression of MUC6 in oncocytic and pancreatobiliary types of intraductal papillary neoplasms highlights a pyloropancreatic pathway, distinct from the intestinal pathway, in pancreatic carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 34, 364–370. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181cf8bb6>
22. Beg, M.S., Brenner, A.J., Sachdev, J., Borad, M., Kang, Y.-K., Stoudemire, J., Smith, S., Bader, A.G., Kim, S., Hong, D.S., 2017. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 35, 180–188. <https://doi.org/10.1007/s10637-016-0407-y>
23. Biasiolo, M., Sales, G., Lionetti, M., Agnelli, L., Todoerti, K., Bisognin, A., Coppe, A., Romualdi, C., Neri, A., Bortoluzzi, S., 2011. Impact of host genes and strand selection on miRNA and miRNA* expression. *PLoS One* 6, e23854. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023854>
24. Bortoluzzi, S., Bisognin, A., Biasiolo, M., Guglielmelli, P., Biamonte, F., Norfo, R., Manfredini, R., Vannucchi, A.M., AGIMM (Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro–Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative) Investigators, 2012.

Characterization and discovery of novel miRNAs and moRNAs in JAK2V617F-mutated SET2 cells. *Blood* 119, e120-130. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-368001>

25. Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, R.H., Theise, N.D., 2010. WHO classification of tumours of the digestive system. WHO classification of tumours of the digestive system.

26. Bouchie, A., 2013. First microRNA mimic enters clinic. *Nat Biotechnol* 31, 577. <https://doi.org/10.1038/nbt0713-577>

27. Busnardo, A.C., DiDio, L.J., Tidrick, R.T., Thomford, N.R., 1983. History of the pancreas. *Am. J. Surg.* 146, 539–550. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(83\)90286-6](https://doi.org/10.1016/0002-9610(83)90286-6)

C

28. Campbell, J.E., Newgard, C.B., 2021. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 142–158. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00317-7>

29. Campbell, P.J., Yachida, S., Mudie, L.J., Stephens, P.J., Pleasance, E.D., Stebbings, L.A., Morsberger, L.A., Latimer, C., McLaren, S., Lin, M.-L., McBride, D.J., Varela, I., Nik-Zainal, S.A., Leroy, C., Jia, M., Menzies, A., Butler, A.P., Teague, J.W., Griffin, C.A., Burton, J., Swerdlow, H., Quail, M.A., Stratton, M.R., Iacobuzio-Donahue, C., Futreal, P.A., 2010. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 467, 1109–1113. <https://doi.org/10.1038/nature09460>

30. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: andrew_aguirre@dfci.harvard.edu, Cancer Genome Atlas Research Network, 2017. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 32, 185-203.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.007>

31. Carraway, C.C., Komatsu, M., Jepson, S., Arango, M., Carraway, K., 2001. Muc4/sialomucin Complex, A Specific Intramembrane Modulator of ERBB2/HER2/NEU, Potentiates Primary Tumor Growth and Suppresses Apoptosis in A Xenotransplanted Melanoma. *ScientificWorldJournal* 1, 149. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.23.248>

32. Carraway, K.L., Cantley, L.C., 1994. A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* 78, 5–8. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90564-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90564-9)

33. Carraway, K.L., Theodoropoulos, G., Kozloski, G.A., Carothers Carraway, C.A., 2009. Muc4/MUC4 functions and regulation in cancer. *Future Oncol* 5, 1631–1640. <https://doi.org/10.2217/fon.09.125>
34. Catalanotto, C., Cogoni, C., Zardo, G., 2016. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci* 17, E1712. <https://doi.org/10.3390/ijms17101712>
35. Cech, T.R., Steitz, J.A., 2014. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell* 157, 77–94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.008>
36. Chan-Seng-Yue, M., Kim, J.C., Wilson, G.W., Ng, K., Figueroa, E.F., O’Kane, G.M., Connor, A.A., Denroche, R.E., Grant, R.C., McLeod, J., Wilson, J.M., Jang, G.H., Zhang, A., Dodd, A., Liang, S.-B., Borgida, A., Chadwick, D., Kalimuthu, S., Lungu, I., Bartlett, J.M.S., Krzyzanowski, P.M., Sandhu, V., Tiriach, H., Froeling, F.E.M., Karasinska, J.M., Topham, J.T., Renouf, D.J., Schaeffer, D.F., Jones, S.J.M., Marra, M.A., Laskin, J., Chetty, R., Stein, L.D., Zogopoulos, G., Haibe-Kains, B., Campbell, P.J., Tuveson, D.A., Knox, J.J., Fischer, S.E., Gallinger, S., Notta, F., 2020. Transcription phenotypes of pancreatic cancer are driven by genomic events during tumor evolution. *Nat Genet* 52, 231–240. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0566-9>
37. Chari, S.T., Kelly, K., Hollingsworth, M.A., Thayer, S.P., Ahlquist, D.A., Andersen, D.K., Batra, S.K., Brentnall, T.A., Canto, M., Cleeter, D.F., Firpo, M.A., Gambhir, S.S., Go, V.L.W., Hines, O.J., Kenner, B.J., Klimstra, D.S., Lerch, M.M., Levy, M.J., Maitra, A., Mulvihill, S.J., Petersen, G.M., Rhim, A.D., Simeone, D.M., Srivastava, S., Tanaka, M., Vinik, A.I., Wong, D., 2015. Early detection of sporadic pancreatic cancer: summative review. *Pancreas* 44, 693–712. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000368>
38. Chaturvedi, P., Singh, A.P., Chakraborty, S., Chauhan, S.C., Bafna, S., Meza, J.L., Singh, P.K., Hollingsworth, M.A., Mehta, P.P., Batra, S.K., 2008. MUC4 mucin interacts with and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 68, 2065–2070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6041>
39. Cherradi, N., 2016. microRNAs as Potential Biomarkers in Adrenocortical Cancer: Progress and Challenges. *Frontiers in Endocrinology* 6, 195. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00195>
40. Chooi, Y.C., Ding, C., Magkos, F., 2019. The epidemiology of obesity. *Metabolism* 92, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005>
41. Citri, A., Yarden, Y., 2006. EGF–ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 505–516. <https://doi.org/10.1038/nrm1962>

42. Collado-González, M., González Espinosa, Y., Goycoolea, F.M., 2019. Interaction Between Chitosan and Mucin: Fundamentals and Applications. *Biomimetics (Basel)* 4, E32. <https://doi.org/10.3390/biomimetics4020032>
43. Collisson, E.A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W.J., Truitt, M., Gu, S., Cooc, J., Weinkle, J., Kim, G.E., Jakkula, L., Feiler, H.S., Ko, A.H., Olshen, A.B., Danenberg, K.L., Tempero, M.A., Spellman, P.T., Hanahan, D., Gray, J.W., 2011. Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Differing Responses to Therapy. *Nat Med* 17, 500–503. <https://doi.org/10.1038/nm.2344>
44. Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.-L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., Bennouna, J., Bachet, J.-B., Khemissa-Akouz, F., Péré-Vergé, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Ducreux, M., Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer, PRODIGE Intergroup, 2011. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 364, 1817–1825. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>
45. Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A.C., Raoul, J.-L., Choné, L., Francois, E., Artru, P., Biagi, J.J., Lecomte, T., Assenat, E., Faroux, R., Ychou, M., Volet, J., Sauvanet, A., Breysacher, G., Di Fiore, F., Cripps, C., Kavan, P., Texereau, P., Bouhier-Leporrier, K., Khemissa-Akouz, F., Legoux, J.-L., Juzyna, B., Gourgou, S., O'Callaghan, C.J., Jouffroy-Zeller, C., Rat, P., Malka, D., Castan, F., Bachet, J.-B., Canadian Cancer Trials Group and the Unicancer-GI-PRODIGE Group, 2018. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 379, 2395–2406. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775>
46. Corfield, A.P., Carroll, D., Myerscough, N., Probert, C.S., 2001. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci* 6, D1321-1357. <https://doi.org/10.2741/corfield>
47. Crick, F.H., 1958. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* 12, 138–163.

D

48. Dasari, A., Shen, C., Halperin, D., Zhao, B., Zhou, S., Xu, Y., Shih, T., Yao, J.C., 2017. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol* 3, 1335–1342. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0589>
49. Desseyn, J.-L., Tetaert, D., Gouyer, V., 2008. Architecture of the large membrane-bound mucins. *Gene* 410, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.12.014>

50. Dhayat, S.A., Mardin, W.A., Seggewiß, J., Ströse, A.J., Matuszcak, C., Hummel, R., Senninger, N., Mees, S.T., Haier, J., 2015. MicroRNA Profiling Implies New Markers of Gemcitabine Chemoresistance in Mutant p53 Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS One* 10, e0143755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143755>.
51. Di Lella, S., Sundblad, V., Cerliani, J.P., Guardia, C.M., Estrin, D.A., Vasta, G.R., Rabinovich, G.A., 2011. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry* 50, 7842–7857. <https://doi.org/10.1021/bi201121m>.
52. Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., Sherr, C.J., 1998. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12, 3499–3511.
53. Distler, M., Kersting, S., Niedgerthmann, M., Aust, D.E., Franz, M., Rückert, F., Eehalt, F., Pilarsky, C., Post, S., Saeger, H.-D., Grützmann, R., 2013. Pathohistological subtype predicts survival in patients with intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas. *Ann Surg* 258, 324–330. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318287ab73>.

E

54. El Amrani, M., Corfiotti, F., Corvaisier, M., Vasseur, R., Fulbert, M., Skrzypczyk, C., Deshorgues, A.-C., Gnemmi, V., Tulasne, D., Lahdaoui, F., Vincent, A., Pruvot, F.-R., Van Seuningen, I., Huet, G., Truant, S., 2019. Gemcitabine-induced epithelial-mesenchymal transition-like changes sustain chemoresistance of pancreatic cancer cells of mesenchymal-like phenotype. *Mol Carcinog* 58, 1985–1997. <https://doi.org/10.1002/mc.23090>.
55. El Amrani, M., Fulbert, M., Lenne, X., Clément, G., Drumez, E., Pruvot, F.-R., Truant, S., 2018. Do complications following pancreatic resections impact hospital costs in France: Medico-economic study on 127 patients. *J Visc Surg* 155, 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.jviscsurg.2018.04.003>.
56. El Sayed, S.A., Mukherjee, S., 2021. Physiology, Pancreas, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
57. Espiau-Romera, P., Courtois, S., Parejo-Alonso, B., Sancho, P., 2020. Molecular and Metabolic Subtypes Correspondence for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Classification. *J Clin Med* 9, 4128. <https://doi.org/10.3390/jcm9124128>.

F

58. Fabian, M.R., Sonenberg, N., Filipowicz, W., 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 79, 351–379. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060308-103103>.
59. Fauquette, V., Aubert, S., Groux-Degroote, S., Hemon, B., Porchet, N., Van Seuninghen, I., Pigny, P., 2007. Transcription factor AP-2alpha represses both the mucin MUC4 expression and pancreatic cancer cell proliferation. *Carcinogenesis* 28, 2305–2312. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm158>.
60. Fink, D.M., Steele, M.M., Hollingsworth, M.A., 2016. The lymphatic system and pancreatic cancer. *Cancer Lett* 381, 217–236. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.11.048>.
61. Fléjou, J.-F., 2011. [WHO Classification of digestive tumors: the fourth edition]. *Ann Pathol* 31, S27-31. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2011.08.001>.
62. Forman, J.J., Legesse-Miller, A., Collier, H.A., 2008. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14879–14884. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803230105>.
63. Funes, M., Miller, J.K., Lai, C., Carraway, K.L., Sweeney, C., 2006. The mucin Muc4 potentiates neuregulin signaling by increasing the cell-surface populations of ErbB2 and ErbB3. *J Biol Chem* 281, 19310–19319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603225200>.

G

64. Gagnon, K.T., Li, L., Chu, Y., Janowski, B.A., Corey, D.R., 2014. RNAi factors are present and active in human cell nuclei. *Cell Rep* 6, 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.013>
65. Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., Wong, L., Isomura, I., Ho, W., Banerjee, A., 2006. Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* 25, 6781–6799. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209944>
66. Giannakakis, A., Sandaltzopoulos, R., Greshock, J., Liang, S., Huang, J., Hasegawa, K., Li, C., O'Brien-Jenkins, A., Katsaros, D., Weber, B.L., Simon, C., Coukos, G., Zhang, L., 2008. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 7, 255–264. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.2.5297>

67. Gibbins, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., Voinnet, O., 2009. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 11, 1143–1149. <https://doi.org/10.1038/ncb1929>
68. Giovannetti, E., van der Borden, C.L., Frampton, A.E., Ali, A., Firuzi, O., Peters, G.J., 2017. Never let it go: Stopping key mechanisms underlying metastasis to fight pancreatic cancer. *Semin Cancer Biol* 44, 43–59. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.006>
69. Golan, T., Hammel, P., Reni, M., Van Cutsem, E., Macarulla, T., Hall, M.J., Park, J.-O., Hochhauser, D., Arnold, D., Oh, D.-Y., Reinacher-Schick, A., Tortora, G., Algül, H., O'Reilly, E.M., McGuinness, D., Cui, K.Y., Schlienger, K., Locker, G.Y., Kindler, H.L., 2019. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 381, 317–327. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1903387>
70. Gottschalk, A., 1960. Correlation between composition, structure, shape and function of a salivary mucoprotein. *Nature* 186, 949–951. <https://doi.org/10.1038/186949a0>
71. Granados-López, A.J., Ruiz-Carrillo, J.L., Servín-González, L.S., Martínez-Rodríguez, J.L., Reyes-Estrada, C.A., Gutiérrez-Hernández, R., López, J.A., 2017. Use of Mature miRNA Strand Selection in miRNAs Families in Cervical Cancer Development. *Int J Mol Sci* 18, E407. <https://doi.org/10.3390/ijms18020407>
72. Greither, T., Grochola, L.F., Udelnow, A., Lautenschläger, C., Würfl, P., Taubert, H., 2010. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* 126, 73–80. <https://doi.org/10.1002/ijc.24687>
73. Groux-Degroote, S., Foulquier, F., Cavdarli, S., Delannoy, P., 2021. Les mécanismes de régulation de la glycosylation. *médecine/sciences* 37, 609–617. <https://doi.org/10.1051/medsci/2021082>
74. Grünwald, B., Harant, V., Schaten, S., Frühschütz, M., Spallek, R., Höchst, B., Stutzer, K., Berchtold, S., Erkan, M., Prokopchuk, O., Martignoni, M., Esposito, I., Heikenwalder, M., Gupta, A., Siveke, J., Saftig, P., Knolle, P., Wohlleber, D., Krüger, A., 2016. Pancreatic Premalignant Lesions Secrete Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1, Which Activates Hepatic Stellate Cells Via CD63 Signaling to Create a Premetastatic Niche in the Liver. *Gastroenterology* 151, 1011-1024.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.07.043>
75. Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Cañamero, M., Grippo, P.J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E.P., Barbacid, M., 2007. Chronic

pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 11, 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.012>.

H

76. Hadj Bachir, E., Poiraud, C., Paget, S., Stoup, N., El Moghrabi, S., Duchêne, B., Jouy, N., Bongiovanni, A., Tardivel, M., Weiswald, L.-B., Vandeputte, M., Beugniez, C., Escande, F., Leteurtre, E., OrgaRES consortium, Poulain, L., Lagadec, C., Pigny, P., Jonckheere, N., Renaud, F., Truant, S., Van Seuning, I., Vincent, A., 2021. A new pancreatic adenocarcinoma-derived organoid model of acquired chemoresistance to FOLFIRINOX: First insight of the underlying mechanisms. *Biol Cell*. <https://doi.org/10.1111/boc.202100003>

77. Hain, E., Sindayigaya, R., Fawaz, J., Gharios, J., Bouteloup, G., Soyer, P., Bertherat, J., Prat, F., Terris, B., Coriat, R., Gaujoux, S., 2019. Surgical management of pancreatic neuroendocrine tumors: an introduction. *Expert Rev Anticancer Ther* 19, 1089–1100. <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1703677>

78. Heldin, C.H., 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213–223. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90404-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90404-2)

79. Hingorani, S.R., 2007. Location, location, location: precursors and prognoses for pancreatic cancer. *Gastroenterology* 133, 345–350. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.059>

80. Hirakawa, T., Nakata, B., Amano, R., Kimura, K., Shimizu, S., Ohira, G., Yamada, N., Ohira, M., Hirakawa, K., 2011. HER3 overexpression as an independent indicator of poor prognosis for patients with curatively resected pancreatic cancer. *Oncology* 81, 192–198. <https://doi.org/10.1159/000333825>

81. Holter, S., Borgida, A., Dodd, A., Grant, R., Semotiuk, K., Hedley, D., Dhani, N., Narod, S., Akbari, M., Moore, M., Gallinger, S., 2015. Germline BRCA Mutations in a Large Clinic-Based Cohort of Patients With Pancreatic Adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 33, 3124–3129. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.7401>

82. Hruban, R.H., Takaori, K., Klimstra, D.S., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A.V., Biankin, S.A., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., Goggins, M., Kato, Y., Klöppel, G., Longnecker, D.S., Lüttges, J., Maitra, A., Offerhaus, G.J.A., Shimizu, M., Yonezawa, S., 2004. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 28, 977–987. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000126675.59108.80>

83. Hu, H.Y., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Zhou, Y.H., Chen, W., Khaitovich, P., 2009. Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* 10, 413. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-413>
84. Huang, V., Place, R.F., Portnoy, V., Wang, J., Qi, Z., Jia, Z., Yu, A., Shuman, M., Yu, J., Li, L.-C., 2012. Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer. *Nucleic Acids Res* 40, 1695–1707. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr934>
85. Huang, X., Ding, L., Bennewith, K.L., Tong, R.T., Welford, S.M., Ang, K.K., Story, M., Le, Q.-T., Giaccia, A.J., 2009. Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol Cell* 35, 856–867. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.006>
86. Huang, Z., Liu, F., 2014. Diagnostic value of serum carbohydrate antigen 19-9 in pancreatic cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol* 35, 7459–7465. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1995-9>
87. Hum, C., Loisel, J., Ahmed, N., Shaw, T.A., Toudic, C., Pezacki, J.P., 2021. MicroRNA Mimics or Inhibitors as Antiviral Therapeutic Approaches Against COVID-19. *Drugs* 81, 517–531. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01474-5>
88. Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, E., Tuschl, T., Zamore, P.D., 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834–838. <https://doi.org/10.1126/science.1062961>
- J**
89. Jacob, F., Monod, J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3, 318–356. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(61)80072-7)
90. Jiang, K., Lawson, D., Cohen, C., Siddiqui, M.T., 2014. Galectin-3 and PTEN expression in pancreatic ductal adenocarcinoma, pancreatic neuroendocrine neoplasms and gastrointestinal tumors on fine-needle aspiration cytology. *Acta Cytol* 58, 281–287. <https://doi.org/10.1159/000362221>
91. Jonckheere, N., Auwerx, J., Hadj Bachir, E., Coppin, L., Boukrout, N., Vincent, A., Neve, B., Gautier, M., Treviño, V., Van Seuning, I., 2020. Unsupervised Hierarchical Clustering of Pancreatic Adenocarcinoma Dataset from TCGA Defines a Mucin Expression Profile that Impacts Overall Survival. *Cancers (Basel)* 12, E3309. <https://doi.org/10.3390/cancers12113309>
92. Jonckheere, N., Perrais, M., Mariette, C., Batra, S.K., Aubert, J.-P., Pigny, P., Van Seuning, I., 2004. A role for human MUC4 mucin gene, the ErbB2 ligand, as

a target of TGF-beta in pancreatic carcinogenesis. *Oncogene* 23, 5729–5738. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207769>

93. Jonckheere, N., Skrypek, N., Frénois, F., Van Seuningen, I., 2013. Membrane-bound mucin modular domains: From structure to function. *Biochimie* 95, 1077–1086. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.11.005>

94. Jonckheere, N., Skrypek, N., Merlin, J., Dessein, A.F., Dumont, P., Leteurtre, E., Harris, A., Desseyne, J.-L., Susini, C., Frénois, F., Van Seuningen, I., 2012. The mucin MUC4 and its membrane partner ErbB2 regulate biological properties of human CAPAN-2 pancreatic cancer cells via different signalling pathways. *PLoS ONE* 7, e32232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032232>

95. Jonckheere, N., Skrypek, N., Van Seuningen, I., 2010. Mucins and pancreatic cancer. *Cancers (Basel)* 2, 1794–1812. <https://doi.org/10.3390/cancers2041794>

96. Jonckheere, N., Van Seuningen, I., 2008. The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies. *Crit Rev Oncog* 14, 177–196. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.v14.i2-3.30>

97. Jonckheere, N., Vincent, A., Neve, B., Van Seuningen, I., 2021. Mucin expression, epigenetic regulation and patient survival: A toolkit of prognostic biomarkers in epithelial cancers. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1876, 188538. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188538>

K

98. Kakimoto, Y., Kamiguchi, H., Ochiai, E., Satoh, F., Osawa, M., 2015. MicroRNA Stability in Postmortem FFPE Tissues: Quantitative Analysis Using Autoptic Samples from Acute Myocardial Infarction Patients. *PLoS One* 10, e0129338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129338>

99. Kazmierczyk, M., Kasprowicz, M.K., Kasprzyk, M.E., Wrzesinski, J., 2020. Human Long Noncoding RNA Interactome: Detection, Characterization and Function. *Int J Mol Sci* 21, E1027. <https://doi.org/10.3390/ijms21031027>

100. Khan, R.M.M., Chua, Z.J.Y., Tan, J.C., Yang, Y., Liao, Z., Zhao, Y., 2019. From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. *Medicina (Kaunas)* 55, E546. <https://doi.org/10.3390/medicina55090546>

101. Kim, J.Y., Hong, S.-M., 2018. Precursor Lesions of Pancreatic Cancer. *Oncol Res Treat* 41, 603–610. <https://doi.org/10.1159/000493554>

102. Kirkegård, J., Mortensen, F.V., Cronin-Fenton, D., 2017. Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 112, 1366–1372. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.218>

103. Klöppel, G., Basturk, O., Schlitter, A.M., Konukiewitz, B., Esposito, I., 2014. Intraductal neoplasms of the pancreas. *Semin Diagn Pathol* 31, 452–466. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2014.08.005>
104. Koorstra, J.-B.M., Hustinx, S.R., Offerhaus, G.J.A., Maitra, A., 2008. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology* 8, 110–125. <https://doi.org/10.1159/000123838>
105. Kovacs, E., Zorn, J.A., Huang, Y., Barros, T., Kuriyan, J., 2015. A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor. *Annu Rev Biochem* 84, 739–764. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034402>
106. Kufe, D.W., 2009. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer* 9, 874–885. <https://doi.org/10.1038/nrc2761>
107. Kuo, E.J., Salem, R.R., 2013. Population-level analysis of pancreatic neuroendocrine tumors 2 cm or less in size. *Ann Surg Oncol* 20, 2815–2821. <https://doi.org/10.1245/s10434-013-3005-7>

L

108. Lagow, E., DeSouza, M.M., Carson, D.D., 1999. Mammalian reproductive tract mucins. *Hum Reprod Update* 5, 280–292. <https://doi.org/10.1093/humupd/5.4.280>
109. Lahdaoui, F., Delpu, Y., Vincent, A., Renaud, F., Messenger, M., Duchêne, B., Leteurtre, E., Mariette, C., Torrisani, J., Jonckheere, N., Van Seuning, I., 2015. miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer. *Oncogene* 34, 780–788. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.11>
110. Lakshmanan, I., Seshacharyulu, P., Haridas, D., Rachagani, S., Gupta, S., Joshi, S., Guda, C., Yan, Y., Jain, M., Ganti, A.K., Ponnusamy, M.P., Batra, S.K., 2015. Novel HER3/MUC4 oncogenic signaling aggravates the tumorigenic phenotypes of pancreatic cancer cells. *Oncotarget* 6, 21085–21099.
111. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
112. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
113. Lee, Y.S., Dutta, A., 2009. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 4, 199–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222>
114. Lellouche, L., Palmieri, L.-J., Dermine, S., Brezault, C., Chaussade, S., Coriat, R., 2021. Systemic therapy in metastatic pancreatic adenocarcinoma: current

practice and perspectives. *Ther Adv Med Oncol* 13, 17588359211018540. <https://doi.org/10.1177/17588359211018539>

115. Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>

116. Li, C.-H., Chang, Y.-C., Chan, M.-H., Yang, Y.-F., Liang, S.-M., Hsiao, M., 2021. Galectins in Cancer and the Microenvironment: Functional Roles, Therapeutic Developments, and Perspectives. *Biomedicines* 9, 1159. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091159>

117. Liberelle, M., Jonckheere, N., Melnyk, P., Seuningen, I.V., Lebègue, N., 2020. EGF-Containing Membrane-Bound Mucins: A Hidden ErbB2 Targeting Pathway? *Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02001>

118. Liberelle, M., Magnez, R., Thuru, X., Bencheikh, Y., Ravez, S., Quenon, C., Drucbert, A.-S., Foulon, C., Melnyk, P., Van Seuningen, I., Lebègue, N., 2019. MUC4-ErbB2 Oncogenic Complex: Binding studies using Microscale Thermophoresis. *Sci Rep* 9, 16678. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53099-0>

119. Liu, G., Shao, C., Li, A., Zhang, X., Guo, X., Li, J., 2020. Diagnostic Value of Plasma miR-181b, miR-196a, and miR-210 Combination in Pancreatic Cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2020, 6073150. <https://doi.org/10.1155/2020/6073150>

120. Llach, J., Carballal, S., Moreira, L., 2020. Familial Pancreatic Cancer: Current Perspectives. *Cancer Manag Res* 12, 743–758. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S172421>

121. Logsdon, C.D., Ji, B., 2013. The role of protein synthesis and digestive enzymes in acinar cell injury. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 362–370. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.36>

122. Luchini, C., Capelli, P., Scarpa, A., 2016. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. *Surg Pathol Clin* 9, 547–560. <https://doi.org/10.1016/j.path.2016.05.003>

M

123. Manero-Rupérez, N., Martínez-Bosch, N., Barranco, L.E., Visa, L., Navarro, P., 2020. The Galectin Family as Molecular Targets: Hopes for Defeating Pancreatic Cancer. *Cells* 9, 689. <https://doi.org/10.3390/cells9030689>

124. Manohar, M., Verma, A.K., Venkateshaiah, S.U., Sanders, N.L., Mishra, A., 2017. Pathogenic mechanisms of pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 8, 10–25. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i1.10>

125. Marchegiani, G., Mino-Kenudson, M., Ferrone, C.R., Warshaw, A.L., Lillemoe, K.D., Fernández-del Castillo, C., 2015. Oncocytic-Type Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms: A Unique Malignant Pancreatic Tumor with Good Long-Term Prognosis. *Journal of the American College of Surgeons* 220, 839–844. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2015.01.051>
126. Marmor, M.D., Skaria, K.B., Yarden, Y., 2004. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58, 903–913. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.06.002>
127. Meijer, H.A., Smith, E.M., Bushell, M., 2014. Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans* 42, 1135–1140. <https://doi.org/10.1042/BST20140142>
128. Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., Tuschl, T., 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15, 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.007>
129. Mihalache, O., Doran, H., Poiană, C., Bîrligea, A., Cîrstea, M.O., Pătrașcu, T., 2019. Pancreatic Neuroendocrine Tumors - Case Series and Literature Review. *Chirurgia (Bucur)* 114, 630–638. <https://doi.org/10.21614/chirurgia.114.5.630>
130. Miquel, M., Zhang, S., Pilarsky, C., 2021. Pre-clinical Models of Metastasis in Pancreatic Cancer. *Front Cell Dev Biol* 9, 748631. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.748631>
131. Miyahara, N., Shoda, J., Ishige, K., Kawamoto, T., Ueda, T., Taki, R., Ohkohchi, N., Hyodo, I., Thomas, M.B., Krishnamurthy, S., Carraway, K.L., Irimura, T., 2008. MUC4 interacts with ErbB2 in human gallbladder carcinoma: potential pathobiological implications. *Eur J Cancer* 44, 1048–1056. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.03.007>
132. Mizrahi, J.D., Surana, R., Valle, J.W., Shroff, R.T., 2020. Pancreatic cancer. *Lancet* 395, 2008–2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30974-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30974-0)
133. Moffitt, R.A., Marayati, R., Flate, E.L., Volmar, K.E., Loeza, S.G.H., Hoadley, K.A., Rashid, N.U., Williams, L.A., Eaton, S.C., Chung, A.H., Smyla, J.K., Anderson, J.M., Kim, H.J., Bentrem, D.J., Talamonti, M.S., Iacobuzio-Donahue, C.A., Hollingsworth, M.A., Yeh, J.J., 2015. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet* 47, 1168–1178. <https://doi.org/10.1038/ng.3398>
134. Mpillá, G.B., Philip, P.A., El-Rayes, B., Azmi, A.S., 2020. Pancreatic neuroendocrine tumors: Therapeutic challenges and research limitations. *World J Gastroenterol* 26, 4036–4054. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i28.4036>

135. Mukherjee, S., Hurt, C.N., Bridgewater, J., Falk, S., Cummins, S., Wasan, H., Crosby, T., Jephcott, C., Roy, R., Radhakrishna, G., McDonald, A., Ray, R., Joseph, G., Staffurth, J., Abrams, R.A., Griffiths, G., Maughan, T., 2013. Gemcitabine-based or capecitabine-based chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer (SCALOP): a multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 14, 317–326. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70021-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70021-4)

N

136. Nagy, P., Friedländer, E., Tanner, M., Kapanen, A.I., Carraway, K.L., Isola, J., Jovin, T.M., 2005. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 65, 473–482.

137. Neoptolemos, J.P., Palmer, D.H., Ghaneh, P., Psarelli, E.E., Valle, J.W., Halloran, C.M., Faluyi, O., O'Reilly, D.A., Cunningham, D., Wadsley, J., Darby, S., Meyer, T., Gillmore, R., Anthony, A., Lind, P., Glimelius, B., Falk, S., Izbicki, J.R., Middleton, G.W., Cummins, S., Ross, P.J., Wasan, H., McDonald, A., Crosby, T., Ma, Y.T., Patel, K., Sherriff, D., Soomal, R., Borg, D., Sothi, S., Hammel, P., Hackert, T., Jackson, R., Büchler, M.W., European Study Group for Pancreatic Cancer, 2017. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 389, 1011–1024. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32409-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32409-6)

138. Neoptolemos, J.P., Stocken, D.D., Bassi, C., Ghaneh, P., Cunningham, D., Goldstein, D., Padbury, R., Moore, M.J., Gallinger, S., Mariette, C., Wente, M.N., Izbicki, J.R., Friess, H., Lerch, M.M., Dervenis, C., Oláh, A., Butturini, G., Doi, R., Lind, P.A., Smith, D., Valle, J.W., Palmer, D.H., Buckels, J.A., Thompson, J., McKay, C.J., Rawcliffe, C.L., Büchler, M.W., European Study Group for Pancreatic Cancer, 2010. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA* 304, 1073–1081. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1275>

139. Nguyen, T.A., Jo, M.H., Choi, Y.-G., Park, J., Kwon, S.C., Hohng, S., Kim, V.N., Woo, J.-S., 2015. Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* 161, 1374–1387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.010>

140. Ni, J., Zhou, S., Yuan, W., Cen, F., Yan, Q., 2019. Mechanism of miR-210 involved in epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells under hypoxia. *J Recept Signal Transduct Res* 39, 399–406. <https://doi.org/10.1080/10799893.2019.1683863>

141. Noë, M., Brosens, L.A.A., 2016. Pathology of Pancreatic Cancer Precursor Lesions. *Surgical Pathology Clinics, Pancreatic Pathology* 9, 561–580. <https://doi.org/10.1016/j.path.2016.05.004>

142. Nonne, N., Ameyar-Zazoua, M., Souidi, M., Harel-Bellan, A., 2010. Tandem affinity purification of miRNA target mRNAs (TAP-Tar). *Nucleic Acids Res* 38, e20. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1100>

O

143. Ørom, U.A., Nielsen, F.C., Lund, A.H., 2008. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30, 460–471. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.001>

P

144. Pancreatitis, 2019. . *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 17, A15. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.01.011>

145. Pandol, S.J., Apte, M.V., Wilson, J.S., Gukovskaya, A.S., Edderkaoui, M., 2012. The Burning Question: Why is Smoking a Risk Factor for Pancreatic Cancer? *Pancreatology* 12, 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2012.06.002>

146. Park, W., Chawla, A., O'Reilly, E.M., 2021. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA* 326, 851–862. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.13027>

147. Pasquinelli, A.E., 2012. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* 13, 271–282. <https://doi.org/10.1038/nrg3162>

148. Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., Ruvkun, G., 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86–89. <https://doi.org/10.1038/35040556>

149. Perrais, M., Pigny, P., Ducourouble, M.P., Petitprez, D., Porchet, N., Aubert, J.P., Van Seuning, I., 2001a. Characterization of human mucin gene MUC4 promoter: importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 276, 30923–30933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104204200>

150. Perrais, M., Pigny, P., Ducourouble, M.P., Petitprez, D., Porchet, N., Aubert, J.P., Van Seuning, I., 2001b. Characterization of human mucin gene MUC4 promoter: importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 276, 30923–30933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104204200>

151. Pinho, A.V., Chantrill, L., Rooman, I., 2014. Chronic pancreatitis: a path to pancreatic cancer. *Cancer Lett* 345, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.015>
152. Ponnusamy, M.P., Singh, A.P., Jain, M., Chakraborty, S., Moniaux, N., Batra, S.K., 2008. MUC4 activates HER2 signalling and enhances the motility of human ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 99, 520–526. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604517>
153. Popa, S.J., Stewart, S.E., Moreau, K., 2018. Unconventional secretion of annexins and galectins. *Semin Cell Dev Biol* 83, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.022>
154. Porchet, N., Aubert, J.-P., 2004. [MUC genes: mucin or not mucin? That is the question]. *Med Sci (Paris)* 20, 569–574. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004205569>
155. Porchet, N., Dufosse, J., Audie, J.P., Duperat, V.G., Perini, J.M., Nguyen, V.C., Degand, P., Aubert, J.P., 1991. Structural features of the core proteins of human airway mucins ascertained by cDNA cloning. *Am Rev Respir Dis* 144, S15-18. https://doi.org/10.1164/ajrccm/144.3_pt_2.S15
156. Price-Schiavi, S.A., Carraway, C.A., Fregien, N., Carraway, K.L., 1998. Post-transcriptional regulation of a milk membrane protein, the sialomucin complex (Ascites sialoglycoprotein (ASGP)-1/ASGP-2, rat muc4), by transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 273, 35228–35237. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.35228>
157. Pu, M., Chen, J., Tao, Z., Miao, L., Qi, X., Wang, Y., Ren, J., 2019a. Regulatory network of miRNA on its target: coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. *Cell Mol Life Sci* 76, 441–451. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2940-7>
158. Pu, M., Chen, J., Tao, Z., Miao, L., Qi, X., Wang, Y., Ren, J., 2019b. Regulatory network of miRNA on its target: coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. *Cell Mol Life Sci* 76, 441–451. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2940-7>
159. Pu, M., Li, C., Qi, X., Chen, J., Wang, Y., Gao, L., Miao, L., Ren, J., 2017. MiR-1254 suppresses HO-1 expression through seed region-dependent silencing and non-seed interaction with TFAP2A transcript to attenuate NSCLC growth. *PLoS Genet* 13, e1006896. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006896>
160. Puleo, F., Nicolle, R., Blum, Y., Cros, J., Marisa, L., Demetter, P., Quertinmont, E., Svrcek, M., Elarouci, N., Iovanna, J., Franchimont, D., Verset, L., Galdon, M.G., Devière, J., de Reyniès, A., Laurent-Puig, P., Van Laethem, J.-L.,

Bachet, J.-B., Maréchal, R., 2018. Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. *Gastroenterology* 155, 1999–2013.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.033>

R

161. Rachagani, S., Macha, M.A., Ponnusamy, M.P., Haridas, D., Kaur, S., Jain, M., Batra, S.K., 2012. MUC4 potentiates invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through stabilization of fibroblast growth factor receptor 1. *Carcinogenesis* 33, 1953–1964. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs225>

162. Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., Matrisian, L.M., 2014. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 74, 2913–2921. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>

163. Rahn, J.J., Chow, J.W., Horne, G.J., Mah, B.K., Emerman, J.T., Hoffman, P., Hugh, J.C., 2005. MUC1 mediates transendothelial migration *in vitro* by ligating endothelial cell ICAM-1. *Clin Exp Metastasis* 22, 475–483. <https://doi.org/10.1007/s10585-005-3098-x>

164. Raimondi, S., Lowenfels, A.B., Morselli-Labate, A.M., Maisonneuve, P., Pezzilli, R., 2010. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 24, 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.02.007>

165. Ray, K., 2015. Pancreatic cancer: Pancreatic cancer exosomes prime the liver for metastasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12, 371. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.93>

166. Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906. <https://doi.org/10.1038/35002607>

167. Rezaee, N., Barbon, C., Zaki, A., He, J., Salman, B., Hruban, R.H., Cameron, J.L., Herman, J.M., Ahuja, N., Lennon, A.M., Weiss, M.J., Wood, L.D., Wolfgang, C.L., 2016. Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) with high-grade dysplasia is a risk factor for the subsequent development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *HPB* 18, 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2015.10.010>

168. Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M., Yan, W., 2007. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res* 35, 5944–5953. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm641>

169. Rooney, S.L., Shi, J., 2016. Intraductal Tubulopapillary Neoplasm of the Pancreas: An Update From a Pathologist's Perspective. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 140, 1068–1073. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0207-RA>
170. Rorsman, P., Husing, M.O., 2018. The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 14, 404–414. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0020-6>

S

171. Sahin, I.H., Elias, H., Chou, J.F., Capanu, M., O'Reilly, E.M., 2018. Pancreatic adenocarcinoma: insights into patterns of recurrence and disease behavior. *BMC Cancer* 18, 769. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4679-9>
172. Saitou, M., Goto, M., Horinouchi, M., Tamada, S., Nagata, K., Hamada, T., Osako, M., Takao, S., Batra, S.K., Aikou, T., Imai, K., Yonezawa, S., 2005. MUC4 expression is a novel prognostic factor in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas. *J Clin Pathol* 58, 845–852. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.023572>
173. Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H.R., Soleymani Fard, S., Ghaffari, S.H., 2019. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol* 234, 5451–5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
174. Sankaran, S.J., Xiao, A.Y., Wu, L.M., Windsor, J.A., Forsmark, C.E., Petrov, M.S., 2015. Frequency of Progression From Acute to Chronic Pancreatitis and Risk Factors: A Meta-analysis. *Gastroenterology* 149, 1490-1500.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.066>
175. Senapati, S., Chaturvedi, P., Chaney, W.G., Chakraborty, S., Gnanapragassam, V.S., Sasson, A.R., Batra, S.K., 2011. Novel Interaction of MUC4 and Galectin: Potential Pathobiological Implications for Metastasis in Lethal Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 17, 267–274. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1937>
176. Sherblom, A.P., Carraway, K.L., 1980. A complex of two cell surface glycoproteins from ascites mammary adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* 255, 12051–12059.
177. Siehler, J., Blöching, A.K., Meier, M., Lickert, H., 2021. Engineering islets from stem cells for advanced therapies of diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 20, 920–940. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00262-w>
178. Singh, K., Pruski, M., Bland, R., Younes, M., Guha, S., Thosani, N., Maitra, A., Cash, B.D., McAllister, F., Logsdon, C.D., Chang, J.T., Bailey-Lundberg, J.M., 2021. Kras mutation rate precisely orchestrates ductal derived pancreatic intraepithelial

- neoplasia and pancreatic cancer. *Lab Invest* 101, 177–192. <https://doi.org/10.1038/s41374-020-00490-5>
179. Sipos, B., Möser, S., Kalthoff, H., Török, V., Löhr, M., Klöppel, G., 2003. A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an *in vitro* research platform. *Virchows Arch* 442, 444–452. <https://doi.org/10.1007/s00428-003-0784-4>
180. Skrypek, N., Duchêne, B., Hebbar, M., Leteurtre, E., van Seuning, I., Jonckheere, N., 2013. The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the Concentrative Nucleoside Transporter family. *Oncogene* 32, 1714–1723. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.179>
181. Skrypek, N., Vasseur, R., Vincent, A., Duchêne, B., Van Seuning, I., Jonckheere, N., 2015. The oncogenic receptor ErbB2 modulates gemcitabine and irinotecan/SN-38 chemoresistance of human pancreatic cancer cells via hCNT1 transporter and multidrug-resistance associated protein MRP-2. *Oncotarget* 6, 10853–10867. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3414>
182. Sohrabi, E., Rezaie, E., Heiat, M., Sefidi-Heris, Y., 2021. An Integrated Data Analysis of mRNA, miRNA and Signaling Pathways in Pancreatic Cancer. *Biochem Genet* 59, 1326–1358. <https://doi.org/10.1007/s10528-021-10062-x>
183. Song, R., Hu, X.-Q., Zhang, L., 2019. Mitochondrial MiRNA in Cardiovascular Function and Disease. *Cells* 8, E1475. <https://doi.org/10.3390/cells8121475>
184. Srivastava, S.K., Bhardwaj, A., Singh, S., Arora, S., Wang, B., Grizzle, W.E., Singh, A.P., 2011. MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 32, 1832–1839. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr223>
185. Stavast, C.J., Erkeland, S.J., 2019. The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells* 8, E1465. <https://doi.org/10.3390/cells8111465>
186. Stoup, N., Liberelle, M., Schulz, C., Cavdarli, S., Vasseur, R., Magnez, R., Lahdaoui, F., Skrypek, N., Peretti, F., Frénois, F., Thuru, X., Melnyk, P., Renault, N., Jonckheere, N., Lebègue, N., Van Seuning, I., 2021. The EGF Domains of MUC4 Oncomucin Mediate HER2 Binding Affinity and Promote Pancreatic Cancer Cell Tumorigenesis. *Cancers (Basel)* 13, 5746. <https://doi.org/10.3390/cancers13225746>
187. Stratton, M.R., 2011. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* 331, 1553–1558. <https://doi.org/10.1126/science.1204040>

188. Suh, S., Kim, K.W., 2019. Diabetes and Cancer: Cancer Should Be Screened in Routine Diabetes Assessment. *Diabetes Metab J* 43, 733–743. <https://doi.org/10.4093/dmj.2019.0177>
189. Sultana, A., Tudur Smith, C., Cunningham, D., Starling, N., Tait, D., Neoptolemos, J.P., Ghaneh, P., 2007. Systematic review, including meta-analyses, on the management of locally advanced pancreatic cancer using radiation/combined modality therapy. *Br J Cancer* 96, 1183–1190. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603719>
190. Sun, F.-B., Lin, Y., Li, S.-J., Gao, J., Han, B., Zhang, C.-S., 2018. MiR-210 knockdown promotes the development of pancreatic cancer via upregulating E2F3 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22, 8640–8648. https://doi.org/10.26355/eurev_201812_16628
191. Svoronos, A.A., Engelman, D.M., Slack, F.J., 2016. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res* 76, 3666–3670. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0359>
192. Swartz, M.J., Batra, S.K., Varshney, G.C., Hollingsworth, M.A., Yeo, C.J., Cameron, J.L., Wilentz, R.E., Hruban, R.H., Argani, P., 2002. MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 117, 791–796. <https://doi.org/10.1309/7Y7N-M1WM-R0YK-M2VA>
193. Szabo, A., Gurlich, R., Liberko, M., Soumarova, R., Vernerova, Z., Mandys, V., Popov, A., 2020. Expression of selected microRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma: is there a relation to tumor morphology, progression and patient's outcome? *Neoplasma* 67, 1170–1181. https://doi.org/10.4149/neo_2020_200123N87

T

194. Tanaka, M., Fernández-del Castillo, C., Adsay, V., Chari, S., Falconi, M., Jang, J.-Y., Kimura, W., Levy, P., Pitman, M.B., Schmidt, C.M., Shimizu, M., Wolfgang, C.L., Yamaguchi, K., Yamao, K., 2012. International consensus guidelines 2012 for the management of IPMN and MCN of the pancreas. *Pancreatology* 12, 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2012.04.004>
195. Tanaka, M., Fernández-del Castillo, C., Kamisawa, T., Jang, J.Y., Levy, P., Ohtsuka, T., Salvia, R., Shimizu, Y., Tada, M., Wolfgang, C.L., 2017. Revisions of international consensus Fukuoka guidelines for the management of IPMN of the pancreas. *Pancreatology* 17, 738–753. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.07.007>
196. Tang, R., Li, L., Zhu, D., Hou, D., Cao, T., Gu, H., Zhang, J., Chen, J., Zhang, C.-Y., Zen, K., 2012. Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1

biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system. *Cell Res* 22, 504–515. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.137>

197. Tesfaye, A.A., Azmi, A.S., Philip, P.A., 2019. miRNA and Gene Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Am J Pathol* 189, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.10.005>

198. Theodoropoulos, G., Carraway, C.A.C., Carraway, K.L., 2009. MUC4 involvement in ErbB2/ErbB3 phosphorylation and signaling in response to airway cell mechanical injury. *Journal of Cellular Biochemistry* 107, 112–122. <https://doi.org/10.1002/jcb.22106>

199. Thomas, G., Chardès, T., Gaborit, N., Mollevi, C., Leconet, W., Robert, B., Radosevic-Robin, N., Penault-Llorca, F., Gongora, C., Colombo, P.-E., Lazrek, Y., Bras-Goncalves, R., Savina, A., Azria, D., Bazin, H., Pèlegri, A., Larbouret, C., 2014. HER3 as biomarker and therapeutic target in pancreatic cancer: new insights in pertuzumab therapy in preclinical models. *Oncotarget* 5, 7138–7148. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2231>

200. Thompson, L.D., Becker, R.C., Przygodzki, R.M., Adair, C.F., Heffess, C.S., 1999. Mucinous cystic neoplasm (mucinous cystadenocarcinoma of low-grade malignant potential) of the pancreas: a clinicopathologic study of 130 cases. *Am J Surg Pathol* 23, 1–16. <https://doi.org/10.1097/00000478-199901000-00001>

201. To, K.K.W., Fong, W., Tong, C.W.S., Wu, M., Yan, W., Cho, W.C.S., 2020. Advances in the discovery of microRNA-based anticancer therapeutics: latest tools and developments. *Expert Opinion on Drug Discovery* 15, 63–83. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1690449>

U

202. Ueno, M., Nakamori, S., Sugimori, K., Kanai, M., Ikeda, M., Ozaka, M., Furukawa, M., Okusaka, T., Kawabe, K., Furuse, J., Komatsu, Y., Ishii, H., Sato, A., Shimizu, S., Chugh, P., Tang, R., Ioka, T., 2020. nal-IRI+5-FU/LV versus 5-FU/LV in post-gemcitabine metastatic pancreatic cancer: Randomized phase 2 trial in Japanese patients. *Cancer Med* 9, 9396–9408. <https://doi.org/10.1002/cam4.3558>

203. Urey, C., Andersson, B., Ansari, D., Sasor, A., Said-Hilmersson, K., Nilsson, J., Andersson, R., 2017. Low MUC4 expression is associated with survival benefit in patients with resectable pancreatic cancer receiving adjuvant gemcitabine. *Scand J Gastroenterol* 52, 595–600. <https://doi.org/10.1080/00365521.2017.1290134>

V

204. Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L.,

Seeberger, P.H. (Eds.), 2015. *Essentials of Glycobiology*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

205. Vasiljević, J., Torkko, J.M., Knoch, K.-P., Solimena, M., 2020. The making of insulin in health and disease. *Diabetologia* 63, 1981–1989. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05192-7>

206. Vasseur, R., Skrypek, N., Duchêne, B., Renaud, F., Martínez-Maqueda, D., Vincent, A., Porchet, N., Van Seuningen, I., Jonckheere, N., 2015. The mucin MUC4 is a transcriptional and post-transcriptional target of K-ras oncogene in pancreatic cancer. Implication of MAPK/AP-1, NF-κB and RalB signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1849, 1375–1384. <https://doi.org/10.1016/j.bbtagrm.2015.10.014>

207. Vasudevan, S., 2012. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 311–330. <https://doi.org/10.1002/wrna.121>

208. Vauthey, J.-N., Dixon, E., 2009. AHPBA/SSO/SSAT Consensus Conference on Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: rationale and overview of the conference. *Ann Surg Oncol* 16, 1725–1726. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0409-5>

209. Vincent, A., Ducourouble, M.-P., Van Seuningen, I., 2008. Epigenetic regulation of the human mucin gene MUC4 in epithelial cancer cell lines involves both DNA methylation and histone modifications mediated by DNA methyltransferases and histone deacetylases. *The FASEB Journal* 22, 3035–3045. <https://doi.org/10.1096/fj.07-103390>

210. Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R.H., Goggins, M., 2011. Pancreatic cancer. *Lancet* 378, 607–620. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0)

211. Von Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S.A., Ma, W.W., Saleh, M.N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R.K., Taberner, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., Van Cutsem, E., Wei, X., Iglesias, J., Renschler, M.F., 2013. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 369, 1691–1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304369>

W

212. Waddell, Nicola, Pajic, M., Patch, A.-M., Chang, D.K., Kassahn, K.S., Bailey, P., Johns, A.L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., Quinn, M.C.J., Robertson, A.J., Fadlullah, M.Z.H., Bruxner, T.J.C., Christ, A.N., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Wani, S., Wilson, P.J., Markham, E., Cloonan, N., Anderson, M.J., Fink, J.L., Holmes, O., Kazakoff, S.H., Leonard, C., Newell, F.,

- Poudel, B., Song, S., Taylor, D., Waddell, Nick, Wood, S., Xu, Q., Wu, J., Pinese, M., Cowley, M.J., Lee, H.C., Jones, M.D., Nagrial, A.M., Humphris, J., Chantrill, L.A., Chin, V., Steinmann, A.M., Mawson, A., Humphrey, E.S., Colvin, E.K., Chou, A., Scarlett, C.J., Pinho, A.V., Giry-Laterriere, M., Rooman, I., Samra, J.S., Kench, J.G., Pettitt, J.A., Merrett, N.D., Toon, C., Epari, K., Nguyen, N.Q., Barbour, A., Zeps, N., Jamieson, N.B., Graham, J.S., Niclou, S.P., Bjerkvig, R., Grützmann, R., Aust, D., Hruban, R.H., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C.A., Wolfgang, C.L., Morgan, R.A., Lawlor, R.T., Corbo, V., Bassi, C., Falconi, M., Zamboni, G., Tortora, G., Tempero, M.A., Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Gill, A.J., Eshleman, J.R., Pilarsky, C., Scarpa, A., Musgrove, E.A., Pearson, J.V., Biankin, A.V., Grimmond, S.M., 2015. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 518, 495–501. <https://doi.org/10.1038/nature14169>
213. Wang, C., Liu, P., Wu, H., Cui, P., Li, Y., Liu, Y., Liu, Z., Gou, S., 2016. MicroRNA-323-3p inhibits cell invasion and metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma via direct suppression of SMAD2 and SMAD3. *Oncotarget* 7, 14912–14924. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7482>
214. Wang, J., Chen, J., Chang, P., LeBlanc, A., Li, D., Abbruzzese, J.L., Frazier, M.L., Killary, A.M., Sen, S., 2009. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila)* 2, 807–813. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0094>
215. Wang, S., Zheng, Y., Yang, F., Zhu, L., Zhu, X.-Q., Wang, Z.-F., Wu, X.-L., Zhou, C.-H., Yan, J.-Y., Hu, B.-Y., Kong, B., Fu, D.-L., Bruns, C., Zhao, Y., Qin, L.-X., Dong, Q.-Z., 2021. The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: translational challenges and clinical perspectives. *Signal Transduct Target Ther* 6, 249. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00659-4>
216. Wang, W., Abbruzzese, J.L., Evans, D.B., Larry, L., Cleary, K.R., Chiao, P.J., 1999. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 5, 119–127.
217. Westholm, J.O., Lai, E.C., 2011. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* 93, 1897–1904. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.017>
218. Wu, L., Zhou, W.-B., Zhou, J., Wei, Y., Wang, H.-M., Liu, X.-D., Chen, X.-C., Wang, W., Ye, L., Yao, L.C., Chen, Q.-H., Tang, Z.-G., 2020. Circulating exosomal microRNAs as novel potential detection biomarkers in pancreatic cancer. *Oncol Lett* 20, 1432–1440. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11691>

X

219. Xie, L., Ni, W.-K., Chen, X.-D., Xiao, M.-B., Chen, B.-Y., He, S., Lu, C.-H., Li, X.-Y., Jiang, F., Ni, R.-Z., 2012. The expressions and clinical significances of tissue and serum galectin-3 in pancreatic carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 138, 1035–1043. <https://doi.org/10.1007/s00432-012-1178-2>

220. Xu, Y.X.Z., Mishra, S., 2018. Obesity-Linked Cancers: Current Knowledge, Challenges and Limitations in Mechanistic Studies and Rodent Models. *Cancers (Basel)* 10, E523. <https://doi.org/10.3390/cancers10120523>

Y

221. Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, R.H., Eshleman, J.R., Nowak, M.A., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Iacobuzio-Donahue, C.A., 2010. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 467, 1114–1117. <https://doi.org/10.1038/nature09515>

222. Yamaguchi, H., Kuboki, Y., Hatori, T., Yamamoto, M., Shiratori, K., Kawamura, S., Kobayashi, M., Shimizu, M., Ban, S., Koyama, I., Higashi, M., Shin, N., Ishida, K., Morikawa, T., Motoi, F., Unno, M., Kanno, A., Satoh, K., Shimosegawa, T., Orikasa, H., Watanabe, T., Nishimura, K., Harada, Y., Furukawa, T., 2011. Somatic mutations in PIK3CA and activation of AKT in intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas. *American Journal of Surgical Pathology* 35, 1812–1817. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31822769a0>

223. Yang, Z., Zhao, N., Cui, J., Wu, H., Xiong, J., Peng, T., 2020. Exosomes derived from cancer stem cells of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells enhance drug resistance by delivering miR-210. *Cell Oncol (Dordr)* 43, 123–136. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00476-6>

224. Yarden, Y., Pines, G., 2012. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 12, 553–563. <https://doi.org/10.1038/nrc3309>

225. Yarden, Y., Sliwkowski, M.X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127–137. <https://doi.org/10.1038/35052073>

226. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>

227. Yokoyama, A., Shi, B.-H., Kawai, T., Konishi, H., Andoh, R., Tachikawa, H., Ihara, S., Fukui, Y., 2007. Muc4 is required for activation of ErbB2 in signet ring carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 355, 200–203. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.133>

228. Yu, Q., Xu, C., Yuan, W., Wang, C., Zhao, P., Chen, L., Ma, J., 2017. Evaluation of Plasma MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Adenocarcinoma: miR-196a and miR-210 Could Be Negative and Positive Prognostic Markers, Respectively. *Biomed Res Int* 2017, 6495867. <https://doi.org/10.1155/2017/6495867>

Z

229. Zhang, H., Berezov, A., Wang, Q., Zhang, G., Drebin, J., Murali, R., Greene, M.I., 2007. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* 117, 2051–2058. <https://doi.org/10.1172/JCI32278>

230. Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., Mi, S., 2015. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>

231. Zhang, Y., Fei, M., Xue, G., Zhou, Q., Jia, Y., Li, L., Xin, H., Sun, S., 2012. Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *J Cell Mol Med* 16, 249–259. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01291.x>

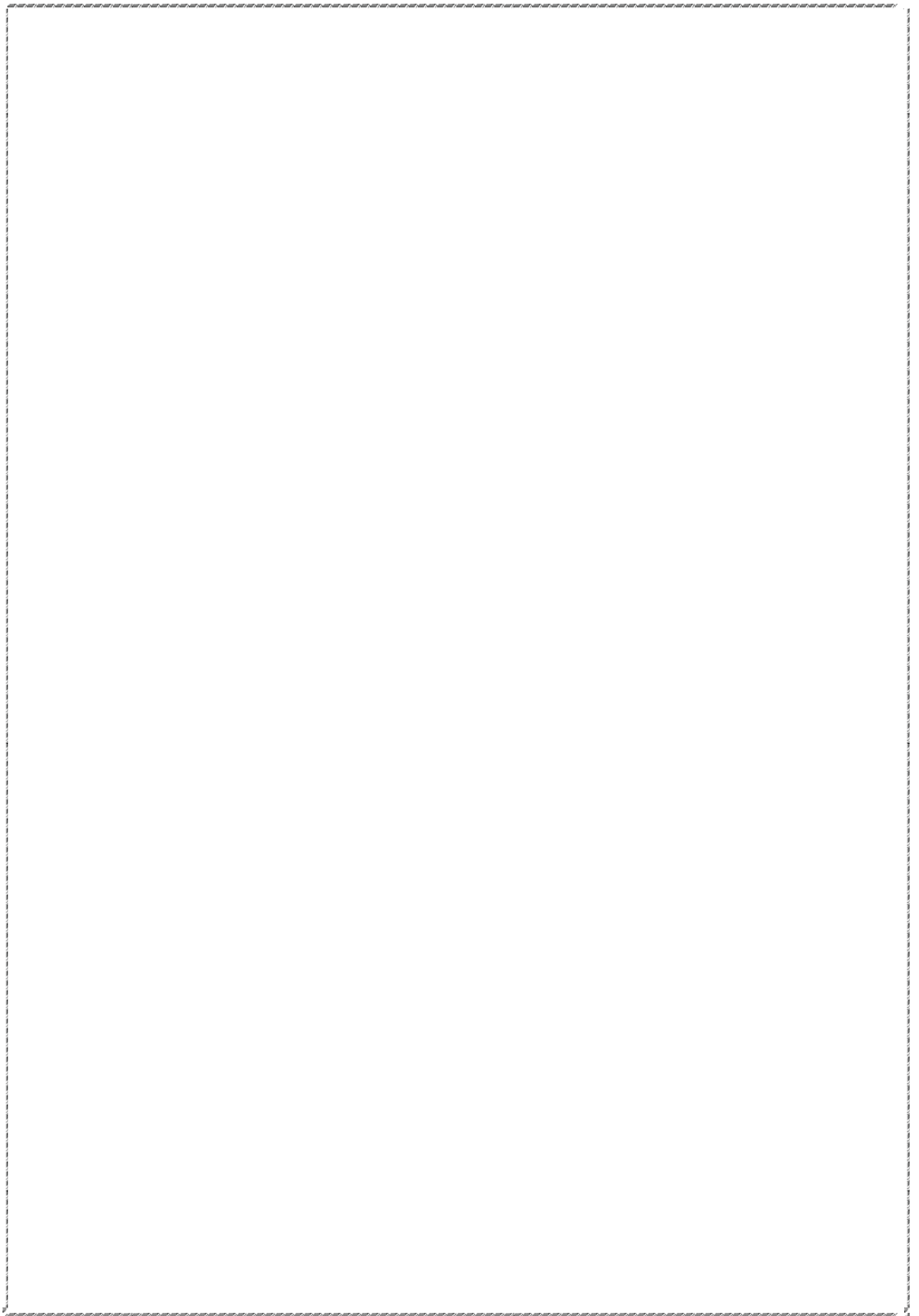
232. Zhao, C., Zhao, M., Zhu, Y., Zhang, L., Zheng, Z., Wang, Q., Li, Y., Zhang, P., Zhu, S., Ding, S., Li, J., 2021. The persistence and stability of miRNA in bloodstained samples under different environmental conditions. *Forensic Sci Int* 318, 110594. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110594>

233. Zhelnin, K., Xue, Y., Quigley, B., Reid, M.D., Choi, H., Memis, B., Adsay, V., Krasinskas, A.M., 2017. Nonmucinous biliary epithelium is a frequent finding and is often the predominant epithelial type in mucinous cystic neoplasms of the pancreas and liver. *American Journal of Surgical Pathology* 41, 116–120. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000745>

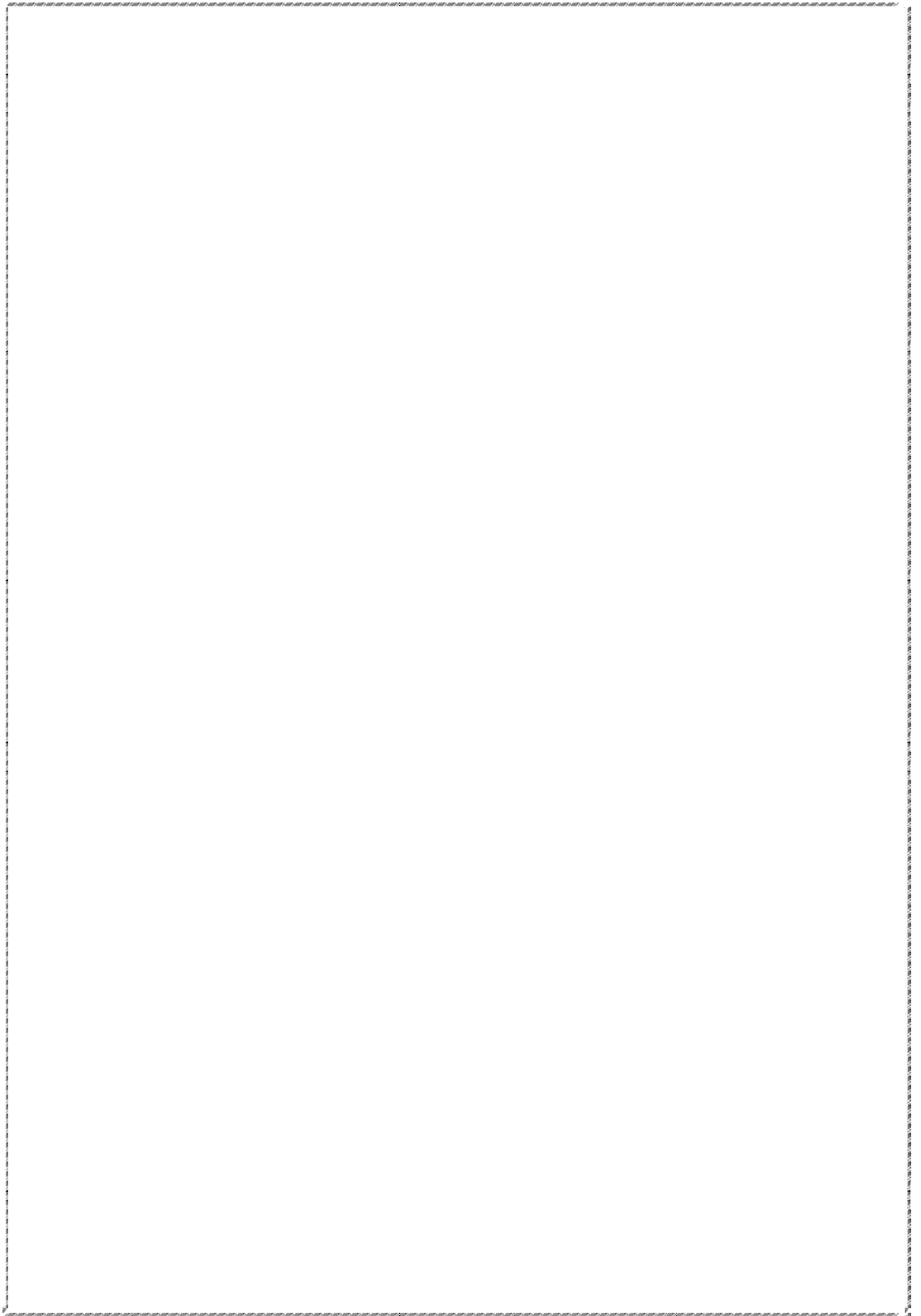
234. Zhi, X., Tao, J., Xie, K., Zhu, Y., Li, Z., Tang, J., Wang, W., Xu, H., Zhang, J., Xu, Z., 2014. MUC4-induced nuclear translocation of β -catenin: A novel mechanism for growth, metastasis and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Letters* 346, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.12.021>

235. Zhou, H., Arcila, M.L., Li, Z., Lee, E.J., Henzler, C., Liu, J., Rana, T.M., Kosik, K.S., 2012. Deep annotation of mouse iso-miR and iso-moR variation. *Nucleic Acids Res* 40, 5864–5875. <https://doi.org/10.1093/nar/gks247>

236. Zhu, Y., Wang, J., Meng, X., Xie, H., Tan, J., Guo, X., Han, P., Wang, R., 2017. A positive feedback loop promotes HIF-1 α stability through miR-210-mediated suppression of RUNX3 in paraquat-induced EMT. *J Cell Mol Med* 21, 3529–3539. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13264>



Article



Article

Antagonistic Roles of the Tumor Suppressor miR-210-3p and Oncomucin MUC4 Forming a Negative Feedback Loop in Pancreatic Adenocarcinoma

Nihad Boukrout¹, Mouloud Souidi¹, Fatima Lahdaoui¹, Belinda Duchène¹ , Bernadette Neve¹ ,
Lucie Coppin¹ , Emmanuelle Leteurre¹, Jérôme Torrisani² , Isabelle Van Seuningen¹ 
and Nicolas Jonckheere^{1,*} 

¹ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277-CANTHER—Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France; nihad.boukrout@inserm.fr (N.B.); mouloud.souidi@inserm.fr (M.S.); Fatima.Lahdaoui@inserm.fr (F.L.); belinda.duchene@inserm.fr (B.D.); bernadette.neve@inserm.fr (B.N.); lucie.coppin@inserm.fr (L.C.); Emmanuelle.Leteurre@chru-lille.fr (E.L.); isabelle.vanseuningen@inserm.fr (I.V.S.)

² Université de Toulouse, INSERM, Université Toulouse III-Paul Sabatier, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, F-31037 Toulouse, France; jerome.torrisani@inserm.fr

* Correspondence: nicolas.jonckheere@inserm.fr; Tel.: +33-3-2029-8865



Citation: Boukrout, N.; Souidi, M.; Lahdaoui, F.; Duchène, B.; Neve, B.; Coppin, L.; Leteurre, E.; Torrisani, J.; Van Seuningen, I.; Jonckheere, N.

Antagonistic Roles of the Tumor Suppressor miR-210-3p and Oncomucin MUC4 Forming a Negative Feedback Loop in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, 6197. <https://doi.org/10.3390/cancers13246197>

Academic Editor: Francesca Orso

Received: 26 October 2021

Accepted: 3 December 2021

Published: 9 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: We aimed at characterizing microRNAs activated downstream of MUC4-associated signaling in pancreatic adenocarcinoma. We investigated the MUC4-miR-210-3p reciprocal regulation and deciphered miR-210-3p biological roles in vitro and in vivo. We showed a MUC4-miR-210-3p negative feedback loop that involves NF-κB in PDAC-derived cells and the miR-210-3p anti-tumoral functions, suggesting a complex balance between antagonistic pro-oncogenic functions of the oncomucin MUC4 and anti-tumoral roles of the miR-210-3p.

Abstract: Background: Pancreatic adenocarcinoma (PDAC) is a deadly cancer with an extremely poor prognosis. MUC4 membrane-bound mucin is neoexpressed in early pancreatic neoplastic lesions and is associated with PDAC progression and chemoresistance. In cancers, microRNAs (miRNAs, small noncoding RNAs) are crucial regulators of carcinogenesis, chemotherapy response and even metastatic processes. In this study, we aimed at identifying and characterizing miRNAs activated downstream of MUC4-associated signaling in pancreatic adenocarcinoma. MiRnome analysis comparing MUC4-KD versus Mock cancer cells showed that MUC4 inhibition impaired miR-210-3p expression. Therefore, we aimed to better understand the miR-210-3p biological roles. Methods: miR-210-3p expression level was analyzed by RT-qPCR in PDAC-derived cell lines (PANC89 Mock and MUC4-KD, PANC-1 and MiaPACA-2), as well as in mice and patients tissues. The MUC4-miR-210-3p regulation was investigated using luciferase reporter construct and chromatin immunoprecipitation experiments. Stable cell lines expressing miR-210-3p or anti-miR-210-3p were established using CRISPR/Cas9 technology or lentiviral transduction. We evaluated the biological activity of miR-210-3p in vitro by measuring cell proliferation and migration and in vivo using a model of subcutaneous xenograft. Results: miR-210-3p expression is correlated with MUC4 expression in PDAC-derived cells and human samples, and in pancreatic PanIN lesions of Pdx1-Cre; LstopL-KrasG12D mice. MUC4 enhances miR-210-3p expression levels via alteration of the NF-κB signaling pathway. Chromatin immunoprecipitation experiments showed p50 NF-κB subunit binding on miR-210-3p promoter regions. We established a reciprocal regulation since miR-210-3p repressed MUC4 expression via its 3'-UTR. MiR-210-3p transient transfection of PANC89, PANC-1 and MiaPACA-2 cells led to a decrease in cell proliferation and migration. These biological effects were validated in cells overexpressing or knocked-down for miR-210-3p. Finally, we showed that miR-210-3p inhibits pancreatic tumor growth and proliferation in vivo. Conclusion: We identified a MUC4-miR-210-3p negative feedback loop in early-onset PDAC, but also revealed new functions of miR-210-3p in both in vitro and in vivo proliferation and migration of pancreatic cancer cells, suggesting a complex balance between MUC4 pro-oncogenic roles and miR-210-3p anti-tumoral effects.

Keywords: pancreatic cancer; MUC4; miR-210-3p; anti-tumoral miR

1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an extremely aggressive and highly drug-resistant cancer. At the time of diagnosis, more than 80% of PDACs are already locally advanced or metastatic. In addition, the 5-year survival rate of patients with local or metastatic PDAC treated with surgery or palliative chemotherapy, respectively, remains very low (<10%) [1,2]. Owing to its dramatic prognosis and the failure of conventional therapies, PDAC is the third leading cause of cancer death in the United States and it is predicted to be the second cause by 2030 [3]. Understanding PDAC carcinogenesis mechanisms and identifying the main factors of its invasiveness are crucial for patient care improvement and the development of new therapeutic approaches. Pancreatic precancerous lesions are the starting point of PDAC development. The most common lesions are pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) [4]. Their initiation and progression are frequently associated with an abnormal synthesis of mucins and especially with neoexpression of mucin-4 (MUC4), which is undetectable in the normal pancreas [5]. Furthermore, MUC4 neoexpression is positively correlated with PDAC progression and aggressiveness [6].

MUC4 is a high molecular weight *O*-glycoprotein (up to 930 kDa). This heterodimeric membrane-bound protein is composed of two subunits: MUC4 α and MUC4 β . The extracellular mucin-type subunit, MUC4 α , represents a typical hyper-glycosylated region. The membrane-bound EGF-like subunit, MUC4 β , contains EGF-like domains and is implicated in receptor–ligand interactions with the transmembrane growth factor receptor ErbB2/HER2 [7]. MUC4 alone and the MUC4–ErbB2 complex contribute to pancreatic tumorigenesis via the regulation of cell signaling pathways related to cell proliferation, survival, motility [8] and chemotherapy metabolism [9]. Several genes activated downstream of MUC4-regulated cell signaling have been investigated. Indeed, Skrypek et al. demonstrated a transcriptional activation of the human nucleoside transporters hCNT1 via the MUC4-regulated NF- κ B pathway in pancreatic cancer cells [9]. However, it remains unknown whether MUC4 is implicated in microRNA (miRNA) gene regulation and thereby controls epigenetic mechanisms.

MiRNAs are evolutionarily conserved small non-coding RNA (18–25 nt) that are negative post-transcriptional regulators of gene expression via the interaction with 3' UTR of targeted mRNAs inducing either their cleavage or translation inhibition [10]. MiRNAs have been demonstrated as regulators of biological processes and cellular homeostasis during the initiation and the progression of many diseases, including cancers. Oncogenic or tumor-suppressor effects have been described depending on their expression level, mRNA targets and environmental conditions. Because of their high stability, miRNAs can be isolated from body fluids, paraffin-embedded or fresh tissue samples and measured by qPCR [11,12]. Altogether, miRNAs seem to be interesting therapeutic targets and potential biomarkers.

MiR-210 is one of the most frequently dysregulated miRNAs in PDAC [13]. It is highly expressed in pancreatic cancer tissues [14,15], as well as in the patients' plasma [16,17]. miR-210 overexpression in PDAC tissue samples was shown as a predictor of poor outcome [15], whereas an increased plasma level was linked to better patient survival [17]. Moreover, plasma miR-210 concentration combined with other miRNA levels has a good diagnostic value for PDAC [18,19]. However, implication of miR-210 in pancreatic carcinogenesis remains unclear. Moreover, some studies described miRNAs such as miR-219-1-3p or miR-150 as negative regulators of MUC4 in pancreatic cancer cells [20,21]. However, it remains unknown whether miR-210-3p is a MUC4 regulator.

In this manuscript, we demonstrated for the first time a reciprocal regulation between a mucin and a miRNA. Indeed, we identified and characterized a MUC4-miR-210-3p

negative feedback loop in PDAC, but we also elucidated the miR-210-3p roles in vitro and in vivo on proliferation and migration of pancreatic cancer cells.

2. Results

2.1. MiR-210-3p Is Overexpressed in PDAC

In order to identify miRNAs potentially regulated by MUC4, we analyzed a miRnome dataset based on MUC4 knock-down (MUC4-KD) 647-V cancer cells (unpublished data, GSE137130) and observed a decrease in miR-210 relative expression level in MUC4-KD compared to Mock control cells by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RTqPCR, $p < 0.001$) (Supplemental Figure S1).

Based on these observations, we then investigated miR-210-3p study in pancreatic cancer samples. MiR-210-3p expression was evaluated by RT-qPCR in both PDAC human tissues and pancreatic cancer cell lines. We found a significant miR-210-3p overexpression in nine paired human PDAC tissues compared to their corresponding non-tumoral adjacent tissues (4.7 ± 3.8 -fold increase, $p = 0.0112$, Figure 1A). We obtained a similar result in the GSE41369 PDAC dataset (4.2 ± 4.9 -fold increase, $p = 0.0320$, Figure 1B). In addition, miR-210-3p overexpression was found in PDAC cell lines PANC89 and PANC-1 compared with normal human pancreatic ductal HPDE cells (Figure 1C). Interestingly, the highest miR-210-3p expression level fold change (5.93 ± 0.73 fold change) was observed in PANC89 cells expressing MUC4 compared to PANC-1 and MIA PaCa-2 cells that do not express MUC4 (1.8 ± 0.05 fold change, and 0.43 ± 0.02 -fold, respectively, Figure 1C,D).

We also determined that MUC4 down-expression in PANC89 cells by shRNA (Figure 1F) leads to a significant decrease in miR-210-3p relative expression level compared to the corresponding Mock control cells ($38.10 \pm 4.15\%$ decrease, $p = 0.0008$) (Figure 1E). We verified the decrease in MUC4 expression following stable shMUC4 transfection (Figure 1F).

Altogether, our results show a miR-210-3p overexpression in PDAC samples and suggest an association between MUC4 and miR-210-3p expression in PDAC-derived cells.

2.2. MiR-210-3p Expression Is Positively Correlated with Muc4 Expression during Pancreatic Carcinogenesis

In order to establish a link between MUC4 and miR-210-3p in early-stage PDAC, we evaluated miR-210-3p expression level by RT-qPCR and Muc4 immuno-staining scores by immunohistochemistry (IHC) in Pdx1-Cre; K-rasG12D (KC) transgenic mouse model of pancreatic cancer. The KC mouse model harbors PanIN formation that increases in size and number over time (3 to 12 months) (Figure 2A). As expected, we did not observe any PanIN in Pdx1-Cre; K-rasWT (WT) control mice. Moreover, caerulein intraperitoneal injections enhanced a loss of normal exocrine histology and promoted PanIN progression as previously described by Guerra et al. (2007) [22]. We confirmed the Muc4 sustained expression in the cell membrane in PanIN lesions at every age, as previously observed in [23], and also in pancreas from caerulein-treated KC mice. In contrast to miR-210-3p, we did not observe a Muc4 basal expression in WT mice normal pancreas. Muc4 immuno-staining scores showed a statistically significant increase in Muc4 expression at 12 months old and in caerulein-treated mice compared to WT mice (Figure 2B). Interestingly, as observed in MUC4 IHC, RTqPCR analysis demonstrated that miR-210-3p expression is also significantly increased at 12 months old and in caerulein-treated mice (Figure 2C). Muc4 immuno-staining scores and miR-210-3p relative expression level were positively correlated with both Pearson's and Spearman's r higher than 0.7 (Figure 2D). In addition, we also noticed a positive correlation between MUC4 and miR-210-3p RNA relative expression levels in patients from a TCGA PAAD public dataset (Spearman $r = 0.2719$, $p < 0.001$) (Figure S2).

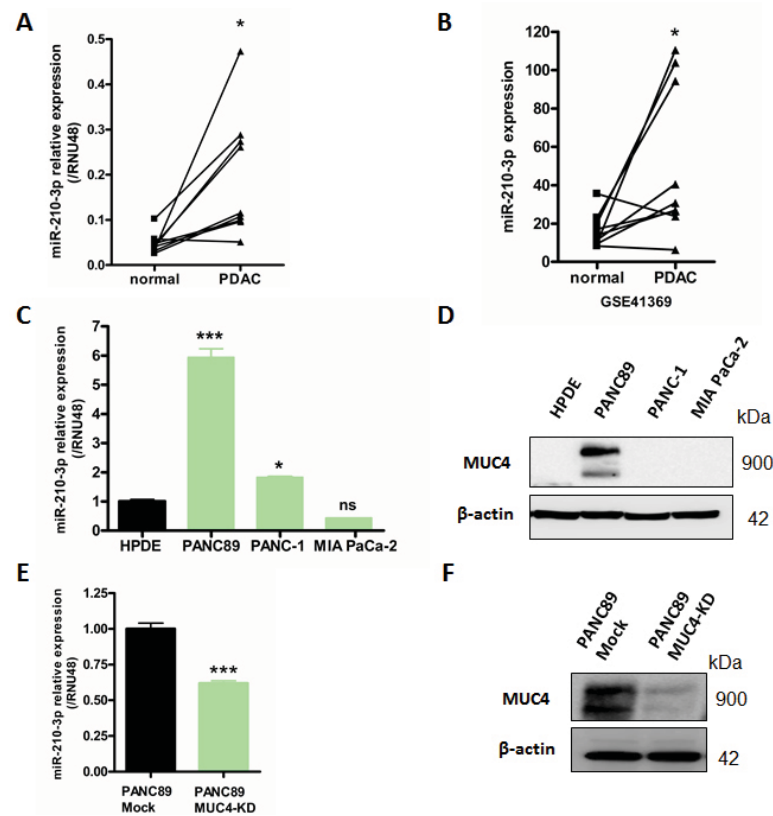


Figure 1. MiR-210-3p is overexpressed in PDAC tissues and pancreatic cancer cell lines compared to normal pancreas. (A) RT-qPCR analysis of miR-210-3p relative expression level in nine paired human pancreatic cancers and their corresponding non-tumoral adjacent tissues. Expression levels are evaluated using $2^{-\Delta Ct}$ method ($\Delta Ct = Ct \text{ miR-210} - Ct \text{ RNU48}$). (B) Analysis of miR-210-3p expression level in GSE41369 PDAC dataset using GEO2R analyzer. (C–E) RT-qPCR analysis of miR-210-3p relative expression in PANC89, PANC-1 and MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells, HPDE normal human pancreatic ductal cells (C) and PANC89 Mock and MUC4-KD cells (E). Expressions were determined according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method ($\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ miR-210} - Ct \text{ RNU48}) - Ct \text{ HPDE}$). Three independent experiments were performed. (D–F) Western blotting analysis of MUC4 and β -actin expression in PANC89, PANC-1, MIA PaCa-2, HPDE (D) and Mock and MUC4-KD PANC89 cells (F). * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ indicate statistical significance compared to normal tissues. ns indicates no statistical significance. At least three independent experiments were conducted.

Altogether, our results highlight a positive correlation between MUC4 and miR-210-3p expression levels in mice and patients' PDAC samples and suggest a potential MUC4 implication in miR-210-3p regulation.

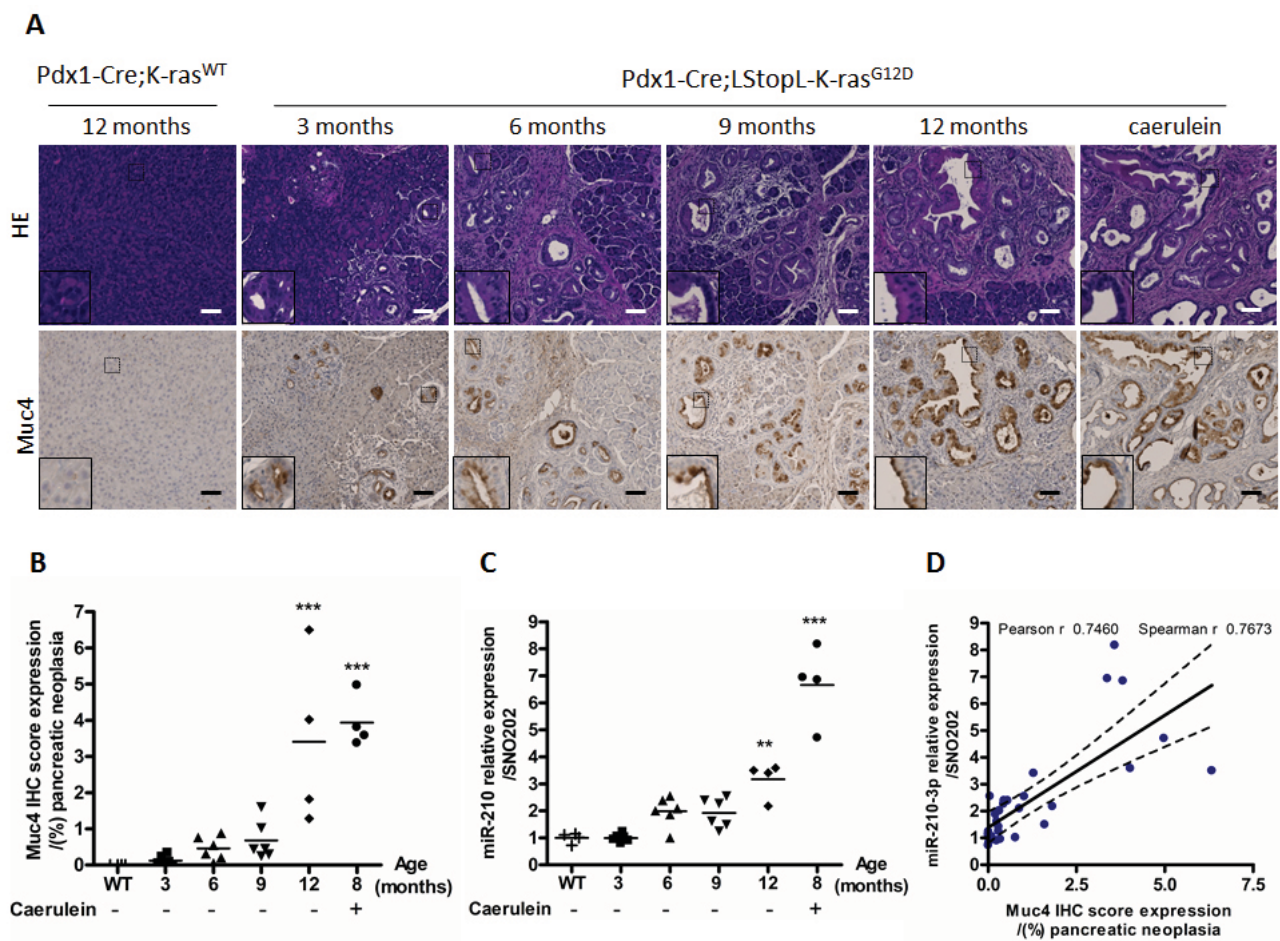


Figure 2. MiR-210-3p expression is correlated with Muc4 expression in PanIN lesions. **(A)** Hematoxylin and eosin stainings (upper panel) and Muc4 immunohistochemical staining (lower panel) were performed in pancreatic tissues from Pdx1-Cre; LStopL-K-ras^{G12D} (KC) (3, 6, 9, 12 months and 8-month-old caerulein-treated mice) and Pdx1-Cre; K-ras^{WT} (WT) control mice (12 months), representative of six mice per age. Scale bar: 100 μ m. **(B)** An immunostaining score of Muc4 expression was calculated in PanIN lesions from KC mice treated, or not, with caerulein. *** indicates statistical significance ($p < 0.001$) compared to WT mice. **(C)** miR-210-3p relative expression level was evaluated by RT-qPCR in PanINs pancreatic tissue from KC mice treated or not with caerulein and K-ras WT control mice. Data are expressed according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method ($\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ miR-210-3p} - Ct \text{ SNO202}) - Ct \text{ K-rasWT}$). MiR-210-3p expression in WT control mice was arbitrarily set to 1. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ indicates a statistical significance compared to WT mice. **(D)** Correlation analysis between miR-210-3p expression and Muc4 expression in PanIN lesions. Statistical analyses were performed using Pearson's and Spearman's correlation coefficients ($r = 0.7460$, $r = 0.7673$, respectively, $p < 0.0001$).

2.3. MUC4 Regulates miR-210 Expression at the Transcriptional Level

We previously demonstrated MUC4 involvement in transcriptional gene regulation via NF- κ B pathway modulation [9]. In this study, we investigated whether miR-210-3p expression level was also subject to this MUC4 regulatory mechanism via the NF- κ B signaling pathway. We first confirmed the MUC4 impact on NF- κ B pathway activity in PANC89. Indeed, we showed that MUC4-KD in PANC89 cells induce a $57.4 \pm 9.9\%$ significant decrease in relative luciferase activity of the κ B-Luc synthetic promoter compared to Mock cells ($p < 0.0001$, Figure 3A). We then performed transient NF- κ B knock-down in PANC89 cells and validated NF- κ B p50 siRNA efficacy by Western blot analysis showing a strong decrease in p50 NF- κ B subunit expression (41%, $p < 0.001$, Figure 3B). We observed a significant decrease in miR-210-3p expression level in PANC89 p50 NF- κ B knock-down cells compared to non-targeting (NT) siRNA control cells ($62.7 \pm 3.0\%$ decrease, $p < 0.0001$, Figure 3C). Using the Eukaryotic Promoter Database (<https://epd.epfl.ch//index.php>, accessed on 8 January 2019), we analyzed the miR-210 promoter and identified numerous

κ B putative binding sites in silico. We then investigated p50 NF- κ B subunit direct binding on the miR-210 promoter following chromatin immunoprecipitation experiments. We observed a p50 NF- κ B binding enrichment compared to IgG negative control on four miR-210 promoter regions (P1–P4), encompassing seven different κ B p50 binding sites tested in PANC89 cells (Figure 3D,E). Interestingly, we observed that these NF- κ B p50–miR-210 promoter interactions were lost in PANC89 MUC4-KD cells.

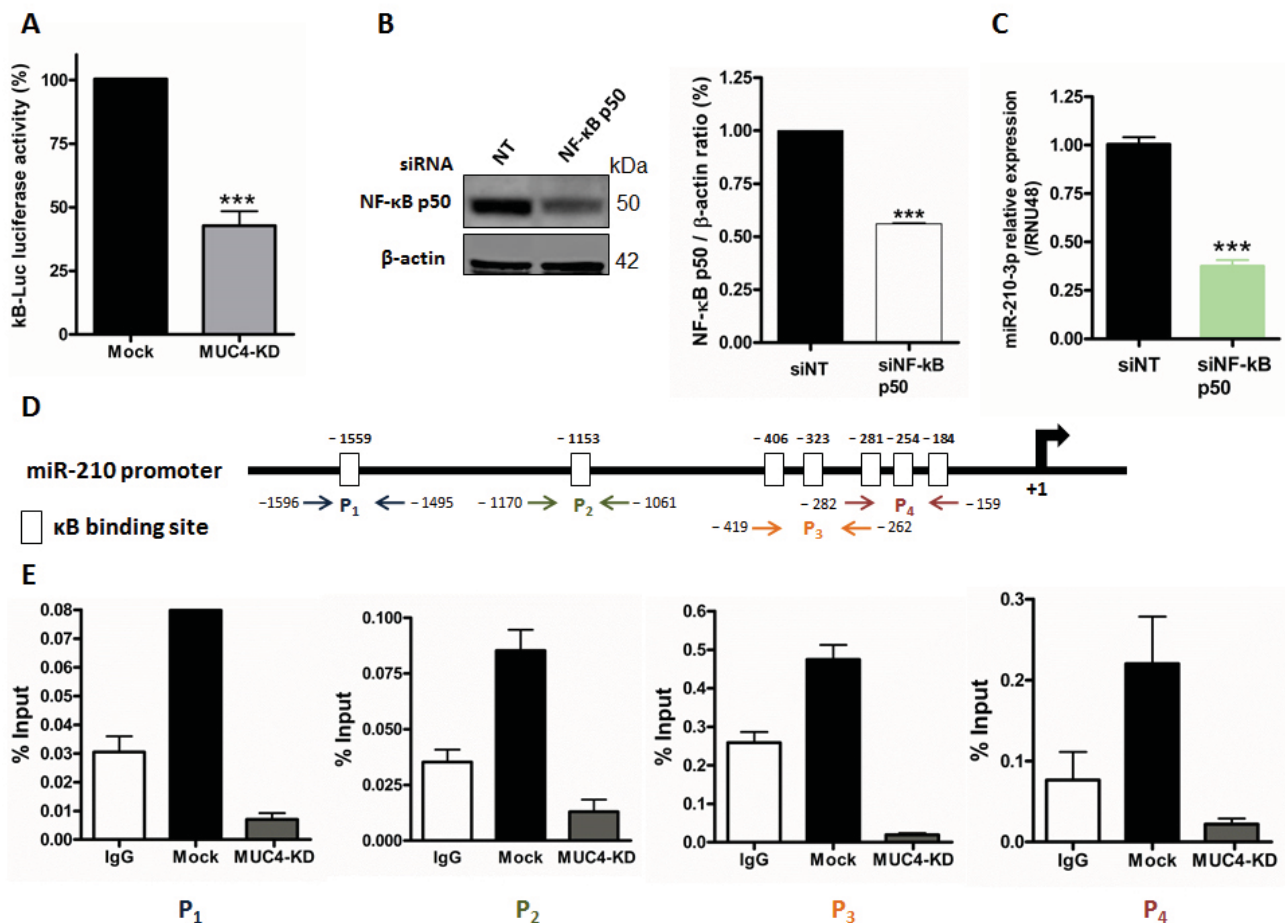


Figure 3. MUC4 regulates miR-210 expression through NF- κ B pathway. (A) Luciferase activity of the κ B-Luc synthetic reporter construct was measured 48 h following transient transfection in Mock and MUC4-KD PANC89 cells. Luciferase activity in Mock cells was set as 100%. *** indicates statistical significance compared to mock cells ($p < 0.001$). Three independent experiments were performed. (B) Western blotting analysis of NF- κ B p50 and β -actin expression in siNF- κ B p50 transfected cells and corresponding siNT control. P50/ β -actin ratio is indicated on the histogram. (C) RT-qPCR analysis of miR-210-3p relative expression in NF- κ B siRNA (siNF- κ B p50)-transfected PANC89 cells. Expression in siNT control cells was arbitrarily set to 1. *** indicates statistical significance compared to siNT control cells ($p < 0.001$). Three independent experiments were performed. (D) miR-210 promoter schematic representation. κ B predicted binding sites are indicated with white boxes. Four primer pairs (p) were used for ChIP assays and are indicated with colored arrows. (E) Chromatin immunoprecipitation of miR-210 promoter regions (P1[−1596/−1496], P2[−1070/−1061], P3[−419/−262] and P4[−282/−159] with NF- κ B p50. Chromatin enrichment was normalized to the input. Three independent experiments were performed.

Altogether, these results indicate that MUC4 transcriptionally regulates miR-210-3p expression via NF- κ B pathway activation and direct p50 binding on the miR-210 promoter.

2.4. MiR-210-3p Represses MUC4 Expression in PDAC-Derived Cells

After demonstrating that MUC4 mediates miR-210 expression regulation (Figure 3), we aimed at determining the existence of MUC4 and miR-210-3p reciprocal regulation.

Using the MicroCosm Targets miRNA database, (European Bioinformatic institute), we identified in silico three putative miR-210-3p binding sites in MUC4 3'-UTR at positions 219–240 (site #1), 159–182 (site #2) and 248–268 (site #3), respectively (Figure 4A). In order to study MUC4 regulation by miR-210-3p, we generated stable PANC89 AAVS1 cell lines expressing miR-210-3p, anti-miR-210-3p or their corresponding controls miR-scramble and anti-miR-control, respectively. We validated that our cell models harbored an increased miR-210-3p relative expression level in AAVS1-miR-210-3p cells (3-fold) and a decreased relative expression level in AAVS1-anti-miR-210-3p cells (54% decrease) compared to their corresponding controls, miR-scramble and anti-miR-control, respectively (Figure 4B). Western blot analysis showed a strong MUC4 expression inhibition in PANC89 AAVS1-miR-210-3p cells (91% decrease, $p < 0.001$, Figure 4C) compared to AAVS1-miR-scramble cells. On the contrary, anti-miR-210-3p induced an increase in MUC4 expression level (1.9-fold, $p < 0.01$) compared to AAVS1-anti-miR-control cells. Finally, we investigated whether miR-210-3p regulates MUC4 expression through its 3'-UTR. Therefore, we performed a co-transfection of MUC4 3'-UTR-luciferase reporter construct and miR-210-3p in PANC-1 cells to prevent interference or sponge effect of endogenous MUC4 mRNA. We observed a significant reduction in relative luciferase activity in PANC-1 cells overexpressing miR-210-3p compared to PANC-1 miR-scramble cells ($34.4 \pm 9.3\%$ decreases, $p = 0.0215$, Figure 4D).

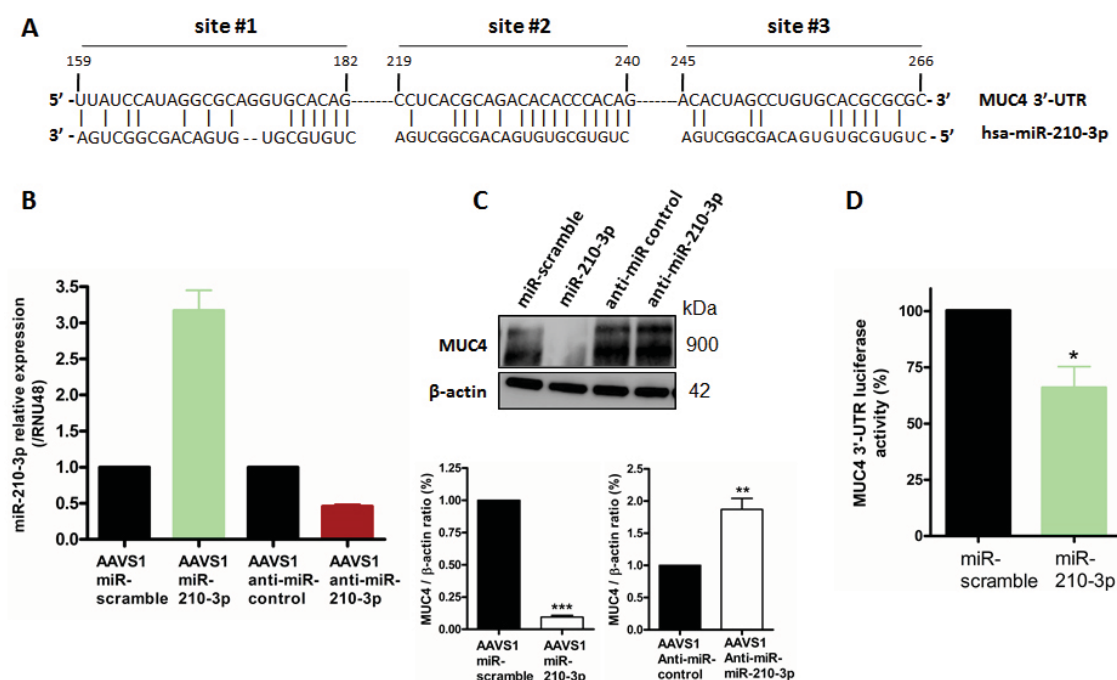


Figure 4. MiR-210-3p represses MUC4 expression via its 3'-UTR. (A) Identification of three putative miR-210-3p binding sites in MUC4 3'-UTR at the positions 219–240 (site #1), 159–182 (site #2) and 248–268 (site #3). (B) RT-qPCR analysis of miR-210-3p relative expression level in PANC89 stably transfected with miR-210-3p and anti-miR-210-3p and their respective controls, miR-scramble and anti-miR-control, using CRISPR/Cas9 recombination at AAVS1 integration site. Expression levels are evaluated with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method ($\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ miR-210} - Ct \text{ RNU48}) - Ct \text{ miR-scramble or miR-control}$). (C) Western blotting analysis of MUC4 and β -actin expression in PANC89 AAVS1-miR-210-3p, PANC89 AAVS1-anti-miR-210-3p and their controls PANC89 miR-scramble and PANC89 miR-control. The density of each band was measured by imageJ and control density was arbitrarily set to 1. MUC4/ β -actin ratios are indicated on the histograms. Three independent experiments were performed. (D) PANC-1 cells were co-transfected with the pGL3-MUC4-3'-UTR reporter plasmid and the miR-210-3p or miR-scramble. Luciferase activity was measured 48 h after transfection and set as 100% in miR-scramble transfected cells. * $p < 0.05$ indicates statistical significance compared to miR-scramble cells ($p = 0.0215$). ** indicates $p < 0.01$; *** indicates $p < 0.001$. Three independent experiments were performed.

Altogether, these results show that miR-210-3p represses MUC4 expression via its 3'-UTR.

2.5. MiR-210-3p Inhibits PDAC-Derived Cell Proliferation and Migration In Vitro

We further investigated the miR-210-3p biological roles in vitro in PANC89 (expressing MUC4), PANC-1 and MIA PaCa-2 (not expressing MUC4) pancreatic cancer cells by performing transient and stable transfections. MiR-210-3p transfection efficacy was evaluated by RT-qPCR (Figure S3). We first assessed MTT assays to evaluate global miR-210-3p effects on cell viability. We observed a significant decrease in cell viability in all transient and stable miR-210-3p overexpressing cells compared to miR-scramble overexpressing cells (20–40% decrease $p < 0.001$ Figure 5A). On the contrary, anti-miR-210-3p induced a significant increase in cell viability in PANC-1 and PANC-89 AAVS1 anti-miR-210-3p cells compared to AAVS1 anti-miR-control cells (63.4 ± 0.02 and $72.48 \pm 0.02\%$ increase, respectively, $p < 0.001$ Figure 6A). We then studied miR-210-3p's roles in cell proliferation using Incucyte™ technology. Cell confluency was significantly decreased in miR-210-3p overexpressing cells while miR-210-3p inhibition significantly enhanced PANC89 and PANC-1 cell proliferation compared to control conditions (Figures 5B and 6B). Finally, we performed wound healing assays in order to investigate miR-210-3p's impact on cell-migration in pancreatic cancer cells. We showed that miR-210-3p overexpression significantly reduces the cell-migration compared to miR-scramble cells. Moreover, anti-miR-210-3p enhances cell-migration in PANC89 and PANC-1 cells compared to anti-miR-control cells (Figures 5C,D and 6C,D). Interestingly, we noticed that the highest miR-210-3p effects on cell viability, proliferation and migration processes were observed in MUC4-expressing PANC89 cells compared to PANC-1 and MIA PaCa-2 cells.

Altogether, these results highlight the anti-tumoral roles of miR-210-3p in pancreatic cancer cells.

2.6. MiR-210-3p Inhibits Pancreatic Tumor Growth In Vivo

In order to investigate miR-210-3p's in vivo functions, we used Capan-1 PDAC cells that were previously transfected with a lentivirus encoding miR-210-3p (LV-miR-210-3p and LV-miR-neg control cells). First, we validated a strongest miR-210-3p overexpression using RTqPCR analysis (13.8 ± 1.2 -fold change, $p < 0.001$, Figure 7A). We confirmed the in vitro miR-210-3p anti-proliferation effect in Capan-1 LV-miR-210-3p compared to LV-miR-neg cells (38.1% decrease, $p < 0.001$) (Figure 7B) as previously demonstrated in Figures 5 and 6. These cells were then subcutaneously xenografted in SCID mice and tumor growth was evaluated for 51 days. We observed that LV-miR-210-3p Capan-1 tumors were significantly smaller than LV-miR-neg control tumors (42% decrease, $p < 0.05$) at 39 days and the difference was sustained until mice were euthanized (Figure 7C). Tumors were extracted and Ki67 index was analyzed by immuno-staining (Figure 7D,E). We observed a statistically significant decrease in the Ki-67⁺ cell percentage in tumors from LV-miR-210-3p (66.6 ± 18.9 decrease, $p = 0.0245$) compared to miR-neg control tumors. Moreover, Western blot analysis of Capan-1 LV-miR-210-3p cells showed a decrease in proliferation-associated protein levels, such as S474 phospho-Akt, constitutive Akt and Cyclin D1 compared to Capan-1 LV-miR-neg control cells (Figure 7F and Figure S4).

Altogether, these results demonstrate that the miR-210-3p ectopic over-expression inhibits Capan-1 cell proliferation and decreases tumor growth in vivo.

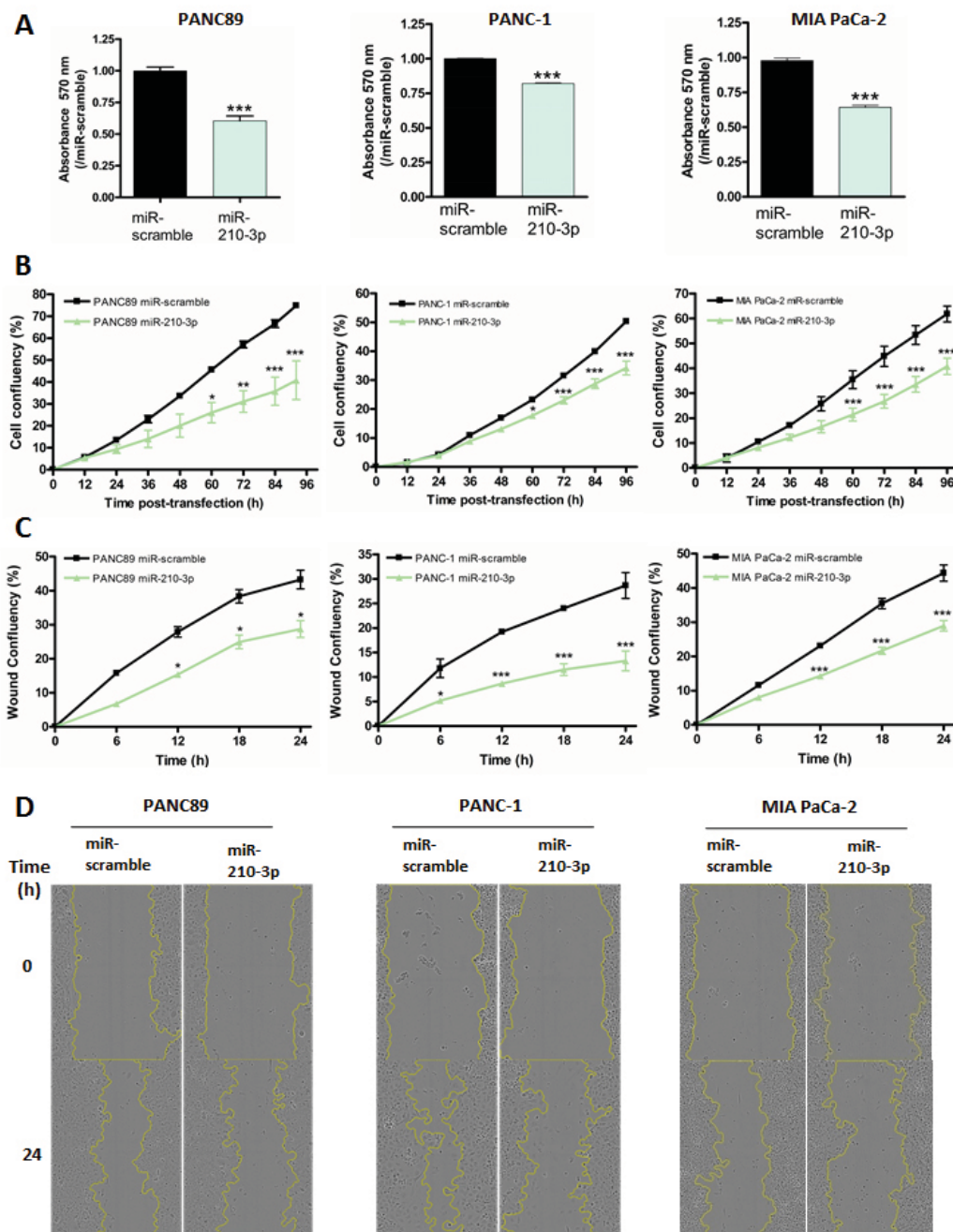


Figure 5. Transient expression of miR-210-3p inhibits proliferation and migration of pancreatic cancer cells. (A) PANC89, PANC-1 and MIA PaCa-2 cells were transiently transfected with miR-210-3p or miR-scramble for 96 h. Cell viability was assessed using MTT assays. MiR-scramble condition was arbitrarily set to 1. Three independent experiments were performed. (B) Cell confluency was evaluated using the Incucyte™ apparatus over 96 h following miR-210-3p or miR-scramble transient transfection of PANC89, PANC-1 and MIA PaCa-2 cells. Three independent experiments were performed. (C) Wound-healing assays were performed in transiently transfected miR-210-3p or miR-scramble cells. Wound area was measured every 6 h for 24 h using an Incucyte™ instrument. Experiments were performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ indicate statistical significance compared to miR-scramble. Three independent experiments were performed. (D) Representative images of wound healing in PANC89, PANC-1 and MIA PaCa-2 cells.

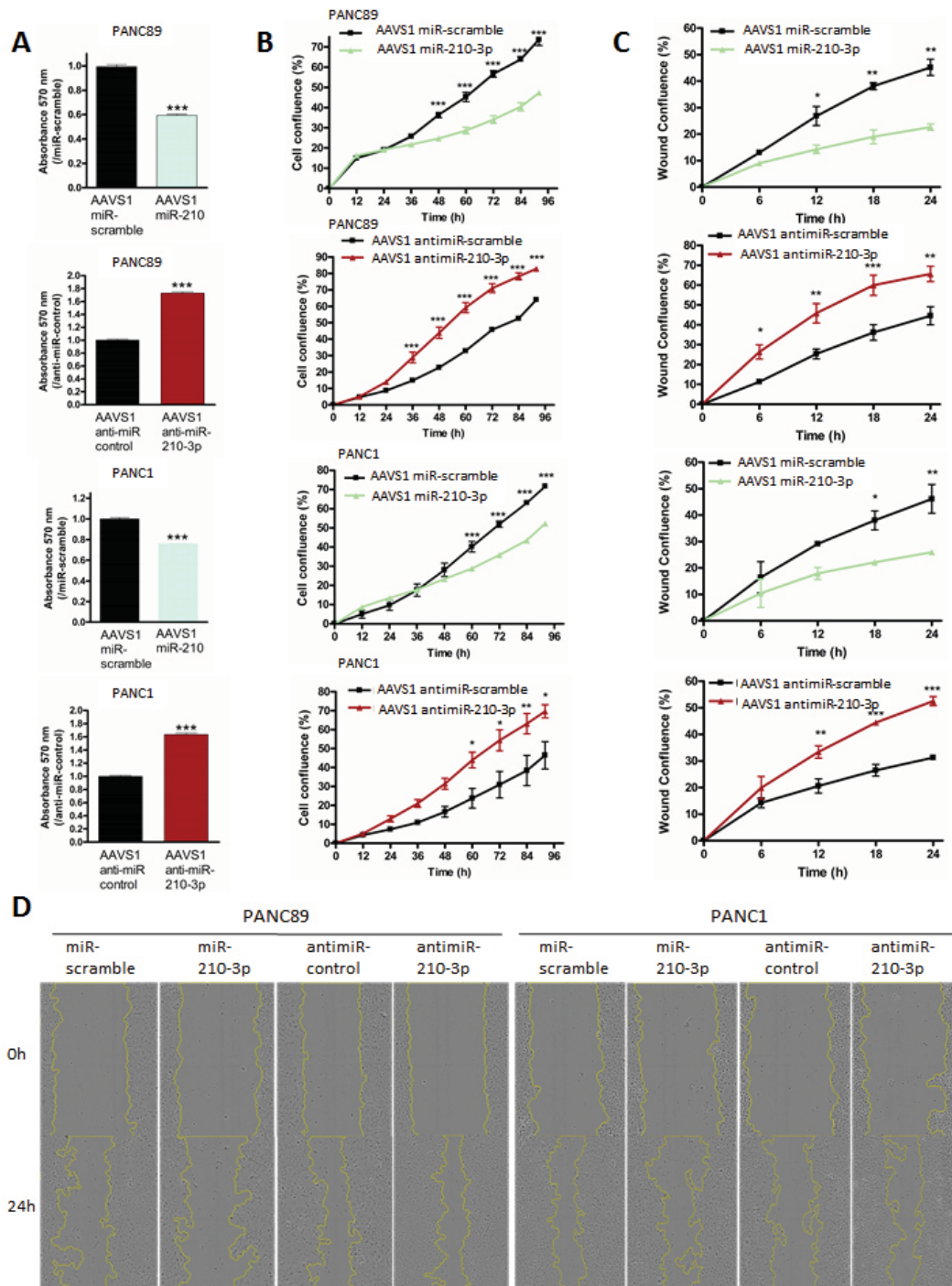


Figure 6. Stable expression of miR-210-3p and anti-miR-210-3p regulate the proliferation and migration of pancreatic cancer cells. PANC89 and PANC1 cells were stably transfected with either miR-210-3p, anti-miR-210-3p or miR-scramble and anti-miR-scramble corresponding controls using CRISPR/Cas9 recombination at the AAVS1 integration site. (A) Cell viability was assessed using MTT assays. MiR-scramble or anti-miR-scramble conditions were arbitrarily set to 1. Three independent experiments were performed. (B) Cell confluency was evaluated using the Incucyte™ instrument every 12 h during 96 h. Three independent experiments were performed. (C) Wound-healing assays were performed after seeding 30,000 cells. Wound area was measured every 6 h during 24 h using the Incucyte™ instrument. Three independent experiments were performed. (D) Representative images of wound healing in PANC89 and PANC-1 cells expressing miR-210-3p or anti-miR-210-3p. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ indicate statistical significance compared to miR-scramble or anti-miR-control.

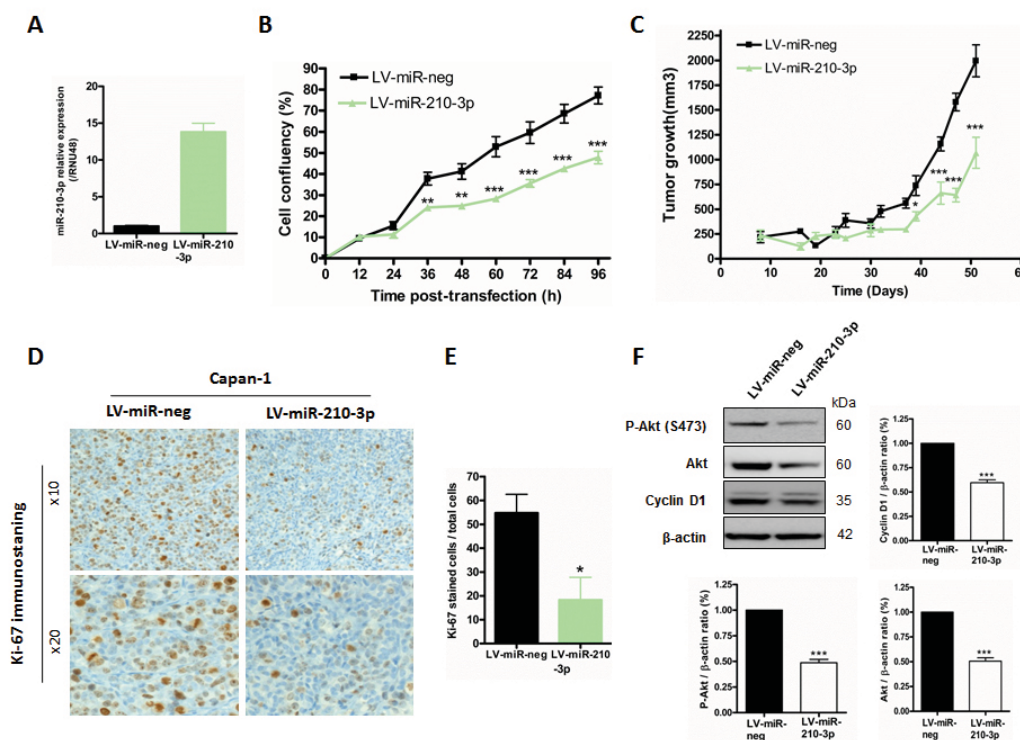


Figure 7. MiR-210-3p inhibits pancreatic tumor growth in vivo. (A) RT-qPCR analysis of miR-210-3p relative expression in Capan-1 LV-miR-210 and Capan-1 LV-miR-neg control cells. MiR-210-3p expression is evaluated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method ($\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ miR-210} - Ct \text{ RNU48}) - Ct \text{ miR-neg}$). MiR-210-3p expression in Capan-1 LV-miR-neg control cells was arbitrarily set to 1. (B) Proliferation of Capan-1 LV-miR-210 cells compared with their controls, LV-miR-neg (** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$). Three independent experiments were performed. (C) Subcutaneous xenografts of Capan-1 LV-miR-210-3p and Capan-1 LV-miR-neg control cells in SCID mice. Tumor growth (mm^3) was evaluated until mice were euthanized. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ indicate statistical significance of miR-210-3p compared with miR-neg control. (D) Ki-67 immuno-histochemical staining was performed on xenografted tumors. Original magnification: $\times 10$ (upper panel) and $\times 20$ (lower panel). (E) Ki-67⁺ percentage was calculated and represented as histograms. * $p < 0.05$ indicates statistical significance of miR-210-3p compared to miR-neg control. (F) Western blot analysis of S474 phospho-Akt, Akt, Cyclin D1 and β -actin protein expression in Capan-1 LV-miR-210-3p and Capan-1 LV-miR-neg control cells. Akt/ β -actin, pAKT/ β -actin, and Cyclin D1/ β -actin ratios are indicated on the respective histograms. Three independent experiments were performed. *** $p < 0.001$ indicates statistical significance compared to Capan-1 LV-miR-neg control cells.

3. Discussion

In the present manuscript, we observed that both MUC4 and miR-210 are overexpressed in PDAC. Interestingly, inhibition of MUC4 expression leads to a decrease in miR-210-3p relative level via the alteration of the NF- κ B signaling pathway. Moreover, we also showed that miR-210-3p represses MUC4 expression via its 3'-UTR, suggesting a negative feedback regulation loop. Finally, we characterized miR-210-3p roles in PDAC using in vitro and in vivo approaches and showed that it acts as an anti-tumor miRNA.

MUC4 is a key actor in pancreatic carcinogenesis [24,25]. Since its neoexpression in PanIN's earlier stages, MUC4 contributes to progression and aggressiveness of PDAC. Several in vitro and in vivo studies demonstrated that MUC4 modulates pancreatic tumor growth, cell proliferation, invasion and apoptosis [8,9,26,27]. Nevertheless, the underlying mechanisms associated with MUC4 expression remain to be fully deciphered. In this study, we identified miR-210-3p as a MUC4-regulated microRNA and deciphered the NF- κ B mechanism involved in this regulation. Finally, we demonstrated the miR-210-3p effects on the biological properties of pancreatic cancer cells. MiR-210-3p was initially described in ovarian cancer as a crucial player in tumor onset and a key regulator of the hypoxia response [28]. MiR-210-3p is a predominant hypoxia HIF1 α -inducible microRNA in a broad

spectrum of cancer types, including pancreatic cancer. In addition to its well-described role as a hypoxic regulator, miR-210-3p is also expressed under normoxia conditions and modulates tumor initiation [29]. In this study, we aimed at investigating MUC4-miR-210 roles in earlier stages of pancreatic tumor formation before the hypoxia response activation. We identified and characterized the MUC4-miR-210-3p feedback regulation loop in PDAC cells under normoxia conditions and showed that miR-210-3p inhibits pancreatic cancer cell proliferation and migration. We also observed that MUC4 is induced in hypoxic conditions and that miR-210-3p relative level is reduced when MUC4 expression is inhibited (MUC4-KD cells) compared to control Mock cells (Jonckheere, unpublished results).

In PDAC, both MUC4 and miR-210-3p are up-regulated [5,14,15,25] and associated with poor prognosis [15,30]. In this study, we revealed a positive correlation between Muc4 expression and miR-210-3p during PanIN initiation and progression. Moreover, the inhibition of MUC4 in PDAC cells induces a significant decrease in miR-210-3p expression levels. Our result suggests a potential implication of MUC4 in miR-210-3p transcriptional regulation. Indeed, it is now established that MUC4 is able to modulate gene expression through cell signaling activation as we observed a significant decrease in NF- κ B activity in MUC4-KD PANC89 pancreatic cancer cells. For instance, we previously showed that MUC4 induced hCNT1 upregulation in PDAC cells via NF- κ B pathway modulation [9]. NF- κ B is a family of dimeric transcription factors central to inflammatory responses, immunity, cellular differentiation, proliferation and survival in multicellular organisms [31]. The NF- κ B network dysregulation has been implicated in a wide range of diseases, including cancers. In PDAC, it promotes tumor progression by regulating genes implicated in proliferation, angiogenesis and survival. The NF- κ B pathway is well known to be constitutively activated in PDAC compared to normal pancreas [32]. The regulatory network formed by transcription factors and miRNA has been extensively studied. The miR-210 gene is located in an intron of a noncoding RNA, miR210HG, located on chromosome 11p15.5 (NCBI, gene, 406992). A functional NF- κ B p50-binding site was identified and acts as transcriptional activator of miR-210 expression in pre-eclampsia disease [33]. In our work, we demonstrated that NF- κ B inhibition in PANC89 pancreatic cancer cells using siNF- κ B p50 significantly decreased the miR-210-3p relative level. Based on this result, we investigated NF- κ B p50 implication on miR-210-3p transcriptional regulation under MUC4 control in pancreatic cancer cells. Mapping of a 2-kb core promoter region immediately upstream of the miR-210-3p stem-loop structure allowed us to identify several putative κ B binding sites. Structural and functional studies revealed that NF- κ B p50 can physically interact with the miR-210 promoter and transactivate it in PDAC-derived cells. Interestingly, we demonstrated that the MUC4-KD abolished NF- κ B p50-miR-210 promoter interactions via NF- κ B activity inhibition. We previously showed NF- κ B subunit accumulation in the cytoplasmic fraction of MUC4-KD cancer cells [9].

In silico analysis of MUC4 3'-UTR allowed us to identify three miR-210-3p binding sites. This result suggests that MUC4 is a potential miR-210 target. Complex regulation of MUC4 has been demonstrated, as MUC4 is regulated (1) at the epigenetic level via DNA methylation and histone modifications [34], (2) at the transcriptional level via the epidermal growth factor [35], transforming growth factor β [36,37] and Kras-activated MAPK and NF- κ B pathways [23] and (3) at the post-transcriptional level via miRNAs. Indeed, in PDAC-derived cells, MUC4 is a functional target of miR-150 [21] and miR-219-1-3p [20]. Similarly, in this report, we demonstrate that miR-210-3p is a MUC4 regulator. We demonstrated that miR-210-3p inhibits MUC4 expression at the post-transcriptional level via the MUC4 3'-UTR. In this study we showed that MUC4 and miR-210-3p regulate each other. MiR-210-3p transcriptional activation by MUC4 appears to be sustained during pancreatic carcinogenesis as their expressions are positively correlated and both MUC4 and miR-210-3p are overexpressed in PDAC cells and tissues.

Conversely, we hypothesize that MUC4 escapes miR-210-3p regulation during late pancreatic cancer stages since MUC4 is aberrantly upregulated in advanced PDAC even in the presence of high miR-210-3p expression levels. Accordingly, we observed similar

findings in KC mice, which harbored strong MUC4 immuno-staining and high levels of miR-210-3p, suggesting that cellular mechanisms promoting MUC4 expression can overcome miR-210-3p-induced repression. This could be due to altered expression of other miR-210 targets that trap the miRNA in other regulons. We therefore suggest that the MUC4–miR-210 negative feedback loop is exclusively effective in earlier stages of pancreatic cancer in order to maintain cell homeostasis and inhibit tumor initiation under normoxic conditions (Figure 8).

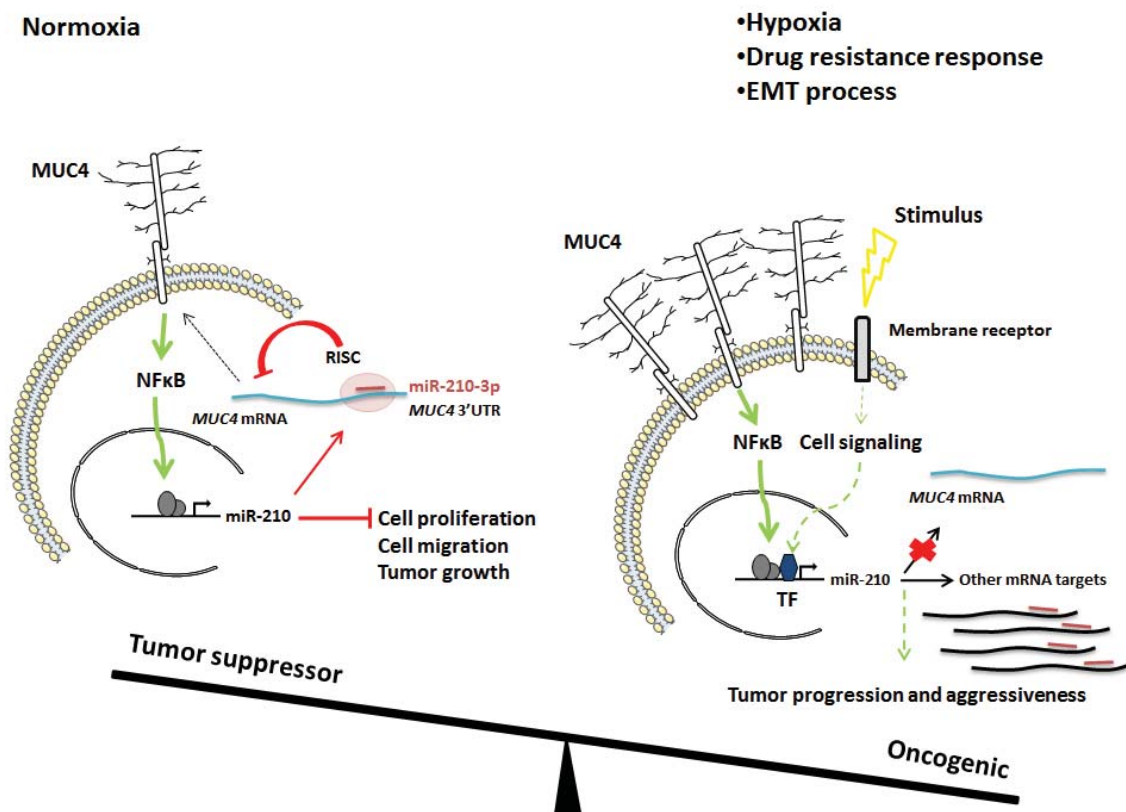


Figure 8. Schematic representation of overall miR-210-3p tumor suppressor/oncogenic effects in PDAC cells. Left: MUC4–miR-210-3p negative feedback loop that we identified under normoxic conditions. Right: Hypothetical model of miR-210-3p regulation and roles under hypoxia, drug resistance or metastasis signaling. Green arrows represent activating signals. Red arrows represent inhibitor signals. Short red line represents miR-210-3p. RISC: RNA-induced silencing complex. TF: transcription factors.

Although miR-210 tissue expression is inversely correlated to survival in PDAC patients [15], we showed that miR-210-3p ectopic expression inhibits *in vitro* proliferation and migration of pancreatic cancer cells and tumor growth in a xenograft model. Several studies show controversial miR-210-3p effects on pancreatic cancer cells biological processes. It is well known that miRNAs had different roles depending on their origin, spatiotemporal expression, environmental stimuli and cell types. Indeed, several studies demonstrated an oncogenic miR-210-3p effect. Yang and colleagues suggested that miR-210-3p in exosomes derived from gemcitabine-resistant pancreatic cancer stem cells induce drug resistance in gemcitabine-sensitive pancreatic cancer [38]. Moreover, miR-210 mediates the occurrence of epithelial–mesenchymal transition (EMT) of pancreatic cancer cells under hypoxia [39]. In contrast, other studies suggested a miR-210-3p tumor-suppressing effect as it inhibits pancreatic cell proliferation [40] and represses the initiation of tumor growth under normoxic conditions [29]. The overall balance between miR-210-3p pro- and anti-tumorigenic effects may depend on its spatiotemporal expression (center or periphery of tumor, early or late phases of cancer) and environmental stimuli (such as hypoxia, chemotherapy).

In summary, we show for the first time the existence of a reciprocal regulation loop between MUC4 and miR-210-3p. Moreover, our findings indicate that miR-210-3p could be a good anti-tumor candidate by inhibiting both MUC4 expression and tumor initiation.

4. Conclusions

In the present work, we showed for the first time the existence of a feedback regulation between MUC4 and miR-210-3p. We observed that both miR-210-3p and MUC4 expression levels are increased in pancreatic cancer. We deciphered the complex MUC4–miR-210-3p negative regulation loop in PDAC. Indeed, we observed that MUC4 activates miR-210-3p transcriptional expression via NF- κ B pathway modulation and leads to miR-210-3p overexpression in pancreatic cancer cells and tissues. On the contrary, miR-210-3p inhibits MUC4 expression via its 3' UTR *in vitro*. Finally, we demonstrated *in vitro* and *in vivo* anti-proliferative and anti-migratory effects of miR-210-3p in PDAC, suggesting a complex balance between oncogenic roles of MUC4 and anti-tumoral roles of miR-210-3p.

5. Materials and Methods

5.1. Human Pancreatic Ductal Tumor Sample

A total of nine paired human PDAC tissues and their corresponding adjacent normal tissues were collected from PDAC patients in Lille University Hospital (Lille, France) [41]. Every patient signed an informed consent form of non-opposition to research use of a biological sample. A part of surgically resected samples was immediately fixed in formaldehyde and embedded in paraffin. All patients were naive of any chemotherapy prior to surgery.

5.2. *Pdx1-Cre; LSL-KrasG12D* Mouse Model

Pdx1-Cre (C57Bl/6 background) and *LStopL-KrasG12D* (C57Bl/6 background) transgenic mice were previously described in [23]. *LSL-KrasG12D* and *Pdx1-Cre* mice were maintained as heterozygous lines and crossed to obtain *Pdx1-Cre; LSL-KrasG12D* (KC). After sacrifice and dissection, pancreas from 3-, 6-, 9- and 12-month old KC and WT control mice were fixed and embedded in paraffin.

Intraperitoneal injections of 37.5 μ g/mL caerulein solution were performed on 6-month-old KC and WT control mice following two processing steps. First, an acute treatment with an injection every hour for 6 h (1st day) followed by a chronic treatment with an injection every day (5 days a week) for 59 days. At the end of the protocol, pancreas were dissected, fixed and embedded in paraffin. All procedures were in accordance with the guideline of Animal Care Committee (#00422.02).

5.3. Cell Lines and Culture Conditions

PANC89 pancreatic cancer cells and 647-V bladder cancer cells were obtained from Dr FX Real (CNIO, Madrid, Spain). MIA PaCa-2 (ATCC[®] CRL-1420[™]) and PANC-1 (ATCC[®] CRL-1469[™]) pancreatic cancer cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). MUC4 knocked-down (MUC4-KD) cells were obtained as described previously [9]. Cells were cultured in RPMI (PANC-89, Capan-1, 647-V) or DMEM (MIA PaCa-2, PANC-1) media containing, respectively, 15% (PANC-89 and Capan-1) and 10% (other cells) of heat-inactivated Fetal Bovine Serum and supplemented with 2mM L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin solution at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. These cell lines were authenticated according to the procedures recommended by the ATCC Institute.

5.4. Gene Expression Omnibus Microarray

Public pancreatic cancer microarray (GSE41369) was analyzed from the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, accessed on 8 December 2018). The mir-210 expression profile was established using nine tumors and adjacent non-tumor tissues from PDAC cases. Data were analyzed using GEO2R software.

5.5. Cell Transient Transfection

Transient miR-210-3p overexpression was performed using 30 nM of pre-miR-210-3p and siPORTNeoFX transfection reagent (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). Transient NF- κ B knockdown was performed using 5 μ M siRNA (NF- κ B1) from Dharmacon (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). The manufacturer's instructions were followed in both protocols. Controls were performed using pre-miR-scramble and non-targeting siRNA (NT). Transfection efficiency was evaluated, respectively, by RT-qPCR and Western blot analysis. Co-transfection of 1 μ g of pGL3-MUC4-3'UTR luciferase reporter plasmid obtained as described previously [20] and 30 nM of pre-miR-210-3p was performed using Lipofectamine 3000TM transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). Transfection of κ B-Luc synthetic promoter containing three κ B-binding sites was performed with Lipofectamine 3000TM transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). A luciferase reporter assay was performed 48 h post transfection.

5.6. Luciferase Reporter Assay

Relative luciferase activity was evaluated using a Mithras Microplate Reader LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) on cell lysates extracted using Reagent Lysis[®] Buffer (Promega, Madison, WI, USA). Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid method. Relative luciferase activity was normalized (/total protein concentrations) and expressed as a percentage of fold activation compared to control conditions. Each experiment was performed in triplicate.

5.7. Establishment of miR-210 Stable Cell Lines by CRISPR/Cas9 Genome Editing

PANC89 and PANC-1 AAVS1 miR-210-3p and anti-miR-210-3p and their corresponding controls AAVS1 miR-scramble and miR-control stable cell lines were established using the genome editing strategy. The coding DNAs for miR-210-3p, anti-miR-210-3p, miR-scramble and miR-control (Table 1) were cloned into pAAVS1-shRNA expression vector (#82697 Addgene, Watertown, MA, USA), under the U6 promoter and flanked by Adeno-Associated Virus Integration Site 1 (AAVS1) homology arms sequences. The expression vector was co-transfected with pCas9_GFP (#44719 Addgene, Watertown, MA, USA) and AAVS1 guide RNA (#41824 Addgene, Watertown, MA, USA) using Lipofectamine 3000TM Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) according to the manufacturer's instructions. Positive PANC89 and PANC-1 cells were selected with 2 μ g/mL of puromycin (Promega, Madison, WI, USA) chronic treatment. Genotyping experiments by AAVS1 PCR were then performed to validate the insertion of the constructs. Expression of mature miR-210-3p was quantified by RT-qPCR as described below. pCas9_GFP was a gift from Dr K. Musunuru (Addgene plasmid #44719; <http://n2t.net/addgene:44719>; RRID: Addgene_44719, Watertown, MA, USA) [42]. pAAVS1-shRNA was a gift from Dr A. Mullen (Addgene plasmid #82697; <http://n2t.net/addgene:82697>; RRID: Addgene_82697, Watertown, MA, USA) [43]. gRNA_Cloning Vector was a gift from Dr G. Church (Addgene plasmid #41824; <http://n2t.net/addgene:41824>; RRID: Addgene_41824, Watertown, MA, USA) [44]. Capan-1 LV-miR-neg and Capan-1 LV-miR-210 stable cell lines were obtained from Dr J. Torrisani (CRCT, Toulouse, France) as previously described in [20].

Table 1. Sequences of DNA blocks used for CRISPR/Cas9 cloning.

Block	Sense	Sequence (5' → 3')
miR-scramble	Forward	5'-CCGGTACACCATGTTGCCAGTCTCTAGGTGGGCGTATAGACGTGTTACACTGTGAAGC CACAGATGTGTAACACGTCTATACGCCCATGGCGTCTGGCCAACCACACTTTTTG-3'
	Reverse	5'-AATTCAAAAAGTGTGGTTGGGCCAGACGCCATGGGCGTATAGACGTGTTACACATCT GTGGCTTACAGTGTAAACAGTCTATACGCCACCTAGAGACTGGCAACATGGTGTGA-3'
miR-210	Forward	5'-CCGGTACACCATGTTGCCAGTCTCTAGGAGCCCCTGCCACCGCACACTGTGTGAAG CCACAGATCTGTGCGTGTGACAGCGGCTGATGGCGTCTGGCCAACCACACTTTTTG-3'
	Reverse	5'-AATTCAAAAAGTGTGGTTGGGCCAGACGCCATCAGCCGCTGTCACACGCACAGATCT GTGGCTTACACAGTGTGCGGTGGGCAGGGGCTCCTAGAGACTGGCAACATGGTGTGA-3'
Anti-miR-control	Forward	5'-CCGGTAGAGCTCCCTTCAATCCAAGTGAAGAGCTCCCTTCAATCCAACGCGTAGAGC TCCCTTCAATCCAATCGAGAGCTCCCTTCAATCCAACGCGTAGAGCTCCCTTCAATC CAAGTGAAGAGCTCCCTTCAATCCAACGCGTAGAGCTCCCTTCAATCCAATCGAGA GCTCCCTTCAATCCAATTTTTG-3'
	Reverse	5'-AATTCAAAAATTGGATTGAAGGGAGCTCTCGATTTGGATTGAAGGGAGCTCTACGCG TTGGATTGAAGGGAGCTCTTCACTTGGATTGAAGGGAGCTCTACGCGTTGGATTGAAGG GAGCTCTCGATTTGGATTGAAGGGAGCTCTACGCGTTGGATTGAAGGGAGCTCTTCACT TGGATTGAAGGGAGCTCTA-3'
Anti-miR-210-3p	Forward	5'-CCGGTTCAGCCGCTGTCACACGCACAGGTGATCAGCCGCTGTCACACGCACAGCGC GTTTACAGCCGCTGTCACACGCACAGATCGTCAGCCGCTGTCACACGCACAGCGCGTTCA GCCGCTGTCACACGCACAGGTGATCAGCCGCTGTCACACGCACAGCGCGTTTACAGCCG TGTCACACGCACAGATCGTCAGCCGCTGTCACACGCACAGTTTTT-3'
	Reverse	5'-AATTCAAAAAGTGTGCGTGTGACAGCGGCTGACGATCTGTGCGTGTGACAGCGGCTG AACGCGCTGTGCGTGTGACAGCGGCTGATCACCTGTGCGTGTGACAGCGGCTGAACGC GCTGTGCGTGTGACAGCGGCTGACGATCTGTGCGTGTGACAGCGGCTGAACGCGCTGT GCGTGTGACAGCGGCTGATCACCTGTGCGTGTGACAGCGGCTGAA-3'
SgRNA AAVS1		5'-GGGGCCACTAGGGACAGGATTGG-3'

5.8. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

Crosslinking of chromatin proteins to DNA was performed for 10 min at RT by adding formaldehyde drop-wise directly to the cell-culture medium to a final concentration of 1%. The reaction was stopped by the addition of 0.125 M glycine for 5 min. Cells were washed with 1× PBS, scrapped, and collected by centrifugation. Chromatin was prepared from nuclei purified by two successive extraction steps at 4 °C for 10 min, with 50 mM HEPES/KOH (pH 7.5); 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10% Glycerol; 0.5% NP-40; 0.25% Triton X-100] and [200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0.5 mM EGTA; 10 mM Tris (pH 8.0). Nuclei were resuspended in 50 mM Tris (pH 8.0); 0.1% SDS; 1% NP-40; 0.1% Na-Deoxycholate; 10 mM EDTA; 150 mM NaCl, supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma, P8340) and sonicated with Bioruptor Power-up (Diagenode, Toyama, Japan), yielding genomic DNA fragments with a bulk size of 150–300 bp. Chromatin was recovered by centrifugation at 14,000× g for 10 min at 4 °C and immunoprecipitation carried out overnight at 4 °C with specific antibodies directed against NF-κB p50 transcription factor (N-19, sc-1191) and the non-specific IgG control (bovine anti-goat IgG-HRP, sc-2350). Immune complexes were recovered by adding protein G-coupled magnetic beads and incubated for 2 h at 4 C. Beads were washed as follows: low salt buffer (0.1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris (pH 8.0); 150 mM NaCl) (×2), high salt buffer (0.1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris (pH 8.0); 500 mM NaCl) (×2), LiCl wash buffer (10 mM Tris (pH 8.0); 1% Na-deoxycholate; 1% NP-40, 250 mM LiCl; 1 mM EDTA] (once), and TE supplemented with 50 mM NaCl) (×2). Elution of cross-linking complexes was performed at 65°C using elution buffer (5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA, 10% (v/v) SDS). After reversion of cross-linking with 5 M of NaCl and digestion of chromatin-associated proteins with protease-K (Qiagen), DNA was purified using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel™, Allentown, PA, USA). RT-PCR analyses were conducted on 1 µL of

chromatin using SsoFast Evagreen Supermix kit (Bio-Rad, Marnes La coquette, France) and CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad, Marnes La coquette, France). Primers are listed in Table 2. Chromatin enrichment was normalized to input samples.

Table 2. Primer sequences for ChIP experiments.

Position from TSS	Orientation	Sequences (5' → 3')
−159/−282	Forward	5'-GACCACCTCGGGCCGTACCAT-3'
	Reverse	5'-CTTTTCTGCACGTCTGCCCG-3'
−262/−419	Forward	5'-CGGGAAGAGGGGCAGCTC-3'
	Reverse	5'-ATGGTACGGCCCGAGGTGGTC-3'
−1061/−1170	Forward	5'-CATGGGCTGGTTCCGAAGCTC-3'
	Reverse	5'-CATGACCTCCCTGCCTCGG-3'
−1475/−1596	Forward	5'-GGTGCCTGTGAAATTGGCAGGAC-3'
	Reverse	5'-GGGACAAGAAGGGGCAAGAGGAC-3'

5.9. RNA Isolation and Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) sample RNAs (from mice and human cells) were purified, respectively, using NucleoSpin® miRNA (Macherey-Nagel™, Allentown, PA, USA) and RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Life Technologies, Tokyo, Japan). MiRNA was measured by RT-qPCR using a TaqMan® MicroRNA Assays protocol (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) and CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France). Briefly, 5 ng of total RNA was reverse transcribed using a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit, including Taqman microRNA primers specific for miR-210-3p (hsa-miR-210-3p, 000512), RNU48 (001006) and snoRNA202 (001232) from Thermo Fisher Scientific, following manufacturer's instructions. The qPCR was carried out using TaqMan Gene Expression Master Mix II with Taqman microRNA specific primers using recommended PCR cycling conditions. Expression levels were normalized using RNU48 (human cells and tissues), or snoRNA202 (mice samples) and were measured using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

5.10. Immunoblotting

Total protein extraction and Western blotting analysis were carried out as described before [45,46]. After Western blotting, the nitrocellulose membrane (0.2 µm, Schleicher et Shüll, Life Technologies, Tokyo, Japan) was incubated with Akt (9272, Cell Signaling Technology, 1/500, Danvers, MA, USA), Cyclin D1 (M-21, sc 718, 1/500), NF-κB p50 (clone H-119, 1/500), and MUC4 (clone 8G7, 1/200) from Santa Cruz Biotechnology Inc and β-actin (AC-15, 1/10000, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Antibodies were diluted in 5% (w/v) non-fat dry milk in Tris-buffered saline (Tween-20). MUC4 and β-actin antibodies were diluted in Tris-buffered saline Tween-20 and incubated overnight at 4 °C. Peroxidase-conjugated secondary antibodies were used (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Immunoreactive bands were visualized with the LAS4000 device (Fujifilm, Courbevoie, France) using the Super Signal® West Pico chemoluminescent substrate (Thermo Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). Band density was quantified with the image analysis software ImageJ and represented as histograms.

5.11. Analysis of Cell Properties

MTT assay: Cell viability was measured using MTT assay. Briefly, 10^4 cells were cultured over 96 h. MTT (Sigma-Aldrich, 0.5 ng/ml, Saint-Quentin-Fallavier, France) was then added to the medium for 1 h. Formazan crystals were dissolved using 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Optical

density was evaluated at 570 nm using the Multiskan™ FC microplate photometer (Thermo Scientific™, Illkirch-Graffenstaden, France).

Cell proliferation: Cells were seeded in 96-well plates and incubated in the live cell imaging system IncuCyte® (IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System, Essen Bioscience, Ann Arbor, MI, USA). Cell confluency was measured and analyzed every 12 h over 96 h using the IncuCyte software. Experiments were performed in triplicate.

Wound Healing assay: cells were seeded at 3×10^5 in 96-well plates (ImageLock™ plates, Essen Bioscience, Ann Arbor, MI, USA) and incubated until confluence. Wounds were homogenously generated manually using the 96-well Wound Maker (Essen Bioscience, Ann Arbor, MI, USA). Pictures were collected every 2 h during 24 h using IncuCyte® apparatus before wound widths were analyzed. Results are expressed as wound confluency, which is the ratio of the occupied area of the initially scratched area to the total area of the scratch.

5.12. Subcutaneous Xenografts

Subcutaneous injection of CAPAN-1 LV-miR-neg or LV-miR-210 cells (10^6 cells in 100 μ L of Matrigel (R & D)) was performed into the flank of 8-week-old male severe combined immunodeficient mice (CB17, Charles Rivers, France). Groups consisted of six mice. Tumor volume was monitored by measuring length (L) and width (W) using the formula ($W^2 \times L$). All procedures were evaluated by the animal care committee (Comité Ethique Expérimentation Animale Nord Pas-de-Calais, #14123-2018012517309750).

5.13. Immunohistochemistry

Hematoxylin and eosin staining were performed on 5 μ m tissue sections. Primary antibodies specific for mouse Muc4 (1G8, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) and human Ki-67 (NLC Ki-67p Novocastra) were used for immunostaining as described previously [20,23]. The PanINs area was measured in each section using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) with a specific macro and reported relative to the total tissue area. The intensity of immunostaining was evaluated as follows: weak (1), moderate (2), or strong (3). Percentage of PanIN-stained cells: 1 (0–25%), 2 (25–50%), 3 (50–75%), and 4 (75–100%). Total Muc4 staining score was calculated by multiplying the PanIN areas with intensity and percentage scores. The number of Ki-67-stained cells was measured using ImageJ software (version 1.53k, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and reported to the total cell count.

5.14. Statistical Analyses

At least three independent experiments were performed for every assay. ANOVA and Student's t-test statistical analyses were performed using Graphpad Prism 4.0 software (Graphpad softwares Inc., La Jolla, CA, USA). $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13246197/s1>, Figure S1: MUC4 inhibition induced a decrease in miR-210-3p relative level in 647-V cells, Figure S2: MUC4 and miR-210 expression levels are correlated in TCGA-PAAD dataset, Figure S3: Evaluation of miR-210 expression in transient and stable expression cell models, Figure S4: Full pictures of Western blots.

Author Contributions: N.B., M.S. and N.J. conceived and designed the experiments. N.B., M.S., F.L., B.D., J.T. and N.J. performed the experiments. N.B., M.S., E.L., J.T. and N.J. analyzed the data. J.T. established the LV-miR-210-3p model. N.B. and N.J. wrote and edited the paper. B.N., L.C. and I.V.S. reviewed and edited the paper. I.V.S. and N.J. obtained funding. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (Inserm), “Centre National de la Recherche Scientifique” (CNRS), Université de Lille, “la Ligue Nationale contre le Cancer” (Comités CD59, CD62, CD80, N.J., I.V.S.) and “Région Nord Pas de Calais Contrat de Plan Etat Région” CPER Cancer 2015-2020 (I.V.S.). Nihad Boukrout is a recipient of a PhD fellowship from the University of Lille. Fatima Lahdaoui is a recipient of an engineer fellowship of CPER Cancer.

Institutional Review Board Statement: All procedures were evaluated by the animal care committee (Comité Ethique Expérimentation Animale Nord Pas-de-Calais, #14123-2018012517309750).

Informed Consent Statement: Every patient signed an informed consent form of non-opposition to research use of a biological sample.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

Acknowledgments: We are grateful to Mathieu Gautier, Virginie Mattot, Irina Naguibneva, Audrey Vincent for their insightful advice. We thank Céline Schulz (UGSF-UMR 8576 CNRS), Marie-Hélène Gevaert (Department of Histology, Faculty of Medicine, University of Lille, France) for technical help and the EOPS animal (J. Devassine) and imaging (M. Tardivel) facilities of the UMS 2014-US 41 (PLBS) of the University of Lille (S. Crespin).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Park, W.; Chawla, A.; O’Reilly, E.M. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA* **2021**, *326*, 851–862. [[CrossRef](#)]
2. Vincent, A.; Herman, J.; Schulick, R.; Hruban, R.H.; Goggins, M. Pancreatic cancer. *Lancet* **2011**, *378*, 607–620. [[CrossRef](#)]
3. Rahib, L.; Smith, B.D.; Aizenberg, R.; Rosenzweig, A.B.; Fleshman, J.M.; Matrisian, L.M. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 2913–2921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hruban, R.H.; Maitra, A.; Goggins, M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2008**, *1*, 306–316. [[PubMed](#)]
5. Swartz, M.J.; Batra, S.K.; Varshney, G.C.; Hollingsworth, M.A.; Yeo, C.J.; Cameron, J.L.; Wilentz, R.E.; Hruban, R.H.; Argani, P. MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am. J. Clin. Pathol.* **2002**, *117*, 791–796. [[CrossRef](#)]
6. Jonckheere, N.; Van Seuningen, I. The membrane-bound mucins: How large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies. *Crit. Rev. Oncog.* **2008**, *14*, 177–196. [[CrossRef](#)]
7. Liberelle, M.; Jonckheere, N.; Melnyk, P.; Van Seuningen, I.; Lebegue, N. EGF-Containing Membrane-Bound Mucins: A Hidden ErbB2 Targeting Pathway? *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 5074–5088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Jonckheere, N.; Skrypek, N.; Merlin, J.; Dessein, A.F.; Dumont, P.; Leteurtre, E.; Harris, A.; Desseyn, J.L.; Susini, C.; Frenois, F.; et al. The mucin MUC4 and its membrane partner ErbB2 regulate biological properties of human CAPAN-2 pancreatic cancer cells via different signalling pathways. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32232.
9. Skrypek, N.; Duchene, B.; Hebban, M.; Leteurtre, E.; van Seuningen, I.; Jonckheere, N. The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the Concentrative Nucleoside Transporter family. *Oncogene* **2013**, *32*, 1714–1723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **2004**, *431*, 350–355. [[CrossRef](#)]
11. Le Large, T.Y.; Meijer, L.L.; Prado, M.M.; Kazemier, G.; Frampton, A.E.; Giovannetti, E. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for pancreatic cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2015**, *15*, 1525–1529. [[CrossRef](#)]
12. Link, A.; Becker, V.; Goel, A.; Wex, T.; Malfertheiner, P. Feasibility of fecal microRNAs as novel biomarkers for pancreatic cancer. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e42933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sohrabi, E.; Rezaie, E.; Heiat, M.; Sefidi-Heris, Y. An Integrated Data Analysis of mRNA, miRNA and Signaling Pathways in Pancreatic Cancer. *Biochem. Genet.* **2021**, *59*, 1326–1358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Szabo, A.; Gurlich, R.; Liberko, M.; Soumarova, R.; Vernerova, Z.; Mandys, V.; Popov, A. Expression of selected microRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma: Is there a relation to tumor morphology, progression and patient’s outcome? *Neoplasma* **2020**, *67*, 1170–1181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Greither, T.; Grochola, L.F.; Udelnow, A.; Lautenschlager, C.; Wurl, P.; Taubert, H. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int. J. Cancer* **2010**, *126*, 73–80. [[CrossRef](#)]

16. Wang, J.; Chen, J.; Chang, P.; LeBlanc, A.; Li, D.; Abbruzzese, J.L.; Frazier, M.L.; Killary, A.M.; Sen, S. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev. Res.* **2009**, *2*, 807–813. [[CrossRef](#)]
17. Yu, Q.; Xu, C.; Yuan, W.; Wang, C.; Zhao, P.; Chen, L.; Ma, J. Evaluation of Plasma MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Adenocarcinoma: miR-196a and miR-210 Could Be Negative and Positive Prognostic Markers, Respectively. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 6495867. [[CrossRef](#)]
18. Liu, G.; Shao, C.; Li, A.; Zhang, X.; Guo, X.; Li, J. Diagnostic Value of Plasma miR-181b, miR-196a, and miR-210 Combination in Pancreatic Cancer. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2020**, *2020*, 6073150. [[CrossRef](#)]
19. Wu, L.; Zhou, W.B.; Zhou, J.; Wei, Y.; Wang, H.M.; Liu, X.D.; Chen, X.C.; Wang, W.; Ye, L.; Yao, L.C.; et al. Circulating exosomal microRNAs as novel potential detection biomarkers in pancreatic cancer. *Oncol. Lett.* **2020**, *20*, 1432–1440. [[CrossRef](#)]
20. Lahdaoui, F.; Delpu, Y.; Vincent, A.; Renaud, F.; Messenger, M.; Duchene, B.; Leteurtre, E.; Mariette, C.; Torrisani, J.; Jonckheere, N.; et al. miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer. *Oncogene* **2015**, *34*, 780–788. [[CrossRef](#)]
21. Srivastava, S.K.; Bhardwaj, A.; Singh, S.; Arora, S.; Wang, B.; Grizzle, W.E.; Singh, A.P. MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 1832–1839. [[CrossRef](#)]
22. Guerra, C.; Schuhmacher, A.J.; Canamero, M.; Grippo, P.J.; Verdaguier, L.; Perez-Gallego, L.; Dubus, P.; Sandgren, E.P.; Barbacid, M. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 291–302. [[CrossRef](#)]
23. Vasseur, R.; Skrypek, N.; Duchene, B.; Renaud, F.; Martinez-Maqueda, D.; Vincent, A.; Porchet, N.; Van Seuning, I.; Jonckheere, N. The mucin MUC4 is a transcriptional and post-transcriptional target of K-ras oncogene in pancreatic cancer. Implication of MAPK/AP-1, NF-kappaB and RalB signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1849*, 1375–1384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hollingsworth, M.A.; Swanson, B.J. Mucins in cancer: Protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 45–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Jonckheere, N.; Skrypek, N.; Van Seuning, I. Mucins and pancreatic cancer. *Cancers* **2010**, *2*, 1794–1812. [[CrossRef](#)]
26. Chaturvedi, P.; Singh, A.P.; Moniaux, N.; Senapati, S.; Chakraborty, S.; Meza, J.L.; Batra, S.K. MUC4 mucin potentiates pancreatic tumor cell proliferation, survival, and invasive properties and interferes with its interaction to extracellular matrix proteins. *Mol. Cancer Res.* **2007**, *5*, 309–320. [[CrossRef](#)]
27. Workman, H.C.; Sweeney, C.; Carraway, K.L., 3rd. The membrane mucin Muc4 inhibits apoptosis induced by multiple insults via ErbB2-dependent and ErbB2-independent mechanisms. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 2845–2852. [[CrossRef](#)]
28. Giannakakis, A.; Sandaltzopoulos, R.; Greshock, J.; Liang, S.; Huang, J.; Hasegawa, K.; Li, C.; O'Brien-Jenkins, A.; Katsaros, D.; Weber, B.L.; et al. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2008**, *7*, 255–264. [[CrossRef](#)]
29. Huang, X.; Ding, L.; Bennewith, K.L.; Tong, R.T.; Welford, S.M.; Ang, K.K.; Story, M.; Le, Q.T.; Giaccia, A.J. Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol. Cell* **2009**, *35*, 856–867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Jonckheere, N.; Vincent, A.; Neve, B.; Van Seuning, I. Mucin expression, epigenetic regulation and patient survival: A toolkit of prognostic biomarkers in epithelial cancers. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2021**, *1876*, 188538. [[CrossRef](#)]
31. Gerondakis, S.; Grumont, R.; Gugasyan, R.; Wong, L.; Isomura, I.; Ho, W.; Banerjee, A. Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* **2006**, *25*, 6781–6799. [[CrossRef](#)]
32. Wang, W.; Abbruzzese, J.L.; Evans, D.B.; Larry, L.; Cleary, K.R.; Chiao, P.J. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 119–127.
33. Zhang, Y.; Fei, M.; Xue, G.; Zhou, Q.; Jia, Y.; Li, L.; Xin, H.; Sun, S. Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: New insights into molecular mechanisms for the disease. *J. Cell. Mol. Med.* **2012**, *16*, 249–259. [[CrossRef](#)]
34. Vincent, A.; Ducourouble, M.P.; Van Seuning, I. Epigenetic regulation of the human mucin gene MUC4 in epithelial cancer cell lines involves both DNA methylation and histone modifications mediated by DNA methyltransferases and histone deacetylases. *FASEB J.* **2008**, *22*, 3035–3045. [[CrossRef](#)]
35. Perrais, M.; Pigny, P.; Ducourouble, M.P.; Petitprez, D.; Porchet, N.; Aubert, J.P.; Van Seuning, I. Characterization of human mucin gene MUC4 promoter: Importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 30923–30933. [[CrossRef](#)]
36. Andrianifahanana, M.; Agrawal, A.; Singh, A.P.; Moniaux, N.; van Seuning, I.; Aubert, J.P.; Meza, J.; Batra, S.K. Synergistic induction of the MUC4 mucin gene by interferon-gamma and retinoic acid in human pancreatic tumour cells involves a reprogramming of signalling pathways. *Oncogene* **2005**, *24*, 6143–6154. [[CrossRef](#)]
37. Jonckheere, N.; Perrais, M.; Mariette, C.; Batra, S.K.; Aubert, J.P.; Pigny, P.; Van Seuning, I. A role for human MUC4 mucin gene, the ErbB2 ligand, as a target of TGF-beta in pancreatic carcinogenesis. *Oncogene* **2004**, *23*, 5729–5738. [[CrossRef](#)]
38. Yang, Z.; Zhao, N.; Cui, J.; Wu, H.; Xiong, J.; Peng, T. Exosomes derived from cancer stem cells of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells enhance drug resistance by delivering miR-210. *Cell. Oncol.* **2020**, *43*, 123–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Ni, J.; Zhou, S.; Yuan, W.; Cen, F.; Yan, Q. Mechanism of miR-210 involved in epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells under hypoxia. *J. Recept. Signal Transduct.* **2019**, *39*, 399–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Sun, F.B.; Lin, Y.; Li, S.J.; Gao, J.; Han, B.; Zhang, C.S. MiR-210 knockdown promotes the development of pancreatic cancer via upregulating E2F3 expression. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2018**, *22*, 8640–8648. [[PubMed](#)]

41. Trehoux, S.; Lahdaoui, F.; Delpu, Y.; Renaud, F.; Leteurtre, E.; Torrisani, J.; Jonckheere, N.; Van Seuning, I. Micro-RNAs miR-29a and miR-330-5p function as tumor suppressors by targeting the MUC1 mucin in pancreatic cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1853 Pt A*, 2392–2403. [[CrossRef](#)]
42. Ding, Q.; Regan, S.N.; Xia, Y.; Ostrom, L.A.; Cowan, C.A.; Musunuru, K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell* **2013**, *12*, 393–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Daneshvar, K.; Pondick, J.V.; Kim, B.M.; Zhou, C.; York, S.R.; Macklin, J.A.; Abualteen, A.; Tan, B.; Sigova, A.A.; Marcho, C.; et al. DIGIT Is a Conserved Long Noncoding RNA that Regulates GSC Expression to Control Definitive Endoderm Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 353–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mali, P.; Yang, L.; Esvelt, K.M.; Aach, J.; Guell, M.; DiCarlo, J.E.; Norville, J.E.; Church, G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **2013**, *339*, 823–826. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Jonckheere, N.; Fauquette, V.; Stechly, L.; Saint-Laurent, N.; Aubert, S.; Susini, C.; Huet, G.; Porchet, N.; Van Seuning, I.; Pigny, P. Tumour growth and resistance to gemcitabine of pancreatic cancer cells are decreased by AP-2alpha overexpression. *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 637–644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Van Seuning, I.; Ostrowski, J.; Bustelo, X.R.; Sleath, P.R.; Bomsztyk, K. The K protein domain that recruits the interleukin 1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of c-Src and Vav SH3-binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26976–26985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

