



FAK inhibiteur et chimiothérapie : une nouvelle stratégie prometteuse pour les patients atteints de cancer pancréatique

Ismahane Belhabib

► To cite this version:

Ismahane Belhabib. FAK inhibiteur et chimiothérapie : une nouvelle stratégie prometteuse pour les patients atteints de cancer pancréatique. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. ⟨NNT : 2023TOU30331⟩. ⟨tel-04594718⟩

HAL Id: tel-04594718

<https://theses.hal.science/tel-04594718v1>

Submitted on 30 May 2024

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.



HAL Authorization

Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

FAK inhibiteur et chimiothérapie : une nouvelle stratégie
prometteuse pour les patients atteints de cancer
pancréatique

Thèse présentée et soutenue, le 6 novembre 2023 par

Ismahane BELHABIB

École doctorale

BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

Spécialité

CANCEROLOGIE

Unité de recherche

CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par

Christine JEAN

Composition du jury

Mme Patricia ROUSSELLE, Rapporteuse, CNRS de Lyon - IBCP

Mme Ana HENNINO, Rapporteuse, INSERM de Lyon- CRCL

M. CEDRIC GAGGIOLI, Rapporteur, INSERM de Nice - IRCAN

Mme Ilaria CASCONE, Examinatrice, Université Paris Est Créteil

Mme Christine JEAN, Directrice de thèse, INSERM de Toulouse - CRCT

M. Ludovic MARTINET, Président, INSERM de Toulouse - CRCT

Remerciements

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude au Dr. Cédric Gaggioli, au Dr. Patricia Rousselle, au Dr. Ana Hennino, au Dr. Ilaria Coscone ainsi qu'au Dr. Ludovic Martinet pour avoir aimablement accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir évalué ce manuscrit.

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de thèse, Christine Jean, qui m'a fait confiance et a accepté de travailler avec moi. Elle n'a pas hésité à me recruter malgré mon manque de compétences en cancérologie. Elle s'est donnée beaucoup de mal pour me préparer pour le concours mais également pour me transmettre toutes les connaissances requises afin de mieux appréhender le projet. Je lui suis profondément reconnaissante de m'avoir encadrée tout au long de ma thèse et d'avoir partagé avec moi l'ensemble de ses connaissances techniques. Mes remerciements envers elle sont infinis pour tout ce qu'elle m'a enseigné et pour avoir été présente à la fois sur le plan professionnel et personnel.

Je tiens à remercier Corinne pour m'avoir accueillie dans l'équipe, avoir été aussi accessible et nous avoir conseillé pour le projet. Je remercie Yvan pour son amabilité, ses compétences de mécano, toujours présent dès qu'on a besoin de lui ou qu'on casse quelque chose. C'était super de l'avoir durant ces quatre années, une vraie bibliothèque scientifique. Je remercie également Marjorie pour sa bienveillance, sa disponibilité à m'aider à chaque fois que j'en ai eu besoin et pour toutes les fois où elle se moquait de moi gentiment.

Je tiens à remercier sincèrement Ludmila pour sa gentillesse et son soutien sur cette fin de thèse. Je remercie Morgane pour sa bonne humeur, son adorabilité (ça ne se dit pas mais c'est vraiment ce qui l'a décrit pour moi). Je remercie également Petnoi pour m'avoir aidé dans le projet, pour sa mignonnerie (oui je me fais plaisir sur le choix des mots) et ce qu'elle a pu m'apporter. Maxime, je te remercie pour ton aide dans le labo, pour tout ce que tu as mis en place dans l'équipe pour améliorer notre organisation (on en avait bien besoin) et bien sûr pour ton humour décalé mais qui me fait rire malgré tout (ne t'emballe pas je suis bon public). Merci à Claire pour nos moments confidences, ça m'a fait beaucoup de bien de te parler et t'écouter. Et merci pour tes conseils sérieux ! Hippo (ou Moussa lol), merci pour l'ambiance que t'as mis dans le bureau, t'as vraiment pris la place de Jérôme en terme de folie alors que je pensais que personne ne comblerait le vide qu'il avait laissé. Je remercie également notre équipe de Ranguel pour leur aide pour les labmeetings et la préparation de la soutenance.

Un grand merci à toute l'équipe, ainsi qu'aux anciens, et beaucoup de courage aux nouveaux. Je souhaite le succès à chacun d'entre vous !

J'aimerais maintenant remercier mes amis voisins sans qui cette thèse aurait été bien différente et bien moins joyeuse. Romain, mon collègue de course et de tennis lol, merci pour tout, je ne pensais pas que je me lierai d'amitié comme ça avec toi, t'es vraiment une

personne superbe, j'ai beaucoup aimé rire avec toi mais aussi parler plus sérieusement (même si ce n'était pas toujours joyeux, t'as été présent dans des moments un peu difficiles et je ne te remercierais jamais assez pour ça). Ahmed et Sanae, je me souviens quand je vous voyais papoter devant l'ascenseur pendant des minutes ou des heures et avec Mehdi on se disait mais qu'ils fassent une vraie pause en bas au lieu de faire vanne « on s'est croisé par hasard dans les couloirs » mdrrr. Je ne pensais pas que j'accrocherais autant avec vous, bon avec Sanae oui (pour des raisons évidentes lol) mais Ahmed pas du tout. Au final on a créé notre petite bande et heureusement. On s'en est tapé des grosses barres et ça m'a permis d'aller beaucoup mieux surtout en période de stress et pour ça je vous remercie de tout mon cœur. Je vous souhaite le meilleur à tous les trois vous le méritez et vous avez intérêt de m'appeler pour votre soutenance (et pas que pour faire le buffet) !

Je remercie ma famille pour m'avoir soutenue et supportée malgré, parfois, ma mauvaise humeur à cause du stress. Merci d'avoir été présents, de m'avoir gâtée et de m'avoir motivée. Merci ma soeurette d'amour pour avoir enduré ma présence dans ta chambre (voilàààà tes remerciements pour la chambre j'espère que ça te satisfait). Non en vrai merci d'avoir été là pour moi, de m'avoir encouragée (surtout en me payant des cinés pour que je décomprime lol) ! Je te souhaite le meilleur, j'espère que tu réussiras tout ce que tu entreprends (autant que moi, même si ça va être compliqué mdr bon j'arrête).

Et bien sûr le meilleur pour la fin, Mehdi (je déconne prends pas trop la confiance) ! Je t'ai déjà fait un bon pavé de remerciements après ma soutenance donc je ne vais pas m'étaler non plus à moins de faire un copier-coller lol. Tu sais très bien ce que je pense de toi, t'as vraiment été la personne qui m'a fait sourire quasi tous les jours depuis que t'as commencé ta thèse dans l'équipe, je n'aurais jamais cru rencontrer quelqu'un comme toi dans le milieu scientifique mdr mais vraiment très bonne surprise. T'as fait ressortir un côté de moi qui avait disparu depuis un moment et je ne te remercierais jamais assez pour ça. T'es vraiment une bonne personne, qui pense beaucoup aux autres et qui sait se montrer patient même si on pourrait imaginer le contraire au premier abord. J'ai rarement vu quelqu'un d'autant présent pour les autres, toujours là à rendre service que ce soit dans la science ou en dehors. T'es vraiment quelqu'un de facile à vivre et d'arrangeant et j'espère que l'équipe se rend compte de la chance qu'elle a d'avoir quelqu'un comme toi. Reste comme t'es, t'y es un bon gars (imagine mon accent marseillais là) ! Je te souhaite le meilleur du meilleur, tu le mérites amplement.

Enfin et le plus important pour moi, je remercie mon créateur qui m'a poussée à m'instruire et à faire de longues études et sans qui rien de tout cela n'aurait eu lieu.

Résumé

Les chimiothérapies atteignent la tumeur par le système vasculaire, faisant de la quantité et de la qualité des vaisseaux sanguins un régulateur clé de l'efficacité des drogues. Or, dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC), les vaisseaux sont très peu nombreux, tortueux et perméables, et ceci est notamment dû à une importante réaction desmoplastique. Nous émettons l'hypothèse que réduire cette réaction desmoplastique pourrait favoriser la "normalisation" des vaisseaux et, par conséquent, améliorer la pénétration des chimiothérapies dans la tumeur. Nous avons précédemment identifié que l'activation de la Focal Adhésion Kinase (FAK) dans les fibroblastes associés au cancer (CAFs) est un facteur de mauvais pronostic pour le patient. De plus, dans un modèle de co-greffe orthotopique de cellules tumorales de PDAC avec MEF (mouse embryonic fibroblasts) exprimant soit un FAK-WT (wild type) soit KD (kinase Dead), nous avons pu identifier que l'inactivation FAK dans les fibroblastes diminue la production de certaines protéines matricielles responsables de la réaction desmoplastique observée dans le PDAC, et que ce remodelage matriciel corrèle avec une diminution des métastases spontanées. Nous postulons donc que l'activité kinase de FAK dans les CAFs participe au maintien de la réaction desmoplastique et au développement d'un réseau vasculaire anormal, tout ceci aboutissant à une dissémination métastatique. Son inactivation devrait normaliser le stroma, rendre les vaisseaux moins perméables et donc, favoriser l'accès des drogues à la tumeur.

Pour étudier le rôle de FAK dans les CAFs, j'ai poursuivi l'analyse du modèle de co-greffe précédemment publié (Zaghdoudi et al. 2020) et ai également développé deux autres modèles murins (co-greffe ou modèle inductible) immunocompétents et syngéniques de PDAC, dans lesquels les CAFs expriment soit un FAK actif soit inactif (kinase dead) : 1- modèle de co-greffe orthotopique de PSC (pancreatic stellate cells) exprimant soit un FAK-WT soit KD avec des cellules tumorales de PDAC et 2- un modèle d'inactivation (FAK^{fl}/WT ou FAK^{fl}/KD) inductible (Cre(ERT2)) de FAK spécifiquement dans les PSCs (promoteur GFAP) greffé en intrapancréatique avec des cellules tumorales de PDAC. Dans les deux modèles, l'inactivation de FAK dans les CAFs semble réduire la croissance tumorale et induit un remodelage matriciel (diminution des collagènes fibrillaires) dans la tumeur primaire. L'analyse précise des modifications d'expression des protéines matricielles (Matrisome, analyse par spectrométrie de masse) des tumeurs dans le modèle de co-greffe utilisant les MEFs montre que l'inactivation de FAK dans les CAFs induit une diminution importante des "protéines pro-tumorales" associée à une forte augmentation de protéines de la membrane basale (MB). L'analyse immunohistochimique de la localisation des protéines de la MB révèle une accumulation de collagène IV spécifiquement autour des vaisseaux sanguins. Nos résultats

préliminaires soutiennent l'idée que cette accumulation de collagène IV autour des vaisseaux est due à un dialogue entre les CAFs et les péricytes. La MB des vaisseaux régulant leur stabilité et leur perméabilité, nous avons évalué l'impact de l'inactivation fibroblastique de FAK sur la perméabilité vasculaire en réalisant un " Miles Assay " *in vivo*. Nous montrons que l'inactivation fibroblastique de FAK diminue la perméabilité vasculaire dans les tumeurs et dans les organes de métastase révélant une " normalisation " des vaisseaux. Quant au modèle inductible, nous observons également une tendance à la diminution de la perméabilité vasculaire dans la tumeur primaire et organes de métastases (tendance non significative pour le moment car peu de souris ont été utilisées pour cette expérience). Ces résultats soutiennent l'idée qu'un co-traitement composé d'un inhibiteur de FAK et d'une chimiothérapie devrait améliorer l'administration de la chimiothérapie dans la tumeur (puisque la vascularisation devrait être normalisée), et donc être un traitement bénéfique pour les patients atteints de PDAC. C'est pourquoi nous avons traité les souris avec les deux chimiothérapies de référence dans le PDAC : la gemcitabine et le folfirinox, par injection veineuse. La combinaison des chimiothérapies avec l'inactivation de FAK dans les PSC réduit la croissance tumorale. Enfin, de manière très intéressante, alors que les tumeurs pancréatiques sont considérées comme des tumeurs « froides », nous observons une infiltration massive de lymphocytes T CD8 dans le modèle inductible lorsque FAK est inactif dans les fibroblastes. Cette accumulation de lymphocytes s'accompagne en plus d'une augmentation du nombre de structures lymphoïdes tertiaires et de HEV (high endothelial venules) connus pour permettre l'entrée des lymphocytes dans la tumeur facilitant ainsi l'immunité anti-tumorale. Ces derniers résultats ouvrent de nombreuses perspectives à mon travail ; perspectives qui seront développées dans mon manuscrit de thèse.

Abstract

Chemotherapies reach the tumor *via* the vascular system, making the quantity and quality of blood vessels a key regulator of drug efficacy. However, in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), the vessels are very few, tortuous and permeable, and this is notably due to a significant desmoplastic reaction. We hypothesize that reducing this desmoplastic reaction could promote vessel "normalization" and, consequently, improve the penetration of chemotherapies into the tumor. We previously identified that activation of Focal Adhesion Kinase (FAK) in cancer-associated fibroblasts (CAFs) is a poor prognostic factor for the patient. Furthermore, in an orthotopic co-graft model of PDAC tumor cells with MEFs (mouse embryonic fibroblasts) expressing either FAK-WT (wild type) or KD (kinase Dead), we were able to identify that FAK inactivation in fibroblasts decreases the production of certain matrix proteins responsible for the desmoplastic reaction observed in PDAC, and that this matrix remodeling correlates with a decrease in spontaneous metastasis. We therefore postulate that FAK kinase activity in CAFs participates in the maintenance of the desmoplastic reaction and the development of an abnormal vascular network, all leading to metastatic dissemination. Its inactivation should normalize the stroma, making the vessels less permeable and thus favoring drug access to the tumor.

To investigate the role of FAK in CAFs, I continued the analysis of the previously published co-graft model (Zaghdoudi et al. 2020) and also developed two other immunocompetent and syngeneic mouse models (co-graft or inducible model) of PDAC, in which CAFs express either active or inactive FAK (kinase dead): 1- an orthotopic co-graft model of PSCs (pancreatic stellate cells) expressing either FAK-WT or KD with PDAC tumor cells and 2- an inducible (Cre(ERT2)) inactivation model (FAK^{fl}/WT or FAK^{fl}/KD) of FAK specifically in PSCs (GFAP promoter) transplanted intrapancreatically with PDAC tumor cells. In both models, inactivation of FAK in CAFs seems to reduce tumor growth and induced matrix remodeling (decrease in fibrillary collagens) in the primary tumor. Precise analysis of changes in matrix protein expression (Matrisome, mass spectrometry analysis) of tumors in the MEFs co-graft model shows that FAK inactivation in CAFs induces a significant decrease in "pro-tumor proteins" associated with a strong increase in basement membrane (BM) proteins. Immunohistochemical analysis of BM protein localization reveals an accumulation of collagen IV specifically around blood vessels. Our preliminary findings support the idea that this accumulation of collagen IV around blood vessels is attributed to a crosstalk between CAFs and pericytes. As vessel BM regulates vessel stability and permeability, we assessed the impact of fibroblast FAK inactivation on vascular permeability using a "Miles Assay" *in vivo*. We show that fibroblastic FAK inactivation decreases vascular permeability in tumors and in organs of metastasis, revealing a "normalization" of vessels. In the inducible model, we also observed a trend towards decreased vascular permeability in the primary

tumor and metastatic organs (not significant at present, as few mice were used for this experiment). These results support the idea that co-treatment with a FAK inhibitor and chemotherapy should improve chemotherapy delivery to the tumor (since vascularization should be normalized), and thus be a beneficial treatment for PDAC patients. We therefore treated mice with the two reference chemotherapies in PDAC: gemcitabine and folfirinox, by intravenous injection. Combining chemotherapies with FAK inactivation in fibroblasts reduced tumor growth. Finally, and very interestingly, while pancreatic tumors are considered "cold" tumors, we observe a massive infiltration of CD8 T lymphocytes in the inducible model when FAK is inactivated in fibroblasts. This accumulation of lymphocytes is accompanied by an increase in the number of tertiary lymphoid structures and HEVs (high endothelial venules), which are known to allow lymphocytes to enter the tumor, thus facilitating anti-tumor immunity. These latest results open up many new perspectives for my work, which will be developed in my thesis manuscript.

Abréviations

ADM : acinar to ductal metaplasia
ALDH : aldéhyde déshydrogénase
 α -SMA: α smooth muscle actin
ATP : adénosine triphosphate
BMDC : bone marrow derived cells
BMDM : bone marrow derived macrophage
CAF : cancer-associated fibroblasts
CCL : CC chemokine ligand
CCR : CC chemokine receptor
CD : cellule dendritique
CEN : cellule endothéliale normale
CET : cellule endothéliale tumorale
CPE : cellule progénitrice endothéliale
CRF : cellule réticulaire fibroblastique
CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte associated protein 4
CXCL : CXC chemokine ligand
CXCR : CXC chemokine receptor
DDR : discoïdine domain receptor
DMV : densité des microvaisseaux
EGFR : epithelial growth factor receptor
EMT : epithelio-mesenchymal transition
ERT2 : tamoxifen inducible estrogen receptor
FAK : focal adhésion kinase
FAP : fibroblast activation protein
FSP : fibroblast specific protein
FGF : fibroblast growth factor
G-CSF : granulocyte colony stimulating factor
GDNF : glial cell line-derived neurotrophic factor
GEMM : genetically engineered mouse model
GFAP : glial fibrillary acidic protein
GM-CSF : granulocyte and macrophage colony stimulating factor
HA : hyaluronic acid
HEV : high endothelial venule
HGF : hepatic growth factor
HIF : hypoxia inducible factor
HSC : hepatic stellate cell
iCAF : CAF inflammatoires
ICB : immune checkpoint blockade
IFN : interferon
IL : interleukin
IPMN : intraductal papillary mucinous neoplasm
IPN : invasion périnerveuse
JA : jonction adhérente
KC : Kras Cre
KI : knock-in
KO : knock-out
KPC : Kras p53 Cre
LAIR : leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor
LIF : leukemia inhibitory factor

LOX : lysyl oxidase
 LPP : lipoma preferred partner
 LT β R : lymphotoxin β receptor
 LTC : lymphocyte T cytotoxique
 MB : membrane basale
 MCN : mucinous cystic neoplasm
 M-CSF : macrophage colony stimulating factor
 MDR : multidrug resistance
 MDSC : myeloïd derived suppressive cell
 MEC : matrice extracellulaire
 MECA-79 : mouse endothelial cell antigen 79
 MEF : mouse embryonic fibroblast
 MMP : matrix metalloproteinase
 MSC : mesenchymal stem cell
 myCAF : CAF myofibroblastiques
 NE : norepinephrine
 NG2 : neuron glial 2
 NGF : nerve growth factor
 NK : natural killer
 PanIN : pancreatic intraepithelial neoplasm
 PD-1 : programmed cell death 1
 PDAC : pancreatic ductal adenocarcinoma
 PDGFR : platelet derived growth factor receptor
 PD-L1 : programmed death ligand 1
 PFI : pression de fluide interstitiel
 PNad : peripheral node addressin
 PSC : pancreatic stellate cell
 PVT1 : plasmacytoma variant translocation 1
 ROS : reactive oxygen species
 TACS : tumor associated collagen signature
 TAM : tumor associated macrophage
 TASc : tumor associated schwann cell
 TGF β : transforming growth factor β
 TIL : tumor infiltrating lymphocyte
 TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase
 TNF : tumor necrosis factor
 TRAIL : tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand
 Treg : T régulateur
 TLS : tertiary lymphoïde structure
 VEGF : vascular endothelial growth factor
 VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor
 VM : vascular mimicry

Liste des figures

- Figure 1 : Microenvironnement tumoral des cancers solides
- Figure 2 : Diversité des CAFs dans les cancers solides
- Figure 3 : Rôle des CAFs dans les cancers solides
- Figure 4 : L'influence de la MEC sur les caractéristiques du cancer
- Figure 5 : Structure d'un vaisseau
- Figure 6 : Vaisseaux sains versus tumoraux
- Figure 7 : Transmigration d'un lymphocyte à travers un HEV par microscopie biphotonique
- Figure 8 : Anatomie du pancréas
- Figure 9 : Histologie du pancréas
- Figure 10 : Décès par type de cancer dans le monde en 2019
- Figure 11 : Facteurs de risques intrinsèques et environnementaux du PDAC
- Figure 12 : Lésions précurseurs de PDAC
- Figure 13 : Représentation schématique des mutations génétiques et lésions PanIN aboutissant à un PDAC
- Figure 14 : Représentation schématique et histologique de l'ADM et PanIN aboutissant à un PDAC
- Figure 15 : Origine des CAFs
- Figure 16 : Fonctions des CAFs dans le PDAC
- Figure 17 : Types de formation des vaisseaux
- Figure 18 : Cellules immunitaires dans le PDAC
- Figure 19 : Structure de FAK
- Figure 20 : Activation de FAK
- Figure 21 : Signalisations en aval de FAK
- Figure 22 : Stimuli physiologiques conduisant à la translocation de FAK au noyau
- Figure 23 : Fonctions de FAK
- Figure 24 : Impact de FAK dans le microenvironnement
- Figure 25 : Croisements du modèle transgénique inducible
- Figure 26 : Progression tumorale dans le modèle transgénique inducible avec tamoxifène en IP
- Figure 27 : Progression tumorale dans le modèle transgénique inducible avec tamoxifène en régime
- Figure 28 : Progression tumorale dans le modèle transgénique inducible avec mâles versus femelles
- Figure 29 : Remodelage matriciel dans le modèle transgénique inducible
- Figure 30 : Perméabilité vasculaire dans le modèle transgénique inducible
- Figure 31 : Infiltration immunitaire dans le modèle de co-greffe des PSC + cellules tumorales
- Figure 32 : Infiltration immunitaire dans le modèle transgénique inducible
- Figure 33 : Comparaison mâles – femelles dans l'infiltration immunitaire du modèle transgénique inducible
- Figure 34 : Structures lymphoïdes tertiaires (TLS) dans le modèle transgénique inducible
- Figure 35 : HEV dans le modèle transgénique inducible
- Figure 36 : Comparaison mâles – femelles dans la présence de TLS et HEV du modèle transgénique inducible
- Figure 37 : Anatomie d'un nerf
- Figure 38 : Quantification des cellules de Schwann et PSC GFAP+ dans le modèle transgénique inducible
- Figure 39 : Schéma de conclusion résumant les résultats obtenus dans le modèle de co-greffe avec les MEFs
- Figure 40 : Schéma de conclusion résumant les résultats obtenus dans le modèle de co-greffe avec les PSCs
- Figure 41 : Schéma de conclusion résumant les résultats obtenus dans le modèle transgénique inducible greffé avec des cellules tumorales de PDAC

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Abréviations.....	7
Liste des Figures.....	9
INTRODUCTION.....	15
 CHAPITRE 1 : Microenvironnement des cancers solides.....	17
I. Généralités.....	17
II. Fibroblastes associés au cancer et matrice extracellulaire : des régulateurs clés de la progression tumorale dans les cancers solides.....	19
II.A. Les fibroblastes associés au cancer (CAFs)	19
II.A.1. Origine des CAFs	19
II.A.2. Hétérogénéité de localisation, fonction et modes de communications des CAFs.....	21
II.B. La matrice extracellulaire (MEC), acteur clé de la progression tumorale.....	26
II.B.1. Composition de la MEC.....	26
II.B.2. Impact de la MEC sur la survie et la prolifération tumorale.....	27
II.B.3. Impact de la MEC sur l'invasion des cellules tumorales et les métastases.....	30
II.B.4. Impact de la MEC sur l'angiogenèse tumorale.....	32
II.B.5. Impact de la MEC sur la composante immunitaire.....	33
II.B.6. Impact de la MEC sur la réponse aux thérapies.....	36
II.C. Ciblage des CAFs et de la MEC dans les cancers solides.....	37
II.C.1. Ciblage des CAFs.....	37
II.C.2. Ciblage de la MEC.....	38
III. Vaisseaux.....	39
III.A. Vaisseaux sanguins.....	40
III.A.1. Composition cellulaire d'un vaisseau.....	40
III.A.1.1. Cellules endothéliales.....	40
III.A.1.2. Péricytes.....	41
III.A.2. Composition acellulaire, la membrane basale (MB).....	42
III.A.2.1. Laminines.....	43
III.A.2.1.1. Localisation.....	43
III.A.2.1.2. Fonctions.....	43
III.A.2.2. Collagène IV.....	44

III.A.3. Rôle des vaisseaux dans le cancer.....	45
III.A.3.1. Cellules endothéliales de la tumeur.....	46
III.A.3.2. Péricytes.....	47
III.A.3.3. La membrane basale.....	48
III.A.4. Dialogue des cellules vasculaires avec les CAFs.....	49
III.A.4.1. Dialogue CAFs - cellules endothéliales.....	49
III.A.4.2. Dialogue CAFs - péricytes.....	51
III.A.5. Ciblage des vaisseaux dans le cancer.....	52
III.B. High endothelial venules (HEV)	55
III.B.1. Composition et rôle physiologique.....	55
III.B.2. Rôle des HEV dans le cancer.....	56
III.B.3. Exploitation des HEV dans le cancer.....	58
 CHAPITRE 2 : Microenvironnement de l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC).....	59
I. Pathologie.....	59
I.A. Biologie et fonction du pancréas sain.....	59
I.B. Adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC).....	62
I.B.1. Epidémiologie, facteurs de risque et symptômes.....	62
I.B.2. Développement du PDAC.....	64
I.B.3. Diagnostic et traitements.....	69
II. CAFs et MEC : composants majoritaires du stroma du PDAC.....	71
II.A. CAFs : une hétérogénéité importante dans le PDAC.....	72
II.A.1. myCAFs.....	76
II.A.2. iCAFs.....	79
II.A.3. apCAFs.....	81
II.A.4. Autres CAFs.....	81
II.B. La MEC : acteur clé de la progression tumorale dans le PDAC.....	82
II.C. Ciblage des CAFs et de la MEC dans le PDAC.....	85
II.C.1. Ciblage des CAFs.....	85
II.C.1.1. Reprogrammation des CAFs vers un état quiescent.....	85
II.C.1.2. Ciblage de la signalisation des CAFs.....	86
II.C.2. Ciblage de la MEC.....	87
II.C.2.1. Ciblage direct et indirect.....	87
II.C.2.2. Ciblage de la signalisation induite par la MEC.....	88

III. Vaisseaux dans le PDAC.....	90
III.A. Formation des vaisseaux dans le PDAC.....	90
III.A.1. Angiogenèse par bourgeonnement.....	91
III.A.2. Angiogenèse intussusceptive.....	91
III.A.3. Mimétisme vasculaire.....	91
III.A.4. Vasculogenèse.....	92
III.B. Caractéristiques des vaisseaux dans le PDAC.....	92
III.C. Ciblage des vaisseaux dans le PDAC.....	94
IV. Composante immunitaire dans le PDAC.....	95
IV.A. TILs : cellules T CD4 et T CD8.....	96
IV.B. Cellules dendritiques.....	97
IV.C. Macrophages associés à la tumeur (TAM).....	98
IV.D. Interactions CAFs – cellules immunitaires.....	98
IV.E. Ciblage de la composante immunitaire dans le PDAC.....	99
 CHAPITRE 3 : Focale adhésion kinase (FAK).....	102
I. Caractéristiques et activation de FAK.....	102
I.A. Gène et structure.....	102
I.A.1. Gène.....	102
I.A.1. Structure.....	103
I.B. Activation de FAK.....	104
I.C. Modèles murins d'inactivation de FAK.....	105
II. Signalisations induites par FAK.....	106
II.A. FAK dans les points d'adhésion focaux.....	107
II.B. FAK dans les jonctions adhérentes intercellulaires.....	108
II.C. FAK dans le noyau.....	109
II.D. Fonctions dépendantes de FAK en condition physiologique.....	111
III. Rôle de FAK dans le cancer.....	113
III.A. FAK dans la cellule tumorale.....	113
III.A.1. Expression et activation de FAK dans la cellule tumorale.....	113
III.A.2. FAK régule la survie et la prolifération tumorale.....	114
III.A.3. FAK régule l'invasion des cellules tumorales.....	115
III.A.4. FAK et cellules souches.....	117
III.A.5. FAK et inflammation tumorale.....	119

III.B. FAK dans le microenvironnement tumoral.....	120
III.B.1. FAK dans les cellules endothéliales.....	120
III.B.2. FAK dans les macrophages associés aux tumeurs.....	121
III.B.3. FAK dans les CAFs.....	122
III.C. Ciblage de FAK.....	125
III.C.1. Etudes précliniques.....	125
III.C.2. Etudes cliniques.....	126
III.C.2.1. Etudes cliniques dans différents cancers.....	126
III.C.2.2. Etudes cliniques dans le PDAC.....	127
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	129
I. « FAK activity in cancer-associated fibroblasts is a prognostic marker and a druggable key metastatic player in pancreatic cancer ».....	131
II. « FAK inactivation in fibroblasts normalizes blood vessels by remodeling their basement membrane and permeability ».....	133
Abstract.....	135
Introduction.....	137
Material and Methods.....	139
Results.....	147
Discussion.....	152
References.....	157
Figure Legends.....	161
Figures.....	164
III. Résultats supplémentaires.....	166
III.A. Développement du modèle transgénique inducible.....	166
III.A.1. Croisements.....	166
III.A.2. Traitement au tamoxifène.....	166
III.A.3. Importance du sexe dans notre modèle.....	169
III.B. Remodelage matriciel dans le modèle transgénique inducible.....	170
III.C. Perméabilité vasculaire dans le modèle transgénique inducible.....	172
III.D. Impact de l'inactivation de FAK dans les fibroblastes des différents modèles sur l'infiltration immunitaire.....	173
III.D.1. Modèle de co-greffe	174
III.D.2. Modèle transgénique.....	176

III.E. Structures lymphoïdes tertiaires et HEV.....	178
III.F. Implication potentielle des cellules de Schwann dans le modèle transgénique inductible.....	180
III.F.1. Rôle des nerfs dans le pancréas sain.....	180
III.F.1.1. Nerfs parasympathiques.....	181
III.F.1.2. Nerfs sympathiques.....	181
III.F.1.3. Nerfs sensoriels.....	181
III.F.1.4. Cellules de Schwann.....	181
III.F.2. Rôle des nerfs dans le PDAC.....	182
III.F.2.1. Innervation sympathique dans le PDAC.....	182
III.F.2.2. Innervation parasympathique dans le PDAC.....	183
III.F.2.3. Innervation sensorielle dans le PDAC.....	183
III.F.2.4. Invasion périnerveuse (IPN).....	183
III.F.3. Interactions des nerfs avec les cellules tumorales et stromales.....	184
III.F.3.1. Dialogue des cellules tumorales vers les neurones.....	184
III.F.3.2. Dialogue des neurones vers les cellules tumorales.....	185
III.F.3.3. Interactions des neurones avec les cellules stromales.....	186
III.F.4. Cellules de Schwann dans le modèle transgénique inductible.....	186
Matériel et Méthodes (supplémentaire).....	188
CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	190
BIBLIOGRAPHIE.....	206
Annexe (Revue).....	256

INTRODUCTION

Chapitre I : Microenvironnement des cancers solides

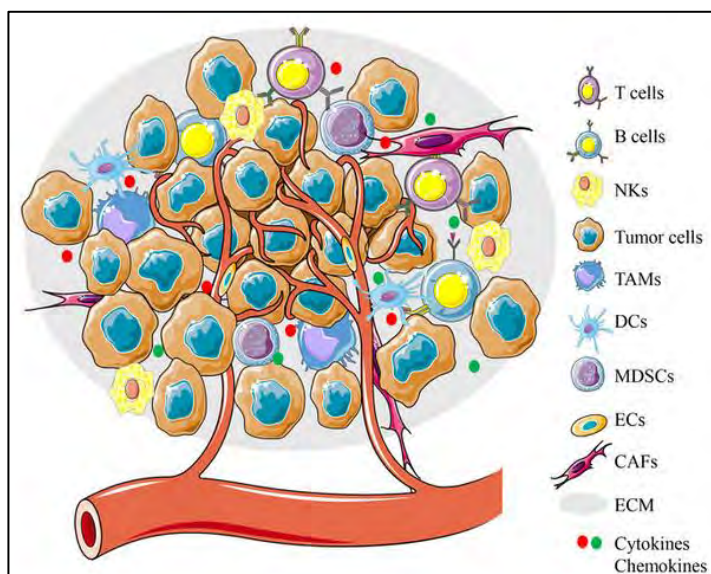
I. Généralités

Pendant des années le monde scientifique a focalisé toute son attention sur la cellule tumorale afin de comprendre tous les mécanismes lui permettant de se développer et de disséminer pour mieux la cibler. Cependant, il est aujourd'hui clairement identifié que la cellule tumorale, à l'image d'une graine, a besoin d'un sol fertile pour pouvoir se développer (Paget 1889). Le microenvironnement tumoral représente ce sol permettant le plus souvent la progression tumorale des cancers solides. Ce microenvironnement aussi appelé stroma est très complexe et sa composition, qui peut varier selon les cancers, est globalement constituée de cellules stromales comprenant des cellules immunitaires, des fibroblastes associés au cancer (CAFs), des cellules vasculaires, et de matrice extracellulaire (MEC) (Figure 1)(S.-J. Kim, Khadka, and Seo 2022). Ce stroma n'est pas seulement un sol inerte sur lequel reposent les cellules tumorales mais bien un sol actif qui promeut la progression tumorale. Les cellules cancéreuses interagissent avec ce stroma par des contacts cellule-cellule ou *via* la MEC ou encore *via* des facteurs solubles de sorte que ce microenvironnement puisse favoriser leur survie, leur prolifération et leurs capacités invasives (S.-J. Kim, Khadka, and Seo 2022). Les cellules stromales les plus abondantes retrouvées dans le microenvironnement sont les fibroblastes associés au cancer (CAFs). Ces CAFs ont diverses origines dont les fibroblastes quiescents qui peuvent être activés *via* différents stimuli émanant notamment des cellules tumorales et stromales environnantes (Casey et al. 2008). Dans la tumeur, les CAFs jouent un rôle clé dans le dialogue entre les cellules tumorales et le microenvironnement. Même si leur présence est souvent associée à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers, ils peuvent avoir un rôle pro ou anti-tumoral selon leur sous-type. Ils sont connus principalement pour leur sécrétion de facteurs solubles et de MEC dans le microenvironnement. Cette MEC, composante acellulaire du microenvironnement, en représente la majorité. Elle joue plusieurs rôles dans la progression tumorale notamment en formant des rails d'invasion que les cellules tumorales utilisent pour métastaser mais aussi en faisant barrière à l'entrée des drogues et des cellules immunitaires anti-tumorales. De plus, elle permet la séquestration de facteurs solubles que les cellules tumorales peuvent utiliser une fois la matrice dégradée et enfin, elle peut réguler plusieurs fonctions cellulaires *via* son interaction avec les intégrines (mécanotransduction) (Belhabib et al. 2021). En plus de la MEC et des CAFs, le microenvironnement est constitué d'autres types cellulaires comme les adipocytes qui stockent l'énergie nécessaire au développement tumoral et les cellules vasculaires comprenant notamment les cellules endothéliales impliquées dans la vascularisation des tumeurs (Belhabib et al. 2021). En effet, pour contrer l'hypoxie de leur environnement, les cellules tumorales interagissent avec le stroma pour promouvoir la formation de

nouveaux vaisseaux, processus appelé angiogenèse, afin de leur fournir l'oxygène et les nutriments nécessaires à leur développement et compenser les pertes métaboliques (Nishida et al. 2006). Cette nouvelle vascularisation va aussi permettre une infiltration de cellules immunitaires qui peuvent avoir des effets pro ou anti-tumoraux. Ces cellules immunitaires qui font partie du microenvironnement comptent plusieurs types cellulaires dont la présence et l'abondance dépendent du type de cancer puisque certains sont considérés comme « tumeurs froides » (peu d'infiltration immunitaire) et d'autres comme « tumeurs chaudes » (avec une meilleure infiltration immunitaire). Parmi ces cellules immunitaires, nous retrouvons notamment les cellules T qui peuvent médier la réponse immunitaire anti-tumorale ou favoriser un environnement immunosuppresseur selon qu'ils soient des CD8 ou des Treg, les cellules B connues pour la production d'anticorps et la présentation d'antigènes, les « natural killer » (NK) qui exercent une cytotoxicité permettant la mort des cellules tumorales (ces cellules innées ont un rôle similaire aux lymphocytes T cytotoxiques), les macrophages qui sont catégorisés en type M1 plutôt anti-tumoraux ou M2 plutôt pro-tumoraux, et enfin les cellules dendritiques présentant des antigènes tumoraux aux cellules T afin de guider l'immunité anti-tumorale et les neutrophiles produisant différentes chimiokines permettant le recrutement de cellules T (Gonzalez, Hagerling, and Werb 2018). De par son abondance et son rôle clé dans la progression tumorale, plusieurs thérapies ont été développées dans le but de cibler le microenvironnement que ce soit en détruisant/normalisant la matrice ou les CAFs, en stimulant l'activité des cellules T *via* les immunothérapies ou en modifiant les vaisseaux par des traitements anti-angiogéniques.

En accord avec mon projet de thèse et au vu de l'importance du microenvironnement dans les cancers solides, je présenterai donc dans ce premier chapitre une description de ce stroma et je détaillerai plus particulièrement le rôle des CAFs notamment dépendant de leur production de matrice, les thérapies développées pour contrer leurs effets, et la place des vaisseaux dans le microenvironnement des cancers solides.

Figure 1 : Microenvironnement tumoral des cancers solides (Shi, Tang, and Miao 2020)



II. Fibroblastes associés au cancer et matrice extracellulaire : des régulateurs clés de la progression tumorale dans les cancers solides

A. Les fibroblastes associés au cancer (CAFs)

Les fibroblastes associés au cancer, principales cellules stromales présentes dans les cancers solides, jouent un rôle crucial dans la progression tumorale en raison de leurs capacités sécrétoires. Les CAFs sont définis comme étant des cellules fibroblastiques, non néoplasiques, non vasculaires, non épithéliales et non inflammatoires, activées et présentes dans les tumeurs et les niches métastatiques (Daniel Öhlund, Elyada, and Tuveson 2014; Kalluri and Zeisberg 2006). Contrairement à leur activation physiologique temporaire (lors de la cicatrisation par exemple), les CAFs maintiennent un phénotype "activé" permanent dans le cancer. L'équipe du Dr Gaggioli a démontré que la cytokine proinflammatoire LIF (leukemia inhibitory factor) reprogramme les fibroblastes humains, *in vitro*, en un phénotype activé pro-invasif, favorisant le remodelage de la matrice extracellulaire et l'invasion collective des cellules cancéreuses (Albregues et al. 2014). De plus, cette même équipe révèle que l'exposition à LIF induit des modifications épigénétiques conduisant à l'activation constitutive de la signalisation JAK1/STAT3, entraînant ainsi le maintien de l'activation des CAFs humains *in vitro* (Albregues et al. 2015). Au cours de la tumorigenèse chez la souris et chez l'Homme, les fibroblastes quiescents sont activés en réponse à divers stimuli tels que l'hypoxie, le stress oxydatif, les facteurs de croissance (facteur de croissance transformant β (TGF β), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et le sonic hedgehog (SHH)), les chimiokines et les cytokines (Belhabib et al. 2021). Cette activation conduit à une augmentation des capacités contractiles des CAFs (avec une expression accrue d' α -SMA, smooth muscle actin, et de vimentine), à une modification morphologique et à une sécrétion exacerbée de nombreux facteurs majoritairement pro-tumoraux (solubles et insolubles dont les protéines de la MEC). Bien qu'il n'existe pas de marqueur spécifique exclusif des CAFs, plusieurs marqueurs tels que la vimentine, l' α -SMA, FAP α (fibroblast activation protein alpha), les récepteurs PDGFR- α et PDGFR- β (platelet-derived growth factor receptor), ainsi que FSP-1 (fibroblast-specific protein) sont couramment utilisés pour les identifier (Daniel Öhlund, Elyada, and Tuveson 2014; Kalluri and Zeisberg 2006).

A.1. Origine des CAFs

Les CAFs proviennent de diverses origines dont les fibroblastes résidents quiescents (PSC (Pancreatic Stellate Cells), HSC (Hepatic Stellate Cells) ...), les BMDC (Bone Marrow-derived Dendritic Cells), les

cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les péricytes. Alors que dans l'adénocarcinome pancréatique canalaire (PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma), les PSCs ont longtemps été considérées comme principales cellules à l'origine des CAFs, une étude de Helms et ses collaborateurs publiée en 2021 a démontré que les PSCs, chez la souris (modèle de greffe orthotopique de cellules de PDAC issues du modèle KPC (LSL-KrasG12D/+, Trp53R172H/+, Pdx1- Cre : modèle murin développant spontanément un PDAC) dans des souris transgéniques modifiées pour suivre les PSCs), ne donnaient naissance qu'à une petite sous population de CAFs ayant principalement des fonctions de CAFs myofibroblastiques (cette étude sera détaillée dans le chapitre II paragraphe sur l'hétérogénéité des CAFs dans le cancer du pancréas)(Helms et al. 2022). Dans le cholangiocarcinome, le groupe du Dr Schwabe a publié une étude utilisant des souris « Lrat-Cre-driven lox-stop-lox-TdTomato » (croisées avec quatre différents modèles murins développant spontanément un cholangiocarcinome) afin de marquer les fibroblastes hépatiques quiescents (HSC), et a montré que les HSCs étaient à l'origine de la majorité des CAFs, ces derniers favorisant la progression tumorale. Par séquençage d'ARN de cellule unique (single cell RNAseq), les auteurs ont identifié que les HSCs donnent naissance à deux sous groupes de CAFs : les CAFs myofibroblastiques (myCAF) impliqués majoritairement dans la sécrétion de matrice et les CAFs inflammatoires (iCAF) qui ont un rôle clé dans la modulation de la réponse immunitaire. Enfin, les auteurs montrent que les myCAF (dont une partie est issue des HSCs et exprimant l' α SMA et le col1), qui représentent 26.2% des CAFs totaux sont associés à une survie plus courte des patients atteints de cholangiocarcinome (Afro et al. 2021). Récemment, Miyazaki et ses collaborateurs ont montré, *in vitro*, que les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) provenant de tissu adipeux pouvaient également être à l'origine de myCAF et iCAF pancréatiques. En effet, lorsque les MSCs sont en culture directe avec les cellules tumorales pancréatiques, elles se différencient à la fois en myCAF et iCAF alors que si cette co-culture est indirecte (par transwell), elle ne permet leur différenciation qu'en iCAF (Miyazaki et al. 2020). Une autre étude menée par Miyai et ses collaborateurs a aussi identifié, chez des patients atteints de cancer du poumon, un sous-type de CAFs exprimant un marqueur de MSCs, la Mefline. La présence de ces CAFs est associée à une meilleure infiltration de lymphocytes T CD4 et une meilleure vascularisation des tumeurs. De plus, la surexpression de Mefline dans les CAFs a amélioré la réponse à des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire dans des modèles murins de cancer colorectal (transplantation syngénique par voie sous-cutanée de cellules de cancer colorectal) et cancer du sein (greffe orthotopique syngénique de cellules tumorales mammaires)(Miyai et al. 2022). Dans le cancer du poumon, l'équipe de Lan a également identifié, par des études de transcriptomique à l'échelle de la cellule unique, que des CAFs pro-tumoraux pourraient provenir de la transition macrophage-myofibroblaste. Cette transition qui s'effectuerait à partir de TAM (macrophages associés à la tumeur, montré *in vivo*), et de BMDM (bone marrow-derived macrophage, montré *in vitro*) serait

dépendante de l'activation de la voie de signalisation Smad3 (P. C. Tang et al. 2021). De manière surprenante, dans le cancer colorectal, une étude de traçage de lignées chez la souris transgénique inducible (développant un cancer colorectal induit par traitement chimique à l'Azoxymethane (AOM)/Dextran sodium sulfate), faite par le groupe du Dr Worthley, montre que de nombreux CAFs α SMA positifs proviennent de cellules intestinales péricryptiques exprimant le récepteur à la leptine. Ces CAFs spécifiques expriment certaines molécules d'adhésion telles que MCAM dont l'expression est corrélée à une diminution de la survie des patients. Les auteurs ont identifié, en greffant orthotopiquement des tumeurs de tumeur colorectale dans des souris Mcam Wild type ou knockout, que l'expression de MCAM dans ces CAFs favorise l'infiltration de macrophages associés à la tumeur (TAM) en induisant la voie de signalisation du récepteur à l'IL-1 (H. Kobayashi et al. 2022). Bien que toutes ces études aient apporté beaucoup de nouveauté sur les diverses origines des CAFs, il est aujourd'hui difficile de parvenir à un consensus.

A.2. Hétérogénéité de localisation, fonction et modes de communications des CAFs

La localisation des CAFs est étroitement liée à leur fonction et au mode de communication (*via* la matrice extracellulaire, les facteurs sécrétés et les vésicules extracellulaires) qu'ils utilisent pour interagir avec les cellules tumorales et autres cellules stromales. J'aborderai dans cette partie 1/la localisation des CAFs et les fonctions associées, 2/ les CAFs dont la localisation n'a pas encore été identifiée mais dont les rôles sont importants, et enfin 3/ les modes de communications employés par les CAFs pour interagir avec d'autres cellules (notamment tumorales).

L'une des particularités des CAFs à prendre en compte pour comprendre leur rôle dans le cancer est l'idée récente que les CAFs sont hétérogènes, en termes de localisation, de morphologie, de fonctions et de marqueurs. Ce concept émergent, de sous-populations de CAFs, est basé sur plusieurs publications récentes rapportant la présence de sous-groupes de CAFs dans le cancer du pancréas, le carcinome du sein, le carcinome du côlon, l'adénocarcinome du poumon et les cancers ovariens séreux de haut grade (Bartoschek et al. 2018; Givel et al. 2018; Belhabib et al. 2021). Dans le cancer du sein, Costa et ses collaborateurs ont identifié, par cytométrie en flux multicolore sur des tumeurs humaines, quatre sous-populations de CAFs différentes (appelées CAF-S1 à -S4), qui s'accumulent différemment en fonction du sous-type de cancer (luminal, HER2 et triple négatif). Les auteurs ont identifié que la sous-population CAF-S1 contribue fortement à l'immunosuppression et suggèrent que les patients dont les tumeurs sont riches en CAF-S1 pourraient bénéficier d'une stratégie immunothérapeutique spécifique, soulignant ainsi l'importance de l'hétérogénéité des CAFs dans la stratégie thérapeutique à adopter (Costa et al. 2018). Dans le cancer du pancréas, l'identification des sous-populations de CAFs a permis non seulement de caractériser les patients

dont le stroma est "normal" ou "activé" (par microdissection virtuelle en utilisant la NMF (non-negative matrix factorization) sur des puces à ADN mais également des séquençages ARN) et dont le pronostic est respectivement meilleur ou pire (Moffitt et al. 2015), mais aussi les patients dont les CAFs sont "myofibroblastiques" (myCAF) ou "inflammatoires" (iCAF) (populations également retrouvées chez la souris dans un modèle KPC) et dont les fonctions diffèrent (Daniel Öhlund et al. 2017b).

Selon leur sous-type, les CAFs peuvent avoir des localisations particulières dans le microenvironnement et cette hétérogénéité de localisation peut expliquer leurs différents rôles, et leur mode de communication avec les autres cellules. Par exemple, alors que les myCAFs du cancer pancréatique sont localisés à proximité des cellules tumorales (montré dans des tumeurs humaines et un modèle murin KPC) et interagissent avec elles majoritairement *via* la MEC qu'ils sécrètent, les iCAFs quant à eux, sont à distance des cellules tumorales (montré dans des tumeurs humaines et un modèle murin KPC) et dialoguent avec elles *via* des cytokines (Daniel Öhlund et al. 2017b). Ces deux sous-types de CAFs possèdent des rôles différents, l'un a pour principal fonction de remodeler la MEC (myCAFs) et l'autre a pour but de favoriser un environnement immunosuppresseur (iCAFs) (Figure 2) (Biffi and Tuveson 2021). Le rôle de ces deux sous-types sera détaillé dans le chapitre II (paragraphe sur l'hétérogénéité des CAFs dans le cancer du pancréas).

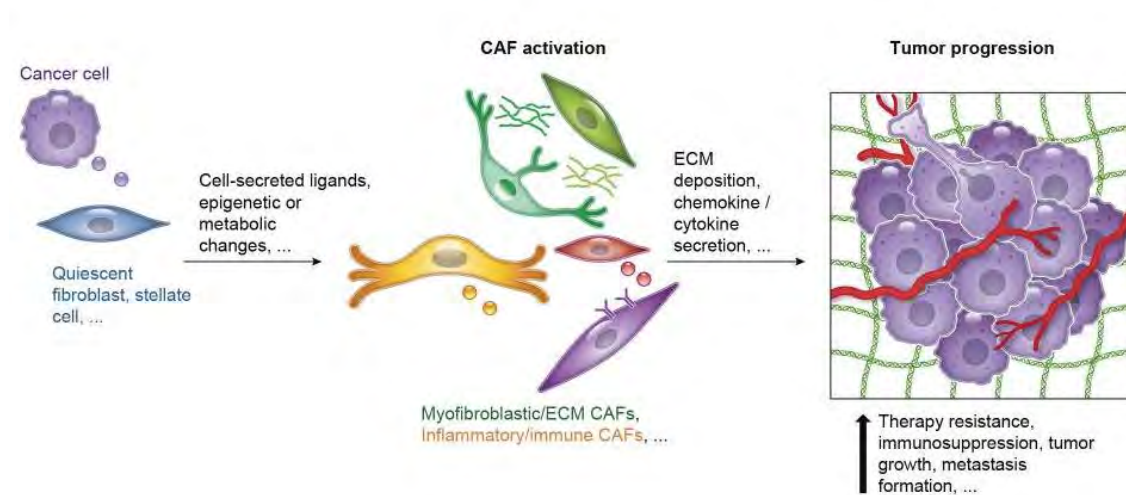


Figure 2 : Diversité des CAFs dans les cancers solides (Biffi and Tuveson 2021)

Une autre sous-population de CAFs a également été décrite avec une localisation particulière. En effet, Dominguez et ses collaborateurs ont identifié par analyse transcriptomique à l'échelle de la cellule unique, une population de CAFs exprimant la protéine LRRC15 entourant les îlots tumoraux et qui sont absents dans la partie saine du pancréas chez la souris dans un modèle KPP

(Kras^{+/G12D}, Ptf1a^{+/ER-Cre}, Pten^{f/f}) développant spontanément un PDAC. De manière intéressante, cette sous-population de CAFs a été retrouvée (par séquençage ARN à l'échelle de la cellule unique) chez les patients atteints de cancer pancréatique et corrélée à une mauvaise réponse aux immunothérapies suggérant que ces CAFs induisent une immunosuppression importante dans le microenvironnement (Dominguez et al. 2020). En parallèle, d'autres études ont identifié que certains types de CAFs pouvaient avoir un effet protecteur dépendant de l'induction de l'immunité anti-tumorale, d'un sécrétome ou d'une signalisation inhibant la croissance tumorale, ou la production de composants matriciels faisant barrière à l'invasion tumorale. En effet, concernant l'immunité anti-tumorale, Hutton et ses collaborateurs ont identifié dans des tumeurs humaines et murines (modèle KPC développant spontanément un PDAC), deux sous-type de CAFs dont un n'exprimant pas le CD105 qui facilite l'infiltration de cellules T CD8 (Hutton et al. 2021). Les CAFs peuvent également promouvoir la formation de structures lymphoïdes tertiaires (TLS) dans les tumeurs, favorisant ainsi la survie des patients mais aussi leur réponse aux thérapies. Dans l'étude de Rodriguez et ses collaborateurs, les auteurs montrent que les CAFs peuvent avoir des caractéristiques d'organiseurs de tissu lymphoïde (expression de TNFR (tumor necrosis factor receptor), LTβR (lymphotoxin β receptor)) et peuvent être recrutés *via* CXCL13 afin de favoriser la formation de TLS dans un modèle murin de mélanome (transplantation sous-cutanée de cellules tumorales de mélanome B16-OVA) (Rodriguez et al. 2021). Enfin, les CAFs exprimant la Mefline retrouvés chez les patients atteints de cancer pancréatique ont été identifiés comme étant de bon pronostic pour les patients atteints de PDAC. En effet, alors que la surexpression de Mefline dans les CAFs d'un modèle murin de cancer pancréatique (modèle KPC) a bloqué la croissance tumorale, sa délétion a remodelé la MEC produite par les CAFs facilitant ainsi l'agressivité tumorale (Mizutani et al. 2019).

La localisation des CAFs peut ainsi conditionner leur mode de dialogue avec les cellules environnantes (tumorales ou immunitaires). Ces dialogues peuvent se faire *via* la MEC produite par les CAFs mais également par les facteurs solubles qu'ils sécrètent.

Dialogue *via* la MEC :

Dans le cancer du poumon par exemple, des analyses sur la base de données TCGA (Cancer Genome Atlas) et des marquages IHC ont permis d'identifier que les CAFs exprimant la podoplanine (une glycoprotéine) favorisent non seulement un microenvironnement très fibrotique facilitant la progression tumorale mais aussi l'infiltration de TAMs et donc d'un microenvironnement plutôt immunosuppresseur chez le patient (Suzuki et al. 2021). D'autres protéines matricielles produites par les CAFs ont aussi montré un rôle dans la progression tumorale et notamment l'invasion. C'est le cas de la laminine 332 qui est retrouvée dans les CAFs récupérés de tumeurs humaines de cancer du sein

(Rousselle and Scoazec 2020, 332). Le groupe du Dr Eble montre, *in vitro*, que des fibroblastes pancréatiques résidents peuvent se différencier en CAFs *via* l'interaction de la laminine 332 avec l'intégrine $\alpha 3\beta 1$. De manière intéressante, cette interaction semble favoriser l'invasion de cellules tumorales pancréatiques lorsque ces dernières sont en co-culture avec les CAFs dans des sphéroides *in vitro* (Cavaco et al. 2018). Une étude de Bhattacharjee et ses collaborateurs montre également que la localisation, l'organisation et la densité de la MEC produite par les CAFs peuvent empêcher la progression tumorale. En effet, le dépôt de collagène I par les myCAFs dans des modèles murins de métastases colorectal et pancréatique (par injection intrasplénique de cellules tumorales pancréatiques ou du colon) permettrait d'arrêter la croissance tumorale en bloquant mécaniquement les cellules tumorales dans la matrice (Bhattacharjee et al. 2021). Ce rôle de fonction barrière de la MEC peut également jouer un rôle pro-tumoral puisqu'il a été rapporté dans le cancer du poumon que les sous populations de CAFs FAP⁺ α SMA⁺ et MYH11⁺ α SMA (identifiées par des analyses de séquençage ARN à cellule unique couplé à de l'imagerie multiplexe, sur des tumeurs humaines) sécrètent une MEC dense dont l'organisation et l'alignement de fibres de collagène représentent une barrière physique à l'entrée des cellules T (Grout et al. 2022).

Dialogue *via* les facteurs sécrétés :

Une étude menée par Wang et ses collaborateurs sur des cultures de CAFs issus de patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire révèle que les CAFs peuvent induire l'EMT (transition épithélio-mésenchymateuse) des cellules tumorales favorisant leur dissémination *via* la production de SDF-1 (également appelé CXCL12) qui active les voies de signalisation impliquées dans l'invasion comme CXCR4, β -catenin et PPAR δ . De plus, les auteurs montrent qu'une forte expression de ces protéines (CXCR4, β -catenin et PPAR δ) est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients (Y. Wang et al. 2021). Parmi ces protéines, le récepteur CXCR4 et son ligand CXCL12 sont également retrouvés comme étant de mauvais pronostic pour les patients atteints de cancer du pancréas notamment à cause de leur rôle pro-invasif (D'Alterio et al. 2022). Dittmer et ses collaborateurs révèlent que des CAFs sécrétant TIMP-1 (Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases) induiraient l'activation de STAT3 *in vitro* dans des cellules tumorales mammaires, qui elles-mêmes augmenteraient leur sécrétion de TIMP-1 conduisant ainsi à une boucle d'activation de STAT3. Cette boucle favorise la migration des cellules tumorales et leur résistance aux anti-estrogènes (Dittmer and Dittmer 2022). Enfin, dans le glioblastome, l'étude de Jain et ses collaborateurs montre, *in vitro*, que la production de HGF (hepatocyte growth factor) et d'ostéopontine (glycoprotéine) par les CAFs a un effet pro-tumoral en induisant la polarisation des macrophages en type M2 (pro-tumoral) et en permettant un enrichissement en cellules souches de glioblastome (S. Jain et al. 2023).

Dialogue *via* les vésicules extracellulaires :

En plus de la MEC et des facteurs sécrétés, les CAFs peuvent influencer les fonctions des cellules tumorales *via* la production de vésicules extracellulaires. Par exemple, la sécrétion d'exosomes par les CAFs isolés de tumeurs mammaires humaines a induit une surexpression de miR-500a-5p dans les cellules tumorales favorisant ainsi leur prolifération et dissémination (B. Chen et al. 2021). A l'inverse, les cellules tumorales peuvent également dialoguer avec les CAFs *via* des vésicules extracellulaires. En effet, des vésicules extracellulaires produites par une lignée cellulaire tumorale humaine de cancer de l'ovaire sont capables d'activer les fibroblastes en CAFs *in vitro*, stimuler leur prolifération et migration afin de favoriser leurs effets pro-tumoraux en agissant sur les cellules tumorales mais aussi sur les cellules environnantes comme les cellules endothéliales (Giusti et al. 2022).

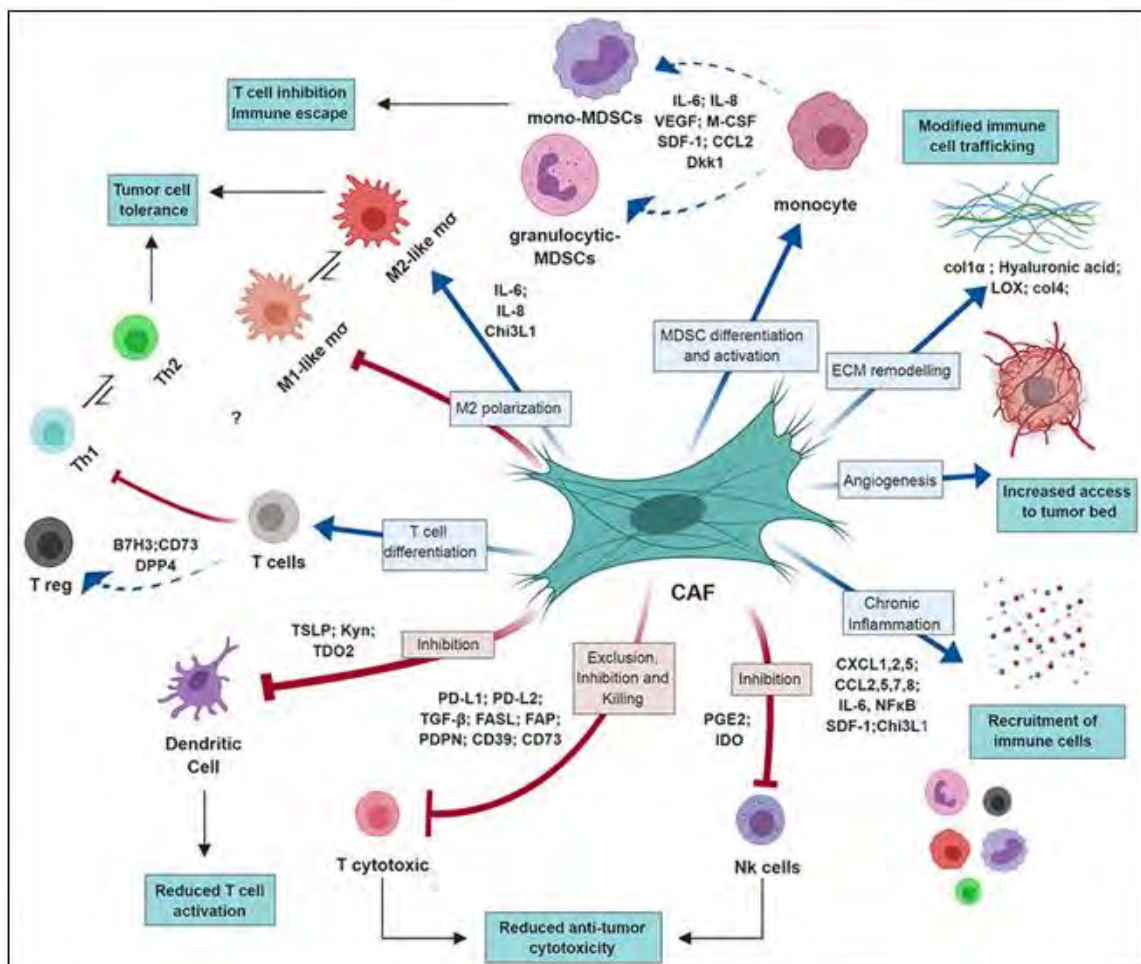


Figure 3 : Fonctions modulées par le dialogue instauré par les CAFs dans le cancer (Monteran and Erez 2019)

Pour conclure, l'hétérogénéité de fonction des CAFs montre bien qu'il est primordial d'être prudent quant à leur ciblage. Dans le cancer colorectal, la déplétion de CAFs α SMA⁺ dans un modèle murin iKAP (dans lequel l'induction de la mutation de KRAS par le tamoxifène conduit au développement tumoral) a favorisé l'invasion tumorale et les métastases et réduit la survie des souris *via* différents mécanismes. Cette déplétion a généré la diminution de BMP4 (bone morphogenetic protein 4), l'augmentation de TGF β 1, une augmentation de cellules ayant des propriétés de cellules souches avec une expression de Lgr5 (leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5), mais a aussi généré un environnement immunosuppresseur avec notamment une réduction de cellules T CD8 et une augmentation de cellules Treg (McAndrews et al. 2021). La déplétion des CAFs α SMA⁺ a également favorisé l'EMT et l'invasion tumorale et réduit la survie des souris dans un modèle PKT (Ptf1acre/+;LSL-KrasG12D/+;Tgfr2flox/flox) développant spontanément un cancer du pancréas (Özdemir et al. 2014). Après différents échecs des thérapies visant à détruire les CAFs, il est paru évident pour la communauté scientifique que la déplétion du stroma n'était pas la stratégie thérapeutique à adopter mais qu'il est préférable de normaliser ce stroma.

B. La matrice extracellulaire, acteur clé de la progression tumorale

B.1. Composition de la MEC

Les CAFs, notamment les CAFs myofibroblastiques, se distinguent par leur aptitude à générer des quantités considérables de protéines de la matrice extracellulaire (Walker, Mojares, and Del Río Hernández 2018). Le développement de nouvelles technologies, telles que le "matrisome" qui permet de caractériser la composition biochimique de la MEC par spectrométrie de masse, a révolutionné notre compréhension des composants et des rôles de la MEC tumorale (Naba et al. 2012; Hynes and Naba 2012). La MEC constitue une structure complexe formée de plusieurs centaines de protéines, jouant un rôle essentiel dans l'ancrage et le soutien des cellules dans des contextes physiologiques et pathologiques (Hynes and Naba 2012). Cette MEC se divise en trois grandes familles de protéines : les collagènes, les glycoprotéines et les protéoglycanes. Les protéines de la MEC ne se contentent pas d'assurer un rôle structurel, elles émettent également des signaux captés par les cellules *via* des récepteurs de surface comme les intégrines, déclenchant ainsi un processus appelé mécanotransduction. Ce mécanisme active des voies de signalisation qui influencent des fonctions clés telles que la prolifération, la survie, l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaire (Hastings et al. 2019). De plus, la MEC agit comme un réservoir de facteurs de croissance, pouvant les séquestrer et les libérer plus tard induisant ainsi différentes signalisations (Hynes 2009). Des altérations de la MEC, que ce soit au niveau de sa composition, de ses propriétés mécaniques ou de son organisation, sont fréquemment observées dans le cancer (Kaukonen et al.

2017; Theocharis and Karamanos 2019). Il est aujourd'hui largement décrit que la MEC possède des caractéristiques biomécaniques et physiques ayant un impact significatif sur l'ensemble des aspects du cancer, incluant la croissance tumorale, l'apparition de métastases, l'angiogenèse, l'inflammation et enfin la réponse aux thérapies (Figure 4).

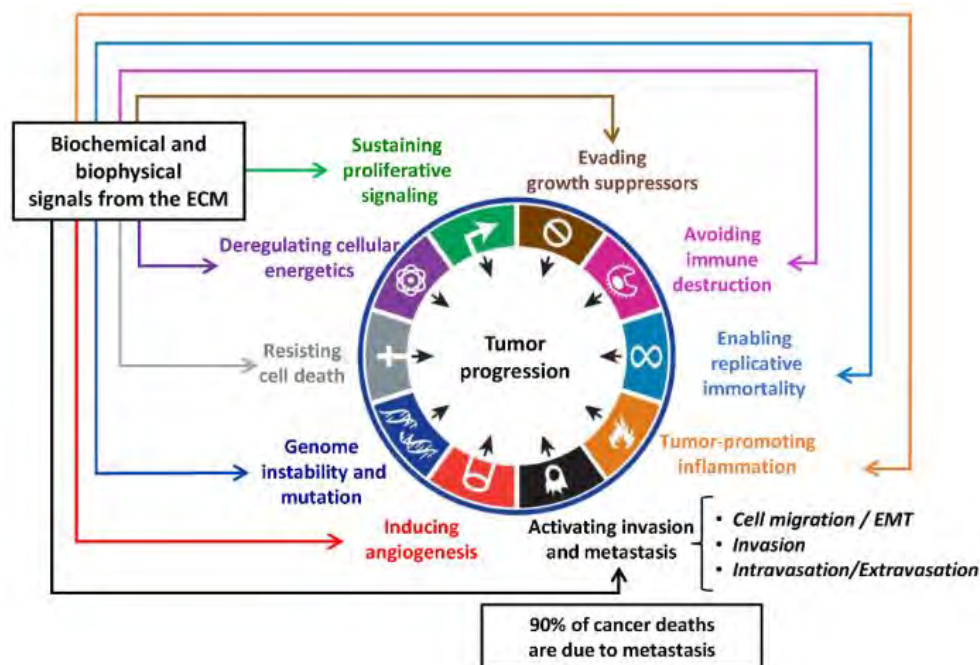


Figure 4 : L'influence de la MEC sur les caractéristiques du cancer (Socovich and Naba 2019)

B.2. Impact de la MEC sur la survie et la prolifération tumorale

La prolifération des cellules tumorales est un élément crucial dans le développement et la progression du cancer. La croissance tumorale est soutenue par divers mécanismes issus du microenvironnement tumoral, parmi lesquels l'activation des intégrines en réponse à leur interaction avec la MEC joue un rôle prédominant (Moreno-Layseca and Streuli 2014). Les principaux composants de la MEC impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses sont les collagènes dont l'accumulation exacerbée a été observée dans de nombreux cancers et dont la majorité a montré un rôle pro-tumoral (Nissen, Karsdal, and Willumsen 2019; Insua-Rodríguez and Oskarsson 2016). Par exemple, l'accumulation de collagène I observée dans les tumeurs des patients atteints de cancer gastrique, a été montrée comme favorisant, *in vitro*, la phosphorylation de la β -caténine dans les cellules tumorales gastriques, sa dissociation de l'E-cadhérine, et sa translocation au noyau, conduisant ainsi à une augmentation de la prolifération de ces cellules (dépendant de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine) (A. Li et al. 2010). Une autre étude menée par Lv et ses collaborateurs identifie, dans ce même cancer, que l'activation de la voie β -caténine *via*

l'engagement de l'intégrine $\beta 1$ par le collagène I (culture en 3D) résulte en une augmentation de la prolifération et de la survie des cellules tumorales gastriques notamment *via* l'expression accrue de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Lv et al. 2021). Le collagène XI présente également des propriétés pro-tumorales *via* l'induction de l'activation des fibroblastes. En effet, le collagène XI produit par les cellules tumorales de l'ovaire active les fibroblastes environnant en CAFs qui vont alors sécréter l'IL-6 favorisant non seulement la prolifération des cellules tumorales mais aussi leurs capacités d'invasion *in vitro* et *in vivo* (souris immunodéficientes greffées en intrapéritonéal avec des cellules tumorales ovariennes humaines) (Y.-H. Wu et al. 2021).

En plus des collagènes, les glycoprotéines peuvent être impliquées dans la régulation des mécanismes pro-tumoraux. C'est par exemple le cas du fibrinogène et de la périostine qui semblent favoriser la prolifération tumorale dans le cancer colorectal et hépatique respectivement. Dans le cancer colorectal, la déplétion du fibrinogène dans un modèle murin (injection de cellules tumorales de colon MC38 dans le tissu sous-cutané dorsal dans des souris déficientes ou non en fibrinogène) diminue la progression tumorale et favorise la sénescence en induisant notamment une diminution de l'activité de FAK connu pour inhiber l'activité de p53 par sa fonction chaperonne (Sharma et al. 2021; S.-T. Lim, Chen, et al. 2008). Quant à la périostine dans le cancer hépatique, sa délétion dans les cellules étoilées hépatiques (HSC) d'un modèle murin (développant un cancer hépatique *via* l'injection en IP d'un agent chimique, le DEN (diethylnitrosamine)) empêche le développement du cancer notamment en inhibant leur activation en CAFs qui favorise habituellement la prolifération des cellules tumorales. Les auteurs montrent que la périostine active les HSCs en se fixant à l'intégrine $\alpha \beta 3$, qui active FAK et induit la voie STAT3 *in vitro* (Xiao et al. 2021). De plus, la croissance tumorale peut être favorisée par la collaboration de protéines matricielles de différentes familles. C'est le cas du collagène de type I et de la fibronectine qui régulent, ensemble, la prolifération tumorale mais qui confèrent aussi des propriétés de cellules souches aux cellules de gliome. L'interaction collagène-fibronectine induit, *in vitro* dans un modèle de culture en 3D, l'activation de différentes voies de signalisation *via* l'intégrine $\alpha \beta 3$ dans les cellules de gliome, c'est pourquoi l'inhibition de cette intégrine, en combinaison avec une chimiothérapie, a permis de bloquer la prolifération tumorale dans un modèle murin immunodéficient de greffe sous-cutané de cellules de gliome (Zhong et al. 2021). Enfin, en plus des collagènes et glycoprotéines, les protéoglycanes peuvent aussi avoir des effets pro-tumoraux. C'est le cas par exemple du syndécan, dont le blocage par un anticorps recombinant réduit la croissance des cellules tumorales (de mélanome et de cancer de l'ovaire) humaines greffées en sous-cutané dans des souris immunodéficientes (Orecchia et al. 2013).

Bien que la plupart des études montrent un rôle pro-tumoral des protéines matricielles, certaines peuvent avoir un rôle plutôt anti-tumoral. C'est le cas de la fibuline 2 qui est sous-exprimée dans des

lignées de cancer du poumon par rapport à des cellules épithéliales bronchiques normales et qui peut inhiber la formation de colonies, l'invasion et la migration de cellules tumorales *in vitro* en régulant certaines voies de signalisation telles que la voie des MAPK et de PI3K. Cette protéine inhibe également la prolifération cellulaire en dérégulant l'expression de certaines molécules d'adhésion et de protéines associées à la MEC et de protéines de la MEC (Yunxia Ma et al. 2021). La glycoprotéine SPARC (Secreted Protein Acidic Cysteine-Rich ou BM-40, Osteonectin) peut aussi bloquer la croissance tumorale. En effet, dans le cancer du pancréas par exemple, l'apport exogène de la protéine SPARC inhibe la prolifération des lignées cellulaires tumorales, tandis que sa diminution stimule la prolifération et réduit l'apoptose *in vitro* (Neuzillet et al. 2013). Le collagène XIV dans le mélanome semble également avoir des propriétés anti-tumorales. En effet, Pach et ses collaborateurs ont identifié, *in vitro*, que la délétion de la métalloprotéase MMP14 dans les fibroblastes dermales murins induit une accumulation de collagène XIV responsable d'une réduction importante de prolifération et de migration des cellules tumorales de mélanome (Pach et al. 2021). Certaines protéines matricielles peuvent également induire la dormance tumorale. C'est par exemple le cas du collagène de type III qui peut favoriser l'induction de la dormance des cellules tumorales (cancer squameux de la tête et du cou et tumeurs mammaires) et dont la modification d'organisation peut être modifiée de sorte à réactiver les cellules dormantes plus tard. Ces résultats ont été montrés *in vitro* sur des cellules tumorales de cancer squameux de la tête et du cou et *in vivo* dans des CAM (membranes chorioallantoïques de poulet) ou des souris immunodéficientes transplantées orthotopiquement avec soit des cellules tumorales de cancer squameux de la tête et du cou, soit avec des cellules tumorales mammaires (Di Martino et al. 2022). Jouer sur l'abondance et l'organisation de la MEC pourrait donc permettre de bloquer les cellules tumorales au stade de dormance et empêcher ainsi l'apparition de métastases.

Enfin, le hyaluronane (acide hyaluronique) est une protéine matricielle particulière puisqu'elle peut jouer des rôles pro et anti-tumoraux. La majorité des études montrent que cette protéine matricielle favorise la progression tumorale dans différents cancers notamment en activant des voies de signalisation impliquées dans la prolifération, l'invasion, les métastases et l'angiogenèse et en inhibant l'apoptose des cellules tumorales. Cependant, selon sa taille il peut induire un effet anti-tumoral (Ying Liu et al. 2023). Dans le cancer du sein par exemple, le traitement des cellules tumorales, *in vitro*, par le hyaluronane de haut poids moléculaire (200kDa) bloque la prolifération des cellules cancéreuses mammaires ce qui n'est pas le cas du hyaluronane de faible poids moléculaire (Tavianatou et al. 2021).

Toutes ces études confirment encore une fois qu'il est important de ne pas détruire la matrice et le stroma de manière générale mais plutôt de les normaliser puisque toutes les matrices ne sont pas pro-tumorales.

B.3. Impact de la MEC sur l'invasion des cellules tumorales et les métastases

L'invasion, une étape clé du processus métastatique, est également induite par des mécanismes dépendants de l'expression de protéines matricielles spécifiques, de l'organisation de la MEC mais également de sa réticulation/rigidité. En effet, la réticulation du collagène, dépendante notamment des LOX (Lysyl oxydases), engendre une MEC plus rigide qui favorise la formation d'adhésions focales dans les cellules tumorales *in vitro* via l'engagement des intégrines (Elosegui-Artola et al. 2016). Ce processus active par la suite des voies de signalisation telles que FAK, Rho-A et Src, qui renforcent la contractilité des cellules et favorisent leur invasion (Pickup et al. 2013; Rubashkin et al. 2014). Lorsque la rigidité matricielle est diminuée via l'inhibition de la LOX (par le β -aminopropionitrile (BAPN) par exemple), l'invasion et la migration des cellules tumorales de carcinome cervical sont réduites *in vitro* (X. Yang et al. 2013). De manière intéressante, la sécrétion de LOXL2 induit, à distance de la tumeur, la rigidité de la MEC et le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC) afin de faciliter le développement d'une niche pré-métastatique (Sethi and Kang 2011), contribuant à l'invasion des cellules cancéreuses hépatiques et à la colonisation des poumons *in vivo* (modèle de greffe orthotopique dans des souris immunodéficientes) (C. C.-L. Wong et al. 2014; Erler and Weaver 2009). Mécanistiquement, l'augmentation de la rigidité de la MEC favorise dans les cellules tumorales, la création de faisceaux d'actomyosine stimulant la formation d'invadopodes (Aung et al. 2014; Jerrell and Parekh 2014). Les invadopodes sont des protubérances de la membrane plasmique riches en actine et en MMPs (métalloprotéases) qui participent à la dégradation de la matrice et à la formation de pores ou de tunnels dans lesquels les cellules tumorales peuvent passer pour envahir d'autres tissus (Kessenbrock, Plaks, and Werb 2010; Schoumacher et al. 2010). La rigidité matricielle peut également favoriser la sécrétion d'exosomes qui modifieraient la morphologie, l'adhésion et la motilité des cellules tumorales mammaires *in vitro*. Ces capacités pro-invasives induites par la dureté de la matrice font intervenir la MMP-9 et FAK (Patwardhan et al. 2021). Liu et ses collaborateurs ont montré qu'en effet, sur un support rigide, les cellules tumorales mammaires voient leur signalisation YAP1 et AP1 diminuer, qu'elles passent d'un métabolisme glycolytique à un métabolisme plutôt lipidique impliquant davantage la phosphorylation oxydative, tout ceci favorisant leur invasion (C. Liu et al. 2021). De plus, dans d'autres cancers tels que le glioblastome, la rigidité de la matrice a induit la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules tumorales (montré *in vitro*), connue pour favoriser l'invasion des cellules et l'apparition de métastases (Basilico et al. 2022; Winkler et al. 2020). Certaines

protéines matricielles au contraire empêchent l'EMT. C'est le cas de la décorine qui est un protéoglycane dont la délétion dans un modèle murin de cancer du côlon (induit par la colite *via* l'Azoxymethane (AOM)/Dextran sodium sulfate) favorise l'expression de facteurs impliqués dans l'EMT, tels que Snail, Slug, Twist, et MMP2, et corrèle avec une diminution de E-cadhérine (caractéristique de l'EMT impliquée dans les métastases) et augmente les métastases. Lorsque les souris déficientes pour la décorine ont reçu un traitement avec de la décorine, le phénotype a été réversé (diminution de l'EMT et des métastases) (Mao et al. 2021). Les modifications de la matrice au cours de l'âge peuvent également réguler les capacités d'invasion des cellules. En effet, lorsque des cellules épithéliales saines mammaires humaines ont été cultivées sur une MEC mammaire de souris âgées, elles ont montré une perte d'E-cadhérine à leur membrane, une surproduction de protéines associées au cancer (MMPs, collagène I...) mais surtout une augmentation de leur motilité et de leur invasion. Ce phénotype a été réversé lorsque la LOX a été délétée par siARN *in vitro* démontrant ainsi l'importance de l'organisation de la matrice dans l'induction du comportement pro-invasif (Bahcecioglu et al. 2021). Suite à une chimiothérapie, la matrice peut être accumulée (c'est notamment le cas de la gemcitabine) mais il s'avère aussi qu'elle peut être remodelée. C'est le cas du paclitaxel qui induit l'expression de la LOX afin de remodeler la matrice dans les poumons de souris sans tumeur. Étonnement, ce remodelage matriciel a été montré (grâce à un modèle murin dans lequel la LOX est déplétée dans la moelle osseuse) comme médié par l'expression de la LOX par les cellules T et non par les fibroblastes comme nous aurions pu le penser (Haj-Shomaly et al. 2022). Les auteurs montrent que l'inhibition de la LOX dans un modèle murin de cancer du sein (cellules tumorales greffées dans le coussin adipeux entourant la glande mammaire) peut contrer le remodelage matriciel provoqué par le paclitaxel et empêche l'apparition de métastases (Haj-Shomaly et al. 2022). Alors que cette étude révèle un remodelage de la MEC par les cellules immunitaires, cette modulation se fait dans les deux sens puisque la matrice peut réguler la présence et la fonction de cellules immunitaires (détaillé dans le paragraphe B.5).

Enfin, en plus de la quantité et de la rigidité de la MEC, l'organisation de la MEC joue un rôle critique dans l'invasion tumorale. Ceci est illustré par le fait qu'une classification basée sur l'organisation de la MEC, proposée sur la base des "signatures de collagène associées aux tumeurs (TACS)", est en corrélation avec le pronostic des patientes atteintes de cancer du sein (Conklin et al. 2011; Paolo P. Provenzano et al. 2006). Par rapport aux tissus normaux où les fibres de collagène sont ondulées avec une orientation isotrope (TACS-1), dans les tumeurs non invasives de cancer du sein elles sont soit tendues, anisotropes et forment une coque autour de la tumeur (TACS-2) soit perpendiculaires au bord de la tumeur (TACS-3) dans les tumeurs invasives facilitant ainsi l'invasion tumorale (Brett et al. 2020). Ces signatures ont également été observées dans des tumeurs humaines et murines

(modèle KPC) de PDAC et dans des tumeurs humaines du cancer de l'ovaire (Adur et al. 2014; Ray et al. 2022). Ainsi, la quantité, la rigidité et l'organisation de la MEC ont un rôle majeur dans l'invasion tumorale.

B.4. Impact de la MEC sur l'angiogenèse tumorale

La MEC se divise en deux compartiments : la MEC interstitielle et la membrane basale (MB). Cette dernière, en plus de constituer une couche séparant les tissus épithéliaux des tissus sous-jacents, se retrouve également autour des vaisseaux. Elle fournit à elle seule les caractéristiques structurelles et mécaniques qui soutiennent l'endothélium, elle participe à l'intégrité vasculaire et permet la distribution des nutriments et de l'oxygène (Armulik, Genové, and Betsholtz 2011; Stratman and Davis 2012). La MB entourant les vaisseaux se compose majoritairement de collagène IV et de laminines. Il est maintenant bien établi que des modifications de la MB peuvent influencer l'angiogenèse tumorale puisque l'angiogenèse est associée à la dégradation et à la reformation d'une MB anormale (Kalluri 2003). En réponse aux facteurs de croissance influençant les cellules endothéliales et à la présence de MMPs, la MB peut être dégradée et peut subir des modifications de structure favorisant la prolifération et la migration des cellules endothéliales vasculaires. Les facteurs de croissance, tels que le VEGF, le FGF- β et le PDGF produits par les cellules tumorales, les fibroblastes et les cellules immunitaires et pré-stockés dans la MB, sont libérés tout au long de sa dégradation par les MMPs conduisant ainsi à la formation d'une matrice intermédiaire, puis d'une nouvelle matrice mature plus complexe (Kalluri 2003). Ces dernières années, de nombreuses études se sont penchées sur l'influence de diverses protéines de la MB sur l'angiogenèse tumorale. Lord et ses collaborateurs ont notamment montré *in vitro* que le perlecan (protéoglycane) produit par les cellules endothéliales exerce une activité pro-angiogénique principalement par la régulation d'une voie de signalisation FGF-2 impliquée dans la prolifération, la motilité et l'adhésion de ces cellules, et contribuant au maintien de l'intégrité et de la fonction de barrière endothéliale (Lord et al. 2014). De manière intéressante, lorsque ce perlecan est dégradé par l'héparanase *ex vivo* dans un modèle de morphogenèse de la glande submandibulaire, il libère différents facteurs pro-angiogéniques auxquels il était lié, résultant en l'activation de voies de signalisation telles que les MAPK impliquées dans l'invasion et l'apparition de métastases (Whitelock, Melrose, and Iozzo 2008; Iozzo and Cohen 1994). Cependant, malgré son activité pro-angiogénique, la protéine résultant de sa dégradation par les MMPs, appelée endorepelline, possède des propriétés anti-angiogéniques. En effet, lorsque l'endorepelline se lie à l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, elle active une cascade de signalisation dans les cellules endothéliales, inhibant leur prolifération et leur migration *in vitro* (Mongiat et al. 2003). D'autres fragments de clivage des protéines de la MEC dépendants de l'activité des MMPs ont été rapportés comme jouant un rôle anti-angiogénique. C'est le cas de l'endostatine, un fragment du collagène

XVIII, ou encore de l'angiostatine issue du plasminogène, toutes deux considérées comme des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse avec des fonctions anti-tumorales (O'Reilly et al. 1997; Cornelius et al. 1998).

B.5. Impact de la MEC sur la composante immunitaire

La MEC impacte non seulement les fonctions des cellules tumorales mais aussi d'autres composants du stroma comme l'immunité notamment grâce à ses propriétés architecturales, en agissant comme une barrière physique ou en générant des rails d'invasion, et grâce à ses propriétés biochimiques, en piégeant et en libérant des cytokines (Flies et al. 2023). La densité, l'organisation et la composition de la MEC jouent un rôle clé dans la migration et la distribution spatiale des cellules immunitaires (Hynes 2009; Hallmann et al. 2015). En effet, les cellules dendritiques et T sont capables de migrer, sous la direction des chimiokines, le long des fibres de collagène I indépendamment des intégrines et des molécules d'adhésion (migration amiboïde) *in vitro* (dans des structures matricielles de collagène en 3D) (Friedl and Wolf 2003a; Lämmermann et al. 2008; Wolf et al. 2013; Friedl and Weigelin 2008). La rigidité de la MEC influence également l'infiltration et le phénotype des cellules immunitaires dans la tumeur. Une étude publiée par l'équipe de Donnadieu a notamment montré que l'inhibition de la LOX dans un modèle murin développant spontanément un cancer du pancréas (KPC) diminue la rigidité matricielle favorisant ainsi la migration et l'infiltration de cellules T dans les tumeurs, et améliorant la réponse aux anti-PD1 (Nicolas-Boluda et al. 2021). Chirivì et ses collaborateurs ont montré que la rigidité de la matrice pouvait influencer la morphologie, la viabilité et l'expression de certains gènes des lymphocytes T CD4 et CD8 *in vitro*. En effet, lorsqu'ils sont cultivés sur une matrice rigide issue de cancer du sein, les lymphocytes voient leur volume cellulaire réduire considérablement même si leur noyau augmente de taille comparé à lorsqu'ils sont sur une matrice saine (Chirivì et al. 2021). Or, la déformation des lymphocytes induite par la MEC peut modifier leurs fonctions durant l'extravasation (passage d'un vaisseau sanguin vers un tissu) et la migration. En effet, la rigidité matricielle peut stimuler les gènes du système immunitaire, augmenter les propriétés métaboliques des lymphocytes T primaires humains et leur prolifération *in vitro* (Saitakis et al. 2017). Cependant, cet effet dépend du degré de rigidité de la matrice puisque le groupe de Chirivì montre que sur une matrice rigide (2.5kPa) mais moins que celle du groupe de Saitakis (100kPa), la viabilité des lymphocytes T CD8 *in vitro* est réduite. La rigidité matricielle influence notamment l'expression de certains gènes comme *NFKB1* impliqué dans la voie NF-κB qui sont diminués dans les T CD8 sur une matrice rigide (Chirivì et al. 2021). La rigidité matricielle peut également influencer le phénotype et la polarisation des macrophages. En effet, des lignées de monocytes humains cultivés sur une matrice rigide se polarisent en macrophages de type M2 (pro-tumoraux). La rigidité matricielle active la voie intégrineβ5-FAK-MEK1/2-ERK1/2 induisant une surexpression de HIF-1α et une forte

expression de LOXL2 par ces macrophages, générant alors une boucle d'amplification de la rigidité matricielle (Xing et al. 2021). Enfin, une matrice rigide influence également les fonctions des cellules dendritiques, et favorise, *in vitro*, leur prolifération, activation et production de cytokines et oriente leur métabolisme vers la glycolyse (Chakraborty et al. 2021). Ainsi, de manière générale, la rigidité de la MEC régule à la fois l'entrée des cellules immunitaires au sein de la tumeur et leurs fonctions.

Alors que la MEC est un réseau de nombreuses protéines matricielles et que la rigidité et l'organisation de la MEC dépendent de l'ensemble des protéines qui la compose, certaines protéines peuvent, à elles seules, influencer la composante immunitaire. Dans ce paragraphe, je développerai notamment le rôle du collagène I, de la tenascine-C et de l'ostéopontine. Concernant le collagène de type I, il a été rapporté par le groupe de R Kalluri que sa délétion génétique spécifiquement dans les fibroblastes d'un modèle murin développant spontanément un cancer pancréatique (KPPF : *FSF-Kras^{G12D/+};Trp53^{frt/frt};Pdx1-Flp*) favorise l'immunosuppression. En effet, cette délétion induit une surproduction de CXCL5 par les cellules tumorales (*via* SOX9) qui est associé un recrutement massif de cellules immunosuppressives telles que les MDSCs (myeloid-derived suppressor cells) et une élimination des cellules T CD8 dans la tumeur (Y. Chen et al. 2021). De plus, l'organisation du collagène proposée sur la base des TACS (tumor-associated collagen signature) peut aussi influencer l'infiltration immunitaire. Dans le cancer du sein, la formation de TACS-2 dépendante de l'expression de DDR1 (Discoidin domain receptor1, récepteur du collagène) par les cellules tumorales, induit l'exclusion des cellules immunitaires de la tumeur. La délétion de DDR1 dans les cellules tumorales restaure une infiltration de cellules T au sein de la tumeur empêchant ainsi la croissance tumorale *in vivo* (modèle murin de greffe de cellules tumorales mammaires dans le coussin adipeux entourant la glande mammaire de souris). Chez les patientes, une forte expression de l'ARNm de DDR1 est associée à une survie plus courte et à une faible infiltration de cellules T CD8 dans la tumeur mammaire (X. Sun et al. 2021). DDR1 n'étant pas le seul récepteur du collagène, un autre a été étudié : LAIR (leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor). Ce récepteur, pouvant se fixer à la fois au collagène et à ses fragments, est exprimé par presque toutes les cellules immunitaires et son accumulation est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de différents cancers dont le cancer du sein et du poumon. Lorsque des fragments de collagène se fixent à LAIR-1 présent sur les cellules T *in vitro*, la fonction de ces cellules est alors bloquée *via* l'inhibition de la sécrétion d'IFN γ (interféron-gamma) et de la signalisation du récepteur CD3, ce qui pourrait favoriser un environnement plutôt immunosuppresseur chez l'Homme et la souris (Vijver et al. 2021). Dans des modèles murins de cancer du sein ou du colon (greffe de cellules tumorales mammaires ou de colon en sous-cutané), un blocage de ce récepteur en combinaison avec une inhibition du TGF β et un anti-

PD-L1 a permis de remodeler la MEC et de faciliter ainsi l'infiltration et l'activation des T CD8 et de diminuer la croissance tumorale (Horn et al. 2022).

Une autre protéine matricielle influençant l'immunité est la tenascine-C. Cette glycoprotéine est un acteur clé du blocage des lymphocytes dans la matrice. En induisant la production de CXCL12 dans les lymphocytes et en s'y fixant, la tenascine-C immobilise les lymphocytes (montré *in vitro* dans des co-cultures indirectes (transwell) de cellules tumorales mammaires et lymphocytes, et *in vivo* dans un modèle murin de greffe orthotopique syngénique de cellules tumorales mammaires). Afin de bloquer l'interaction entre CXCL12 et la tenascine, des inhibiteurs du récepteur de CXCL12 ont été utilisés *in vivo* et ont permis une meilleure infiltration de cellules T mais aussi de macrophages réduisant ainsi la croissance tumorale dans le cancer du sein (Murdamoothoo et al. 2021).

Enfin, concernant l'ostéopontine, cette glycoprotéine peut être produite par les macrophages associés à la tumeur et a été montrée comme stimulant l'expression de PD-L1 *in vitro* et *in vivo* (modèle murin de xénogreffe sous-cutanée) dans un cancer pulmonaire *via* la voie NF- κ B favorisant ainsi l'inactivation des cellules T dans la tumeur (Y. Li et al. 2021). Cette protéine a donc été ciblée grâce à l'utilisation d'anticorps bloquants et résulte en une diminution de la progression tumorale et une augmentation des réponses aux immunothérapies (anti-PD-1) dans un modèle murin de cancer colorectal (dans lequel les cellules tumorales de colon sont injectées dans la veine caudale) (Klement et al. 2021).

Enfin, la MEC est une source importante de molécules immunomodulatrices, notamment des cytokines et des facteurs de croissance, qui sont liées aux protéines de la MEC ou libérées lors de la dégradation protéolytique de cette dernière. Ces molécules influencent divers aspects des cellules immunitaires, notamment leur prolifération, leur migration et leur différenciation (Boyd and Thomas 2017; Rahman et al. 2005; Wijelath et al. 2006). En outre, certaines protéines de la MEC contiennent des domaines de structure similaires à ceux des cytokines et des chimiokines, appelés matrikines, qui, une fois exposés par protéolyse, régulent la migration, l'adhésion, la différenciation et les fonctions pro-inflammatoires des cellules immunitaires (Monboisse et al. 2014). Par exemple, le fragment bioactif de collagène I, le N-acétyl Pro-Gly-Pro (PGP), qui partage une homologie structurelle avec CXCR1 et CXCR2 attire les neutrophiles dans les zones inflammatoires *in vivo* (dans un modèle de fibrose cystique). La génération de PGP *ex vivo* à partir de collagène a été atténuée en utilisant des inhibiteurs de MMP-8 et MMP-9 (Gaggar et al. 2008). Ces découvertes soulignent l'importance des fragments de la MEC dans la régulation de la migration des cellules immunitaires.

B.6. Impact de la MEC sur la réponse aux thérapies

De nombreux types de cellules tumorales ont été montrés comme exploitant les interactions avec leur microenvironnement pour développer une résistance aux médicaments, que ce soit dans la tumeur d'origine ou lors de la formation de métastases (Vincent and Mechti 2005; Sloan et al. 2006; Chrenek, Wong, and Weaver 2001). Ces interactions peuvent être classées en deux catégories : les obstacles physiques au traitement (comme l'hypoxie, le pH et la pression de fluide interstitiel) et la résistance aux médicaments liée à l'adhésion cellulaire (responsable de la mécanotransduction). Dans de nombreux cas, l'administration d'agents thérapeutiques à l'intérieur et autour d'une tumeur repose sur la diffusion et la convection sous pression (R. K. Jain 1999) et la plupart des agents thérapeutiques anticancéreux ont une pénétration limitée dans les tumeurs solides (Trédan et al. 2007; Kyle et al. 2007). L'augmentation du fluide interstitiel due à la MEC constitue l'un des principaux obstacles à la pénétration des thérapies. Ce phénomène de gonflement électromécanique de la matrice n'affecte pas uniquement la pression de fluide interstitiel, mais entraîne également la génération d'une contrainte de compression qui favorise la croissance locale des cellules cancéreuses (Helmlinger et al. 1997). Ce stress compressif a été associé à une résistance accrue à la chimiothérapie dans le cancer du pancréas. En effet, l'application de contraintes mécaniques sur des sphéroïdes de cellules tumorales pancréatiques entraîne une diminution de la prolifération cellulaire, ce qui réduit l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques *in vitro* (Rizzuti et al. 2020). En parallèle de ces contraintes mécaniques, la résistance aux thérapies peut être médiée par l'adhésion cellulaire. En effet, des cellules de glioblastome humaines cultivées sur différentes matrices (fibronectine, vitronectine et laminines) puis traitées avec une chimiothérapie (carmustine) présentent une viabilité augmentée comparé aux mêmes cellules cultivées sans MEC. Cette résistance aux chimiothérapies est dépendante de l'engagement de l'intégrine αV , et donc de l'adhésion des cellules à la MEC, puisque le traitement avec un inhibiteur de l'intégrine αV empêchant l'adhésion, restaure une réponse aux chimiothérapies. Mécanistiquement, l'adhésion des cellules favorise la résistance aux drogues en inhibant l'apoptose des cellules médiée par p53 et augmentant l'expression de gènes impliqués dans l'efflux des drogues tels que MDR1 (multidrug resistance gene 1) (Yu et al. 2021). Le collagène XI a également été décrit comme chimioprotecteur face à la gemcitabine en induisant, *in vitro*, l'inhibition de la libération de cytochrome C et détruisant la balance bcl2/bax perturbant ainsi le potentiel transmembranaire mitochondrial et empêchant les cellules tumorales pancréatiques d'entrer en apoptose (Hui Wang et al. 2021). Dans le carcinome hépatocellulaire, le remodelage de la matrice *via* les MMPs et les modifications de rigidité par des cellules cancéreuses souches, *in vitro*, a aussi induit une résistance à la chimiothérapie (5-Fluorouracile) qui peut être réversée par l'ajout de la protéine THBS2 (thrombospondine,

glycoprotéine) montrant l'implication de cette protéine dans la chimiosensibilité (Ng et al. 2021). La rigidité matricielle protège également les cellules tumorales du cancer de l'ovaire, *in vitro*, contre le cisplatine *via* l'activation des voies de signalisation impliquant FAK et YAP (Pietilä et al. 2021). Enfin, comme mentionné dans la partie précédente, la MEC impacte également la réponse aux immunothérapies de manière indirecte de par sa rigidité (Nicolas-Boluda et al. 2021).

C. Ciblage des CAFs et de la MEC dans les cancers solides

C.1. Ciblage des CAFs

En s'appuyant sur une riche documentation démontrant le rôle stimulant des CAFs dans la tumorigenèse et la résistance aux thérapies, diverses approches ont été élaborées pour les cibler spécifiquement. La première approche consiste à réduire la présence des CAFs afin d'entraver leur contribution à la croissance tumorale. Par exemple, un vaccin à base d'ADN ciblant spécifiquement les CAFs FAP+ a montré des résultats prometteurs en inhibant la tumeur primaire et les métastases pulmonaires chez les souris atteintes de cancer du côlon (modèle de greffe sous-cutanée de cellules tumorales)(Wen et al. 2010). La destruction de ces CAFs par le vaccin oral FAP dans un modèle murin de cancer du sein (greffe orthotopique de cellules tumorales mammaires dans le coussin adipeux entourant la glande mammaire) a augmenté l'absorption des chimiothérapies au sein de la tumeur réduisant ainsi la croissance tumorale mais également les métastases (Loeffler et al. 2006). En plus de FAP, un autre marqueur des CAFs, l' α -SMA, a été ciblé. Cependant, tandis que le ciblage des CAFs α -SMA+ a été bénéfique pour supprimer les métastases dans des modèles murins de greffe orthotopique de cellules tumorales de cancer du sein (réduction de plus de 70% des CAFs α -SMA+ grâce au Cellax qui est composé de nanoparticules conjuguées au docétaxel) (Murakami et al. 2013), il a eu un effet délétère dramatique dans le cas du cancer du pancréas (détaillé dans le chapitre II sur le ciblage des CAFs dans le cancer du pancréas)(Özdemir et al. 2014).

Une autre stratégie consiste à normaliser les CAFs en les reprogrammant en fibroblastes non activés ou quiescents. Pour cela, plusieurs molécules ont été testées dont l'acide tout-trans rétinoïque (ATRA), un métabolite actif de la vitamine A. Dans le cas du cancer pancréatique, l'ATRA a permis de ramener les fibroblastes pancréatiques à un état de quiescence (*in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin KPC), réduisant ainsi leur capacité à générer des forces de traction élevées et diminuant ainsi le remodelage de la MEC. Cette modification du stroma a non seulement un effet inhibiteur sur l'invasion et la progression du cancer, mais elle entraîne également une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales pancréatiques *in vivo* (modèle KPC), en plus de favoriser l'infiltration des cellules T dans la tumeur, améliorant ainsi la survie des animaux (Chronopoulos et al. 2016; Froeling et al. 2011; Ene-Obong et al. 2013). Le

récepteur de la vitamine D s'est également avéré prometteur dans la stratégie de reprogrammation stromale en favorisant la pénétration intra-tumorale de chimiothérapie (gemcitabine), en réduisant le volume tumoral et augmentant la survie des souris KPC par rapport à la chimiothérapie seule dans le cas du cancer du pancréas (Sherman et al. 2014). Actuellement, les approches utilisant l'ATRA et la vitamine D font l'objet d'essais cliniques dans divers cancers solides (NCT00195156 ; NCT03611595 ; NCT02052492 ; NCT00511017), tant en monothérapie qu'en combinaison avec des chimiothérapies, et semblent prometteurs. Enfin, la dernière stratégie consiste à cibler les voies pro-tumorales induites par les CAFs. Par exemple, l'inhibition pharmacologique de la signalisation CXCL12-CXCR4 dépendante des CAFs a permis de bloquer la progression tumorale dans plusieurs cancers dont le cancer pancréatique, gastrique et le cancer du sein en atténuant la desmoplasie, diminuant l'invasion tumorale (*in vivo* et *in vitro*) et augmentant l'infiltration immunitaire anti-tumorale (*in vivo*) (Feig et al. 2013; I. X. Chen et al. 2019; Izumi et al. 2016). Des essais cliniques évaluent actuellement l'efficacité des inhibiteurs de CXCR4 dans le traitement des cancers solides, qu'ils soient administrés en monothérapie ou en association avec d'autres traitements.

C.2. Ciblage de la MEC

Étant donné l'influence majeure de la MEC dans les cancers solides, diverses investigations ont été menées pour évaluer son ciblage direct ou indirect. L'une des protéines de la MEC dont le ciblage direct a été largement documenté est l'acide hyaluronique (HA), qui joue un rôle crucial dans la progression tumorale. L'utilisation de la hyaluronidase recombinante humaine PH20 PEGylée (PEGPH20) a notamment permis d'induire une réponse anti-tumorale importante dans un modèle murin de cancer de la prostate (greffe intra-musculaire de cellules tumorales de prostate) présentant un taux élevé de HA mais aussi d'améliorer l'infiltration des chimiothérapies dans la tumeur (Thompson et al. 2010). Malheureusement, dans le cancer du pancréas, malgré des résultats prometteurs dans des études précliniques (Jacobetz et al. 2013), les essais cliniques ont montré que l'ajout du PEGPH20 au traitement standard n'apportait pas d'avantage aux patients atteints de cancer métastatique et, au contraire, entraînait une survie globale plus courte dans un essai clinique de phase Ib/II (Ramanathan et al. 2019).

La MEC peut également être ciblée indirectement en agissant sur les MMPs qui participent à son remodelage favorisant la progression tumorale. Parmi les MMPs majoritairement ciblées, on retrouve la MMP-9 dont l'inhibiteur induit une réduction de la progression tumorale dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (injection de cellules tumorales de colon issues de métastases pulmonaires dans la veine cave de souris) de cancer colorectal (Lubbe et al. 2006). Malheureusement, la plupart des essais cliniques portant sur les inhibiteurs de MMPs ont été interrompus, car ils n'ont ni amélioré

la survie des patients ni réduit la croissance tumorale, tout en entraînant des effets secondaires graves (A. Winer, Adams, and Mignatti 2018). La LOX a aussi été une cible de choix dans les études précliniques mais a donné des résultats mitigés. En effet, alors que dans des études précliniques de différents cancers (sein, prostate, pancréas à des stades précoces) son inhibition a permis de sensibiliser les cellules tumorales aux thérapies (Saatci et al. 2020; P. Xie et al. 2019; Miller et al. 2015), les essais cliniques utilisant le Simtuzumab (inhibiteur de LOX) ont été décevants puisqu'il n'améliore pas la survie des patients atteints de cancer du pancréas ni de carcinome colorectal (Benson et al. 2017; Hecht et al. 2017).

Enfin, une autre approche consiste à cibler les voies de signalisation induites par la MEC. Comme la MEC induit ces signalisations principalement en interagissant avec les intégrines, ces dernières ont été ciblées. Par exemple, le Cilengitide, un inhibiteur des intégrines $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$, a démontré une capacité à inhiber, *in vitro*, la prolifération des cellules de carcinome épidermoïde de la tête et du cou (L. Zhang et al. 2019), tandis que l'endostatine, un inhibiteur endogène ciblant l'intégrine $\alpha V\beta 1$, a montré une inhibition de la tumorigenèse à la fois *in vitro* et *in vivo* (modèle murin avec injection sous-cutanée de cellules tumorales EOMA) dans l'hémangioendothéliome (L. Guo et al. 2015). Malheureusement, une fois en essai clinique, les inhibiteurs d'intégrines, dont le Cilengitide, n'ont pas amélioré la survie des patients atteints de cancer (glioblastome, cancer du poumon non à petites cellules avancé, carcinome épidermoïde récurrent et/ou métastatique de la tête et du cou, ou cancer colorectal) (Stupp et al. 2014). Enfin, parmi les protéines ciblées en aval de l'interaction MEC-intégrines, on retrouve la focale adhésion kinase (FAK) qui a été étudiée dans différents cancers. Les stratégies ciblant cette tyrosine kinase seront détaillées dans le chapitre III partie III.C « Ciblage de FAK ».

III. Vaisseaux

La fonction primaire des vaisseaux sanguins est d'apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires au bon fonctionnement des organes et tissus du corps mais aussi d'évacuer les déchets de l'organisme. Il existe trois types de vaisseaux avec des fonctions différentes : les artères qui transportent le sang depuis le cœur, les veines qui ramènent le sang vers le cœur et les capillaires (les plus petits vaisseaux) qui connectent les artères aux veines (Tucker, Arora, and Mahajan 2023). Alors que les artères sont des vaisseaux sanguins solides qui peuvent supporter une importante pression provenant du flux sanguin mais qui ne transportent que peu de volume de sang (10-15% du sang seulement présent dans les artères), les veines ont des parois minces et moins élastiques ne leur permettant pas de transporter du sang sous haute pression mais leur permettant de ramener de grands volumes de sang désoxygéné vers le cœur (Tansey et al. 2019). De manière générale, ces

vaisseaux se composent d'une couche de cellules endothéliales connectées entre elles par des jonctions serrées et adhérentes mais aussi d'une membrane basale (MB) permettant le maintien du vaisseau et composée de différentes protéines matricielles telles que le collagène IV et les laminines. Cette membrane est entourée de cellules périvasculaires appelées péricytes ou cellules musculaires lisses vasculaires (Bergers and Song 2005a) (Figure 5).

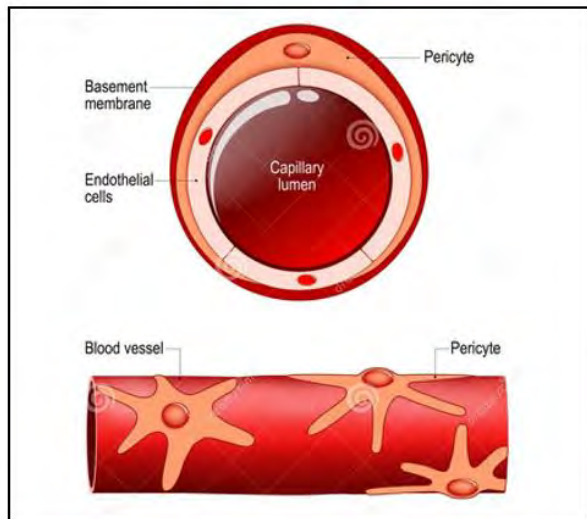


Figure 5 : Structure d'un vaisseau (*Adapté de Pericyte anatomy, structure of blood vessel*)

Alors que ces vaisseaux permettent le bon maintien des tissus du corps humain dans des conditions physiologiques, ils peuvent malheureusement aussi avoir un impact désastreux sur le corps lors de situations pathologiques. Lors d'un cancer par exemple, les vaisseaux apportent l'oxygène et les nutriments nécessaires à la croissance tumorale et permettent aux cellules d'envahir d'autres tissus (Siemann and Horsman 2015). De plus, dans ce contexte, et notamment à cause de l'augmentation de la pression de fluide interstitiel induite par l'abondance matricielle, les vaisseaux sont tortueux et présentent une perméabilité excessive anormale. Dans ce chapitre, j'ai décidé de me focaliser sur les vaisseaux sanguins présents dans les cancers solides en décrivant leur composition, leur rôle pro-tumoral, leurs interactions avec les CAFs et leur ciblage. Enfin, je finirai en portant une attention particulière à un type de vaisseaux spécifique que sont les High Endothelial Venules (HEVs).

A. Vaisseaux sanguins

A.1. Composition cellulaire d'un vaisseau

A.1.1. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont les constituants majeurs des vaisseaux sanguins et sont des acteurs clés de leur développement et de leur fonction. Au stade embryonnaire, les artères et les veines se

composent seulement de cellules endothéliales et de MB alors que les péricytes, permettant la maturation et stabilisation des vaisseaux, ne sont requis que plus tardivement (stade embryonnaire E16 chez la souris)(Qiu and Hirschi 2019). Les cellules endothéliales forment une simple couche fine autour du lumen que l'on appelle endothélium vasculaire et qui a plusieurs propriétés dont la régulation de la thrombose et thrombolyse, la modulation du flux sanguin, l'adhérence des plaquettes mais aussi la régulation de l'infiltration immunitaire notamment en contrôlant les interactions entre les cellules immunitaires et les vaisseaux (Sumpio, Riley, and Dardik 2002). Les cellules endothéliales produisent des protéines matricielles afin de constituer la MB stabilisant les vaisseaux (Stratman and Davis 2012). Cet endothélium semi-perméable régule le flux de liquide et de solutés, y compris les protéines plasmatiques, entre le sang et les tissus environnants. Concernant leur origine, les cellules endothéliales proviennent soit de la différenciation de cellules progénitrices endothéliales (CPE) soit de la prolifération d'autres cellules endothéliales d'un vaisseau préexistant comme lors de l'angiogenèse (Nikitenko and Boshoff 2006). Elles peuvent exprimer différents marqueurs comme le CD31 (exprimé par les cellules endothéliales mais aussi certaines cellules hématopoïétiques), le CD34 (exprimé également par les cellules souches mésenchymales et cellules endothéliales progénitrices) ou le CD62E (exprimé par les cellules endothéliales dans un contexte inflammatoire) (Goncharov et al. 2020). Elles peuvent être activées par différents stimuli tels que la thrombine qui leur donne leur propriété de vasoconstriction. C'est cette vasoconstriction qui favorise par la suite l'apparition de caillots sanguins à l'origine de thrombose chez l'Homme. Les cellules endothéliales doivent s'activer dans différents contextes tels que lors de la régulation du tonus vasculaire (régulation du diamètre des vaisseaux), lors de la formation de nouveaux vaisseaux (angiogenèse) mais également lors d'une réponse inflammatoire en exprimant des molécules facilitant l'adhésion de leucocytes à la paroi des vaisseaux. Cependant, une stimulation non contrôlée de ces cellules peut avoir lieu lors de différentes pathologies telles que l'athérosclérose ou l'hypertension. Le dysfonctionnement des cellules endothéliales est notamment connu pour avoir un rôle clé dans les pathologies cardiaques. L'implication des cellules endothéliales dans le cancer et plus particulièrement dans la régulation de l'initiation et la progression tumorale et des métastases est aujourd'hui aussi bien établie. Ces cellules prolifèrent peu en condition physiologique mais leur activation par différents facteurs tels que le VEGF peut stimuler leur prolifération et migration afin de former de nouveaux vaisseaux comme lors de la cicatrisation ou de l'angiogenèse par exemple.

A.1.2. Péricytes

Les vaisseaux sont également formés d'un autre type cellulaire appelé péricyte. Ces cellules sont aussi appelées cellules musculaires lisses vasculaires de par leurs capacités contractiles. La différence entre péricytes et cellules musculaires lisses n'est pas très claire mais les péricytes sont plutôt

présents dans les petits vaisseaux comme les veines et veinules par exemple, alors que les cellules musculaires lisses sont retrouvées dans les vaisseaux plus gros comme les artères où l'on peut voir plusieurs couches cellulaires permettant d'avoir une structure plus solide. Certains chercheurs pensent que les péricytes sont des cellules musculaires lisses alors que d'autres soutiennent l'idée que les péricytes sont des cellules à part mais qui possèdent des caractéristiques de cellules musculaires lisses (Bergers and Song 2005b). Les péricytes ont une morphologie plutôt allongée, un noyau proéminent et peu de cytoplasme. Ils sont séparés des cellules endothéliales par la MB mais peuvent tout de même interagir avec, *via* des interactions directes (par la présence de jonctions communicantes) ou des signaux paracrines (Bergers and Song 2005a). Les péricytes présentent de longs prolongements leur permettant de communiquer avec les cellules endothéliales mais aussi de s'étendre et intégrer des signaux sur toute la longueur vasculaire. De plus, les péricytes expriment différents marqueurs tels que l' α SMA, la myosine, la tropomyosine (qui participent à leur activité contractile), le protéoglycane de chondroïtine sulfate Neuron-glial 2 (NG2) mais aussi le récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR β) (Stallcup 2002; Lindahl et al. 1997).

L'une des principales fonctions des péricytes est la stabilisation des vaisseaux. En effet, lors de la formation des vaisseaux, les cellules endothéliales envoient des signaux comme le PDGF β qui vont permettre de recruter les péricytes aux vaisseaux nouvellement formés (montré dans plusieurs modèles murins délétant PDGF β ou son récepteur dans des contextes physiologiques et tumoraux) (Betsholtz 2004). Ainsi, les péricytes peuvent générer de la vasoconstriction et de la vasodilatation (Hamilton, Attwell, and Hall 2010). Ils peuvent aussi présenter des fonctions de macrophages en ayant des capacités de phagocytose *in vitro* et ils peuvent exprimer le marqueur de macrophages CD11b (Balabanov et al. 1996). Enfin, Franco et ses collaborateurs ont montré que les péricytes peuvent favoriser la survie des cellules endothéliales *in vitro* en induisant l'expression de VEGF-A dans ces dernières par une signalisation autocrine (impliquant la production de vitronectine, par les péricytes, qui induit la production de VEGF-A dans les cellules endothéliales en se liant à l'intégrine α V) (Marcela Franco et al. 2011) et aussi interagir avec les cellules endothéliales afin de produire et d'assembler la MB (Stratman and Davis 2012). En effet, Stratman et ses collaborateurs montrent que lorsque les cellules endothéliales ou les péricytes sont cultivés seuls, ils produisent peu de protéines de la MB telles que le collagène IV ou les laminines mais que leur co-culture stimule fortement leur production et dépôt (par ces deux types cellulaires) (Stratman and Davis 2012).

A.2. Composition acellulaire, la membrane basale

La membrane basale (MB) est une matrice extracellulaire particulière constituant une couche que l'on retrouve entre un épithélium et un tissu conjonctif. Cette MB se compose majoritairement de

collagène IV, de laminines, de nidogène et de protéoglycanes. Au début de sa formation dans l'embryon de souris, la MB se compose de différentes laminines qui polymérisent et forment un réseau qui est ensuite stabilisé par l'interconnexion avec le nidogène et le collagène IV (Nikolova, Strilic, and Lammert 2007). Le collagène IV est connecté aux laminines *via* des protéoglycanes tels que le perlecan (Behrens et al. 2012). Le rôle principal de la MB est de servir de soutien mécanique pour les tissus (puisque les cellules peuvent s'y fixer *via* les intégrines) et de barrière entre différents types cellulaires afin de définir des compartiments (Paulsson 1992). Il est aujourd'hui clair que la MB possède d'autres fonctions et joue notamment un rôle dans différents mécanismes cellulaires tels que la prolifération, la différenciation ou la migration modifiant ainsi le comportement des cellules (Nikolova, Strilic, and Lammert 2007). Dans les vaisseaux, cette MB se trouve autour des cellules endothéliales et est entourée de péricytes (Jeon et al. 1996; Anderson and Hinds 2012; Raza, Franklin, and Dudek 2010). Dans cette partie, je porterai une attention particulière au collagène IV et aux laminines au vu de leur abondance et de leur importance.

A.2.1. Laminines

A.2.1.1. Localisation

Les laminines sont des glycoprotéines faisant partie des constituants majeurs de la MB et elles constituent une grande famille de 18 isoformes. Ces protéines composées de chaînes α , β et γ ne sont déposées dans la MB qu'en trimères. Les isoformes majeurs de laminines présents dans les MB des vaisseaux matures sont les laminines 411 et 511 formées par les chaînes $\alpha 4$ et $\alpha 5$ combinées avec les chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$ (Hallmann et al. 2020). Toutes les laminines ne sont pas retrouvées dans tous les types de vaisseaux et à tout moment du développement. En effet, bien que les laminines 411 et 511 soient présentes dans les MB de presque tous les vaisseaux, il semble que la laminine 511 soit préférentiellement retrouvée dans les artères, et serait exprimée plus tardivement (stade embryonnaire E10) durant le développement contrairement à la laminine 411 qui est exprimée de manière ubiquitaire dans toutes les membranes basales endothéliales dès les premiers stades de la formation des tubes (Di Russo et al. 2017). La laminine 511 est aussi retrouvée dans des vaisseaux tels que les HEV connus pour être spécialisé dans le recrutement des lymphocytes.

A.2.1.2. Fonctions

Les laminines ont plusieurs fonctions dont le fait de servir de support aux cellules. En effet, la laminine 511 a été montrée comme contribuant à la stabilité des tubes formés lors de l'angiogenèse. Son expression coïncide avec le recrutement des cellules périvasculaires (au stade embryonnaire E16 chez la souris) et elle favorise la fonction barrière endothéliale en affectant la perméabilité vasculaire (Hallmann et al. 2020; Sorokin et al. 1997). Les mutations supprimant les laminines (*lama3*, *lamc1*...)

sont généralement létales pour la souris montrant ainsi leur importance (Sugden et al. 2022; Üstün et al. 2019). Les laminines ont un rôle dans la formation, l'architecture et la stabilité des MB en interagissant avec d'autres protéines de la MEC mais peuvent aussi induire des voies de signalisation régulant l'adhésion, la migration et la survie cellulaire en interagissant directement avec différents types cellulaires *via* les intégrines ou indirectement (*via* leur domaine de liaison heparine) en séquestrant des facteurs de croissance (tels que le VEGF et PDGF-BB) ou des cytokines chez la souris (montré dans un modèle murin diabétique dans un contexte de cicatrisation)(Aumailley 2013; Ishihara et al. 2018). Ainsi les laminines jouent un rôle fondamental dans la mise en place des MB mais aussi dans le dialogue de ces MB avec les cellules.

A.2.2. Collagène IV

Contrairement à la plupart des collagènes, le collagène IV qui est un collagène non fibrillaire se retrouve principalement dans les MB dont il est le composant majoritaire. Il forme un réseau complexe, confère à la MB une résistance à la traction des tissus sous-jacents et il permet, tout comme les laminines, la séquestration de différents facteurs de croissance. Le collagène IV est un hétérotrimère qui peut être formé par la combinaison de 6 chaînes α (codées par les gènes COL4A1 à COL4A6) dont l'expression varie selon le temps et la localisation conférant ainsi des propriétés biochimiques uniques. Chaque chaîne possède trois domaines : un domaine N-terminal riche en cystéine et lysine, une répétition de résidus de collagène Gly-Xaa-Yaa et enfin un domaine C-terminal non collagèneux. Les résidus riches en cystéine et lysine permettent la réticulation dépendante de la LOX entre les triples hélices qui, après s'être associées, vont former de grands réseaux permettant d'interagir avec d'autres protéines de la MEC telles que les laminines et protéoglycanes *via* des sites de fixation spécifiques (Khoshnoodi, Pedchenko, and Hudson 2008). Ainsi le collagène IV s'assemble en agrégats supramoléculaires. Un protomère (ou monomère) est un trimère de trois chaînes α avec des domaines N-terminal 7S flanquants et des domaines C-terminal NCI. Après leur sécrétion par la cellule, deux protomères interagissent *via* leurs domaines NCI pour former un dimère. Quatre dimères se lient au niveau des domaines 7S pour former un tétramère. D'autres associations, impliquant des interactions bout à bout et latérales entre les protomères de collagène IV, conduisent à la formation d'une suprastructure de collagène IV (Mak and Mei 2017). Le collagène IV peut interagir avec différents types cellulaires : cellules normales (kératinocytes, cellules endothéliales...) et cellules tumorales (du cancer du sein, du mélanome, du cancer pancréatique...). Ces interactions peuvent se faire *via* les intégrines et d'autres récepteurs. Le collagène IV possède une grande affinité pour l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ mais interagit aussi avec d'autres intégrines ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$) (Khoshnoodi, Pedchenko, and Hudson 2008). Concernant les récepteurs non intégrines pouvant interagir avec le collagène IV, il existe la famille des récepteurs de mannose, la glycoprotéine IV, les

protéoglycanes de sulfate d'héparine à la surface des cellules et les récepteurs à domaine discoïdine (DDR) (Khoshnoodi, Pedchenko, and Hudson 2008). Ces interactions sont impliquées dans différents processus biologiques comme la survie cellulaire, la différenciation, la régénération tissulaire, la cicatrisation (Khoshnoodi, Pedchenko, and Hudson 2008), l'adhésion et la migration des cellules (Boudko et al. 2018).

A.3. Rôle des vaisseaux dans le cancer

Il est aujourd'hui évident que les cellules tumorales utilisent leur microenvironnement pour favoriser leur survie et leur dissémination. Dans ce microenvironnement, elles interagissent notamment avec les vaisseaux pour développer leur propre vascularisation. Tout d'abord, les vaisseaux contribuent à l'initiation tumorale en favorisant une réponse inflammatoire prolongée (augmentation de leur perméabilité et de l'extravasation de cellules immunitaires) pouvant participer à l'apparition de mutations dans les cellules (*via* la production de ROS par les cellules immunitaires notamment) (Roda, Blandano, and Pelicci 2021). Une fois la tumeur installée, elle va envoyer des signaux aux vaisseaux afin de favoriser l'angiogenèse. L'angiogenèse est un processus en plusieurs étapes : 1/ un vaisseau préexistant va recevoir un signal et notamment le VEGF qui va permettre à une cellule endothéliale spéciale appelée cellule apicale (tip cell) de dégrader la MB vasculaire, 2/ cette cellule apicale va ensuite guider d'autres cellules endothéliales, appelées cellules de la tige (stalk cells), qui vont migrer et proliférer afin d'allonger et d'agrandir le réseau vasculaire, 3/ les cellules endothéliales vont par la suite former un tube avec un lumen, 4/ elles vont cesser de migrer et de proliférer, 5/ la MB va se reconstituer, et enfin 6/ des cellules périvasculaires (péricytes) vont être recrutées pour assurer la stabilité des vaisseaux (Senger and Davis 2011). Sans ce processus, la plupart des tumeurs solides demeureraient dormantes, c'est pourquoi différentes interactions ont lieu entre les cellules tumorales et les cellules vasculaires afin de favoriser l'angiogenèse. Ce processus donne naissance à des vaisseaux tumoraux différents des vaisseaux normaux retrouvés en conditions physiologiques. En effet, alors que dans un tissu normal les vaisseaux ont une structure bien organisée, les vaisseaux tumoraux présentent une désorganisation structurelle avec notamment des monocouches irrégulières de cellules endothéliales qui ont perdu leur fonction de barrière (montré dans un modèle murin de cancer du sein MCa-IV)(Hashizume et al. 2000), une épaisseur de MB non uniforme (jusqu'à être absente) et une dissociation entre les péricytes et les cellules endothéliales (Figure 6). Tous ces éléments résultent, *in fine*, en une perméabilité anormale des vaisseaux et une augmentation de la pression de fluide interstitiel (causée par l'accumulation d'acide hyaluronique favorisant le collapsus des vaisseaux) (Araujo and McElwain 2004). Ce collapsus des vaisseaux empêche l'entrée des thérapies dans la tumeur mais aussi des cellules immunitaires, c'est pourquoi il est important de « normaliser » les vaisseaux tumoraux.

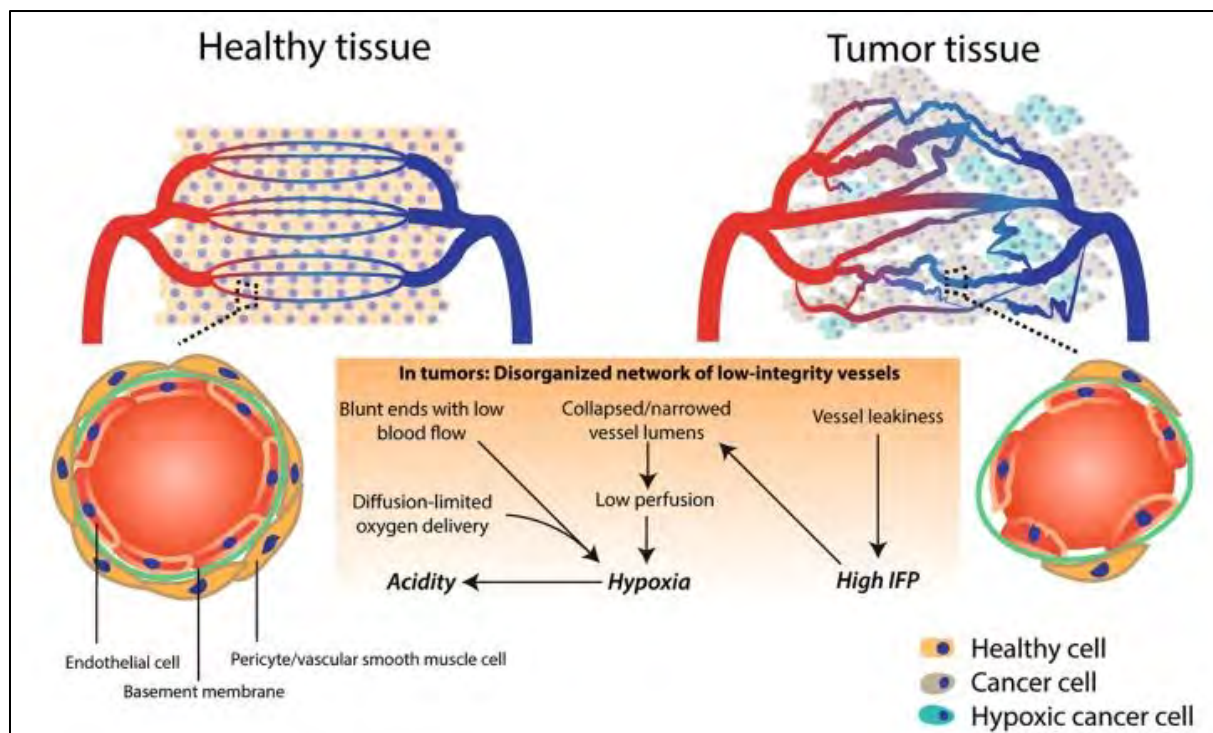


Figure 6 : Vaisseaux sains versus tumoraux (Schaaf, Garg, and Agostinis 2018)

A.3.1. Cellules endothéliales de la tumeur

Les cellules endothéliales de la tumeur (CET) sont des acteurs clés de l'angiogenèse. Contrairement aux cellules endothéliales normales (CEN) qui forment habituellement une couche continue dans les vaisseaux, les CET sont de taille et de morphologie différentes formant ainsi des couches irrégulières. Les CET humaines sécrètent plus de facteurs proangiogéniques que les CEN, tels que VEGF-A, VEGF-D, l'angiopoïétine 1 et expriment également plus de récepteurs tels que VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 et TIE-2 (Bussolati et al. 2003). De plus, les CET humaines surexpriment plusieurs molécules d'adhésion comme ICAM-1, VCAM-1 et la E-sélectine qui leur permettent non seulement d'interagir avec les cellules tumorales mais aussi avec les cellules immunitaires pro inflammatoires (Alessandri et al. 1999). La surexpression de ces molécules d'adhésion permet un meilleur attachement des cellules tumorales aux CET afin de faciliter leur extravasation (les cellules passent de des vaisseaux sanguins aux tissus environnants) et donc leur dissémination. Concernant leurs fonctions, les CET (issues de modèles murins de xénogreffes de tumeurs humaines) prolifèrent et migrent plus que les CEN (issues du tissu dermique murin)(Matsuda et al. 2010). Une étude menée par Cantelmo et ses collaborateurs montre, *in vivo* (modèle murin avec injection de cellules de mélanome dans la veine portale pour obtenir des tumeurs dans le foie) et *ex vivo*, que les CET présentent aussi un métabolisme altéré avec notamment une glycolyse non contrôlée due à une surexpression de certains gènes glycolytiques aboutissant à la structure anormale des vaisseaux tumoraux (Cantelmo

et al. 2016). Toutes ces caractéristiques permettent aux CET de favoriser la croissance et les métastases tumorales. Elles ont été démontrées comme ayant des dysfonctions chromosomiques notamment dues à l'hypoxie généralement retrouvée dans les cancer solides (cancer du sein, glioblastome...) (Hida et al. 2022). Ce même environnement hypoxique conduit à l'expression par les CET de certains gènes caractéristiques de cellules souches comme l'aldéhyde déshydrogenase (ALDH), dont l'ARNm est augmenté dans les CET par rapport aux CEN que ce soit chez la souris ou l'Homme, et qui peuvent leur conférer des propriétés de chimiorésistance *in vitro* et *in vivo* (modèle murin de greffe sous-cutanée de cellules de mélanome). Cette chimiorésistance est aussi due à l'hétérogénéité des CET et à la surexpression de gènes impliqués dans l'efflux des drogues tels que MDR-1 (Hida et al. 2017). Les CET contribuent à la progression tumorale *via* différents mécanismes passant presque tous par la suractivation de la voie du VEGF. En effet, le VEGF favorise par exemple la perte de jonctions adhérentes entre cellules endothéliales (dépendante de l'activation de FAK) augmentant ainsi la perméabilité vasculaire de façon anormale *in vivo* (X. L. Chen et al. 2012). D'autre part, les CET elles-mêmes sécrètent des facteurs angiocrines stimulant la croissance et la dissémination tumorale (Butler, Kobayashi, and Rafii 2010). En effet, lorsque les CET produisent de l'endothéline, du TGF β et d'autres facteurs (IL-6, IL-3, G-CSF, GM-CSF, l'IL-1), elles favorisent la croissance des cellules tumorales de la prostate *in vitro* (Pirtskhalaishvili and Nelson 2000). De plus, la surexpression de certaines protéines de la MEC par les CET comme le biglycan peut promouvoir les métastases. En effet, ce dernier, sécrété par les CET a été montré comme pouvant activer *in vitro* la migration des cellules tumorales de mélanome *via* la voie NF- κ B et *in vivo* (dans un modèle murin greffé en sous-cutané avec des cellules de mélanomes et des cellules endothéliales) favorisant l'apparition de métastases (Maishi et al. 2016). Ainsi, ces études montrent bien que les cellules endothéliales peuvent jouer un rôle pro-tumoral important en favorisant la croissance tumorale et l'apparition de métastases. Enfin, les cellules endothéliales interagissent avec d'autres cellules stromales telles que les CAFs, je détaillerai donc cette interaction dans la partie A.4.1« Dialogue CAFs – cellules endothéliales ».

A.3.2. Péricytes

Comme décrit précédemment, les péricytes permettent la stabilisation des vaisseaux mais participent également à la régulation de leur perméabilité et à la mise en place de l'angiogenèse. Durant l'angiogenèse, les péricytes sont recrutés par les cellules endothéliales *via* une sécrétion accrue de PDGF β puis ils sécrètent des facteurs angiogéniques tels que le VEGF-A et Ang-1 pour stabiliser les vaisseaux et réguler leur maturation (Armulik, Abramsson, and Betsholtz 2005). Cependant, durant l'angiogenèse tumorale, les CET sécrètent en plus l'Ang-2 qui va entrer en compétition avec Ang-1 et induire la destruction de l'interaction des CET et des péricytes en activant

les intégrines présentent sur les péricytes facilitant ainsi leur détachement des vaisseaux *in vivo* (modèle murin PDCD10-KO)(Saharinen, Eklund, and Alitalo 2017). Les interactions CET-péricytes étant altérées dans ce contexte, elles favorisent ainsi la formation de vaisseaux défectueux et l'hypoxie. Les péricytes peuvent également promouvoir la progression tumorale en interagissant avec les cellules tumorales par l'intermédiaire de facteurs solubles. Ils favorisent notamment la croissance et la survie des cellules tumorales *via* la sécrétion paracrine de différents facteurs tels que CCL2, CXCL1 et TIMP1 (montré *ex vivo* en utilisant des péricytes issus de souris) (P.-P. Wong et al. 2020). Les péricytes n'interagissent pas seulement avec les CET et les cellules tumorales, mais aussi avec les cellules immunitaires afin de favoriser un environnement immunosuppresseur. En effet, les péricytes humains et murins expriment des molécules d'adhésion telles que VCAM-1 et ICAM-1 permettant l'adhésion de cellules immunitaires dans les vaisseaux mais peuvent aussi sécréter des chimiokines en réponse à des signaux pro-inflammatoires (Guijarro-Muñoz et al. 2014). Ils sécrètent par exemple le CCL2, CXCL1 et CXCL8 leur permettant de dialoguer avec les neutrophiles et monocytes (Navarro et al. 2016). Ils sécrètent également l'IL-33 induisant un recrutement de macrophages associés à la tumeur (TAM) pour favoriser les métastases (par la production de MMPs par exemple) dans des modèles murins de xénogreffes sous-cutanées de fibrosarcome et de cancer pancréatique (Y. Yang et al. 2016), mais aussi l'IL-6 induisant le recrutement de cellules myéloïdes suppressives (MDSC) facilitant la croissance tumorale dans des souris transgéniques greffées en sous-cutané avec des cellules de mélanome et de cancer du poumon(J. Hong et al. 2015). De plus, la sécrétion de TGFβ par les péricytes induit un recrutement massif de lymphocytes T régulateurs (Treg) empêchant ainsi l'activité cytotoxique des lymphocytes T cytotoxiques (LTC) *in vitro* (Navarro et al. 2016). Enfin, les péricytes peuvent être à l'origine ou se différencier en CAFs connus pour favoriser la progression tumorale et les métastases (Hosaka et al. 2016a). Je détaillerai ce point dans la partie A.4.2« Dialogue CAFs – péricytes ».

A.3.3. La membrane basale

Comme évoqué précédemment, la MB sert de support mécanique pour les cellules et permet ainsi aux vaisseaux d'avoir une structure stable. Dans le cancer, cette MB est dégradée par les MMPs produites par les cellules tumorales et stromales. Cette dégradation de la MB est nécessaire pour l'intravasation des cellules tumorales dans les vaisseaux et leur extravasation dans les organes métastatiques (Lambert, Pattabiraman, and Weinberg 2017). L'intégrité de la MB est un marqueur de bon pronostic pour différents cancers tels que le cancer du sein, le cancer colorectal ou encore le cancer de la prostate mais certains de ses composants favorisent la croissance tumorale (Chang and Chaudhuri 2019). En effet, lorsque les cellules tumorales sont attachées à une MB, dont notamment les laminines, elles prolifèrent plus (montré *in vitro* avec des cellules tumorales de colon)(Jun et al.

1994). De plus, les laminines ont des propriétés haptotaxiques (migration cellulaire induite par des matrices extracellulaires) favorisant la migration des cellules tumorales de mélanome *in vitro* (Aznavorian et al. 1990; Givant-Horwitz, Davidson, and Reich 2005). Les laminines favorisent également l'invasion de cellules métastatiques de fibrosarcome humain (cellules HT1080) en activant l'expression de MMPs par les cellules tumorales (Reich, Blumenthal, and Liscovitch 1995). Tous ces événements pro-tumoraux dépendant de l'interaction des laminines avec les cellules tumorales passent par l'activation des voies de signalisation impliquant les protéines G, les MAPK, FAK et d'autres (Givant-Horwitz, Davidson, and Reich 2005).

Le collagène IV étant majoritaire dans les MB, son rôle a aussi été étudié. Dans différents cancers tels que le cancer du sein, le collagène IV a été montré comme étant de mauvais pronostic chez le patient notamment par sa capacité à promouvoir les métastases (Jansson et al. 2022). Dans le cancer du pancréas, son accumulation dans la tumeur est également associée à un mauvais pronostic, avec une survie médiane réduite chez les patients présentant des niveaux élevés (6,4 mois) par rapport à ceux ayant des niveaux faibles (16,9 mois) (Whatcott et al. 2015). Cependant, de manière intéressante, la localisation du collagène IV peut déterminer son rôle pro ou anti-tumoral. En effet, alors qu'il favorise la croissance et la migration de cellules tumorales pancréatiques *in vitro* lorsqu'il se trouve dans la matrice interstitielle, il joue plutôt un rôle anti-tumoral lorsqu'il se trouve dans les MB (Daniel Öhlund et al. 2013a; Baba et al. 2008). Il est d'ailleurs perdu dans les MB, dont celles entourant les vaisseaux, durant la progression tumorale afin de faciliter l'invasion des cellules cancéreuses. En effet, cette protéine matricielle est dégradée par des MMPs telles que les MMP-2 et MMP-9, chez l'Homme et la souris, dans les cancers solides tels que le cancer colorectal et pancréatique (Zeng, Cohen, and Guillem 1999; Barrett et al. 2018; Kalluri 2003).

A.4. Dialogue des cellules vasculaires avec les CAFs

Les CAFs représentent une grande partie des cellules du microenvironnement tumoral et interagissent avec différentes cellules stromales incluant les cellules vasculaires.

A.4.1. Dialogue CAFs – cellules endothéliales

Alors que le dialogue entre les cellules tumorales et endothéliales a été bien étudié, peu de choses sont connues sur le dialogue des cellules endothéliales avec les CAFs. Cependant plusieurs corrélations ont été montrées entre la production de certaines protéines (solubles et matricielles) par les CAFs et un effet sur les cellules endothéliales.

C'est le cas de facteurs pro-angiogéniques tels que SDF-1 (qui favorise le recrutement de cellules endothéliales), TGFβ (qui promeut l'angiogenèse en induisant l'expression de VEGF par les cellules

tumorales), FGF et HGF (tous deux favorisant l'angiogenèse) (F.-T. Wang et al. 2019). Les CAFs peuvent aussi induire ce que l'on appelle le mimétisme vasculaire (vascular mimicry) sur les cellules tumorales de carcinome hépatocellulaire *via* la sécrétion de TGF β et SDF-1 *in vitro*. Ce processus permet aux cellules tumorales de mimer des cellules endothéliales pour former des structures similaires aux vaisseaux (Jine Yang et al. 2016).

En plus de réguler certaines fonctions endothéliales *via* la sécrétion de facteurs solubles, les CAFs interagissent aussi indirectement avec les cellules endothéliales *via* leur production de matrice. Par exemple, Leung et ses collaborateurs montrent que les CAFs induisent, *via* la protéine 5 associée aux microfibrillaires (MFAP5) qui est une glycoprotéine, une surexpression du gène LPP (Lipoma-preferred partner) dans les cellules endothéliales *in vitro* favorisant ainsi leur motilité et perméabilité. Cette surexpression a été confirmée dans des tissus de patientes atteintes de cancer ovarien. De plus, le LPP dans les cellules endothéliales corrèle avec une diminution de survie de ces patientes et une chimiorésistance importante (Leung et al. 2018).

En produisant de la fibronectine qui, par la suite induit une séquestration plus importante de VEGF dans la matrice, les CAFs stimuleraient également la prolifération des cellules endothéliales et donc la formation de vaisseaux et faciliteraient ainsi la croissance tumorale dans des modèles murins greffés avec des cellules tumorales mammaires ou de la prostate (von Au et al. 2013). Une autre protéine matricielle produite par les CAFs et régulant certaines fonctions des cellules endothéliales est la tenascine-C. Cette protéine aux propriétés à la fois pro et anti angiogéniques réduit notamment la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales mais aussi la tubulogenèse *in vitro*. Par contact direct avec les cellules endothéliales *in vitro*, elle altère la polymérisation de l'actine qui induit une rétention de YAP dans le cytoplasme qui n'est donc plus actif provoquant ainsi une diminution de facteurs pro-angiogéniques (Rupp et al. 2016). En parallèle de cet effet anti angiogénique, les cellules tumorales et les fibroblastes exposés à la tenascine-C vont sécréter différents facteurs pro angiogéniques afin de re-stimuler la prolifération et la survie des cellules endothéliales *in vitro* (Rupp et al. 2016). La rigidité de la MEC est aussi un élément clé de régulation des fonctions endothéliales. En effet, cette rigidité connue pour être modifiée par les CAFs va en plus de favoriser la croissance tumorale et les métastases, impacter l'endothélium. Elle peut notamment réguler CCN1 (Cellular Communication Network Factor 1) dans les cellules endothéliales qui peut activer en cascade la translocation nucléaire de la β -caténine conduisant ainsi à une surexpression de N-cadhérine à la surface des vaisseaux *in vitro*. Or, la N-cadhérine est connue pour permettre l'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules tumorales afin de faciliter l'adhésion de ces dernières à la paroi vasculaire pour former des métastases *in vivo* dans des souris greffées avec des cellules de mélanome (Reid et al. 2017). Enfin, par leur sécrétion de MMPs qui

dégradent la MB favorisant l'intravasation des cellules tumorales et donc l'apparition de métastases, les CAFs mettent en place des conditions favorables à l'angiogenèse (F.-T. Wang et al. 2019).

De manière inverse, il est envisageable que les cellules endothéliales puissent influencer le comportement des CAFs puisque dans une étude menée par Sanchez et ses collaborateurs, ne traitant pas du cancer mais de stress inflammatoire, les auteurs montrent que les cellules endothéliales sécrètent différents facteurs tels que CCL2, IL-6, IL-8 résultant en une production altérée de matrice par les fibroblastes dans un modèle de peau en 3D (Sanchez et al. 2019). Il est également documenté que les cellules endothéliales peuvent s'activer en CAFs en subissant une transition mésenchymale, *in vitro* et *in vivo* dans des souris greffées en sous-cutané avec des cellules tumorales de mélanome, suggérant donc que des thérapies anti-angiogéniques réduiraient par la même occasion le nombre de CAFs dans la tumeur (Zeisberg et al. 2007). Cette activation des cellules endothéliales en CAFs serait, selon Kim et ses collaborateurs, dépendante de la sécrétion d'exosomes par les cellules tumorales ; la résultante en serait un remodelage de la matrice par les CAFs facilitant *in fine* la migration des cellules tumorales (montré *in vitro*) (K. Kim et al. 2020).

A.4.2. Dialogue CAFs – péricytes

Les CAFs interagissent également avec les péricytes. Dans une étude menée par Zonneville et ses collaborateurs, sur le cancer du sein, la sécrétion de TGF β et de fibronectine par les CAFs favorise le recouvrement des vaisseaux par les péricytes dans un modèle murin de xénogreffe de cellules tumorales mammaires. Quant à l'inactivation de la voie du TGF β , elle réduit considérablement le nombre de vaisseaux présents dans ce modèle montrant ainsi l'importance de cette voie, et des cellules qui l'expriment, dans la vascularisation tumorale (Zonneville et al. 2018). Le TNF α est un autre facteur sécrété par les CAFs et impliqué dans le rôle angiogénique. Cette cytokine pro inflammatoire permet aux péricytes d'induire la signalisation Notch dans les cellules endothéliales afin de réguler les cellules apicales et cellules de la tige (« Tip cell » et « Stalk cell »), impliquées dans l'angiogenèse *in vitro* dans un modèle artificiel de vaisseaux (T.-Y. Kang et al. 2019; Louault, Li, and DeClerck 2020). Tout comme pour les cellules endothéliales, les CAFs peuvent également interagir avec les péricytes *via* la production et le remodelage de la MEC. Par exemple, la protéine SPARC connue pour être produite par les CAFs (Alcaraz et al. 2023) a été montrée comme facilitant la migration des péricytes *in vitro* en empêchant l'interaction de l'endogline avec l'intégrine αV bloquant ainsi l'activité du TGF β 1 (qui inhibe initialement la migration des péricytes) (Rivera and Brekken 2011). De plus, une étude d'Hosaka et ses collaborateurs a montré que les péricytes pouvaient se différencier en CAFs et ainsi participer à l'invasion tumorale et aux métastases. En effet, après induction par le PDGF-BB de la transition péricyte-fibroblaste, les péricytes acquièrent des

caractéristiques mésenchymales *in vitro* et *in vivo* (modèle murin transgénique greffé avec des cellules de fibrosarcome) et facilitent l'invasion tumorale et les métastases (en facilitant l'angiogenèse et l'intravasation des cellules tumorales dans les vaisseaux) (Hosaka et al. 2016). De plus, l'expression d' α SMA (un des marqueurs des CAFs) par les péricytes en réponse à des exosomes sécrétés par des cellules tumorales pancréatiques corrèle avec une altération des structures et fonctions vasculaires *in vivo* dans modèle murin KPC développant spontanément un cancer pancréatique. Cette altération est notamment due aux propriétés biomécaniques dépendant de la surexpression d' α SMA des péricytes qui favorise la mise en place d'une perméabilité vasculaire élevée et d'une hypoxie intra tumorale importante (Natarajan et al. 2022). Cette acquisition d'expression de marqueurs de CAFs (FAP, FSP et α SMA) par les péricytes en réponse à une stimulation provenant d'exosomes tumoraux a également été rapportée dans le cancer gastrique. Cette transition péricytes-CAF serait dépendante des voies de signalisation PI3K/AKT et MEK/ERK et résulterait en une stimulation de leur prolifération et de leur migration *in vitro* (Ning et al. 2018). La transition péricytes-CAF peut également être induite par les modifications de la MEC et plus spécifiquement par l'augmentation de sa rigidité activant la voie de signalisation YAP. Ce facteur de transcription a été montré comme pouvant être transloqué au noyau, *in vitro*, lorsque la cellule reçoit un signal mécanique et devient ainsi actif dans l'induction de l'expression de certaines protéines comme FSP1 par exemple, connue pour être exprimée dans les fibroblastes (Feng et al. 2021). Enfin, il est intéressant de noter que les péricytes ayant effectué une transition vers le phénotype CAF, notamment ceux exprimant fortement l' α SMA, pourraient jouer un rôle immunomodulateur *via* notamment l'expression de certaines molécules immunorégulatrices telles que CD80, CD86, HLA-DRA et CD274 (en réponse à des exosomes sécrétés par les cellules tumorales pancréatiques *in vitro* (Natarajan et al. 2022). Pour conclure, les dialogues entre les CAFs et les cellules vasculaires semblent avoir une part importante dans la mise en place d'une angiogenèse favorable à la progression tumorale et à leurs capacités à envahir d'autres organes.

A.5. Ciblage des vaisseaux dans le cancer

En se basant sur ce qui a été évoqué sur le rôle des vaisseaux dans les cancers solides et notamment leur altération structurelle et fonctionnelle facilitant d'une part la progression tumorale et empêchant d'autre part l'accès des drogues et des cellules immunitaires anti-tumorales à l'intérieur de la tumeur, les cibler a été une stratégie thérapeutique très étudiée depuis des décennies. Pour cela, des thérapies anti-angiogéniques visant à bloquer la néo angiogenèse tumorale ont vu le jour. La plupart des thérapies développées ciblent le VEGFA puisqu'il représente l'acteur majeur favorisant l'angiogenèse tumorale. En se fixant à ses récepteurs (VEGFR-1 et VEGFR-2), le VEGFA régule l'angiogenèse mais aussi la perméabilité vasculaire et la migration des cellules endothéliales. Ainsi,

plusieurs drogues bloquant l'action du VEGF ont été développées comme les anticorps neutralisants le VEGF ou ses récepteurs VEGFRs, des hybrides solubles du VEGFR ou même des inhibiteurs de la tyrosine kinase des VEGFRs. De manière générale, les thérapies anti-VEGF (en monothérapie ou bithérapie ciblant l'angiogenèse et principalement la destruction des vaisseaux) ont très peu amélioré la survie des patients atteints de cancers solides même si elles ont montré un effet bénéfique dans des études précliniques (Ferrara 2005). Dans les modèles murins de cancer (neuroblastome, cancer du sein, cancer colorectal), les anti-VEGF semblent inhiber spécifiquement l'angiogenèse tumorale sans effets évidents sur les vaisseaux normaux. En conséquence, ces inhibiteurs ont produit des effets anti tumoraux puissants chez les souris (Cao 2004). Enthousiasmés par ces études précliniques, plusieurs inhibiteurs de l'angiogenèse ont été développés et évalués pour leurs effets anticancéreux chez les patients (atteints de cancer du sein, du colon...). Cependant, plusieurs observations préliminaires ont montré des résultats décevants (Cao 2004). En effet, il a été démontré que la destruction vasculaire induit l'hypoxie au sein de la tumeur, qui elle-même est responsable d'une instabilité génétique et favorise la sélection de cellules tumorales avec un potentiel métastatique accru. L'hypoxie peut également compromettre les fonctions cytotoxiques des cellules immunitaires qui infiltrent la tumeur empêchant ainsi sa régression (Rakesh K. Jain 2005). De plus, dans la plupart des cancers, des résistances importantes à ces stratégies thérapeutiques, lorsqu'utilisées en monothérapie, ont été rapportées (Lopes-Coelho et al. 2021). Ces résistances sont dues notamment à l'implication d'autres facteurs pro angiogéniques mais aussi au phénomène de mimétisme vasculaire (vascular mimicry) par les cellules tumorales (Casanovas et al. 2005; Angara, Borin, and Arbab 2017). Afin de contrer ces mécanismes de résistances, des thérapies ciblant le VEGF ont été combinées à des thérapies ciblant d'autres voies angiogéniques comme le FGF par exemple permettant ainsi un meilleur effet anti-tumoral dans des études précliniques (André et al. 2013). Des thérapies visant à cibler l'angiopoietine 2 (ANG2), connue pour jouer un rôle clé dans la résistance aux thérapies anti-VEGF, ont aussi été testées. Le blocage d'ANG2 et du VEGF a ainsi montré *in vivo* (modèle de greffe orthotopique syngénique de cellules de glioblastome) une diminution de la croissance tumorale et une augmentation de la survie des souris atteintes de glioblastome (Kloepper et al. 2016). D'autres combinaisons ont été développées ciblant en parallèle le VEGF et le PDGF (qui induit une réduction de la survie et migration des cellules endothéliales *in vitro*) ou le HGF (qui n'a malheureusement pas apporté de réel bénéfice aux patients) ou même PIGF (qui semble être efficace dans des modèles *in vivo*) (Kong et al. 2017).

Afin d'éviter les résistances et les effets pro-tumoraux liés à la destruction des vaisseaux, le Dr R Jain a été le premier à proposer d'essayer de rendre les vaisseaux plus normaux, de les « normaliser ». La normalisation des vaisseaux est caractérisée par une réduction des fuites vasculaires, des vaisseaux

moins dilatés et moins tortueux, une MB plus stable, un bon recouvrement péricytaire et donc une meilleure perfusion de la tumeur (Rakesh K. Jain 2005). Dans cette optique, les doses antiangiogéniques ont été réduites : dans des modèles murins de greffe de cellules tumorales mammaires ou de mélanome, les anti-VEGF à dose faible ont des effets bénéfiques en améliorant la distribution des vaisseaux fonctionnels mais aussi en reprogrammant un microenvironnement immunosuppresseur favorisant ainsi l'effet des immunothérapies (Y. Huang et al. 2012; Shrimali et al. 2010). En effet, le VEGF possède aussi des propriétés immunosuppressives en inhibant la maturation et la fonction des cellules dendritiques (M. Yi et al. 2019). C'est pourquoi plusieurs études ont combiné des anti-VEGF et des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire tels que les anti-PD1, anti-PDL1 et anti-CTLA4. Plusieurs combinaisons sont en essais cliniques dans différents cancers solides tels que le mélanome ou l'hépatocarcinome (NCT04356729, NCT05199285) et certaines ont montré une efficacité importante *in vivo*. C'est par exemple le cas de l'axitinib en combinaison avec un anti-CTLA4 qui a montré une meilleure infiltration de lymphocytes T effecteurs et de cellules présentatrices d'antigènes réduisant ainsi la croissance tumorale du mélanome (dans un modèle murin de mélanome métastasant au cerveau) (Lopes-Coelho et al. 2021). D'autres thérapies visant à normaliser les vaisseaux ont vu le jour. C'est le cas du ciblage de Rgs5 (Regulator Of G Protein Signaling 5) qui est un gène responsable de la morphologie anormale des vaisseaux. La délétion génétique de ce gène dans la souris induit une normalisation des vaisseaux et est associée à une meilleure maturation des péricytes. Cette normalisation a permis par la suite une meilleure infiltration de cellules immunitaires comme les cellules T CD8 permettant la régression tumorale dans des modèles murins de xénogreffe sous-cutanée de cellules de fibrosarcome et de carcinogénèse des îlots pancréatiques (Hamzah et al. 2008). La normalisation des vaisseaux passe aussi par l'induction de certains marqueurs de contractilité dans les péricytes. Le groupe de Ganss a en effet normalisé les vaisseaux *via* LIGHT (glycoprotéine transmembranaire de la superfamille du TNF), homologue de la lymphotoxine et co-stimulateur immunitaire, qui a permis la différenciation des péricytes avec l'acquisition d'un phénotype contractile. Grâce à ces caractéristiques, la perfusion tumorale dans le cancer pancréatique neuroendocrine et la pénétration de cellules effectrices anti-tumorales ont été améliorées chez la souris RiP1-Tag5 (développant spontanément un carcinome des îlots pancréatiques) (Johansson-Percival et al. 2015). Pour conclure, les thérapies visant à normaliser la vascularisation tumorale plutôt que la détruire marquent un tournant dans le ciblage des vaisseaux et semblent être très prometteuses.

B. High endothelial venules (HEV)

B.1. Composition et rôle physiologique

Les HEV sont des vaisseaux spécialisés dans le trafic des lymphocytes et sont généralement retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques mais aussi dans les organes lymphoïdes tertiaires présents dans les tumeurs. Les HEV forment un réseau post-capillaire de veinules intégré aux vaisseaux normaux des organes lymphoïdes secondaires à l'exception de la rate. Ce réseau est très organisé et contrôle principalement l'entrée des lymphocytes. Tout comme les vaisseaux sanguins normaux, les HEV possèdent des cellules endothéliales, une MB et des cellules péri vasculaires. Cependant, les cellules composant les HEV ont des particularités, comparées à celles des vaisseaux sanguins « classiques ». En effet, les cellules endothéliales des HEV ont une morphologie cubique contrairement aux autres vaisseaux dans lesquels elles ont plutôt une forme plate, et sont entourées d'une MB bien plus épaisse. Enfin, les HEV sont composés, à l'extérieur du lumen, de cellules péri vasculaires dont les péricytes et des cellules similaires aux péricytes appelées cellules réticulaires fibroblastiques (CRF). Tout comme dans les autres vaisseaux, ces cellules constituent une gaine péri vasculaire entourant la MB (Ager and May 2015). Les cellules endothéliales des HEV expriment à leur surface la protéine PNAd (peripheral node addressin) appelée également MECA-79 (Mouse Endothelial Cell Antigen-79). Ils ont pour rôle d'apporter de l'oxygène et des nutriments aux organes lymphoïdes secondaires mais surtout de réguler leur développement en recrutant des cellules hématopoïétiques permettant d'initier l'organogenèse lymphoïde. Chez l'adulte, les HEV permettent un recrutement efficace de lymphocytes en conditions physiologiques normales (Ager 2017). On estime que 5 millions de lymphocytes migrent dans le corps humain à travers les HEV chaque seconde (Girard and Springer 1995). Les mécanismes moléculaires contribuant à la circulation des lymphocytes et à leur extravasation sont aujourd'hui bien établis. Les lymphocytes interagissent tout d'abord avec les cellules endothéliales des HEV grâce à la L-selectine (ou CD62L) qui est présente à leur surface et qui peut reconnaître certaines glycoprotéines, appelées sialomucines, présentes sur les cellules endothéliales des HEV. Parmi ces sialomucines on retrouve notamment le CD34, la podocalyxine, l'endomucine et la nepmucine. La forte expression de ces sialomucines est une caractéristique des cellules endothéliales des HEV et permet leur reconnaissance *via* des anticorps tels que le MECA-79 (qui reconnaît un oligosaccharide sulfaté porté par les sialomucines) (Blanchard and Girard 2021). Ces interactions cellules endothéliales des HEV - lymphocytes vont permettre l'entrée des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques. Dans des conditions physiologiques, les HEV recrutent principalement des lymphocytes naïfs. Ces lymphocytes vont dans un premier temps s'attacher aux HEV *via* la L-selectine ce qui va leur permettre de ralentir et d'interagir avec des chimiokines présentes dans les HEV. Parmi ces chimiokines, produites soit

par les cellules endothéliales de HEV soit par les CRF, on retrouve CCL19, CCL21 et CXCL13 qui vont interagir avec les lymphocytes *via* leurs récepteurs et ainsi arrêter leur migration afin de trouver des sites d'extravasation. Les lymphocytes traversent alors la barrière endothéliale *via* une migration paracellulaire (entre deux cellules endothéliales) ou transcellulaire (à travers le cytoplasme des cellules endothéliales) (Schoefl 1972). Les HEV ont une plasticité remarquable et dépendent beaucoup de leur microenvironnement. En effet, il a été montré que des cellules endothéliales de HEV humaines perdent leur phénotype de HEV une fois cultivées *ex vivo*. De plus, le maintien du phénotype HEV dépend aussi de la présence de certains types cellulaires comme les cellules dendritiques par exemple. Leur déplétion dans des souris adultes par la toxine diphtérique induit une dédifférentiation des HEV avec notamment une réduction d'expression de MECA-79 et une surexpression de MAdCAM-1 qui est un marqueur d'immaturité des HEV (Mebius et al. 1996; Moussion and Girard 2011). Certaines voies de signalisation (TNF, NFkB,LTβR) sont aussi importantes pour le maintien de la fonction des HEV et notamment pour la migration des lymphocytes. C'est le cas de la voie de signalisation impliquant le récepteur à la lymphotoxine-β (LTβR) dont la délétion *in vivo*, par injection de protéine de fusion LTβR-Ig, induit une répression de gènes spécifiques des HEV (Glycam1, Ccl21a,Fut7, Chst2, Chst4, Gcnt1, B3gnt3) (Veerman et al. 2019). Cette voie est notamment régulée par la production de lymphotoxine par les cellules dendritiques d'où l'importance de ces cellules dans le maintien des HEV (Veerman et al. 2019).

B.2. Rôle des HEV dans le cancer

La migration des lymphocytes vers la tumeur est une étape cruciale dans la réponse immunitaire anti-tumorale, car elle permet aux lymphocytes activés en périphérie d'éliminer les cellules cancéreuses.

En physiologie, les HEV sont présents exclusivement dans les ganglions lymphatiques et les autres organes lymphoïdes secondaires. Cependant, dans le cancer, on peut retrouver ces HEV (identifiés par marquage MECA-79) dans les tissus non lymphoïdes, mais aussi dans les structures lymphoïdes tertiaires (TLS) observées dans certaines tumeurs solides (sein, poumon) chez l'Homme et la souris, bien que les HEV soient plus fréquents que les TLS (Sautès-Fridman et al. 2019). Le groupe du Dr Girard a montré que la présence de HEV dans les tumeurs est associée à une meilleure infiltration de lymphocytes dans la tumeur et à des résultats cliniques positifs (meilleure survie globale, survie sans progression et sans métastases) chez les patients atteints de cancer du sein (Martinet et al. 2011). En 2022, il a été démontré par cette même équipe que les HEV présents dans les tumeurs sont les principales portes d'entrée des lymphocytes lors de l'immunité anti-tumorale spontanée et de l'immunothérapie anti-cancéreuse. En effet, alors que les vaisseaux sanguins tumoraux favorisent la

croissance tumorale et empêchent l'entrée des cellules immunitaires dans la tumeur, les HEV semblent avoir un impact positif sur la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans le cancer du sein, une augmentation de la densité des HEV dans les tumeurs est corrélée à une augmentation de la densité intra-tumorale de lymphocytes T et B et est associée à une meilleure survie des patients (Martinet et al. 2011). La combinaison d'un nombre élevé de HEV avec un nombre important de lymphocytes T CD8 est corrélée à une meilleure survie des patients atteints de cancer gastrique (S. A. Hong et al. 2020). De manière intéressante, la simple présence d'une tumeur en périphérie du ganglion lymphatique dans un modèle murin de mélanome (greffe sous-cutanée de cellules de mélanome) est suffisante pour induire la régulation négative de CCL21, diminuant ainsi l'attachement des lymphocytes à l'endothélium des HEV et empêchant leur arrivée dans la tumeur (Carrière et al. 2005). La tumeur peut donc reprogrammer les HEV et c'est d'ailleurs la raison pour laquelle des changements morphologiques et phénotypiques des HEV sont observés durant la progression tumorale avec notamment une dilatation de ces vaisseaux, un amincissement des cellules endothéliales qui deviennent plus plates et moins cubiques, et une expression discontinue du MECA-79 (Bekkhuss et al. 2021). Ils sont également différents des HEV ganglionnaires par les protéines qu'ils expriment à leur surface. En effet, dans la tumeur, les cellules endothéliales des HEV sont caractérisées par une forte expression de la P-sélectine (CD62P), qui joue un rôle essentiel dans le recrutement de lymphocytes activés dans les tissus inflammatoires (Asrir et al. 2022). De plus, le recrutement lymphocytaire est différent entre la tumeur et les ganglions puisque les HEV des tumeurs recrutent non seulement des lymphocytes naïfs, mais aussi des lymphocytes activés contrairement aux HEV des ganglions lymphatiques qui ne sont associés qu'au recrutement de lymphocytes naïfs *in vivo* (modèle murin de mélanome avec greffe sous-cutanée) (Asrir et al. 2022). De manière intéressante, les HEV jouent un rôle clé dans l'immunothérapie anti-cancéreuse. Le groupe du Dr Girard a montré que dans trois modèles murins de tumeurs distinctes (de sein, de colon et fibrosarcome), l'effet anti-tumoral du blocage des points de contrôle immunitaire (anticorps bloquant CTLA-4 et PD-1) est lié à une augmentation de la proportion des HEV dans les tumeurs. Grâce à la microscopie intravitale, ce groupe a observé le recrutement de lymphocytes à travers les HEV et a identifié ces derniers comme principaux points d'entrée des lymphocytes dans l'arbre vasculaire tumoral, même en l'absence d'immunothérapie (Figure 7) (Asrir et al. 2022). Ces données renforcent les perspectives thérapeutiques sur la modulation des HEVs dans les tumeurs.

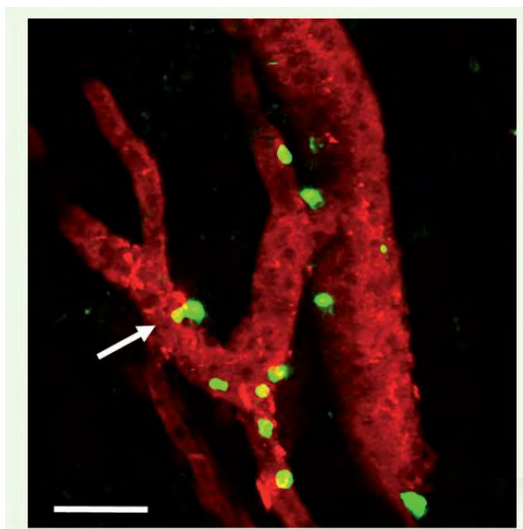


Figure 7 : Transmigration d'un lymphocyte (en vert) à travers un HEV (en rouge) par microscopie biphotonique (Asrir et al. 2022)

B.3. Exploitation des HEV dans le cancer

Comme le trafic des lymphocytes et leur infiltration dans la tumeur est une étape critique pour l'immunité anti-tumorale mais aussi pour les immunothérapies, il est évident qu'induire la présence et la maturation des HEV pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante. En effet, la présence élevée de cellules T CD8 dans les tumeurs humaines, telles que les tumeurs colorectales et gastriques, est un indicateur prédictif de la réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (Ning et al. 2018; Galon et al. 2006). Comme mentionné précédemment, le rôle principal des HEV est de faciliter l'infiltration de la tumeur par les lymphocytes, y compris les cellules T CD8. Ainsi, des thérapies ont été développées afin de stimuler la formation de HEV notamment par des agonistes de LT β R (Moussion and Girard 2011). Dans le cancer du sein par exemple, des anticorps agonistes du LT β R ont permis de générer des HEV et d'augmenter l'infiltration de lymphocytes dans un modèle murin (PyMT)(Allen et al. 2017). La stimulation du TNFR1 et l'induction de l'expression de LIGHT (homologue de la lymphotoxine) favorisent également la formation de HEV et la réduction de la croissance tumorale dans un modèle murin de mélanome (greffe sous-cutanée). L'induction de l'expression de LIGHT a également permis de contrer les résistances aux immunothérapies telles que les anti-PD1 et anti-PDL1 *in vivo* (dans des modèles murins de mélanome et de cancer du poumon)(Schrama et al. 2008; He et al. 2020).

Pour conclure sur cette partie, il est aujourd'hui évident que les HEV sont bénéfiques puisqu'ils facilitent l'entrée des lymphocytes dans la tumeur favorisant ainsi l'effet des immunothérapies sur sa destruction. Les thérapies induisant la formation de HEV dans le cancer semblent avoir un avenir prometteur.

Chapitre II : Microenvironnement de l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC)

I. Pathologie

A. Biologie et fonction du pancréas sain

Le pancréas est un organe vital localisé dans la partie supérieure de la cavité abdominale possédant à la fois des fonctions exocrine et endocrine. Cet organe se présente sous forme allongée et s'étend depuis le duodénum en direction de la rate. Sur le plan anatomique, le pancréas est divisé en trois parties : la tête, le corps et la queue (Figure 8). Le parenchyme pancréatique présente une structure lobulaire et possède des canaux qui sont très importants pour son fonctionnement. Le canal principal est le canal pancréatique appelé aussi canal de Wirsung, qui commence dans la queue du pancréas et parcourt toute la longueur de l'organe pour finalement pénétrer dans le duodénum par la grande papille. Il existe également le canal pancréatique accessoire appelé canal de Santorini, qui, chez environ 70 % des personnes, est relié au canal pancréatique (Karpińska and Czauderna 2022). Le pancréas est un organe bien vascularisé composé de trois artères : l'artère gastro-duodénale, l'artère splénique et l'artère mésentérique supérieure (AMS). Il possède également un réseau veineux comprenant à la fois les veines pancréatico-duodénales (au niveau de la tête et du duodénum d'une part, et du corps et de la queue d'autre part) et les veines dites pancréatiques se jetant par la suite dans la veine splénique (Henry et al. 2019). Le pancréas reçoit une double innervation, comprenant d'une part une innervation sympathique par les nerfs splanchniques, qui jouent un rôle dans la perception de la douleur, et d'autre part une innervation parasympathique *via* le nerf vague, qui participe à la sécrétion exocrine (W. Li et al. 2019).

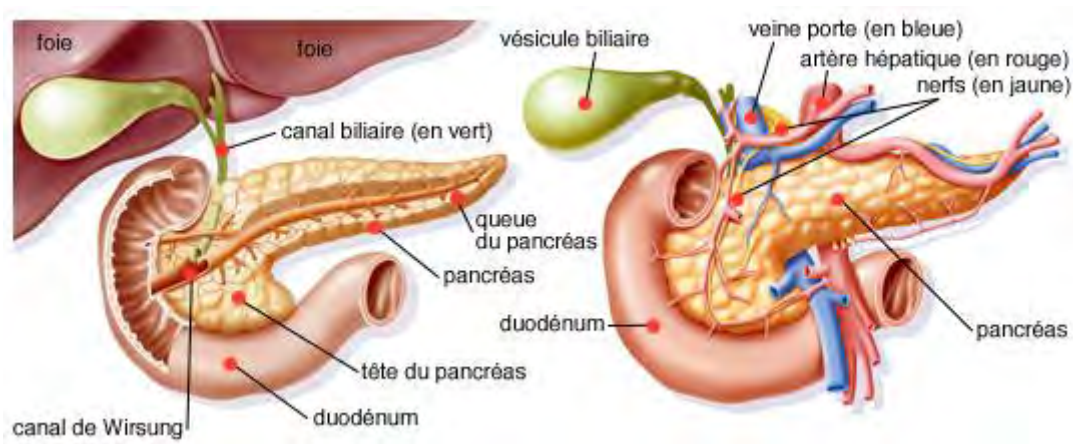


Figure 8 : Anatomie du pancréas

D'un point de vue histologique, on distingue deux structures fondamentales dans le pancréas : les îlots pancréatiques (ou îlots de Langerhans) participant à la fonction endocrine (en produisant des hormones) et les cellules sécrétoires (les cellules acineuses et canalaire) impliquées dans la fonction exocrine du pancréas, responsables de la sécrétion du suc pancréatique et des enzymes pancréatiques (Karpińska and Czauderna 2022)(Figure 9).

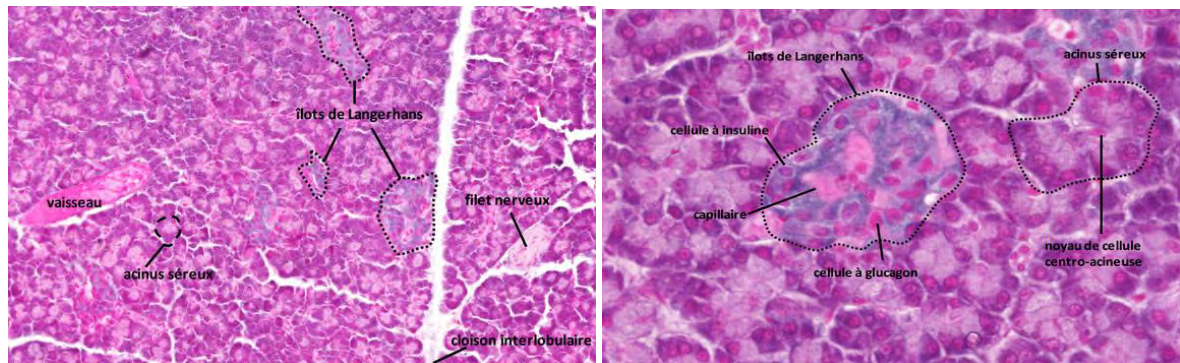


Figure 9 : Histologie du pancréas (Laboratoire d'histologie, UFR de médecine de Nantes)

Les îlots de Langerhans, dont le nombre peut atteindre 2 millions, sont des petits nodules sphériques disséminés au sein du parenchyme exocrine et ne représentent que 1 à 2% de la masse pancréatique mais leur rôle biologique est essentiel à l'organisme. Chaque îlot se compose de plusieurs types de cellules endocrines irriguées par des petits capillaires sanguins. Il existe au moins cinq types cellulaires différents au sein de ces îlots : les cellules α (20 à 40% de la population constituant les îlots), les cellules β (50 à 70%), et en plus faible quantité les cellules δ (4%), les cellules γ (1%) et les cellules ϵ (< 1%). Chaque type cellulaire est caractérisé par l'hormone qu'il sécrète et joue un rôle crucial dans le métabolisme du glucose et la régulation de la glycémie. Alors que les cellules α sécrètent du glucagon pour augmenter le taux de glucose dans le sang à partir de glycogène stocké dans le foie, les cellules β quant à elles, sécrètent l'insuline permettant de diminuer le niveau de glucose dans le sang notamment en favorisant son absorption dans les cellules graisseuses ainsi que dans le foie et les muscles squelettiques sous forme de glycogène et/ou de triglycérides (Röder et al. 2016). Ces hormones constituent les deux hormones clés régulant l'homéostasie glucidique. Concernant les autres types cellulaires des îlots, on retrouve les cellules δ qui sécrètent la somatostatine inhibant la sécrétion de glucagon et d'insuline, les cellules γ sécrétant l'hormone polypeptide pancréatique (PP) ayant un rôle dans la régulation des sécrétions endocrines et exocrines du pancréas ainsi que dans l'appétit, et enfin les cellules ϵ produisant la ghréline dont la fonction est de stimuler l'appétit.

L'autre composante majoritaire du pancréas correspond aux cellules sécrétoires impliquées dans la fonction exocrine du pancréas. Ces cellules sont principalement des cellules acineuses qui

représentent jusqu'à 85% de la masse pancréatique. Ces cellules sont regroupées en acini formant ainsi une structure en dôme permettant l'acheminement des sécrétions vers la lumière du canal intercalaire (Dolenšek, Rupnik, and Stožer 2015). En plus de ces cellules acineuses, on retrouve des cellules canalaire ou ductales participant aussi à la fonction exocrine du pancréas. La sécrétion pancréatique exocrine implique deux mécanismes sécrétoires distincts : les sécrétions enzymatique et électrolytique. La sécrétion enzymatique par les cellules acineuses permet notamment la digestion des protides, des glucides et des lipides *via* la trypsine, l'amylase et la lipase respectivement. Plusieurs enzymes sont sécrétées sous forme de proenzymes inactives dont l'activation se fait plus tard dans le processus de digestion afin d'éviter qu'elles ne dégradent le pancréas (Whitcomb and Lowe 2007). La sécrétion enzymatique est régulée par la cholécystokinine (CCK) produite par les cellules endocrines du duodénum en réponse à l'arrivée d'acides gras et de protéines après leur passage dans l'estomac. La CCK agit sur les cellules acineuses *via* des récepteurs membranaires, provoquant différentes phosphorylations aboutissant au processus d'exocytose de la cellule acineuse. Quant à la sécrétion électrolytique, elle a lieu dans les canaux proches des acini *via* un échange chlore-bicarbonate. Ce sont donc les cellules canalaire qui participent grandement à cette sécrétion, riche en bicarbonate afin de réguler le pH du suc pancréatique (Ishiguro et al. 2012). La sécrétion électrolytique s'accompagne également d'une sécrétion d'eau et de sodium par les cellules canalaire. Cette sécrétion est régulée par la sécrétine qui stimule l'élimination de bicarbonate et d'eau par les cellules canalaire notamment *via* une augmentation de la concentration de l'AMP cyclique (AMPC) intracellulaire. Tout comme la cholécystokinine, cette hormone est produite par des cellules du duodénum lors d'un afflux acide important provenant de l'estomac (Ishiguro et al. 2012).

Le pancréas contient également du tissu adipeux, des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des nerfs. Enfin, il se compose de cellules étoilées pancréatiques (PSCs), qui correspondent aux fibroblastes résidents, et de matrice extracellulaire. La MEC, qui enveloppe les cellules, joue un rôle bien plus étendu que simplement fournir un soutien structurel. Elle se lie également aux récepteurs membranaires, tels que les intégrines, et contrôle la diffusion et la liaison des facteurs de croissance, ce qui influe sur la signalisation cellulaire. Elle joue un rôle majeur dans la signalisation essentielle à la viabilité des îlots de Langerhans producteurs d'insuline (Tabang et al. 2021). Quant aux PSCs, ils constituent 4 à 7 % du tissu pancréatique sain et se trouvent dans les zones basolatérales des cellules acineuses, ainsi qu'autour des petits canaux pancréatiques, des îlots pancréatiques et des vaisseaux sanguins. Ces cellules ont la particularité d'exprimer des gouttelettes lipidiques riches en vitamine A dans leur cytoplasme et elles expriment des marqueurs des cellules stellaires tels que la desmine, la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) et la nestine. Les PSCs sont les principaux producteurs de protéines de la MEC telles que le collagène I, III et IV, la fibronectine et les laminines. Parallèlement,

elles produisent également des enzymes dégradant la MEC comme les métalloprotéases matricielles (MMPs) et leurs inhibiteurs (TIMP). Dans le pancréas normal, ces enzymes maintiennent un équilibre entre le dépôt et la dégradation des protéines de la MEC. Cependant, il est maintenant reconnu que les PSCs ont des fonctions qui vont au-delà du remodelage de la MEC dans le pancréas normal. Ils expriment notamment des récepteurs pour la cholécystokinine sécrétagogue (CCK1 et CCK2) et ont la capacité de synthétiser le neurotransmetteur acétylcholine (ACh). Lorsqu'ils sont exposés à des niveaux physiologiques de CCK, les PSCs sécrètent de l'ACh qui, à son tour, agit sur les récepteurs muscariniques des cellules acineuses et induit la sécrétion d'amylase (Mekapogu et al. 2020).

B. Adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC)

B.1. Epidémiologie, facteurs de risque et symptômes

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) représente plus de 90% des cas de cancer du pancréas. Son incidence augmente de 0.5 à 1% chaque année prédisposant ainsi ce cancer à devenir la deuxième cause de décès par cancer d'ici 2030 (aux Etats Unis). Bien que son incidence soit faible, il présente des taux de mortalité bien plus élevés que tous les autres cancers solides avec une survie globale à 5 ans inférieure à 12% (W. Park, Chawla, and O'Reilly 2021). Au niveau mondial, le PDAC a été la 5ème cause de décès par cancer en 2019 (Figure 10).

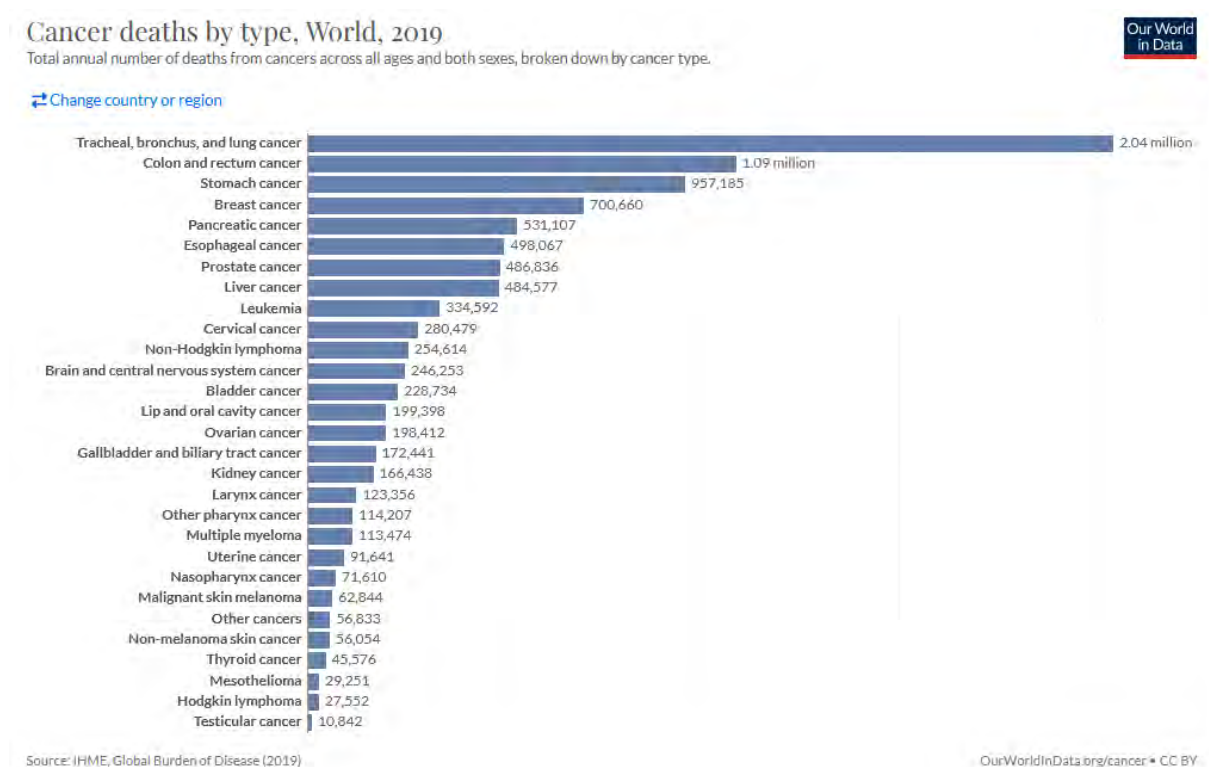


Figure 10 : Décès par type de cancer dans le monde en 2019 (Our World in Data)

Entre 2016 et 2020, ce cancer très agressif présentait une mortalité de 12.7 et 9.6 pour 100 000 hommes et femmes respectivement (Siegel et al. 2023). L'une des explications de cette forte mortalité est que ce cancer est détecté très tardivement. En effet, lors du diagnostic, seulement 10-15% ont une tumeur localisée pouvant être opérée, 30-35% possèdent une tumeur localement avancée qui est très souvent non opérable en raison de l'atteinte vasculaire de la tumeur et 50% des patients sont déjà métastatiques (W. Park, Chawla, and O'Reilly 2021). Ce cancer présente une incidence plus importante dans les pays développés (Europe et Amérique du nord) suggérant ainsi que les facteurs environnementaux joueraient un rôle clé dans l'apparition de ce cancer (Ushio et al. 2021).

Parmi les facteurs de risque environnementaux du PDAC, on retrouve notamment la cigarette qui semble présenter une association très importante avec l'apparition du PDAC (Figure 11). En effet, elle augmente de 74% le risque de développer ce cancer (Iodice et al. 2008). On retrouve également l'alcool comme facteur de risque avec une association plus modérée (augmente de 15% le risque) à l'apparition de ce cancer notamment lorsque la prise dépasse 30g par jour. L'obésité, qui peut altérer le bon fonctionnement du pancréas, et le diabète peuvent aussi favoriser l'apparition du PDAC. En effet, 1% des patients diabétiques développe un PDAC dans les 3 ans suivant le diagnostic. Enfin, la pancréatite chronique, correspondant à une inflammation du pancréas, entraînant une perte de cellules acineuses et des îlots dans le pancréas, peut augmenter de 13 fois le risque de développer un PDAC (W. Park, Chawla, and O'Reilly 2021). En parallèle des facteurs de risque environnementaux, des facteurs intrinsèques aux patients entrent en jeu comme l'âge. Ce cancer touche principalement les personnes âgées avec 90% des patients qui ont plus de 55 ans au diagnostic (Connor and Gallinger 2022). L'ethnie peut également influencer l'apparition du PDAC avec un risque plus important chez les Afro-Américains (risque de 50 à 90%) par rapport aux Caucasiens. L'historique familial est aussi un facteur de risque impliqué dans le développement du PDAC puisqu'un patient dont au moins deux parents au 1er degré ont développé ce cancer présente un risque 9 fois plus élevé (Becker et al. 2014). Enfin, certaines mutations génétiques germinales, notamment sur les gènes BRCA1, BRCA2 (BRCA1 et 2) et ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), peuvent augmenter le risque de développer ce cancer (W. Park, Chawla, and O'Reilly 2021).

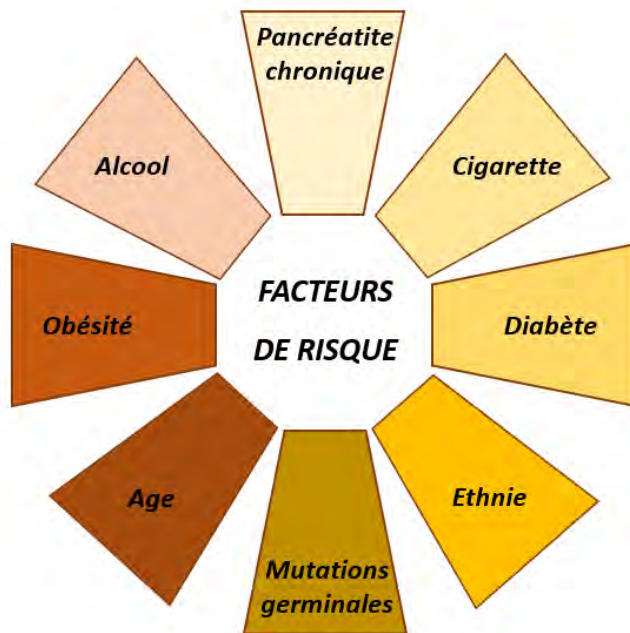


Figure 11 : Facteurs de risques intrinsèques et environnementaux du PDAC

Le PDAC est difficile à diagnostiquer à cause d'une absence de symptômes spécifiques même si quelques signes peuvent être alarmants. L'un des premiers signes est l'état général du patient avec une perte d'appétit conduisant à un amaigrissement progressif et une fatigue importante. Les tumeurs se développant au niveau de la tête du pancréas peuvent induire une obstruction biliaire, qui entraîne la production d'urines foncées mais aussi une jaunisse également appelée ictère. La jaunisse est provoquée par la compression du canal cholédoque par la tumeur, empêchant l'évacuation normale de la bile depuis le foie jusqu'à l'intestin ; la bile est alors renvoyée dans la circulation sanguine entraînant ainsi un jaunissement des yeux et de la peau. En revanche, lorsque la tumeur atteint le corps ou la queue du pancréas, les patients présentent davantage de symptômes non spécifiques, notamment des douleurs abdominales, des douleurs dorsales et des symptômes liés à la cachexie (W. Park, Chawla, and O'Reilly 2021).

B.2. Développement du PDAC

Comme tout cancer, le PDAC se caractérise par une prolifération cellulaire incontrôlée accompagnée d'une rupture de l'homéostasie cellulaire. Le déséquilibre entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire qu'elle soit programmée (apoptose) ou non (nécrose) entraîne la perte de cette homéostasie. Ce processus peut être la conséquence de mutations génétiques, de réarrangements chromosomiques et de modifications épigénétiques conduisant non seulement à l'activation d'oncogènes (comme Kras) mais aussi à la perte de gènes suppresseurs de tumeurs (tels que Tp53).

Ces phénomènes vont ainsi agir sur la cellule tumorale en induisant une activation permanente du cycle cellulaire et une résistance à la mort cellulaire, mais également agir sur l'environnement tumoral afin de favoriser l'invasion des tissus environnants et l'apparition de métastases. Le développement du PDAC se fait en plusieurs étapes caractérisées par différentes altérations génétiques. Plusieurs études ont montré que ce développement se fait à partir de 3 lésions précurseurs : les néoplasies intraépithéliales pancréatiques (PanIN), les néoplasmes kystiques mucineux (MCN) et les tumeurs intracanalaires papillaires et mucineuses (IPMN) (Hezel et al. 2006; Basturk et al. 2015) (Figure 12).

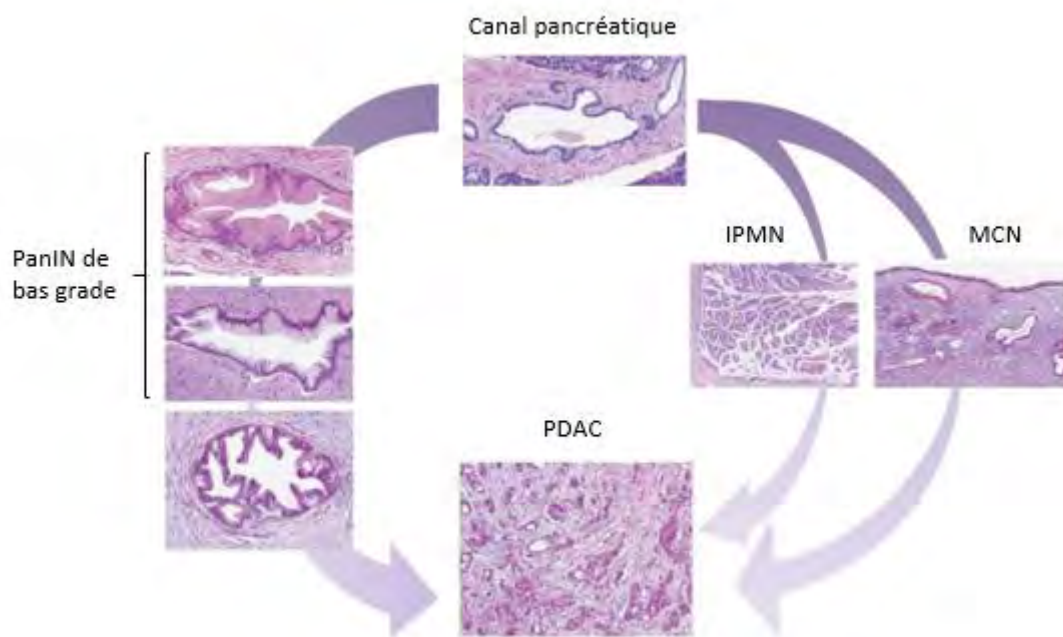


Figure 12 : Lésions précurseurs de PDAC (Hezel et al. 2006)

Les IPMN se développent généralement au niveau de la tête du pancréas aux dépens du canal pancréatique principal ou des canaux secondaires et sont responsables d'une dilatation kystique canalaire. Quant aux MCN, ce sont des lésions kystiques épithéliales qui se développent généralement dans la queue du pancréas. Ces lésions sécrétant de la mucine ne communiquent pas avec les canaux pancréatiques (Distler et al. 2014).

Parmi les lésions pré-cancéreuses évoluant vers un PDAC, les PanIN sont les majoritaires et sont classées par grade de sévérité croissante (de bas grade à haut grade). Le stade le plus précoce est caractérisé par l'apparition d'un épithélium mucineux, une désorganisation architecturale, ainsi que des atypies nucléaires alors que le stade le plus tardif présente des atypies nucléaires plus sévères et une perte de polarité. Pour ces PanIN de haut grade, elles peuvent finalement donner lieu à un PDAC

agressif conduisant à l'apparition de métastases. Durant la progression des PanIN vers un PDAC, plusieurs mutations génétiques sont accumulées provoquant ainsi l'expression d'oncogènes et la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs à l'origine de l'initiation et du maintien du PDAC. Parmi ces mutations on retrouve notamment la mutation activatrice (G12D) qui touche l'oncogène KRAS et qui est retrouvée dans au moins 90% des cas de PDAC. Cette mutation conduit à une perte d'activité GTPasique de KRAS maintenant sa liaison à l'ATP stimulant ainsi de nombreuses voies de signalisation (MAPK, PI3K ...) (Waters and Der 2018). Dans environ 50-70% des cas, on observe également une mutation de gènes suppresseurs de tumeur tels que TP53 dont la perte de fonction induit des lésions génétiques, une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire et une inhibition d'apoptose. On retrouve également dans environ 35% des cas, une mutation du gène CDKN2A induisant la perte de fonction de la protéine p16INK4A stimulant ainsi la prolifération cellulaire en ne régulant plus les kinases dépendantes des cyclines. Enfin, dans 30% des cas, le gène DPC4 codant pour la protéine SMAD4 est inactivé induisant une dérégulation de la voie de signalisation du TGF β facilitant donc l'apparition du PDAC (F. Wang et al. 2018) (Figure 13).

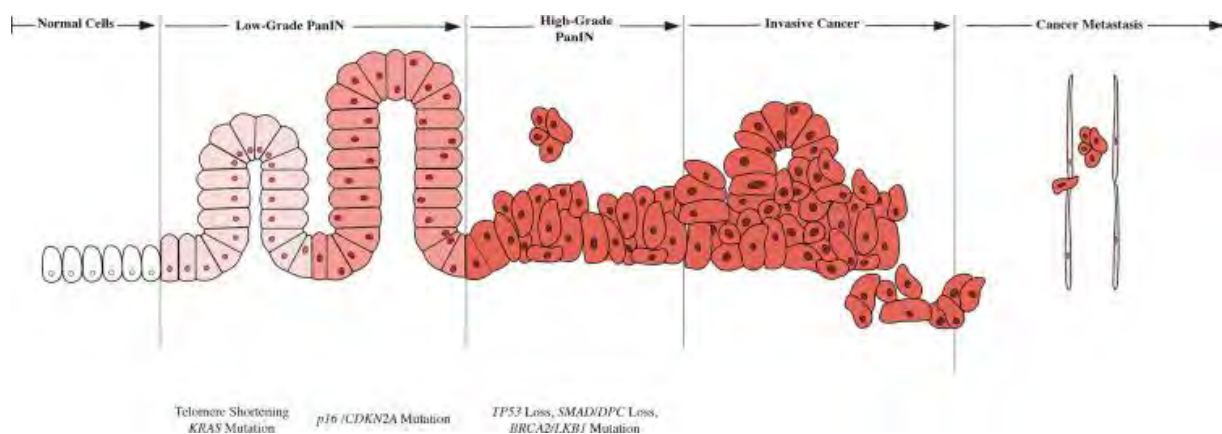


Figure 13 : Représentation schématique des mutations génétiques et lésions PanIN aboutissant à un PDAC (Chhoda et al. 2019)

Afin d'étudier le PDAC et son origine, divers modèles murins, notamment les modèles murins génétiquement modifiés (GEMM), ont été créés pour induire spontanément une tumeur pancréatique en introduisant des mutations oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs. Etant donné la fréquence des mutations activatrices de KRAS dans le PDAC, les premiers efforts de modélisation chez la souris se concentrèrent sur l'expression ciblée de cet oncogène. En 2003, le groupe de Tuveson a développé un modèle de type « knock-in », qui est obtenu en remplaçant l'allèle sauvage endogène KRAS par un allèle KRAS mutant (mutation G12D) comprenant en 5' une cassette Lox-Stop-Lox (LSL) qui empêche sa transcription. L'expression de KrasG12D est alors induite lorsque les cellules portant cet allèle mutant expriment la recombinaise Cre, par excision de la

cassette LSL; plusieurs modèles de souris exprimant la Cre dans le pancréas ont été développés selon que la Cre soit sous le contrôle du promoteur du facteur de transcription Pdx1 (pancreatic and duodenal homeobox 1), ou de celui de Ptf1 (pancreatic transcription factor 1), permettant respectivement une expression spécifique de l'allèle KRAS mutant dans les cellules souches pancréatiques ou dans les cellules acineuses. Ces souris appelées KC (pour « Kras » et « Cre ») ont pu ainsi développer des lésions PanIN pouvant aller parfois vers un adénocarcinome invasif (Hingorani et al. 2003). Par la suite, d'autres modèles GEMM ont été développés avec l'introduction des mutations récurrentes du PDAC. Parmi eux on retrouve le modèle le plus répandu, KPC (LSL-KrasG12D/+, Trp53R172H/+, Pdx1- Cre), combinant les mutations Kras et p53. L'avantage de ce modèle est qu'il permet un développement tumoral plus proche de celui des tumeurs humaines notamment avec une forte desmoplasie et des sites métastatiques semblables (foie, poumon), et présente une survie médiane d'environ 5 mois (Hingorani et al. 2005). Malheureusement, la génération des modèles GEMM est longue et coûteuse à mettre en œuvre. C'est pourquoi les modèles de xénogreffe orthotopique dans lesquels des cellules tumorales de PDAC sont directement greffées dans le pancréas de souris sont développés. Cette méthode permet l'obtention de résultats rapides ainsi que la production de cohortes importantes : deux caractéristiques avantageuses pour la validation de cibles thérapeutiques.

Le développement du PDAC, a ainsi été largement étudié, que ce soit du point de vue de son aspect histologique, de l'observation des lésions précancéreuses ou de l'analyse des altérations génétiques associées. Cependant, le pancréas exocrine se composant à la fois de cellules acineuses et de cellules canalaire, l'origine cellulaire du PDAC est aujourd'hui controversée. De par leur ressemblance histologique aux cellules tumorales, les cellules canalaire ont longtemps été considérées comme étant à l'origine de ce cancer (Cubilla and Fitzgerald 1976). Cependant, une étude menée par Habbe et ses collaborateurs a montré que l'activation de la mutation KrasG12D spécifiquement dans les cellules acineuses (exprimant l'élastase et Mist1) chez les souris adultes a conduit à la formation spontanée de lésions PanIN pouvant conduire à un PDAC (Habbe et al. 2008). Ces cellules subissent notamment une métaplasie acino-canaire (ADM) conduisant à l'apparition de PanIN et *in fine* à un cancer (L. Wang, Xie, and Wei 2019). L'ADM représente la lésion histologique la plus précoce détectée tant dans les modèles murins de cancer du pancréas que dans les échantillons de tissus pancréatiques humains. Cette métaplasie implique une transdifférenciation d'un type cellulaire différencié, ici les cellules acineuses, en un autre type cellulaire différencié, les cellules canalaire. En conséquence, après l'ADM, les cellules acineuses perdent leurs caractéristiques d'origine, telles que les marqueurs Ptf1a et Mist-1, au profit des marqueurs associés aux cellules canalaire, notamment la cytokératine-19 (CK-19) (Marstrand-Daucé et al. 2023). Au départ, l'ADM est un processus

réversible qui témoigne de la capacité des cellules acineuses à s'adapter aux contraintes génétiques et environnementales, leur permettant de se régénérer. Cependant, en cas d'inflammation, de lésions ou de stress prolongé, cela peut conduire à une transdifférenciation irréversible et au développement de PanIN (L. Wang, Xie, and Wei 2019). Afin d'étudier le processus d'ADM, diverses approches expérimentales ont été élaborées. L'ADM a été provoquée par plusieurs méthodes, notamment la ligature du canal pancréatique, l'induction d'une pancréatite avec la caéruléine, la culture *ex vivo* de cellules acineuses (tant murines qu'humaines), ainsi que l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés (pour exprimer la mutation activatrice de l'oncogène Kras et la mutation inhibitrice du suppresseur de tumeur Tp53 spécifiquement dans les cellules acineuses ou canalaire)(L. Wang, Xie, and Wei 2019). Ces modèles ont permis d'explorer plus en profondeur les facteurs sous-jacents au développement de l'ADM qui sont notamment l'hyperactivation de l'oncogène KRAS, l'inflammation, l'activation de voies de signalisation (telles que MAPK, PI3K/AKT, EGFR) et les mécanismes épigénétiques. De manière intéressante, l'hyperactivation de l'oncogène KRAS joue un rôle crucial dans la persistance de l'ADM conduisant ainsi à la formation de lésions PanIN à l'origine du PDAC (Figure 14) (Marstrand-Daucé et al. 2023).

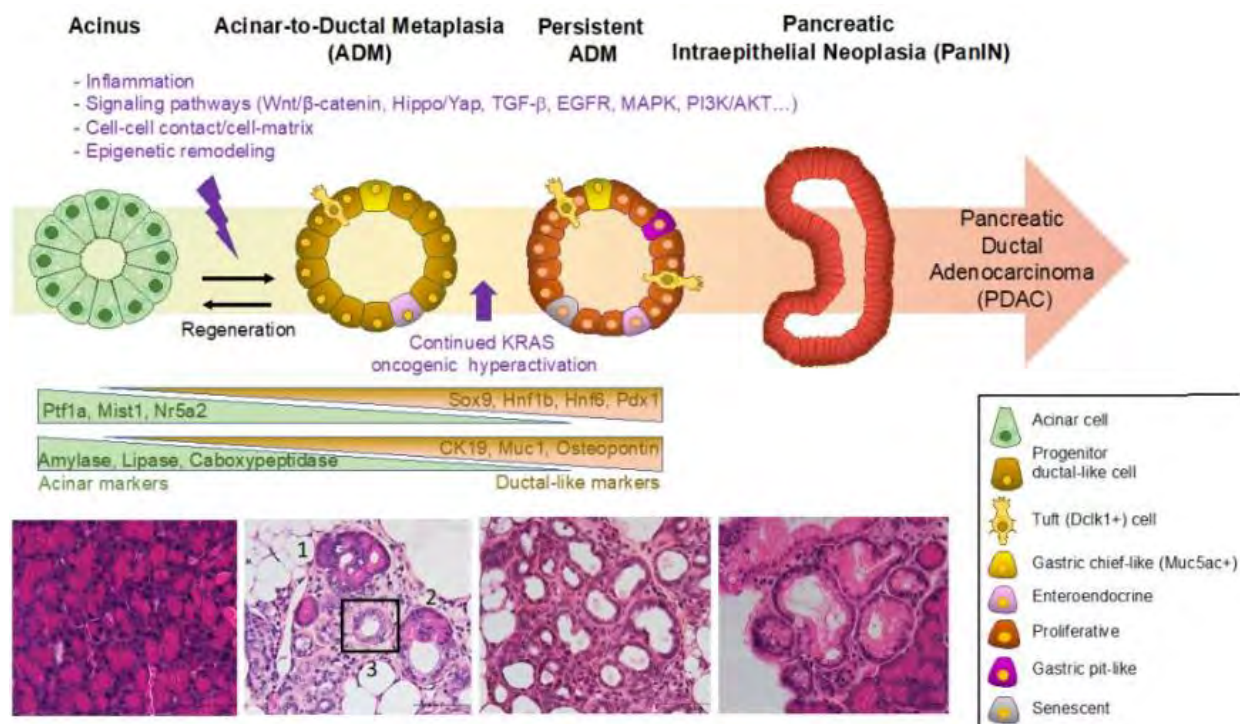


Figure 14 : Représentation schématique et histologique de l'ADM et PanIN aboutissant à un PDAC (Marstrand-Daucé et al. 2023)

Enfin, une étude de Flowers et ses collaborateurs montre grâce à des modèles murins génétiquement modifiés (Kras^{LSL-G12D/+}; Rosa26^{LSL-tdTomato/LSL-tdTomato} ; Trp53^{fl/fl} ou

Trp53+/fl) que le PDAC se développe à la fois à partir de cellules acineuses et de cellules canalaire, l'origine cellulaire étant déterminante pour le sous-type moléculaire de PDAC (les cellules canalaire donnant naissance à un sous-type de PDAC de type basal, tandis que les cellules acineuses engendrent un sous-type de type classique) (Flowers et al. 2021).

B.3. Diagnostic et traitements

De par l'absence de symptômes spécifiques, le diagnostic du PDAC reste aujourd'hui très tardif (généralement au stade métastatique). Le diagnostic de cette pathologie et la recherche de lésions indiquant un début de cancer se font dans un premier temps *via* des techniques d'imagerie (échographie, CT-Scan, IRM, ERCP, ...) et peuvent parfois être combinées à une endoscopie. En cas de suspicion, une biopsie est réalisée sous échographie endoscopique pour confirmer, ou non, la présence de cellules tumorales (Nakaoka et al. 2023). En plus des techniques d'imagerie, l'utilisation de biomarqueurs peut s'avérer être utile. Malheureusement, dans le cas du PDAC, le seul biomarqueur approuvé par la Food and Drug Administration des Etats-Unis pour une utilisation lors de la gestion de routine du cancer du pancréas est l'antigène sérique carbohydre 19-9 (CA 19-9). Cet antigène détecté à la surface de certaines cellules tumorales est observé dans le sang lorsqu'il est libéré par la tumeur. Cependant, cet antigène étant aussi exprimé dans certains tissus sains tels que le foie ou les poumons, il est utilisé uniquement pour surveiller la réponse au traitement et en tant que marqueur de récurrence (Nakaoka et al. 2023). A l'heure d'aujourd'hui, aucun biomarqueur spécifique du PDAC n'a été identifié, et plusieurs groupes cherchent à en identifier afin de faciliter le diagnostic.

Une fois le diagnostic confirmé, plusieurs cas de figures se présentent et donnent lieu à différents traitements. Soit la tumeur est opérable d'emblée, soit elle est localement avancée, soit le patient est déjà au stade métastatique.

Le seul traitement curatif est la résection mais elle ne concerne que 15 à 20% des patients dont les critères cliniques sont favorables. Selon la localisation de la tumeur, différentes opérations chirurgicales sont envisagées. Malheureusement, malgré la résection chirurgicale, la plupart des patients développent par la suite des métastases hépatiques et pulmonaires voire même une récurrence locale (Hishinuma et al. 2006). Afin d'éviter cette rechute, les patients reçoivent un traitement adjuvant après l'opération. Plusieurs études évaluant les chimiothérapies adjuvantes, dont la gemcitabine et le FOLFIRINOX, ont été menées au cours des dernières décennies. La gemcitabine est un antimétabolite spécifique de la phase S du cycle cellulaire, analogue de la désoxycytidine, qui s'incorpore dans l'ADN et inhibe la synthèse nucléotidique entraînant par la suite la mort cellulaire. Le FOLFIRINOX, quant à lui, est une combinaison de plusieurs drogues :

- 5-Fluorouracile (5-FU) : cet antimétabolite cytostatique est un analogue de l'uracile s'incorporant à la fois dans l'ADN et l'ARN conduisant au blocage de la synthèse nucléotidique
- L'acide folinique : dérivé de la vitamine B améliorant les effets du 5-FU
- L'irinotecan : inhibiteur de l'ADN topoisomérase I empêchant le rôle de cette enzyme dans la réplication de l'ADN et conduisant donc à un arrêt de la division cellulaire
- L'oxaliplatine : ce sel de platine est un agent alkylant interagissant avec l'ADN pour former des ponts intra- et inter-brins inhibant ainsi la division/prolifération cellulaire

Une première étude menée par Neoptolemos et ses collaborateurs avait montré qu'une chimiothérapie adjuvante à base de fluorouracile augmentait significativement la survie des patients par rapport à la chirurgie seule (20,1 mois vs 15,5 mois)(J. P. Neoptolemos et al. 2001). Une chimiothérapie adjuvante à base de gemcitabine avait également montré une amélioration de la survie sans progression par rapport à la chirurgie seule (13,4 mois vs 6,9 mois) même si la survie globale n'était pas impactée (Oettle et al. 2007). Plus récemment, l'essai ESPAC-4 a montré que la combinaison de gemcitabine et capecitabine (antimétabolite, précurseur du 5-FU) a légèrement amélioré la survie globale des patients par rapport à la gemcitabine seule (28 mois vs 25,5) (John P. Neoptolemos et al. 2017). Un autre essai a évalué le mFOLFIRINOX (FOLFIRINOX modifié (doses réduites) afin de diminuer les effets secondaires) en tant que chimiothérapie adjuvante par rapport à la gemcitabine seule. Cette étude menée par Conroy et ses collaborateurs a révélé l'effet bénéfique du mFOLFIRINOX puisqu'il a amélioré la survie sans progression (21,6 mois pour le mFOLFIRINOX vs 12,8 mois pour la gemcitabine) et la survie globale des patients par rapport à la gemcitabine seule (54,4 mois pour le mFOLFIRINOX vs 35 mois pour la gemcitabine) (Conroy et al. 2018). Le mFOLFIRINOX est considéré comme étant le meilleur traitement adjuvant à l'heure actuelle pour les patients ayant un bon état général.

Concernant les tumeurs localement avancées qui sont trop développées pour être opérées d'emblée (invasion des structures avoisinantes) mais pas encore métastatiques, elles sont généralement traitées par chimiothérapie néo-adjuvante visant à réduire le volume tumoral permettant éventuellement par la suite une résection. Si la tumeur ne régresse pas après thérapie néo-adjuvante, les patients deviennent généralement métastatiques et malheureusement les traitements curatifs ne sont plus une option. Dans ce cas-là, des soins palliatifs sont mis en place afin de soulager les patients. Parmi ces soins on retrouve les deux chimiothérapies de référence utilisées en France (en néo-adjuvant et palliatif) : la gemcitabine et le FOLFIRINOX. La gemcitabine en traitement de première ligne n'apporte qu'une amélioration de la survie globale de 6,8 mois chez les patients atteints de PDAC métastatique (Conroy et al. 2011), mais elle peut être combinée avec du nab-paclitaxel (Abraxane), agissant comme un poison du fuseau mitotique, pour améliorer la survie

globale des patients de 8,5 mois (Von Hoff et al. 2013). Enfin, lorsque les patients présentent un « bon état général », ils reçoivent le FOLFIRINOX et ont une survie globale de 11.1 mois (Conroy et al. 2011).

A l'heure actuelle aucun traitement n'est curatif (hormis la chirurgie) d'où les nombreux essais cliniques développés à travers le monde.

II. CAFs et MEC : composants majoritaires du stroma du PDAC

Le microenvironnement tumoral du PDAC est caractérisé par une complexité considérable. En plus des cellules cancéreuses elles-mêmes, il comprend une multitude d'autres types de cellules, tels que les fibroblastes, les cellules vasculaires et les cellules immunitaires (bien que celles-ci soient présentes en faible quantité). Toutes ces cellules interagissent de manière dynamique et complexe, influençant le développement, la progression et la réponse thérapeutique du cancer pancréatique. De plus, le microenvironnement pancréatique présente des caractéristiques particulières, telles qu'une fibrose stromale élevée et une faible perfusion sanguine. Cette complexité fait de ce microenvironnement un défi majeur dans le développement de thérapies efficaces, nécessitant une compréhension approfondie de ses composants et de leurs interactions.

En 2021, Grunwald et ses collaborateurs ont classé le microenvironnement du PDAC en deux sous-groupes en se basant sur des données histopathologiques de patients et des données cliniques puis en réalisant de la microdissection assistée par laser sur des biopsies de patients. Les échantillons ont ensuite été étudiés en détail par spectrométrie de masse et séquençage d'ARN (RNAseq): le microenvironnement « désertique » qui présente un aspect plutôt acellulaire avec des fibroblastes fins et fusiformes et beaucoup de MEC, et un microenvironnement « réactif » avec des fibroblastes activés et une inflammation importante. Alors que les CAFs du microenvironnement désertique confèrent des propriétés de chimiorésistance aux cellules tumorales, les CAFs du microenvironnement réactif facilitent leur prolifération (Grünwald et al. 2021). En parallèle, en étudiant les profils transcriptomiques de plus de 10 000 patients atteints de cancer, Bagaev et ses collaborateurs ont identifié quatre sous-types distincts de microenvironnements qui se retrouvent dans 20 types de cancers différents dont le PDAC : (1) stroma enrichi en cellules immunitaires et fibrotique, (2) stroma enrichi en cellules immunitaires et non fibrotique, (3) stroma fibrotique et enfin (4) stroma faible en immunité ou « immune-depleted ». Ces sous-types de microenvironnement sont étroitement liés à la réponse des patients à l'immunothérapie, avec une meilleure efficacité chez ceux qui présentent des sous-types enrichis en cellules immunitaires. Ainsi, ces sous-types de microenvironnement constituent des biomarqueurs généraux pour l'immunothérapie (Bagaev et al. 2021).

A. CAFs : une hétérogénéité importante dans le PDAC

Les CAFs du PDAC ont longtemps été considérés comme provenant des cellules étoilées pancréatiques (PSCs) ou fibroblastes résidents (Arina et al. 2016). Cependant, une récente étude menée par Helms et ses collaborateurs a remis en question ce dogme (Helms et al. 2022). Les PSCs ont été marqués *in vivo* (modèle de greffe orthotopique de cellules de PDAC) en utilisant des souris Fabp4-Cre ; Rosa26^{ACTB-tdTomato,-EGFP} (Rosa26mTmG) et suivis (Fabp4 (fatty acid binding protein 4) marquant les PSCs) durant la tumorigenèse (après greffe orthotopique de cellules de PDAC). Chez ces souris, le promoteur Rosa26 induit l'expression de tdTomato; en présence de la Cre, tdTomato et le codon stop (qui lui fait suite) sont excisés, ce qui entraîne l'expression de GFP. Ainsi les cellules positives à la Cre (les PSC) et leur descendance (les CAFs dont ils sont à l'origine), sont irréversiblement marquées par la GFP. En utilisant différents marqueurs de CAFs (PDPN, α -SMA, PDGFR α), les auteurs montrent que, bien que les PSCs ne donnent naissance qu'à 10% des CAFs, ces cellules ont des fonctions non redondantes des autres CAFs, principalement des fonctions de CAFs myofibroblastiques (myCAFs) (abordé plus en détail dans le prochain paragraphe) comprenant la production de MEC et la régulation de la rigidité du tissu (Helms et al. 2022). La délétion des CAFs dérivés de ces PSCs (par injection rétrograde de particules virales (vecteur à base de virus adéno-associé (AAV) AAVKP1-Fabp4-Cre) directement dans le canal pancréatique) a modifié la production de protéines de la MEC (tenascine-C, p-MLC2 (phospho-myosin light chain 2)) en plus de la rigidité des tissus (mesurée par microscopie de force atomique) (Helms et al. 2022). Il est aujourd'hui bien établi que l'origine des CAFs du PDAC est diverse (cellules épithéliales, cellules endothéliales, péricytes, MSC, cellules mésothéliales, adipocytes, BMDC) et que cette diversité participe très probablement à l'hétérogénéité de populations des CAFs (Vaish et al. 2021) (Figure 15).

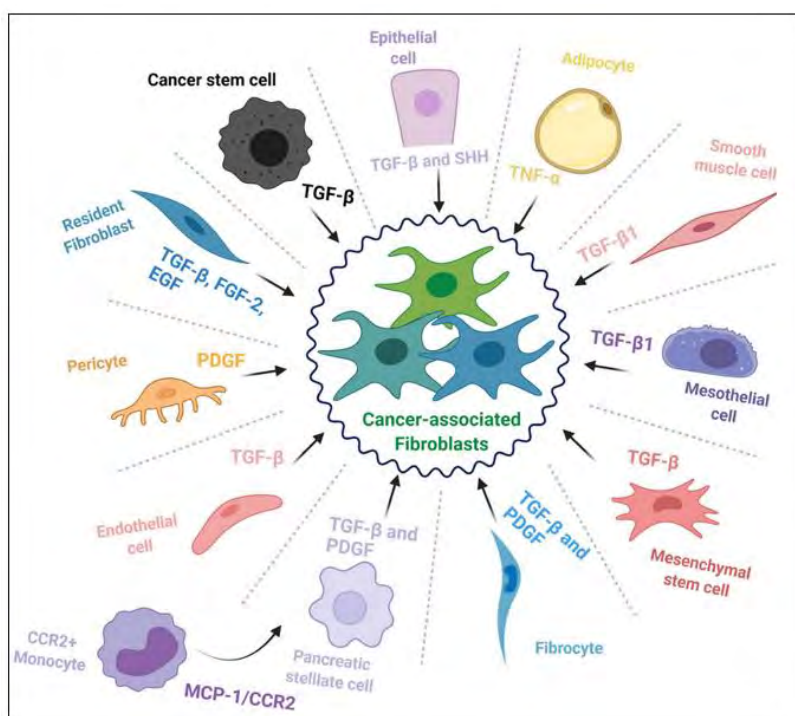


Figure 15 : Origine des CAFs (Manoukian, Bijlsma, and van Laarhoven 2021)

Les fonctions des CAFs sont multiples : ils peuvent avoir un rôle dans l'angiogenèse, dans différentes signalisations cellulaires, dans le métabolisme, sur la composante immunitaire mais aussi sur la production et le remodelage de matrice. Les CAFs sécrètent une grande quantité de facteurs de croissance et cytokines favorisant la croissance tumorale mais également l'établissement d'un microenvironnement immunosuppresseur (Table 1). Par exemple, les CAFs peuvent empêcher l'activité anti-tumorale des cellules T CD8 notamment en sécrétant des cytokines (IL-6, IFN- γ ...) capables d'induire une surexpression des points de contrôle immunitaire tels que CTLA-4 ou PD-1 (montré dans des CAFs de patients atteints de PDAC par spectrométrie de masse) (Tianyi Zhang et al. 2022). Dans des modèles murins KC (p48-Cre;KrasG12D) et KIC (pdx1-Cre;KrasG12D;Ink4a/Arffl/fl) induisant spontanément un PDAC, l'équipe du Dr Hennino a identifié une protéine matricielle, β ig-h3 (ou TGF β i), très fortement exprimée par les CAFs et qui induit un environnement immunosuppresseur en bloquant la migration et l'activation des cellules T CD8 (Goehrig et al. 2019).

En agissant sur la cellule tumorale elle-même mais aussi sur les autres composantes du stroma (immunitaire et vasculaire), les CAFs jouent un rôle clé dans la progression tumorale et la mise en place d'un environnement propice à cette croissance (Figure 16).

Table 1 : Quelques exemple de facteurs solubles et protéines matricielles sécrétés par les CAFs ayant un rôle dans le PDAC

Facteurs sécrétés	Rôle dans la progression tumorale	Voie impliquée	Référence
TGFβ	Prolifération, survie, EMT, invasion, production de MEC, recrutement de Treg,	Voies de signalisation du TGFβ	(Tianyi Zhang et al. 2022)
IL-6	EMT, migration, invasion, angiogenèse	Voies des MAPK, JAK/STAT, PI3K/AKT	(van Duijneveldt, Griffin, and Putoczki 2020)
IL-8	Migration, invasion, métastases	Fixation au récepteur CXCR2	(T. Wang et al. 2017)
VEGF	Angiogenèse	Fixation au récepteur VEGFR → activation des voies MAPK, PI3K/AKT	(Longo et al. 2016)
IL-1β	Chimiorésistance	Voie NFκB	(D. Zhang et al. 2018)
CXCL12	Immunosuppression	Fixation au récepteur CXCR4 → activation de la voie ERK	(Feig et al. 2013)
LIF	Chimiorésistance	Voie STAT3	(C. Hu et al. 2022)
MMPs	Invasion	Dégradation de la MEC	(Vaish et al. 2021)
miR-5703	Prolifération	Fixation à CMTM4 → activation de la voie PI3K/AKT	(M. Li et al. 2020)
Collagène 1	Prolifération, invasion, réservoir métabolique	Fixation aux intégrines → voies PI3K/AKT, MAPK	(Armstrong et al. 2004; Olivares et al. 2017)
Fibronectin	Prolifération, chimiorésistance	Activation de pERK1/2	(Amrutkar et al. 2019)
Periostin	Chimiorésistance	Voies de signalisation AKT et ERK	(Yang Liu et al. 2016b)
SPARC	-EMT, invasion -Inhibition de la prolifération et diminution de la prolifération -Angiogenèse	-Induction de MMPs -Voie PI3K/AKT -Régulation du remodelage matriciel	(Neuzillet et al. 2013; S. A. Arnold et al. 2010)
βig-h3	Immunosuppression (blocage de prolifération et d'activation des cellules T)	Liaison aux cellules T <i>via</i> le CD61 induisant la phosphorylation de Lck inhibant son activité kinase	(Goehrig et al. 2019)

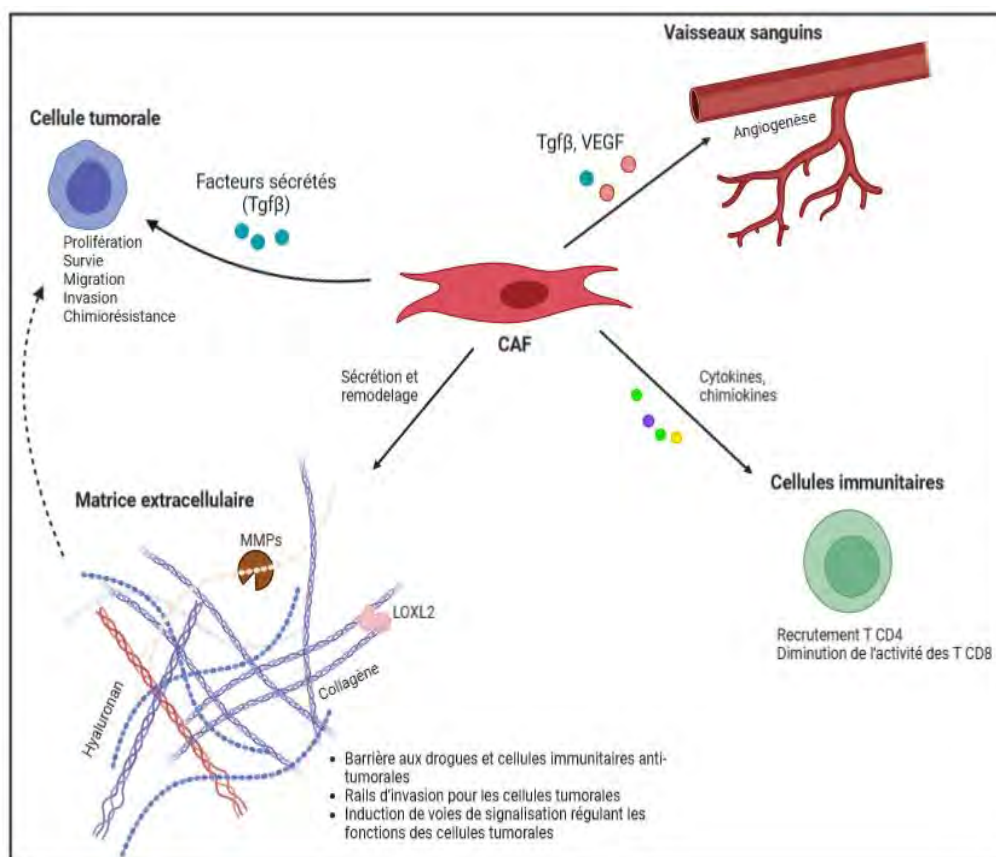


Figure 16 : Fonctions des CAFs dans le PDAC

Il est aujourd’hui évident que la diversité des CAFs est bien plus grande que ce que le monde scientifique avait imaginé jusqu’ici. Il est donc nécessaire de mieux définir les sous-types de CAFs et de comprendre leurs rôles (Table 2). Dans le PDAC, différents sous-types de CAFs ont été définis, les deux principaux étant les myCAF et les iCAF. En effet, le groupe du Pr Tuveson a montré en 2017, dans des tissus humains et murins (modèle KPC) de PDAC, la coexistence d’un sous-groupe α SMA+ / IL6- appelé CAFs myofibroblastiques (myCAF) et d’un sous-groupe α SMA- / IL6+ appelé CAFs inflammatoires (iCAF), avec des fonctions distinctes (Daniel Öhlund et al. 2017b). D’autres CAFs ont ensuite été découverts comme les apCAF et d’autres, plus récemment et donc moins documentés, que je présenterai brièvement (Elyada et al. 2019).

Table 2 : Sous-populations de CAFs dans le PDAC

Sous-populations de CAFs	Sécrétion	Caractéristiques	Marqueurs	Référence
CAFs myofibroblastiques (myCAF)	<i>Protéines de la MEC</i>	Proches des cellules tumorales	FAP+ α SMA+ IL-6-	(Daniel Öhlund et al. 2017a)
CAFs inflammatoires	<i>IL-6, IL-11, LIF,</i>	A distance des cellules	α SMA- IL-6+	(Daniel Öhlund et al.

(iCAF)	<i>CXCL2, CCL2, CXCL12</i>	tumorales, favorisent la progression tumorale <i>via</i> la sécrétion d'IL-6		2017a)
CAFs présentant des antigènes (apCAF)	<i>Protéines de la MEC, cytokines inflammatoires</i>	Activent les cellules T CD4 et modulent la réponse immunitaire	CMHII+CD74+	(Elyada et al. 2019)
CAFs Mefline	/	Bloquent la progression du PDAC en inhibant le remodelage de la MEC	Mefline+	(Mizutani et al. 2019)
CAFs LRRC15	<i>Collagènes, VEGF, IL-11, LIF</i>	Entourent la tumeur, corrélient avec une mauvaise réponse aux immunothérapies	LRRC15+	(Dominguez et al. 2020)
CAFs CD105+	<i>TGFβ, postn, CXCL14</i>	Favorisent la croissance tumorale <i>in vivo</i>	CD105+	(Hutton et al. 2021)
CAFs CD105-	<i>TNFα, IL-6, CXCL2</i>	Bloquent la progression tumorale <i>in vivo</i>	CD105- CD14+ CMHII +	(Hutton et al. 2021)

A.1. myCAFs

Les CAFs myofibroblastiques (myCAFs), présents dans les tumeurs de PDAC humaines et murines, expriment fortement les gènes *Acta2* et les gènes de réponse au TGFβ, tels que *Ctgf* (connective tissue growth factor) et *Col1a1*. Ces CAFs sont localisés à proximité étroite des cellules tumorales (dans les tissus humains et murins de modèle KPC) et sont stimulés par le TGF-β. Ces cellules ont des capacités contractiles et sont impliquées dans le remodelage de la MEC (Daniel Öhlund et al. 2017b). Principe et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition du TGFβ dans les cellules épithéliales favorisait la formation de tumeurs pancréatiques dans un modèle murin KTE (EL-Kras^{G12D}MT-*TGFBR2*^{DN}) développant spontanément un PDAC, tandis que la perte totale du TGFβ dans un modèle KTG (EL-Kras^{G12D}*Tgfbr1*^{+/-}) protégeait contre le développement de tumeurs en inhibant la formation de fibrose associée à la tumeur, la production de TGFβ1 dans le stroma, et en restaurant ainsi la fonction immunitaire anti-tumorale montrant ainsi que le TGFβ produit dans le stroma (principalement par les CAFs) joue un rôle majeur dans la progression tumorale (Principe et al. 2016). Récemment, il a été révélé que les CAFs fournissent du TGF-β pour induire la progression tumorale et la chimiorésistance en augmentant l'expression d'ATF4 *in vitro* (en réalisant des co-cultures de CAFs humains avec des lignées tumorales pancréatiques humaines) et *in vivo* (dans des souris greffées avec des cellules tumorales pancréatiques) (Wei et al. 2021). Ces études soutenant le rôle pro-tumoral des myCAFs, il est apparu évident que les supprimer pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante. Mais de manière surprenante, le groupe du Dr Kalluri a montré que la

délétion des myCAFs dans un modèle murin PKT (*Ptf1a^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Tgfbr2^{flox/flox}*) développant spontanément un PDAC a conduit à des tumeurs invasives avec des caractéristiques plus agressives (augmentation de l'hypoxie, de l'EMT et des cellules souches, et réduction de la survie des souris). De plus, cette délétion corrèle avec une augmentation des lymphocytes T régulateurs réprimant ainsi la surveillance immunitaire dans la tumeur. En outre, lorsque ces souris sont traitées avec une immunothérapie anti-CTLA4, leur survie est prolongée. Les auteurs montrent également une corrélation entre les myofibroblastes et la survie chez les patients atteints de PDAC, une faible présence de myCAFs (identifiés sur la base du marqueur α SMA) dans les tumeurs de patients corrélant avec une survie réduite (Özdemir et al. 2014). Chen et ses collaborateurs montrent qu'il faut également être prudent quant au ciblage des matrices produites par ces CAFs. En effet, la suppression de collagène 1 dans les myCAFs α -SMA+ dans un modèle murin KPPF (*FSF-Kras^{G12D/+};Trp53^{frt/frt};Pdx1-Flp; α SMA-Cre*) a favorisé un environnement immunosuppresseur même si elle a réduit la rigidité tumorale (favorisant normalement la progression tumorale), suggérant que les myCAFs ralentissent la progression tumorale dans ce modèle murin (Y. Chen et al. 2021).

En parallèle, d'autres groupes ont étudié le rôle des CAFs qu'ils ne définissent pas directement de myCAFs mais qui présentent certaines de leurs caractéristiques (notamment l'expression de marqueur α -SMA et la production de matrice). Ces CAFs et leur matrice régulent non seulement la prolifération des cellules tumorales mais également la capacité des cellules tumorales à migrer, envahir et métastaser. Par exemple, le groupe de Yang montre que des vésicules extracellulaires (EV) sécrétées par les CAFs (que je considérerai comme des myCAFs puisqu'ils expriment le marqueur α -SMA) et contenant différents miARN et lncARN ont un rôle important dans l'induction de la prolifération tumorale et notamment miR-5703 (provenant de CAFs de patients PDAC) qui a stimulé la prolifération des cellules tumorales pancréatiques *in vitro* en se liant à CMTM4 (CKLF Like MARVEL Transmembrane Domain Containing 4) afin de bloquer son expression et activer ainsi la voie de signalisation PI3K/Akt (M. Li et al. 2020). Une étude de Richards et ses collaborateurs a montré que lorsque des CAFs de PDAC étaient exposés à la gemcitabine, ils sécrétaient plus d'exosomes. Ces derniers étant riches en Snail, permettant l'expression de miR-146a dans les CAFs, stimulent la prolifération et chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques humaines *in vitro* (en co-culture). L'inhibition de production de ces exosomes (par l'inhibiteur GW4869) a permis de réduire la survie des cellules tumorales montrant ainsi l'importance de la production des exosomes par les CAFs (Richards et al. 2017). La sécrétion de MEC par les CAFs peut également favoriser la prolifération tumorale. En effet, le collagène I, produit notamment par les myCAFs peut servir de réservoir métabolique (*via* sa composition en proline) que les cellules tumorales murines utilisent pour proliférer *in vitro* (Olivares et al. 2017). La fibronectine produite par les myCAFs a aussi été montrée

comme pouvant promouvoir la prolifération de différentes lignées tumorales pancréatiques humaines *in vitro* (Miyamoto et al. 2004). Une étude menée par Kikuta et ses collaborateurs a montré que des cellules tumorales pancréatiques humaines en co-culture avec des PSCs issus de patients atteints de PDAC et ayant des caractéristiques de myCAFs (expression d' α SMA, collagène, fibronectine...) présentaient plus de marqueurs d'EMT (expression de vimentine et Snail, perte d'expression de E-cadhérine) associés à l'invasion comparé à des cellules tumorales en monoculture (Kikuta et al. 2010). Les CAFs régulent également l'invasion tumorale indirectement, *via* leur production de MEC. C'est majoritairement le cas du collagène I qui, en activant les voies Smad3 et Smad4, module l'expression de Snail dans les cellules tumorales *in vitro* (dans un gel de collagène en 3D). Snail a augmenté l'expression de MT1-MMP par l'activation de la signalisation ERK-MAPK, et l'inhibition de la signalisation ERK dans les cellules exprimant Snail a bloqué l'invasion tumorale. De plus, les auteurs ont observé une corrélation positive statistiquement significative entre MT1-MMP et Snail dans les tumeurs humaines de PDAC (Shields et al. 2011). En outre, il a été montré que lorsque des CAFs FAP+ (reconnus pour leur sécrétion de MEC et donc ressemblant aux myCAFs) étaient déplétés par des cellules FAP-CAR T, les tumeurs pancréatiques présentaient une diminution de MEC (collagène, acide hyaluronique, versican) mais également une réduction de structures vasculaires (diminution de cellules endothéliales CD31+ et péricytes NG2+) facilitant ainsi le blocage de la croissance tumorale dans deux modèles murins de PDAC (un modèle KPC et un modèle de greffe sous-cutanée de cellules tumorales)(Lo et al. 2015). Ces CAFs sont aussi impliqués dans l'immunomodulation et notamment dans l'immunosuppression dans le PDAC. Une étude de Feig et ses collaborateurs a montré que les CAFs FAP+ favorisent l'immunosuppression du PDAC *via* la sécrétion de CXCL12 *in vivo*. Lorsque ces CAFs sont déplétés (par traitement à la toxine diphtérique après avoir introduit dans la lignée KPC le transgène de chromosome artificiel bactérien (BAC) contenant un gène *Fap* modifié qui active sélectivement l'expression du récepteur de la toxine diphtérique humaine (DTR) dans les cellules qui sont FAP+), les tumeurs de souris KPC deviennent sensibles aux immunothérapies telles que les anti-CTLA4 et anti-PDL1 (Feig et al. 2013). Les CAFs induisent également la chimiorésistance *via* leur production de MEC et notamment de fibronectine et périostine. Liu et ses collaborateurs montrent que la périostine favorise la tumorigénécité du PDAC *in vitro* (lignées tumorales humaines) et *in vivo* (greffe sous-cutanée de cellules tumorales dans des souris immunodéficientes) *via* l'induction d'une résistance à la gemcitabine en activant les voies de signalisation EGFR-Akt et EGER-ERK-c-Myc et en bloquant PARP-1 et la caspase-9 dans les cellules tumorales (Yang Liu et al. 2016b). Enfin, en co-culture directe et indirecte avec des cellules tumorales humaines (lignées et cellules primaires), des PSCs humaines ont induit une résistance à la gemcitabine *via* une augmentation de phosphorylation de ERK1/2. De plus, lorsque des cellules tumorales sontensemencées sur des plaques contenant de la fibronectine, elles sont plus résistantes

à la gemcitabine, et l'utilisation d'un inhibiteur de fibronectine (peptide synthétique RGDS) bloque cette chimiorésistance induite par le milieu conditionné de PSCs en diminuant la phosphorylation de ERK1/2 (Amrutkar et al. 2019).

A.2. iCAFs

Les iCAFs ont également été découverts par l'équipe du Pr Tuveson. Ils sont activés par des facteurs paracrines sécrétés par les cellules cancéreuses et sont localisés plus loin des cellules néoplasiques que les myCAFs. Les iCAFs expriment des niveaux extrêmement faibles d' α -SMA et présentent une augmentation des cytokines inflammatoires telles que l'IL-6, IL-11 et LIF, ainsi que les chimiokines CXCL1 et CXCL2 dans les tissus humains et murins (KPC) de PDAC (Daniel Öhlund et al. 2017b). Alors que la voie TGF β /SMAD2/3 favorise l'activation en myCAFs, la voie IL-1/JAK-STAT3 est impliquée dans l'activation en iCAFs (montré *in vitro* avec des PSCs en présence soit d'IL-1 α , soit de milieux conditionnés par des organoïdes tumoraux, en présence ou en absence de l'inhibiteur de JAK (AZD1480)). En outre, les voies de signalisation impliquées dans la contractilité et la production de matrice sont diminuées dans les iCAFs comparé aux myCAFs. Les iCAFs se caractérisent par un phénotype sécrétoire de facteurs solubles, avec la capacité de moduler de manière paracrine les cellules cancéreuses et les autres types de cellules présentes dans la tumeur. Les facteurs sécrétés par les iCAFs, tels que l'IL-6, contribuent probablement aux effets systémiques chez les patients atteints de PDAC, tels que la cachexie et la suppression immunitaire (Daniel Öhlund et al. 2017b; Biffi et al. 2019). Un taux élevé d'IL-6 dans le sérum est un marqueur pronostique négatif dans le PDAC humain (van Duijneveldt, Griffin, and Putoczki 2020). Les iCAFs contribuent également à la croissance tumorale en participant à l'évasion immunitaire *via* la libération des cytokines et des chimiokines suppressives (l'IL-6, l'IL-1 β , le CXCL1, le CXCL2) (Daniel Öhlund et al. 2017a; Kennel et al. 2023).

Les iCAFs régulent également l'invasion tumorale *via* leur sécrétion de facteurs solubles tels que l'IL-8. Lorsque la sécrétion d'IL-8 est bloquée dans les CAFs humains issus de patients par un knockdown de la caveoline-1, et que les cellules tumorales pancréatiques humaines sont en contact avec ce milieu conditionné de CAFs, elles perdent leurs capacités migratoires et invasives (Yamao et al. 2019). Lorsque des cellules tumorales ont été mises en contact avec un milieu conditionné de CAFs pré-traités à l'ATRA (induisant une reprogrammation des CAFs vers un phénotype quiescent), elles ont montré une réduction de leur migration et EMT médiée par l'IL-6 (Guan et al. 2014).

Les CAFs, *via* leur sécrétion des cytokines et facteurs de croissance tels que le VEGF et IL-6, peuvent également réguler, positivement ou négativement, l'angiogenèse tumorale. En effet, alors que la majorité des études montrent que les CAFs favorisent l'angiogenèse tumorale notamment par l'induction de VEGF (qui peut être induite par l'IL-6) (Vaish et al. 2021; Q. Sun et al. 2018), une étude

menée par Zegeye et ses collaborateurs a identifié qu'au contraire les CAFs pourraient avoir un rôle anti-angiogénique. Les auteurs montrent que l'IL-6 altère l'angiogenèse par bourgeonnement (sprouting) en inhibant la migration, la prolifération et la formation de tubes des cellules endothéliales humaines *in vitro*. Cela se manifeste notamment par une augmentation de l'expression de facteurs anti-angiogéniques bien connus tels que CXCL10 et Serpinf1, ainsi qu'une réduction de l'expression de facteurs pro-angiogéniques comme CXCL8 et cKit par le biais de la trans-signalisation (par liaison au récepteur gp130) (Zegeye et al. 2020).

En parallèle, d'autres groupes ont étudié le rôle des CAFs qu'ils ne définissent pas directement de iCAF mais qui présentent certaines de leurs caractéristiques. Ces CAFs peuvent être des acteurs clés de la chimiorésistance dans le PDAC. Par exemple, *via* leur sécrétion de LIF, les CAFs favorisent la résistance à la gemcitabine en activant la voie de signalisation STAT3 dans les cellules tumorales *in vitro* (ajout d'un milieu conditionné de CAFs humains sur des lignées tumorales pancréatiques humaines) et dans un modèle murin de xénogreffe sous-cutanée de cellules de PDAC. Cette voie est documentée pour réguler l'efflux de médicaments (*via* ABCC2, ATP binding cassette subfamily C member 2), la détoxification (*via* la voie de CDA, Cytidine Deaminase) et la pluripotence (en impliquant SOX2, SRY-box transcription factor 2)(C. Hu et al. 2022). Hu et ses collaborateurs confirment que les niveaux d'ABCC2, de CDA et de SOX2 sont augmentés par LIF sécrété par les CAFs (C. Hu et al. 2022).

Enfin, il est clair que les iCAFs ont un rôle dans l'immunomodulation du PDAC puisqu'ils empêchent l'entrée des cellules T CD8 dans la tumeur d'un modèle murin de greffe sous-cutanée de cellules tumorales pancréatiques, par leur sécrétion de la cytokine CCL5 (Tan et al. 2009), ce qui contribue au microenvironnement immunosuppresseur du PDAC. Ces CAFs peuvent également agir sur d'autres populations immunitaires et notamment réguler la polarisation des macrophages. En effet, en co-culture directe ou indirecte (*via* un milieu conditionné), des CAFs humains induisent une polarisation des monocytes humains en macrophages de type M2 pro-tumoraux. Cette polarisation est médiée par la surproduction de ROS par les monocytes induite par la cytokine M-CSF sécrétée par les CAFs (A. Zhang et al. 2017).

De manière intéressante, il a été rapporté que les iCAFs pouvaient devenir des myCAFs et vice versa en réponse à des stimulations (telles que l'IL1b ou la TGFb). La conversion de iCAF en myCAF a été évoquée par Biffi et ses collaborateurs comme pouvant être une stratégie prometteuse pour améliorer le microenvironnement immunosuppresseur. En effet, les auteurs ont montré que l'inhibition de la voie de signalisation IL-1/JAK (inhibition pharmacologique de JAK) dans un modèle murin KPC augmente le ratio myCAF/iCAF et diminue la progression tumorale (Biffi et al. 2019), suggérant qu'une meilleure compréhension de l'hétérogénéité des CAFs pourrait contribuer au

développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Un essai clinique de phase I évaluant l'Anakinra (un antagoniste du récepteur de l'IL-1 empêchant l'activation des CAFs en iCAFs) en combinaison avec une chimiothérapie est d'ailleurs actuellement en cours ([NCT02550327](#))(D. Zhang et al. 2018; Geng et al. 2021).

A.3. apCAFs

En 2019, une nouvelle population de CAFs a été découverte par le groupe du Pr Tuveson dans un modèle murin KPC et dans des tissus de patients : les CAFs présentant des antigènes « apCAFs » (Elyada et al. 2019). Ces CAFs expriment le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH classe II) et CD74, mais n'expriment pas les molécules co-stimulatrices classiques notamment CD80, CD86 et CD40, ce qui indique que les apCAFs ne peuvent pas fonctionner en tant que cellules présentatrices d'antigènes expertes. Les auteurs supposent un rôle des apCAFs dans l'induction des lymphocytes T CD4 vers un phénotype Treg suggérant ainsi leur rôle dans l'immunosuppression (Elyada et al. 2019). En plus des gènes liés au CMH de classe II, les apCAFs expriment d'autres marqueurs uniques tels que la protéine de l'amyle sérique A3 (Saa3) et l'inhibiteur de la peptidase leucocytaire sécrétoire (Slpi). Saa3 a été identifié comme facteur pro-tumorigénique dans les CAFs du pancréas d'un modèle murin KPeCy (*K-Ras*^{+LSLG12V_{geo}};*Trp53*^{lox/lox};*Elas-tTA/tetO-Cre*) développant spontanément un PDAC à partir des cellules acineuses (Djurec et al. 2018). Slpi a été identifié comme un jouant un rôle pro-inflammatoire dans les fibroblastes cutanés dysplasiques(H. Huang et al. 2022; Elyada et al. 2019; Dominguez et al. 2020).

A.4. Autres CAFs

CD105

Hutton et ses collègues ont découvert que l'expression de CD105 permet de distinguer deux lignées de fibroblastes pancréatiques fonctionnelles dans les tissus sains et les tumeurs murines et humaines de PDAC. *In vivo*, dans un modèle murin de greffe sous-cutanée de cellules tumorales pancréatiques murines, les fibroblastes pancréatiques CD105+ favorisent la croissance tumorale en empêchant l'infiltration de cellules immunitaires anti-tumorales, tandis que les fibroblastes CD105- la suppriment. Les CAF CD105+ et CD105- semblent dériver de précurseurs de fibroblastes distincts spatialement ; par conséquent, la contribution des différentes lignées de CAFs au PDAC est également un sujet d'étude méritant davantage d'investigations(Hutton et al. 2021).

Mefline

Mizutani et ses collaborateurs ont découvert que la Mefline (protéine ancrée au glycosylphosphatidylinositol qui est un marqueur des cellules mésenchymateuses souches) est

exprimée par les PSCs à l'origine des CAFs humains et murins (modèle KPC). L'étude a révélé que l'infiltration de CAFs positifs pour la Mefline était corrélée à un meilleur pronostic pour les patients atteints de PDAC. Au contraire, l'absence de Mefline a favorisé la progression tumorale dans un modèle murin de PDAC (KPC) et l'ablation génétique des CAFs positifs pour la Mefline dans un modèle de greffe syngénique par la toxine diphtérique a entraîné une faible différenciation des tumeurs. En revanche, la surexpression exogène de Mefline dans les CAFs a permis de bloquer la croissance tumorale (modèle murin immunodéficient de xénogreffe sous-cutanée de PSCs et cellules tumorales humaines) (Mizutani et al. 2019). Dans l'ensemble, les données suggèrent que la Mefline est un marqueur des CAFs inhibant la progression du PDAC.

LRRC15

En utilisant la transcriptomique à cellule unique, Dominguez et ses collaborateurs ont identifié en 2020 une sous population de myCAFs exprimant la protéine LRRC15 dans un modèle murin KPP (*Pdx1^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};p16/p19^{flox/flox}*). Ces CAFs LRRC15+ entourent les îlots tumoraux et sont absents du tissu pancréatique normal. Chez les patients, la présence de CAFs LRRC15+ a été confirmée sur des données issues d'une étude de séquençage de l'ARN à cellule unique (scRNA-seq) sur des patients, réalisée par Peng et ses collègues (Dominguez et al. 2020). En outre, des essais cliniques d'immunothérapie portant sur plus de 600 patients atteints de six types de cancer ont révélé que des niveaux élevés de CAFs LRRC15+ étaient corrélés à une mauvaise réponse à la thérapie anti-PD-L1. Ces travaux montrent l'importance du ciblage des composants non immunitaires du microenvironnement afin de stimuler les réponses des patients aux immunothérapies (Dominguez et al. 2020).

B. La MEC : acteur clé de la progression tumorale dans le PDAC

Une des particularités du stroma du PDAC est qu'il se caractérise par une fibrose très importante. La matrice responsable de cette fibrose se compose majoritairement de collagènes fibrillaires tels que le collagène I dont la quantité a été corrélée à une survie plus courte chez les patients atteints de PDAC (Whatcott et al. 2015). En effet, Whatcott et ses collaborateurs montrent que les patients ayant un taux élevé de collagène I ont une survie de 6.4 mois alors que ceux qui présentent un taux faible de cette protéine matricielle ont une survie de 14.6 mois (Whatcott et al. 2015). De plus, l'étude menée par le groupe de Kalluri déplaçant le collagène I (présentée dans le paragraphe A.1 « myCAFs ») met en lumière le rôle fondamental du collagène I dérivé des myofibroblastes dans la régulation de l'immunité tumorale et la limitation de la progression du PDAC (Y. Chen et al. 2021). De manière intéressante, la structure du collagène I (homo/hétérotrimère) peut également impacter

son rôle. En Effet, une récente étude menée par le même groupe montre que contrairement à l'hétérotrimère normal de collagène I ($\alpha 1/\alpha 2/\alpha 1$) produit par les fibroblastes murins, les cellules cancéreuses pancréatiques humaines et murines produisent spécifiquement un homotrimère unique de collagène I, $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 1$. Alors que la délétion du collagène 1 hétérotrimère dans les fibroblastes favorisait la progression tumorale dans le modèle KPPF α SMA-Cre;R26^{Dual} (Y. Chen et al. 2021), la suppression des homotrimères de Col1 dans les cellules tumorales augmente la survie globale des souris dans les modèles murins KPC et KPPC (*LSL-Kras*^{G12D/+}; *Trp53*^{loxP/loxP}; *Pdx1-Cre*). Ceci est associé à une reprogrammation du microbiome tumoral et à une amélioration de l'infiltration des cellules T et de l'efficacité de l'immunothérapie anti-PD-1. Cette étude montre encore une fois la complexité du collagène I et de son organisation dans la progression tumorale. Il est donc nécessaire d'être prudent quant à son ciblage (Y. Chen et al. 2022). Le clivage du collagène I peut également avoir un rôle dans la progression tumorale. En effet, Tian et ses collaborateurs montrent que la protéine BMP1 responsable de l'activité de la prolylprotéase C clivant les collagènes fibrillaires, bloque la croissance tumorale et les métastases dans un modèle murin de xénogreffe de PDAC et dans les cellules tumorales humaines de PDAC exprimant des niveaux élevés de collagène I (C. Tian et al. 2021).

Un autre collagène retrouvé dans l'espace interstitiel dont le dépôt est augmenté dans le PDAC, est le collagène IV. Une étude *in vitro* bloquant ce collagène (*via* le blocage des intégrines α_1 , α_2 , et β_1 interagissant avec lui) a montré une réduction de la prolifération et migration des cellules tumorales humaines mais également une augmentation de leur apoptose (Daniel Öhlund et al. 2013b). De manière notable, les patients atteints de cancer du pancréas montrent des niveaux élevés de collagène IV près de la tumeur mais également dans le sang. De plus, après chirurgie, un taux élevé de collagène IV circulant est indicateur de rechute et de survie réduite (D Öhlund et al. 2009). Cependant, tout comme le collagène I, la quantité du collagène IV n'est pas le seul paramètre à prendre en considération. En effet, sa localisation peut avoir différents impacts sur la progression tumorale. Le collagène IV est fortement retrouvé dans les membranes basales, notamment des vaisseaux, où il est fondamental pour le maintien de l'intégrité, de la stabilité et de la fonction vasculaire (Gross et al. 2021; Pöschl et al. 2004). Barrett et ses collaborateurs ont montré que le collagène IV se trouvant dans les membranes basales est perdu au cours de la progression du PDAC dans un modèle murin KTC (*Kras*^{LSL-G12D/+} *Tgfb β 2*^{fllox/+} *Ptf1a-Cre*), et que sa perte, tout comme la perte des autres protéines de la membrane basale, favorise l'apparition de métastases (Koikawa et al. 2018; Barrett et al. 2018). La perte du collagène IV dans les membranes basales est principalement due à l'action de la MMP-9. Or, dans le PDAC, l'expression de cette MMP est corrélée à l'apparition de métastases et la réduction de la survie des patients (CHO et al. 2011).

En plus des collagènes, la MEC du PDAC se compose de glycoprotéines telles que la fibronectine et la périostine. La périostine est fortement exprimée dans le stroma du PDAC et elle favorise l'agressivité des cellules tumorales en facilitant l'assemblage du collagène. Une récente étude menée par Karakas et ses collaborateurs montre que supprimer cette protéine dans les PSCs humaines par CRISPR-Cas9 diminue la quantité de collagène et augmente l'infiltration des cellules NK qui induisent alors la mort des cellules tumorales dans des sphéroïdes (composés de cellules tumorales pancréatiques humaines et PSCs) (Karakas et al. 2023). La fibronectine stimule également la prolifération des cellules tumorales et facilite leur interaction avec les collagènes en établissant des ponts *via* les intégrines (Zeltz, Orgel, and Gullberg 2014). Alors qu'une forte expression stromale de la fibronectine est détectée dans la plupart des cas de cancer du pancréas (84,8 % des résections), son expression n'est pas corrélée à la survie sans progression ou globale des patients, mais est corrélée à la taille de la tumeur (D. Hu et al. 2019). La galectine-1 fait aussi partie des glycoprotéines déposées en grande quantité dans le PDAC et qui est impliquée dans la régulation de la prolifération, de l'invasion et des métastases. Sa délétion dans un modèle murin de PDAC (K-Ras+/LSLG12V;Elas-tTA/tetO-Cre;p53lox/lox) améliore la survie des souris en diminuant l'activation du stroma et la vascularisation mais aussi en augmentant l'infiltration de cellules T dans la tumeur (Orozco et al. 2018). SPARC, glycoprotéine notamment connue pour moduler l'organisation de la MEC en se liant à certains collagènes, est également augmentée dans les tumeurs pancréatiques. Cependant, contrairement à la galectine, la délétion totale de SPARC *in vivo* (modèle murin de greffe orthotopique) augmente l'apparition de métastases, au moins en partie, *via* une augmentation de la perméabilité vasculaire (réduction du recouvrement péricytaire associé à une réduction de la quantité de MB autour des vaisseaux) (S. A. Arnold et al. 2010). Cette déstructuration des vaisseaux, induite par la perte de SPARC, est réversée par la surexpression de MMP-9 (dont l'expression peut être induite par SPARC) dans les cellules tumorales. Cette normalisation des vaisseaux dans les tumeurs SPARC-/- MMP9+ diminue presque totalement l'apparition de métastases, mais favorise la croissance de la tumeur primaire (S. Arnold et al. 2008). Ces études révèlent une interaction évidente entre la MMP-9 et SPARC dans la régulation des métastases et de l'angiogenèse.

Enfin, la matrice du PDAC se compose de protéoglycanes tels que l'acide hyaluronique (HA) dont l'expression est un facteur de mauvais pronostic pour les patients. En effet, les patients avec un taux élevé de HA ont une survie réduite (9.3 mois) comparé aux patients avec un taux faible (24.3 mois) (Whatcott et al. 2015). Ce protéoglycane est notamment connu pour réguler la pression de fluide interstitiel (PFI) *via* son interaction avec les molécules d'eau puisqu'elle est chargée négativement. La délétion enzymatique de l'HA par le PEGPH20 a permis de normaliser la PFI et ainsi d'améliorer l'entrée des chimiothérapies dans la tumeur permettant une meilleure survie des souris (modèles

murins KC et KPC) (Paolo P. Provenzano et al. 2012). Malheureusement, les résultats d'essais cliniques chez les patients n'ont pas été concluants (Van Cutsem et al. 2020).

C. Ciblage des CAFs et de la MEC dans le PDAC

Étant donné l'importance des CAFs et de la MEC dans la croissance tumorale et la réponse au traitement, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques, pour pallier au manque d'efficacité des chimiothérapies classiques, s'est concentrée sur leur ciblage.

C.1. Ciblage des CAFs

Le monde scientifique ayant longtemps pensé que les CAFs n'avaient qu'un rôle pro-tumoral, plusieurs thérapies ont été développées dans le but de les détruire. Bien qu'une étude menée par Lo et ses collaborateurs ait montré que la déplétion des CAFs (par l'utilisation de cellules CAR T ciblant les cellules FAP+) réduisait la croissance tumorale, la desmoplasie et l'angiogenèse dans des modèles murins de PDAC (KPC et un modèle de greffe sous-cutanée de cellules tumorales) (Lo et al. 2015), une autre a montré que la déplétion de certaines sous-populations de CAFs (α SMA+) augmentait l'immunosuppression et l'agressivité des tumeurs de PDAC *in vivo* (modèle murin PKT) (Özdemir et al. 2014). Ces études mettent en évidence la complexité d'une telle approche visant à cibler les CAFs pro-tumoraux sans impacter les anti-tumoraux.

C.1.1. Reprogrammation des CAFs vers un état quiescent

Dans ce contexte, une nouvelle stratégie thérapeutique ayant pour but de normaliser les CAFs plutôt que de les détruire a émergé. Le but de cette stratégie est de reprogrammer les CAFs vers un phénotype quiescent et non activé ou d'empêcher les PSCs de s'activer en CAFs. Une étude préclinique menée par Sherman et ses collaborateurs a démontré que la stimulation des récepteurs de la vitamine D (par le calcipotriol), qui sont exprimés par les cellules stromales et diminuent l'activation des PSCs, réduit la fibrose observée dans le PDAC et conduit à une meilleure entrée de la gemcitabine dans la tumeur augmentant ainsi la survie des souris KPC comparé à la gemcitabine seule (Sherman et al. 2014). Ainsi, plusieurs essais cliniques (NCT03520790, NCT03300921, NCT04617067...) ont évalué l'efficacité de la vitamine D et de ses analogues en monothérapie ou en combinaison avec des chimiothérapies. Par exemple, l'essai clinique de phase 1 et 2 NCT03520790 combinant la gemcitabine, le nab-paclitaxel et le paricalcitol (agoniste du récepteur à la vitamine D) a été développé avec 112 participants et a une fin estimée pour 2025. L'ATRA, un métabolite de vitamine A, peut également reprogrammer les CAFs vers leur état quiescent d'origine. En reprogrammant les PSCs humains dans le PDAC, l'ATRA a permis de bloquer le remodelage matriciel et l'invasion des cellules tumorales pancréatiques humaines *in vitro* (dans un modèle 3D contenant

du matrigel)(Chronopoulos et al. 2016). Dans des essais cliniques de phase 1, il s'est avéré sûr et tolérable en association avec la gemcitabine et le nab-paclitaxel (NCT03307148) (Kocher et al. 2020). Plusieurs autres essais cliniques utilisant l'ATRA sont en cours dans le PDAC dont l'essai de phase IIb combinant la gemcitabine et le nab-paclitaxel avec l'ATRA (NCT04241276, fin 2024) et l'essai de phase I combinant le nivolumab (anti-PD1) avec l'ATRA (NCT05482451, fin 2025).

C.1.2. Ciblage de la signalisation des CAFs

Plusieurs stratégies ont été développées afin de cibler les CAFs dans le PDAC et notamment les facteurs qu'ils sécrètent. Parmi ces facteurs, on retrouve LIF dont le blocage est en essai clinique de phase 1 (NCT03490669). LIF joue un rôle dans la progression tumorale du PDAC en tant que régulateur de la différenciation cellulaire, du renouvellement et de la survie cellulaire (Wrona et al. 2021). L'essai clinique utilisant un anticorps monoclonal anti-LIF (MSC-1 (AZD0171)) dans les cancers solides dont le PDAC, semble prometteur puisqu'il est bien toléré et que certains patients présentent une survie sans progression prolongée (Borazanci et al. 2022). Cet anticorps est également en essai clinique de phase 2 avec le durvalumab (anti-PDL1) en association avec la gemcitabine et le nab-paclitaxel chez des patients atteints de PDAC présentant une infiltration de cellules T CD8+ (déterminé par des marquages sur des biopsies lors de l'inclusion des patients) (NCT04999969). Le sécrétome des CAFs favorisant la survie, la migration et l'invasion des cellules tumorales, notre groupe a développé une approche pharmacologique permettant d'inhiber la synthèse protéique en utilisant un analogue de la somatostatine, le SOM230. Dans un modèle murin immunodéficient de xénogreffe orthotopique de CAFs et de cellules tumorales humaines de PDAC, bien que le SOM230 ne bloque pas la croissance tumorale, il empêche l'apparition de métastases (Moatassim-Billah et al. 2016). Ces résultats ont été confirmés dans un modèle murin immunocompétent de xénogreffe orthotopique de PSCs et de cellules tumorales murines de PDAC. De plus, dans cette étude de Samain et ses collaborateurs, il a été démontré que le SOM230 empêche l'apparition de métastases en diminuant la quantité de CSF-1 sécrété par les CAFs (Samain et al. 2021). Une autre stratégie est de moduler les voies de signalisation liées aux CAFs telles que le TGF- β et Hedgehog (Hh). Comme évoqué précédemment, le TGF- β est un acteur clé de l'activité pro-tumorale des CAFs. Plusieurs inhibiteurs du TGF- β (ciblant le ligand ou le récepteur) font l'objet d'essais cliniques en monothérapie (NCT00844064) ou en combinaison avec des immunothérapies (NCT02734160, NCT04624217) ou des chimiothérapies (NCT02154646, NCT01373164, NCT04935359). Parmi les essais cliniques en combinaison avec des immunothérapies on retrouve l'essai NCT02734160 combinant le galunisertib (antagoniste du TGFBR1) et le durvalumab (anti-PD-L1) dans lequel, parmi les 32 patients (atteints d'un cancer pancréatique métastatique) traités, un patient a montré une réponse partielle, 7 ont montré une maladie stable, 15 ont eu une progression objective de la maladie, et 9 n'ont pas pu être

évalués (Melisi et al. 2021). On retrouve aussi des essais combinant le ciblage du TGF- β avec des chimiothérapies. L'essai NCT04935359 en cours de phase 3 combine la gemcitabine et le nab-paclitaxel avec le NIS793 qui est un anticorps monoclonal IgG2 anti-TGF- β entièrement conçu pour inhiber la voie du TGF- β . Cet essai se terminera en 2026. Enfin, des essais combinent le blocage du TGF- β avec à la fois des chimiothérapies et immunothérapies. C'est le cas de l'essai de phase 1 et 2 NCT04624217 combinant la gemcitabine, le paclitaxel et le SHR-1701 qui est une nouvelle protéine de fusion bifonctionnelle composée d'un anticorps monoclonal anti-PD-L1 fusionné avec le domaine extracellulaire du récepteur II du TGF β . Concernant le ciblage de la signalisation Hh, bien que la plupart des inhibiteurs n'aient pas montré d'effet bénéfique, le sonidegib (LDE225), qui favoriserait la réduction de la quantité de MEC, a montré une certaine efficacité en association avec la gemcitabine et le nab-paclitaxel après un traitement préalable par FOLFIRINOX en phase 1 et 2 (NCT02358161) (Pijnappel et al. 2021). Cependant le ciblage de cette voie doit être surveillé puisque la suppression de la protéine Sonic Hedgehog, bien qu'elle réduise le contenu stromal, a été montrée comme pouvant augmenter l'agressivité de la tumeur et la densité vasculaire dans un modèle murin PKCY (Pdx1-Cre;KrasLSL-G12D/+;p53fl/+;Rosa26LSL-YFP/+) ce qui expliquerait l'échec de certains inhibiteurs de Hh dans les essais cliniques (Rhim et al. 2014).

La voie de signalisation CXCL12/CXCR4 a aussi été ciblée dans le PDAC. L'inhibition de cette voie permet la modulation du microenvironnement du PDAC en réduisant l'immunosuppression puisque l'interaction CXCL12 (sécrété par les iCAFs) avec CXCR4 diminue l'infiltration des cellules T CD8 dans la tumeur (modèle murin KPC) (Feig et al. 2013). Un essai clinique de phase 2 a été mené chez des patients atteints de PDAC utilisant le BL-8040 (antagoniste de CXCR4) en combinaison avec le pembrolizumab (anti-PD1) et une chimiothérapie onyvide (irinotecan, leucovorin, 5-FU) (NCT02826486). Dans cette étude menée sur 37 patients atteints de PDAC par Bockorny et ses collaborateurs, le taux de contrôle de la maladie était de 34,5 % comprenant neuf patients avec une maladie stable et un patient avec une réponse partielle. Le BL-8040 augmente l'infiltration tumorale des lymphocytes T CD8, réduit les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) et les cellules Treg circulantes. Ces données suggèrent que le blocage combiné de CXCR4 et PD-1 pourrait être bénéfique pour le traitement du PDAC (Bockorny et al. 2020).

C.2. Ciblage de la MEC

C.2.1. Ciblage direct et indirect

La matrice peut être ciblée de manière directe en dégradant différentes protéines matricielles. Une étude menée par Provenzano et ses collaborateurs a ciblé l'acide hyaluronique notamment en induisant sa dégradation par la hyaluronidase PEGPH20. Cette dernière a permis d'augmenter la perfusion vasculaire et par conséquent l'entrée des traitements dans la tumeur et la survie lors

d'essais précliniques (modèles murins KC et KPC) (Paolo P. Provenzano et al. 2012). Suite à cela, un essai clinique combinant PEGPH20 et la gemcitabine plus nab-paclitaxel a été développé et a amélioré la survie sans progression des patients atteints de PDAC et plus encore chez les patients ayant un taux élevé de HA dans la tumeur (Hingorani et al. 2018). Sur la base de ces résultats prometteurs, une étude de phase III a été menée sur des patients présentant une forte teneur en HA dans la tumeur mais les résultats ont été décevants puisque la survie globale des patients dans le groupe PEGPH20 plus chimiothérapie était de 11,2 mois contre 11,5 mois dans le groupe chimiothérapie seule (Van Cutsem et al. 2020). Pire encore, une autre étude menée par Ramanathan et ses collaborateurs combinant le PEGPH20 et le FOLFIRINOX modifié (mFOLFIRINOX) a révélé que le PEGPH20 conduit à une survie globale des patients plus courte en comparaison à la chimiothérapie seule (Ramanathan et al. 2019).

Une autre stratégie thérapeutique est de cibler la MEC de manière indirecte en inhibant les protéines impliquées dans son remodelage. C'est notamment le cas de la LOX, dont le blocage par un anticorps *in vivo* (modèle murin KPC) a permis de diminuer la réticulation de la matrice et de bloquer la migration et l'invasion des cellules tumorales (Miller et al. 2015). D'autre part, l'inhibition de la LOX a permis d'améliorer la survie des souris en favorisant l'effet de la gemcitabine. Toutefois, dans un modèle murin de PDAC ayant des tumeurs localement avancées, l'inhibition de la LOX en combinaison avec la chimiothérapie n'a pas amélioré la survie des souris KPC principalement à cause du fait que dans ce modèle, la MEC est déjà bien établie (Miller et al. 2015). Les inhibiteurs de MMPs ont aussi été évalués dans de nombreuses tumeurs solides en raison de leur rôle fondamental dans la modulation du stroma tumoral, avec des données précliniques encourageantes (A. Winer, Adams, and Mignatti 2018). Cependant, les résultats cliniques ont été décevants dans le PDAC. En effet, le marimastat (inhibiteur de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12,) et BAY12-9566 (inhibiteur de MMP-2, MMP-3, MMP-9) ont été étudiés en comparaison avec la gemcitabine en tant que traitement de première ligne chez les patients atteints de PDAC à un stade avancé et ont démontré des résultats moins bons qu'avec la gemcitabine seule (survie globale de 3.74 mois pour le BAY12-9566 versus 6.59 mois pour la gemcitabine) (Moore et al. 2003; Evans et al. 2001).

C.2.2. Ciblage de la signalisation induite par la MEC

Enfin, des études ont été menées afin de cibler différentes voies de signalisations induites par la MEC et étant impliquées dans la progression tumorale. C'est le cas de certains régulateurs de la mécanotransduction tels que FAK. Stokes et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition de FAK par le PF-562271 inhibe la prolifération et migration des cellules tumorales pancréatiques humaines *in vitro*, et diminue la croissance tumorale et l'apparition de métastases dans un modèle murin

immunodéficient de greffe orthotopique de cellules tumorales pancréatiques humaines (Stokes et al. 2011). Le groupe de DeNardo a également montré que l'inhibition de FAK par le VS-4718 dans des modèles murins développant spontanément un PDAC (KPC et KPPC) réduit la fibrose, améliore la survie des souris et diminue la présence de populations immunosuppressives dans la tumeur. De manière intéressante, le groupe montre que ces effets sont dus au rôle de FAK spécifiquement dans les cellules tumorales. En effet, lorsque FAK est délété spécifiquement dans les cellules tumorales murines (par shARN) et que ces cellules sont ensuite greffées dans des souris, les auteurs observent une réduction du volume tumoral et des cellules immunosuppressives dans les tumeurs *in vivo*. Enfin, les auteurs montrent que l'inhibition de FAK par le VS-4718 dans un modèle murin KPPC rend les tumeurs sensibles à la chimiothérapie (gemcitabine) et immunothérapie (anti-PD1)(Jiang et al. 2016). Basés sur ces études précliniques montrant un effet bénéfique de l'inhibition de FAK, plusieurs essais cliniques utilisant le Defactinib (inhibiteur de FAK) ont été menés (NCT05669482 en cours de recrutement, NCT04331041 en cours de recrutement, NCT03875820 actif, NCT02465060 actif). Ces essais cliniques seront développés dans le chapitre III partie III.C.2 « Etudes cliniques dans le PDAC ».

III. Vaisseaux dans le PDAC

Comme évoqué précédemment, l'une des principales caractéristiques du PDAC est l'abondance du stroma due à une réaction desmoplastique importante. Cette réaction induit une pression interstitielle élevée comprimant les vaisseaux sanguins et conduisant à la mise en place d'un microenvironnement hypovasculaire et hypoxique. De plus, cette compression vasculaire empêche la pénétration des drogues dans la tumeur, contribuant ainsi au manque d'efficacité des chimiothérapies conventionnelles dans le traitement du PDAC (Paolo P. Provenzano et al. 2012).

A. Formation des vaisseaux dans le PDAC

Comme dans tout cancer solide, les cellules tumorales et stromales du PDAC envoient des signaux favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse), ce qui permet d'apporter les éléments nutritifs essentiels à la tumeur tout en facilitant sa propagation. L'angiogenèse est activée par des molécules pro angiogéniques telles que le VEGF qui est considéré comme étant l'acteur clé de la régulation de la croissance et du maintien des vaisseaux pathologiques chez l'Homme et la souris (Ellis and Hicklin 2008). Dans le PDAC, il existe différents types de vascularisation : l'angiogenèse par bourgeonnement (sprouting), l'angiogenèse intussusceptive, le mimétisme

vasculaire (vascular mimicry) et la vasculogénèse (Figure 17).

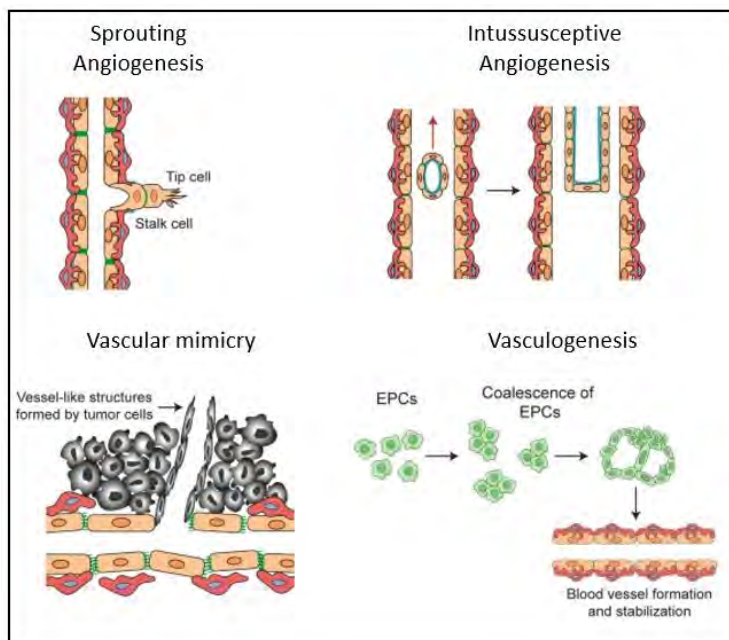


Figure 17 : Types de formation des vaisseaux (Lugano, Ramachandran, and Dimberg 2020)

Il existe un autre type de formation vasculaire non angiogénique appelé la cooptation qui est un mécanisme par lequel les cellules tumorales s'approvisionnent en sang en détournant et en se déplaçant le long de la vascularisation préexistante. Cependant, dans le cadre du cancer du pancréas,

ce mécanisme de vascularisation n'a été montré que dans un type de tumeurs correspondant aux tumeurs neuroendocrines, je n'aborderai donc pas ce type de formation vasculaire (M. Franco et al. 2011).

A.1. Angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement (ou sprouting) est un mécanisme de formation de vaisseaux à partir d'un vaisseau préexistant. On retrouve deux différents types cellulaires impliqués dans ce mécanisme d'angiogenèse : les cellules apicales (tip cells) et cellules de la tige (stalk cells). Alors que les cellules apicales se trouvent sur le front vasculaire à la recherche de stimuli angiogéniques grâce à leurs filopodes, les cellules de la tige s'alignent derrière les cellules apicales et prolifèrent de manière importante afin d'allonger le vaisseau nouvellement formé (Potente, Gerhardt, and Carmeliet 2011). En présence de VEGF, une cellule endothéliale peut devenir une cellule apicale et induire par la suite l'expression de DLL4 (Delta-like ligand 4) qui, en se liant au récepteur Notch présent sur les cellules endothéliales voisines, empêche leur différenciation en cellule apicale (Hellström et al. 2007). Une fois la cellule apicale formée, les cellules de la tige prolifèrent et migrent favorisant ainsi l'angiogenèse (étapes abordées dans le chapitre I (partie sur les vaisseaux)). Contrairement aux autres cancers, le PDAC se caractérise par une faible formation vasculaire éloignant ainsi les vaisseaux des cellules tumorales et favorisant l'hypoxie dans la tumeur.

A.2. Angiogenèse intussusceptive

La caractéristique typique de l'angiogenèse par intussusception est la formation d'un pilier intraluminal. Cette formation comprend 4 étapes clés : 1/ les cellules endothéliales des parois vasculaires opposées entrent en contact les unes avec les autres et forment un pont transluminal, 2/ les membranes basales du côté abluminal des cellules endothéliales formées par le pont sont dégradées et la cellule endothéliale adhère à un faisceau de collagène voisin, 3/ le faisceau de collagène I synthétisé par les cellules endothéliales s'étend et atteint l'autre côté de la lumière, et enfin 4/ les péricytes et les myofibroblastes migrent vers le pilier de collagène et génèrent des tissus connectifs qui favorisent la maturation des cellules. Une fois le pilier formé, il se divise en deux nouveaux vaisseaux permettant ainsi une augmentation de la densité des micro vaisseaux (Paku et al. 2011).

A.3. Mimétisme vasculaire

Le mimétisme vasculaire (ou vascular mimicry) (MV) est un autre type de vascularisation non angiogénique faisant intervenir les cellules cancéreuses. Dans ce mécanisme, les cellules tumorales peuvent imiter les cellules endothéliales et directement former des canaux similaires aux vaisseaux. Dans le cancer du pancréas, le MV est corrélé à une faible différenciation de la tumeur, un stade

clinique avancé, des métastases ganglionnaires et il est un facteur de mauvais pronostic (Jian Yang et al. 2017). Le MV peut être induit par différentes molécules et passe par l'expression de VE-cadhérine. En effet, une étude menée par Guo et ses collaborateurs a montré que l'inhibition de VE-cadhérine par le ginsenoside Rg3 réduit considérablement la formation de vaisseaux par MV dans un modèle murin de xénogreffe de cellules tumorales pancréatiques humaines (J.-Q. Guo et al. 2014). De plus, Yang et ses collaborateurs ont identifié que le facteur HIF-2 α favorise le MV par les cellules tumorales pancréatiques en liant Twist1 à la VE-cadhérine *in vitro* (cellules tumorales humaines) et dans un modèle murin immunodéficient de xénogreffe (Jian Yang et al. 2017). Enfin, la voie de signalisation ERK1/2 – MMP2/9 semble également être impliquée puisque l'inhibition de ERK1/2 par le JQ1 bloque la formation de MV *in vitro* (dans des lignées tumorales humaines) et *in vivo* (modèle murin immunodéficient de xénogreffe de cellules tumorales humaines) (Zhuo et al. 2019).

A.4. Vasculogénèse

Bien que la plupart des tumeurs forment de nouveaux vaisseaux par angiogénèse, il a été démontré que la vasculogénèse contribue également à la croissance tumorale. Ce mécanisme correspond à une formation spontanée de nouveaux vaisseaux à partir de cellules progénitrices endothéliales (CPE) dérivées de la moelle osseuse. Dans le cancer du pancréas, les CPE (identifiées par le marqueur CD133) sont très concentrées dans le tissu tumoral des patients (26 fois plus concentrées que dans le pancréas normal). De plus, un fort taux de CPE est associé à un mauvais pronostic (survie réduite) comparé à ceux avec un taux normal (Vizio et al. 2010). Certains facteurs angiogéniques, tels que le VEGF ou l'angiopoïétin-1 sécrétés par les cellules tumorales pancréatiques, permettraient le recrutement de CPE et leur différenciation en cellules endothéliales afin de former de nouveaux vaisseaux facilitant la croissance tumorale mais également l'apparition de métastases (Vizio et al. 2013). Sonic Hedgehog, un autre facteur sécrété par les cellules tumorales, facilite également le recrutement de CPE et favorise leur fonction pro angiogénique *in vitro* (en co-culture) et *in vivo* (modèle murin de xénogreffe dans lequel les progéniteurs sont marqués en GFP afin de les suivre) notamment en induisant l'expression de facteurs solubles comme Ang-1 et IGF-1 (Nakamura et al. 2010).

B. Caractéristiques des vaisseaux dans le PDAC

Le PDAC est caractérisé par une desmoplasie très importante qui génère des pressions de fluide interstitiel (PFI) anormalement élevées. Alors qu'en condition physiologique la PFI est comprise entre 8 et 13 mmHg, dans le cancer du pancréas elle se trouve entre 75 et 130 mmHg chez la souris. Cette augmentation de pression résulte en un collapsus des vaisseaux et un blocage de l'entrée des drogues dans la tumeur de souris KC et KPC malgré une perméabilité importante (Paolo P.

Provenzano et al. 2012). De plus, dans le PDAC comme dans d'autres cancers, une densité de microvaisseaux (DMV) importante est associée à une croissance tumorale élevée, une faible différenciation tumorale et une augmentation de l'apparition de métastases chez les patients (Hoem et al. 2013). En outre, les vaisseaux présentent une distribution hétérogène dans la tumeur. En effet, Barău et ses collaborateurs ont identifié que les DMV sont significativement plus élevées dans les zones intra-tumorales de patients que dans les zones péri-tumorales ou le tissu sain (Barău et al. 2013). Di Maggio et ses collaborateurs suggèrent que les PSCs activés peuvent moduler l'hétérogénéité spatiale des vaisseaux puisqu'ils observent que le stroma des tumeurs pancréatiques de patients est peu vascularisé contrairement au pancréas normal entourant la tumeur (Di Maggio et al. 2016). Lorsque les PSCs sont reprogrammés vers un état quiescent par l'utilisation de l'ATRA, le phénotype vasculaire est réversé (montré dans des essais d'angiogenèse *ex vivo* en utilisant des anneaux aortiques de souris). De manière intéressante, les auteurs montrent que la concentration en collagène peut également influencer la formation de vaisseaux par bourgeonnement, des concentrations intermédiaires étant les plus favorables pour l'angiogenèse dans des cultures organotypiques en 3D (composées de collagène/Matrigel, de cellules endothéliales humaines, de cellules tumorales humaines et de PSCs humains) (Di Maggio et al. 2016).

En plus de présenter une distribution spatiale hétérogène, les vaisseaux nouvellement formés du PDAC ont une intégrité altérée notamment due à un faible recouvrement péricytaire. Lorsque ce recouvrement est amélioré, les vaisseaux sont alors normalisés inhibant ainsi la croissance tumorale. McCarty et ses collaborateurs ont montré que lorsqu'ils greffent *in vivo* des cellules tumorales pancréatiques surexprimant PDGF-BB, connu pour stimuler la prolifération des péricytes, la croissance tumorale est diminuée et le recouvrement des cellules endothéliales par les péricytes augmenté. Lorsque ces souris sont traitées avec un inhibiteur de PDGF-BB, la quantité de péricytes est réduite et la croissance tumorale augmentée (McCarty et al. 2007). Une autre étude menée par Gilles et ses collaborateurs a montré que dans un modèle de PDAC dans lequel la nucleoline (protéine exprimée à la surface des cellules endothéliales facilitant l'angiogenèse) est inhibée, l'amélioration du recouvrement péricytaire (due à la régulation de molécules angiogéniques induite par le ciblage de la nucléoline) s'accompagne d'une meilleure perfusion tumorale et d'une réduction de l'hypoxie dans un modèle murin immunodéficient de greffe orthotopique de cellules tumorales pancréatiques humaines. De plus, cette normalisation vasculaire améliore l'administration de la gemcitabine et son efficacité (Gilles et al. 2016). Enfin, Wang et ses collaborateurs ont révélé qu'une DMV élevée combinée à une altération du recouvrement péricytaire des vaisseaux sont de mauvais pronostic chez le patient (W.-Q. Wang et al. 2013). Ainsi, il est clair que la quantité et la qualité des vaisseaux tumoraux sont à prendre en compte pour le pronostic des patients atteints de PDAC.

C. Ciblage des vaisseaux dans le PDAC

Basé sur toutes les caractéristiques des vaisseaux pathologiques du PDAC, il est apparu évident pour la communauté scientifique que les cibler pourrait être bénéfique pour les patients. Pour cela, différents anti angiogéniques ont été développés et testés en essais cliniques chez les patients atteints de cancer pancréatique. A l'heure actuelle, il n'existe aucun antiangiogénique approuvé par la FDA pour traiter le PDAC, malgré les nombreux essais cliniques menés ces dernières années. Un essai clinique de phase II utilisant le bevacizumab, un anti-VEGF, associé à la gemcitabine chez des patients atteints de PDAC métastatique semblait être prometteur (Hedy L. Kindler et al. 2005). Toutefois, l'essai clinique de phase III de cette étude n'a pas amélioré la survie globale des patients (Hedy Lee Kindler et al. 2010). Dans un autre essai clinique de phase III, des patients atteints de PDAC métastatique ont été traités avec le bevacizumab en combinaison avec la gemcitabine et l'erlotinib (inhibiteur de RTK agissant sur l'EGFR). Malheureusement cet essai n'a pas permis une amélioration de la survie globale des patients même si leur survie sans progression était allongée (Van Cutsem et al. 2009). Un autre grand essai clinique de phase III a été mené sur des patients atteints de PDAC avancé, qui ont reçu de la gemcitabine associée ou non à un inhibiteur pan-VEGFR, l'axitinib. Encore une fois, la survie globale n'a pas été améliorée interrompant ainsi l'essai (Hedy L. Kindler et al. 2011). Enfin, le sorafenib, un anti angiogénique inhibiteur multikinases, a également été étudié dans le cadre d'un essai randomisé multicentrique et n'a pas permis d'améliorer la survie globale (Gonçalves et al. 2012). Malgré les succès obtenus dans d'autres tumeurs solides, l'échec répété des thérapies anti angiogéniques dans le PDAC exige que leur utilisation soit revue.

C'est dans ce cadre qu'a émergé le concept de normalisation vasculaire qui consiste à réduire les fuites vasculaires afin d'améliorer la perfusion tumorale mais également augmenter le recouvrement péricytaire des vaisseaux améliorant ainsi l'administration des traitements standards (Rakesh K. Jain 2005). Différentes stratégies précliniques de normalisation vasculaire ont été proposées, exploitant plusieurs cibles moléculaires. La sémaphorine 3A (SEMA3A) est une molécule sécrétée par les cellules endothéliales, qui favorise la normalisation vasculaire physiologique par des effets régulateurs négatifs sur les intégrines et qui est perdue au cours de la progression tumorale dans différents modèles murins de cancer dont le cancer pancréatique neuroendocrine (Maione et al. 2009). Dans un modèle murin de PDAC (greffe orthotopique), l'expression d'un isoforme mutant de SEMA3A (en raison de ses capacités à se lier fortement au récepteur PLXNA4) conduit à une normalisation des vaisseaux en réduisant leur perméabilité anormale. Il a ainsi permis d'inhiber la croissance tumorale, d'empêcher les métastases et d'améliorer l'entrée et l'efficacité de la gemcitabine (Gioelli et al. 2018).

IV. Composante immunitaire dans le PDAC

La vascularisation anormale du PDAC ainsi que la présence excessive de matrice extracellulaire, qui forme une barrière physique autour des cellules tumorales, entravent l'infiltration des cellules immunitaires. C'est la raison pour laquelle le PDAC est désigné comme un cancer "froid", car il se distingue par une faible entrée de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL). Dans le microenvironnement du PDAC, l'infiltration immunitaire est déséquilibrée en faveur d'un phénotype immunosuppresseur, avec une forte prévalence de MDSC, de macrophages pro-tumoraux M2 et de Tregs, par rapport aux cellules pro-inflammatoires telles que les macrophages anti-tumoraux M1, les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4 et CD8 effecteurs (Padoan, Plebani, and Basso 2019) (Figure 18). Globalement, le fait que le PDAC soit un désert immunitaire, peut expliquer le fait que les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire n'aient toujours pas montré d'efficacité dans ce cancer.

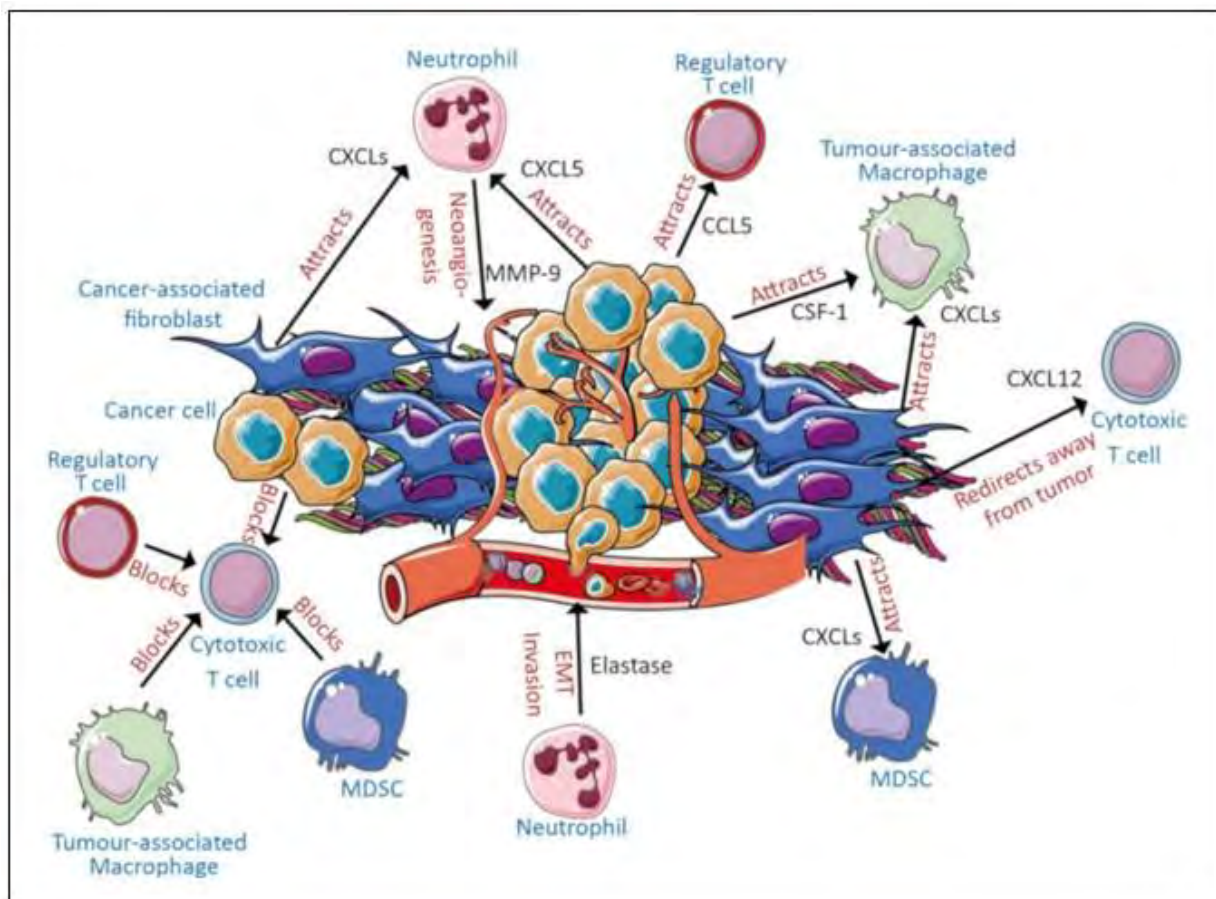


Figure 18 : Cellules immunitaires dans le PDAC (Melzer et al. 2020)

A. TILs : cellules T CD4 et T CD8

Les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) sont impliqués dans la limitation du développement et de la progression tumorale. Les TILs les plus étudiées sont les cellules T CD8 et T CD4.

Les cellules T CD8 (cellules T cytotoxiques, LT CD8) identifient tout d'abord les cellules tumorales comme des cellules étrangères grâce au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Par la suite, les LT CD8 activées (par les cellules présentatrices d'antigènes leur apportant les antigènes reconnus par le TCR) détruisent par lyse cytotoxique les cellules tumorales présentant à leur surface des peptides antigènes associés à la tumeur (Fukunaga et al. 2004). Un niveau élevé d'infiltration intra-tumorale de LT CD8 est associé à une meilleure survie des patients. En effet, alors que les patients atteints de PDAC présentant un faible taux de LT CD8 ont une survie de 18,9 mois, ceux avec un taux élevé ont une survie de 27,5 mois (Carstens et al. 2017). Afin de contrer l'effet anti-tumoral des LT CD8, les cellules tumorales peuvent induire différents mécanismes leur permettant soit de ne pas être reconnues notamment en réduisant l'expression à leur surface de CMH-I, soit en bloquant l'activité des LT CD8 *via* l'expression de points de contrôle immunitaire tels que PD-1 et CTLA-4 (Martinez-Bosch, Vinaixa, and Navarro 2018). L'échappement immunitaire des cellules tumorales *via* l'utilisation de ces points de contrôle immunitaire a conduit au développement clinique d'inhibiteurs de points de contrôle immunitaire tels que les anticorps anti-CTLA-4, anti-PD-1 et anti-PD-L1 dans le PDAC. Malheureusement, le PDAC étant une tumeur froide, ces immunothérapies n'ont pas montré d'effet bénéfique chez le patient (les anti-CTLA-4 n'améliorent la survie que de 4.14 mois) (Kabacaoglu et al. 2018). Enfin, les cellules tumorales échappent également au système immunitaire *via* la sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que le TGF β , l'IL-6 et d'autres induisant le recrutement de cellules immunosuppressives telles que les MDSC, les macrophages M2 et les Treg qui bloquent l'activité anti-tumorale des lymphocytes T effecteurs (CD4 et CD8) (Martinez-Bosch, Vinaixa, and Navarro 2018).

Les LT CD4 jouent aussi un rôle important dans la réponse immunitaire. Ces cellules peuvent cibler les cellules tumorales en les éliminant par des mécanismes cytolytiques tout comme les CD8 (de manière dépendante de la perforine/granzyme B) (Kennedy and Celis 2008). Parmi les CD4, on retrouve les Th1 qui sécrètent l'IFN- γ , cytokine pro-inflammatoire favorisant la cytotoxicité des LT CD8 cytotoxiques, mais également les Th2 qui présentent des fonctions plutôt pro-tumorales en produisant des cytokines (IL-4, IL-5, IL-13) et en contribuant à la différenciation des macrophages en un phénotype M2 pro-tumoral *via* la sécrétion d'IL-13 et IL-4 (Foucher et al. 2018). De plus, l'abondance des cellules Th2 par rapport aux Th1 est corrélée à une diminution de la survie des patients. Parmi les LT CD4 on retrouve également les Tregs qui inhibent l'activation des LT CD8 (*via*

l'expression des points de contrôle immunitaire CTLA-4 et PD-1) et dont le nombre est inversement associé aux LT CD8 dans des tumeurs de patients (Hiraoka et al. 2006).

B. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules présentatrices d'antigènes capables d'induire des réponses immunitaires spécifiques à l'antigène. Elles sont responsables de la reconnaissance et de la capture des antigènes étrangers, puis les présentent aux LT pour déclencher une réponse immunitaire. Les CD sont également impliquées dans la tolérance immunitaire en présentant des antigènes propres au corps pour éduquer les LT à ne pas les attaquer. Elles jouent un rôle majeur dans l'immunité anti-tumorale, en particulier les CD myéloïdes qui expriment des marqueurs de surface spécifiques, tels que CD11b et CD11c, qui les distinguent des autres cellules dendritiques. Les CD sont rares dans le microenvironnement du PDAC et sont principalement localisées en périphérie de la tumeur chez le patient (Dallal et al. 2002). Lorsque les CD sont retrouvées en grande quantité dans la circulation et au sein de la tumeur de PDAC, la survie globale des patients est améliorée quel que soit le stade de la maladie (métastatique ou résécable) (Yamamoto et al. 2012). De manière intéressante, Fukunaga et ses collaborateurs ont identifié que le nombre de CD infiltrant la tumeur chez le patient est significativement plus élevé dans les PDAC avec infiltration de TILs CD4 et CD8 suggérant ainsi que si l'on trouve des TILs dans la tumeur, tous les composants clés d'une réponse immunitaire anti-tumorale sont présents, permettant ainsi de générer une réponse anti-tumorale depuis la présentation des antigènes associés à la tumeur par les CD jusqu'à l'interaction des lymphocytes T CD4 et CD8 pour lyser les cellules tumorales (Fukunaga et al. 2004). Comme le PDAC se caractérise par une réduction du nombre et de la fonction des CD et que ces dernières contribuent à l'activité immunitaire anti-tumorale, des stratégies vaccinales à base de CD ou des agents favorisant la maturation des CD tels que les agonistes CD40 ont été évalués dans le PDAC (Deicher et al. 2018). Par exemple, des souris KPC traitées avec un vaccin de cellules dendritiques par injection intrapéritoneale, ont vu leur survie prolongée notamment grâce à la stimulation de la réponse anti-tumorale des cellules T (Jia Yang et al. 2019). Une étude récente menée par Liu et ses collaborateurs montre que l'administration intra-tumorale soutenue d'anticorps monoclonal CD40 (par l'intermédiaire d'une graine nanofluidique à élution de médicaments) module le microenvironnement en réduisant l'immunosuppression pour réduire la charge tumorale dans des modèles murins (KPC et modèle de xénogreffe) (H.-C. Liu et al. 2023). Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours dans le PDAC (NCT05650918, NCT05484011).

C. Macrophages associés à la tumeur (TAM)

Les macrophages font partie des cellules stromales abondantes dans le microenvironnement. Les TAMs interagissent avec différents types cellulaires dont les cellules souches cancéreuses, les cellules tumorales, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les lymphocytes T et B et les cellules NK (N. Wang et al. 2021). Les TAMs sont classiquement divisés en deux groupes : les macrophages polarisés M1 et les macrophages polarisés M2. Alors que les macrophages M1 sont caractérisés par un phénotype pro-inflammatoire (sécrétion d'IL-6, d'IL-1 β , d'IL-12, de TNF- α ...), les macrophages M2 présentent des propriétés anti-inflammatoires favorisant la progression tumorale (sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que le TGF- β 1 et l'IL-10) (montré *in vitro* avec des TAMs isolés de patients en co-culture avec des cellules tumorales pancréatiques humaines) (Helm et al. 2014). Kurahara et ses collaborateurs ont identifié qu'un taux élevé de TAMs et plus particulièrement de M2 dans les tumeurs de patients atteints de PDAC est corrélé à une lymphangiogenèse ganglionnaire accrue et un mauvais pronostic. De plus, ce groupe révèle que le taux de survie à 5 ans des patients ayant un taux faible de macrophages M2 est de 28% alors qu'il est de 5% chez les patients ayant un taux élevé (Kurahara et al. 2011). Une étude plus récente menée par Sadozai et ses collaborateurs confirme que les patients ayant une survie à long terme (survie globale \geq 60 mois) présentent des taux plus faibles de macrophages M2 que des patients ayant une survie courte (Sadozai et al. 2021). Il a été démontré que les cytokines inflammatoires sécrétées par les macrophages peuvent être impliquées dans l'initiation du cancer pancréatique. En effet, *via* leur sécrétion de cytokines inflammatoires telles que RANTES ou le TNF α , les macrophages peuvent induire, *ex vivo* (modèle 3D contenant des cellules acineuses pancréatiques murines et macrophages murins dans du collagène) la trans-différenciation des acini (ADM) favorisant l'apparition de lésions pré-néoplasiques par l'activation de NF κ B et de ses gènes cibles impliqués dans la régulation de la survie, la prolifération et la dégradation de la MEC (Liou et al. 2013). Enfin, plusieurs cytokines (CCL2, CSF-1...) permettant le recrutement des macrophages M2 sont retrouvées dans le microenvironnement des tumeurs de patients afin de favoriser l'immunosuppression du PDAC (Kadomoto, Izumi, and Mizokami 2021; Habtezion, Edderkaoui, and Pandol 2016).

D. Interactions CAFs - cellules immunitaires

Les cellules immunitaires du microenvironnement du PDAC interagissent avec les cellules tumorales mais également avec les CAFs. Par exemple, ces derniers jouent un rôle crucial dans la limitation de la migration des lymphocytes T cytotoxiques (LTC) dans la tumeur. Le blocage de cette migration implique différents mécanismes dont la surproduction de CXCL12 (ligand de CXCR4), et l'activation de manière excessive de FAK. Une étude préclinique menée par le groupe du Dr Denardo a montré que

l'inhibition de FAK dans un modèle murin KPC permet de réduire les cellules immunosuppressives et de potentialiser l'efficacité de l'immunothérapie par blocage points de contrôle immunitaire (Jiang et al. 2016). L'inhibition ayant lieu dans toutes les cellules et les CAFs étant très abondants dans le PDAC, on peut supposer que l'inhibition de FAK dans les CAFs joue un rôle important. De même, l'utilisation d'un antagoniste du récepteur CXCR4 a augmenté l'accumulation de lymphocytes T CD8 dans la tumeur et a montré une synergie avec l'anticorps anti-PD-L1 pour réduire la charge tumorale dans un modèle préclinique de PDAC (modèle KPC) (Feig et al. 2013). Les CAFs sont également capables de diminuer la fonction des LTC grâce à la sécrétion de facteurs solubles tels que l'IL-6, le TGF β , la prostaglandine E2 ainsi que par l'expression de PD-L1 (Gorchs and Kaipé 2021). En plus de leur interaction avec les LTC, les CAFs interagissent avec les cellules myéloïdes immunosuppressives en sécrétant des cytokines inflammatoires telles que le GM-CSF, l'IL-6, le VEGF et le M-CSF. Ces voies favorisent la différenciation des cellules mononucléaires du sang périphérique en MDSC *in vitro* (Mace, Bloomston, and Lesinski 2013). L'interaction complexe entre les cellules tumorales, les CAFs et les cellules immunitaires révèle des mécanismes pro-tumoraux interconnectés au sein du microenvironnement.

Enfin, les matrices sécrétées par les CAFs dans le PDAC peuvent également impacter le recrutement des cellules immunitaires. Par exemple, les fibres de collagène de type I servent de guide à la migration des lymphocytes T humains *in vitro*, l'emportant sur les signaux de guidage des cellules tumorales, ce qui conduit à leur accumulation anormale dans le compartiment riche en fibrose (périphérie de la tumeur) dans des tumeurs de patients (Hartmann et al. 2014). En plus de l'organisation et de la densité des fibres, la composition de la MEC régit l'infiltration des lymphocytes T, car elle peut renforcer (par exemple, l'HA) ou supprimer (par exemple, le versican) leur migration (montré *in vitro* avec des lymphocytes T humains) (Evanko et al. 2012).

E.Ciblage de la composante immunitaire dans le PDAC

Les progrès en immunothérapie offrent de nouvelles perspectives de traitement pour certaines tumeurs autrefois résistantes à la chimiothérapie, mais le PDAC demeure principalement insensible au blocage des points de contrôle immunitaire (BCI). Les études menées avec le BCI en tant qu'agent unique, ou en combinaison (entre eux), utilisant des anticorps anti-PD-1 et anti-CTLA4 ont montré des taux de réponse globale de 0% et 3% respectivement (en agent unique), ce qui est très décevant (Royal et al. 2010; O'Reilly et al. 2019).

Comme évoqué précédemment, une stratégie est de cibler le stroma afin de le rendre favorable à l'immunothérapie en perturbant l'axe CXCR4/CXCL12 (Bockorny et al. 2020). Une autre stratégie

consiste à bloquer le recrutement de cellules immunosuppressives dans la tumeur en inhibant l'axe chimioattractif CCL2-CCR2, qui est impliqué dans le recrutement des TAMs et notamment des macrophages M2. Un essai clinique de phase I sur le PDAC localement avancé a montré que l'association du PF-04136309 (un inhibiteur oral de CCR2) avec la chimiothérapie FOLFIRINOX a entraîné un taux de réponse globale de 49% et un taux de contrôle de la maladie de 97% (Nywening et al. 2016). Cependant, un autre essai associant le même inhibiteur de CCR2 avec la gemcitabine/nab-paclitaxel a été interrompu prématurément en raison d'un manque d'efficacité (Noel et al. 2020). De même, l'inhibition de CSF1-R, qui réduit le recrutement des TAMs dans des tumeurs de souris greffées orthotopiquement et favorise leur repolarisation pour stimuler la présentation de l'antigène et l'activation des lymphocytes T, a été étudiée. Zhu et ses collaborateurs montrent que cette inhibition de CSF1-R en synergie avec le BCI, n'a pas permis d'augmenter la survie sans progression des patients dans une étude de phase II évaluant le cabiralizumab (anti-CSF1-R) en combinaison avec un anti-PD-1 avec ou sans chimiothérapie dans le PDAC avancé (NCT03336216) (Zhu et al. 2014). Cependant, plusieurs autres études utilisant des inhibiteurs de CSF1-R en combinaison avec différentes associations de chimiothérapie et d'immunothérapie sont en cours (NCT05627427, NCT02777710, NCT03153410).

Une stratégie complémentaire dans le traitement du PDAC consiste à renforcer les capacités cytotoxiques du système immunitaire adaptatif. Les lymphocytes T CD8 jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire anti-tumorale, et leur activation peut être améliorée en ciblant les récepteurs co-stimulateurs. Les anticorps agonistes ciblant ces récepteurs, tels que l'anti-CD40, ont montré des résultats prometteurs dans le PDAC. En effet, des études de phase I utilisant un agoniste de CD40 ont montré une augmentation des LT CD8, des CD matures et une réduction des macrophages M2 pro-tumoraux dans les tumeurs de patients (Beatty et al. 2013; Byrne et al. 2021). Dans l'essai clinique de phase Ib combinant une chimiothérapie (gemcitabine/nab-paclitaxel) et l'agoniste de CD40 (APX005M) avec ou sans anti-PD1, un taux de réponse globale de 58% a été observé chez des patients atteints de PDAC métastatique, avec un profil de tolérance acceptable (O'Hara, O'Reilly, Varadhachary, et al. 2021). Cependant, dans l'essai clinique de phase II, la chimiothérapie associée à l'anti-PD1 et à l'APX005M n'a pas montré d'amélioration de la survie globale par rapport au groupe sans APX005M (O'Hara, O'Reilly, Wolff, et al. 2021).

Les vaccins sont également étudiés dans le PDAC et ont montré des résultats variables. Le vaccin GVAX, qui est composé de cellules tumorales allogéniques entières irradiées, modifiées pour exprimer le GM-CSF, a induit une meilleure infiltration de LT effecteurs lorsqu'il est administré avant la résection chirurgicale (Lutz et al. 2014). Dans une étude de phase II, l'association de cyclophosphamide/GVAX (qui induit une immunité des lymphocytes T contre les antigènes du

cancer), avec CRS-207, un vaccin à base de bactéries (permettant d'induire l'immunité innée et adaptative), a montré une amélioration de la survie globale des patients par rapport à ceux recevant une chimiothérapie de deuxième ligne (6,1 mois contre 3,9 mois) (Le, Wang-Gillam, et al. 2015). Bien que cette étude semblait renforcer la réponse des LT CD8, un essai de phase IIb, évaluant la combinaison de cyclophosphamide/GVAX/CRS-207, n'a pas montré de différence significative en terme de survie globale par rapport à la chimiothérapie en monothérapie (Le et al. 2019). L'ajout d'un anti-PD-1 à la combinaison de GVAX/cyclophosphamide/CRS-207 ne donne pas d'avantage de survie aux patients (Le, Crocenzi, et al. 2015).

Enfin, la dernière stratégie développée est le transfert de cellules adoptives, notamment la thérapie des LT à récepteur antigénique chimérique (CAR-T). Bien que cette stratégie ait donné des résultats cliniques remarquables pour les patients atteints de cancers hématologiques, ce n'est pas le cas du PDAC. Une étude menée par Kondo et ses collaborateurs portant sur les CAR T dans le PDAC a utilisé des lymphocytes T cytotoxiques sensibilisés avec une lignée cellulaire de cancer du pancréas, YPK-1, exprimant MUC1 (exprimé par les cellules tumorales) pour reconnaître et détruire les cellules tumorales. En parallèle, les patients ont reçu, par injection intra-dermale, des cellules dendritiques chargées avec le peptide MUC1 afin de mieux stimuler les lymphocytes T cytotoxiques (injectés en intraveineux). Sur les 20 patients traités, un patient atteint de multiples métastases pulmonaires a obtenu une réponse complète et cinq autres ont présenté une maladie stable (H. Kondo et al. 2008). Cependant, tout comme les LT CD8, les CAR T ont du mal à infiltrer la tumeur c'est pourquoi il est primordial d'associer ces thérapies à des traitements normalisant le stroma. L'efficacité de CAR T ciblant les CAFs FAP+ a été évaluée par Liu et ses collaborateurs et démontre que cette stratégie permet d'augmenter les activités anti-tumorales de la thérapie CAR T séquentielle en remodelant le microenvironnement, au moins partiellement par l'inhibition du recrutement des MDSC dans des modèles murins de xénogreffes de PDAC (Yifan Liu et al. 2023).

Chapitre III : Focale adhésion kinase (FAK)

I. Caractéristiques et activation de FAK

La Focale Adhésion Kinase (FAK) est une protéine tyrosine kinase cytoplasmique ubiquitaire qui joue un rôle essentiel dans la régulation du mouvement cellulaire (adhésion, migration, invasion), et participe également à la régulation de la prolifération et la survie cellulaire. Elle a été découverte pour la première fois en 1992 par le groupe de Parsons qui l'a identifiée aux sites d'adhésion cellulaire entre la MEC et les intégrines dans des cellules embryonnaires de poulet (M. D. Schaller et al. 1992). FAK est activée par des signaux de stimulation provenant des intégrines, des facteurs de croissance et d'autres voies de signalisation cellulaires (Parsons 2003).

A. Gène et structure

A.1. Gène

PTK2 (Protein Tyrosine Kinase 2), gène codant pour FAK, est situé sur le chromosome humain 8q24.3. Il est exprimé de manière omniprésente dans la plupart des cellules du corps humain (M. D. Schaller et al. 1994; Zachary 1997). Il existe également le gène PTK2B qui code pour la protéine PYK2 (Proline-rich Tyrosine Kinase 2), qui est un orthologue de FAK avec une similarité de séquence d'acides aminés d'environ 45%. Dans certains modèles de souris knockout pour PTK2, la protéine PYK2 peut compenser certaines fonctions de FAK (Mitra, Hanson, and Schlaepfer 2005; S.-T. Lim, Chen, et al. 2008; S.-T. Lim et al. 2010). Une étude menée par Lipinski et ses collaborateurs a montré que PYK2 peut jouer un rôle similaire à celui de FAK dans la signalisation cellulaire, en particulier dans les processus de migration cellulaire et d'adhésion des cellules tumorales de gliome *in vitro* (Lipinski et al. 2005). Lorsque FAK est absente, PYK2 peut être activé pour remplir certaines des fonctions de FAK dans ces processus. C'est le cas dans les cellules tumorales et endothéliales mais également les fibroblastes (Jean et al. 2014; Sulzmaier, Jean, and Schlaepfer 2014). En effet, la surexpression de PYK2 induit la réorganisation du cytosquelette pour compenser le défaut mécanique observé en condition où FAK est délétée dans les fibroblastes murins embryonnaires (MEF). Cependant, il est important de noter que FAK et PYK2 ne sont pas totalement interchangeables, et des différences fonctionnelles et d'expression entre ces deux protéines peuvent exister dans certains contextes cellulaires ou pathologiques (comme la réparation épithéliale intestinale suite à une blessure (induite *in vivo* par traitement au sulfate de dextrane de sodium) dans laquelle FAK et PYK2 sont tous deux nécessaires) (Thomas et al. 2019).

A.2. Structure

FAK se compose de trois sous-domaines principaux : un domaine d'homologie de la bande protéique 4.1-ezrin-radixine-moesin (FERM) à l'extrémité N-terminale, un domaine kinase central et un domaine de ciblage de l'adhérence focale (FAT, focal adhesion targeting) à l'extrémité C-terminale (Figure 19).

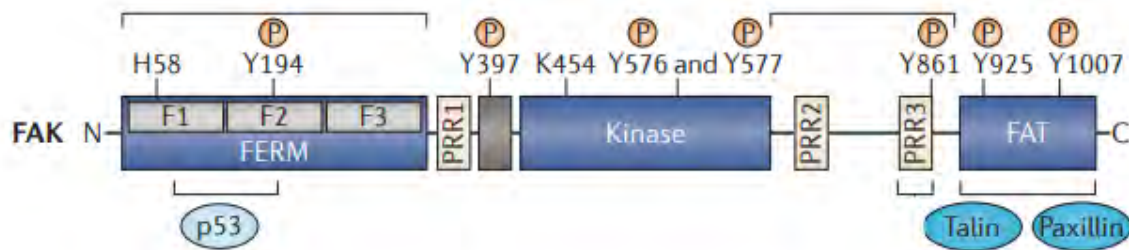


Figure 19 : Structure de FAK (Sulzmaier, Jean, and Schlaepfer 2014)

Les deux domaines terminaux sont séparés par une région de liaison riche en proline (PRR). Dans cette structure, certains sites spécifiques jouent un rôle crucial dans l'activation de FAK. Parmi ceux-ci on retrouve les sites tyrosine (Y) les plus importants comprenant notamment la tyrosine Y397, mais on trouve également le site lysine K454 et le site histidine H58 qui ont tous deux leur importance (Sulzmaier, Jean, and Schlaepfer 2014). Alors que le site Y397 est le site clé de l'autophosphorylation de FAK permettant son activation, le site K454 est un site de liaison à l'ATP et est essentiel pour la fonction catalytique de la kinase FAK. Quant à H58, il est impliqué dans la régulation de l'activité enzymatique de la kinase. Ces sites spécifiques sont importants pour l'activation et la fonction de FAK dans la signalisation cellulaire. La phosphorylation de ces sites peut être régulée par divers signaux extracellulaires (liaison matrice-intégrine) et intracellulaires (modifications de pH), permettant ainsi à FAK de répondre aux besoins fonctionnels des cellules (Sulzmaier, Jean, and Schlaepfer 2014).

Les fonctions de FAK peuvent être divisées en deux catégories principales : les fonctions dépendantes de l'activité kinase et les fonctions indépendantes de la kinase, également appelées fonction scaffold. Les fonctions dépendantes de la kinase de FAK sont principalement associées à la signalisation médiée par les intégrines au niveau des adhésions focales, où FAK régule la migration cellulaire, l'adhésion et la prolifération. Cependant, FAK agit également comme une chaperonne (scaffold) indépendamment de sa fonction kinase, en participant à des interactions protéine-protéine. Par exemple, FAK peut former un complexe avec la protéine p53 dans le noyau cellulaire de fibroblastes primaires humains pour favoriser la prolifération cellulaire et la survie en induisant la dégradation protéosomale de p53 (S.-T. Lim, Chen, et al. 2008; Golubovskaya and Cance 2007). Le domaine FERM

de FAK est crucial pour ses interactions avec d'autres protéines. Par exemple, il peut interagir avec la région cytoplasmique des intégrines (Dunty et al. 2004), le récepteur tyrosine kinase RET (Plaza-Menacho et al. 2011), le PDGFR et l'EGFR (Sieg et al. 2000), la queue cytoplasmique de la VE-cadhérine (X. L. Chen et al. 2012). Ainsi, FAK peut former des complexes protéiques indépendamment de la phosphorylation, agissant comme une chaperonne pour réguler divers processus cellulaires et améliorer la survie cellulaire *in vitro* via FERM (S.-T. Lim, Chen, et al. 2008).

B. Activation de FAK

L'activation de FAK et sa signalisation en aval sont des processus complexes. Initialement, FAK est sous forme de monomères auto-inhibés se maintenant ainsi sous une forme inactive (Walkiewicz, Girault, and Arold 2015). Cette conformation inhibitrice est maintenue par des interactions entre les domaines FERM et kinase de FAK, qui empêchent l'autophosphorylation de FAK sur la tyrosine 397 (montré par cristallographie) (Lietha et al. 2007). La signalisation médiée par les intégrines est l'un des principaux activateurs de FAK. Lorsque les intégrines se lient à la MEC, cela déclenche un signal qui libère l'interaction auto-inhibitrice entre les domaines FERM et kinase de FAK (Parsons et al. 2008). En conséquence, FAK subit une autophosphorylation sur la tyrosine 397 *via* sa dimérisation. L'état de dimère de FAK augmente l'efficacité de la trans-autophosphorylation de cette protéine (Brami-Cherrier et al. 2014). Deux sites de dimérisation de FAK ont été identifiés, l'un dans le domaine FERM et l'autre dans le domaine FAT. L'autophosphorylation de FAK induit un changement conformationnel qui expose un site de liaison SH2 de haute affinité pour la protéine Src. Src peut alors interagir avec FAK et la phosphoryler sur les tyrosines 576 et 577. Ces étapes sont nécessaires pour une activation complète de l'activité kinase de FAK (Figure 20) (Frame et al. 2010). Cette cascade de phosphorylations et de modifications conformationnelles permet à FAK d'acquérir une activité kinase maximale et d'amorcer la signalisation en aval, affectant ainsi différentes voies de signalisations cellulaires.

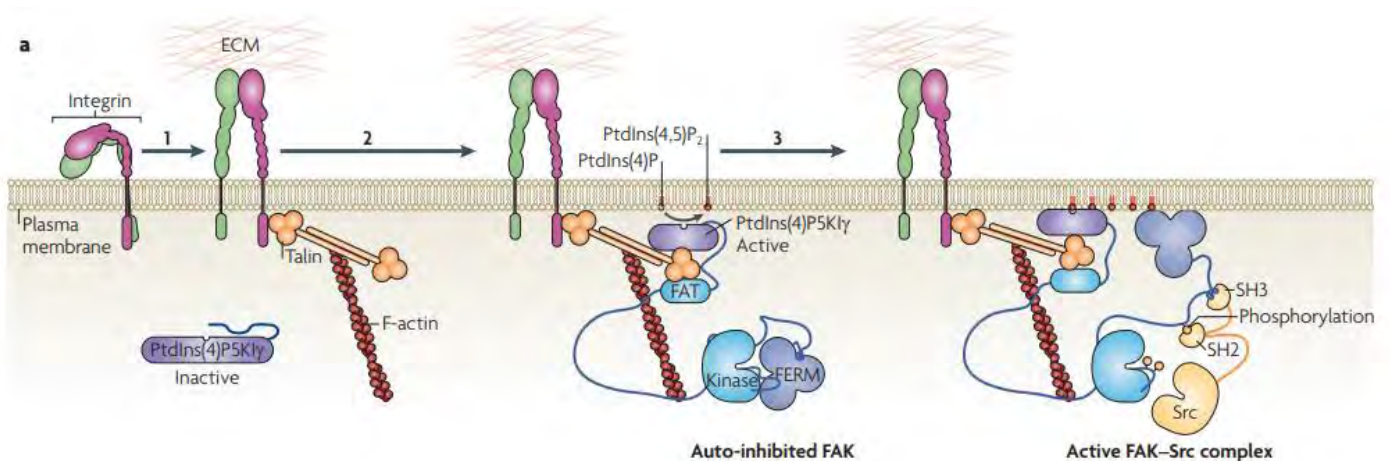


Figure 20 :Activation de FAK. L'engagement des intégrines dans la MEC active et regroupe les intégrines (étape 1). Les intégrines regroupées provoquent le regroupement des protéines d'adhésion focale intracellulaire, FAK, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns (4,5) P2) et talin. Talin stabilise la liaison de l'intégrine au cytosquelette d'actine. PtdIns(4)P5Kly interagit avec la talin par son extrémité C terminale, ce qui libère son autoinhibition. La liaison de FERM au (PtdIns (4,5) P2) induit une conformation relâchée, un regroupement de FAK et une dimérisation transitoire FERM : FERM et FAT : FAT. La dimérisation transitoire de FERM : FERM et de FAT : FAT permet la trans-phosphorylation autorégulée de FAK Y397 (étape 2). La phosphorylation de FAK Y397 crée un site de liaison sur le domaine SH2 pour Src. Src phosphoryle ensuite FAK sur plusieurs sites, induisant une activation complète de la FAK par un changement de conformation qui inclut la libération de FERM:kinase (étape 3) (Frame et al. 2010).

L'activation de FAK peut être influencée par différents paramètres tels que l'augmentation du pH. Cela se produit par la déprotonisation de l'histidine 58 (H58) au sein de la structure de FAK. Cette déprotonisation est en partie médiée par les échangeurs de sodium et d'hydrogène présents dans la membrane plasmique des cellules (montré *in vitro* sur des MEF) (Choi et al. 2013). Par ailleurs, les intégrines jouent un rôle crucial dans la mécanodétection (mécanosensing), c'est-à-dire la capacité des cellules à détecter et à répondre aux forces mécaniques de leur environnement. Les fluctuations de force au sein des adhésions focales, où les intégrines se lient à la MEC, peuvent conduire à l'activation de FAK. Ces forces mécaniques induisent une augmentation de la phosphorylation de paxilline par FAK, ce qui renforce sa liaison au cytosquelette d'actine. Cela favorise également le recrutement de vinculine aux adhésions focales et la maturation des points d'adhésion focaux dans les fibroblastes (MEF) (Plotnikov et al. 2012). En résumé, les augmentations locales du pH et les forces mécaniques exercées sur les intégrines au niveau des adhésions focales sont des mécanismes importants impliqués dans l'activation de FAK et la régulation de ses fonctions cellulaires. De plus, le promoteur du gène de FAK peut également être activé par les facteurs de transcription tels que NF- κ B, BACH1, ETV1, ETS1, NANOG, AGO2 et ETV4. En revanche, p53 et ATF3 ont un effet inverse (Z. Zhang et al. 2022). En effet, ATF3 est un facteur de transcription pouvant être stimulé par les ROS, dont des niveaux accrus peuvent réduire le niveau transcriptionnel de FAK, réduisant ainsi l'invasion des cellules cancéreuses de la prostate *in vitro* (H. Tian et al. 2021). Quant à p53, il a été montré comme pouvant se lier au promoteur de FAK pour inhiber sa transcription dans des cellules tumorales humaines de colon *in vitro* (Golubovskaya et al. 2008).

C. Modèles murins d'inactivation de FAK

L'utilisation de modèles murins de FAK a permis d'approfondir notre compréhension du rôle de FAK et de l'importance de son activité kinase dans le développement embryonnaire. Les premières études utilisant des knock-out classiques de FAK ont révélé une létalité embryonnaire précoce au stade de la gastrulation (E8.5) (Furuta et al. 1995). Pour étudier spécifiquement la fonction dépendante de l'activité kinase de FAK, des modèles murins knock-in ont été créés. Ces modèles

expriment une forme complète de FAK avec une mutation ponctuelle de la lysine 454 en arginine rendant la protéine kinase inactive en empêchant sa liaison à l'ATP. Ces modèles ont mis en lumière l'importance cruciale de l'activité kinase de FAK dans le développement embryonnaire précoce, puisqu'une létalité embryonnaire précoce a été observée (E9.5) en raison de défauts vasculaires (S.-T. Lim et al. 2010). D'autres modèles murins ont été développés pour étudier l'importance des sites spécifiques de FAK, tels que la suppression de l'exon 15 qui contient le site d'autophosphorylation Y397. Ces modèles murins présentent des défauts de développement, y compris des anomalies vasculaires, des hémorragies, des œdèmes et des anomalies d'organes multiples conduisant à une mortalité à E14.5-16.5 (Corsi et al. 2009). Pour éviter la létalité embryonnaire, des modèles murins avec des délétions conditionnelles de FAK induites par le système génétique inducible de la recombinaison Cre-Lox ont été créés. Ces modèles permettent de supprimer sélectivement FAK au cours du développement ou chez la souris adulte, afin d'étudier les effets de la perte de FAK à des stades spécifiques de la vie. En résumé, les modèles murins de FAK ont permis une meilleure compréhension des fonctions de cette protéine et de sa signalisation dans différents contextes biologiques et ils ont été très utilisés dans différents modèles tumoraux.

II. Signalisations induites par FAK

L'activité kinase de FAK fait référence à la capacité de cette protéine à transférer un groupe phosphate de l'ATP à des résidus de tyrosine spécifiques sur d'autres substrats. Parmi les substrats de FAK on retrouve la paxilline, Src, cortactine, VE-cadhérine, β -caténine et d'autres dont la fonction est modifiée par cet ajout de phosphate par FAK (Figure 21) (Sulzmaier, Jean, and Schlaepfer 2014). Les interactions entre Src et FAK, dépendent du changement conformationnel de FAK et donc de son autophosphorylation sur la tyrosine 397, stimulent également la phosphorylation d'autres protéines associées à FAK, telles que p130Cas. La phosphorylation de FAK en tyrosine 861 permet notamment à p130Cas de se lier à FAK, activant ainsi la voie de signalisation PI3K. D'autre part, la phosphorylation de FAK en tyrosine 925 permet à GRB2 de se lier à FAK, activant ainsi la voie de signalisation des MAPK *in vitro* (dans une lignée cellulaire ovarienne CHO)(Cary et al. 1998). L'activation de FAK a divers effets sur les fonctions cellulaires. Par exemple, elle peut augmenter la motilité cellulaire mais aussi influencer le recyclage des intégrines, le recyclage des contacts focaux, la survie cellulaire et la protection contre l'apoptose dépendante de l'adhésion (appelée anoïkis) ainsi que la régulation de l'angiogenèse (Canel et al. 2010; J. Zhao and Guan 2009).

Bien qu'identifiée pour la première fois dans les adhésions focales, FAK est désormais connue pour être localisée dans plusieurs endroits de la cellule, où elle remplit diverses fonctions (Kleinschmidt and Schlaepfer 2017). FAK peut se localiser sur les membranes endosomales où elle est maintenue active par l'apport de cholestérol et où elle promeut la migration des cellules humaines de carcinome épithélial *in vitro* (Alanko et al. 2015; Takahashi et al. 2021). Elle peut également être localisée aux jonctions adhérentes (JA) entre les cellules endothéliales en interagissant directement avec les récepteurs des cadhérines. Dans ce contexte, l'activité de FAK est essentielle pour l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire induites par le VEGF chez la souris, toutes deux importantes dans la progression tumorale (Brami-Cherrier et al. 2014; X. L. Chen et al. 2012). En outre, un nombre croissant de fonctions sont trouvées pour FAK dans le noyau, toutes affectant l'expression des gènes de diverses manières. FAK possède d'ailleurs 2 séquences d'exportation au noyau (S.-T. Lim, Chen, et al. 2008).

Figure 21 : Signalisations en aval de FAK (Cornillon, Campos, and Guyotat 2003)

Lorsque les intégrines se lient aux protéines de la MEC, elles entraînent la formation d'adhésomes qui sont des structures situées près de la membrane cellulaire, contenant les queues cytoplasmiques des intégrines et de paxilline (Horton et al. 2015). Les adhésions focales sont de grands complexes

protéiques qui se forment sur le côté cytoplasmique de la membrane plasmique et qui, par l'intermédiaire des récepteurs d'intégrine, sont reliés à la MEC à travers la membrane. Cet attachement à la MEC permet aux cellules de gagner en traction lors de la migration des cellules mésenchymateuses et peut être considéré comme l'équivalent des "pieds" qui touchent le "sol" lorsque nous marchons. À l'intérieur de la cellule, le complexe d'adhésion focale est relié aux fibres de stress de l'actomyosine qui, par leur contraction, génèrent les forces de traction de la cellule. Pour une migration cellulaire productive, les adhésions focales doivent être dynamiques et leur formation et leur désassemblage doivent être contrôlés (Wehrle-Haller 2012). FAK est l'un des principaux composants de signalisation dans les adhésions focales permettant ce contrôle. Une étude menée par Zhou et ses collaborateurs, réalisant des simulations de dynamique moléculaire en équilibre et de dynamique moléculaire avec sonde de force du fragment FERM-kinase de FAK, montre que les forces exercées par les fibres de la MEC peuvent ouvrir l'interface FERM-kinase de FAK et augmenter la phosphorylation de FAK en tyrosine 397 (J. Zhou et al. 2015). Cette signalisation induite par les forces de la MEC peut avoir plusieurs conséquences. À titre d'exemple, elle peut entraîner une réorganisation du fuseau mitotique (impliqué dans la division cellulaire) (*in vitro* dans des MEFs), déclencher la prolifération de cellules sensibles aux forces mécaniques (montré dans les MEFs) et augmenter la production de cytokines inflammatoires associées à la fibrose (*in vivo* dans un modèle murin de blessure cutanée) (Petridou and Skourides 2014; Bae et al. 2014; V. W. Wong et al. 2011).

B. FAK dans les jonctions adhérentes intercellulaires

Les jonctions adhérentes (JA) sont des complexes de protéines qui se forment lors des contacts entre les cellules endothéliales ou épithéliales. Elles sont composées de cadhérines, qui sont des protéines transmembranaires formant des homodimères (et plus rarement des hétérodimères), ainsi que de caténines et d' α -actinine, qui maintiennent l'intégrité des jonctions intercellulaires (Cavallaro and Dejana 2011). En réponse à différents signaux cellulaires, des protéines d'adhésion focale telles que FAK, Src, vinculine et Rac GTPase sont recrutées aux JA (Mui, Chen, and Assoian 2016). Dans les cellules endothéliales, une fois activée, FAK peut se lier directement à la VE-cadhérine en réponse à la stimulation du VEGF (montré dans un modèle murin transgénique inactivant la kinase de FAK spécifiquement dans les cellules endothéliales). FAK phosphoryle ensuite la β -caténine et la VE-cadhérine, ce qui déclenche le désassemblage des JA. Au niveau moléculaire, l'interaction entre FAK et VE-cadhérine est médiée par la liaison directe du domaine FERM de FAK (indépendante de son activité kinase) avec le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine conduisant à la phosphorylation de la VE-cadhérine et la β -caténine, dissociation du complexe VE-cadhérine/ β -caténine puis à la translocation nucléaire de la β -caténine (X. L. Chen et al. 2012). Dans les cellules épithéliales, FAK et Src peuvent également être recrutés au niveau des JA, où ils induisent un remodelage de

l'actomyosine *in vitro* (dans une lignée cellulaire MDCK, Madin-Darby canine kidney). Cela entraîne la relaxation de la E-cadhérine et la translocation de la β -caténine vers le noyau (Gayrard et al. 2018). En résumé, FAK joue un rôle crucial dans la régulation des jonctions adhérentes et son recrutement et son activation permettent de moduler l'intégrité et la dynamique de ces structures intercellulaires.

C. FAK dans le noyau

FAK peut également être recrutée dans le noyau *via* différents stimuli (Figure 22).

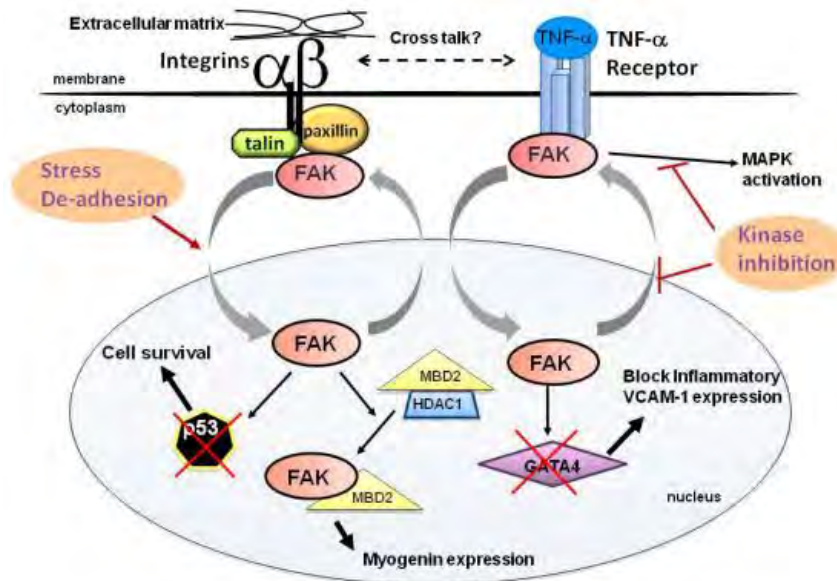


Figure 22 : Stimuli physiologiques conduisant à la translocation de FAK au noyau (S.-T. S. Lim 2013)

Par exemple, en réponse à un stress dans des fibroblastes primaires murins, FAK peut être transloquée vers le noyau grâce à sa séquence de localisation nucléaire (NLS), située dans le résidu F2 du domaine FERM (S.-T. Lim, Chen, et al. 2008). Une fois dans le noyau, FAK peut induire la dégradation protéosomale du suppresseur de tumeur p53, ce qui favorise la survie de cellules d'ostéosarcome en réponse au stress *in vitro* (Golubovskaya, Finch, and Cance 2005). FAK peut également supprimer l'activité transcriptionnelle de p53 en interagissant avec lui, entraînant ainsi l'inhibition de l'expression de ses protéines cibles telles que p21, Mdm-2 et Bax (Golubovskaya, Finch, and Cance 2005). Le stress oxydatif (induit par traitement à l' H_2O_2) peut aussi favoriser la translocation nucléaire de FAK, entraînant la différenciation des cellules musculaires (S.-W. Luo et al. 2009). FAK nucléaire se lie notamment à la protéine MBD2 (protéine de liaison à la méthyl-CpG 2), induisant ainsi la transcription du gène de la myogénine favorisant la différenciation des cellules musculaires. L'interaction entre FAK et MBD2 favorise la dissociation de l'histone désacétylase 1 (HDAC1) du complexe MBD2-HDAC1, qui inhibe normalement la transcription de la myogénine. Cette

interaction FAK-MBD2 jouerait un rôle dans le remodelage de l'hétérochromatine pour activer l'expression génique (Mei and Xiong 2010).

De plus, la désadhésion des cellules vis-à-vis de leur support est un mécanisme qui peut conduire à la localisation nucléaire de FAK. Ce processus permet potentiellement d'augmenter la quantité de FAK libre disponible dans le cytosol en désengageant spécifiquement FAK des adhésions focales (montré *in vitro* dans des fibroblastes primaires murins) (S.-T. Lim, Chen, et al. 2008). Ahn et ses collaborateurs ont montré *in vitro* que XIAP (protéine inhibitrice d'apoptose liée au chromosome X) recrute FAK aux adhésions focales des cellules endothéliales, et l'active sous des conditions de stress mécanique telles que les contraintes de cisaillement (shear stress) (Ahn and Park 2010). L'inhibition de XIAP réduit la phosphorylation de FAK sur sa tyrosine 576 induite par les contraintes de cisaillement et favorise sa translocation nucléaire. Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de FAK à l'aide de composés tels que le PF-562271 ou PF-271 a fortement augmenté la localisation nucléaire de FAK dans des fibroblastes (MEF) *in vitro* (S.-T. Lim et al. 2012).

FAK nucléaire joue également un rôle dans la modulation de l'inflammation. L'étude de Lim et ses collaborateurs a montré *in vitro* que les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α induisent l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation (par exemple VCAM-1) par le biais de la signalisation de FAK dans des MEFs et cellules endothéliales murines primaires (S.-T. Lim et al. 2012). L'inhibition de FAK bloque l'expression de la molécule d'adhésion des cellules endothéliales vasculaires (VCAM-1), une protéine qui joue un rôle clé dans le recrutement des leucocytes *via* son interaction avec l'intégrine α 4, contribuant à l'amplification des réponses inflammatoires (Carter and Wicks 2001; S.-T. Lim et al. 2012). L'inhibition conditionnelle de FAK dans les MEFs et les cellules endothéliales entraîne l'accumulation de FAK nucléaire, favorisant ainsi le renouvellement du facteur de transcription GATA4, essentiel pour l'expression de VCAM-1, en recrutant l'ubiquitine E3 ligase CHIP (protéine d'interaction C-terminus Hsp70) (Ahmad, Theofanidis, and Medford 1998; Dai et al. 2003; S. Kobayashi et al. 2007; Minami and Aird 2001). La régulation de FAK-GATA4 est similaire à celle de FAK-p53, suggérant que FAK FERM nucléaire joue un rôle de chaperonne en favorisant le renouvellement des facteurs de transcription. Ces résultats mettent en évidence le rôle de FAK nucléaire dans la modulation de la réponse inflammatoire, en régulant l'expression de VCAM-1 qui joue un rôle dans l'extravasation des cellules immunitaires.

Une récente étude menée par Griffith et ses collaborateurs a montré que FAK nucléaire contrôle l'accessibilité de la chromatine à un sous-ensemble de gènes dans des cellules de carcinome squameux *in vitro*. En effet, l'accessibilité de la chromatine dépendante de FAK est liée à l'expression différentielle des gènes, y compris de la cytokine et du régulateur transcriptionnel IL-33, qui contrôle l'immunité pro et anti-tumorale. Les auteurs montrent que c-Jun, régule l'expression du gène IL-33

en se liant à son activateur (enhancer) de manière dépendante de la kinase FAK. Cette étude montre que FAK contrôle la transcription *via* l'accessibilité de la chromatine, identifiant ainsi un nouveau mécanisme par lequel FAK nucléaire régule l'expression des gènes (Griffith et al. 2021).

Il est important de noter que la localisation subcellulaire de FAK et son interaction avec les facteurs de transcription peuvent varier en fonction des conditions cellulaires spécifiques et des stimuli environnementaux. Ces différentes localisations de FAK reflètent sa diversité de fonctions et son implication dans la régulation de multiples processus cellulaires.

D. Fonctions dépendantes de FAK en condition physiologique

En condition physiologique, FAK est impliquée dans plusieurs processus dont la prolifération, la survie et la migration cellulaire (Figure 23). Concernant la survie cellulaire, elle dépend de l'adhérence de la cellule et des signalisations induites par les intégrines qui envoient un signal de survie lui indiquant qu'elle est positionnée correctement. En cas d'absence de ce signal, les cellules entrent en apoptose, c'est l'anoïkis. Dans les cellules adhérentes (MEFs), FAK transmet des signaux qui inhibent cette apoptose favorisant ainsi la survie cellulaire *via* plusieurs voies de signalisation (S.-T. Lim, Mikolon, et al. 2008). L'activation de FAK par les intégrines permet également de stimuler la prolifération cellulaire en induisant l'activation de différentes voies de signalisation, de facteurs de transcription mais aussi l'expression de régulateurs de prolifération (tels que les cyclines). Par exemple, FAK peut contrôler la transcription du promoteur de la cycline D1 afin de favoriser la progression du cycle cellulaire *in vitro* (de fibroblastes murins NIH3T3) (Cox et al. 2006).

FAK régule également la migration cellulaire. Les étapes fondamentales de cette migration sont la polarisation cellulaire en réponse à un signal attractant, la régulation de la dynamique des adhésions focales et la régulation du cytosquelette d'actine (Friedl and Wolf 2003b). Lorsqu'une cellule est exposée à des signaux chimio-attractants spécifiques, tels que des facteurs de croissance, elle développe une polarité antéro-postérieure (Michael D. Schaller 2010). FAK régule les Rho GTPases, notamment Rac, Rho et Cdc42, qui jouent un rôle crucial dans la régulation de la contractilité et de la polarisation cellulaire (Nobes and Hall 1999). La phosphorylation de FAK sur la tyrosine 397 favorise la liaison de p120RasGAP à FAK *via* son domaine SH2 puis p120RasGAP facilite la liaison entre FAK et p190A. Dans les cellules ayant Src activé, la polarité cellulaire et le recrutement de p190A dans les adhésions focales dépendent de FAK. L'augmentation de l'activité GTPase-activating protein (GAP) de p190A phosphorylé par FAK Y397, localisée dans les adhésions focales, inhibe l'activité de la RhoA GTPase. Cela est associé à une diminution de la contractilité de l'actine au niveau du bord d'attaque du lamellipode, ce qui permet un mouvement cellulaire directionnel ou polarisé (Tomar and Schlaepfer 2009). Ces mécanismes, impliquant FAK et les Rho GTPases, contribuent à la régulation de

la polarisation cellulaire et de la dynamique du cytosquelette d'actine, favorisant ainsi la migration cellulaire coordonnée et dirigée. FAK joue aussi un rôle clé dans la régulation de la formation, de la maturation et du renouvellement des adhésions focales impliquées dans la migration cellulaire. Des études ont montré que la déplétion de FAK entraîne une augmentation du nombre et de la taille des adhérences focales, ainsi qu'une altération de la motilité cellulaire des fibroblastes (MEF) *in vitro* (Webb et al. 2004; Ilić et al. 1995).

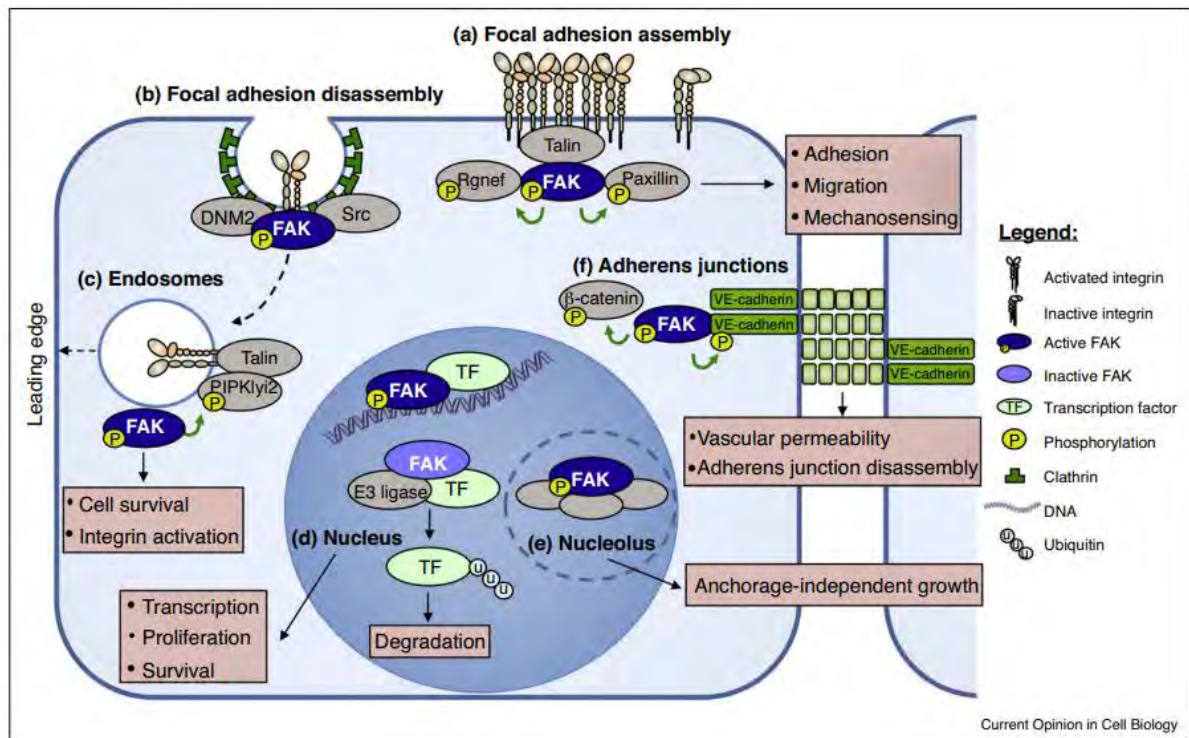


Figure 23 :Fonctions de FAK. (a) Les protéines telles que Rgnes, taline et paxilline contribuent à la localisation de FAK sur les sites de regroupement des intégrines. FAK activée phosphoryle Rgnes et paxilline, favorisant l'assemblage des adhésions focales. (b) FAK lie la dynamine-2 (DNM2), déclenchant le désassemblage de l'adhérence focale et l'endocytose des intégrines. FAK au niveau des adhésions régule l'adhésion, la migration et la détection mécanique des cellules. (c) FAK est activée au niveau des endosomes facilitant l'activation de l'intégrine et la survie des cellules. (d) Dans le noyau, FAK activée se lie à des facteurs de transcription pour moduler l'expression génique. FAK inactive dans le noyau fonctionne comme un échafaudage pour faciliter le renouvellement du facteur de transcription. (e) Dans le nucléole, la formation de complexes de FAK activés avec des protéines sont importantes dans la promotion de phénotypes analogues à des cellules souches. (f) FAK activée se localise aux jonctions adhérentes (JA) et régule le désassemblage de JA (Kleinschmidt and Schlaepfer 2017).

III. Rôle de FAK dans le cancer

FAK est exprimée dans différents types cellulaires et elle possède diverses fonctions dans le cancer. Je présenterai dans cette partie tout d'abord le statut d'expression et d'activation de FAK dans le cancer puis le rôle de cette tyrosine kinase dans la progression tumorale et notamment dans leur survie et leur prolifération, leur phénotype invasif et le phénotype des cellules souches tumorales. Je décrirai ensuite son rôle dans les cellules stromales et notamment les cellules endothéliales, les macrophages et les CAFs. Et enfin je présenterai les avancées thérapeutiques ciblant FAK dans le cancer.

A. FAK dans la cellule tumorale

A.1. Expression et activation de FAK dans la cellule tumorale

La surexpression de FAK dans les cellules tumorales de plusieurs types de cancers solides tels que le cancer de l'ovaire, du pancréas, du sein et d'autres (Golubovskaya, Kweh, and Cance 2009) a été largement rapportée. Une étude clinique a montré une corrélation entre les niveaux de surexpression de FAK et un pronostic clinique défavorable dans différents types de tumeurs, notamment le cancer du sein invasif (Yom et al. 2011). L'amplification génique du gène FAK a été identifiée comme l'un des mécanismes conduisant à sa surexpression. Cette amplification du gène FAK est associée à un pronostic plus mauvais dans le cancer gastrique (J. H. Park et al. 2010). De plus, une augmentation du nombre d'ARNm de FAK a été observée dans les tumeurs invasives et métastatiques telles que les cancers épidermoïdes de la tête et du cou, du poumon et du sein (Weiner et al. 1993; Agochiya et al. 1999; Sulzmaier, Jean, and Schlaepfer 2014). Ces observations suggèrent que la surexpression de FAK joue un rôle dans la progression tumorale et l'agressivité des cancers, ce qui en fait une cible potentielle pour le développement de thérapies anticancéreuses. La compréhension des mécanismes régulant l'expression de FAK dans le contexte du cancer est essentielle pour le développement de stratégies thérapeutiques ciblant cette protéine.

En plus d'être surexprimée, FAK est souvent suractivée dans les cellules tumorales des cancers solides. Andisha et ses collaborateurs ont évalué l'expression des phosphorylations de FAK dans les compartiments membranaire, cytoplasmique et nucléaire des cellules tumorales de patients atteints d'un cancer du sein. Les résultats de l'étude ont montré qu'une forte expression de FAK phosphorylée en position Y397 au niveau membranaire était significativement corrélée à un grade tumoral élevé, à des sous-types moléculaires spécifiques, à une augmentation de la nécrose tumorale, ainsi qu'à une faible survie. De même, une expression élevée de FAK Y397 au niveau nucléaire des cellules tumorales est associée à une réduction de la survie des patients atteints de cancer du sein (Andisha et al. 2019). Ces résultats suggèrent que l'expression et la phosphorylation

spécifique (correspondant à l'activation) de FAK dans différents compartiments cellulaires ont des implications importantes dans la progression et le pronostic tumoral.

A.2. FAK régule la survie et la prolifération tumorale

FAK joue un rôle crucial dans la progression tumorale en favorisant des signaux de prolifération et de survie cellulaire. Lorsque les cellules non-tumorales se détachent de la MEC, cela entraîne une forme d'apoptose appelée l'anoïkis, qui est un mécanisme de mort cellulaire programmée. Cependant, dans les cellules cancéreuses, la signalisation induite par FAK permet aux cellules de survivre en l'absence de signaux d'adhésion (Reddig and Juliano 2005). Ces résultats ont été démontrés dans différents types de cellules tumorales, notamment de carcinome ovarien, de PDAC, de carcinome épidermoïde et de cancer du sein. Dans ces études, l'inhibition pharmacologique de l'activité kinase de FAK ou la suppression génétique de FAK par siARN a entraîné une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses en l'absence de leur adhésion en culture monocouche. Ces résultats soulignent l'importance de la signalisation de FAK dans la survie et la croissance des cellules cancéreuses, en particulier dans des contextes où les cellules sont détachées de la matrice environnante, comme par exemple lorsque les cellules se retrouvent dans la circulation sanguine lors des processus de métastases. La résistance des cellules cancéreuses à l'anoïkis, induite par FAK, est principalement due à l'activation de signaux anti-apoptotiques et pro-survie. L'un des mécanismes par lesquels FAK régule négativement l'apoptose implique la signalisation PI3K/Akt. FAK recrute la sous-unité régulatrice p85 de PI3K, ce qui entraîne la phosphorylation et l'activation de l'enzyme Akt qui, à son tour, phosphoryle et inactive certaines protéines pro-apoptotiques telles que BAD (Datta et al. 1997) et la caspase 9 (Cardone et al. 1998). En inhibant ces protéines, Akt favorise la survie cellulaire en bloquant les voies de mort cellulaire (Paul et al. 2020). De plus, la signalisation de FAK renforce les effets anti-apoptotiques du facteur de transcription NF- κ B dans des lignées leucémiques humaines (Sonoda et al. 2000). NF- κ B est un régulateur clé de la survie cellulaire et son activation par FAK contribue à la résistance des cellules cancéreuses à l'anoïkis (B. Serrels and Frame 2012; Ward et al. 2013).

Dans un modèle murin, l'inactivation conditionnelle de FAK dans les cellules épithéliales intestinales a conduit à une diminution des niveaux de cycline D1, qui est associée à une réduction de la prolifération épithéliale lors du processus de cicatrisation des muqueuses intestinales (Owen et al. 2011). Cette diminution des niveaux de cycline D1 est également observée dans les cellules épithéliales mammaires lorsque FAK est inactivée *in vivo*, ce qui entraîne une réduction de l'activité de la protéine kinase ERK (Nagy et al. 2007). De plus, dans un modèle murin de tumeur mammaire exprimant l'oncogène polyome T (PyMT) sous le contrôle du promoteur MMTV, la suppression

conditionnelle de FAK a diminué l'activation de la protéine p130CAS médiée par Src et la signalisation ERK, ce qui a conduit à une formation retardée de la tumeur spontanée mammaire et à une incidence tumorale réduite (Pylayeva et al. 2009). Il est aujourd'hui clair que l'inhibition de FAK conduit à une réduction de la survie et de la prolifération des cellules tumorales dans différents cancers et plusieurs études récentes le confirment. Par exemple, l'inhibition de FAK dans des cellules tumorales ovariennes humaines par le PF-562271 a bloqué la formation de colonies et induit la sénescence cellulaire en arrêtant le cycle cellulaire en phase G1 par inhibition de la réplication de l'ADN *in vitro* (Pan et al. 2023). Dans le cancer de la tête et du cou, l'inhibition *in vitro* de Src dans des lignées tumorales humaines, induisant la diminution de l'activité kinase de FAK, a également permis de réduire la viabilité des cellules tumorales (Lehman et al. 2021). FAK est également un acteur de la cholangiocarcinogenèse, et des expériences *in vivo* (utilisant des souris transgéniques inductibles pour un KO conditionnel de FAK dans le foie et développant un cholangiocarcinome par transfection hydrodynamique de formes activées d'AKT (myr-AKT) et de YAP (YAPS127A)) ont montré que l'élimination de FAK retardait significativement l'initiation du cholangiocarcinome chez les souris (Song et al. 2021). De manière intéressante, Sato et ses collaborateurs ont montré l'implication de la MEC dans la croissance tumorale médiée par FAK puisque l'apport exogène de COL8A1 favorise la croissance du cancer du sein triple négatif *via* l'activation de FAK/Src *in vitro* dans des sphéroïdes (composés de lignées tumorales mammaires humaines) et *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffe de cellules tumorales mammaires. Cette croissance a été inhibée par le defactinib, un inhibiteur de l'activité kinase de FAK (Sato et al. 2022). De plus, les deux activités de FAK (kinase et chaperonne) peuvent être impliquées dans la croissance tumorale puisque lorsque des cellules tumorales ovariennes humaines ont été traitées *in vitro* avec un nouveau médicament de dernière génération appelé FAK PROTAC ciblant à la fois l'activité kinase et chaperonne (scaffold) de FAK, leur prolifération et survie ont été inhibées. En outre, *in vivo* dans un modèle murin orthotopique de cancer de l'ovaire, le FAK PROTAC a permis de réduire la croissance tumorale (Huo et al. 2022).

A.3. FAK régule l'invasion des cellules tumorales

FAK étant surexprimée et suractivée dans les cellules tumorales, cela amplifie son impact sur leur migration *via* les voies décrites dans la partie II.D « Fonctions dépendantes de FAK en condition physiologique ». Dans le cancer gastrique, une étude de Ma et ses collaborateurs montre *in vitro* que l'IL-8 promeut la migration des cellules tumorales humaines, en plus de faciliter la formation de colonies, *via* FAK (Yuze Ma et al. 2023). Dans le cancer hépatocellulaire, la protéine BACH1 facilite la migration tumorale et les métastases en induisant l'expression des gènes liés à la motilité cellulaire tels que FAK. La délétion de FAK par shRNA dans les cellules tumorales humaines permet de réverser

ce phénomène en diminuant leur migration *in vitro* et les métastases dans un modèle murin immunodéficient de xénogreffe orthotopique (M. Xie et al. 2022).

L'invasion tumorale est un processus complexe qui implique le déplacement de cellules tumorales à travers la MEC. Plusieurs mécanismes contribuent à cette invasion, notamment une augmentation de la motilité cellulaire, des altérations de la dynamique des adhésions focales et surtout une dégradation protéolytique de la MEC (Mitra and Schlaepfer 2006). Dans ce contexte, des études ont montré que la surexpression et la phosphorylation de FAK sont associées au caractère invasif et métastatique des cellules tumorales (Lark et al. 2005; Alexopoulou et al. 2014; Cance et al. 2000). FAK facilite l'invasion des cellules tumorales notamment en favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'EMT se caractérise par la perte d'un phénotype épithélial (réduction d'E-cadhérine, α -caténine et β -caténine) au profit de l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux (augmentation de marqueurs tels que la vimentine, la fibronectine et la N-cadhérine). L'EMT entraîne l'acquisition de capacités migratoires et invasives par les cellules (avec une augmentation de la sécrétion de MMPs et une diminution des jonctions intercellulaires au profit d'une augmentation des jonctions à la MEC), une augmentation de la résistance à l'apoptose et une augmentation de la production de composants matriciels (Thiery and Sleeman 2006; Kalluri and Weinberg 2009). L'activation de FAK induite par Src a été démontrée comme favorisant la dissociation des jonctions intercellulaires contenant l'E-cadhérine dans les cellules cancéreuses du côlon. En effet, une mutation spécifique de FAK au niveau de la région 409-527, qui la rend non phosphorylable par Src, entraîne une formation plus rapide et plus abondante de jonctions intercellulaires dépendantes de l'E-cadhérine *in vitro* dans une lignée tumorale humaine. L'inhibition de l'activité de FAK réduit l'invasion cellulaire induite par Src (Avizienyte et al. 2002). Dans un modèle murin de cancer du sein MMTV-PyMT, il a été rapporté que le rôle de chaperonne (scaffold) de FAK est essentiel à la phosphorylation de l'endophiline A2 par Src, ce qui est à son tour nécessaire pour l'expression de MT1-MMP à la surface et pour l'induction de l'EMT dans les cellules tumorales mammaires (Fan et al. 2013). Toujours dans le cancer du sein, l'activation de FAK par PKC θ dans des cellules tumorales humaines participe à l'invasion tumorale. PKC θ interagit directement avec le domaine FERM de FAK pour favoriser l'exposition de FAK (à travers le domaine V3 spécifique de PKC θ), et phosphoryle FAK sur des résidus de sérine/thréonine au sein des adhésions naissantes *in vitro*, induisant ainsi l'agressivité tumorale. Cette étude de Chadelle et ses collaborateurs montre l'importance de l'interaction FAK- PKC θ dans le contrôle des capacités invasives des cellules tumorales mammaires humaines (Chadelle et al. 2022). Une autre étude menée par Dzung et ses collaborateurs montre que dans les cellules humaines de mélanome dépourvues de STK11 (suppresseur de tumeur), on observe une phosphorylation accrue de FAK favorisant l'invasion cellulaire alors que l'inhibition de FAK

inverse le phénotype invasif des cellules *in vitro* (dans des sphéroïdes de collagène) (Dzung et al. 2022). *In fine*, l'invasion tumorale favorise les métastases. Dans le carcinome hépatocellulaire, la réduction de l'expression de FAK réduit l'invasion tumorale *in vitro* et l'apparition de métastases médiée par la protéine ETV1 dans un modèle murin orthotopique (injection de cellules tumorales humaines dans le foie) (Tongyue Zhang et al. 2022). De plus, la phosphorylation de FAK induite par la connexine 31 dans le cancer du sein stimule l'activation de NF- κ B, induisant le développement de métastases au sein du parenchyme cérébral dans un modèle murin de greffe orthotopique de cellules tumorales mammaires murines. Le traitement systémique avec des inhibiteurs de FAK réduit la progression de ces métastases cérébrales (Lorusso et al. 2022). Une étude récente de Xiaobo et ses collaborateurs (non publiée mais sur BioRxiv) dans ce même cancer a révélé que l'activation des kinases de la famille Src (SFks) par FAK permet aux cellules humaines de cancer du sein HER2+ de proliférer et d'envahir dans un environnement en 3D constitué de Matrigel-Collagène I. De plus, la signalisation FAK-Src est nécessaire à la croissance des tumeurs primaires et à la formation de métastases pulmonaires dans le modèle de souris MMTV-Neu de cancer du sein HER2+ ("FAK-SFK Signaling Integrates ECM Rigidity Sensing and Engagement of ERBB2 to Activate YAP and Promote Invasive Growth and Metastasis in Breast Cancer | BioRxiv" n.d.; Xiaobo Wang, Shimin Wang).

Enfin, l'invasion tumorale peut être favorisée par l'angiogenèse. Dans des modèles murins de mélanome, de glioblastome, de carcinome mammaire et pulmonaire, il a été démontré que FAK est impliquée dans l'angiogenèse, et sa suppression ou son inhibition pharmacologique réduit l'expression du VEGF par les cellules tumorales, ce qui induit la formation de petites tumeurs sans vascularisation (Mitra and Schlaepfer 2006; Tavora et al. 2010; Roberts et al. 2008). Une récente étude menée par Shiao et ses collaborateurs montre que FAK et VEGFR2 sont positivement corrélés chez les patients atteints de carcinome mammaire triple négatif. De plus, les auteurs montrent que FAK régule positivement l'expression de VEGF et VEGFR2 (qui induit la production de VEGF *via* une boucle autocrine, amplifiant ainsi le signal angiogénique) dans les cellules tumorales de ce cancer favorisant ainsi l'angiogenèse dans un modèle murin immunodéficient de xénogreffe de cellules tumorales mammaires humaines (Shiao et al. 2021).

A.4. FAK et cellules souches

Les cellules souches cancéreuses jouent un rôle crucial dans l'hétérogénéité intra-tumorale et la persistance de la tumorigenèse. Dans un modèle de souris MMTV-PyMT, où l'expression de FAK est spécifiquement ciblée (kinase inactivée) dans les cellules épithéliales mammaires, la réduction de la quantité de cellules souches/progénitrices cancéreuses mammaires est observée dans les tumeurs primaires. De plus, les auteurs montrent que cette inactivation de FAK induit une diminution de leur

capacité d'auto-renouvellement et de migration *in vitro*. Dans ce modèle, l'inhibition génétique de l'activité kinase de FAK dans les progéniteurs luminaux (mais pas dans les cellules souches mammaires) entraîne une diminution de la tumorigénèse mammaire *in vivo* (M. Luo et al. 2013). De plus, l'activité kinase de FAK est nécessaire pour la prolifération des progéniteurs, tandis que les fonctions indépendantes de la kinase FAK soutiennent les activités des cellules souches mammaires basales *in vivo* (modèle murin MMTV-PyMT) (Fan et al. 2013).

FAK est également impliquée dans la régulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, qui régule les stades précoces de la tumorigénèse épidermoïde *in vivo* dans un modèle murin de carcinogenèse cutanée induite par le diméthylbenzanthracène/TPA. Cette étude menée par Ridgway et ses collaborateurs a démontré que FAK régule la translocation nucléaire de la β -caténine, activant ainsi la transcription de cibles clés de la voie Wnt, telles que c-Myc. Cela favorise la prolifération des cellules souches épidermoïdes (Ridgway et al. 2012). Une étude de Jang et ses collaborateurs a révélé qu'une phosphorylation accrue de FAK induite par KRT17 (kératine 17) *via* l'activation de l'intégrine $\alpha\beta4$ est corrélée à une augmentation de la capacité de régénération des cellules souches cancéreuses et à une expression accrue de CD44 (marqueur de cellules souches) et du récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR) dans le carcinome épidermoïde buccal *in vitro* et dans un modèle murin de xénogreffe (Jang et al. 2022).

De manière surprenante, dans un modèle de xénogreffe dérivé d'un patient atteint de mésothéliome pleural malin, l'utilisation de chimiothérapies telles que le pemetrexed et le cisplatine a conduit à une augmentation de la population de cellules souches cancéreuses au sein de la tumeur. Cependant, l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité kinase de FAK, appelé VS-4718, élimine préférentiellement les cellules souches cancéreuses (montré *in vitro* et dans un modèle murin de greffe sous-cutanée de cellules de mésothéliome pleural malin), montrant ainsi l'intérêt d'utiliser un inhibiteur de FAK comme co-traitement en tant que stratégie thérapeutique (Shapiro et al. 2014). Dans le cancer du côlon, l'inhibition pharmacologique de FAK a permis de bloquer le phénotype de cellules souches initialement induit par la délétion du syndécan 1 (*via* l'augmentation de nanog qui est un facteur de transcription associé à la pluripotence) et a également réduit les propriétés invasives des cellules tumorales humaines *in vitro* (Kumar Katakam et al. 2021). Dans ce même cancer, le groupe de Liu a confirmé récemment que l'inhibition de FAK dans des cellules tumorales humaines de colon réduit l'expression de marqueurs de cellules souches tels que Nanog, OCT4, CD133, CD44 et c-Myc *in vitro*, notamment en raison d'une modulation altérée de la phosphorylation d'Akt par FAK (Xu, Zhang, and Liu 2023). Toutes ces études montrent ainsi le rôle important de FAK dans le maintien des cellules souches tumorales.

A.5. FAK et inflammation tumorale

FAK exprimée par les cellules tumorales peut jouer un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire anti-tumorale. Par exemple, dans un modèle murin immunocompétent de xénogreffe de cellules murines de carcinome squameux, l'accumulation de FAK nucléaire dans les cellules tumorales conduit à la transcription sélective de chimiokines et de cytokines, notamment de CCL5 qui favorise le recrutement de lymphocytes T régulateurs (Treg) à l'intérieur de la tumeur, entraînant ainsi une suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale des lymphocytes T CD8. En revanche, le traitement avec un inhibiteur de l'activité kinase de FAK (VS-4718) induit une diminution des Treg et une augmentation des lymphocytes T CD8, ce qui favorise une réponse anti-tumorale et conduit à une réduction de la croissance tumorale (A. Serrels et al. 2015). Une étude menée par Ozmadenci et ses collaborateurs a montré que dans des tumeurs de patientes atteintes de cancer de l'ovaire, FAK régule l'expression de CD155 qui un ligand du récepteur de point de contrôle TIGIT (T cell immunoglobulin and ITIM domain) favorisant ainsi l'immunosuppression. Le blocage de l'activité de FAK dans un modèle murin immunodéficient de greffe syngénique de cellules tumorales ovariennes humaines réduit la charge tumorale, diminue les niveaux de CD155 et augmente les TILs. La combinaison de l'inhibition de FAK avec un anticorps bloquant de TIGIT a permis de maintenir des niveaux élevés de TILs et de réduire les niveaux de cellules T régulatrices TIGIT+, d'augmenter les niveaux de CXCL13 et de conduire à la formation de structures lymphoïdes tertiaires prolongeant ainsi la survie des souris (Ozmadenci et al. 2022).

Dans un modèle murin de cancer du pancréas (KPC), le traitement des souris avec un inhibiteur de FAK a entraîné un retard de la progression tumorale. Cette observation est associée à plusieurs modifications du microenvironnement, notamment une diminution du nombre de fibroblastes FAP+ infiltrant la tumeur, de MDSC, de macrophages pro-tumoraux CD206+ (M2) et de lymphocytes Tregs, ainsi qu'une augmentation de l'infiltration de lymphocytes T CD8 (Jiang et al. 2016). De plus, les auteurs soulignent l'intérêt potentiel de combiner un inhibiteur de FAK avec une chimiothérapie (gemcitabine) et un inhibiteur des points de contrôle immunitaire pour améliorer la survie des souris. L'inhibition de FAK étant générale, ces observations pourraient être dues au rôle de FAK dans le microenvironnement, c'est pourquoi le groupe de DeNardo a également inactivé FAK spécifiquement dans les cellules tumorales. Cette inactivation conduit à une réduction de la fibrose et des cellules immunosuppressives et à une augmentation du nombre de cellules T CD8 infiltrant la tumeur favorisant ainsi une réduction du volume tumoral des souris (Jiang et al. 2016). Une étude récente menée par Davidson et ses collaborateurs portant également sur le cancer du pancréas montre que FAK dans les cellules tumorales régule la sécrétion d'IL-6 qui peut interagir avec l'IL-4 sécrétée par les T CD4 et induire une forte expression de PD-L2 (point de contrôle immunitaire) dans les TAMs, les

cellules dendritiques et les cellules endothéliales réduisant ainsi la survie des souris immunocompétentes greffées orthotopiquement avec des cellules murines de PDAC (Davidson et al. 2022).

Ces résultats mettent en évidence le rôle de FAK dans la régulation de la réponse immunitaire et suggèrent que l'inhibition de FAK pourrait représenter une approche thérapeutique prometteuse pour renforcer la réponse immunitaire anti-tumorale et inhiber la croissance des tumeurs. Cependant, les inhibiteurs de FAK n'étant pas spécifiques des cellules tumorales, il est primordial de comprendre le rôle de cette kinase dans le microenvironnement.

B. FAK dans le microenvironnement tumoral

B.1. FAK dans les cellules endothéliales

FAK joue également un rôle crucial dans la régulation de la fonction vasculaire et de l'angiogenèse tumorale. L'expression et l'activation de FAK dans les cellules endothéliales ont été corrélées à une augmentation de la densité des microvaisseaux chez les patientes atteintes de cancers épithéliaux de l'ovaire (Stone et al. 2014). Cependant, il est également important de noter que FAK peut réguler négativement le processus de prolifération cellulaire dans les cellules endothéliales. Dans des conditions de faible adhésion, le domaine FERM de FAK exerce un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules endothéliales (d'artère pulmonaire bovine) *in vitro*. Lorsque cette inhibition est levée, cela conduit à l'activation de RhoA favorisant la prolifération. Ainsi, FAK peut agir en tant que capteur qui transmet des signaux appropriés à la machinerie du cycle cellulaire en fonction du contexte adhésif de la cellule endothéliale (Pirone et al. 2006).

En utilisant des souris dans lesquelles le gène de FAK a été éliminé par KO ou modifié ponctuellement par KI spécifiquement dans les cellules endothéliales, D'Amico et ses collaborateurs démontrent que la perte de FAK ou de son activité kinase, réduit les niveaux d'expression d'ERG (ETS-related gene) et DLL4 (delta like canonical Notch ligand 4), empêchant ainsi la régulation des cellules apicales (tip cell) / cellules de la tige (stalk cell) impliquées dans le développement de l'angiogenèse. De plus, les auteurs ont identifié que FAK nucléaire dans les cellules endothéliales interagit avec l'enzyme de déubiquitination USP9x et la ligase d'ubiquitine TRIM25 afin d'induire la dégradation d'ERG considéré comme un régulateur de l'angiogenèse développementale (montré *in vitro*, *in vivo* sur rétine de souris et *in silico*) (D'Amico et al. 2022). Cette étude suggère que la perte de FAK ou de son activité kinase dans les cellules endothéliales est suffisante pour réduire l'angiogenèse par bourgeonnement (sprouting).

En plus de réguler la prolifération des cellules endothéliales, FAK est impliquée dans leur migration et leur fonction barrière. En effet, une augmentation de l'activation de FAK est corrélée à une augmentation de la migration des cellules endothéliales humaines (HUVEC) *in vitro* (Romer et al. 1994). De plus, la stimulation par le VEGF augmente l'activation de FAK dans les cellules endothéliales (observé sur des coupes de cœur de souris) (X. L. Chen et al. 2012). Comme déjà mentionné, cette activation favorise la déstabilisation des jonctions entre les cellules endothéliales augmentant les fuites vasculaires (X. L. Chen et al. 2012). Dans un contexte tumoral, l'équipe du Pr Schlaepfer a montré que l'inhibition conditionnelle et inductible de FAK spécifiquement dans les cellules endothéliales de souris immunocompétentes greffées avec des cellules murines tumorales ovariennes et de mélanome bloque la perte d'adhésion intercellulaire des cellules endothéliales induite par la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales. Cela conduit au maintien de la fonction barrière de l'endothélium et donc à une inhibition de l'extravasation des cellules tumorales dans les poumons, réduisant ainsi la formation de métastases (Jean et al. 2014). La déstabilisation des jonctions entre les cellules endothéliales, médiée par FAK, démontre comment les cellules cancéreuses sont capables de compromettre la barrière endothéliale afin de pénétrer dans le système vasculaire lors des processus d'intravasation et de le quitter lors de processus d'extravasation (Shibue, Brooks, and Weinberg 2013; Shibue and Weinberg 2009). Cette perturbation de l'intégrité de la barrière endothéliale favorise la dissémination des cellules tumorales et la formation de métastases. Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de FAK dans le traitement du cancer pourrait contribuer à réduire la perméabilité vasculaire, améliorer la normalisation des vaisseaux sanguins et la délivrance des médicaments, ainsi que réduire la formation de métastases (Jean et al. 2014).

Enfin, Newport et ses collaborateurs démontrent que l'inactivation du domaine kinase de FAK dans les cellules endothéliales dans des tumeurs sous-cutanées améliore la sensibilité des cellules de mélanome à la doxorubicine. Cependant, aucune différence n'a été observée dans le nombre de vaisseaux sanguins de la tumeur, la perfusion des vaisseaux ou la délivrance de la doxorubicine, suggérant un possible effet angiocrine sur la régulation de la croissance tumorale (Newport et al. 2022).

Ces études montrent le rôle clé de FAK dans l'angiogenèse et notamment dans la régulation de la prolifération, la migration et la chimiorésistance des cellules endothéliales (Figure 24).

B.2. FAK dans les macrophages associés aux tumeurs (TAM)

Comme vu dans le chapitre II partie IV.C « Macrophages associés à la tumeur », les macrophages jouent un rôle important dans le microenvironnement et leur polarisation en macrophages M2 peut favoriser la progression tumorale contrairement aux macrophages M1. Une étude récente de Sun et

ses collaborateurs montre que FAK peut être impliquée dans la polarisation des macrophages vers un phénotype M2. En effet, lorsque des vésicules dérivées de cellules humaines de carcinome épidermoïde de l'œsophage contenant de l'IL-32 sont internalisées par les macrophages (issus de cellules mononucléaires du sang périphérique humain), elles permettent leur polarisation en type M2 en activant une voie de signalisation impliquant FAK et STAT3 (Y. Sun et al. 2022).

FAK est également un régulateur du recrutement et de l'infiltration des macrophages au sein de la tumeur. En effet, Abshire et ses collaborateurs ont montré que les intégrines $\alpha 4 \beta 1$ et $\alpha 5 \beta 1$ présentes sur les macrophages sont nécessaires pour leur invasion chimiotactique et haptotactique, et la stimulation de ces récepteurs entraîne des changements de morphologie associés à la motilité. FAK se localise en aval de l'activation des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ induite par la fibronectine, ce qui stimule la chimiotaxie et l'haptotaxie induites par le MCSF-1 *ex vivo* (macrophages isolés de souris) (Abshire et al. 2011). L'adhésion des macrophages (murins et humains à la fibronectine) favorise leur migration en induisant l'activation de FAK et la formation du complexe FAK-Src (Digiacoio et al. 2016). La fibronectine induit également la phosphorylation de CSF-1R dépendante de FAK, indépendamment de son ligand, ainsi que l'interaction entre CSF-1R et l'intégrine $\beta 1$. Or CSF-1R est nécessaire pour la migration des macrophages induite par la fibronectine, puisque son inhibition, que ce soit par des approches génétiques ou pharmacologiques, bloque la migration des macrophages *in vitro* (Digiacoio et al. 2016). Une étude menée par Stokes et ses collaborateurs a mis en évidence que l'inhibition pharmacologique de FAK réduit l'infiltration des macrophages associés aux tumeurs (TAM) dans les tumeurs de souris immunodéficientes greffées orthotopiquement avec des cellules tumorales pancréatiques humaines (Stokes et al. 2011). Ces résultats suggèrent que FAK peut être impliquée dans la régulation de l'infiltration des macrophages pro-tumoraux dans les tumeurs, et en ciblant FAK, il pourrait être possible de moduler l'infiltration des TAM et d'influencer ainsi la progression tumorale (Figure 24).

B.3. FAK dans les CAFs

Le rôle de FAK dans les fibroblastes normaux a été largement étudié, mais son rôle dans les fibroblastes associés au cancer (CAF) est documenté depuis peu. Dans les fibroblastes normaux, l'activation de FAK régule des fonctions telles que la migration, l'adhésion et la survie (Schlaepfer, Mitra, and Ilic 2004; Horowitz et al. 2007; S.-T. Lim et al. 2010). De plus, l'activation de FAK dans les fibroblastes normaux activés joue un rôle dans le remodelage de la MEC en induisant l'expression de gènes pro-fibrotiques *in vitro* dans des MEFs et *in vivo* dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Lagares et al. 2012; S. Liu et al. 2007). Les fibroblastes pulmonaires issus des souris traitées à la bléomycine présentent une forte activation de FAK et de Rac, ainsi qu'une

augmentation de l'expression de S100A4 (S100 calcium binding protein A4) *ex vivo*, ce qui contribue à l'acquisition d'un phénotype migratoire (X.-K. Zhao et al. 2016). De plus, l'acquisition d'un phénotype migratoire par les fibroblastes pulmonaires en réponse au facteur pro-fibrotique PDGF-BB dépend de l'activation de FAK et de son association avec l'intégrine $\beta 1$, favorisant ainsi la migration des fibroblastes sur un support de fibronectine *in vitro* (X.-K. Zhao et al. 2016). Enfin, l'inhibition de FAK bloque le développement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine dans des modèles murins de fibrose pulmonaire en réduisant la production de fibronectine et de collagène I, ainsi qu'en diminuant l'activation des fibroblastes (diminution de l'expression de l' α SMA) (Lagares et al. 2012; X.-K. Zhao et al. 2016). Ces résultats suggèrent que FAK joue un rôle important dans les fonctions des fibroblastes normaux mais également les fibroblastes challengés.

Il a également été montré que FAK joue un rôle dans l'activation des fibroblastes en CAFs. En effet, l'inhibition de la LOXL2, réduit l'activation des fibroblastes *via* FAK dans les tumeurs mammaires orthotopiques. La LOXL2 induit la réticulation des collagènes, ce qui active l'intégrine- $\beta 3$, FAK et la voie Akt dans les fibroblastes. Cela conduit à une augmentation de l'expression de l' α -actinine, une protéine associée à la contractilité cellulaire. L'activation des fibroblastes (induite par l'ajout d'une protéine recombinante de la LOXL2) peut être bloquée *in vitro* en inhibant pharmacologiquement FAK (Barker et al. 2013). D'autre part, le traitement avec un inhibiteur de FAK de souris greffées avec des cellules tumorales pancréatiques humaines réduit la croissance tumorale et son agressivité. Cette diminution est associée à une réduction du nombre de CAFs dans la tumeur et de la prolifération des cellules tumorales (Stokes et al. 2011). De même, l'inhibition de FAK dans les souris KPC entraîne une réduction de la fibrose, une diminution des dépôts de collagène et une réduction du nombre de CAFs (Jiang et al. 2016). Ces études suggèrent que FAK est un acteur clé dans les interactions entre les CAFs et les cellules tumorales, et son inhibition peut avoir un impact significatif sur la croissance tumorale, la fibrose et l'agressivité tumorale.

Wu et ses collaborateurs ont montré que la signalisation de FAK dans les CAFs favorise la migration et les métastases des cellules du cancer du sein (modèle MMTV-PyMT) par l'intermédiaire de miARN exosomiques. L'ablation de FAK dans les CAFs (fibroblastes humains activés par un milieu conditionné de cellules tumorales) a diminué la capacité des exosomes à promouvoir la migration des cellules tumorales *in vitro*. Enfin, le profilage des miRs provenant des exosomes des CAFs montre des altérations de plusieurs miRs dans les CAF FAK-KO, et identifie que les miR-16 et miR-148a enrichis dans les exosomes des CAF FAK-KO contribuent à la diminution des métastases des souris MMTV-PyMT (H.-J. Wu et al. 2020). FAK dans les CAFs pourrait aussi réguler le métabolisme des cellules tumorales puisqu'il a été documenté chez la souris (modèle murin immunocompétent de greffe orthotopique de cellules tumorales mammaires murines et modèle MMTV-PyMT), que la

déplétion de FAK dans une sous-population de CAFs (CAF FSP+) induit une augmentation de la glycolyse des cellules tumorales. Cette augmentation a été montrée, *in vitro*, comme passant par la production de chimiokines qui, en se fixant sur CCR1/CCR2 des cellules cancéreuses, activent la protéine kinase A favorisant la glycolyse (Demircioglu et al. 2020).

Enfin, notre équipe a publié un article dont j'ai fait les révisions montrant que FAK dans les CAFs est un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer pancréatique et qu'il favorise l'apparition de métastases et induit un remodelage matriciel important pour la dissémination tumorale dans un modèle murin immunocompétent greffé avec des cellules tumorales murines (Zaghdoudi et al. 2020). Cet article est inclus dans ma thèse.

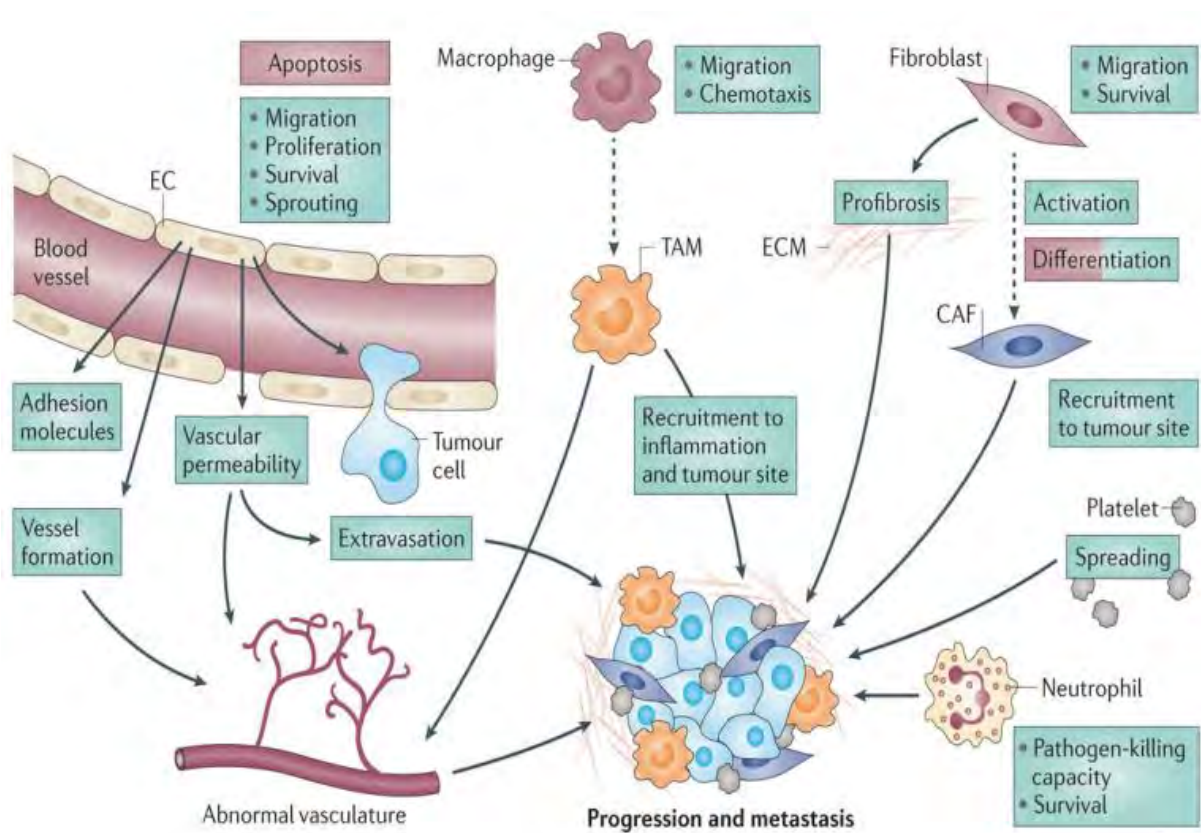


Figure 24 : Impact de FAK dans le microenvironnement

FAK est un important régulateur de la signalisation des cellules endothéliales (EC), des neutrophiles, des plaquettes, des macrophages et des fibroblastes dans le microenvironnement tumoral, conduisant à l'augmentation (cases vertes) ou la diminution (cases roses) des fonctions des cellules stromales. Dans les EC, FAK inhibe l'apoptose et augmente la prolifération. FAK contribue également à la formation de vaisseaux sanguins anormaux *via* l'augmentation de la migration cellulaire, la survie et la perméabilité vasculaire. FAK stimule la migration des macrophages et des fibroblastes et favorise la différenciation (flèche pointillée) des macrophages. Pour les macrophages et les fibroblastes, l'activité de FAK affecte positivement le recrutement des cellules dans la tumeur. FAK régule aussi la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC) ou un remodelage pour favoriser la progression tumorale (Sulzmaier, Jean, and Schlaepfer 2014).

C. Ciblage de FAK

Comme discuté précédemment, FAK est fortement exprimée et activée dans de nombreux cancers et favorise la progression tumorale, ce qui en fait une cible médicamenteuse attrayante pour la thérapie anticancéreuse. Plusieurs essais cliniques ont donc fait suite aux études précliniques encourageant l'inhibition de l'activité de FAK.

C.1. Etudes précliniques

Dans le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC), une surexpression de la protéine IGFBP2 (insulin-like growth factor binding protein 2) est souvent observée chez les patients, et cela contribue à la chimiorésistance, en particulier au dasatinib dans des lignées cellulaires humaines de cancer du poumon. Une étude menée par Lu et ses collaborateurs a montré que l'activation de FAK en aval d'IGFBP2 est impliquée dans ce mécanisme de résistance. Ainsi, le traitement avec un inhibiteur de FAK a permis de restaurer la sensibilité au dasatinib *in vitro* et *in vivo* (modèle murin immunodéficient de greffe sous-cutanée de cellules tumorales pulmonaires humaines) offrant donc une stratégie potentielle pour surmonter la résistance chimiothérapeutique chez les patients atteints de NSCLC (Lu et al. 2013). Une étude réalisée en 2013 par Kang et ses collaborateurs a révélé que FAK confère également une résistance aux cellules tumorales ovariennes humaines face au paclitaxel *in vitro*. L'inhibition pharmacologique de FAK (VS-6063) sensibilise les cellules cancéreuses de l'ovaire aux taxanes (paclitaxel et docétaxel) *in vitro* et *in vivo* (greffe de cellules tumorales humaines dans la cavité péritonéale de souris immunodéficientes). L'association de l'inhibiteur de FAK et du paclitaxel a entraîné une diminution significative de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose, conduisant à une réduction de la taille de la tumeur *in vivo*. Les mécanismes sous-jacents à la chimiorésistance induite par FAK comprennent l'activation d'AKT, la phosphorylation de YB-1 (un facteur de transcription oncogénique) et l'expression de CD44, un marqueur bien caractérisé des cellules souches dans le cancer de l'ovaire (Y. Kang et al. 2013). Une autre étude menée par Halder et ses collaborateurs a montré que l'association d'un inhibiteur pharmacologique de FAK (TAE226) avec le docétaxel prolonge significativement la survie des souris dans un modèle immunodéficient de cancer de l'ovaire (greffe orthotopique de cellules tumorales humaines). Cette combinaison thérapeutique a entraîné la régression de la tumeur, la réduction de la vascularisation tumorale, l'apoptose des cellules endothéliales intra-tumorales, la diminution de la densité des micro-vaisseaux et la réduction de la prolifération des cellules tumorales (Halder et al. 2007). Dans un modèle immunodéficient de xénogreffe sous-cutanée de cellules humaines de carcinome hépatocellulaire chez le rat, où la surexpression de FAK est observée en association avec une néo vascularisation active, la combinaison d'un inhibiteur de l'activité kinase de FAK (PF-562.271) avec le sunitinib, un

composé anti-angiogénique, a montré que cette association bloque la croissance tumorale jusqu'à l'arrêt du traitement (Bagi et al. 2009). De plus, une étude menée par Lee et ses collaborateurs a révélé que l'utilisation de ce même inhibiteur de FAK sur des cellules humaines du cancer de la prostate, résistantes au docétaxel les sensibilise de manière significative à la chimiothérapie *in vitro* (Lee et al. 2014). Plus récemment, Romito et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition de FAK par le TAE226 peut bloquer la progression tumorale dans le carcinome hépatocellulaire, *in vitro* et *in vivo* (dans un modèle immunodéficient de greffe orthotopique de cellules tumorales humaines) lorsqu'il est en combinaison avec le sorafenib. L'inhibition de FAK par TAE226 et la diminution des MAPK favorisée par le sorafenib ont entraîné une diminution de l'expression de HDAC1/2 dans le noyau des cellules tumorales humaines, ce qui a augmenté l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27ac) *in vitro*. Cela a inhibé la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) *in vitro* et ainsi supprimé la progression tumorale du carcinome hépatocellulaire *in vivo* (Romito et al. 2021).

Dans le cancer du pancréas, FAK favorise aussi l'immunosuppression. En ciblant FAK, les cellules cancéreuses deviennent sensibles à l'immunothérapie dans un modèle murin KPC (Jiang et al. 2016). Ce résultat suggère que l'inhibiteur de FAK en combinaison avec l'immunothérapie pourrait être justifié dans des essais cliniques. Les essais cliniques découlant de cette étude seront présentés dans la partie suivante. Malheureusement ce même groupe montre 3 ans plus tard que l'inhibition de FAK dans des souris développant un PDAC spontanément (KPC), induit une surexpression de pSTAT3 suite à la modification du microenvironnement tumoral induite par le traitement avec l'inhibiteur de FAK (diminution de la densité du collagène, réduction du nombre de fibroblastes SMA+ et régulation à la baisse de la voie de signalisation du TGF- β /SMAD). Le ciblage à la fois de FAK mais aussi de JAK-STAT3 permet de contrer ces effets et de bloquer la croissance tumorale *in vivo* (Jiang et al. 2020).

De manière générale, l'inhibition de FAK dans plusieurs cancers a montré des résultats précliniques encourageants, permettant ainsi leur évaluation en essais cliniques (Table 3).

C.2. Etudes cliniques

C.2.1. Etudes cliniques dans différents cancers

Basé sur le rôle de FAK dans la chimiorésistance, des essais cliniques combinant un inhibiteur de FAK avec des chimiothérapies ont été menées. C'est notamment le cas dans le cancer de l'ovaire où FAK favorise la résistance au paclitaxel. Par conséquent, les chercheurs ont mené une étude clinique (essai clinique de phase I #NCT01778803, essai clinique terminé mais sans résultat public) pour déterminer l'efficacité d'une thérapie combinée avec le defactinib (FAK inhibiteur, VS-6063) et le paclitaxel chez les patientes atteints d'un cancer de l'ovaire avancé. Le defactinib fait actuellement

l'objet de l'essai ROCKIF (phase I/II #NCT03287271 ; essai en cours de recrutement, fin prévue pour 2024) pour étudier la combinaison du defactinib avec le carboplatine et le paclitaxel dans le traitement des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire.

En plus de combiner l'inhibition de FAK à la chimiothérapie, plusieurs essais cliniques le combinent à des thérapies ciblées telles que les inhibiteurs de BRAF/MEK. Le defactinib et le VS-6766, un double inhibiteur de RAF/MEK, sont utilisés dans l'essai de phase II #NCT04625270 dans le cancer ovarien sévère de bas grade récurrent avec ou sans mutation KRAS. Les essais (essai clinique de phase II #NCT04720417 et NCT04620330, en cours de recrutement) sur le defactinib et le VS-6766 pour le traitement de patients atteints de mélanome uvéal métastatique et de patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules mutant KRAS récurrent sont toujours en cours. Enfin, des essais cliniques combinant l'inhibition de FAK à l'immunothérapie sont développés (NCT02758587, NCT03727880, NCT02943317). L'essai clinique de phase I #NCT02943317 est appliqué pour évaluer la sécurité, l'efficacité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique du defactinib en association avec l'avelumab (anti-PDL1) dans le cancer épithélial de l'ovaire.

C.2.2. Etudes cliniques dans le PDAC

Concernant les essais cliniques développés dans le PDAC, un essai de phase II (#NCT03727880, en cours de recrutement) vise à étudier l'effet de la combinaison du pembrolizumab et du defactinib après une chimiothérapie en tant que traitement néoadjuvant. Cet essai a pour but de déterminer l'efficacité, la tolérance et la capacité de cette combinaison à stimuler le système immunitaire chez des patients atteints de cancer pancréatique résécable. Il permettra donc d'évaluer si la reprogrammation du microenvironnement par l'inhibiteur de FAK après chimiothérapie peut potentialiser l'effet de l'immunothérapie. De plus, un essai de phase I (#NCT02546531) combinant le defactinib avec le pembrolizumab et la gemcitabine dans une cohorte de 20 patients atteints de PDAC métastatique en progression après un traitement de première ligne (avant la combinaison des 3 médicaments) a été mené. L'association médicamenteuse a été bien tolérée par les patients. Le taux de contrôle de la maladie était de 80 %, avec une réponse partielle et 15 patients présentant une maladie stable. La survie sans progression et la survie globale étaient respectivement de 3,6 et 7,8 mois. Concernant les patients dont la maladie est restée stable après au moins 4 mois de traitement standard par gemcitabine/nab-paclitaxel, le traitement par les 3 médicaments a donné un taux de contrôle de la maladie de 70%. Parmi ces patients, on observe un patient avec réponse partielle et 6 avec une maladie stable. La survie sans progression et la survie globale étaient de 5,0 et 8,3 mois respectivement (Wang-Gillam et al. 2022). Ces résultats préliminaires semblent prometteurs quant à l'utilisation du defactinib avec des immunothérapies et chimiothérapies. D'autres essais sont

en cours dans le cancer du pancréas (NCT05669482 en cours de recrutement, NCT04331041 en cours de recrutement, NCT03875820 actif, NCT02465060 actif).

Table 3 : Essais cliniques utilisant l'inhibiteur de FAK dans les cancers solides (*Adapté de ClinicalTrials.gov*)

NCT Number	Title	Status	Study Results	Conditions	Interventions
14	NCT05612208 A Phase 2 Study of Avometinib (VS-6786) Plus Dactinib	Recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> -Endometrial Cancer -Mucinous Ovarian Cancer -High Grade Serous Ovarian Cancer -Cervical Cancer -Solid Tumor 	<ul style="list-style-type: none"> • Drug Avometinib (VS-6786) + dactinib
15	NCT03875820 Phase 1 Trial of Dactinib and VS-6786	Active, not recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> -NSCLC -Low Grade Serous Ovarian Cancer -Endometrial Carcinoma -Pancreatic Cancer 	<ul style="list-style-type: none"> • Drug VS-6786 • Drug Dactinib
16	NCT0431041 Stereotactic Body Radiotherapy and Focal Adhesion Kinase Inhibitor in Advanced Pancreas Adenocarcinoma	Recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> -Pancreas Cancer -Cancer of the Pancreas -Pancreas Adenocarcinoma 	<ul style="list-style-type: none"> • Device: MR-guided stereotactic body radiation therapy • Drug Dactinib • Procedure: Tumor biopsy • Procedure: Research blood draw
17	NCT04720417 Dactinib and VS-6786 for the Treatment of Patients With Metastatic Uveal Melanoma	Recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> -Metastatic Uveal Melanoma 	<ul style="list-style-type: none"> • Drug Dactinib Hydrochloride • Drug Rimecix Inhibitor VS-6786 • Procedure: Biopsy
18	NCT02372227 A Phase 1 Dose Escalation Study of VS-5584 Administered in Combination With VS-6083 in Subjects With Relapsed Malignant Mesothelioma	Terminated	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> -Relapsed Malignant Mesothelioma 	<ul style="list-style-type: none"> • Drug VS-5584 and VS-6083
19	NCT03727880 Study of Pembrolizumab With or Without Dactinib Following Chemotherapy as a Neoadjuvant and Adjuvant Treatment for Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	Recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> -Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) -Pancreatic Ductal Adenocarcinoma 	<ul style="list-style-type: none"> • Drug Pembrolizumab • Drug Dactinib
20	NCT02004028 Window of Opportunity Study of VS-6083 (Dactinib) in Surgical Resectable Malignant Pleural Mesothelioma Participants	Terminated	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> -Malignant Pleural Mesothelioma 	<ul style="list-style-type: none"> • Drug VS-6083
21	NCT02465060 Targeted Therapy Directed by Genetic Testing in Treating Patients With Advanced Refractory Solid Tumors, Lymphomas, or Multiple Myeloma (The MATCH Screening Trial)	Active, not recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> -Advanced Malignant Solid Neoplasm -Bladder Carcinoma -Breast Carcinoma -Cervical Carcinoma -Colon Carcinoma -Colorectal Carcinoma -Endometrial Carcinoma -Esophageal Carcinoma -Gastric Carcinoma -Glioma -and 40 more 	<ul style="list-style-type: none"> • Drug Adavoseb • Drug Afatinib • Drug Afatinib Dimaleate • Drug Bimelinib • Procedure: Biopsy • Drug Capivasertib • Procedure: Computed Tomography • Drug Copanlisib • Drug Copanlisib Hydrochloride • Drug Crizotinib • and 27 more
22	NCT04201145 Pembrolizumab + Dactinib in Pleural Mesothelioma	Withdrawn	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> -Malignant Pleural Mesothelioma 	<ul style="list-style-type: none"> • Drug Pembrolizumab • Drug Dactinib
23	NCT01870809 Phase 0 Controlled Study of VS-6083 in Subjects With Malignant Pleural Mesothelioma	Terminated	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> -Malignant Pleural Mesothelioma 	<ul style="list-style-type: none"> • Drug dactinib (VS-6083) • Drug Placebo

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Je présenterai dans cette partie, notre précédente publication pour laquelle j'ai réalisé les révisions, puis les résultats faisant l'objet d'un papier que je signerai en 1^{er} auteur et enfin les résultats supplémentaires que j'ai obtenus mais que je ne publierai pas dans mon article de thèse.

Chapitre I: FAK activity in cancer-associated fibroblasts is a prognostic marker and a druggable key metastatic player in pancreatic cancer

Une des caractéristiques du PDAC est la présence d'un stroma abondant et notamment d'une réaction desmoplasique dense. L'accumulation de matrice extracellulaire (MEC) observée dans ce cancer est principalement due à une sécrétion accrue et un remodelage important par les fibroblastes associés aux cancers (CAFs), cellules du stroma les plus abondantes, connues pour favoriser la tumorigenèse, les métastases et la chimiorésistance selon leur sous-type. La MEC, niche dynamique pour le cancer, favorise à elle seule, le développement et la progression de la tumeur. En interagissant avec les cellules tumorales et stromales majoritairement *via* les intégrines présentent à leur surface, la MEC induit l'activation de la protéine tyrosine kinase Focale Adhésion Kinase (FAK). Cette protéine, exprimée de manière ubiquitaire, régule le mouvement cellulaire, la migration, l'adhésion, la prolifération et la survie des cellules. FAK est souvent retrouvée surexprimée et suractivée dans les cellules tumorales, favorisant ainsi la progression tumorale et les métastases. Au commencement de notre projet, l'activation de FAK dans les cellules tumorales était reconnue comme un facteur favorisant la croissance tumorale et son inhibition pharmacologique représentait une thérapie très prometteuse pour de nombreux cancers, y compris le PDAC. Notre groupe s'était donc questionné sur l'effet potentiel de l'inhibition de FAK sur les autres populations de la tumeur et notamment sur les CAFs. Alors que le rôle de l'activité kinase de FAK était largement documenté dans les fibroblastes normaux, son rôle dans la fonction des CAFs, promoteurs de la croissance tumorale, de la progression et de la résistance aux thérapies dans le PDAC, était très peu étudié.

Dans le papier pour lequel j'ai réalisé les révisions, nous avons donc pour objectif d'étudier le statut de FAK dans les CAFs de patients atteints de PDAC et d'évaluer l'impact de son activité kinase spécifiquement dans les fibroblastes de PDAC sur la progression tumorale, l'invasion et l'apparition de métastases. Nous avons pour cela greffé un modèle murin immunocompétent avec des cellules tumorales de PDAC (isolées de souris génétiquement modifié pour développer spontanément un cancer du pancréas, appelé KPC) et des fibroblastes (MEF) exprimant une forme active ou inactive de FAK et étudié la croissance tumorale, les métastases et l'organisation structurelle des tumeurs (notamment l'organisation matricielle). Tandis que l'inactivation fibroblastique de FAK n'a pas impacté la croissance de la tumeur primaire, elle a réduit drastiquement les métastases pulmonaires. De plus, ayant observé une modification d'organisation de la MEC (passage d'une signature TACS-3, facilitant l'invasion tumorale, à une signature TACS-2,

bloquant l'invasion tumorale) dans la tumeur après inactivation de FAK dans les fibroblastes, nous avons quantifié *in vitro* toutes les protéines matricielles produites par des CAFs issus de patients par une technique de « Matrisome » et montré une réduction globale des protéines de la MEC. Une modification de la quantité et de l'organisation de la MEC pouvant impacter l'infiltration des cellules immunitaires dans la tumeur, nous avons quantifié différentes populations immunitaires dans les tumeurs issues du modèle murin par immunophénotypage et montré que l'inactivation de FAK dans les fibroblastes induit une diminution de la présence de macrophages M2 (pro-tumoraux) dans la tumeur. Ces découvertes mettent en évidence l'importance cruciale de FAK fibroblastique dans la création d'un microenvironnement favorable à la progression tumorale, suggérant ainsi son potentiel en tant que cible thérapeutique prometteuse pour les patients atteints de PDAC.



FAK activity in cancer-associated fibroblasts is a prognostic marker and a druggable key metastatic player in pancreatic cancer

Sonia Zaghdoudi^{1,†}, Emilie Decaup^{1,†}, Ismahane Belhabib¹, Rémi Samain¹, Stéphanie Cassant-Sourdy¹, Julia Rochotte¹, Alexia Brunel¹, David Schlaepfer², Jérôme Cros³, Cindy Neuzillet⁴, Manon Strehaiano¹, Amandine Alard¹, Richard Tomasini⁵, Vinothini Rajeeve⁶, Aurélie Perraud⁷, Muriel Mathonnet⁷, Oliver MT Pearce⁸, Yvan Martineau¹ , Stéphane Pyronnet¹, Corinne Bousquet^{1,*} & Christine Jean^{1,**}

Abstract

Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are considered the most abundant type of stromal cells in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), playing a critical role in tumour progression and chemoresistance; however, a druggable target on CAFs has not yet been identified. Here we report that focal adhesion kinase (FAK) activity (evaluated based on 397 tyrosine phosphorylation level) in CAFs is highly increased compared to its activity in fibroblasts from healthy pancreas. Fibroblastic FAK activity is an independent prognostic marker for disease-free and overall survival of PDAC patients (cohort of 120 PDAC samples). Genetic inactivation of FAK within fibroblasts (FAK kinase-dead, KD) reduces fibrosis and immunosuppressive cell number within primary tumours and dramatically decreases tumour spread. FAK pharmacologic or genetic inactivation reduces fibroblast migration/invasion, decreases extracellular matrix (ECM) expression and deposition by CAFs, modifies ECM track generation and negatively impacts M2 macrophage polarization and migration. Thus, FAK activity within CAFs appears as an independent PDAC prognostic marker and a druggable driver of tumour cell invasion.

Keywords cancer-associated fibroblasts; extracellular matrix remodelling; focal adhesion kinase; metastasis; pancreatic ductal adenocarcinoma

Subject Categories Biomarkers; Cancer

DOI 10.15252/emmm.202012010 | Received 14 January 2020 | Revised 4 September 2020 | Accepted 8 September 2020 | Published online 7 October 2020
EMBO Mol Med (2020) 12: e12010

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) has a poor prognosis among carcinomas, with 5-year survival rates < 7% due to a late diagnosis and frequent metastases (50% of cases at diagnosis). Tumour resection is possible only in non-metastatic patients with locally non-advanced tumour, but operated patients still have a life expectancy of < 5 years (Siegel *et al*, 2017). Chemotherapies have provided only limited survival benefit, although they show cytostatic effects in pre-clinical PDAC models (Hidalgo, 2012). Therapeutic resistance may in part be explained by the high amount of desmoplasia within the tumour microenvironment which represents up to 80% of the tumour mass (Feig *et al*, 2012). This fibrotic environment is characterized by increased deposition and altered organization with enhanced stiffening of extracellular matrix (ECM). ECM can form a physical barrier to drug delivery (Olive *et al*, 2009), contribute to the creation of a hypoxic environment that selects for more resilient cancer cells (Hwang *et al*, 2008), and also influences immune cell trafficking into and within the tumour (Hallmann *et al*, 2015). Both ECM composition and architecture are altered in carcinomas (Provenzano *et al*, 2006), and such changes promote tumour

1 Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), team 6 "Protein synthesis & secretion in carcinogenesis", Equipe labellisée Ligue Contre Le Cancer, Labex TOUCAN, INSERM UMR 1037- University Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

2 Department of Reproductive Medicine Moores Cancer Center, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA

3 Department of Pathology, Beaulieu Hospital, INSERM U1149, Clichy, France

4 Medical Oncology Department, Curie Institute, Versailles Saint-Quentin University, Saint-Cloud, France

5 Cancer Research Center of Marseille, INSERM U1068, Marseille, France

6 Centre for Genomics and Computational Biology, Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London, London, UK

7 EA 3842 Laboratory, Medicine and Pharmacy Faculties, Limoges University, Limoges, France

8 Centre for Tumour Microenvironment, Barts Cancer Institute, London, UK

*Corresponding author. Tel: +33 582741653; E-mail: corinne.bousquet@inserm.fr

**Corresponding author. Tel: +33 582741650; E-mail: christine.jean@inserm.fr

[†]These authors contributed equally to this work

progression via the generation of ECM tracks used by tumour cells to invade (Gaggioli *et al*, 2007). Altogether, ECM provides critical chemical and mechanical cues promoting the acquisition and maintenance of each of the cancer hallmarks and its abundance, organization and stiffness modulate every behavioural facet of tumour cells (for review, see (Pickup *et al*, 2014)). ECM synthesis, maturation and organization are largely regulated by fibroblasts (Erdogan & Webb, 2017).

Cancer-associated fibroblasts (CAFs), the most abundant PDAC stromal cells, are important promoters of tumour growth, disease progression and resistance to therapies (Pietras & Ostman, 2010; Ostman, 2012). Fibroblast activation correlates with PDAC poor prognosis and tumour recurrence after surgery (Erkan *et al*, 2012). CAFs increase tumour aggressiveness (survival, invasion, chemoresistance) via the secretion of growth factors, cytokines and chemokines (Egeblad *et al*, 2010). CAFs also impact other stromal cells promoting angiogenesis with immature permeable vessels, inflammation and immune suppression (Sun *et al*, 2018a). Moreover, in several epithelial cancers, CAFs were reported to produce and deposit elevated amounts and abnormal varieties of ECM components (Tuxhorn *et al*, 2002; Schor *et al*, 2003; Erdogan & Webb, 2017). Overall, CAFs and abnormal ECM deposition play critical roles in PDAC progression, deleterious for patient survival.

A key intracellular effector of ECM signalling is focal adhesion kinase (FAK), which dimerizes and gets activated upon ECM-induced integrin receptor activation. This leads to FAK autophosphorylation at residue Y397, binding of SRC-family kinases and subsequent phosphorylation of the FAK domain activation loop (Y576 and Y577) (Sulzmaier *et al*, 2014). FAK is a cytoplasmic protein tyrosine kinase controlling cell movement, invasion, survival and gene expression through its kinase or scaffolding functions. In advanced-stage solid cancers, FAK is often over-expressed and activated in tumour cells thus fostering tumour progression and metastasis (Sulzmaier *et al*, 2014). Therapeutic benefits of pharmacological FAK inhibition in pre-clinical models (Hochwald *et al*, 2009) have been thus far allocated to the direct role of FAK expressed by neoplastic cells. However, one can assume that pharmacological FAK inhibitors will also target tyrosine kinase activity in CAFs. It was previously described that specific FAK inactivation in endothelial cells prevented spontaneous tumour metastasis by enhancing barrier function (Jean *et al*, 2014). Whereas the role of FAK activity is largely documented in normal fibroblasts (for review see (Schlaepfer & Mitra, 2004)), very little is known about the role of FAK in activated fibroblasts present in a tumour context (Barker *et al*, 2013).

We therefore evaluated FAK activity in CAFs from human PDAC and deciphered its implication in PDAC progression, invasion and metastasis. We found that FAK activity within CAFs (using the

phosphorylation level of FAK on tyrosine (Y) 397 as readout) is an independent prognostic marker for disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in PDAC patients. Functionally, we also revealed that FAK activity within PDAC CAFs plays a prominent role in tumour cell metastasis and in intra-tumour immune cell recruitment in correlation with its regulatory impact on ECM synthesis and deposition by CAFs. PDAC patients may therefore benefit from FAK targeting though inhibition of the CAF functions.

Results

Increased FAK activity in human pancreatic adenocarcinoma-associated fibroblasts is an independent prognostic marker

We first sought to determine whether fibroblastic FAK activity was associated with PDAC patient outcome. The level of FAK autophosphorylation at tyrosine 397 (pY397 FAK) was quantified, as a readout of FAK activity, by immunohistochemistry (IHC) on a human tissue array composed of 40 PDAC tumours and 10 healthy human pancreas (Fig 1A and B, high and low magnification, respectively; see Appendix Fig S1A–C for antibody validation). Expression of α -SMA and FAP- α was used as surrogate markers of CAFs (fibroblasts from PDAC but not from healthy pancreas were positive; Fig 1A and B). We observed a very low or null FAK activity in fibroblasts from normal control tissues (identified based on their particular spindle-shaped morphology), whereas fibroblasts from PDAC show an important and significant increase of pY397 FAK staining compared to controls in the whole cell, as well as in the cytoplasm and in the nucleus (Fig 1A–C). Using the average of fibroblastic FAK activity quantified in healthy tissues as a baseline, fibroblastic FAK activity appears increased in 87.5% (35/40) of PDAC patients.

Given the patient heterogeneity found for fibroblastic FAK activity in this discovery cohort (Fig 1C), we have challenged the prognostic value of FAK activity within CAFs on a human tissue array of an independent retrospective cohort composed of 120 resected PDAC samples. Clinical and pathological data from those patients are summarized in Table EV1. At the time of last follow-up, tumour relapse was reported in 80 patients (66.6%), and 67 patients (55.8%) had died. Median DFS and OS were 13.1 months (range: 1.0–113 months) and 19.69 months (range: 2.6–113 months), respectively. Positive resection margin (R1) and lymph node ratio (LNR) > 0.20 were both significantly associated with shorter DFS and OS in univariate analysis (Table 1).

In order to calculate a pY397 FAK score as a surrogate of FAK activity in each sample, and quantify its expression in stromal vs tumoural area, we used the automatic computer-assisted

Figure 1. Increased FAK activation in human pancreatic adenocarcinoma-associated fibroblasts.

- A, B Representative haematoxylin and eosin (H&E) staining, and immunohistochemistry of phosphorylated FAK on tyrosine (Y) 397 (pY397 FAK), alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and fibroblast activated protein alpha (FAP- α) in serial sections of human normal pancreas (Ct1), of human normal adjacent PDAC tissue (Ct2) and of human PDAC tissues (PDAC1–3); scale bar, 100 μ m (A), and 300 μ m (B).
- C Quantification of pY397 FAK level in cancer-associated fibroblasts from human PDAC microarray: 40 different PDAC patient samples and 10 normal human pancreas have been stained for pY397 FAK and double blinded quantified (based on intensity and positive cell number) on a scale between 0 (no staining) and 6 (Y397 FAK highly positive) in whole cell (left), cytoplasm (middle) and nucleus (right). Values are means \pm SEM. $^{**}P < 0.01$, by unpaired two-tailed Student's *t*-test.

Source data are available online for this figure.

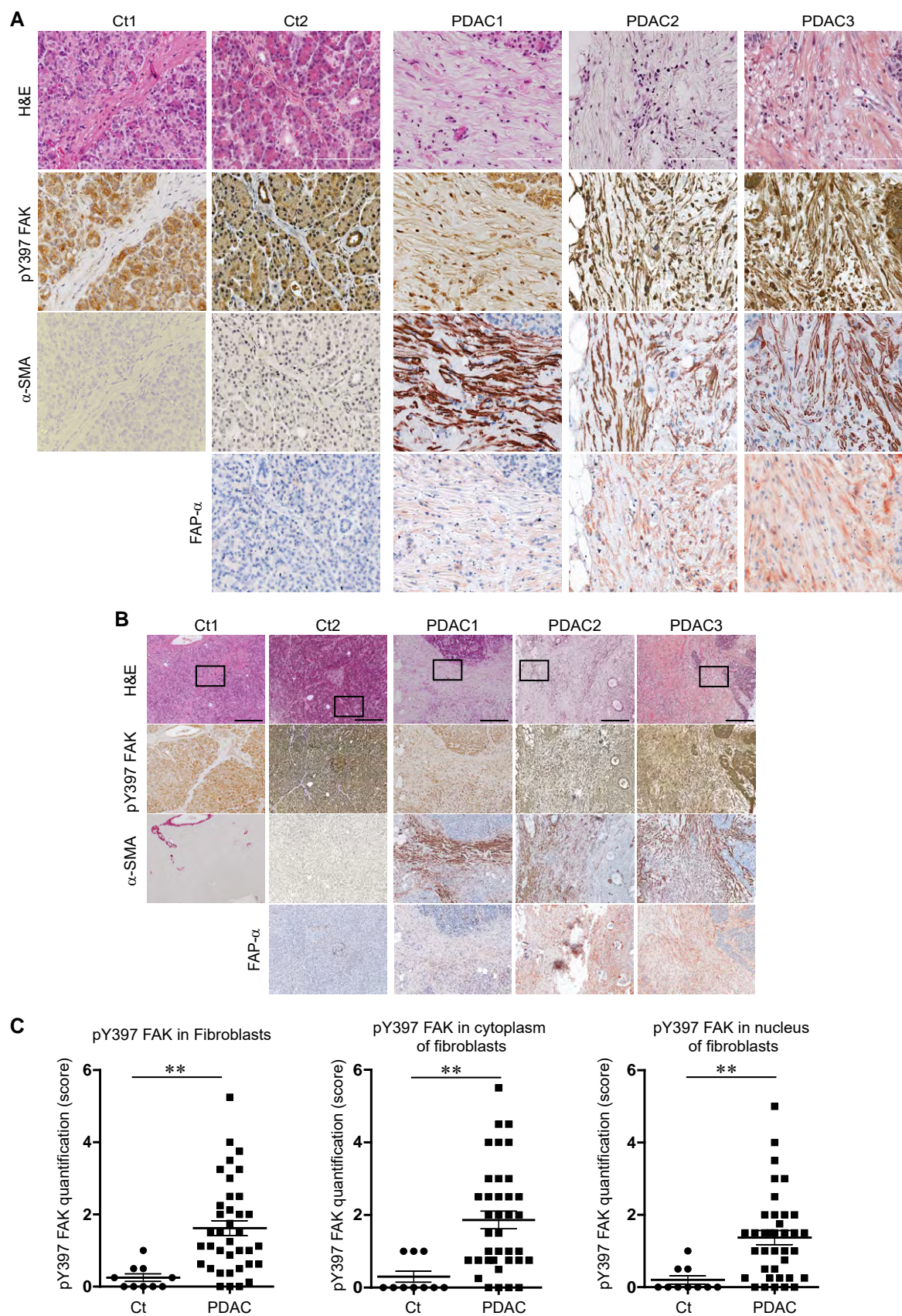


Figure 1.

Table 1. Correlation between pathological data and pY397 FAK score in CAFs with survival: results of univariate and multivariate analyses in the 120 patient cohort (only variables with $P < 0.05$ are presented).

	DFS		OS	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Univariate				
Positive resection margin. R1	2.096 (1.192–3.685)	0.01	2.004 (1.070–3.753)	0.030
LNR (ration N+/N) > 0.20	2.200 (1.296–3.734)	0.003	2.122 (1.178–3.823)	0.012
High fib. pY397 FAK score	1.834 (1.167–2.880)	0.008	1.929 (1.156–3.218)	0.012
Multivariate				
Positive resection margin. R1	1.711 (1.037–2.822)	0.036	1.874 (1.058–3.321)	0.031
LNR (ration N+/N) > 0.20	1.779 (1.097–2.886)	0.020	2.102 (1.189–3.718)	0.011
High fib. pY397 FAK score	1.616 (1.017–2.566)	0.042	1.898 (1.133–3.180)	0.015

CI, confidence of interval; DFS, disease-free survival; HR, hazard ratio; LNR: lymph node ratio; OS, overall survival.

analyser Definiens Tissue Studio®. Appendix Fig S2A and B validate that Definiens® software properly discriminates CAFs (α -SMA- and/or FAP- α -positive cells) from other cells (including isolated tumour cells, positive for pan-cytokeratin) based on cell morphology. We then applied Definiens® software on our tissue array previously stained for pY397 FAK (Fig 2A). Quantification of pY397 FAK scores shows that, in the whole cohort ($n = 120$), high FAK activity within CAFs (60/120) does not correlate with any of the tested variables (known prognostic factors), including resection margin status (R0 vs R1), tumour size, TNM stage and LNR (ratio of positive lymph nodes over total dissected lymph nodes; Table 1). However, using univariate analysis, the FAK activity score correlates with patient survival, where patients with high FAK activity within CAFs have significantly shorter DFS (13.5 vs 19.1 months, HR: 1.834, $P = 0.0085$) and shorter OS (26.3 vs 36.1 months, HR: 1.921, $P = 0.0119$; Table 1; Fig 2B and C). When stratified based on the grade status, fibroblastic FAK activity is predictive of shorter DFS and OS for patients with low and moderate grade but not for patients with high grade tumours (Fig EV1A–D). Across all patient samples, positive resection margin, LNR > 0.20, and high fibroblastic pY397 FAK score were independently associated with DFS and OS in multivariate analysis (Table 1). Conversely, FAK activity in the tumour cell compartment had no prognostic impact on DFS (14.10 vs 15.67 months, HR: 1.112, $P = 0.958$) nor OS (32.98 vs 33.51 months, HR: 1.016, $P = 0.7549$), (Fig 2D–E).

Together these results indicate that FAK is highly activated in human pancreatic adenocarcinoma-associated fibroblasts. High fibroblastic FAK activity (pY397 FAK score) in PDAC tumours is

an independent prognostic factor for DFS and OS in multivariate analysis.

Fibroblastic FAK inactivation prevents tumour metastasis without changing tumour growth

Since we had found that fibroblastic FAK activity in human PDAC correlates with accelerated relapse and shorter survival, we explored its functional role on PDAC progression using a knock-in point mutation strategy (FAK lysine 454 to arginine) in fak exon 21 to generate fibroblasts expressing either a kinase inactive (kinase-dead) FAK (FAK-KD) or active (wild-type) FAK (FAK-WT) (Lim *et al*, 2010). Mouse fibroblasts expressing FAK-WT or FAK-KD were orthotopically and syngeneically co-grafted with mouse pancreatic tumour cells (isolated from LSL-K-ras^{G12D/+}; p53^{R172H/+}; Pdx1-Cre, also referred as KPC) in C57BL/6 immunocompetent mice. From our previous observations (Duluc *et al*, 2015), co-grafting of tumour cells with fibroblasts slightly increases tumour growth compared to tumour cells grafted alone, which was also seen with FAK-KD fibroblasts (Fig 3A). To further validate that FAK-WT and FAK-KD fibroblasts are activated into CAF-like cells once co-grafted with tumour cells, GFP-expressing fibroblasts were co-injected with non-labelled tumour cells, and CAF markers α -SMA, FAP- α and PDGFR- α evaluated. At the time of sacrifice, the level of FAK pY397 is highly decreased in FAK-KD fibroblasts compared to FAK-WT, as expected (Fig EV2A). Importantly, GFP-positive cells, from both groups, express high levels of α -SMA, FAP- α and PDGFR- α (Fig EV2B), confirming the activated status of the grafted fibroblasts. Interestingly, most cells expressing α -SMA, FAP-

Figure 2. Increased FAK activation in human pancreatic adenocarcinoma-associated fibroblasts is an independent prognostic marker.

- A Representative images of Definiens® Tissue Studio multi-resolution segmentation algorithm on two PDAC TMA examples (X, Y). From left to right: IHC for pY397 FAK; ROI detection of tumour cells (dark blue), stroma (orange) and other (light blue/grey); nuclear/cytoplasm detection in blue and green, respectively; IHC staining classification for pY397 FAK intensity signal (dark red for high signal, orange for medium signal, yellow for low signal and white for negative signal).
- B, C Disease-free survival (B) and overall survival (C) from 120 patient cohort according to pY397 FAK expression in CAFs.
- D, E Disease-free survival (D) and overall survival (E) from 120 patient cohort according to pY397 FAK expression in tumour cells.

Data information: (B–E) Survival curves were estimated with the Kaplan–Meier method and compared using log-rank test, non-parametric tests (chi-square test) to compare independent groups for categorical data; HR: hazard ratio.

Source data are available online for this figure.

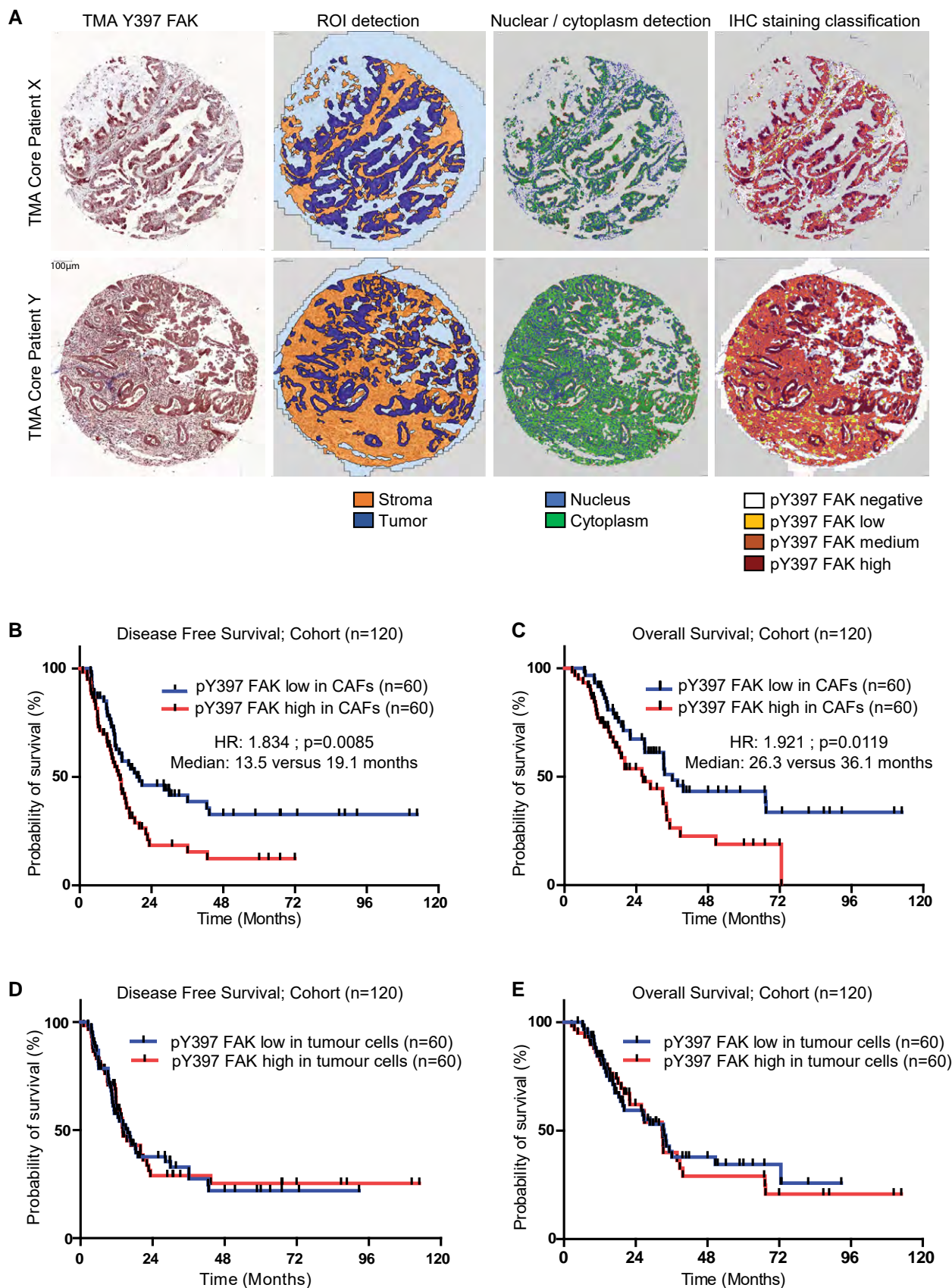


Figure 2.

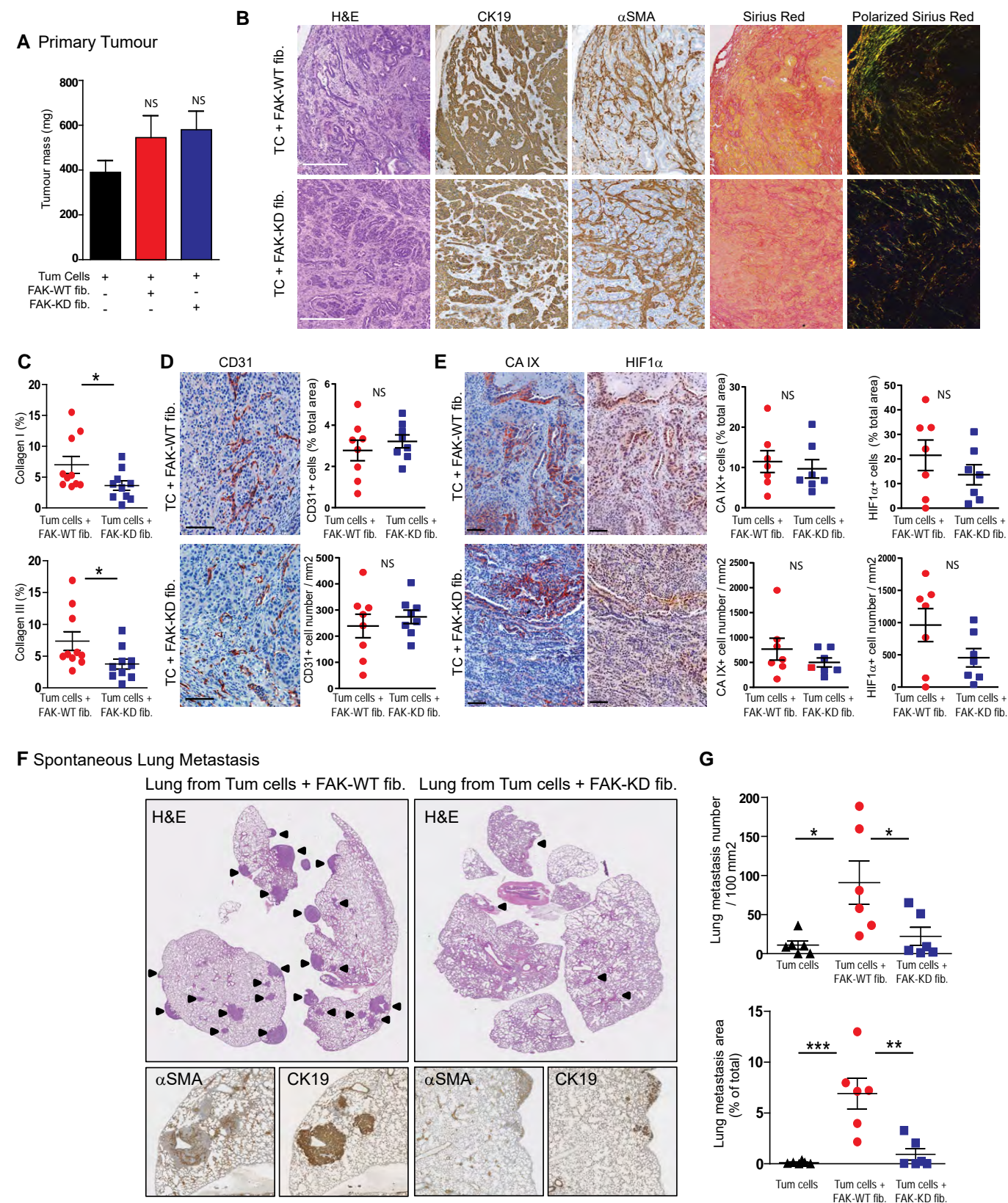


Figure 3.

Figure 3. Fibroblastic FAK inactivation prevents tumour metastasis without impacting tumour growth.

Tumour cells were syngeneically and orthotopically co-grafted with mouse FAK-WT or FAK-KD fibroblasts. Thirty-eight days after injection, mice were euthanized.

- A Primary tumour mass quantification. Values are means \pm SEM from at least seven mice per group. NS: not significantly different using one-way ANOVA test with Tukey's method for multiple comparison.
- B Representative images from primary tumour stained for H&E, cytokeratin 19 (CK19), α -SMA, Sirius Red and polarized Sirius Red. Scale bar, 100 μ m.
- C Quantification of fibrillar collagens I (yellow-orange) and III (green) based on polarized Sirius Red images from (B). Each dot represents a mouse ($n = 11$ per group). Values are means \pm SEM, $*P < 0.05$ using unpaired two-tailed Student's t-test.
- D, E IHC representative images (left) and quantification (right) of the expression of CD31 (D) and two hypoxia markers CaIX and HIF1 α (E) from primary tumour; scale bar, 100 μ m. Values are means \pm SEM from seven mice per group. NS, not significantly different using unpaired two-tailed Student's t-test.
- F Representative images of H&E, CK19 and α -SMA IHC staining performed on lung sections. Arrow identified lung metastasis.
- G Quantification of lung metastasis size and number based on CK19-positive staining using NanoZoomer software. Values are means \pm SEM of six mice per group. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, using one-way ANOVA test with Tukey's method for multiple comparison. NS, not significantly different.

Source data are available online for this figure.

α or PDGFR- α are GFP-positive in both groups (Fig EV2C), demonstrating that most CAFs present in the tumour, at the time of sacrifice, originate from the grafted fibroblasts.

Given the fact that CAFs are major modulators of every component of the tumour, we analysed the impact of fibroblastic FAK inactivation on primary tumour. Histopathology of the primary tumours showed that fibroblastic FAK inactivation does not impact the general architecture and the proportion of tumour cells (CK19-positive) vs fibroblasts (α -SMA-positive) (Fig 3B). However, fibroblastic FAK inactivation drastically impairs tumour collagen I and III fibre production and maturation as visualized and quantified under polarized light using Sirius red coloration (Fig 3B and C). Analysis of tumour vessels showed that FAK inactivation within CAFs does not impact epithelial cell (CD31-positive) organization and number (Fig 3D) but slightly decreases hypoxia. Indeed, the quantification of the two classically used markers of hypoxia, carbonic anhydrase IX (CA IX) and hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α), shows a slight decrease of CA IX or HIF1 α -positive cell number (Fig 3E).

Finally, as fibroblastic FAK activity in human PDAC tumours is an independent prognostic factor for DFS and OS, and mortality is mostly from metastatic disease (Siegel *et al*, 2017), we assessed the possible impact of fibroblastic FAK activity on tumour metastasis. As shown in Fig 3F and G, specific fibroblastic FAK inactivation drastically diminished PDAC spontaneous lung metastasis, decreasing both metastasis number and size. Interestingly, such metastases are rich in activated fibroblasts (α -SMA-positive cells; Fig 3F).

Taken together, these *in vivo* results show that specific FAK inactivation within fibroblasts decreases fibrosis and drastically reduces spontaneous lung metastasis.

Fibroblastic FAK inactivation reduces M2 macrophage polarization, migration and correlates with M2 macrophage number in human PDAC samples

As CAFs and ECM may impact immune cell trafficking (Hallmann *et al*, 2015; Sun *et al*, 2018a), we postulated that fibroblastic FAK inactivation could modify immune cell populations in PDAC. Characterization of tumour-infiltrating immune cells in the primary tumour was performed by flow cytometry (gating strategy in Appendix Fig S3A and B) at early (21 days after the grafting) and late (38 days) time points. At both time points, FAK inactivation

within fibroblasts significantly decreases the pro-tumoural M2 macrophage number (CD206⁺ tumour-associated macrophages), while not affecting the total macrophage number, but increasing the M1 (Nos2⁺) macrophage number only in early setting (Fig 4A and B). None of the other immune cell types are modified by the fibroblastic FAK inactivation at both time points (Fig EV3A and B). IHC analyses confirm that fibroblastic FAK inactivation significantly decreases CD206⁺ tumour-associated macrophage number at specific localizations, i.e. tumoural, adjacent and fibrotic areas (Fig EV3C). Interestingly, whereas fibroblastic FAK inactivation does not impact lymphocyte T CD8⁺ number in the whole tumour (Fig EV3A and B and D left), it increases the number of these cytotoxic T lymphocytes specifically within the fibrotic area (but without decreasing their number in either the tumoural or adjacent areas; Fig EV3D). Then, we searched for a mechanism underlying the reduced *in vivo* M2 tumour-associated macrophages induced by fibroblast-specific FAK inactivation. To do so, we explored the *in vitro* polarization of murine BMDM-derived M0 macrophages into M1 or M2 macrophages, upon 24-h exposure to conditioned medium (CM) collected from FAK-WT or FAK-KD activated fibroblasts (Fig 4C). Fibroblasts were first activated using CM secreted by tumour cells, and their activation was confirmed by expression increase of PDGFR- α , FAP- α and α -SMA (Fig EV3E) markers. We observed that CM from FAK-KD activated fibroblasts decreases M2 polarization (decreased percentage of CD206^{high}/CMH2^{low} but increased of CD206^{low}/CMH2^{high} cells, and decreased dectin⁺ cells), without impacting M1 polarization, when compared to effect induced by CM from FAK-WT activated fibroblasts (Fig 4D). Then, we explored the impact of fibroblastic FAK pharmacological inactivation on CM-induced M1 or M2 macrophage migration, using a transwell assay. To do so, resting macrophages (M0) were first polarized into M1 or M2 macrophages by exposure to IFN γ + LPS- or IL-4 + IL-13, respectively (polarization validation in Fig EV3F). In parallel, four hCAFs (isolated from fresh patient PDAC tumours summarized in Table EV2) were treated with the FAK inhibitor PF-562271 (a pharmacological inhibitor of FAK activity), and their CM were collected. M1 or M2 macrophages were then seeded on the top chamber of the transwell and hCAF CM on the bottom chamber. We observed that both M1 and M2 macrophages migrate through the transwell between 24-h and 48-h exposure to hCAF CM and that FAK inactivation within hCAFs alters the chemoattractant potential of their secretions onto M2, but not M1, macrophages (Fig 4E). We excluded that FAK inhibitor (FAK-I) directly

impacts M1 and M2 macrophage migration as FAK-I pre-incubated for 48 h in un-conditioned CAF medium (DMEM/F12 + 0.5% foetal bovine serum [FBS] without CAF) does not change macrophage migration (Fig EV3G). These data demonstrate that FAK activity within CAFs positively regulates the secretion of soluble factors that polarize macrophages towards the M2 phenotype and

enhances their migration. Therefore, we searched for the involved cytokines/chemokines.

Tumour-associated macrophages originate from circulating monocytes, which are recruited to the tumour by several growth factors and especially by chemokines, produced by stromal and tumour cells (Lahmar *et al*, 2016). Besides M-CSF, the CC

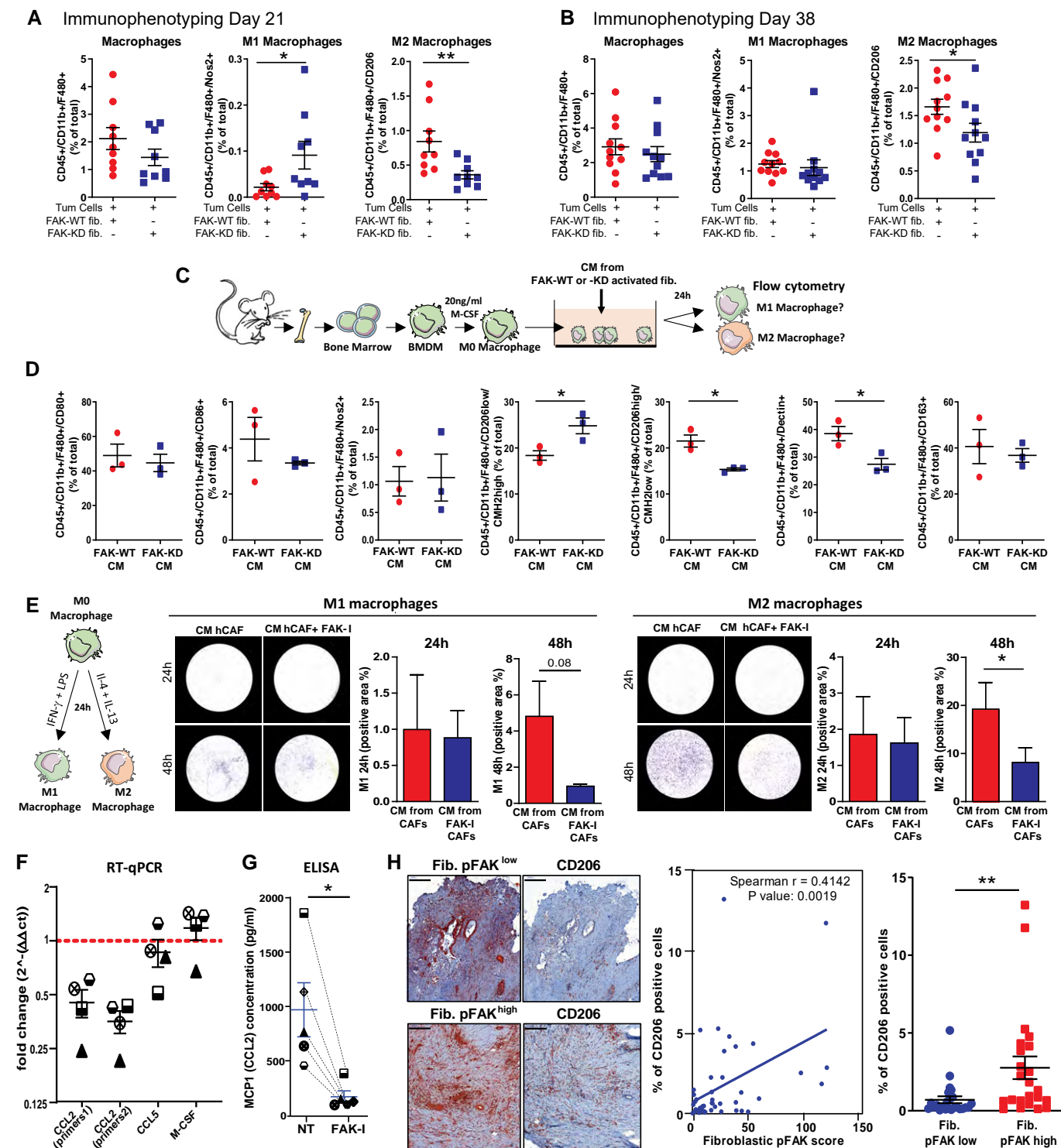


Figure 4.

Figure 4. Fibroblastic FAK inactivation reduces M2 macrophage polarization, migration and correlates with M2 macrophage number in human PDAC samples.

- A, B Relative frequencies of tumour-infiltrating M1 macrophages and M2 macrophages analysed by flow cytometry at 21 days (A) and 38 days (B) after grafting. Values are means \pm SEM from 5 to 10 mice per group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ using unpaired two-tailed Student's *t*-test.
- C Schematic of BMDM isolation and macrophage polarization assay.
- D Impact of conditioned media (CM) secreted by activated mouse fibroblasts expressing FAK-WT or FAK-KD on mouse BMDM-derived macrophage polarization. Relative frequencies of macrophages expressing CD80, CD86, Nos2, CD206, CMH2, dectin and CD163 markers acquired by flow cytometry and processed using FlowJo software. * $P < 0.05$, by unpaired two-tailed Student's *t*-test; values are mean \pm SEM.
- E Impact of soluble factors secreted by CAFs on macrophage migration. Left: schematic of BMDM-derived M1 or M2-like macrophages. Right: Representative pictures and quantification of M1 and M2 macrophage migration at 24 and 48 h towards CM secreted by CAFs (previously treated or not with FAK inhibitor for 48 h). Cells were stained using crystal violet and percentage of crystal violet positive area quantified using Cell Observer videomicroscope (Zeiss) and analysed with ImageJ. * $P < 0.05$, by paired two-tailed Student's *t*-test; values are mean \pm SEM from three experiments.
- F Quantitative real-time PCR conducted with gene-specific primers (CCL2, CCL5 and M-CSF) on four different FAK-I-treated (16 h) and non-treated CAFs for gene expression. The normalized fold change \pm SEM was calculated using the delta-delta Ct method with RPS16 as a control gene; values are mean \pm SEM. Each individual patient-derived activated fibroblast was assigned to a specific symbol (see Table EV2).
- G ELISA quantification of CCL2 (MCP1) concentration ($\mu\text{g/ml}$) in conditioned medium from hCAFs treated or not with FAK-I during 72 h. * $P < 0.05$, by paired two-tailed Student's *t*-test values are mean \pm SEM. Each individual patient-derived activated fibroblast was assigned to a specific symbol (see Table EV2).
- H Left: Representative immunohistochemistry pictures of phosphorylated FAK on tyrosine (Y) 397 and of CD206 in serial sections of human PDAC tissues. Scale bar: 200 μm . Middle: Correlation plot between fibroblastic pY397 FAK score and CD45 or CD206⁺ cell number within human PDAC samples. Fibroblastic pY397 FAK score and percentage of CD206-positive cell quantifications were performed on a 47 patient cohort based on IHC staining. Spearman $r = 0.4145$, $P = 0.0019$. Right: Percentage of CD206-positive cells in PDAC patient expressing either low or high fibroblastic FAK activity score. Values (blue bars) are means \pm SEM; ** $P < 0.01$ using unpaired two-tailed Student's *t*-test.

Source data are available online for this figure.

chemokines CCL2, CCL3, CCL4 and CCL5 are well-recognized chemotactic factors for macrophage populations in the tumour (Ruytinx *et al*, 2018). mRNA expression levels of M-CSF, CCL2, CCL3, CCL4 and CCL5 were analysed in four hCAFs treated with FAK-I. CCL3 and 4 mRNA were undetectable. M-CSF and CCL5 mRNA expressions are not altered by FAK-I treatment; however, CCL2 is drastically reduced at both mRNA (59.4% decrease; Fig 4F) and protein level (84.9% decrease; evaluated by ELISA in hCAF CM) compared to untreated hCAFs (Fig 4G).

Finally, to validate that fibroblastic FAK activity influences M2 macrophages in patients, we searched for a correlation between CD206⁺ tumour-associated macrophage abundance and the fibroblastic pY397 score on a cohort of 47 PDAC patients. As shown in Fig 4H, FAK activity within CAFs positively correlates with CD206⁺ macrophage number ($P = 0.0019$; $r = 0.4142$).

Taken together, we conclude from this section that fibroblastic FAK inactivation decreases intra-tumour M2 macrophage presence. FAK activity within CAFs regulates CCL2 mRNA and secreted protein expression, favours *in vitro* M2 macrophage polarization and migration, and positively correlates with CD206⁺ macrophage number within human PDAC tumours.

Fibroblastic FAK activity controls tumour cell migration and invasion

We then undertook to understand how the sole inactivation of fibroblastic FAK within the primary tumour dramatically reduces spontaneous metastasis, and hypothesized a role for CAF-induced cancer cell invasiveness. Migration of green-labelled FAK-WT or FAK-KD fibroblasts co-cultured with red-labelled KPC cancer cells was explored in a 2D scratch wound assay. Videomicroscopy shows that FAK inactivation in fibroblasts delays the wound closure time from 46 h to more than 72 h (Movies EV1 and EV2 and Fig 5A). Three major parameters were analysed and quantified based on cell tracking (Fig 5B–H, Movies EV1 and EV2): cell velocity (rapidity of cell motion, calculated on moving cells), directionality and distance of migration (length of the path travelled). We observed that, in co-

cultures (fibroblasts plus tumour cells), fibroblasts migrate first, independently of whether they express FAK-WT or FAK-KD, and are followed by tumour cells (Movies EV1 and EV2). When fibroblasts are cultured alone, FAK inactivation significantly decreases their velocity (Figs 5C and, EV4A and B), as well as drastically impairs their migration directionality (Fig 5D and, EV4A and B), confirming published results (Lim *et al*, 2010). Adding tumour cells, which activate fibroblasts (Fig EV3E and (Apte & Wilson, 2012)), rescues FAK-KD fibroblast velocity to levels observed with FAK-WT fibroblasts co-cultured with tumour cells (Fig 5C), but not their loss of directionality (Fig 5D). Moreover, whereas migration distances of FAK-WT and FAK-KD fibroblasts are comparable when cultured alone (Fig 5E), the presence of tumour cells robustly increases the migration distance of activated FAK-KD, but not of FAK-WT, fibroblasts. Indeed, FAK-KD fibroblasts migrate randomly (with low directionality, Movie EV2) and therefore the wound does not close, resulting in continued migration of fibroblasts, which explains their increased migration distance.

Tumour cell velocity is not impacted by the presence of either FAK-WT or FAK-KD fibroblasts (Fig 5F). However, tumour cells migrate with a more linear manner (increased directionality) when co-cultured with FAK-WT fibroblasts compared to tumour cells alone, but not with FAK-KD fibroblasts (Fig 5G). As a result, the distance travelled by migrating tumour cells is significantly higher when co-cultured with FAK-WT, but not with FAK-KD, fibroblasts (Fig 5H). These results show that fibroblastic FAK activity governs, at least in part, the directionality and the subsequent distance travelled by migrating tumour cells.

Next we explored how fibroblastic FAK is involved in cancer cell invasion using a 3D co-culture assay. Visualization and quantification of cell invasion was assessed on spheroids, composed of pancreatic tumour cells and FAK-WT or FAK-KD fibroblasts, embedded into a collagen I matrix (Fig EV4C). Figure 5I shows that fibroblasts expressing FAK-WT are the first cells to invade the collagen matrix and are followed by tumour cells. These sequential invasion events mimic what happens in our *in vivo* model, whereby fibroblasts (α -SMA-positive cells) precede tumour cells (cytokeratin 19-

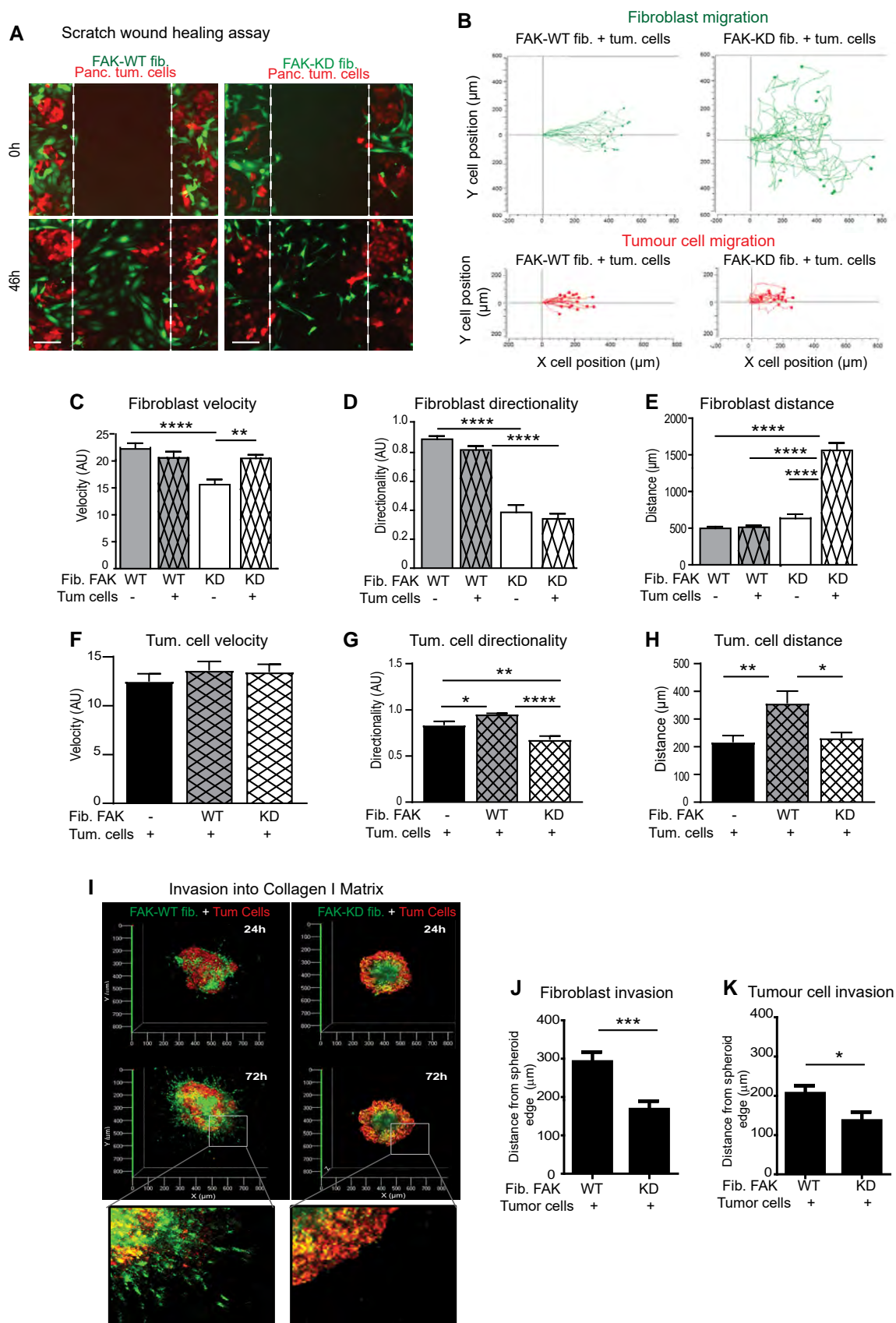


Figure 5.

Figure 5. Fibroblastic FAK activity controls tumour cell migration and invasion.

- A Representative images of three independent scratch wound assays of co-cultivated red-labelled pancreatic tumour cells with either FAK-WT (wild-type) or FAK-KD (kinase-dead) green-labelled fibroblasts at time zero and 46 h (corresponding to the wound closure of co-cultured FAK-WT fibroblasts with tumour cells). Scale bar, 150 μ m.
- B–H Cell migration has been analysed in detail by tracking the location of cells ($n > 16$ cells per condition) over time for fibroblasts or tumour cells (B), and measuring fibroblast velocity (C), directionality (a cell with a directionality equal to 1 is moving straightforward) (D) and migration distance (E) or tumour cell velocity (F), directionality (G) and distance (H). Values are means \pm SEM of 16 tracked cells from two independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ by one-way ANOVA with Tukey's method for multiple comparison.
- I 3D reconstitution of cell invasion into collagen matrix from spheroid composed of green-labelled FAK-WT or FAK-KD fibroblasts plus red-labelled pancreatic tumour cells (ratio 1/1). Shown is representative 3D reconstitution of spheroid invasion into 2 mg/ml collagen I matrix obtained using Zen software.
- J, K Quantification of fibroblast (J) or tumour cell (K) invasion within collagen matrix. Values are means \pm SEM of 60 tracked cells from three independent experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, by unpaired two-tailed Student's t -test.

Source data are available online for this figure.

positive cells) during the invasion process into the spleen (Fig EV4D). Importantly, loss of FAK activity specifically within fibroblasts drastically modifies spheroid organization and cell invasion (Fig 5I), whereby distances of fibroblast (Fig 5J) and of pancreatic tumour cell (Fig 5K) invasion from the spheroid edge are significantly decreased.

Our results show that fibroblast-induced tumour cell migration and invasion are dependent on fibroblastic FAK activity.

Fibroblastic FAK activity promotes drastic ECM modification

We then undertook to identify mechanisms implicated in the fibroblastic FAK-induced tumour cell invasion and postulated that ECM remodelling could be involved. Indeed, in collective migration, carcinoma cells move along invasive tracks made of ECM deposited by fibroblasts (Beacham & Cukierman, 2005; Gaggioli

et al, 2007) and mechanically remodelled by them (Cukierman et al, 2002; Grinnell, 2003). ECM tracks play important role in the initial metastatic step (Kopanska et al, 2016). Thus, we analysed for changes in ECM, cancer cell and/or CAF organization at the invasive front in our *in vivo* model and identified a drastic difference between the two groups. Figure 6A shows that, in the FAK-WT fibroblast tumours, CAFs are oriented towards the adjacent pancreatic tissue, thus with a radial arrangement (parallel to the tumour radius but aligned perpendicularly to the tumour edge), but FAK-KD CAFs are organized perpendicular to the tumour radius (parallel to the tumour edge). Interestingly, ECM (Sirius Red) and CAFs have the same orientation (Figs 6A and EV5A). We then undertook to characterize, *in vitro*, the impact of FAK inactivation on deposited ECM during fibroblast migration. First of all, FAK-WT and FAK-KD fibroblasts were activated by TGF- β treatment as this cytokine is known to promote fibroblast

Figure 6. Fibroblastic FAK activity promotes drastic ECM modification.

- A Representative images of CK19 and α -SMA immunohistochemistry and Sirius red staining in serial sections of primary mouse tumour (graft of FAK-WT or FAK-KD fibroblasts + tumours cells at 38 days after injection) at the invasive front. Scale bar, 100 μ m. Bottom: schematic organization of the cells (tumour cells in brown, CAFs in yellow and non-transformed epithelial cells in beige).
- B Representative images of ECM deposition (stained using Alexa Fluor 488 succinimidyl ester [NHS]) generated by FAK-WT or FAK-KD activated fibroblasts during migration. Scale bar, 50 μ m.
- C Quantification of collagen I gel contraction (calculated based on photographed gels using the formula $100 \times (\text{well diameter} - \text{gel diameter}) / \text{well diameter}$) induced by fibroblasts in presence or not of tumour cells (left: one-way ANOVA with Tukey's method for multiple comparison), or by hCAFs in presence or not of FAK inhibitor (FAK-I, 1 μ M; right: paired two-tailed Student's t -test for each time). Values are means \pm SEM from three independent experiments of triplicates. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.
- D Quantification of the percentage change of Y397 FAK, total FAK, collagen I (coll I), collagen III (coll III), collagen IV (coll IV), LOXL2, periostin (POSTN), osteopontin (OPN) expression by human CAFs treated or not (NT) with FAK inhibitor (1 μ M), based on immunofluorescence analyses. Values are means \pm SEM obtained from at least five primary hCAFs, isolated from 5 to 12 different fresh human PDAC samples. NS: not significantly different; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ using paired two-tailed Student's t -test.
- E Collagens I, III and IV and periostin deposition are shown using heat map of the IF staining, and cell shapes are identified by white line. Scale bar, 50 μ m.
- F–K Characterization of the ECM-enriched fraction (matrisome analyses) from hCAFs treated or not with FAK-I by LC-MS/MS proteomics. (F) Pie charts display the relative proportion of each of the major classes of matrisome proteins in non-treated hCAFs ($N = 3$ biological replicates with two technical replicates/condition) vs FAK-I-treated hCAFs ($N = 3$ biological replicates with two technical replicates/condition). (G, H) Left: Normalized peptide abundance for collagens (G) or proteoglycans (H) from hCAFs (each CAF duplicate is represented, CAF1 in blue, two in red and three in black) treated or not with FAK inhibitor. Right: Heatmap of the collagen (G) or proteoglycan (H) modifications in the three hCAFs upon FAK inhibition in hCAFs. The value of \log_2 fold change between FAK inhibitor-treated CAFs and non-treated CAFs for each protein was indicated by the coloured scale, with red indicating increased expression while blue implies decreased expression. For each CAFs and each protein, \log_2 fold change was calculated based on two technical replicates per condition (biological replicate $n = 3$, technical replicate $n = 2$). (I) Normalized peptide abundance for glycoproteins from hCAFs treated or not with FAK-I. (J) Heatmap of the glycoprotein modifications upon FAK-I in hCAFs. (K) Normalized peptide abundance for "matrisome-associated" protein division: ECM-affiliated proteins, secreted factors and ECM regulators from hCAFs treated or not with FAK inhibitor. (G, H, K) Each individual patient-derived activated fibroblast was assigned to a specific symbol (see Table EV2).
- L Left: Representative pictures of $\beta 1$ integrin activation (red) of tumour cells, upon adhesion to either ECM deposited from non-treated CAFs or treated with FAK-I for 7 days, analysed by IF. Merge: activated $\beta 1$ integrin (red), phalloidin (green), dapi (blue). Right: quantification of the number of activated integrin $\beta 1$ cluster per cells and size of those clusters. Values are means \pm SEM, **** $P < 0.0001$ using paired two-tailed Student's t -test on at least nine images (of three to 33 cells per image) per group, scale bar: 10 μ m.

Source data are available online for this figure.



activation during wound healing and tumorigenesis (Desmouliere *et al*, 1993; Phan, 2008; Albregues *et al*, 2014). Analysis of deposited ECM during fibroblast migration shows that FAK activity is required for the production of ECM tracks as TGF- β -activated FAK-WT fibroblasts generate dense and abundant ECM fibres, oriented through the wound, whereas FAK-KD fibroblasts instead deposit ECM in heaps (Fig 6B). Thus, FAK activity within fibroblasts regulates ECM track generation both *in vitro* and *in vivo*.

Extracellular matrix track generation is dependent on fibroblast-induced ECM remodelling. ECM remodelling occurs through forces applied by cells on the ECM through integrins (named force-mediated matrix remodelling), and can be quantified by measuring collagen matrix contraction (Cukierman *et al*, 2002; Grinnell, 2003). Therefore, we quantified the impact of FAK inhibition on fibroblast-induced ECM contraction. In basal conditions, FAK-WT fibroblasts display a higher contractile phenotype than FAK-KD fibroblasts (Fig EV5B–D). A transient pulse of TGF- β stimulation increases force-mediated matrix remodelling in FAK-WT, but not in FAK-KD, fibroblasts (Fig EV5B–D). Similarly, fibroblasts activated by the presence of tumour cells are less susceptible to contract the matrix when their FAK is inactivated (Fig 6C). Importantly, pharmacological FAK inactivation in primary hCAFs also significantly decreases CAF-induced matrix contraction (Fig 6C). Thus, FAK activity within fibroblasts regulates ECM organization by impacting force-mediated matrix remodelling.

Extracellular matrix composition and organization are key regulators of the initial step of metastasis. Thus, we analysed the impact of FAK inactivation on CAF-derived ECM production and composition using primary cultures of hCAFs. As expected, FAK inhibition decreases FAK-Y397 phosphorylation without impacting total FAK expression (Figs 6D and EV5E–G). FAK inactivation does not significantly impact collagen I expression (although 40% of hCAF culture show a decrease), but a significant downregulation is seen for collagen III and IV expression (Figs 6D and EV5E–G) and extracellular deposition (Fig 6E), as well as for LOXL2 expression, an enzyme implicated in the last step of collagen fibre maturation and more generally in matrix remodelling (Barker *et al*, 2013) (Figs 6D and EV5E and F). Upon FAK inactivation, 100% of the hCAF culture show a decrease in periostin expression and deposition (Fig 6D and E), as well as in osteopontin expression (Figs 6D and EV5E–G), two matricellular proteins implicated in tumour progression (Kolb *et al*, 2005; Fukushima *et al*, 2008).

To better identify changes in the composition of ECM protein expression induced by fibroblastic FAK inactivation, mass spectrometry-based proteomics, a method of choice to profile the protein composition of ECMs produced by cells in culture, was performed (data are available via ProteomeXchange with identifier PXD018899). Using the matrisome-focused proteomic technique (Naba *et al*, 2017), we quantitatively assessed matrisome proteins on 3 primary cultures of hCAFs treated for 7 days with FAK inhibitor (1 μ M). This analysis shows that FAK inhibition robustly decreases the expression of proteins belonging to the “core matrisome” (structural and fibrillar extracellular components, glycoproteins and proteoglycans), which drops from 23 to 16% of the whole matrisome content. In contrast, “matrisome-associated proteins” (ECM regulators, ECM-affiliated proteins and ECM-secreted factors) are globally not impacted by FAK inhibition (Fig 6F). Figure 6G–J shows that, among the three hCAF cultures tested, two (hCAF1 and

2) present, under FAK inactivation, a strong decrease of collagens (10 different collagens were detected, Fig 6G), proteoglycans (three detected, Fig 6H) and glycoproteins (40 proteins detected, Fig 6I and J). Importantly, as opposed to hCAF1 and 2, basal levels of collagens, proteoglycans and glycoproteins produced by hCAF3 are very low and are not impacted by FAK inhibition (Fig 6G–I). Such differences in terms of response to treatment are in accordance with our immunofluorescence (IF) results (Fig EV5E and F) and were expected as recent publications have reported hCAF heterogeneity in PDAC tumours (Ohlund *et al*, 2017). Regarding “matrisome-associated proteins” that are globally not modified by FAK inhibition (Fig 6K), ECM regulators (32 detected) are downregulated in all three hCAFs, whereas ECM-affiliated proteins (affiliated either structurally or physically with the core matrisome, 14 detected) and secreted factors (such as growth factors and cytokines, known or suspected to bind to ECM, 17 detected) show no change in expression levels (Figs 6K and EV5H–J).

Finally, we analysed the impact of such ECM modifications on tumour cell integrin activation and more specifically on β 1 integrin, as overexpression of β 1 is correlated with poorer DFS in PDAC (Sun *et al*, 2018b), and β 1 integrin activation mediates adhesion and invasiveness in PDAC lines (Arao *et al*, 2000). We report here that tumour cell β 1 integrin activation is dramatically decreased upon adhesion to ECM deposited by hCAFs treated with FAK-I compared to non-treated hCAFs, while β 1 integrin expression is not changed (Figs 6L, EV5K and L).

Altogether, these data show that pharmacological FAK inactivation prevents hCAF force-mediated matrix remodelling and downregulates expression of core matrisome proteins. FAK inhibition reduces hCAF-induced collagen, glycoprotein, proteoglycan and ECM-regulator expression without impacting ECM-affiliated proteins and secreted factors. Such modifications directly influence tumour cell integrin activation status.

Discussion

In this study, we report that FAK activity within CAFs is an independent prognostic marker for PDAC patients (patients with high FAK activity, i.e. high score for pY397 FAK within CAFs, have significantly shorter DFS and OS than patients with low FAK activity), whereas FAK activity within tumour cells is not. These cell specific observations are in accordance with a recent publication by Jiang *et al* (2016) that reports that the tumour cell pY397 FAK level does not correlate by itself with patient survival, but only when combined with intra-tumoural CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte infiltration.

When splitting our cohort into high grade ($n = 22$) and low or medium grade ($n = 98$) tumour patients, it appears that fibroblastic FAK activity is predictive of shorter DFS or OS for the less aggressive group (low and moderate grade tumours). We suggest that a gain of FAK activity within CAFs may provide an invasive advantage to well and differentiated tumour cells endowed with a low intrinsic invasive capacity (no epithelial–mesenchymal transition, EMT), and for which the biology of the tumour invasion process is still not clear. Instead, in aggressive tumours, dedifferentiated carcinoma cells (high grade), present at invasive tumour margins, detach from the main tumour, (a process named “tumour budding”

(Karamitopoulou *et al*, 2018)), and acquire EMT features, so intrinsic skills for invasion. Thus, we suggest that CAFs with high FAK activity do not change tumour cell intrinsic features for invasion but provide these features extrinsically to lower grade tumour cells. This may explain why fibroblastic FAK activity does not correlate with tumour grade, even so it is a well-established prognostic factor in PDAC.

Of note, tumour size, grade, lymph node status and resection margins are the main tumour-derived prognostic factors in resected PDAC patients. However, they are insufficient to fully predict the risk of recurrence and death in resected PDAC patients. Thus, there is a need for biomarkers to improve PDAC patient prognostic stratification. Our results indicate that fibroblastic FAK activity is a prognostic marker independent of all other known “classical” predictive markers (i.e. grade, tumour size, lymph nodes, resection margins, perineural and vascular invasion), and support that fibroblastic FAK activity might improve the prognostic stratification of the “differentiated-grade” subgroup of patients for which actual histopathological markers are far to be perfect.

To our knowledge, the status and role of FAK activity within CAFs were unknown. FAK signalling and role have mainly been studied in “normal” fibroblasts where it regulates cell adhesion, spreading, migration and survival (Sieg *et al*, 2000; Schlaepfer & Mitra, 2004; Horowitz *et al*, 2007; Lim *et al*, 2010), as well as pro-fibrotic gene expression and matrix remodelling (Ilic *et al*, 2004; Hong *et al*, 2010). Additionally, in pathologic conditions, pharmacologic FAK inactivation was reported to reduce the number of CAFs within PDAC primary tumours or to abrogate lung fibrosis on bleomycin-induced fibrosis mouse model, but without any demonstration that targeting fibroblastic FAK activity may be involved (Stokes *et al*, 2011; Lagares *et al*, 2012; Kinoshita *et al*, 2013). Here we show that specific FAK inactivation in CAFs (using models of pharmacologic or genetic inactivation) impairs fibroblast and tumour cell migration and invasion *in vitro* and reduces metastasis formation *in vivo*. Moreover, FAK activity within fibroblasts is critical for fibroblast-induced ECM remodelling. Indeed, using the “matrisome” approach developed by R. Hynes and A. Naba (<http://matrisomeproject.mit.edu>), we show that pharmacologic FAK inhibition in primary CAFs isolated from patient tumours globally decreases the expression of ECM proteins from the “core matrisome” (collagens, glycoproteins and proteoglycans) and ECM regulators. Using more classical technics (i.e. IF and Western blot), we validated, *in vivo* and *in vitro*, that FAK inactivation decreases the expression and deposition of key ECM proteins (collagens III and IV, periostin and osteopontin) and of LOXL2, an enzyme involved in collagen fibre maturation. This is consistent with our observation that tumour collagen bundling is impaired in mouse FAK-KD co-engrafted tumours. Altogether, it appears that the prognostic value of FAK activity within CAFs in PDAC patients could be linked to the stimulating effects of FAK signalling on CAF-induced ECM production and remodelling, two critical triggers of tumour cell metastasis (Provenzano *et al*, 2006; Erdogan & Webb, 2017). Interestingly, Moffitt *et al* (2015) recently established that PDAC patients with an “activated stromal” subtype, which comprises enrichment in ECM genes (collagens, fibronectin and periostin), have reduced survival as compared to patients with a “normal” stromal subtype. In 2018, Puleo *et al* (2018), based on a larger cohort of 309 PDAC samples, redefined the classification allowing an integrated stratification using

tumoural and stromal compartments. An activated stroma component defined by high FAP, and ACTA2 expression, correlates with the activated stromal signature defined by Moffitt *et al*. Enrichment analysis confirmed significant overexpression of activated stroma, extracellular matrix organization, focal adhesion, extracellular matrix–receptor interaction and collagen formation pathway genes (Puleo *et al*, 2018). Since we demonstrate that fibroblastic FAK inhibition decreases ECM production and remodelling, one can predict that targeting pancreatic CAFs using a FAK pharmacological inhibitor will induce a stroma switch from the “activated” to the “normal” phenotype.

We here report that FAK activity within CAFs correlates with patient survival, drives ECM remodelling resulting in tumour invasion and favours M2 pro-tumoural macrophage recruitment via MCP1 secretion. When analysed in detail, we noticed that human primary PDAC CAFs present an important inter-patient heterogeneity in terms of FAK activity score, of MCP1 gene and protein expression, of production and secretion of specific ECM, of effectiveness to recruit pro-tumoural macrophages, and of response to FAK inhibitor. Inter-tumour stromal heterogeneity was reported in PDAC patients and enables patient stratification within prognosis groups (Moffitt *et al*, 2015; Puleo *et al*, 2018). Additionally, diverse subpopulations of CAFs were recently reported to co-exist within a same PDAC tumour, being heterogeneous with regard to cell surface marker expression, cytokine production or cell signalling (Nielsen *et al*, 2018; Whittle & Hingorani, 2019; Norton *et al*, 2020). A recent publication identified, using molecular and functional analyses of several patient-derived CAF primary cultures, four CAF sub-groups that co-exist within a tumour, each featuring specific phenotype and prognostic value (Neuzillet *et al*, 2019). While we were preparing this manuscript, the Hodivala-Dilke’s group showed that FAK depletion in a subpopulation of CAFs (FSP1-positive) metabolically increases pancreatic tumour growth in mice and that low FAK gene expression within CAFs is associated with poor PDAC patient survival (Demircioglu *et al*, 2020). FAK role depends on both its scaffolding and kinase activities, and our FAK-inactivating strategy mimics the pharmacological inhibition as FAK-KD mutant retains the cytoplasmic and nuclear scaffolding functions of FAK, which is not the case when FAK gene is invalidated (Demircioglu *et al*, 2020). Another explanation for differences between ours and published results (Demircioglu *et al*, 2020) is that FAK expression and/or signalling may be heterogeneous across patient tumours and within different CAF subsets in a same tumour, putatively explaining different biological consequences for FAK targeting. Accordingly, we observed that fibroblastic FAK activity is highly heterogeneous between PDAC patients, and showed that the fibroblastic pY397 FAK score is an independent prognosis marker that would help to identify patients with high risk of early relapse after surgery, and with the most benefit of receiving an adjuvant protocol including a FAK inhibitor.

Most PDAC patients die from a metastatic disease within the first year of diagnosis. Here, we report that fibroblastic FAK inactivation drastically reduces spontaneous metastasis *in vivo*. Dissemination of cancer cells into normal adjacent tissue is driven by ECM remodelling induced either by CAFs or tumour cells themselves (Gaggioli *et al*, 2007; Friedl & Wolf, 2008). Invasive leading cells protrude, attach to the ECM and generate anterior traction forces, whereas ECM fibres are cleaved several micrometres posterior to the leading

edge (Wolf *et al*, 2007; Friedl & Wolf, 2008). Remaining matrix fibres bound to integrins are realigned as the cell moves forward, resulting in the generation of paralleled fibres, also named as invasive matrix tracks, that “follower” cells can use to migrate (Wolf *et al*, 2007; Friedl & Wolf, 2008; Kopanska *et al*, 2016). Here, we show that CAFs represent “leader” cells for the migration and invasion of pancreatic tumour “follower” cells (Fig 6). Those results can be compared to our *in vivo* observation where CAFs precede tumour cells at tumour invasive front and during spleen invasion. When fibroblastic FAK is active, CAFs invade and reorganize the ECM within adjacent tissue or distant invaded organ, giving an ECM orientation perpendicular to the tumour edge. Importantly, CAFs and ECM orientation are drastically modified when fibroblasts express an inactivated form of FAK, both presenting an orientation parallel to the tumour edge (Fig 6). ECM geometrical and mechanical properties play an important role for the initial step of metastasis formation (Provenzano *et al*, 2006). Aspects of stromal biology including reorganization of the ECM to promote invasion and changes in the expression of stromal cell types are key medical markers for cancer prognosis (Conklin & Keely, 2012). We show that FAK inactivation totally blocks the ability of CAFs to generate ECM tracks that tumour cells use to invade. Additionally, we demonstrate that FAK activation within CAF “leader” cells drives tumour “follower” cell migration and invasion since the sole inhibition of fibroblastic FAK severely decreases fibroblast and tumour cell migration and invasion *in vitro*, as well as severely reduces spontaneous metastasis *in vivo*. Altogether, the anti-metastatic effect of fibroblastic FAK inhibition appears to be linked to reduced fibroblast migration and invasive abilities, and to ECM remodelling leading to a decrease of integrin activation in tumour cells. Accordingly, high fibroblastic pY397 FAK is predictive of worse DFS and OS for the low and moderate grade group (in which tumour cells are still devoid of intrinsic invasive capacity) but not for the high grade group (in which tumour cells are able to perform EMT).

We also show that FAK activity in CAFs positively correlates with the quantity of immunosuppressive M2 macrophages in human PDAC samples. Previous studies reported that pharmacologic FAK inhibition, on genetic PDAC mouse (KPC) (Jiang *et al*, 2016) or immunocompetent PDAC-bearing mouse models (Stokes *et al*, 2011), decreased numbers of tumour-infiltrating immunosuppressive cells such as tumour-infiltrating myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), CD206⁺ tumour-associated macrophages and CD4⁺FOXP3⁺regulatory T cells (Tregs). Complementary to global pharmacologic FAK inhibition's studies, here, we report that inactivation of FAK specifically in fibroblasts impacts pro-tumoural M2 macrophage population, decreasing their migration and their polarization via a mechanism involving CAF-induced secreted factors, especially CCL2 (MCP1). The role of FAK in the regulation of secreted factors was recently reported by Serrels *et al* (2015). The authors identified that, in squamous cell carcinoma, nuclear translocation of FAK triggers transcription of inflammatory cytokines and chemokines by tumour cells, e.g. MCP1 known to facilitate M2 macrophage polarization and migration, thereby promoting an immunosuppressive microenvironment. As we show that FAK activity is increased in both the cytoplasm and nucleus of CAFs in PDAC samples (Fig 1), one can speculate that such mechanism may be involved in the FAK-dependent MCP1 secretion that we showed in CAFs.

Our results, altogether with DeNardo's group study (Jiang *et al*, 2016), provide a scientific rationale to support the ongoing clinical trials (NCT02428270, NCT02546531, NCT02651727 and NCT02758587) for PDAC patients, combining the well-tolerated FAK inhibitors (defactinib or VS-4718 or GSK2256098), with MEK inhibitor (trameetinib), or pembrolizumab (a monoclonal anti-PD1 antibody) or chemotherapy (gemcitabine ± nab-paclitaxel) (Infante *et al*, 2012). FAK pharmacological inhibition should, on one hand, target tumour cells leading to increased sensitivity to chemotherapy and immune-checkpoint inhibitor (Jiang *et al*, 2016), and, on another hand, impact activated fibroblasts reducing ECM remodelling and PDAC metastasis as we demonstrate here.

Materials and Methods

Tissue array

Commercial tissue microarray

Commercial tissue microarray was obtained from BIOMAX.US (<http://www.biomax.us/tissue-arrays/Pancreas/PA1002a>) and IHC was performed as described in the “Immunostaining” section. Slides stained for pY397 FAK were imaged using NanoZoomer XR Hamamatsu (Imag'IN core from Institut Universitaire du Cancer Toulouse, France). Two spots per patient were double blinded quantified based on pY397 FAK staining intensity and positive cell number (a total of four quantifications were performed per patient, and mean calculated). pY397 FAK cytoplasmic and nuclear staining were both scored on a scale of 0: 0 for no staining and 6 for high positive staining, taking into account the intensity of the staining and the quantity of positive cells. pY397 FAK CAF staining score is the mean of cytoplasmic and nuclear score.

Patient samples

120 patient cohort, tissue array

Patients were selected from a retrospective cohort of 120 consecutive patients with stage I–II PDAC who underwent complete surgical resection between April 1997 and April 2009 at Beaujon University Hospital (Clichy, France). All participants gave informed consent before taking part in accordance with the principles set out in the WMA Declaration of Helsinki and the Department of Health and Human Services Belmont Report. Exclusion criteria were macroscopically incomplete resection (R2), tumour histology other than PDAC and death within 30 days following surgery. TMAs were constructed from 600 µm tissue cores obtained from formalin-fixed paraffin-embedded tumour samples, with 3–5 cores per patient, and used for prognostic and predictive biomarker research. Clinical and pathological variables were retrospectively collected, including sex, age at diagnosis, tumour site, preoperative assessment of tumour extension, surgical procedure, resection margins (R0: negative, R1: positive), differentiation grade, tumour size, tumour stage, lymph node status (negative: N–, positive: N+), LNR (i.e. the ratio of lymph nodes with tumour metastasis to total lymph nodes analysed), TNM classification, and presence of vascular and perineural invasion. This cohort has been used for pY397 FAK IHC staining. Statistical analyses: Percentage of cells expressing low, medium and high pY397 FAK staining was

quantified using Definiens Tissue Studio® (Imag'IN core Institut Universitaire du Cancer, Toulouse, France) in stromal and tumour areas. Definiens Tissue Studio multi-resolution segmentation algorithm has been applied on PDAC TMA using the following steps. (i) ROI segmentation was identified by image partitionization into spectrally coherent regions (based on morphology, haematoxylin intensity, area and shape). (ii) Manual classification of subsets of super-pixels (as, e.g., tumour area, stroma area) was performed. (iii) Machine-learning algorithms for automatic morphological segmentation were ran. Software automatically segments each individual cell based on morphology, haematoxylin intensity, area and shape, and identifies each cell as a mathematical object within the different subregions defined previously allowing the nuclear/cytoplasm detection. (iv) IHC staining classification built-in stain deconvolution algorithm enables to separate IHC stain from the background haematoxylin counterstain and to classify it based on intensity into four groups (negative, low, medium or high intensity). FAK activity score (h-score) was calculated based on Definiens results as followed: 1X (%low pY397 FAK cells) + 2X (%medium pY397 FAK cells) + 3X (%high pY397 FAK cells). Patients were separated in half (60/60) based on their pY397 FAK h-score (either in CAFs or in tumour cells depending on the performed analysis), generating pY397 FAK low group (lower half based on the median) and pY397 FAK high group (upper half) of 60 patients each. The outcome variables were DFS and OS. DFS was defined according to the DATECAN consensus (Bonnetain *et al*, 2014) as the time interval between the day of surgical resection and the date of local relapse, or regional relapse, or occurrence of distant metastases, or appearance of a second PDAC, or death (all causes), whichever occurred first. Survival data were censored at the last follow-up. OS was defined as the time interval between day of surgical resection and death (all causes) or date of last follow-up, at which point data were censored. Survival curves were estimated with the Kaplan–Meier method and compared using log-rank test. We used non-parametric tests (chi-square test) to compare independent groups for categorical data. Multivariate analyses, with backward variable selection, were conducted with the Cox proportional-hazards regression model. Variables up to the 0.05 level in univariate analysis were included in the multivariate model. The level of significance for all tests was defined as $P < 0.05$. Statistical analyses were carried out with PRISM 5 and XLSTAT 2017.

47 patient cohort, whole slide

Forty-seven patients were selected from a retrospective cohort of patients with localized (non-metastatic) PDAC who underwent complete surgical resection between December 2011 and January 2014 at Beaujon University Hospital (Clichy, France; Biobank registration number BB-0033-00078) (Neuzillet *et al*, 2019). All participants gave informed consent before taking part. Exclusion criteria were neoadjuvant chemotherapy and/or radiotherapy, macroscopically incomplete resection (R2), tumour histology other than PDAC, and insufficient tumour material available for research.

Fresh PDAC patient samples

Tumours from patients with surgery-resected pancreatic cancer were from the Pathology Department of Toulouse and Limoges Hospitals, France. hCAF cultures were obtained from fresh human

PDAC samples after informed consent in accordance with the declaration of Helsinki and stored at the “Cancer Research Center of Toulouse” collection (CRCT, INSERM U1037, No. CPP DC-2016-2654), according to the French law (declaration to the ministry of higher education and research). PDAC patient samples were either paraffin-embedded for IHC staining or processed for CAF isolation (see “Cells” section). This study was approved by the ethic committee of the Institution.

Cells

Human cancer-associated fibroblasts

CAFs were isolated from human pancreatic tumour tissues using the outgrowth method described by Bachem *et al* (1998). Briefly, human CAFs were isolated using explant techniques from histologically fibrotic areas of PDAC surgically resected. Small tissue blocks were cut (0.5–1 mm³) using razor blade and seeded in 10-cm² uncoated culture wells in the presence of Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM/F12 Lonza D8437) containing 10% FBS (Life Technologies) supplemented with L-Glutamine (L-glu, 2 mmol/l), penicillin and streptomycin (P/S). Tissue blocks were cultured at 37°C in a 5% CO₂-air humidified atmosphere. Eighteen hours after seeding, culture medium was changed. CAFs grew out from the tissue blocks 1–3 days later.

Mouse pancreatic tumour cells

Mouse pancreatic tumour cells are tumour cells isolated from LSL-K-Ras^{G12D/+};LSL-p53^{R172H/+};Pdx1-Cre (also referred as KPC) (Olive *et al*, 2009) and generously provided by Dr. D. Saur (University Hospital Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Germany). Lentivirus-transduced mCherry-expressing tumour cells were puromycin selected and sorting for mCherry. Mouse tumour cells were maintained in DMEM 10% FBS plus P/S and L-glutamine.

Mouse embryonic FAK-WT or FAK-KD fibroblast generation

Primary FAK-KD/KD and FAK-WT/WT MEFs were generously provided by Dr. David Schlaepfer (UCSD, San Diego, USA). MEFs were isolated from E8.5 embryo explant culture. Kinase inactive FAK was generated by knock-in point mutation strategy (FAK lysine 454 to arginine) in fak exon 21 (Lim *et al*, 2010). MEFs were expanded and maintained on dishes pre-coated with 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich, #G2500) in DMEM/F12 10% FBS plus P/S and L-glu. After expansion and limited passage, primary MEFs were immortalized via retrovirus-mediated expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) followed by puromycin selection, or spontaneously immortalized. GFP-MEFs (green-labelled MEFs) were generated by lentiviral infection and GFP sorted.

Macrophages derived bone marrow monocytes

Mice were euthanized in accordance with institutional animal ethics guidelines. Femurs and tibias were harvested and bone cavity flushed with serum-free DMEM. Cells were spun and washed and plated in DMEM/F12 10% FBS plus P/S and L-glu. BM cells were treated with murine recombinant M-CSF (20 ng/ml; Immunotools, #12343115) for 10 days in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. Cells were then stimulated with LPS (10 ng/ml; Sigma-Aldrich, L2880-10MG) plus IFN- γ (20 μ g/ml;

Peprotech, #315-05-100UG) or with IL-4 (10 µg/ml; Peprotech, #214-14-20UG) plus IL-13 (20 µg/ml; Peprotech, #210-13-20UG) for 24 h in order to polarize M0 macrophages into, respectively, M1 or M2-like macrophages.

Tumour mouse model: Pancreatic cancer cell and fibroblast syngeneic and orthotopic co-grafting

Mouse pancreatic cancer cells and FAK-WT or FAK-KD fibroblasts were trypsinized, washed and suspended in sterile PBS. A 1:3 mix of pancreatic cancer cells (20×10^3) and FAK-WT or FAK-KD fibroblasts (60×10^3) contained into 20 µl of PBS were injected in the pancreas of anesthetized (Isoflurane, Isovet from Piramal Health) 8-week-old female c57bl/6j (Charles River, France). Each group was composed of at least five mice. Twenty-one or 38 days after injection, mice were euthanized and primary pancreatic tumour, lung, liver and spleen were removed, analysed and paraffin-embedded before being sliced and stained. Mice were kept under specific pathogen-free conditions. All experiments were in accordance with institutional guidelines and European animal protection law and approved by the responsible government agency (agreement number 201612011806414).

Colorations and Immunostaining (see Table EV3 for antibody and reagent references)

Paraffin-embedded tissue sections were incubated 30 min at 60°C before being deparaffinized and rehydrated. For H&E staining, slides were then incubated 3 min in haematoxylin, washed 5 min in water, incubated 3 min in eosin and twice soaked in 100% ethanol before being incubated in xylene for 5 min and mounted using Eukitt. For immunostaining, after rehydration, slides were processed for antigen retrieval (10 mM sodium citrate pH6 or Tris-EDTA pH9 and autoclaved at 120°C for 12 min) and quenched for peroxidase activity (10 min with 0.3% hydrogen peroxide at RT) before being washed 5 min in PBS. Periphery of section was marked with hydrophobic marker and sections blocked with blocking buffer during 45 min (RT). Slides were incubated with primary antibodies (see Table EV3) overnight at 4°C. Slides were PBS washed and incubated with ImmPRESS secondary antibody 1 h at RT. After PBS washes, antibody binding was visualized with DAB substrate kit or AEC substrate chromogen and counterstained with haematoxylin (2 min). Slides were washed with water, and sections were mounted using glycerol and imaged using Panasonic 250 scanner (Imag'IN core Institut Universitaire Cancer Toulouse, France). For Sirius Red staining, deparaffinized and hydrated sections were incubated with Pico-Sirius Red Solution for 1 h, rinsed, dehydrated in alcohol and mounted using Eukitt. Sections were analysed using Cell Observer videomicroscope (Zeiss) with polarizer D, 90° rotatable for Axio Observer (Zeiss). According to the manufacturer's instructions (Abcam, ab150681), areas of yellow-orange birefringent fibres corresponding to type I (thick fibres) collagen and green birefringent fibres corresponding to type III (thin fibres) collagen were quantified using ImageJ. Areas of lung metastasis were quantified based on CK19 staining allowing tumour cell identification. Percentage of metastasis area is the ratio of 100* (CK19-positive area divided by total lung area).

To demonstrate the specificity of the FAK phosphorylation site specific antibody, anti-pY397 FAK antibody (clone 31H5L17, Thermo Fisher Scientific) was pre-incubated with 200-fold molar excess of peptide (ab40145) for 12 h rolling at 4°C before being used. In parallel, human PDAC sample slides were pre-incubated with Lambda phosphatase (NEB, P0753S) for 2 h at 37°C (according to the manufacturer's instructions) before being incubated with FAK Y397 antibody (clone 31H5L17, Thermo Fisher Scientific).

Immunofluorescence staining (see Table EV3 for antibody and reagent references)

Human primary CAFs were plated in petri dish with coverslips previously coated with 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich). After cell adhesion, cells were starved with DMEM/F12 0.5% FBS overnight. hCAFs were then treated during 48 h with FAK inhibitor (PF-562271, Selleckchem, #S2890) at 1 µM. Forty-eight hours later, coverslips were processed for IF staining. Cells were first fixed (10 min, 10% formalin), permeabilized (10 min, 0.05% Triton X-100) and incubated with 1% BSA for 1 h. Primary antibodies for periostin, osteopontin, lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), pY397 FAK, collagen I, collagen III, collagen IV, FAK and secreted protein acidic and cysteine rich (SPARC) were added in 1% BSA overnight at 4°C. Cells were PBS washed and DAPI plus secondary antibodies Goat anti-Mouse Alexa Fluor-488 or Goat anti-Rabbit Alexa Fluor-647 were added for 1 h at RT. After PBS washes, slides were mounted in Fluorescent mounting Medium and images acquired using Cell Observer videomicroscope (Zeiss), Zen 2012 blue edition. At least 20 cells per patient and per condition were imaged. Quantification was performed using ImageJ. Files were cropped and contrast adjusted using Photoshop (Adobe).

Western blot (see Table EV3 for antibody and reagent references)

Cells were lysed in lysis buffer (50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 5 mM sodium orthovanadate, 2 mM NaF, 1 mM DTT and a cocktail of protease inhibitors, Roche). Protein extract concentration was measured using Protein Assay Reagent (Bio-Rad), and equal amounts of proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in 5% BSA in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) for 1 h followed by incubation with primary antibodies overnight at 4°C. Membranes were then washed with TBST three times and incubated with horseradish peroxidase-coupled secondary antibody for 1 h at room temperature, washed again and treated with enhanced chemiluminescence prior to detection on ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad).

To demonstrate the specificity of the FAK phosphorylation site specific antibody, anti pY397 FAK antibody (clone 31H5L17, Thermo Fisher Scientific) was pre-incubated with the synthetic blocking peptide (ab40145) for 12 h rolling at 4°C before being used as described previously. In parallel, fibroblast lysate (50 µg) was pre-incubated either with Lambda phosphatase (NEB, P0753S) overnight at 37°C (according to the manufacturer's instructions) or with 5 mM sodium orthovanadate before being processed for Western blotting using FAK Y397 antibody (clone 31H5L17, Thermo Fisher Scientific).

Scratch wound healing assay

25×10^3 red-labelled pancreatic tumour cells (mCherry-transfected cells) and 25×10^3 FAK-WT or FAK-KD green-labelled fibroblasts (GFP-transfected cells) were mixed and plated in 0.1% gelatin pre-coated Lab-Tek glass chamber (Lab-Tek, #154941) in DMEM/F12 complete medium overnight. Cells were then starved with 0.5% FBS plus 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C for 1 h. Confluent monolayer was then scratched using sterile 10 μl pipette tip. Cells were PBS washed before DMEM/F12 plus 0.5% FBS and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ mitomycin C added. Images were acquired every 3 min for 72 h at 37°C and 5% CO_2 on Cell Observer videomicroscope motorized with AxioObserver Z1 (ZEISS); Objective 10 \times EC Plan-Neofluar; Source Colibri 2LED (ZEISS), using software Zen Blue 2012. Scratch wound assay movie was made from time zero to 72 h. Individual cell tracking was performed using MTrackJ plugin of ImageJ. Distance of migration (length of the path travelled), directionality (calculated by comparing the Euclidian distance to the accumulated distance represents a measurement of the directness of cell trajectories) and migration velocity (rapidity of cell motion, calculated on moving cells) were analysed using Chemotaxis and Migration Tool software (free software tool for data analysis from time stack chemotaxis experiments, based on the National Institute of Health's (NIH) ImageJ image processing system).

ECM analyses by NHS staining

To promote ECM generation, 0.1% gelatin pre-coated coverslips were treated with 1% glutaraldehyde in PBS for 30 min and washed before being treated with 1 M ethanolamine (30 min, RT). Fibroblasts were then plated (DMEM/F12 0.5% FBS) and activated in presence of 8 ng/ml TGF- β . Confluent monolayer was scratched using sterile 200 μl pipette tip, and cells were washed (PBS) and new medium added (DMEM/F12 0.5% FBS + TGF- β). The medium was changed every 2 days (with fresh TGF- β) until scratch closing (8 days). At day 8, samples were decellularized using alkaline detergent extraction buffer (0.5% Triton X-100, 20 mM NH_4OH in PBS). After 2 min, coverslips were washed with PBS, and DNase treated (10 $\mu\text{g/ml}$) for 30 min at 37°C. To visualize the ECM, the coverslips were labelled with 2 $\mu\text{g/ml}$ NHS-ester Alexa Fluor 488 dye (A20000; Thermo Fisher Scientific) diluted in 50 mM sodium bicarbonate buffer pH 9 for 15 min in the dark. Coverslips were washed, treated with 200 mM Tris buffer pH 7.5 for 10 min to deactivate the NHS esters and blocked in 1% BSA before being mounted in Fluorescent Mounting Medium. Images were acquired using Cell Observer videomicroscope (Zeiss), Zen 2012 blue edition. Files were cropped and contrast adjusted using Photoshop (Adobe).

3D invasion assay

3D spheroids of FAK-WT or FAK-KD fibroblasts plus pancreatic tumour cells were generated using the hanging drop technique. A 20 μl drop containing 5,000 FAK-WT or FAK-KD green-labelled fibroblasts (GFP-transfected cells) plus 5,000 red-labelled pancreatic tumour cells (mCherry-transfected cells) was hanged for 4 days at 37°C on a 24-well plate lid. New formed spheroids were transferred into well (eight-well bottomless $\mu\text{-Slide}$ Ibidi, #80828) pre-coated with 50 mg/ml collagen I matrix (type I collagen, Corning, #354249)

and embedded into 2 mg/ml collagen I matrix for 72 h. Z-stack of embedded spheroids was made using Zeiss LSM 780 confocal microscope every 24 h at 10 \times magnification (every 3 μm). Analyses and 3D reconstitution were made with Zen 2012 Blue edition. Quantification was performed using ImageJ. Distance of cell invasion represents the distance between the spheroid edge and the cell.

Collagen matrix contraction

Collagen lattices were prepared using type I collagen (Corning, #354249) according to the manufacturer's instructions. FAK-WT or FAK-KD fibroblasts and hCAFs were trypsinized, counted, pre-treated or not with FAK inhibitor (1 μM) for 1 h (treated with TGF- β at 2 ng/ml, if needed) before cell-matrix-embedment. Cell-collagen-embedment: fibroblasts alone (hCAFs or FAK-WT or -KD fibroblasts, 2×10^5 cell/ml) or fibroblasts plus tumour cells (10^5 cell/ml of fibroblasts plus 10^5 cell/ml of tumour cells) were suspended in collagen (1 mg/ml of collagen final concentration) and aliquoted into 24-well plates (500 μl /well). Collagen lattices were polymerized for 1 h at RT. To initiate collagen gel contraction, polymerized gels were gently released from the underlying culture dish and DMEM/F12 0.5% FBS medium was immediately added in presence or not of FAK inhibitor (PF-562271 at 1 μM) and/or TGF- β (2 ng/ml). Medium was changed every 2 days. The degree of collagen gel contraction was analysed during 7 days. Gel diameter was measured in mm and recorded as the average values of the major and minor axes. Gel contraction = $100 \times (\text{well diameter} - \text{gel diameter}) / \text{well diameter}$.

Flow cytometry (see Table EV2 for antibody and reagent references)

CAF marker analyses

Thirty-eight days after grafting, c57bl/6j mice were euthanized and primary pancreatic tumour resected. Tumours were dissociated using Tumor Dissociation Kit (130-096-730, MACS, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Cells were then fixed and permeabilized (Fix/Perm solution) for 30 min at RT. Cells were washed before being incubated with pY397 FAK, or FAP α antibodies (30 min, RT) diluted into permeabilization buffer (PB). After PB washes, cells were incubated with secondary antibodies: anti-rabbit Alexa Fluor-647, anti-rabbit Alexa Fluor-546 or anti-mouse Alexa Fluor-647 for 15 min at RT. After PB washes, cells were incubated with PDGFR- α -PE or α -SMA-Alexa Fluor 647 antibodies for 30 min at RT, washed and staining analysed using Fortessa X20 flow cytometer (BD Biosciences) and DIVA version 6.1.2 software (BD Biosciences).

Immune cell marker analyses

Thirty-eight days after grafting, mice were euthanized and single-cell suspensions were prepared as for "CAF marker analyses". Digestion mixtures were filtered through 40- μm nylon strainers (Fisher Scientific). Cells were washed twice in FACS buffer (PBS, BSA 1%, FBS 10%), counted and incubated with FcReceptor-blocking for 30 min at RT. For extracellular staining, cells were then incubated for 30 min at RT with indicated antibodies (see Table EV3). Cells were washed and staining analysed. For intracellular staining, cells were fixed, permeabilized (Fix/Perm solution) for 30 min at RT, washed with PB, and incubated with FOXP3-PE and Nos2-PECy5 for 30 min at RT, washed and staining analysed.

All stained cells were analysed using Fortessa X20 flow cytometer (BD Biosciences) and FlowJo V10 software (BD Biosciences).

Ex vivo macrophage polarization analyses

Bone marrow-derived monocytes were collected from mice bones (tibia). After recovering the marrow by injecting DMEM/F12 10% FBS + P/S + glu in bone holes with a 5 ml syringe and a 12 mm needle, cells were dissociated with a 1,000 µl pipette and filtered using a 40-µm cell strainer. 4.10^6 cells were plated in petri dish in DMEM/F12 + P/S + glu with 20 ng/ml M-CSF to differentiate monocytes into macrophages for 10 days. After 3 days, the supernatant (containing dead and unadhered cells) was centrifuged at 800 rpm 10 min to remove dead cells and the monocytes were replated in fresh medium with M-CSF. At day 10, M0 macrophages were treated for 24 h either with 20 ng/ml M-CSF for M0 macrophages as control, or 10 ng/ml IL-4 + 20 ng/ml IL-13 for M1 macrophages as control, or 20 ng/ml IFN γ + 10 ng/ml LPS for M2 macrophages as control, or CM from FAK-WT or FAK-KD activated fibroblasts. Macrophages were washed and detached using a Versene solution (#15040066, Thermo Fisher Scientific) and CD163, CD206, F4/80, CD11b, CD80, CD86, dectin, CHMII cell markers analysed as previously described.

CAF conditioned medium stimulation

Human primary pancreatic CAFs were cultured in DMEM/F12 0.5% FBS overnight before being treated with new DMEM/F12 0.5% FBS \pm FAK inhibitor (PF-562271, Selleckchem, #S2890) at 1 µM for 48 or 72 h. Mouse tumour cells were cultivated a week with 45% DMEM/F12, 45% DMEM and 10% FBS, then a week with DMEM/F12 10% FBS, and finally, cultured in serum-free DMEM/F12 for 48 h. CM from either CAFs or tumour cells were then harvested and filtered through 0.22-µm filter (Millipore; SLGS033SS).

Transwell migration assay

Transwell chambers (Corning, NY, #3421) containing 6.5 mm Transwell® with 5.0 µm Pore Polyester Membrane Insert were used for cell migration assay. A total of 1×10^5 macrophages were seeded on the upper compartment, and CM from CAFs pre-treated or not with FAK inhibitor on the lower compartment of the transwell chamber. Macrophages were allowed to migrate through the filter for 24 and 48 h. Cells from the lower compartment were then stained with crystal violet and quantification performed using ImageJ based on images acquired using Cell Observer videomicroscope (Zeiss), Zen 2012 blue edition.

RT-qPCR

RT-qPCR was performed on hCAF mRNAs isolated using TRIzol-LS (Thermo Fisher Scientific), and concentration measured using a NanoDrop (ND-1000 from Thermo Fisher Scientific). RNAs were first reverse-transcribed with RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Invitrogen) using random hexamer primers (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction, qPCR was carried out on a StepOne Plus (Applied Biosystems, Life Technologies) using SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) and primer concentration at 0.5 µM. Primers specific to human mRNAs were purchased from

Integrated DNA Technologies (IDT) and are listed on the following table:

	Primer forward	Primer reverse
hCCL2-1	5'-CAGCCAGATGCAATCAATGCC-3'	5'-TGGATCCTGAACCCAC TTCT-3'
hCCL2-2	5'-CCCAAAGAAGCTGTGATCTTCA-3'	5'-TCTGGGGAAAGCTAGG GGAA-3'
hCCL3	5'-CTCTGCAACCAGTCTCTGC-3'	5'-TCGCTTGGTTAGGAAGA TGACA-3'
hCCL4	5'-CTCCCAGCCAGCTGTGGTATTC-3'	5'-CCAGGATTCACTGGGAT CAGCA-3'
hCCL5	5'-CGTGCCACATCAAGGAGTA-3'	5'-TCGGGTGACAAAGACG ACTG-3'
hM-CSF	5'-CGGGACCCAGCTGCC-3'	5'-TGACTGTCAATCAGC CGC-3'

ELISA

Levels of MCP-1 were quantified by using the Human MCP-1 (CCL2) Pre-Coated ELISA Kit (BGK13500) according to the manufacturer's instructions (Biogems, PeproTech Brand). O.D. absorbance was measured at 450 nm using Mithras LB940 (Berthold Technologies).

Matrisome

Matrix production and extraction

Matrix production and extraction was performed as in (Kaukonen et al, 2017). Briefly, CAFs were seeded in a 12-well plate, and once confluent, medium was replaced by fibroblast growth medium supplemented with ascorbic acid (50 µg/ml) and treated or not with FAK inhibitor (1 µM) every other day for 7 days. Cells were then washed with PBS before being treated with pre-warmed sterile-extraction solution (20 mM NH₄OH, 0.5% Triton X-100 in PBS) for 1 min. Extraction buffer was removed immediately by gently pipetting (avoiding to disrupt the matrix). Cell-derived matrices were washed twice with PBS before being treated with DNase I (10 µg/ml) for 30 min at 37°C and then washed again twice with PBS.

Peptide preparation

Peptide preparation was performed as in (Pearce et al, 2018). ECM was then scrapped into Urea Buffer (250 µl of an 8 M Urea in 20 mM HEPES [pH8]) solution containing Na₃VO₄ (100 mM), NaF (0.5 M), β -Glycerol Phosphate (1 M), Na₂H₂P₂O₇ (0.25 M) and transferred into Eppendorf. Samples were vortexed for 30 s and left on ice prior to sonication at 50% intensity, three times for 15 s on ice. Centrifuge tissue lysate suspension at 20,000 g for 10 min at 5°C, and recover supernatant to a protein LoBind tube. BCA assay for total protein was then performed and 80 µg of protein continued to the next step. Volume of supernatant was adjusted to 200 µl. Prior to trypsin digestion, disulphide bridges were reduced by adding 500 mM dithiothreitol (DTT, in 10 µl) to sample(s), vortexed and then incubated at RT for 1 h with agitation in the dark. Free cysteines were then alkylated by adding 20 µl of a 415 mM iodoacetamide solution to sample and then vortexed and incubated at RT for 1 h with agitation in the dark. The sample was then diluted one

in four with 20 mM HEPES. Removal of *N*-glycosylation was then achieved by addition of 1,500 U PNGaseF, vortexed and incubated at 37°C for 2 h. Two microliter of a 0.8 µg/µl LysC sample was then added, gently mixed and then incubated at 37°C for 2 h. Protein digestion was then achieved with the use of immobilized Trypsin beads (40 µl of beads per 250 µg of protein) and incubation at 37°C for 16 h with shaking performed. Peptides were then de-salted using Glygentop tips C-18. Briefly, samples were acidified with trifluoroacetic acid (1% v/v). Samples were then centrifuged at 2,000 g, 5 min at 5°C and transfer supernatant to a 1.5 ml Eppendorf. Glygentop tip was washed with 200 µl of 100% ACN (LC-MS grade), centrifugation (1,500 g for 3 min) performed, flow-through discarded and washed with 99% H₂O (+1% ACN, 0.1% TFA) twice. Protein digest sample were loaded, centrifuged and flow-through discarded. Cartridge was washed with 200 µl of 99% H₂O (+1% ACN, 0.1% TFA). Centrifugation and flow-through discarded were performed. The tip was transferred into a new LoBind Eppendorf and 100 µl of 70/30 ACN/H₂O +0.1% FA added. Centrifugation was performed and flow-through kept. Samples were dried and stored at -20°C. Re-constitute samples in re-con buffer prior to MS analysis. Mass spectrometry analysis and bioinformatics: Dried samples were dissolved in 0.1% TFA (0.5 µg/µl) and analysed by nanoflow ultimate 3000 RSL nano instrument that was coupled on-line to a Q Exactive plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Peptides were separated using analytical column (EASY-Spray; Cat. #ES803) and using solvent A (0.1% FA in LC-MS grade water) and solvent B (0.1% FA in LC-MS grade ACN) as mobile phases. The UPLC settings consisted of a sample loading flow rate of 12 µl/min for 3 min followed by a gradient elution with starting with 3% of solvent B and ramping up to 28% over 120 min followed by a 7 min wash at 80% B and a 10 min equilibration step at 3% B. The flow rate for the sample run was 250 nl/min with an operating back pressure of about 550 bar. Full scan survey spectra (*m/z* 375–1,500) were acquired with a resolution a 70,000 FWHM resolution. A data-dependent analysis (DDA) was employed in which the 15 most abundant multiply charged ions present in the survey spectrum were automatically mass-selected for HCD (higher energy collisional dissociation) and MS/MS scanning (200–2,000 *m/z*) with a resolution of 17,500 FWHM. A 30 s dynamic exclusion was enabled with the exclusion list restricted to mass window of 10 ppm. Overall duty cycle generated chromatographic peaks of approximately 30 s at the base, which allowed the construction of extracted ion chromatograms (XICs) with at least 10 data points.

Data processing protocol

MASCOT search was used to generate a list of proteins. Peptide identification was by searchers against the Swiss-Prot database restricted to human entries using the Mascot search engine (v 2.6.0, Matrix Science, London, UK). The parameters included trypsin as digestion enzyme with up to two missed cleavages permitted, carbamidomethyl (C) as a fixed modification and Pyro-glu (N-term), Oxidation (M) and Phospho (STY) as variable modifications. Datasets were searched with a mass tolerance of ± 5 ppm and a fragment mass tolerance of ± 0.8 Da. A MASCOT score cut-off of 50 was used to filter false-positive detection to a false discovery rate below 1%. PESCAL was used to obtain peak areas in extracted ion chromatograms of each identified peptide (Cutillas & Vanhaesebroeck, 2007) and protein abundance determined by the ratio of the

sum of peptides areas of a given protein to the sum of all peptide areas. This approach for global protein quantification absolute quantification, described in (Cutillas & Vanhaesebroeck, 2007), is similar to intensity-based protein quantification (iBAQ) (Schwanhauser *et al*, 2011) and total protein abundance (TPA) (Wisniewski *et al*, 2012). The mass spectrometry proteomic data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD018899.

β1-integrin activation (see Table EV3 for antibody and reagent references)

Human primary CAFs were plated in coverslips coated with 0.1% gelatin and treated with glutaraldehyde/ethanolamine to favor matrix generation as for NHS staining (see above). After adhesion, cells were starved with DMEM/F12 0.5% FBS overnight before being treated with FAK inhibitor (PF-562271, Selleckchem, #S2890) at 1 µM during 7 days (medium was changed every 2 days with fresh inhibitor). Coverslips were decellularized with an extraction buffer as for NHS staining and tumour cells were plated on the matrices at 20% confluence for 16 h. The negative and positive controls were done by adding 5 mM EDTA and 1 mM MnCl₂, respectively, for 20 min at 37°C before being processed for imaging. Cells were fixed (15 min, 3.7% paraformaldehyde), permeabilized (10 min, 0.1% Triton X-100) and incubated with 2% BSA for 1 h. Antibodies against β1-integrin (#102207, BioLegend) or activated β1-integrin (CD29 9EG, 553715, BD Biosciences) were added in 2% BSA 2 h at RT. Cells were PBS washed and incubated with DAPI (1/1,000) plus secondary antibodies Goat anti-Rat Alexa Fluor-555 and Phalloidin-Alexa Fluor 488 for 45 min at RT. After PBS washes, slides were mounted in Fluorescent Mounting Medium and images acquired using Confocal microscope (Zeiss), Zen 2012 blue edition. Quantification was performed using ImageJ. Files were cropped and contrast adjusted using Photoshop (Adobe). Quantification was performed using ImageJ.

Statistical analyses

Classical statistical analysis was run using the GraphPad Prism software (GraphPad). Data were tested to confirm the Gaussian distribution (Shapiro–Wilk test) and the similarities of variances (*F*-test or chi-square test). Depending on experiments, two-group data were analysed using unpaired or paired, one or two-tailed Student *t*-test (Gaussian distribution and equal variances) or Mann–Whitney test (non-Gaussian distribution). Multi-group data were analysed using one-way ANOVA followed with the Tukey's multiple comparison post-test (Gaussian distribution). All values are mean ± SEM. Differences were considered statistically significant when *P* < 0.05 (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001). Exact *P*-values are indicated for main and EV figures in the Appendix Table S1.

Survival curve statistical analyses were estimated with the Kaplan–Meier method and compared using log-rank test. We used non-parametric tests (chi-square test) to compare independent groups for categorical data. Multivariate analyses, with backward variable selection, were conducted with the Cox proportional-hazards regression model. Variables up to the 0.05 level in univariate analyses were included in the multivariate model. The level of significance for all tests was defined as *P* < 0.05. Statistical analyses were carried out with PRISM 5 and XLSTAT 2017.

The paper explained

Problem

Understanding how cancer-associated fibroblasts (CAFs), the most abundant pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) stromal cells, promote tumour growth, disease progression and resistance to therapies is of major interest, given the poor prognosis and survival of pancreatic cancer patients. This study identifies a druggable key regulator of CAF-induced tumour progression and a prognostic factor for the disease: the protein tyrosine kinase focal adhesion kinase (FAK).

Results

Using two independent cohorts including over 160 PDAC samples, we identify FAK activity (pY397 FAK score) to be significantly increased in CAFs from PDAC compared to fibroblasts from healthy pancreas, and we report that high fibroblastic FAK activity in PDAC tumours is an independent prognostic factor for disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in multivariate analysis. We demonstrate that fibroblastic FAK activity is a potent driver of tumour cell invasion, being involved in CAF-dependent pancreatic tumour migration and invasion, in ECM remodelling and in immunosuppression. Genetic FAK inactivation within CAFs modifies primary tumour stroma (ECM and immune cell population) and drastically reduces spontaneous metastasis in an orthotopic and syngeneic mouse model.

Impact

Our study identifies FAK activity within fibroblasts as a key regulator of PDAC progression and as an independent prognostic marker for patients. It highlights the potential benefit of evaluating FAK activity within CAFs to identify patients with high risk of early relapse and patients that may benefit from a personalized protocol using FAK inhibitor treatment, currently used in clinical trials.

Data availability section

The datasets and computer code produced in this study are available in the following database: Matrisome data: PRIDE PXD018899 (<http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD018899>)

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

We thank Dr Frédéric Lagarrigue (IPBS, Toulouse) for his help with beta-1 integrin assay, and Marcin Domagala and Sophie Gazzola (CRCT, Toulouse) for their advice on macrophage experiments. We thank Laetitia Ligat (CRCT), Sophie Allart (CPTP) and Astrid Canivet-Laffitte (CPTP) for their help and expertise in microscopy; Manon Farce (CRCT) for her help and flow cytometry expertise; and Loïc Van Den Berghe and Christelle Segura for their help in lentivirus production and expertise in vectorology. The authors also acknowledge Dr Francois-Xavier Frenois from the Imag'IN platform (IUC, Toulouse, France) for his help and expertise on Definiens Tissue Studio® and Dr Pedro Cutillas from the Centre for Haemato-Oncology (Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London, UK). We would like to thank Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>) for graphics used in the figures. This work was supported by LNCC (Ligue Nationale Contre le Cancer RAB20007BBA, RAB20008BBA and RAB17029BBA), the Canceropole Grand Sud-Ouest (RMA04002BPA), the Labex TOUCAN, the Toulouse University IDEX (G16001BB), the PHUC CAPTOR, la Fondation Bristol-Myers Squibb and the French National Institute of Cancer (INCa, PLBIO2015-115, PAIR 2018-080). I.B. is a recipient of LNCC fellowship (IP/SC16060). E.D. and J.R. salaries are funded, respectively, by Fondation pour la

Recherche Médicale (FRM ING20150532688) and the French National Institute of Cancer (PLBIO2015-115); R.S. was a recipient of a fellowship from FRM (#40493). C.J. was recipient of a fellowship from the LNCC. O.M.T.P. is a recipient of a Cancer Research UK and Credit Suisse fellowship (A27947).

Author contributions

SZ, ED, IB, RS, SCS, JR, AB, MS, AA, AP, MM and CJ performed the experiments. SZ, ED, IB and CJ analysed and interpreted the data. JC and CN provided data collection. RT, AP and MM were involved in fresh sample collection and CAF isolation. VR and OMTP were involved in matrisome experiment. SZ, CB and CJ designed the study and wrote the manuscript. DS, YM and SP contributed to the result interpretation. All authors critically reviewed and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Albregues J, Bourget I, Pons C, Butet V, Hofman P, Tartare-Deckert S, Feral CC, Meneguzzi G, Gaggioli C (2014) LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep* 7: 1664–1678
- Apte MV, Wilson JS (2012) Dangerous liaisons: pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol* 27(Suppl 2): 69–74
- Arao S, Masumoto A, Otsuki M (2000) Beta1 integrins play an essential role in adhesion and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Pancreas* 20: 129–137
- Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grunert A, Adler G (1998) Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 115: 421–432
- Barker HE, Bird D, Lang G, Erler JT (2013) Tumor-secreted LOXL2 activates fibroblasts through FAK signaling. *Mol Cancer Res* 11: 1425–1436
- Beacham DA, Cukierman E (2005) Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol* 15: 329–341
- Bonnetain F, Bonsing B, Conroy T, Dousseau A, Glimelius B, Haustermans K, Lacaine F, Van Laethem JL, Aparicio T, Aust D *et al* (2014) Guidelines for time-to-event end-point definitions in trials for pancreatic cancer. Results of the DATECAN initiative (Definition for the Assessment of Time-to-event End-points in CANcer trials). *Eur J Cancer* 50: 2983–2993
- Conklin MW, Keely PJ (2012) Why the stroma matters in breast cancer: insights into breast cancer patient outcomes through the examination of stromal biomarkers. *Cell Adh Migr* 6: 249–260
- Cukierman E, Pankov R, Yamada KM (2002) Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol* 14: 633–639
- Cutillas PR, Vanhaesebroeck B (2007) Quantitative profile of five murine core proteomes using label-free functional proteomics. *Mol Cell Proteomics* 6: 1560–1573
- Demircioglu F, Wang J, Candido J, Costa ASH, Casado P, de Luxan Delgado B, Reynolds LE, Gomez-Escudero J, Newport E, Rajeev V *et al* (2020) Cancer associated fibroblast FAK regulates malignant cell metabolism. *Nat Commun* 11: 1290
- Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G (1993) Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122: 103–111

- Duluc C, Moatassim-Billah S, Chalabi-Dchar M, Perraud A, Samain R, Breibach F, Gayral M, Cordelier P, Delisle MB, Bousquet-Dubouch MP et al (2015) Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance. *EMBO Mol Med* 7: 735–753
- Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z (2010) Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 18: 884–901
- Erdogan B, Webb DJ (2017) Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochem Soc Trans* 45: 229–236
- Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, Kong B, Esposito I, Friess H, Kleeff J (2012) The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. *Curr Mol Med* 12: 288–303
- Feig C, Gopinathan A, Neeße A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA (2012) The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 18: 4266–4276
- Friedl P, Wolf K (2008) Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Can Res* 68: 7247–7249
- Fukushima N, Kikuchi Y, Nishiyama T, Kudo A, Fukayama M (2008) Periostin deposition in the stroma of invasive and intraductal neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol* 21: 1044–1053
- Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E (2007) Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 9: 1392–1400
- Grinnell F (2003) Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* 13: 264–269
- Hallmann R, Zhang X, Di Russo J, Li L, Song J, Hannocks MJ, Sorokin L (2015) The regulation of immune cell trafficking by the extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 36: 54–61
- Hidalgo M (2012) New insights into pancreatic cancer biology. *Ann Oncol* 23 (Suppl 10): x135–x138
- Hochwald SN, Nyberg C, Zheng M, Zheng D, Wood C, Massoli NA, Magis A, Ostrov D, Cance WG, Golubovskaya VM (2009) A novel small molecule inhibitor of FAK decreases growth of human pancreatic cancer. *Cell Cycle* 8: 2435–2443
- Hong SY, Jeon YM, Lee HJ, Kim JG, Baek JA, Lee JC (2010) Activation of RhoA and FAK induces ERK-mediated osteopontin expression in mechanical force-subjected periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 335: 263–272
- Horowitz JC, Rogers DS, Sharma V, Vittal R, White ES, Cui Z, Thannickal VJ (2007) Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor-beta1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts. *Cell Signal* 19: 761–771
- Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD (2008) Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Can Res* 68: 918–926
- Ilic D, Kovacic B, Johkura K, Schlaepfer DD, Tomasevic N, Han Q, Kim JB, Howerton K, Baumbusch C, Ogiwara N et al (2004) FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. *J Cell Sci* 117: 177–187
- Infante JR, Fecher LA, Falchook GS, Nallapareddy S, Gordon MS, Becerra C, DeMarini DJ, Cox DS, Xu Y, Morris SR et al (2012) Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* 13: 773–781
- Jean C, Chen XL, Nam JO, Tancioni I, Uryu S, Lawson C, Ward KK, Walsh CT, Miller NL, Ghasseman M et al (2014) Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *J Cell Biol* 204: 247–263
- Jiang H, Hegde S, Knolhoff BL, Zhu Y, Herndon JM, Meyer MA, Nywening TM, Hawkins WG, Shapiro IM, Weaver DT et al (2016) Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nat Med* 22: 851–860
- Karamitopoulou E, Wartenberg M, Zlobec I, Cibir S, Worni M, Gloor B, Lugli A (2018) Tumour budding in pancreatic cancer revisited: validation of the ITBCC scoring system. *Histopathology* 73: 137–146
- Kaukonen R, Jacquemet G, Hamidi H, Ivaska J (2017) Cell-derived matrices for studying cell proliferation and directional migration in a complex 3D microenvironment. *Nat Protoc* 12: 2376–2390
- Kinoshita K, Aono Y, Azuma M, Kishi J, Takezaki A, Kishi M, Makino H, Okazaki H, Uehara H, Izumi K et al (2013) Antifibrotic effects of focal adhesion kinase inhibitor in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49: 536–543
- Kolb A, Kleeff J, Guweidhi A, Esposito I, Giese NA, Adwan H, Giese T, Buchler MW, Berger MR, Friess H (2005) Osteopontin influences the invasiveness of pancreatic cancer cells and is increased in neoplastic and inflammatory conditions. *Cancer Biol Ther* 4: 740–746
- Kopanska KS, Alcheikh Y, Staneva R, Vignjevic D, Betz T (2016) Tensile forces originating from cancer spheroids facilitate tumor invasion. *PLoS ONE* 11: e0156442
- Lagares D, Busnadiego O, Garcia-Fernandez RA, Kapoor M, Liu S, Carter DE, Abraham D, Shi-Wen X, Carreira P, Fontaine BA et al (2012) Inhibition of focal adhesion kinase prevents experimental lung fibrosis and myofibroblast formation. *Arthritis Rheum* 64: 1653–1664
- Lahmar Q, Keirse J, Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van Ginderachter JA (2016) Tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in the tumor microenvironment. *Biochem Biophys Acta* 1865: 23–34
- Lim ST, Chen XL, Tomar A, Miller NL, Yoo J, Schlaepfer DD (2010) Knock-in mutation reveals an essential role for focal adhesion kinase activity in blood vessel morphogenesis and cell motility-polarity but not cell proliferation. *J Biol Chem* 285: 21526–21536
- Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SG, Hoadley KA, Rashid NU, Williams LA, Eaton SC, Chung AH et al (2015) Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet* 47: 1168–1178
- Naba A, Pearce OMT, Del Rosario A, Ma D, Ding H, Rajeev V, Cutillas PR, Balkwill FR, Hynes RO (2017) Characterization of the extracellular matrix of normal and diseased tissues using proteomics. *J Proteome Res* 16: 3083–3091
- Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Ragulan C, Cros J, Patil Y, Martinet M, Erkan M, Kleeff J, Wilson J, Apte M et al (2019) Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol* 248: 51–65
- Nielsen MFB, Mortensen MB, Detlefsen S (2018) Typing of pancreatic cancer-associated fibroblasts identifies different subpopulations. *World J Gastroenterol* 24: 4663–4678
- Norton J, Foster D, Chinta M, Titan A, Longaker M (2020) Pancreatic cancer associated fibroblasts (CAF): under-explored target for pancreatic cancer treatment. *Cancers* 12: 1347
- Ohlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvise M, Corbo V, Oni TE, Hearn SA, Lee EJ et al (2017) Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med* 214: 579–596
- Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D et al (2009) Inhibition of

- Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324: 1457–1461
- Ostman A (2012) The tumor microenvironment controls drug sensitivity. *Nat Med* 18: 1332–1334
- Pearce OMT, Delaine-Smith RM, Maniati E, Nichols S, Wang J, Bohm S, Rajeev V, Ullah D, Chakravarty P, Jones RR et al (2018) Deconstruction of a metastatic tumor microenvironment reveals a common matrix response in human cancers. *Cancer Discov* 8: 304–319
- Phan SH (2008) Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 5: 334–337
- Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* 15: 1243–1253
- Pietras K, Ostman A (2010) Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 316: 1324–1331
- Provenzano PP, Eliceiri KW, Campbell JM, Inman DR, White JG, Keely PJ (2006) Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med* 4: 38
- Puleo F, Nicolle R, Blum Y, Cros J, Marisa L, Demetter P, Quertinmont E, Svrcek M, Elarouci N, Iovanna J et al (2018) Stratification of pancreatic ductal adenocarcinomas based on tumor and microenvironment features. *Gastroenterology* 155: 1999–2013.e1993
- Ruytinx P, Proost P, Van Damme J, Struyf S (2018) Chemokine-induced macrophage polarization in inflammatory conditions. *Front Immunol* 9: 1930
- Schlaepfer DD, Mitra SK (2004) Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev* 14: 92–101
- Schor SL, Ellis IR, Jones SJ, Baillie R, Seneviratne K, Clausen J, Motegi K, Vojtesek B, Kankova K, Furrie E et al (2003) Migration-stimulating factor: a genetically truncated onco-fetal fibronectin isoform expressed by carcinoma and tumor-associated stromal cells. *Can Res* 63: 8827–8836
- Schwanhauser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473: 337–342
- Serrels A, Lund T, Serrels B, Byron A, McPherson RC, von Kriegsheim A, Gomez-Cuadrado L, Canel M, Muir M, Ring JE et al (2015) Nuclear FAK controls chemokine transcription, Tregs, and evasion of anti-tumor immunity. *Cell* 163: 160–173
- Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD (2000) FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2: 249–256
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2017) Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67: 7–30
- Stokes JB, Adair SJ, Slack-Davis JK, Walters DM, Tilghman RW, Hershey ED, Lowrey B, Thomas KS, Bouton AH, Hwang RF et al (2011) Inhibition of focal adhesion kinase by PF-562,271 inhibits the growth and metastasis of pancreatic cancer concomitant with altering the tumor microenvironment. *Mol Cancer Ther* 10: 2135–2145
- Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD (2014) FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* 14: 598–610
- Sun Q, Zhang B, Hu Q, Qin Y, Xu W, Liu W, Yu X, Xu J (2018a) The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer. *Theranostics* 8: 5072–5087
- Sun Q, Zhou C, Ma R, Guo Q, Huang H, Hao J, Liu H, Shi R, Liu B (2018b) Prognostic value of increased integrin-beta 1 expression in solid cancers: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 11: 1787–1799
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR (2002) Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 8: 2912–2923
- Whittle MC, Hingorani SR (2019) Fibroblasts in pancreatic ductal adenocarcinoma: biological mechanisms and therapeutic targets. *Gastroenterology* 156: 2085–2096
- Wisniewski JR, Ostasiewicz P, Dus K, Zielinska DF, Gnadt F, Mann M (2012) Extensive quantitative remodeling of the proteome between normal colon tissue and adenocarcinoma. *Mol Syst Biol* 8: 611
- Wolf K, Wu YL, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, Stack MS, Friedl P (2007) Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 9: 893–904



License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table of Content Appendix

Appendix Figure S1: pY397 FAK antibody (clone 31H5L17) validation.

Appendix Figure S2: Tumour cells and stroma identification using Definiens® software.

Appendix Figure S3: Representative flow cytometry plots of gating strategy.

Appendix Table S1: Exact p-values

Legend Appendix Figures and Table

Appendix Figure S1: pY397 FAK antibody (clone 31H5L17) validation.

(A) Representative images of phosphorylated FAK on tyrosine (Y) 397 (pY397 FAK) antibody immunohistochemistry staining in serial sections of human adjacent pancreas (Ct1) and human PDAC tissues. Left: classical immunohistochemistry, Middle: pY397 FAK antibody was pre-incubated for 12h with specific phosphopeptide before used on slides. The total staining disappearance validates the antibody. Right: samples were treated with lambda-phosphatase before been exposed to pY397 FAK antibody.

(B) Left: Western blot performed on 50 µg of proteins from fibroblast (FAK wild type MEFs) lysates, pre-treated or not with lambda-phosphatase or Na₃VO₄ phosphatase inhibitor using pY397 FAK antibody. Right: pY397 FAK antibody was pre-incubated for 12h with specific phosphopeptide before been used. (C) Western blot performed on 20 µg of proteins from FAK wild-type (WT) or FAK knock-out (KO: MEFs were isolated from murine homozygous *Fak* floxed embryos and treated with an adenovirus expressing the cre-recombinase (adeno-cre) (Lim et al, 2010)) lysates using pY397 FAK antibody. The disappearance of the 125 kDa band validates the antibody specificity. The presence of non-specific bands do not bother western blot analysis as they are around 50-60 kDa

Appendix Figure S2: Tumour cells and stroma identification using Definiens® software.

(A) Representative immunohistochemistry of pan-CK (pan-cytokeratin), pan-CK plus α-SMA, pY397 FAK and FAP-α in serial sections of 2 different PDAC tissues. For each patient, left: IHC staining; right: Definiens® ROI detection of tumour cells (dark blue), stroma (orange) and other (light blue/grey). Scale bar, 100 µm.

(B) Quantification of definiens-identified areas based on pan-CK (pan-cytokeratin), pan-CK plus α-SMA, pY397 FAK and FAP-α staining showing that independently on marker used, Definiens software is able to properly discriminate CAFs (α-SMA and/or FAP-α positive cells) from other cells (including isolated tumour cells, positive for pan-cytokeratin) based on cell morphology.

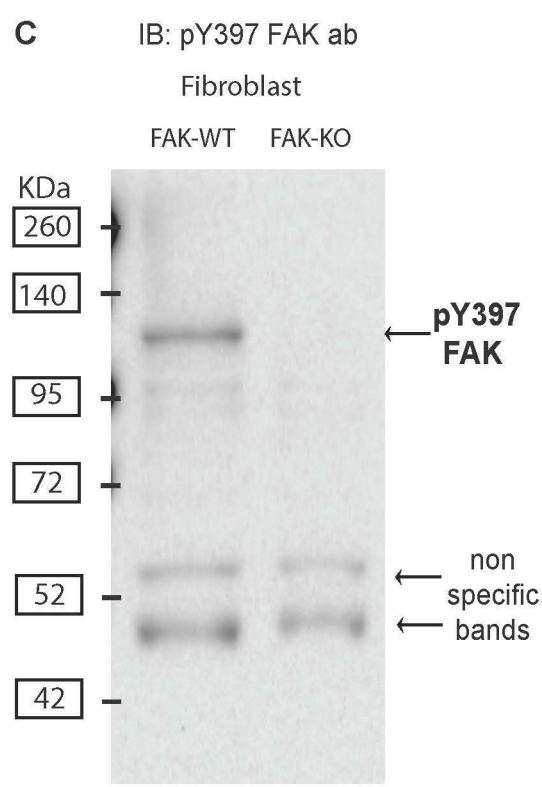
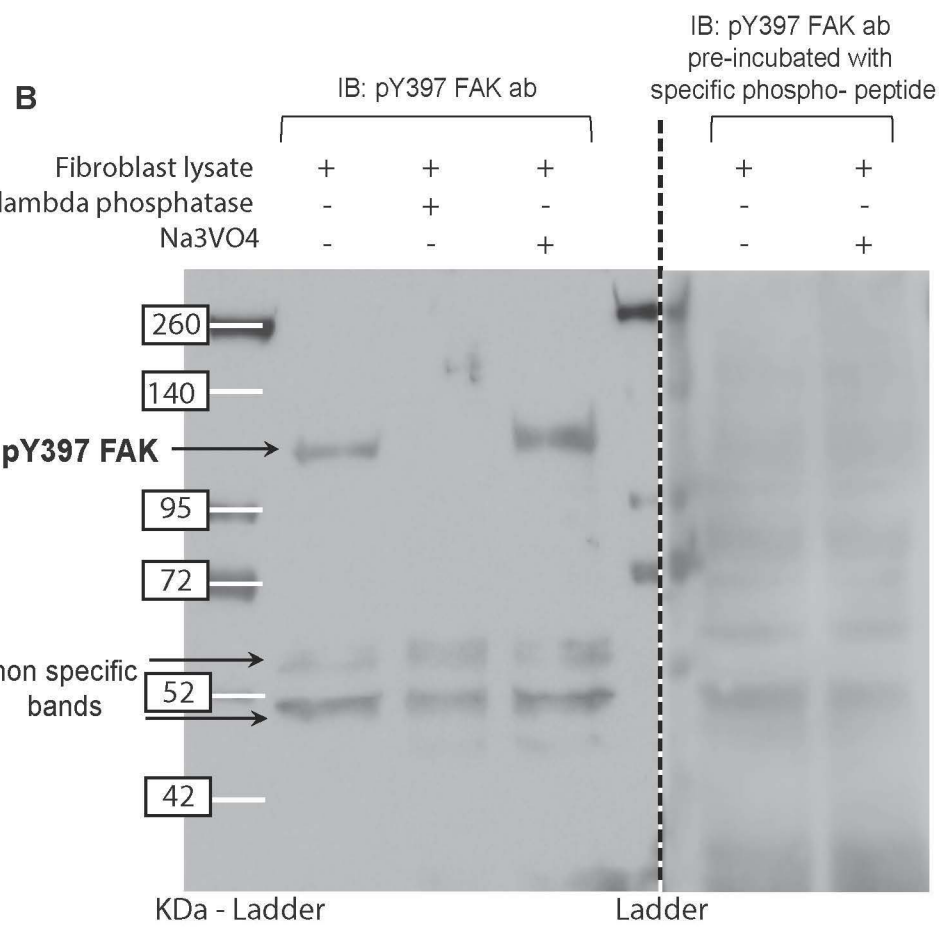
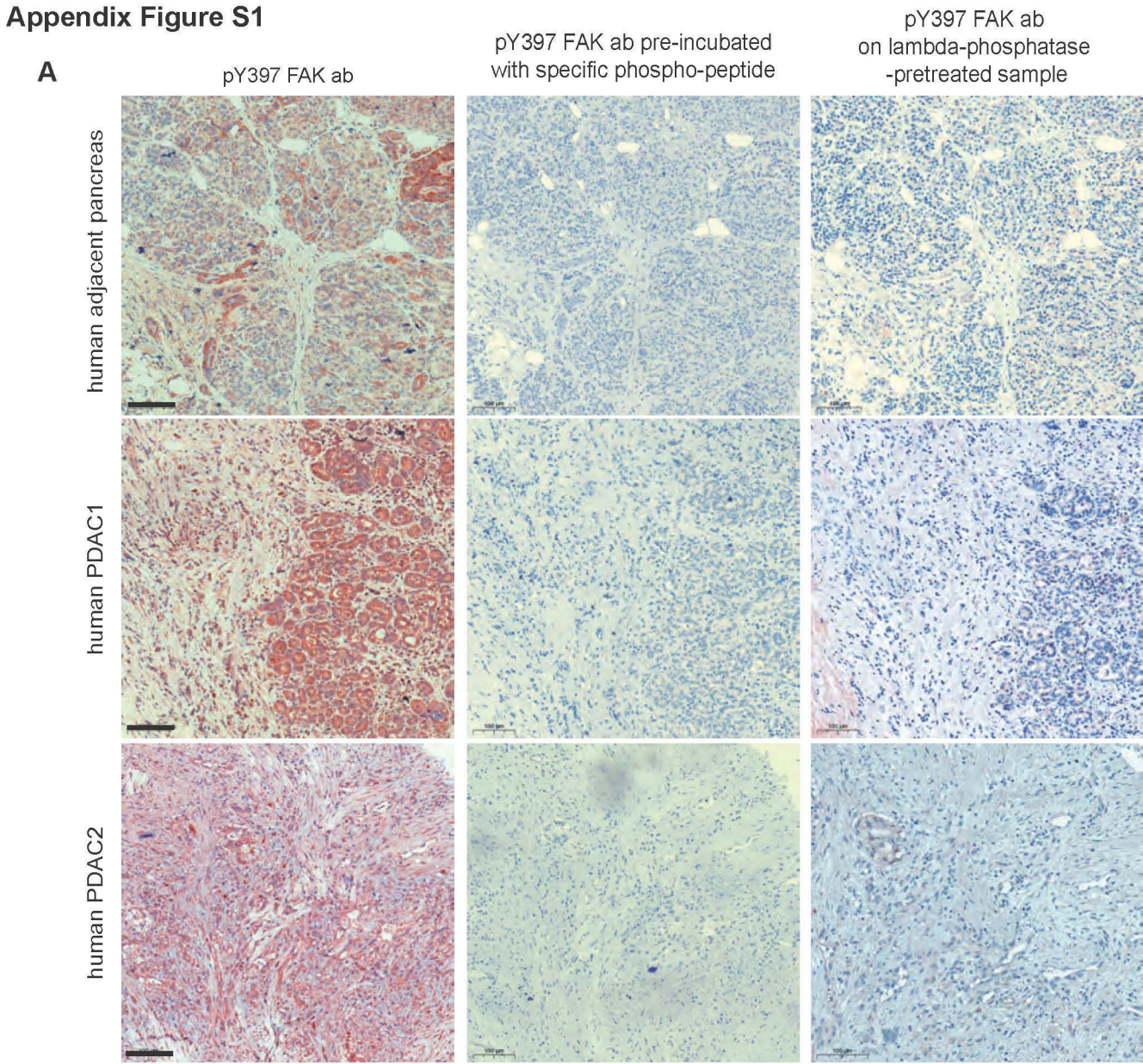
Appendix Figure S3: Representative flow cytometry plots of gating strategy.

(A-B) Representative flow cytometry plots of gating strategy for myeloid (A) and lymphoid cell (B) identification on mouse primary tumours. CD45: Total immune cells ; CD3 +: T lymphocyte CD3 cells;

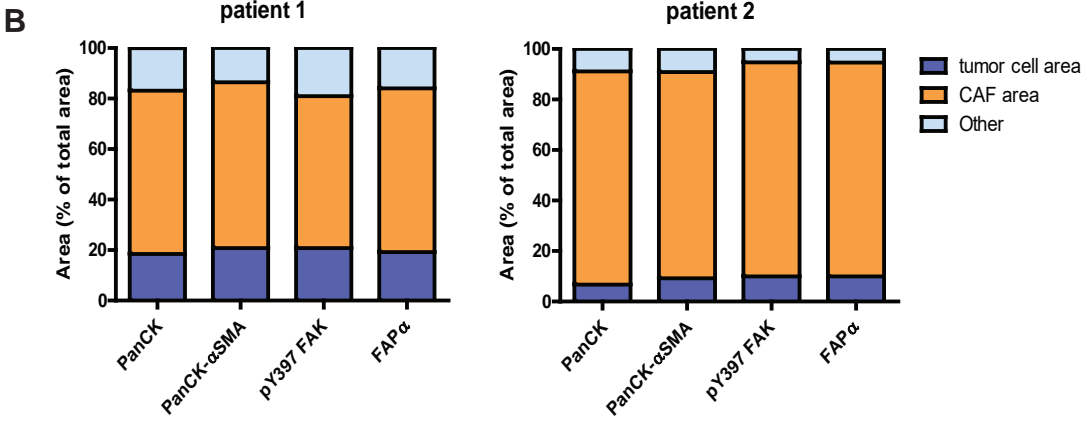
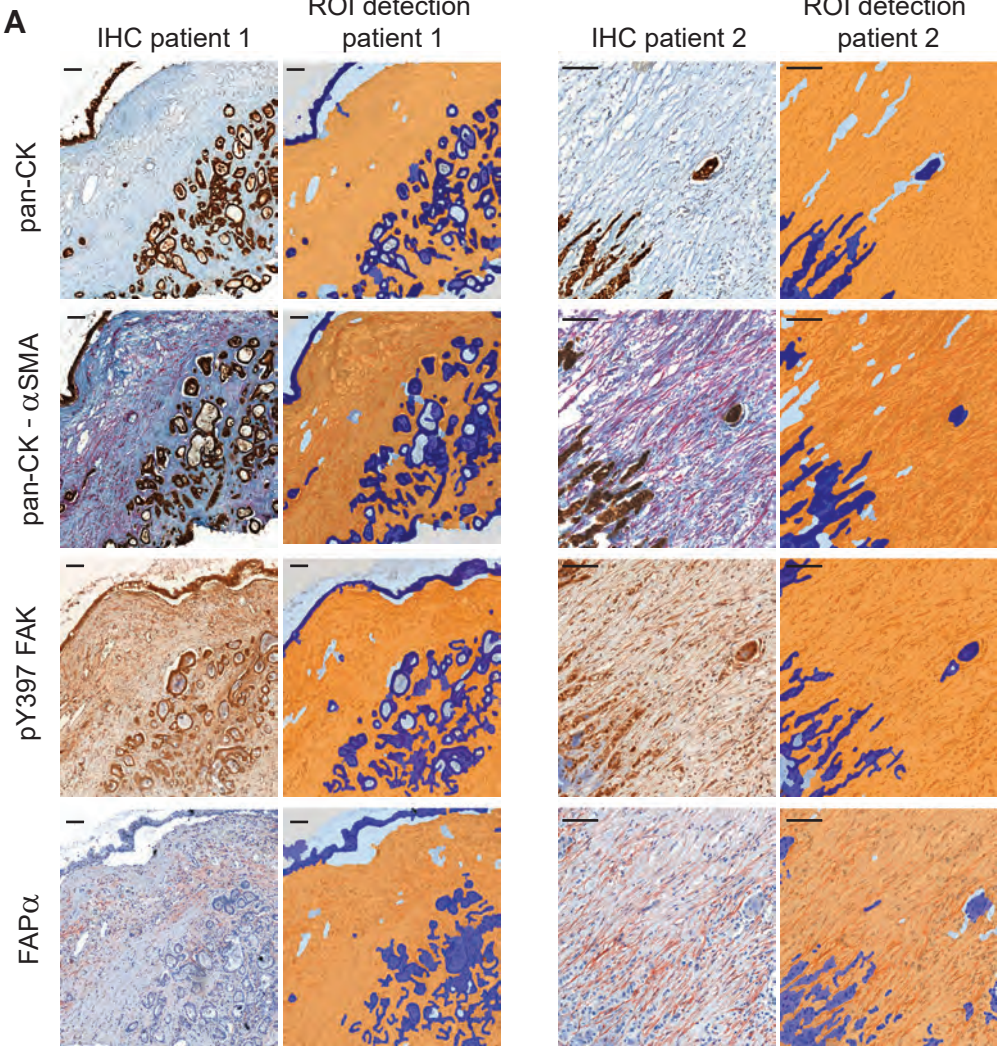
CD4 +: T lymphocyte CD4 cells; CD8 +: Cytotoxic T lymphocyte CD8 cells; FOXP3 +: Forkhead box P3 T regulator lymphocytes, Tregs cell marker ; CD19: B lymphocytes ; NK1.1: Naturals Killers and Natural killers T (NK1.1+/CD3+) ; F480 +: Total macrophages ; F480 + / Nos2 +: Nitric oxide synthase, macrophage M1 marker ; F480+ / CD206 +: Macrophages M2 marker. Data processed using FlowJo software (Beckman Dickinson).

Appendix Table S1: Exact p-values

Appendix Figure S1

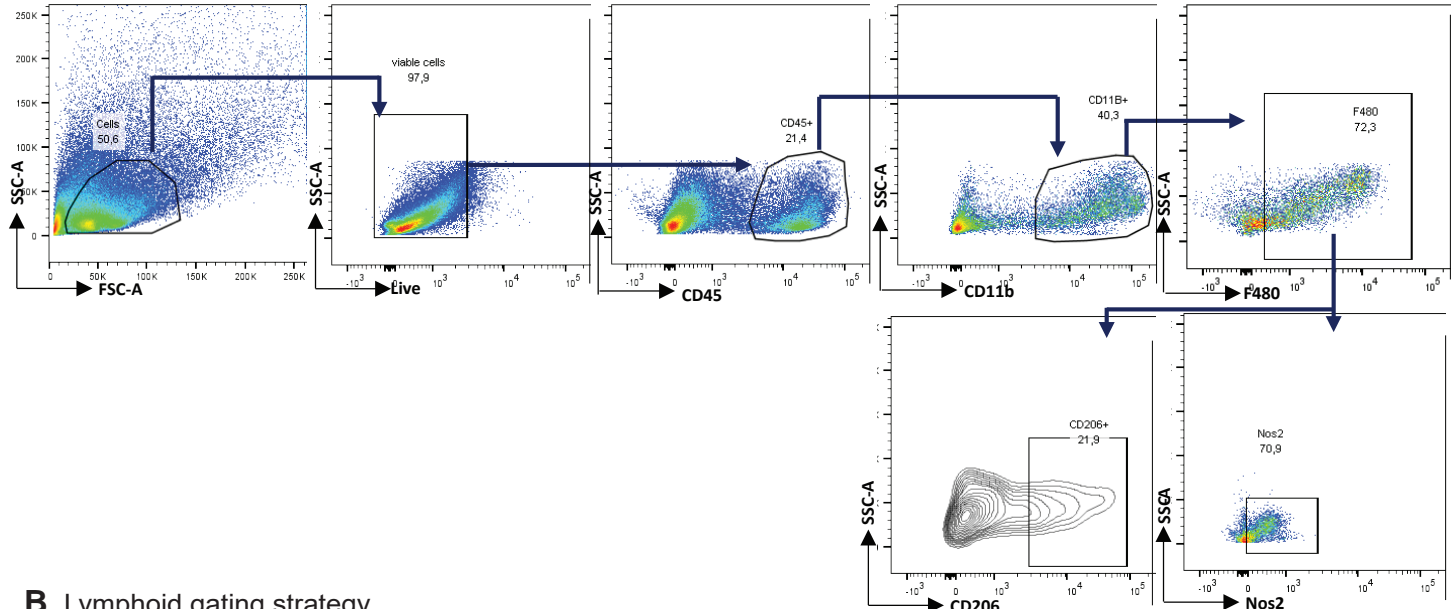


Appendix Figure S2

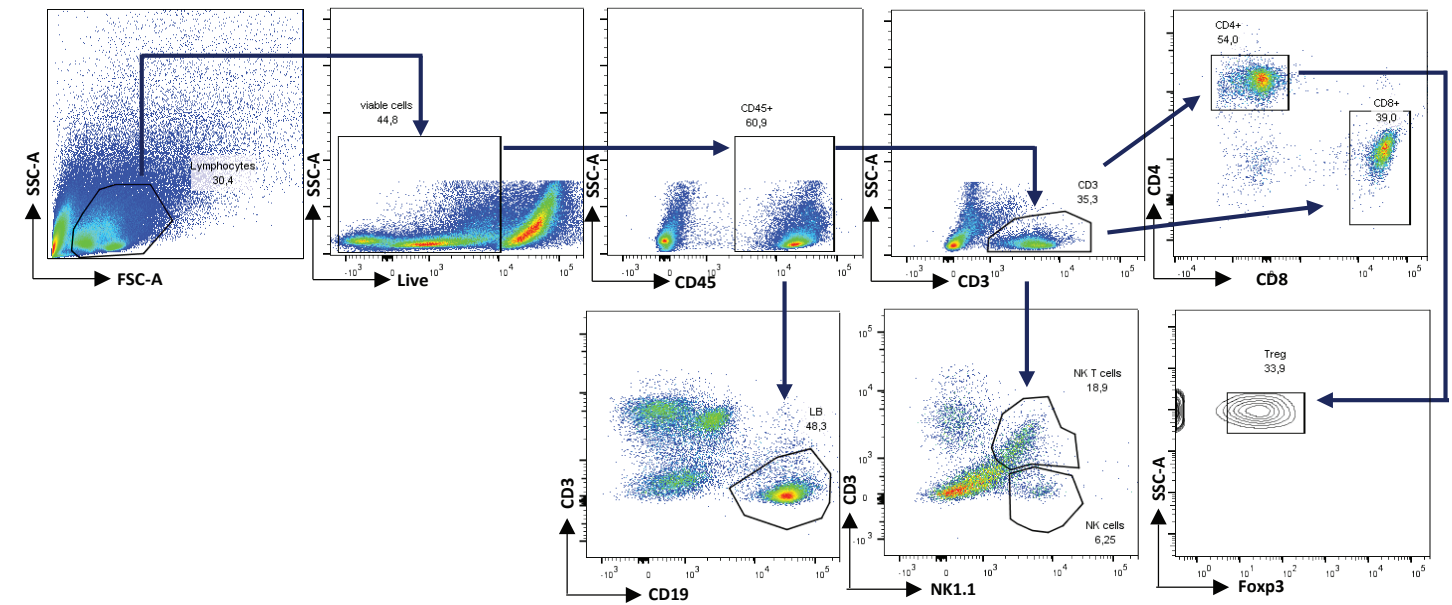


Appendix Figure S3

A Myeloid gating strategy



B Lymphoid gating strategy



Appendix Table S1: Exact p-values

FIGURES	GRAPH	COMPARAISON	SIGNIFICANCE	ADJUSTED P VALUE	TEST
Fig 1C	pYFAK in fib.	Ct vs. PDAC	**	0,0016	Unpaired two-tailed t test
	pYFAK in fib. Cytoplasm	Ct vs. PDAC	**	0,0018	Unpaired two-tailed t test
	pYFAK in fib. Nucleus	Ct vs. PDAC	**	0,0039	Unpaired two-tailed t test
Fig 3C	Collagen I	R211+MEFsFAK-WT vs. R211+MEFsFAK-KD	*	0,0473	Unpaired two-tailed t test
	Collagen III	R211+MEFsFAK-WT vs. R211+MEFsFAK-KD	*	0,0452	Unpaired two-tailed t test
Fig 3G	Metastasis number	R211 vs. R211+MEFsFAK-WT	*	0,0152	Tukey's multiple comparisons test
		R211+MEFsFAK-WT vs. R211+MEFsFAK-KD	*	0,0365	Tukey's multiple comparisons test
	Metastasis area	R211 vs. R211+MEFsFAK-WT	***	0,0003	Tukey's multiple comparisons test
		R211+MEFsFAK-WT vs. R211+MEFsFAK-KD	**	0,0012	Tukey's multiple comparisons test
Fig 4 A	M1	TumCells+FibFAK-WT vs. TumCells+FibFAK-KD	*	0,0396	Unpaired two-tailed t test
	M2	TumCells+FibFAK-WT vs. TumCells+FibFAK-KD	**	0,0091	Unpaired two-tailed t test
Fig 4B	M2	TumCells+FibFAK-WT vs. TumCells+FibFAK-KD	*	0,0442	Unpaired two-tailed t test
Fig 4D	CD206low/CMH2high	FAK-WT CM vs FAK KD CM	*	0,0317	Unpaired two-tailed t test
	CD206high/CMH2low	FAK-WT CM vs FAK KD CM	*	0,0101	Unpaired two-tailed t test
	Dectin	FAK-WT CM vs FAK KD CM	*	0,0287	Unpaired two-tailed t test
Fig 4E	M2 48h	CM from CAFs vs CM from FAK-I CAFs	*	0,047	Paired two-tailed t test
Fig 4G	MCP1 elisa	NT vs FAK-I	*	0,016	Paired two-tailed t test
Fig 4H	CD206	fib pFAK low vs fib pFAK high	**	0,0084	Unpaired two-tailed t test
Fig 5C	fib. Velocity	FibFAK-WT vs. FibFAK-KD	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
		FibFAK-KD vs. FibFAK-KD+TumCell	**	0,0021	Tukey's multiple comparisons test
Fig 5D	fib directionality	FibFAK-WT vs. FibFAK-KD	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
		FibFAK-WT TumCell vs. FibFAK-KD TumCell	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
Fig 5E	fib. Distance	FibFAK-WT vs. FibFAK-KD TumCell	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
		FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
		FibFAK-KD vs. FibFAK-KD+TumCell	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
Fig 5G	Tum Cell directionality	TumCell vs. TumCell+FibFAK-WT	*	0,0173	Tukey's multiple comparisons test
		TumCell vs. TumCell+FibFAK-KD	**	0,0073	Tukey's multiple comparisons test
		TumCell+FibFAK-WT vs. TumCell+FibFAK-KD	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
Fig 5H	Tum Cell distance	TumCell vs. TumCell+FibFAK-WT	**	0,0081	Tukey's multiple comparisons test
		TumCell+FibFAK-WT vs. TumCell+FibFAK-KD	*	0,02	Tukey's multiple comparisons test
Fig 5J	Fib invasion	FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell	***	0,0003	Unpaired two-tailed t test
Fig 5K	Tum Cell invasion	FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell	*	0,023	Unpaired two-tailed t test
		FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell D1	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
		FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell D2	***	0,0001	Tukey's multiple comparisons test
		FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell D3	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test

Fig 6C	Mouse fib. + tum cells	FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell D4	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
		FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell D5	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
		FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell D6	***	0,0004	Tukey's multiple comparisons test
		FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell D7	***	0,0003	Tukey's multiple comparisons test
	Human primary CAFs	NT vs FAK-I D1	**	0,0075	Paired two-tailed t test
		NT vs FAK-I D2	**	0,0032	Paired two-tailed t test
		NT vs FAK-I D3	*	0,0115	Paired two-tailed t test
		NT vs FAK-I D4	**	0,0041	Paired two-tailed t test
		NT vs FAK-I D5	*	0,0278	Paired two-tailed t test
		NT vs FAK-I D7	**	0,0038	Paired two-tailed t test
Fig 6D	pY397 FAK	NT vs FAK-I	***	0,0006	Paired two-tailed t test
	Coll III	NT vs FAK-I	*	0,0473	Paired two-tailed t test
	Coll IV	NT vs FAK-I	**	0,0095	Paired two-tailed t test
	POSTN	NT vs FAK-I	***	0,0002	Paired two-tailed t test
	OPN	NT vs FAK-I	****	< 0,0001	Paired two-tailed t test
	LOXL2	NT vs FAK-I	*	0,0111	Paired two-tailed t test
Fig 6 L	cluster number	CAF14 NT vs. CAF14 FAK-I	****	<0,0001	Unpaired two-tailed t test
	cluster size	CAF14 NT vs. CAF14 FAK-I	****	<0,0001	Unpaired two-tailed t test
Fig EV2 A	pY397 FAK on GFP+ cells	FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell	*	0,0352	Unpaired one-tailed t test
Fig EV3C	CD206 number Tum area	FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell	*	0,0144	Unpaired two-tailed t test
	CD206 numb. Adj are	FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell	*	0,0442	Unpaired two-tailed t test
	CD206 num. Fibrotic area	FibFAK-WT+TumCell vs. FibFAK-KD+TumCell	*	0,0131	Unpaired two-tailed t test
Fig EV3F	M1 differentiation	M0 vs M1	****	<0,0001	Bonferroni's multiple comparisons test
	M2 differentiation	M0 vs M2	****	<0,0001	Bonferroni's multiple comparisons test
Fig EV3G	M2 migration	NT vs. MC	*	0,0381	Tukey's multiple comparisons test
		Pre-inc FAKi vs. MC	*	0,0301	Tukey's multiple comparisons test
		MC vs. MC+FAKi	*	0,0452	Tukey's multiple comparisons test
Fig EV5D	Mouse fibroblasts D1	FAK-WT fib. vs. FAK-WT fib. + TGFb	*	0,0128	Tukey's multiple comparisons test
		FAK-WT fib. vs. FAK-KD fib.	*	0,0195	Tukey's multiple comparisons test
		FAK-WT fib. vs. FAK-KD fib. + TGFb	*	0,0304	Tukey's multiple comparisons test
		FAK-WT fib. + TGFb vs. FAK-KD fib.	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
		FAK-WT fib. + TGFb vs. FAK-KD fib. + TGFb	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
	Mouse fibroblasts D2	FAK-WT fib. vs. FAK-WT fib. + TGFb	**	0,0038	Tukey's multiple comparisons test
		FAK-WT fib. vs. FAK-KD fib.	*	0,0432	Tukey's multiple comparisons test
		FAK-WT fib. + TGFb vs. FAK-KD fib.	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
		FAK-WT fib. + TGFb vs. FAK-KD fib. + TGFb	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
	Mouse fibroblasts D5	FAK-WT fib. vs. FAK-WT fib. + TGFb	**	0,0071	Tukey's multiple comparisons test
		FAK-WT fib. + TGFb vs. FAK-KD fib.	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
		FAK-WT fib. + TGFb vs. FAK-KD fib. + TGFb	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test

Fig EV5 L	Mouse fibroblasts D6	FAK-WT fib. vs. FAK-WT fib. + TGFb	*	0,0107	Tukey's multiple comparisons test
		FAK-WT fib. + TGFb vs. FAK-KD fib.	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
		FAK-WT fib. + TGFb vs. FAK-KD fib. + TGFb	***	0,0004	Tukey's multiple comparisons test
	Mouse fibroblasts D7	FAK-WT fib. vs. FAK-WT fib. + TGFb	*	0,011	Tukey's multiple comparisons test
		FAK-WT fib. + TGFb vs. FAK-KD fib.	****	<0,0001	Tukey's multiple comparisons test
		FAK-WT fib. + TGFb vs. FAK-KD fib. + TGFb	**	0,0017	Tukey's multiple comparisons test
	cluster number	CAF1 NT vs. CAF1 FAK-I	*	0,0134	Tukey's multiple comparisons test
		CAF2 NT vs. CAF2 FAK-I	**	0,0041	Tukey's multiple comparisons test
	cluster size	CAF1 NT vs. CAF1 FAK-I	***	0,0005	Tukey's multiple comparisons test
		CAF2 NT vs. CAF2 FAK-I	**	0,0017	Tukey's multiple comparisons test

Table EV2 : Clinical and pathological data pancreatic ductal adenocarcinoma patients whose surgery-resected tumors were processed to derive primary cultures of CAFs

	Male Sex	AGE	Differentiation	Tumor Size cm	Ratio N+/N >0.2	Liver metastasis	TNM	Adjuvant treatment
CAF1	1	68	Moderately differentiated	2.5	0	0	pT3 N1	Gemcitabine
CAF2	1	44	Moderately differentiated	.4	0	0	pT1a N0	FOLFIRINOX
CAF3	0	70	Moderately differentiated	Unknown	1	0	pT3 N1	No
CAF4	0	74	Moderately differentiated	6	0	0	pT3 N0	No
CAF5	1	56	Unknown	Unknown	0	0	Unknown	No
CAF6	0	78	Moderately differentiated	2	0	0	pT1 N0	FOLFIRINOX
CAF7	1	68	Moderately differentiated	3.2	1	1	pT2 N1b	No
CAF8	1	54	Well differentiated	5	1	0	pT3 N1	No
CAF9	0	77	Moderately differentiated	Unknown	1	0	pT2 N1	No
CAF10	1	67	Moderately differentiated	2.8	0	0	pT3 N0	No
CAF11	0	67	Moderately differentiated	6	1	0	pT3 N1a	FOLFIRINOX
CAF12	0	66	Moderately differentiated	3	0	0	pT3 N1	No
CAF13	0	68	Moderately differentiated	3.2	0	0	pT2 N0 R1	No
CAF14	0	47	Moderately differentiated	2.4	1	0	pT2 N2	No
CAF15	0	58	Moderately differentiated	3.5	0	0	pT3 N0	FOLFIRINOX

Expanded View Figures

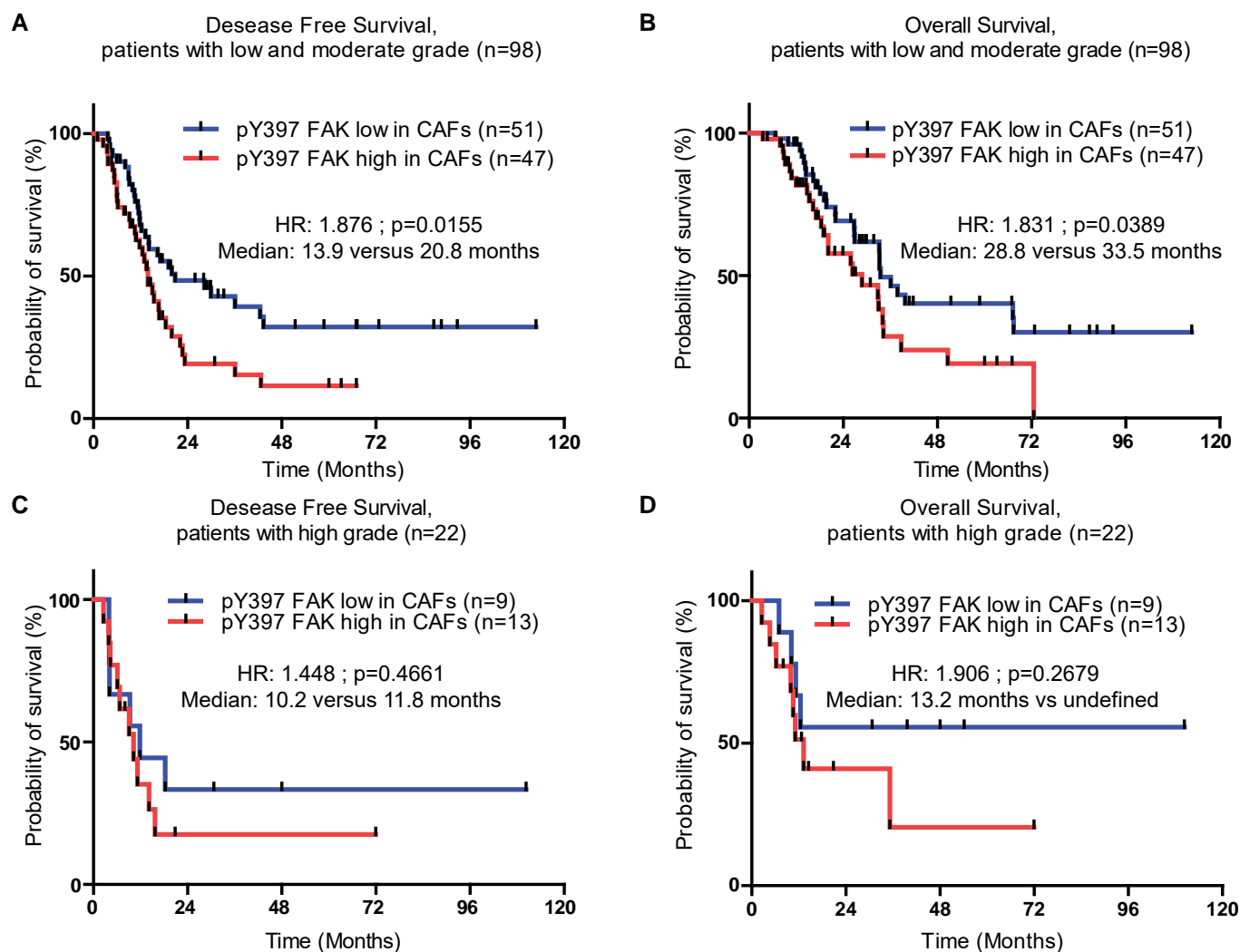


Figure EV1. Increased FAK activation is predictive of shorter DFS and OS for patients with low and moderate grade.

A, B Disease-free survival (A) and overall survival (B) according to pY397 FAK expression in CAFs of patients with low and moderate grade tumour.

C, D Disease-free survival (C) and overall survival (D) according to pY397 FAK expression in CAFs of patients with high grade tumour.

Data information: Survival curves were estimated with the Kaplan–Meier method and compared using log-rank test, non-parametric tests (chi-square test) to compare independent groups for categorical data; HR, hazard ratio.

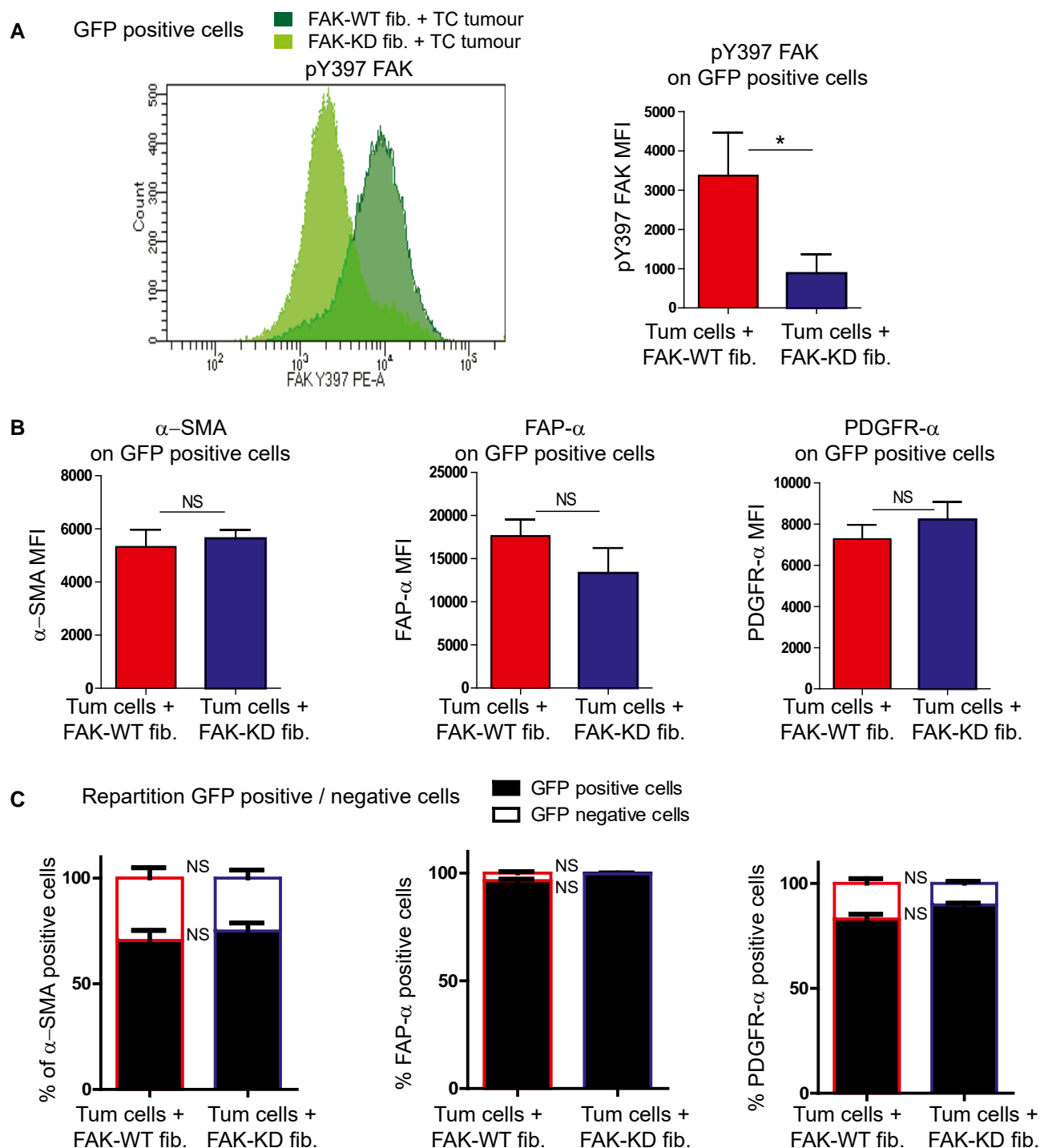


Figure EV2. Fibroblasts get activated when co-grafted with tumour cells.

Mice were syngeneically and orthotopically co-grafted with GFP-expressing FAK-WT or GFP-expressing FAK-KD mouse embryonic fibroblasts and pancreatic tumour cells (respectively, named GFP-FAK-WT fib. + TC or GFP-FAK-KD fib. + TC tumour). Forty days after injection, mice were euthanized, tumour dissociated and CAF markers analysed using flow cytometry.

A, B pY397 FAK, α -SMA, FAP- α and PDGFR- α expressions were analysed on GFP-positive cells from GFP-FAK-WT fib. + TC tumours (dark green) or GFP-FAK-KD fib. + TC tumours (light green) MFI: mean of fluorescence intensity, values are means \pm SEM using unpaired one-tailed Student's t-test from 6 mice per group. * $P < 0.05$.

C Quantification of GFP-expressing cells on α -SMA-, FAP- α - or PDGFR- α -positive cells from GFP-FAK-WT fib. + TC or GFP-FAK-KD fib. + TC tumours. Values are means \pm SEM using unpaired one-tailed Student's t-test from six mice per group. NS: not significantly different.

Figure EV3. Fibroblastic FAK inactivation reduces M2 macrophage polarization and migration.

- A, B Twenty-one and 38 days after syngeneic and orthotopic co-grafting of mouse FAK-WT or FAK-KD fibroblasts plus tumour cells, mice were euthanized and tumour dissociated. Relative frequencies of tumour-infiltrating immune cells (CD3, CD4, CD8, LB, NK, NKT and Treg) using flow cytometry at 21 days (A) and 38 days (B). All stained cells were analysed with a Fortessa X20 flow cytometer (BD Biosciences), and data processed using FlowJo software (Beckman Dickinson). Values are means \pm SEM from 5 to 10 mice per group, unpaired two-tailed Student's *t*-test.
- C, D Quantification of CD206 (C)- and CD8 (D)-positive cell frequency (based on IHC staining) on whole pancreas, tumoural, adjacent and fibrotic areas with representative immunochemistry pictures of each staining on different areas. Values are means \pm SEM from 9 to 10 mice per group. **P* < 0.05 using unpaired two-tailed Student's *t*-test. Scale bar: 50 μ m
- E Mouse embryonic fibroblasts were incubated with conditioned medium (CM) from pancreatic cancer cells during 24, 48 or 72 h before being lysed (CM were harvested from tumour cells 72 h after tumour cells were seeded in F12 medium plus 0.5% FBS). PDGFR- α , FAP- α , α -SMA and GAPDH expressions were evaluated by Western blot.
- F Validation of the BMDM-derived macrophage polarization into M1 or M2. Left: schematic of the experiment; right: percentage of M1- or M2-positive cells. Results were acquired by flow cytometry and processed using FlowJo software. ****P* < 0.001, by Bonferroni's multiple comparison test; values are mean \pm SEM from three experiments.
- G Evaluation of the impact of FAK inhibitor that has been pre-incubated for 48 h at 37°C in DMEM/F12 + 0.5% FBS on macrophage migration. M, medium DMEM/F12 + 0.5% FBS; CM, conditioned medium. Quantification performed using Cell Observer videomicroscope (Zeiss) and analysed with ImageJ. **P* < 0.05, by Tukey's multiple comparison test; values are mean \pm SEM from three experiments.

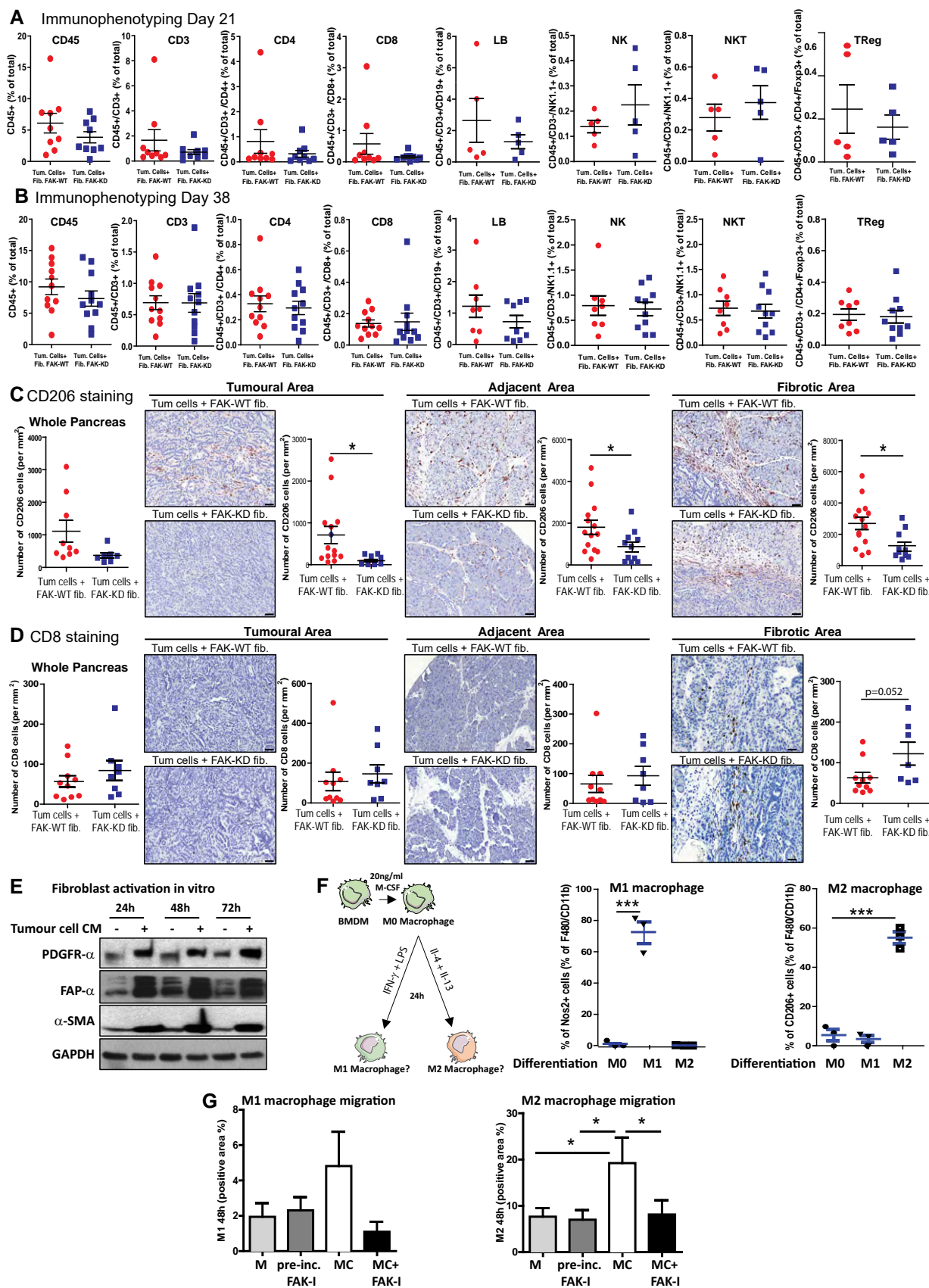


Figure EV3.

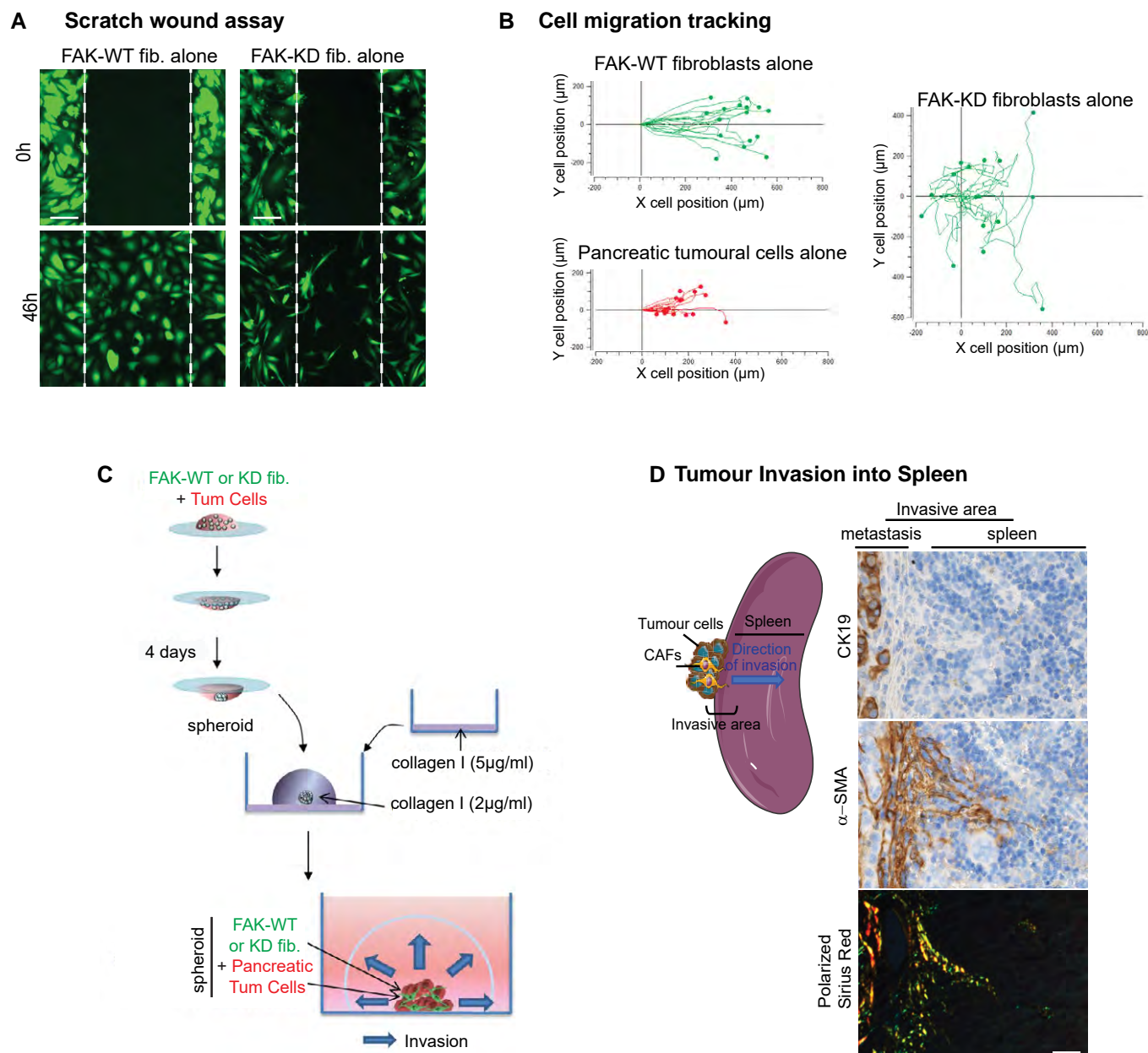


Figure EV4. Fibroblastic FAK activity controls tumour cell migration and invasion.

- A Representative images of three independent scratch wound assays of either FAK-WT or FAK-KD green-labelled fibroblasts at time zero and 46 h. Scale bar, 150 μm.
- B Cell migration tracking of either fibroblasts or tumour cells ($n > 16$ cells per condition) over time.
- C Schematic of the method used to generate 3D spheroid of FAK-WT or FAK-KD fibroblasts plus pancreatic tumour cells in order to analyse cell invasion into collagen I matrix. A 20 μl drop containing FAK-WT or FAK-KD fibroblasts plus pancreatic tumour cells was hanged for 4 days at 37°C. New formed spheroids were transferred into well (eight-well bottomless μ-Slide Ibidi) pre-coated with 50 μg/ml collagen I matrix and embedded into 2 mg/ml collagen I matrix for 72 h. Z-stack of embedded spheroids was made using Zeiss LSM 780 confocal microscope.
- D Representative pictures of pancreatic tumour invasion into the spleen. Left: schematic of the invasion; right: representative images of CK19 and α-SMA IHC staining and polarized Sirius Red performed on spleen sections of mice syngeneically and orthotopically co-grafted with pancreatic tumour cells and fibroblasts. Scale bar, 25 μm.

Figure EV5. Fibroblastic FAK activity promotes drastic ECM modification.

- A Representative images of CD19 and α -SMA immunohistochemistry and Sirius red staining in serial sections of two primary mouse tumours at 38 days after injection of mice grafted with FAK-WT or FAK-KD fibroblasts + tumours cells at the invasive front. Scale bar, 100 μ m.
- B Representative pictures of collagen gel contraction at day 0 and 7 induced by FAK-WT or FAK-KD fibroblasts, in presence or not of TGF- β .
- C Representative pictures of fibroblast organization within collagen gel at day 12 observed using Nikon Eclipse TE200 microscope (40 \times magnifications) and Nikon Digital Camera DMX1200.
- D Quantification of fibroblast-induced collagen I gel contraction based on photographed gels using the formula $100 \times (\text{well diameter} - \text{gel diameter}) / \text{well diameter}$ in presence or not of TGF- β .
- E Representative pictures of immunofluorescence analyses of different protein expressed by human CAFs treated or not (NT) with FAK inhibitor (FAK-I at 1 μ M). Scale bar, 50 μ m.
- F Percentage changes of protein expression for each individual patient-derived activated fibroblast tested. Percentage of pY397 FAK, total FAK, collagen I, collagen III, collagen IV, LOXL2, periostin and osteopontin expression after FAK inhibitor treatment of human primary CAFs. Each individual patient-derived activated fibroblast was assigned to a specific symbol (see Table EV2). Blue symbol colour was used when FAK-I promotes a decrease higher than 10%, red symbols for an increase higher than 10%, black symbols when FAK inhibition promotes variation lower than 10%.
- G pY397 FAK, FAK, collagens I, III, IV, periostin, osteopontin and tubulin expressions were evaluated by Western blot on lysates from either hCAFs treated or not with FAK-I for 48 h, or from primary mouse tumours of mice grafted with FAK-WT or FAK-KD fibroblasts + tumours cells (day 38).
- H–J Heatmap of the modification of ECM-affiliated protein (H), secreted factor (I) and ECM-regulator (J) expressions upon FAK inhibition (48 h) in hCAFs. The value of \log_2 fold change between FAK inhibitor-treated CAFs and non-treated CAFs for each gene was indicated by the coloured scale, with red indicating increased expression while blue implies decreased expression. For each CAFs and each gene, \log_2 fold change was calculated based on two technical replicates per condition (biological replicate $n = 3$, technical replicate $n = 2$).
- K Representative pictures of β 1 integrin activation of tumour cells, upon adhesion to ECM deposited from non-treated CAFs and after 20 min of MnCl_2 or EDTA treatment. Merge: activated β 1 integrin (red), phalloidin (green), dapi (blue); scale bar: 10 μ m.
- L Left: Representative pictures of activated β 1 integrin (top) or total β 1 integrin (bottom) expressed by tumour cells, upon adhesion to either ECM deposited from non-treated CAFs or treated with FAK-I for 7 days, analysed by IF. Merge: integrin (red), phalloidin (green), dapi (blue); scale bar: 10 μ m. Right: quantification of the number of activated integrin β 1 cluster per cell and size of those clusters. Values are means \pm SEM using one-way ANOVA with Tukey's method. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ on at least seven images (of one to 34 cells per image) per group.

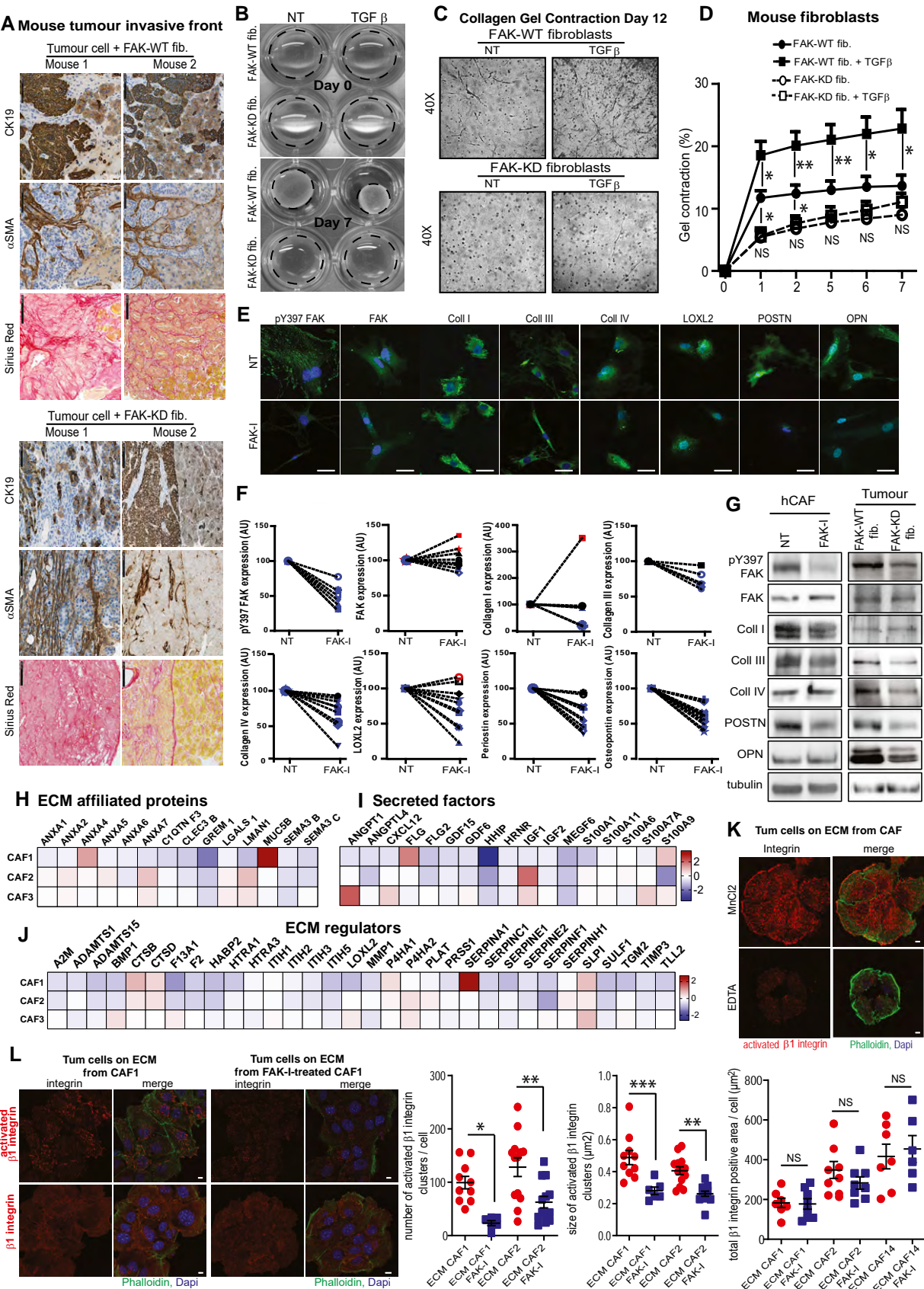


Figure EV5.

Table EV1. Clinical and pathological data for the 120 pancreatic ductal adenocarcinoma patients studied, and association with the fibroblastic pY397 FAK score

Characteristic	Total	Fib FAK pY397 low (n=60)	Fib FAK pY397 high (n=60)	p
Total (n=120)				
Age (years), median (range)	61 (37-79)	60 (37-76)	62 (43 -79)	NS
Male sex, no. (%)	50 (42)	25 (21)	25 (21)	NS
Surgery, no. (%)				
Duodenopancreatectomy	101 (84)	50 (42)	51 (43)	NS
Distal pancreatectomy	11 (9)	6 (5)	5 (4)	
Other	8 (7)	4 (3)	4 (3)	
Resection margin, no. (%)				
Negative, R0	88 (73)	48 (40)	40 (33)	NS
Positive, R1	32 (27)	12 (10)	20 (17)	
Tumour grade, no. (%)				
Well differentiated	60 (50)	32 (27)	28 (23)	NS
Moderately differentiated	38 (32)	19 (16)	19 (16)	
Poorly differentiated	20 (17)	9 (8)	11 (9)	
Unknown	2 (2)	0 (0)	2 (2)	
Tumour size (mm) median (range)	32 (10-150)	33 (10-150)	31 (10-105)	NS
Tumour stage, no. (%)				
T1	3 (3)	2 (2)	1 (1)	NS
T2	14 (12)	4 (3)	10 (8)	
T3	103 (86)	54 (45)	49 (41)	
Lymph nodes, no. (%)				
Positive, N+	94 (78)	48 (40)	46 (38)	NS
Ratio N+/N of ≤ 0.20	85 (71)	42 (35)	43 (36)	NS
Ratio N+/N of >0.20	35 (29)	18 (15)	17 (14)	
Tumour stage, AJCC 2009 (7th edn), no. (%)				
IA	2 (2)	1 (1)	1 (1)	NS
IB	7 (6)	3 (3)	4 (3)	
IIA	17 (14)	8 (7)	9 (8)	
IIB	94 (78)	48 (40)	46 (38)	
Vascular invasion, no. (%)				
No	11 (9)	7 (6)	4 (3)	NS
Yes	92 (77)	43 (36)	49 (41)	
Unknown	17 (14)	10 (8)	7 (6)	
Perineural invasion, no. (%)				
No	12 (10)	5 (4)	7 (6)	NS
Yes	88 (73)	44 (37)	44 (37)	
Unknown	20 (17)	11 (9)	9 (8)	
Adjuvant treatment, no. (%)				
No	21 (18)	9 (8)	12 (10)	NS
Gemcitabine	40 (33)	17 (14)	23 (19)	
RT or RCT with 5FU	19 (16)	14 (12)	5 (4)	
RCT with gemcitabine	37 (31)	18 (15)	19 (16)	
Other	2 (2)	1 (1)	1 (1)	
Unknown	1 (1)	1 (1)	0 (0)	

NS, not significant, AJCC, American Joint Committee on Cancer; RT, radiotherapy; RCT, radiochemotherapy; 5-FU, 5-fluorouracil.

Chapitre II: FAK inactivation in fibroblasts normalizes blood vessels by remodeling their basement membrane and permeability

Nous avons précédemment rapporté que l'activité kinase de FAK est fortement augmentée dans les CAFs de patients atteints de PDAC par rapport à son activité dans les fibroblastes de pancréas sain et que cette activité est un marqueur pronostique indépendant pour la survie globale et sans maladie des patients. De manière intéressante, l'inactivation de FAK dans les fibroblastes (MEF), dans un modèle murin, a réduit la quantité de certaines protéines matricielles (collagènes I et III) et le nombre de cellules immunosuppressives (macrophages M2) à l'intérieur des tumeurs primaires mais également diminué l'apparition de métastases. De plus, l'inactivation pharmacologique ou génétique de FAK *in vitro* a diminué la production de protéines matricielles par les fibroblastes modifiant ainsi les rails de matrice permettant initialement la migration et l'invasion des cellules tumorales.

Suite à la publication de cette étude, nous avons cherché à élucider les mécanismes sous-jacents au remodelage de la matrice induit par l'inactivation de la FAK dans le modèle murin. Nous avons ainsi étudié plus en détail les protéines matricielles impactées par l'inactivation de FAK dans les fibroblastes en réalisant un « Matrisome » sur les tumeurs issues du modèle murin greffé avec des cellules tumorales et des fibroblastes (MEF) exprimant une forme active ou inactive de FAK. Cette technique de spectrométrie de masse réalisée sur des tumeurs décellularisées et enrichies en matrice permet de quantifier toutes les protéines insolubles y compris les protéines matricielles. Nous avons confirmé par cette technique la réduction des collagènes fibrillaires et de la périostine (publiée précédemment) mais avons observé une augmentation des protéines matricielles de la membrane basale dans la condition où FAK fibroblastique est inactivée. Par immunohistochimie, nous confirmons l'augmentation du collagène IV, une protéine majoritaire des membranes basales, spécifiquement autour des vaisseaux sanguins. **Afin de déterminer comment l'inactivation fibroblastique de FAK régule la production de collagène IV autour des vaisseaux,** nous avons traité des cellules vasculaires (cellules endothéliales et péricytes) avec un milieu conditionné de fibroblastes ayant un FAK actif ou inactif et étudié la production de collagène IV par ces cellules vasculaires par immunofluorescence. Nous avons précédemment publié que le traitement des CAFs par un inhibiteur de FAK induisait une réduction de collagène IV réfutant ainsi l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de collagène IV autour des vaisseaux est due à la sécrétion par les CAFs directement. Nos résultats préliminaires semblent soutenir l'idée d'un dialogue entre les CAFs et les péricytes permettant la production accrue (par les péricytes) de collagène IV autour des vaisseaux dans la condition où FAK est inactivée dans les CAFs. L'accumulation de protéines de la membrane basale autour des vaisseaux étant documentée pour induire une « normalisation » de ces derniers,

nous avons mesuré cette « normalisation » *via* un test de perméabilité, le « Miles assay ». Ce test nous a permis de démontrer que l'inactivation fibroblastique de FAK normalise les vaisseaux dans la tumeur primaire et les organes de métastase. La normalisation des vaisseaux pouvant faciliter l'entrée des chimiothérapies dans la tumeur, nous avons postulé que l'inactivation de FAK fibroblastique pourrait favoriser l'entrée des drogues dans la tumeur et ainsi les sensibiliser. Cependant, le traitement de notre modèle murin avec les deux chimiothérapies de référence utilisées dans le PDAC (la gemcitabine et le Folfirinox) par injection intraveineuse (veine caudale) ne montre aucun effet sur la croissance tumorale. En parallèle, afin d'être dans un modèle plus physiologique, nous avons développé un autre modèle murin de PDAC dans lequel les fibroblastes greffés sont des cellules étoilées pancréatiques (PSC), ces cellules étant plus différenciées que les MEFs et à l'origine des CAFs ayant des propriétés myofibroblastiques dans le pancréas. Nous avons suivi la croissance tumorale et le remodelage matriciel (notamment les collagènes fibrillaires et collagène IV) dans ce modèle et montrons que l'inactivation fibroblastique de FAK entraîne une réduction de la croissance tumorale, une diminution des collagènes fibrillaires pro-tumoraux, une augmentation du collagène IV autour des vaisseaux et une réduction non significative de la perméabilité vasculaire dans la tumeur. Contrairement au modèle utilisant les MEFs, l'ajout de chimiothérapies dans le modèle de PSCs a permis une réduction plus importante de la croissance tumorale. Cependant, étant donné que la normalisation vasculaire (perméabilité) n'a pas montré de différences significatives dans le modèle de PSCs, nous n'estimons pas que cela favorise l'entrée de la chimiothérapie, puisque l'effet de l'ajout de chimiothérapie dans les groupes FAK-KD ou -WT est comparable.

FAK inactivation in fibroblasts normalizes blood vessels by remodeling their basement membrane and permeability

Ismahane Belhabib ¹, Sonia Zaghdoudi¹, Petnoi Petsophonsakul ¹, Vinothini Rajeeve ², Mehdi Liauzun ¹, Claire Lac ¹, Aurélie Perraud ³, Muriel Mathonnet ³, Oliver MT Pearce ⁴, David Schlaepfer ⁵, Yvan Martineau ¹, Corinne Bousquet ¹ and Christine Jean ^{1*}

Affiliations

¹Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), team 6 " Microenvironment and Therapeutic Resistance in Pancreatic Neoplasms", Equipe labellisée Ligue Contre Le Cancer, Labex TOUCAN, INSERM UMR 1037- University Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France.

²Centre for Genomics and Computational Biology, Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London, London, UK.

³EA 3842 Laboratory, Medicine and Pharmacy Faculties, Limoges University, Limoges, France.

⁴ Centre for Tumour Microenvironment, Barts Cancer Institute, London, UK.

⁵Department of Reproductive Medicine Moores Cancer Center, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA.

*Corresponding author. Tel: +33 582741650; E-mail: christine.jean@inserm.fr

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most lethal cancers. PDAC aggressiveness is in part caused by the abundance of its stroma mainly composed by cancer-associated fibroblasts (CAFs) that facilitate tumor progression and chemoresistance. We previously reported that FAK activity in CAFs is a prognosis marker and a key actor of metastases. Here, we identify that the fibroblastic inactivation of FAK in three different but complementary and immunocompetent mouse models of PDAC, triggers the remodeling of the extracellular matrix (ECM), whereby the global amount of ECM proteins including pro-tumoral ones is reduced, yet the expression of proteins composing the basement membrane (BM) including of collagen IV, is increased. This major BM component is specifically found enriched around blood vessels, in accordance with our mechanistic data showing that collagen IV production by pericytes is stimulated when the later cells are exposed to secretions of FAK inactivated fibroblasts. BM accumulation around blood vessels in FAK-inactivated fibroblastic PDAC models correlates with a global decrease (trend or significant, depending

on the model) of vessel permeability. Nevertheless, such vessel normalization induced by fibroblastic FAK inactivation and which may have favored drug perfusion, did not result in our models of orthotopic co-graft of MEF or PSC with PDAC cells, in increased drug effect. Hence, drug-induced tumor growth reduction that is observed or not depending on the drugs and on the models, was not amplified in tumors inactivated for fibroblastic FAK. Rather, and importantly enough, fibroblastic FAK inactivation demonstrated a cumulative effect with chemotherapy.

KEY WORDS: Pancreatic ductal adenocarcinoma, Cancer-associated fibroblasts, Focal Adhesion Kinase, Extracellular matrix, Basement membrane, Blood vessel normalization.

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most lethal cancers with a 5-year survival rate of 12% mainly due to a late diagnosis. Most patients remain asymptomatic until the tumor reaches an advanced stage, at which point patients are already highly metastatic and cannot benefit from surgical resection, the only curative treatment. Other classical treatments are chemotherapies but so far, they did not provide important survival benefit for patients (Torphy, Fujiwara, and Schulick 2020). As chemotherapies require intravenous systemic administration and delivery to the tumors, blood vessel quantity and quality appear to be key regulators in this process (Dewhirst and Secomb 2017). However, PDAC stroma is hypovascularized, presenting tortuous, compressed and poorly functional blood vessels. This is due to the combination of intrinsic and extrinsic factors. Intrinsic processes lead to precocious capillary sprouting, convoluted and excessive vessel branching, distorted and enlarged vessels, and abnormal levels of endothelial cell proliferation and apoptosis (Baluk, Hashizume, and McDonald 2005; Nagy et al. 2010). Extrinsic factors involve mechanical and physical features of the extracellular matrix (ECM) found in such tumors (Nia, Munn, and Jain 2020; Hwang et al. 2008; Yamasaki, Yanai, and Onishi 2020).

Indeed, the PDAC tumor microenvironment is mainly composed of a very dense and stiff ECM, a network of non-cellular components (collagens, glycoproteins and proteoglycans) that participate to the generation of mechanical forces such as interstitial fluid pressure (IFP) and solid stress that limit vascularization, promote blood vessel collapse and, thus blocking drug delivery. ECM modifies almost every hallmark of cancer and dynamically contributes to generate a specific microenvironment facilitating tumor growth, metastasis, and survival (Belhabib et al. 2021). ECM is a reservoir of soluble factors that tumor cells can use to grow. Moreover, if ECM is organized in tracks (so called TACS for Tumor-Associated Collagen Signatures) it can favor tumor cell dissemination. ECM can also activate different pro-tumoral signaling pathways (mechanotransduction) within cells notably through integrins. Importantly, basal membrane proteins, a highly specialized ECM that physiologically form a sheet-like that underlies epithelia and endothelia participating to the maintenance of homeostasis, separating tissues and protecting them from mechanical stress, is lost during tumorigenesis favoring vessel leaks, tumor progression, invasion and metastasis (Barrett et al. 2018). Thus, ECM composition, quantity, organization and stiffness can affect tumor progression and drug delivery (Belhabib et al. 2021). Therapeutic strategies aiming to normalize this ECM (overcoming the dense ECM accumulation and restoring basement

membrane) appears to be of interest for PDAC treatment as it may decrease tumor cell function dependent on mechanotransduction, impact ECM track formation and normalize vessels leading to a better drug delivery within tumor.

Cancer-associated fibroblasts (CAFs), the main cellular component of PDAC microenvironment, contribute to several features of PDAC, including the deposition of ECM, metabolic support for malignant cells, and immunosuppression. CAFs are highly heterogeneous in terms of origin, functions, and markers. On the basis of their functions, CAFs can be divided into three broad groups: myofibroblastic CAF (myCAF), inflammatory CAF (iCAF) and antigen-presenting CAF (apCAF)(Öhlund et al. 2017). myCAF best-known function is the production of ECM components and remodeling enzymes that can participate to the generation of abnormal vasculature and limitation of delivery of intravenous therapeutic agents (Paolo P. Provenzano et al. 2012; Jacobetz et al. 2013; Belhabib et al. 2021). myCAF main origin has been shown to be the pancreatic stellate cells (PSCs), a tissue-resident mesenchymal cells from the pancreas (Helms et al. 2022). In the line with such knowledge, one can hypothesize that targeting myCAFs may result in normalizing the ECM and thus all the cancer hallmarks dependent on it, such as tumor growth, invasion, metastasis and abnormal vasculature (collapsed vessels and hypoperfusion) implicated in chemoresistance.

We recently identified that targeting FAK activity in CAFs is of clinical interest for PDAC patients as increased FAK activity within CAFs specifically is of bad prognosis for patient and a druggable key metastatic player in pancreatic cancer (Zaghdoudi et al. 2020). To better understand the role of FAK (a ubiquitous cytoplasmic tyrosine kinase mainly activated by the interaction between ECM and integrins) in CAFs, we grafted immunocompetent mice with tumor cells and fibroblasts (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) expressing an active or inactive FAK. We identified that fibroblastic FAK activity promotes tumor cell metastases, recruitment of pro-tumoral M2 macrophages and enhances ECM deposition. Those findings have motivated our efforts to analyze deeper this pre-clinical model and develop a new one in which FAK activity is targeted specifically in PSC, the cell of origin of myCAFs. Taking advantage of those models, we investigated the potential indirect effect of fibroblastic FAK inactivation, through ECM remodeling, on vasculature normalization and enhanced chemotherapy delivery within the tumors.

Materials and Methods

Cells

Human cancer-associated fibroblasts: CAFs were isolated from human pancreatic tumor tissues using the outgrowth method described by Bachem *et al* (Bachem et al. 1998). Briefly, human CAFs were isolated using explant techniques from histologically fibrotic areas of PDAC surgically resected. Small tissue blocks were cut (0.5–1 mm³) using razor blade and seeded in 10-cm² uncoated culture wells in the presence of Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM/F12 Lonza D8437) containing 10% FBS (Life Technologies) supplemented with l-Glutamine (l-glu, 2 mmol/l), penicillin and streptomycin (P/S). Tissue blocks were cultured at 37°C in a 5% CO₂-air humidified atmosphere. Eighteen hours after seeding, culture medium was changed. CAFs grew out from the tissue blocks 1–3 days later.

Mouse pancreatic tumor cells: Mouse pancreatic tumor cells (R211 and 8305) are tumor cells isolated from LSL-K-Ras^{G12D/+};LSL-p53^{R172H/+};Pdx1-Cre (also referred as KPC) and LSL-K-Ras^{G12D/+};Pdx1-Cre (also referred as KC) mice (Hingorani et al. 2005; 2003) and generously provided by Dr. D. Saur (University Hospital Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Germany). Cells were maintained in DMEM 10% FBS plus P/S and l-glutamine.

Mouse embryonic FAK-WT or FAK-KD fibroblast generation: Primary FAK-KD/KD and FAK-WT/WT MEFs were generously provided by Dr. David Schlaepfer (UCSD, San Diego, USA). MEFs were isolated from E8.5 embryo explant culture. Kinase inactive FAK was generated by knock-in point mutation strategy (FAK lysine 454 to arginine) in fak exon 21 (Lim et al. 2010). MEFs were expanded and maintained on dishes pre-coated with 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich, #G2500) in DMEM/F12 10% FBS plus P/S and l-glutamine. After expansion and limited passage, primary MEFs were immortalized via retrovirus-mediated expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) followed by puromycin selection, or spontaneously immortalized.

Mouse FAK-WT or FAK-KD pancreatic stellate cells (mPSCs) generation: Primary PSCs were isolated using the method described by Wilson et al. (Apte et al. 1998) on pancreas from FAK-WT/fl or FAK-KD/fl mice that were generated from different crossings done with FAK fl/fl and FAK WT/KD mice generously provided by Dr. Guan (College of Medicine,

Cincinnati, USA). Briefly, the pancreas from FAK-WT/fl and FAK-KD/fl mice was harvested in PBS plus P/S and cut in small pieces in a digestion buffer (0.05% collagenase P, 0.1% DNase, 0.02% pronase in Gey's Balanced Salt Solution) freshly prepared. The small pieces of pancreas were mixed and let 15min at 37°C. This step was repeated one more time. The digested sample was filtrated through 100µm nylon mesh, centrifuged at 1800rpm for 8min and washed with 0.3% BSA in GBSS. After a centrifugation, the pellet was resuspended in 0.3% BSA GBSS and mixed in a 43.75% Nycodenz solution. In a tube, the mix was added slowly and carefully in 0.3% BSA GBSS. After a centrifugation at 2600rpm for 20min (with an off brake), PSCs present at the interface were harvested, centrifuged 8min 1800rpm, resuspended in DMEM/F12 10% FBS plus P/S into 6-well poly-L-lysine plate. Medium was changed after 45min-1h, and primary cells were expanded before been immortalized *via* retrovirus-mediated expression of hTERT and treated *ex-vivo* with a Cre recombinase adenovirus to delete the floxed allele. PSCs FAK-WT and FAK-KD were expanded and maintained on dishes pre-coated with 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich, #G2500) in DMEM/F12 10% FBS plus P/S and l-glutamine.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC): HUVECs were generously provided by Dr Stéphanie Gayral (I2MC, Toulouse, France) or obtained from Promocell (#C-12250). Cells were expanded and maintained on dishes pre-coated with 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich, #G2500) in Endothelial cell growth medium 2 (ECGM2) (Promocell #C-22011B) plus SupplementMix (Promocell #C-39216) containing FCS, EGF, BFGF, IGF, VEGF, ascorbic acid, heparin and hydrocortisone, plus P/S. HUVECs are cultivated until a maximum passage of 10.

Human pericytes from placenta (hPC-PL): hPC-PL were obtained from Promocell (#C-12981) and were expanded and maintained on dishes pre-coated with 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich, #G2500) in Pericyte growth medium 2 (PGM2) (Promocell #C-28041B) plus SupplementMix (Promocell #C-39841), plus P/S. hPC-PL are cultivated until a maximum passage of 15.

Mouse model: pancreatic tumor cells and fibroblasts syngeneic and orthotopic co-grafting:

Mouse pancreatic cancer cells and FAK-WT or FAK-KD fibroblasts (MEFs or PSCs) were trypsinized, washed and suspended in sterile PBS. A 1:3 mix of pancreatic cancer cells

(20×10^3) and FAK-WT or FAK-KD fibroblasts (60×10^3) contained into 20 μ L of PBS were injected in the pancreas of anesthetized (Isoflurane, Isovet from Piramal Health) 8-week-old female C57Bl/6J (Charles River, France). Each group was composed of at least six mice. We echography (AIXPLOTTER, CRCT) the mice 2 times per week to follow tumor progression and we measure the stiffness by elastography (AIXPLOTTER, CRCT). When the limit volume (700mm^3) has been reached, mice were euthanized and primary pancreatic tumor, lung and liver were harvested and paraffin-embedded before being sliced and stained. Mice were kept under specific pathogen-free conditions. Mice were treated with either PBS (100 μ L), gemcitabine (50 mg/kg) or Folfirinox (18,75 mg/kg levofolinate, 50 mg/kg irinotecan, 5 mg/kg oxaliplatin, 15 mg/kg 5-FU) intravenously (100 μ L final volume for gemcitabine, and 113.5 μ L for Folfirinox) twice a week, starting when mean tumor volume was around 30mm^3 and until the sacrifice. All experiments were in accordance with institutional guidelines and European animal protection law and approved by the responsible government agency (agreement number 2019061900061441).

Colorations and Immunostaining:

Colorations and immunostaining were performed as previously described (Zaghdoudi et al. 2020). Primary antibodies are described in Table 1 (Table of antibodies and reagents). Antigen retrieval was performed using Sodium citrate 10 mM, pH 6 or Tris 10mM EDTA 1mM, pH 8.8 depending on the antibody.

Co-staining:

First step of the co-staining (CD31-staining visualized with DAB substrate) was performed as previously described (Zaghdoudi et al. 2020). Slices were then stripped during 1hour at 50°C in a buffer containing 25mM glycine-HCl, 10% SDS, pH 2 (with shaking), then washed with PBS-Tween 0.5% for 10min and with PBS (2x10min). Slices were blocked during 30min and a collagen IV primary antibody was added overnight. After washes, a secondary rabbit phosphatase alkaline-coupled antibody was added and antibody binding was visualized with Fast-Red and counterstained with haematoxylin (2 min). Slides were washed with water, and sections were mounted using glycerol and imaged using Panasonic 250 scanner (Imag'IN core Institut Universitaire Cancer Toulouse, France).

Immunofluorescence staining:

Cell treatment: mPSC, HUVEC or hPC-PL were starved with DMEM/F12 0,5% FBS or ECGM2 0,5% supplementmix or PGM2 0,5% supplementmix respectively overnight. mPSC were pre-treated with TGF β 1 8ng/ml or IL1 β 1ng/ml during one week (medium was changed every 3 days). Then, cells were plated in petri dish with coverslips previously coated with 0.1% gelatin and placed in complete medium (without TGF β 1 or IL1 β) for 72hours and let to produce ECM during 72h before doing immunofluorescence. HUVECs and hPC-PL were plated in petri dish with coverslips previously coated with 0.1% gelatin and treated (after overnight starvation) with conditioned medium from murine PSCs or human CAFs pre-treated or not with FAK inhibitor 1 μ M (PF-271; Selleckchem, #S2890). Those CAFs were previously starved in DMEM/F12 0,5% FBS overnight, then treated with FAK inhibitor during 72h, and conditioned medium (CM) was collected and centrifuged 5min at 1200 rpm. As CM was not well supported by HUVECs, it has been diluted (1:1) in ECGM2 medium (0,5% supplement mix). CM was added on HUVECs or hPC-PL, and immunofluorescence has been done after 72h.

Immunofluorescence staining: Cells were fixed (10 min, 10% formalin), permeabilized (10 min, 0.05% Triton X-100) and incubated with 1% BSA for 1 h. Primary antibodies directed against pY397 FAK, collagen IV, FAK and α SMA were added in 1% BSA overnight at 4°C. Cells were PBS washed and DAPI plus secondary antibodies Goat anti-Rabbit Alexa Fluor-488 or Goat anti-Mouse Alexa Fluor-647 were added for 1h at RT. After PBS washes, slides were mounted in Fluorescent mounting Medium (Dako #S3023) and images acquired using Cell Observer videomicroscope or confocal microscope LSM780 (Zeiss), Zen 2012 blue edition. At least 8 cells per condition were imaged. Quantification was performed using ImageJ. Files were cropped and contrast adjusted using Photoshop (Adobe).

Western blot:

Cells were lysed in lysis buffer (50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 5 mM sodium orthovanadate, 2 mM NaF, 1 mM DTT and a cocktail of protease inhibitors, Roche). Protein extract concentration was measured using BCA Protein Assay (Merck #71285), and equal amounts of proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in 5% milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) for 1h followed by incubation with primary antibodies overnight at 4°C. Membranes were then washed with

TBST three times and incubated with horseradish peroxidase-coupled secondary antibody for 1h at room temperature, washed again and treated with enhanced chemoluminescence prior to detection on ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad).

Table 1 (antibodies and reagents):

Antibody	Usage	Reference	Company	Dilution
anti- α -Smooth Muscle Actin	IHC, IF	Ab7817	Abcam	1/100
anti-cytokeratin 19 (CK19)	IHC	Ab133496	Abcam	1/100
anti-pY397 FAK	WB	700255	Invitrogen	1/500
anti-CD31	IHC	Sc-1506	Santa cruz	1/300
anti-collagen IV	IHC, IF	Ab6586	Abcam	1/100
anti-FAK	WB	05-537	EMD Millipore	1/1000
Anti-nidogen 1	IHC	MA1-06501	ThermoFisher Scientific	1/100
ImmPRESS Mouse secondary antibody	IHC	MP-7402	Vector	
ImmPRESS Rabbit secondary antibody (HRP)	IHC	MP-7401	Vector	
ImmPRESS Rabbit secondary antibody (phosphatase alkaline)	IHC	MP-5401	Vector	
Goat anti-Mouse Alexa Fluor 647	IF	A28181	Invitrogen	1/1000
Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 488	IF	A27034	Invitrogen	1/1000

Reagent	Usage	Reference	Company	Dilution
DAB	IHC	SK-4105	DAKO	
Fast Red	IHC	Ab64254	Abcam	
Glycergel	IHC	C0563	DAKO	
Fluorescent mounting medium	IF	S3023	DAKO	
DAPI	IF	D9545	Sigma-Aldrich	1/1000
Protein Block	IHC	X0909	DAKO	
Antibody Diluent	IHC	S3022	DAKO	
Matrigel	Tube formation	356231	Corning	

Miles Assay:

At the day of sacrifice, mice (previously grafted with tumor cells plus fibroblasts FAK-WT or FAK-KD) were intravenously injected with 200µl of 1% Evan blue dye. After 20min of dye diffusion, mice were anesthetized with isoflurane and euthanized (cervical dislocation) after blood harvesting. Mice were then perfuse with 10ml of PBS with a rate of 2.2ml/min. Primary pancreatic tumor, lung and liver were harvested before been incubated in 500µl of formamide and placed overnight at 65°C under shaking. Optical density (OD) of all organs and plasma were measured by spectrophotometry at 610 nm. The quantity of Evan blue within organs was normalized based on the organ weight and the Evan blueplasma concentration (organ OD divided by organ weight and plasma OD (Brash, Ruhrberg, and Fantin 2018)).

Tube formation assay:

Tube formation assay was performed as described by Wiest et al (DeCicco-Skinner et al. 2014). Briefly, dishes were coated with Matrigel (#356231) (stored at 4°C 2h before the experiment) and kept at 37°C for 1h. mPSC FAK-WT or FAK-KD were plated on the matrix either in DMEM/F12 10% FBS 1% P/S for 72h. Pictures were taken using a Leica DMi1 microscope (4X objective).

Matrisome:

Tumor decellularization and ECM enrichment:

Sequential extractions of frozen samples of tumors were performed using the CNMCS (Cytosol/Nucleus/Membrane/Cytoskeleton) Compartmental Protein Extraction kit (Clinisciences #K3012010) according to manufacturer's instructions. In brief, frozen tumors (100 mg) were homogenized and extracted sequentially to remove cytosolic proteins, nuclear proteins, membrane proteins and cytoskeletal proteins leaving a final insoluble fraction enriched for ECM proteins (Naba et al. 2012).

Peptide preparation for MEF tumors:

Peptide preparation was performed as in (Pearce et al. 2018). ECM was then scrapped into Urea Buffer (250 µl of an 8 M Urea in 20 mM HEPES [pH8]) solution containing Na₃VO₄ (100 mM), NaF (0.5 M), β-Glycerol Phosphate (1 M), Na₂H₂P₂O₇ (0.25 M) and transferred into Eppendorf. Samples were vortexed for 30 s and left on ice prior to sonication at 50% intensity, three times for 15 s on ice. Centrifuge tissue lysate suspension at 20,000 g for

10 min at 5°C, and recover supernatant to a protein LoBind tube. BCA assay for total protein was then performed and 80 µg of protein continued to the next step. Volume of supernatant was adjusted to 200 µl. Prior to trypsin digestion, disulphide bridges were reduced by adding 500 mM dithiothreitol (DTT, in 10 µl) to sample(s), vortexed and then incubated at RT for 1 h with agitation in the dark. Free cysteines were then alkylated by adding 20 µl of a 415 mM iodoacetamide solution to sample and then vortexed and incubated at RT for 1 h with agitation in the dark. The sample was then diluted one in four with 20 mM HEPES. Removal of *N*-glycosylation was then achieved by addition of 1,500 U PNGaseF, vortexed and incubated at 37°C for 2 h. Two microliter of a 0.8 µg/µl LysC sample was then added, gently mixed and then incubated at 37°C for 2 h. Protein digestion was then achieved with the use of immobilized Trypsin beads (40 µl of beads per 250 µg of protein) and incubation at 37°C for 16 h with shaking performed. Peptides were then de-salted using Glygentop tips C-18. Briefly, samples were acidified with trifluoroacetic acid (1% v/v). Samples were then centrifuged at 2,000 g, 5 min at 5°C and transfer supernatant to a 1.5 ml Eppendorf. Glygentops tip was washed with 200 µl of 100% ACN (LC-MS grade), centrifugation (1,500 g for 3 min) performed, flow-through discarded and washed with 99% H₂O (+1% ACN, 0.1% TFA) twice. Protein digest sample were loaded, centrifuged and flow-through discarded. Cartridge was washed with 200 µl of 99% H₂O (+1% ACN, 0.1% TFA). Centrifugation and flow-through discarded were performed. The tip was transferred into a new LoBind Eppendorf and 100 µl of 70/30 ACN/H₂O +0.1% FA added. Centrifugation was performed and flow-through kept. Samples were dried and stored at -20°C. Re-constitute samples in re-con buffer prior to MS analysis. Mass spectrometry analysis and bioinformatics: Dried samples were dissolved in 0.1% TFA (0.5 µg/µl) and analysed by nanoflow ultimate 3000 RSL nano instrument that was coupled on-line to a Q Exactive plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Peptides were separated using analytical column (EASY-Spray; Cat. #ES803) and using solvent A (0.1% FA in LC-MS grade water) and solvent B (0.1% FA in LC-MS grade ACN) as mobile phases. The UPLC settings consisted of a sample loading flow rate of 12 µl/min for 3 min followed by a gradient elution with starting with 3% of solvent B and ramping up to 28% over 120 min followed by a 7 min wash at 80% B and a 10 min equilibration step at 3% B. The flow rate for the sample run was 250 nl/min with an operating back pressure of about 550 bar. Full scan survey spectra (*m/z* 375–1,500) were acquired with a resolution a 70,000 FWHM resolution. A data-dependent analysis (DDA) was employed in which the 15 most abundant multiply charged ions present in the survey spectrum were automatically mass-selected for HCD (higher energy collisional dissociation)

and MS/MS scanning (200–2,000 m/z) with a resolution of 17,500 FWHM. A 30 s dynamic exclusion was enabled with the exclusion list restricted to mass window of 10 ppm. Overall duty cycle generated chromatographic peaks of approximately 30 s at the base, which allowed the construction of extracted ion chromatograms (XICs) with at least 10 data points.

Data processing protocol:

MASCOT search was used to generate a list of proteins. Peptide identification was by searchers against the Swiss-Prot database restricted to human entries using the Mascot search engine (v 2.6.0, Matrix Science, London, UK). The parameters included trypsin as digestion enzyme with up to two missed cleavages permitted, carbamidomethyl (C) as a fixed modification and Pyro-glu (N-term), Oxidation (M) and Phospho (STY) as variable modifications. Datasets were searched with a mass tolerance of ± 5 ppm and a fragment mass tolerance of ± 0.8 Da. A MASCOT score cut-off of 50 was used to filter false-positive detection to a false discovery rate below 1%. PESCAL was used to obtain peak areas in extracted ion chromatograms of each identified peptide and protein abundance determined by the ratio of the sum of peptides areas of a given protein to the sum of all peptide areas. This approach for global protein quantification absolute quantification, described in (Cutillas et al. 2006), is similar to intensity-based protein quantification (iBAQ) (Schwanhäusser et al. 2011) and total protein abundance (TPA) (Wiśniewski et al. 2012). The mass spectrometry proteomic data will be deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository.

Statistical analyses:

Classical statistical analysis was run using the GraphPad Prism software. Data were tested to confirm the Gaussian distribution (Shapiro–Wilk test) and the similarities of variances (F -test or chi-square test). Depending on experiments, data were analyzed using unpaired, two-tailed Student t -test (Gaussian distribution and equal variances) or Mann–Whitney test (non-Gaussian distribution). Multi-group data were analyzed using one-way ANOVA followed with the Tukey's multiple comparison post-test (Gaussian distribution). All values are mean \pm SD. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$ (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Results

FAK inactivation specifically in fibroblasts remodels the PDAC extracellular matrix

We previously reported that fibroblastic FAK activity in human PDAC correlates with accelerated relapse and shorter survival, and we identified that inactivating FAK (using a knock-in point mutation strategy, lysine 454 to arginine) specifically in fibroblasts (using mouse embryonic fibroblasts, MEFs) prevents tumor metastases without changing the primary tumor growth, modifies ECM organization and expression of collagen I and III in the primary tumor and decreases pro-tumoral M2 macrophage infiltration (Zaghdoudi et al. 2020).

In order to better characterize the *in vivo* ECM composition of our tumors (orthotopic co-grafting of tumor cells plus MEFs expressing active (FAK-Wild-Type, FAK-WT) or inactive FAK (FAK-Kinase-Dead, FAK-KD) in immunocompetent mice, Fig 1.A), we performed a matrisome, proteomic technic developed by A. Naba and R Hynes (Naba et al. 2012) consisting in an enrichment of tumoral insoluble proteins and subsequent analysis by mass spectrometry (Fig 1.B). Proteins from the matrisome are divided into two main groups: the core matrisome including collagens, glycoproteins and proteoglycans; and the ECM-associated proteins that includes ECM-affiliated proteins, ECM regulators and secreted factors. Analysis of 6 tumors per group shows that fibroblastic FAK inactivation highly reduced the global ECM amount (ECM division Fig 1.C) through drastic decrease of ECM proteins from the core matrisome. Matrisome-associated proteins were almost absent from the tumors where fibroblastic FAK activity was active (0.2%), and are increased upon inactivation of FAK in the fibroblasts (0.5%) (Fig1.C). Regarding the relative proportion of each categories of the core matrisome, FAK inactivation within fibroblasts induces a significant relative decrease of collagens, almost no modification of the glycoproteins, and a relative increase of proteins belonging to the proteoglycan family (Fig 1.D, E). As shown in Figure 1.F-H, while some collagens, glycoproteins or proteoglycans are increased, others are decreased, revealing a very fine regulation of the secretion of ECM by the CAFs, dependent on FAK activity. The global increase of matrisome-associated proteins induced by fibroblastic FAK inactivation is mainly due to the increase of proteins belonging to the ECM regulators and secreted factors (Fig 1.I; Supplementary Fig 1.A).

Our results show that FAK inactivation in MEFs reduces the global ECM amount, particularly affecting ECM proteins from the core matrisome including collagens, while it increases matrisome-associated proteins.

FAK inactivation in fibroblasts (MEFs) induces an increase of basement membrane proteins around blood vessels

Despite a global decrease of the core matrisome ECM quantity, we identified some proteins upregulated in tumors where FAK was inactivated in fibroblasts (Fig 1 and Fig 2.A). The large majority of those enriched proteins belong to the basement membrane (BM) matrix family (including collagen IV, nidogen and laminins), the most ancient and conserved type of specialized ECM (Fig 2.A). The BM proteins have been shown to be lost in several cancers including PDAC (Barrett et al. 2018) in order to facilitate tumor invasion and metastases (Ghannam et al. 2023; Chang and Chaudhuri 2019; Rakha et al. 2018). We have selected 2 of these proteins to validate their increase through immunohistochemistry: the nidogen, a glycoprotein that plays a crucial role in basement membrane assembly, and in the maintenance of pericyte coverage around blood vessels (Mokkapati et al. 2008) and the collagen IV, a central regulator of blood vessel formation and mandatory protein for blood vessel survival and maturation *in vivo* (Pöschl et al. 2004). Their organization and scaffolding together with other BM proteins (such as laminins) is required for proper capillary morphogenesis and maintenance of vascular homeostasis. As shown in Fig 2.B and C, we confirmed the increase of nidogen I and collagen IV respectively. Interestingly, we identify drastic changes in term of localization of the collagen IV within our two groups of tumors: in tumor where fibroblasts express an active form of FAK, collagen IV staining is high and diffuse in poorly vascularized areas, and almost absent around blood vessels (Fig 2.D). However, in tumor where FAK was inactive in fibroblasts, collagen IV was exclusively found around blood vessels identified by CD31 staining (endothelial cells) on serial sections (Fig 2.D).

Altogether, we show that FAK inactivation in MEFs increases basement membrane proteins including the collagen IV which is relocalized around blood vessels.

Impact of FAK inactivation in pancreatic stellate cells (PSCs) on tumor progression

As pancreatic stellate cells (PSC), pancreas-resident mesenchymal cells, have been recently shown to be at the origin of most of the myCAFs in PDAC tumors (Helms et al. 2022), we decided to evaluate the impact of the inactivation of FAK in those cells. PSCs were isolated from the pancreas of mice expressing FAK-WT/fl or FAK-KD/fl by performing Nicodens gradient. PSCs were then treated with Cre recombinant adenovirus and the decrease of FAK phosphorylated on the tyrosine 397 (reflecting FAK activity) validated by western blot (Fig

3.A). PSCs were then co-grafted with PDAC tumor cells (ratio 3:1) into the pancreas of immunocompetent mice (Fig 3.B). We developed two different but complementary mouse models using two different PDAC cell lines: the R211 cells that have a “differentiated” phenotype (and metastasize to the lung, same cells as the one used in the previous model with MEFs) and the 8305 cells that have a mesenchymal phenotype (and metastasize to the liver, the main site of metastasis in human).

FAK inactivation within PSCs decreases the R211 tumor growth and tumor weight at day 34 (Fig3.C). While the stiffness of the tumor (elastography) shows no significant decrease between the two groups, upon inactivation of FAK in PSCs, the collagen I expression is decreased within primary tumor (Fig 3.D and E), and the collagen IV accumulates around blood vessels (Fig 3.F). When co-grafted with 8305 tumor cells, FAK inactivated fibroblasts slightly (no significant) decrease tumor weight (Fig 3.G) and liver metastasis number (Supplementary Fig 2.A) while tumor stiffness (Fig 3. H) and collagen I expression (Fig 3.I) are not impacted. However, as for the two other models, FAK inactivation in PSC results in a significant increase of collagen IV, with a switch of its localization from diffuse within the tumor to a more accumulated expression in well vascularized areas, around blood vessels (Fig 3.J).

Our results show that FAK inactivation in PSCs induces an important ECM remodeling with decreased expression of the fibrillary collagen I and increased collagen IV expression around blood vessels.

Mechanism of fibroblastic FAK-dependent collagen IV remodeling

FAK inactivation in fibroblasts (MEFs and PSCs) induces a decrease of collagen IV within poorly vascularized areas and an accumulation of this BM protein around blood vessels. The decrease of collagen IV within the tumor was expected as we previously showed that inactivation of FAK in primary CAFs isolated from tumor patients results in a down-regulation of collagen IV expression (Zaghdoudi et al. 2020). Regarding the accumulation of collagen IV around blood vessels, we have several hypotheses. First, we postulate that inactivation of FAK within PSC could favor the “vascular mimicry” process associated with the acquisition of collagen IV production capacity. By performing a tube formation assay, we observed that fibroblasts with an active FAK form networks like blood vessels which was not the case for PSC FAK-KD, showing that FAK inactivated fibroblasts are not able to mimic vasculature (Fig 4.A). Moreover, FAK inactivation does not induce collagen IV production by activated mPSC (by TGF β 1 to induce myCAFs or IL1 β to induce iCAFs) (Fig 4.B) and

therefore does not explain the collagen IV accumulation observed in well vascularized areas. Another hypothesis was that fibroblasts can dialogue with vascular cells, such as endothelial cells or pericytes (Supplementary Fig 3.A), through soluble factors, and stimulate their collagen IV production. Therefore, we treated pericytes or endothelial cells with conditioned medium from CAFs pretreated or not with FAK inhibitor for 72h (FAK inhibitor is inactive after 72h, thus, results obtained are not due to a direct impact of the FAK inhibitor on vascular cells). After 72 h of incubation with CM from CAFs, we evaluated the collagen IV expression by endothelial cells or pericytes (Fig 4.C). While soluble factors from FAK inactivated fibroblasts do not affect collagen IV production by endothelial cells, it induces collagen IV production by pericytes (Fig 4.D). However, we have repeated this experiment using 4 different primary CAFs, and unfortunately, we identified only one CAF that promotes pericyte collagen IV production once inactivated for FAK. We postulated that CAF heterogeneity could be involved in this inconsistency of response. Thus, we treated pericytes with conditioned medium (CM) from FAK-WT or -KD TGF β -induced myCAF β s or IL1 β -induced iCAF β s (Fig 4.C). We show that soluble factors from FAK inactivated myCAF β s, but not iCAF β s, enhances the production of collagen IV by pericytes (Fig 4.E). *This experiment has to be repeated on pericytes and performed on endothelial cells too.*

Altogether, our results (to be confirmed) show that FAK inactivated myCAF β s dialogue with pericytes through soluble factors to make them produce collagen IV.

Impact of fibroblastic FAK inactivation on blood vessel permeability and response to chemotherapy

Vascular basement membrane (BM) highly contributes to the structural and functional homeostasis of vessels mostly through its blood barrier function. In solid cancers, the loss of BM participates to render blood vessels unstable and porous thus favoring tumor escape and limiting drug delivery within the tumor (as the combination between increased interstitial fluid pressure (IFP) within the tumor and permeable vessels leads to an almost total blockade of the drug penetration within the tumor) (Fu et al. 2022). We previously identified that fibroblastic FAK inhibition does not impact blood vessel number within the tumor (Zaghdoudi et al. 2020), but, as we found that inactivation of FAK within fibroblasts promotes collagen IV accumulation around blood vessels, we speculate a better stabilization of blood vessel structure with a decrease of the abnormal leakiness observed in cancer. To assess the impact of fibroblastic FAK inactivation on blood vessel permeability in our

different mouse models (MEFs and PSCs), we performed a Miles assay, an *in vivo* technic that allows to study vascular permeability through the proxy measurement of vascular leakage (Supplementary Fig4.A). Our results show that FAK inactivation within MEFs leads to a significant decrease of the vascular permeability in the primary tumor, as assessed by the decrease of Evan blue dye quantity in the tumor (Fig 5.A). Such results were confirmed using a complementary technic allowing the visualization of the leak of another dye, the Hoechst, through blood vessels stained with CD31-PE (Fig 5.B and Supplementary Fig4.B). Importantly enough, metastatic organ, here the lung, shows a hyperpermeability in the condition where MEFs express an active form of FAK, while this is not the case in the condition where fibroblastic FAK was inactive (Fig 5.A). Such result is in accordance with the fact that at day 38, the inactivation of FAK within fibroblasts almost abrogates spontaneous metastasis (Zaghdoudi et al. 2020).

As FAK inactivation in MEFs induces blood vessel normalization, we wondered if this could facilitate the drug delivery within the tumor and then reduces tumor growth. Therefore, mice were treated, with either gemcitabine (50mg/kg) or FOLFIRINOX (18.75mg/kg Levofolinate, 50mg/kg Irinotecan, 5mg/kg Oxaliplatin, 15mg/kg 5-Fluorouracil) or PSC (control group), through tail vein injection, twice a week until day of sacrifice. The first dose of chemotherapy was administered at day 24 (when mean tumor volume was around 30mm³). Chemotherapies were injected, and the non-treated group received the same volume of PBS. Unexpectedly, we observe no effect of any chemotherapy on tumor growth in both FAK-WT and FAK-KD tumors (Fig 5.C). In our two other models of (PSC+R211 or PSC +8305 co-grafting), the inactivation of FAK within PSC has no impact on vascular permeability of metastatic organs (Fig Sup 4. C) and of the primary tumor at early stage (day 24) (Fig 5. D). Importantly, at late stage, in the two models, vascular leak appears to be decreased slightly (Fig 5. E). We thus evaluated the impact of chemotherapy. In both models, the PSC FAK inactivation alone induces a decrease of tumor growth (significant in the R211 model, and a trend in the 8305) (Fig 5.F-H). Tumor growth reduction is also induced upon drug treatment (either gemcitabine or FOLFIRINOX) but is not amplified in tumors inactivated for fibroblastic FAK. Rather, and importantly enough, fibroblastic FAK inactivation demonstrated a cumulative effect with chemotherapy (Fig 5.F-H).

Altogether, in our models, tumor vasculature normalization does not correlate with enhanced drug effect; however, we identified that FAK inactivation within pancreatic fibroblasts and chemotherapy treatment (either gemcitabine or FOLFIRINOX) can cumulate their anti-tumoral effect.

Discussion

In this study, we report that FAK inactivation in fibroblasts induces extracellular matrix remodeling in PDAC tumors. The ECM is classically divided into 2 main structures: basement membranes which are sheet-like structures that underlie or ensheath polarized cells, and the interstitial matrix within which collagens type I and III are the most abundant collagens and essential for the matrix structure. In cancer, CAFs synthesize, remodel and crosslink ECM to increase ECM stiffness leading to the generation of a dense fibrotic tumor stroma, while basement membranes are lost favoring vessel leakage and tumor dissemination (Piersma, Hayward, and Weaver 2020; Barrett et al. 2018). By performing the matrisome technic developed by Pr. R. Hynes and Dr. A. Naba, we show that fibroblastic FAK inactivation *in vivo* reduces the global ECM quantity, mainly proteins belonging to the interstitial matrix family from the core matrisome including collagens and glycoproteins. Importantly, those matrix proteins are part of the “activated” stromal signature (Moffitt et al. 2015; Puleo et al. 2018) which correlates with worst prognosis for PDAC patients. In parallel, we identified that FAK inactivation promotes the re-expression of matrix proteins belonging to the basement membranes. Therefore, our data, showing that fibroblastic FAK inactivation remodels the ECM from an “activated” like phenotype to a more “normal” like matrix phenotype, strengthens the idea that FAK inhibitors, already into clinical trials for PDAC patients, may have important therapeutic benefits.

In this study, we focused our attention on the main key protein from the basement membrane, the type IV collagen, and identified that FAK inactivation within fibroblasts promotes a switch of its distribution from stroma surrounding tumor cells (in poorly vascularized areas within the tumor core) to an accumulation around blood vessels. In normal healthy pancreas, collagen IV is found accumulated around blood vessels and, in a less extent, around acini (Supplementary Fig5.A). Collagen IV is fundamental for the maintenance of integrity and functions of BM under conditions of increasing mechanical demands such as vessels. The BM scaffold, integrating collagen IV and other components such as laminins, nidogen or perlecan, into highly organized supramolecular architecture, is crucial for the integrity, stability and functionality of vessels and organs (Pöschl et al. 2004). In human PDAC samples, collagen IV is found to be widely distributed in the stroma surrounding the cancer cells but absent from BM-like structures (Franklin et al. 2015). The accumulation of collagen IV within the PDAC

tumors is of bad prognosis as Kaplan-Meier curves for collagen IV expression showed median survival of 16.9 months in low collagen IV patients, and 6.4 months in high level patients (log rank, $P < 0.05$) (Whatcott et al. 2015). Preclinical mouse models allowed to identify that collagen IV accumulation within tumor core is associated with a more undifferentiated and thus aggressive PDAC tumor (Wegner et al. 2016), and this could be due to a direct effect of this matrix on tumor cell functions as it stimulates their proliferation, migration, and inhibits apoptosis (Öhlund et al. 2013). Here, we not only show that collagen IV is drastically decreased from its aberrant localization (within the tumor core, in poorly vascularized areas) when FAK is inactivated in fibroblasts, but also regains its original and normal localization, around blood vessels. Thus, we show that fibroblastic FAK inactivation normalizes collagen IV expression and localization. *We propose to perform co-staining of collagen IV and CD31 in order to get precise quantification of the quantity of collagen IV around blood vessels.*

Mechanisms underlying the decrease of collagen IV within the tumor core are very likely due to a direct effect of FAK inhibition on CAFs, as we previously reported that pharmacological FAK inhibition leads to a decrease of collagen IV expression by human primary CAFs isolated from PDAC tumors (Zaghdoudi et al. 2020). Regarding the process involved in the increased expression of collagen IV around blood vessels in tumors in which FAK is inactivated specifically in fibroblasts, the direct implication of FAK inactivated fibroblasts in this phenomenon is very unlikely as we show that they are unable to perform vascular mimicry. However, as it was described that CAFs can dialogue with vascular cells, either endothelial cells or pericyte, through the secretion of soluble factors, to induce angiogenesis for example (Wang et al. 2019), we hypothesize and tested the potential implication of such a dialogue resulting in the production of collagen IV by vascular cells. We identified that, in response to some stimuli coming from FAK-inactivated fibroblasts, the pericytes (but not endothelial cells) produces high amount of collagen IV. Further investigations using PSCs activated into myCAF (upon TGF β treatment), or into iCAF (upon IL1 β treatment), allowed us to conclude that only myCAF inactivated for FAK secrete soluble factors promoting collagen IV production by pericytes. *This experiment has to be repeated on pericytes and performed on endothelial cells too. If we confirm that the collagen IV accumulation around blood vessels is a result of a dialogue between CAFs and pericytes through soluble factors, we will look for the CAF-secreted factor involved.* While we believe that we have identified the major pathway involved, we cannot rule out other hypothesis such as the involvement of the CAF-derived ECM, that we identified to be modified upon FAK inactivation (Zaghdoudi

et al. 2020). Indeed, the dialogue between CAFs and vascular cells can also be settled down through the production and remodeling of ECM, as for example, tenascin-C produced by CAFs can promote survival and proliferation of endothelial cells (Rupp et al. 2016). We postulate that fibroblastic FAK-induced ECM-derived CAF modification could activate signaling pathway within vascular cells, probably through the integrin engagement, resulting in collagen IV production by either endothelial cells or pericytes. *In order to evaluate such hypothesis, vascular cells will be cultivated on top of a decellularized matrix produced by CAFs treated or not with FAK inhibitor. 72h after, collagen IV production by endothelial cells or pericytes will be analyzed by immunofluorescence.*

Finally, we can also imagine that other cells are involved, such as for example macrophages (TAMs). Indeed, TAMs are designated as M1-like differentiated macrophages with antitumor properties, or as M2-like macrophages with tumor-supporting functions, depending on the cell polarization achieved by signaling molecules in the microenvironment (Cassetta and Kitamura 2018; De Palma and Lewis 2013; Noy and Pollard 2014). M2-like macrophages are responsible for producing angiogenic factors (Kim and Bae 2016) and can make the endothelium more susceptible for tumor cell invasion by producing proteases, such as matrix metalloproteinases (MMP), that can breakdown the BM around the endothelium (Noy and Pollard 2014; Lewis, Harney, and Pollard 2016). Reversing the polarization of tumor-associated macrophages inhibits tumor metastasis through a downregulation of the expression of VEGF-A and MMP9 within tumors (Yuan et al. 2017). The potential implication of macrophages in the vessels modification and re-expression of collagen IV around them in our context is very likely as we previously reported a positive correlation between fibroblastic FAK activity and the number of M2 macrophages within human PDAC samples. Moreover, we showed that inactivation of FAK within fibroblasts negatively impacts M2 macrophage polarization and migration resulting in a decrease of M2 macrophage infiltration within PDAC tumor (Zaghdoudi et al. 2020). Therefore, the “normalization” of M2/M1 macrophage ratio in our mouse model where FAK is inactive in fibroblasts can be part of the processes resulting in vessel “normalization”.

In solid cancers, blood vessel network is disorganized and leaky resulting in blood flow disturbances, inflammatory cell infiltration, tumor cell extravasation and limited conventional drug therapy delivery within the tumor. Indeed, the structurally aberrant and hyperpermeable vessels cannot ensure correct blood perfusion and the difference of pressure between leaky vessels and surrounding tissues constitutes an important physical barrier. In order to restore a

more effective drug delivery, excessive angiogenesis need to be alleviated and tumor vasculature normalized which includes decreased vascular leakage associated with a better pericyte coverage and a denser and steadier BM around (Jain 2005). As we show that fibroblastic FAK inactivation enhances the expression of various BM proteins within the tumors and induces an accumulation of collagen IV around blood vessels, we wondered about the potential normalization of the vessels. Our results clearly established that, vascular leakages in primary tumor and on organ of metastasis are drastically reduced when FAK was inactivated in MEFs. Thus, we wondered if this blood vessel normalization could enhance the drug delivery within the tumor. Unfortunately, chemotherapy treatment (Gemcitabine or FOLFIRINOX), through tail vein injection, has no impact on tumor growth, neither on tumors where fibroblasts express an active FAK nor in the one with FAK inactivated fibroblasts. One can speculate that the only reason of such negative result is due to an intrinsic chemoresistance of the tumor cells, however, this is not the case, as shown in our second model where the same tumor cells are co-grafted with PSC. Thus, we conclude that vascular normalization induced by FAK inactivation within fibroblasts is not sufficient to improve the drug delivery within the tumor, in that model.

In parallel, we performed the Miles assay on the PSC models and observe a slight reduction of the tumor permeability at late stage, but not early stage, in tumors in which PSCs express an inactive form of FAK. We went further and evaluated the drug response in combination with the inactivation of fibroblastic FAK. First of all, as opposed to the MEF model, FAK inactivation in PSCs drastically reduced tumor growth (in absence of drug treatment). This result clearly shows that PSC-derived CAFs, even if they represent only 10% of total CAFs within PDAC tumor (Helms et al. 2022), are stromal cells with pro-tumoral features highly dependent on FAK activity. Chemotherapy treatment reduces tumor growth of both fibroblastic FAK activated and inactivated tumors, with a fold change comparable in the two groups. The combination between fibroblastic FAK inactivation and chemotherapy treatment show a cumulative effect rather than the synergistic effect expected due to vasculature normalization.

Based on literature, we hypothesize that increased interstitial fluid pressure (IFP) could be responsible. Indeed, drug delivery is not only dependent on vessel permeability, but also on physical barrier generated by the pressure difference between leaky vessels and surrounding tissues, namely IFP, which is highly increased in cancer (Ferretti et al. 2009). As the main actor of the IFP accumulation is the hyaluronic acid (HA), a large linear negatively charged proteoglycan that imbibes and retains water (P P Provenzano and Hingorani 2013), *we*

propose to analyze its expression in our tumor models. Our hypothesis is that HA is highly accumulated in our tumors (independently to the fibroblastic FAK activity status) and that its degradation (using hyaluronidase form example) would decrease tumoral IFP and thus, in combination with FAK inactivation within fibroblasts, would restore a normalized vasculature that would enhance drug delivery.

Finally, we also noticed discrepancies of tumor growth, tumor stiffness, collagen production and response to chemotherapies between our two models of tumor cells: the effects of FAK inhibition within PSCs are more pronounced with R211 cells than 8305 cells. Such differences could be due to their genetic mutations (R211 are PDAC tumor cells from KPC model (LSL-K-Ras^{G12D/+};LSL-p53^{R172H/+};Pdx1-Cre) while 8305 are from KC model (LSL-K-Ras^{G12D/+};Pdx1-Cre)) and/or to their “differentiation” status. Indeed, while R211 grow in culture as very epithelial cells, the 8305 have a much more mesenchymal phenotype. Thus, one can speculate that tumor cells with an epithelial phenotype will highly depend on the support of CAFs to grow and metastases, while the mesenchymal tumor cells have intrinsic features and relies much less on the stroma cell compartment.

Altogether, our study sheds light on the role of FAK in fibroblasts in shaping the tumor microenvironment and influencing tumor response to chemotherapy. The observed ECM remodeling, particularly the collagen IV-enriched basement membrane around blood vessels, holds promise for optimizing drug delivery and therapeutic impact in PDAC.

Acknowledgements:

We thank Laetitia Ligat (CRCT) and Simon Lachambre (Infinity) for their help and expertise in microscopy and IHC quantification; Loic Van Den Berghe for his help in lentivirus production and expertise in vectorology; Christelle Segura for organ inclusion and slices; and Nicole Therville for her help in elastography measurement. We thank also the Non-Invasive Exploration service (UMS006/CREFRE, Anexplo Platform, Toulouse) for giving us access to the Aixplorer

References:

- Apte, M. V., P. S. Haber, T. L. Applegate, I. D. Norton, G. W. McCaughan, M. A. Korsten, R. C. Pirola, and J. S. Wilson. 1998. "Periacinar Stellate Shaped Cells in Rat Pancreas: Identification, Isolation, and Culture." *Gut* 43 (1): 128–33. <https://doi.org/10.1136/gut.43.1.128>.
- Bachem, M. G., E. Schneider, H. Gross, H. Weidenbach, R. M. Schmid, A. Menke, M. Siech, H. Beger, A. Grünert, and G. Adler. 1998. "Identification, Culture, and Characterization of Pancreatic Stellate Cells in Rats and Humans." *Gastroenterology* 115 (2): 421–32. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70209-4](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70209-4).
- Baluk, Peter, Hiroya Hashizume, and Donald M. McDonald. 2005. "Cellular Abnormalities of Blood Vessels as Targets in Cancer." *Current Opinion in Genetics & Development* 15 (1): 102–11. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.12.005>.
- Barrett, Alexander S., Ori Maller, Michael W. Pickup, Valerie M. Weaver, and Kirk C. Hansen. 2018. "Compartment Resolved Proteomics Reveals a Dynamic Matrisome in a Biomechanically Driven Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Journal of Immunology and Regenerative Medicine* 1 (March): 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.regen.2018.03.002>.
- Belhabib, Ismahane, Sonia Zaghdoudi, Claire Lac, Corinne Bousquet, and Christine Jean. 2021. "Extracellular Matrices and Cancer-Associated Fibroblasts: Targets for Cancer Diagnosis and Therapy?" *Cancers* 13 (14): 3466. <https://doi.org/10.3390/cancers13143466>.
- Brash, James T., Christiana Ruhrberg, and Alessandro Fantin. 2018. "Evaluating Vascular Hyperpermeability-Inducing Agents in the Skin with the Miles Assay." *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 136 (June): 57524. <https://doi.org/10.3791/57524>.
- Cassetta, Luca, and Takanori Kitamura. 2018. "Macrophage Targeting: Opening New Possibilities for Cancer Immunotherapy." *Immunology* 155 (3): 285–93. <https://doi.org/10.1111/imm.12976>.
- Chang, Julie, and Ovijit Chaudhuri. 2019. "Beyond Proteases: Basement Membrane Mechanics and Cancer Invasion." *The Journal of Cell Biology* 218 (8): 2456–69. <https://doi.org/10.1083/jcb.201903066>.
- Cutillas, Pedro R., Asim Khwaja, Mariona Graupera, Wayne Pearce, Severine Gharbi, Mike Waterfield, and Bart Vanhaesebroeck. 2006. "Ultrasensitive and Absolute Quantification of the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway by Mass Spectrometry." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (24): 8959–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602101103>.
- De Palma, Michele, and Claire E. Lewis. 2013. "Macrophage Regulation of Tumor Responses to Anticancer Therapies." *Cancer Cell* 23 (3): 277–86. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.013>.
- DeCicco-Skinner, Katie L., Gervaise H. Henry, Christophe Cataisson, Tracy Tabib, J. Curtis Gwilliam, Nicholas J. Watson, Erica M. Bullwinkle, et al. 2014. "Endothelial Cell Tube Formation Assay

- for the In Vitro Study of Angiogenesis." *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 91 (September): 51312. <https://doi.org/10.3791/51312>.
- Dewhirst, Mark W., and Timothy W. Secomb. 2017. "Transport of Drugs from Blood Vessels to Tumour Tissue." *Nature Reviews. Cancer* 17 (12): 738–50. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.93>.
- Ferretti, Stephane, Peter R Allegrini, Mike M Becquet, and Paul MJ McSheehy. 2009. "Tumor Interstitial Fluid Pressure as an Early-Response Marker for Anticancer Therapeutics." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 11 (9): 874–81.
- Franklin, Oskar, Daniel Öhlund, Christina Lundin, Mikael Öman, Peter Naredi, Wanzhong Wang, and Malin Sund. 2015. "Combining Conventional and Stroma-Derived Tumour Markers in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers* 15 (1): 1–10. <https://doi.org/10.3233/CBM-140430>.
- Fu, Yihan, Fei Ye, Xuwu Zhang, Yuchu He, Xiaoyu Li, Yongfu Tang, Jing Wang, and Dawei Gao. 2022. "Decrease in Tumor Interstitial Pressure for Enhanced Drug Intratumoral Delivery and Synergistic Tumor Therapy." *ACS Nano* 16 (11): 18376–89. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c06356>.
- Ghannam, Suzan F., Catrin Sian Rutland, Cinzia Allegrucci, Nigel P. Mongan, and Emad Rakha. 2023. "Defining Invasion in Breast Cancer: The Role of Basement Membrane." *Journal of Clinical Pathology* 76 (1): 11–18. <https://doi.org/10.1136/jcp-2022-208584>.
- Helms, Erin J., Mark W. Berry, R. Crystal Chaw, Christopher C. DuFort, Duanchen Sun, M. Kathrina Onate, Chet Oon, et al. 2022. "Mesenchymal Lineage Heterogeneity Underlies Nonredundant Functions of Pancreatic Cancer-Associated Fibroblasts." *Cancer Discovery* 12 (2): 484–501. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0601>.
- Hingorani, Sunil R., Emanuel F. Petricoin, Anirban Maitra, Vinodh Rajapakse, Catrina King, Michael A. Jacobetz, Sally Ross, et al. 2003. "Preinvasive and Invasive Ductal Pancreatic Cancer and Its Early Detection in the Mouse." *Cancer Cell* 4 (6): 437–50. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00309-x](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00309-x).
- Hingorani, Sunil R., Lifu Wang, Asha S. Multani, Chelsea Combs, Therese B. Deramaudt, Ralph H. Hruban, Anil K. Rustgi, Sandy Chang, and David A. Tuveson. 2005. "Trp53R172H and KrasG12D Cooperate to Promote Chromosomal Instability and Widely Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice." *Cancer Cell* 7 (5): 469–83. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.023>.
- Hwang, Rosa F., Todd Moore, Thiruvengadam Arumugam, Vijaya Ramachandran, Keith D. Amos, Armando Rivera, Baoan Ji, Douglas B. Evans, and Craig D. Logsdon. 2008. "Cancer-Associated Stromal Fibroblasts Promote Pancreatic Tumor Progression." *Cancer Research* 68 (3): 918–26. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5714>.
- Jacobetz, Michael A., Derek S. Chan, Albrecht Neesse, Tashinga E. Bapiro, Natalie Cook, Kristopher K. Frese, Christine Feig, et al. 2013. "Hyaluronan Impairs Vascular Function and Drug Delivery in a Mouse Model of Pancreatic Cancer." *Gut* 62 (1): 112–20. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302529>.
- Jain, Rakesh K. 2005. "Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy." *Science (New York, N.Y.)* 307 (5706): 58–62. <https://doi.org/10.1126/science.1104819>.
- Kim, Jaehong, and Jong-Sup Bae. 2016. "Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment." *Mediators of Inflammation* 2016: 6058147. <https://doi.org/10.1155/2016/6058147>.
- Lewis, Claire E., Allison S. Harney, and Jeffrey W. Pollard. 2016. "The Multifaceted Role of Perivascular Macrophages in Tumors." *Cancer Cell* 30 (1): 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.017>.
- Lim, Ssang-Taek, Xiao Lei Chen, Alok Tomar, Nichol L. G. Miller, Jiyeon Yoo, and David D. Schlaepfer. 2010. "Knock-in Mutation Reveals an Essential Role for Focal Adhesion Kinase Activity in

- Blood Vessel Morphogenesis and Cell Motility-Polarity but Not Cell Proliferation." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (28): 21526–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.129999>.
- Moffitt, Richard A., Raoud Marayati, Elizabeth L. Flate, Keith E. Volmar, S. Gabriela Herrera Loeza, Katherine A. Hoadley, Naim U. Rashid, et al. 2015. "Virtual Microdissection Identifies Distinct Tumor- and Stroma-Specific Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Nature Genetics* 47 (10): 1168–78. <https://doi.org/10.1038/ng.3398>.
- Mokkapati, Sharada, Anke Baranowsky, Nicolae Mirancea, Neil Smyth, Dirk Breitkreutz, and Roswitha Nischt. 2008. "Basement Membranes in Skin Are Differently Affected by Lack of Nidogen 1 and 2." *The Journal of Investigative Dermatology* 128 (9): 2259–67. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.65>.
- Naba, Alexandra, Karl R. Clauser, Sebastian Hoersch, Hui Liu, Steven A. Carr, and Richard O. Hynes. 2012. "The Matrisome: In Silico Definition and In Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices." *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 11 (4): M111.014647. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014647>.
- Nagy, Janice A., Sung-Hee Chang, Shou-Ching Shih, Ann M. Dvorak, and Harold F. Dvorak. 2010. "Heterogeneity of the Tumor Vasculature." *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 36 (3): 321–31. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1253454>.
- Nia, Hadi T., Lance L. Munn, and Rakesh K. Jain. 2020. "Physical Traits of Cancer." *Science (New York, N.Y.)* 370 (6516): eaaz0868. <https://doi.org/10.1126/science.aaz0868>.
- Noy, Roy, and Jeffrey W. Pollard. 2014. "Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy." *Immunity* 41 (1): 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>.
- Öhlund, Daniel, Oskar Franklin, Erik Lundberg, Christina Lundin, and Malin Sund. 2013. "Type IV Collagen Stimulates Pancreatic Cancer Cell Proliferation, Migration, and Inhibits Apoptosis through an Autocrine Loop." *BMC Cancer* 13 (1): 154. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-154>.
- Öhlund, Daniel, Abram Handly-Santana, Giulia Biffi, Ela Elyada, Ana S. Almeida, Mariano Ponz-Sarvisé, Vincenzo Corbo, et al. 2017. "Distinct Populations of Inflammatory Fibroblasts and Myofibroblasts in Pancreatic Cancer." *The Journal of Experimental Medicine* 214 (3): 579–96. <https://doi.org/10.1084/jem.20162024>.
- Pearce, Oliver M. T., Robin M. Delaine-Smith, Eleni Maniati, Sam Nichols, Jun Wang, Steffen Böhm, Vinothini Rajeeve, et al. 2018. "Deconstruction of a Metastatic Tumor Microenvironment Reveals a Common Matrix Response in Human Cancers." *Cancer Discovery* 8 (3): 304–19. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0284>.
- Piersma, Bram, Mary-Kate Hayward, and Valerie M. Weaver. 2020. "Fibrosis and Cancer: A Strained Relationship." *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer* 1873 (2): 188356. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188356>.
- Pöschl, Ernst, Ursula Schlötzer-Schrehardt, Bent Brachvogel, Kenji Saito, Yoshifumi Ninomiya, and Ulrike Mayer. 2004. "Collagen IV Is Essential for Basement Membrane Stability but Dispensable for Initiation of Its Assembly during Early Development." *Development (Cambridge, England)* 131 (7): 1619–28. <https://doi.org/10.1242/dev.01037>.
- Provenzano, P P, and S R Hingorani. 2013. "Hyaluronan, Fluid Pressure, and Stromal Resistance in Pancreas Cancer." *British Journal of Cancer* 108 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.569>.
- Provenzano, Paolo P., Carlos Cuevas, Amy E. Chang, Vikas K. Goel, Daniel D. Von Hoff, and Sunil R. Hingorani. 2012. "Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Cell* 21 (3): 418–29. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.007>.
- Puleo, Francesco, Rémy Nicolle, Yuna Blum, Jérôme Cros, Laetitia Marisa, Pieter Demetter, Eric Quertinmont, et al. 2018. "Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features." *Gastroenterology* 155 (6): 1999–2013.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.033>.

- Rakha, Emad A, Islam M Miligy, Kylie L Gorringer, Michael S Toss, Andrew R Green, Stephen B Fox, Fernando C Schmitt, et al. 2018. "Invasion in Breast Lesions: The Role of the Epithelial–Stroma Barrier." *Histopathology* 72 (7): 1075–83. <https://doi.org/10.1111/his.13446>.
- Rupp, Tristan, Benoit Langlois, Maria M. Koczorowska, Agata Radwanska, Zhen Sun, Thomas Hussenet, Olivier Lefebvre, et al. 2016. "Tenascin-C Orchestrates Glioblastoma Angiogenesis by Modulation of Pro- and Anti-Angiogenic Signaling." *Cell Reports* 17 (10): 2607–19. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.012>.
- Schwanhäusser, Björn, Dorothea Busse, Na Li, Gunnar Dittmar, Johannes Schuchhardt, Jana Wolf, Wei Chen, and Matthias Selbach. 2011. "Global Quantification of Mammalian Gene Expression Control." *Nature* 473 (7347): 337–42. <https://doi.org/10.1038/nature10098>.
- Torphy, Robert J., Yuki Fujiwara, and Richard D. Schulick. 2020. "Pancreatic Cancer Treatment: Better, but a Long Way to Go." *Surgery Today* 50 (10): 1117–25. <https://doi.org/10.1007/s00595-020-02028-0>.
- Wang, Fang-Tao, Wei Sun, Jing-Tao Zhang, and Yue-Zu Fan. 2019. "Cancer-Associated Fibroblast Regulation of Tumor Neo-Angiogenesis as a Therapeutic Target in Cancer." *Oncology Letters* 17 (3): 3055–65. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9973>.
- Wegner, Catherine S., Jon-Vidar Gaustad, Lise Mari K. Andersen, Trude G. Simonsen, and Einar K. Rofstad. 2016. "Diffusion-Weighted and Dynamic Contrast-Enhanced MRI of Pancreatic Adenocarcinoma Xenografts: Associations with Tumor Differentiation and Collagen Content." *Journal of Translational Medicine* 14 (1): 161. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0920-y>.
- Whitcott, Clifford J., Caroline H. Diep, Ping Jiang, Aprill Watanabe, Janine LoBello, Chao Sima, Galen Hostetter, H. Michael Shepard, Daniel D. Von Hoff, and Haiyong Han. 2015. "Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21 (15): 3561–68. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1051>.
- Wiśniewski, Jacek R., Paweł Ostasiewicz, Kamila Duś, Dorota F. Zielińska, Florian Gnad, and Matthias Mann. 2012. "Extensive Quantitative Remodeling of the Proteome between Normal Colon Tissue and Adenocarcinoma." *Molecular Systems Biology* 8: 611. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.44>.
- Yamasaki, Akio, Kosuke Yanai, and Hideya Onishi. 2020. "Hypoxia and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Letters* 484 (August): 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.04.018>.
- Yuan, Rufe, Shengfu Li, Hua Geng, Xin Wang, Qinglin Guan, Xiaohuan Li, Changle Ren, and Xiaolin Yuan. 2017. "Reversing the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Inhibits Tumor Metastasis." *International Immunopharmacology* 49 (August): 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.05.014>.
- Zaghdoudi, Sonia, Emilie Decaup, Ismahane Belhabib, Rémi Samain, Stéphanie Cassant-Sourdy, Julia Rochotte, Alexia Brunel, et al. 2020. "FAK Activity in Cancer-associated Fibroblasts Is a Prognostic Marker and a Druggable Key Metastatic Player in Pancreatic Cancer." *EMBO Molecular Medicine* 12 (11): e12010. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012010>.

Figure legends

Figure 1: *Fibroblastic FAK inactivation remodels the extracellular matrix in the tumor.*

(A) Schematic representation of PDAC tumor cell (R211) plus FAK-WT or -KD MEF co-grafting in the pancreas of C57BL/6 mice and pictures of tumors at day of sacrifice, day 38 (no difference on tumor weight as previously published in Zaghdoudi et al. 2020). (B) Schematic representation of the Matrisome technic (($N = 6$ biological replicates (6 FAK-WT, 6 FAK-KD tumors)). Tumors were decellularized and ECM enriched, and after digestion mass spectrometry was done. (C-I) Characterization of the ECM-enriched fraction (matrisome analyses) from MEF model tumors by LC-MS/MS proteomics. (C) Normalized peptide abundancy for matrisome proteins including the total ECM, the core matrisome and the matrisome-associated proteins. (D) Normalized peptide abundancy for the core matrisome including collagens, glycoproteins and proteoglycans. (E-F) Pie charts display the relative proportion of main ECM categories (E) or of most abundant individual ECM proteins (F). (G-H) Heatmap of the main regulated proteins from collagen (G) or of glycoprotein and proteoglycan (H) families. (I) Normalized peptide abundancy for the matrisome-associated proteins including ECM regulators, ECM-affiliated proteins and secreted factors. Values are means \pm SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ values were calculated using Mann–Whitney test.

Figure 2: *Fibroblastic FAK inactivation induces an increase of BM proteins around blood vessels.*

(A) Plot of ECM proteins showing upregulated and downregulated proteins in tumors from MEF FAK-KD model compared to MEF FAK-WT. X axis represents the protein expression variation in FAK-KD compared to FAK-WT (\log_2 fold change), and Y axis represents the protein expression in basal condition (FAK-WT) (\log_{10}). Proteins in red correspond to basement membrane protein family. (B) Representative images and quantification of Nidogen I immunohistochemistry in tumors from MEF model. Scale bar, 200 μm . (C) Quantification of collagen IV observed by immunohistochemistry in tumors from MEF model. (D) Representative images of CD31 and collagen IV immunohistochemistry in tumors from MEF model, in poorly or well vascularized areas. Scale bar, 100 μm . Values are means \pm SD, * $p < 0.05$ values were calculated using unpaired two-tailed Student's t-test.

Figure 3: *Impact of FAK inactivation in PSCs on tumor progression and ECM remodeling.*

(A) Schematic representation of the generation of FAK-KD and FAK-KD PSCs: PSCs were collected through Nicodens gradient, immortalized with hTERT and treated with an adenovirus containing a Cre recombinase to delete FAK fl. Western blot of FAK phosphorylated on Y397 was performed to validate FAK inactivation in PSC FAK-KD. (B) Schematic representation of PDAC tumor cell (R211) plus FAK-WT or -KD PSC co-grafting in the pancreas of C57BL/6 mice. (C) Tumor weight at D35 of murine model grafted with PSC plus R211 tumor cells (7 mice FAK-WT, 7 mice FAK-KD). (D) Elastography of PSC+R211 tumors (7 mice FAK-WT, 7 mice FAK-KD). (E) Representative pictures of Sirius Red staining visualized by polarized light on PSC+R211 tumors, and quantification of collagen I fluorescence intensity (by measuring thick fibers). Scale bar, 1 mm. (F) Representative pictures of collagen IV immunohistochemistry in PSC+R211 tumors in poorly or well vascularized areas. Scale bar, 100 μm . (G) Tumor weight at D44 of murine model grafted with PSC plus 8305 tumor cells (8 mice FAK-WT, 8 mice FAK-KD). (H) Elastography of tumors (PSC+8305). (I) Representative images of Sirius Red staining

visualized by polarized light on PSC+8305 tumors and quantification of collagen I fluorescence intensity. Scale bar, 1mm. (J) Quantification of collagen IV observed by immunohistochemistry in PSC+8305 tumors and representative pictures of the staining in poorly or well vascularized areas. Scale bar, 100 μ m.

Values are means \pm SD, * $p < 0.05$ values were calculated using unpaired two-tailed Student's t-test.

Figure 4: Mechanisms of fibroblastic FAK-dependent collagen IV remodeling.

(A) Tube formation assay: mPSC FAK-WT or -KD were plated on matrigel during 72h and observed with Leica DM10 microscope. Scale bar, 250 μ m. (B) Immunofluorescence images (20X objective) and quantification (mean fluorescence intensity) of collagen IV (Alexa-488; green) and α SMA (Alexa-647; red) in mPSC FAK-WT or -KD treated or not with TGF β 1 or IL1 β during one week (n=3), Scale bar, 50 μ m. (C) Schematic representation of the experiment: Conditioned medium (CM) from mPSC FAK-WT or -KD (pre-activated with TGF β 1 or IL1 β during one week) or human CAFs pre-treated or not with FAK inhibitor (PF271 1 μ M during 72h) was added on top of pericytes (hPC-PL) or endothelial cells (HUVECs) during 72h before collagen IV immunofluorescence staining was performed. (D) Representative pictures of collagen IV (Alexa-488; green) immunofluorescence in HUVEC or hPC-PL treated with CM from hCAF +/– FAK inhibitor after 72h. Scale bar, 50 μ m. (E) Representative pictures and quantification (mean fluorescence intensity divided by cell number) of collagen IV (Alexa-488; green) expression in hPC-PL treated during 72h with CM from mPSC FAK-WT or -KD (pre-activated or not with TGF β 1 or IL1 β during one week) (n=2).

Values are means \pm SD, p values were calculated using one-way ANOVA multiple comparison.

Figure 5: Impact of fibroblastic FAK inactivation on blood vessel permeability and response to chemotherapy.

(A) Representative pictures and quantification (ratio of OD (610nm) organ / organ weight / OD plasma) of Evan Blue leakage in pancreas, lung and liver from MEF model. (B) Representative images of Hoechst vascular leakage. CD31-PE (endothelial cells) and Hoechst staining were analyzed using LSM780 confocal microscope (z-stacks). Scale bar, 50 μ m. (C) Tumor weight at day of sacrifice (D39) of MEF model treated by intravenous injection of either PBS, gemcitabine (Gem) (50 mg/kg) or Folfirinox (FX) (18,75 mg/kg levofolinate, 50 mg/kg irinotecan, 5 mg/kg oxaliplatin, 15 mg/kg 5-FU) at D24, D28, D31, D35 and D37. (D) Quantification (ratio of OD (610nm) organ / organ weight / OD plasma) of Evan blue leakage in the primary tumor of PSC models (with either R211 or 8305 tumor cells) at early day (D24) or (E) day of sacrifice (D35 for R211 and D42 for 8305 cells). (F) Tumor progression of PSC+R211 model treated with either PBS, gemcitabine (50 mg/kg) or Folfirinox (18,75 mg/kg levofolinate, 50 mg/kg irinotecan, 5 mg/kg oxaliplatin, 15 mg/kg 5-FU) at D20, D24, D27 and D31. (G) Tumor progression of PSC+8305 model treated with either PBS, gemcitabine (50 mg/kg) or Folfirinox (18,75 mg/kg levofolinate, 50 mg/kg irinotecan, 5 mg/kg oxaliplatin, 15 mg/kg 5-FU) at D21, D25, D29, D32, D35 and D39. (H) Tumor weight at day of sacrifice (D33) of PSC+R211 model treated with either PBS, gemcitabine (Gem) or Folfirinox (FX). (I) Tumor weight at day of sacrifice (D39) of PSC+8305 model treated with either PBS, gemcitabine (Gem) or Folfirinox (FX).

Values are means \pm SD, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ values were calculated using one-way ANOVA multiple comparison.

Supplementary Figure 1

Heatmap of matrisome-associated protein expression in the 6 MEF FAK-WT+R211 and 6 MEF-FAK-KD+R211 tumors identified by LC-MS/MS.

Supplementary Figure 2

(A) Representative pictures and quantification of lung metastases identified through CK19 immunohistochemistry staining in PSC+8305 mouse model. Scale bar, 1000 μ m.

Values are means \pm SD, p values were calculated using unpaired two-tailed Student's t-test.

Supplementary Figure 3

Schematic of a blood vessel composed of endothelial cells surrounded by a basement membrane on which pericytes are stabilized.

Supplementary Figure 4

(A) Schematic representation of the Milles assay: Mice were grafted with MEFs plus R211 tumor cells; At day 38, Evan Blue was tail vein injected and let to diffuse for 20min; after sacrifice, mice were perfused with PBS, organs were collected and incubated ON in formamide; then OD was measured. (B) Schematic representation of the Hoechst diffusion experiment: Mice were grafted with MEF plus R211 tumor cells; At day 38, CD31-PE was tail vein injected and let to diffuse during 9min; then Hoechst was injected and after 1min, mice were euthanized, and organs embedded in OCT. (C-D) Quantification (ratio of OD (610nm) organ / organ weight / OD plasma) of Evan Blue leakage in lung and liver from PSC+R211 (C) or PSC+8305 (D) models.

Values are means \pm SD, p values were calculated using unpaired two-tailed Student's t-test.

Supplementary Figure 5

(A) Representative picture of collagen IV IHC staining on mouse healthy pancreas. Scale bar, 200 μ m.

Figure 1

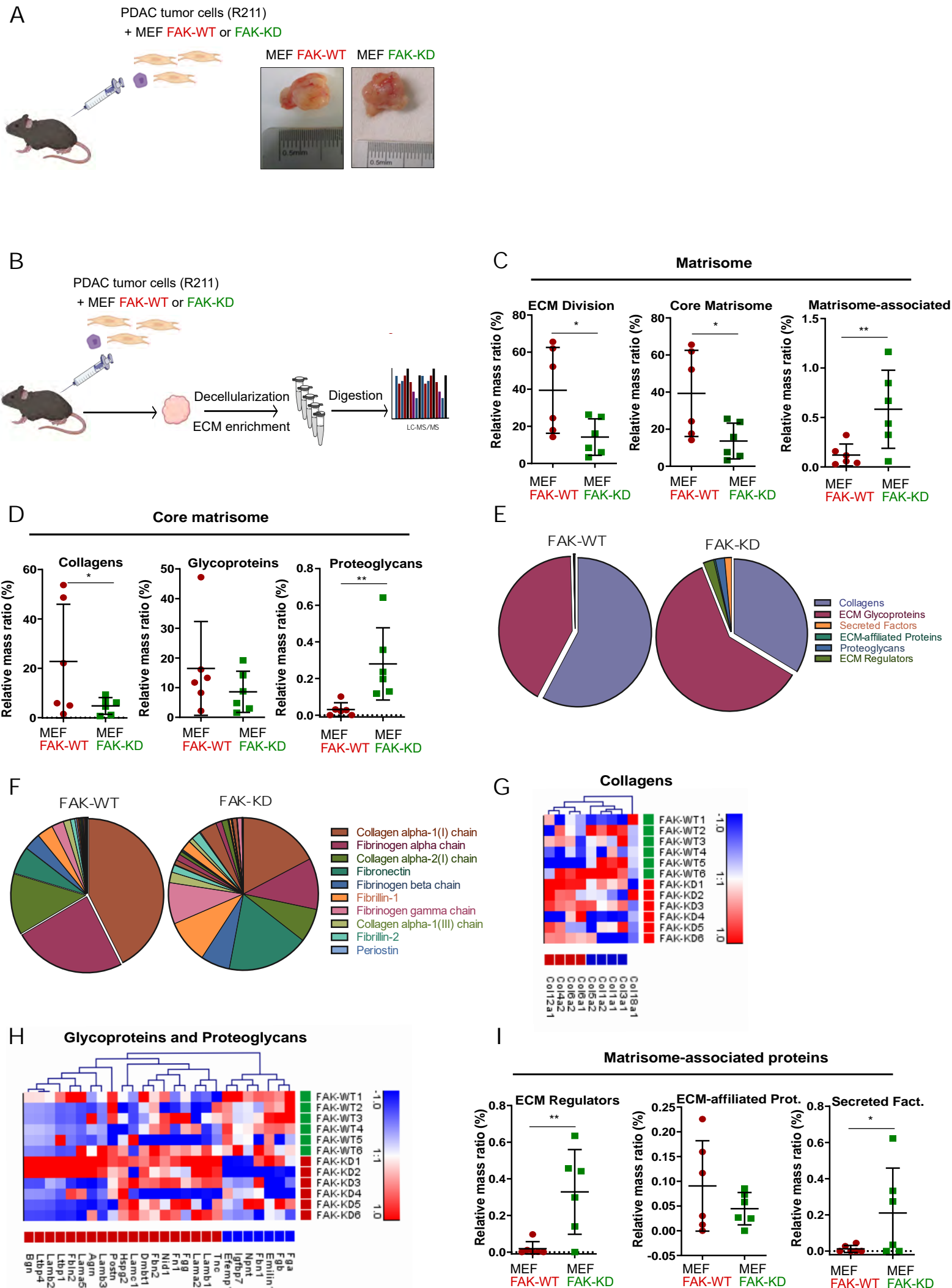


Figure 2

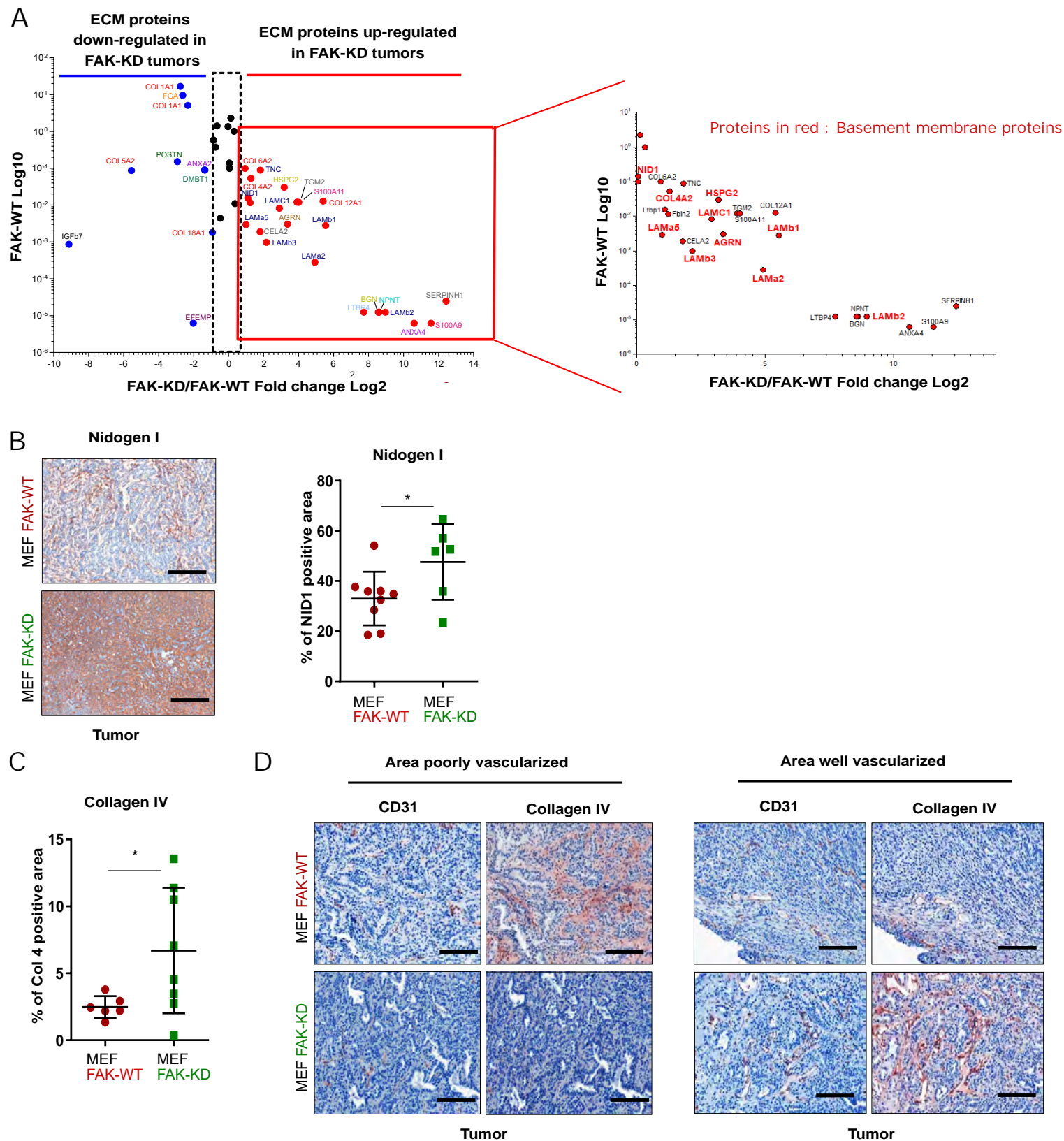


Figure 3

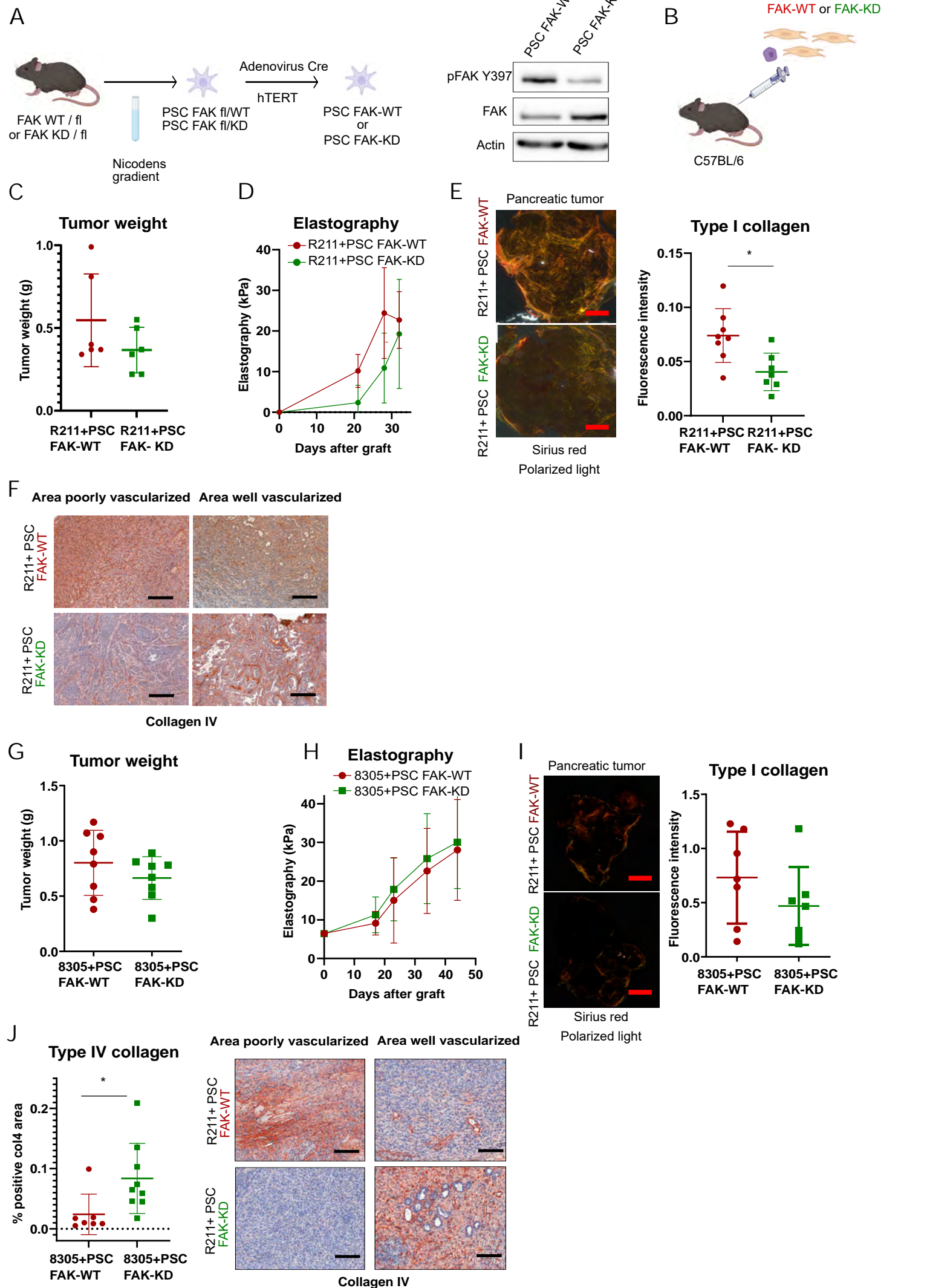


Figure 4

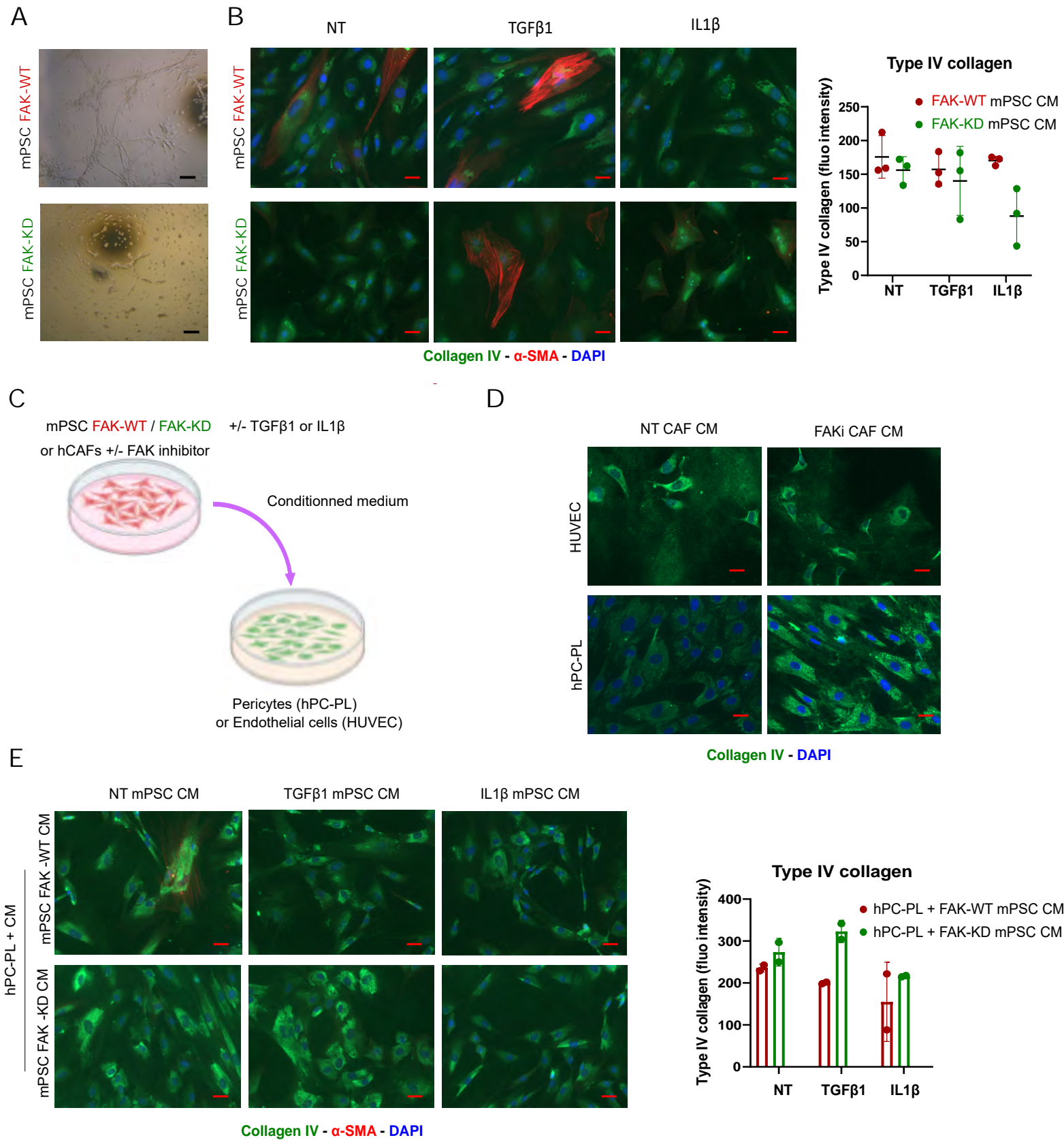


Figure 5

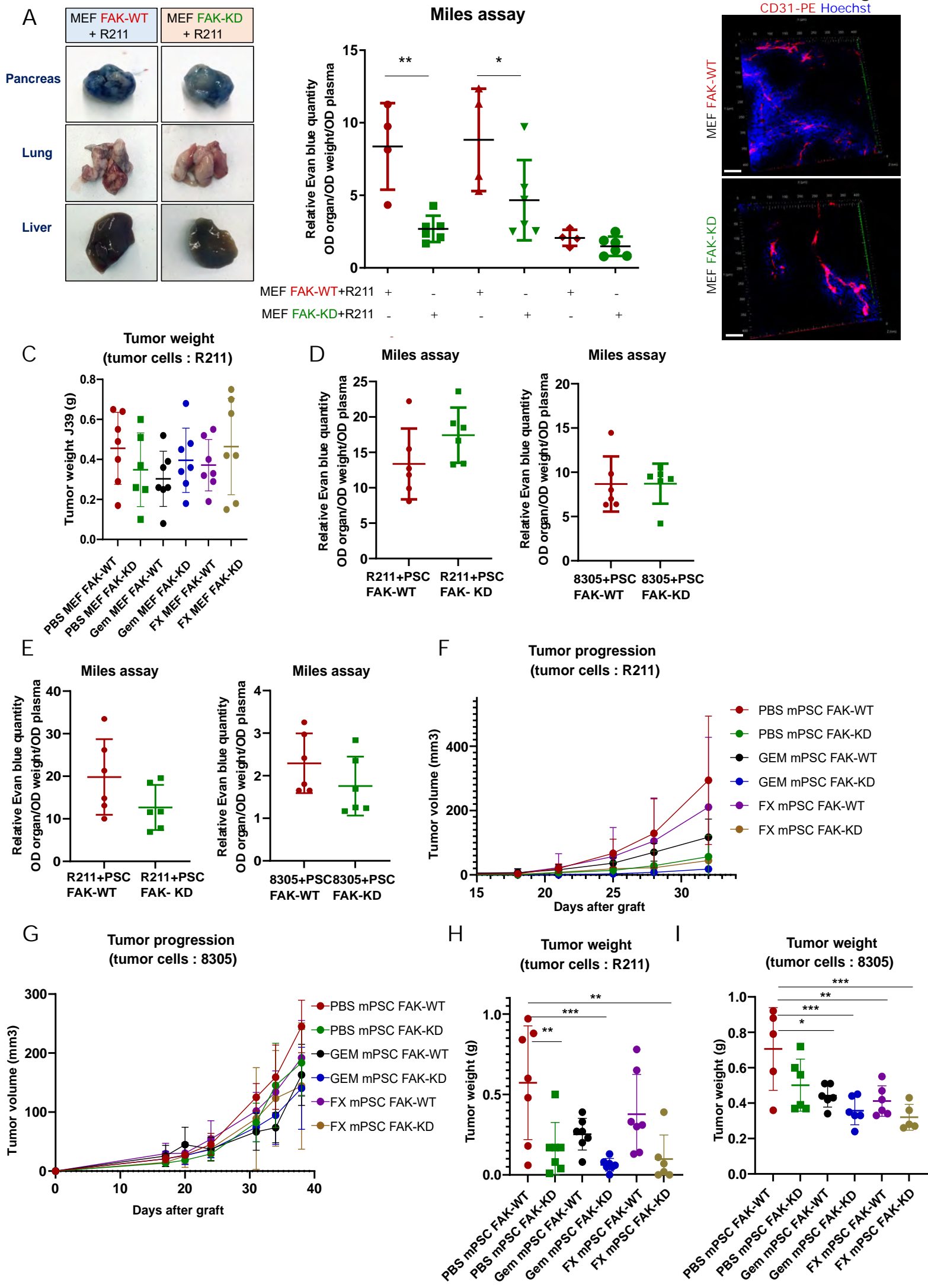


Figure Supp 1

A

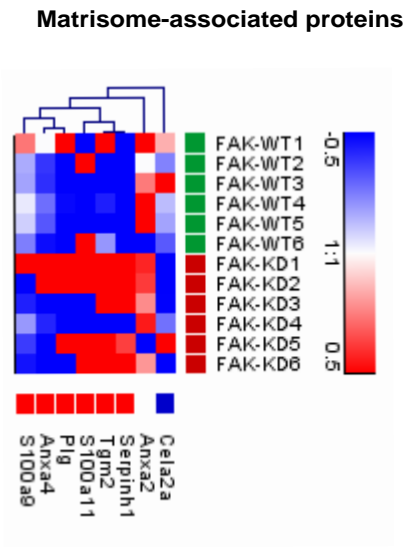


Figure Supp 2

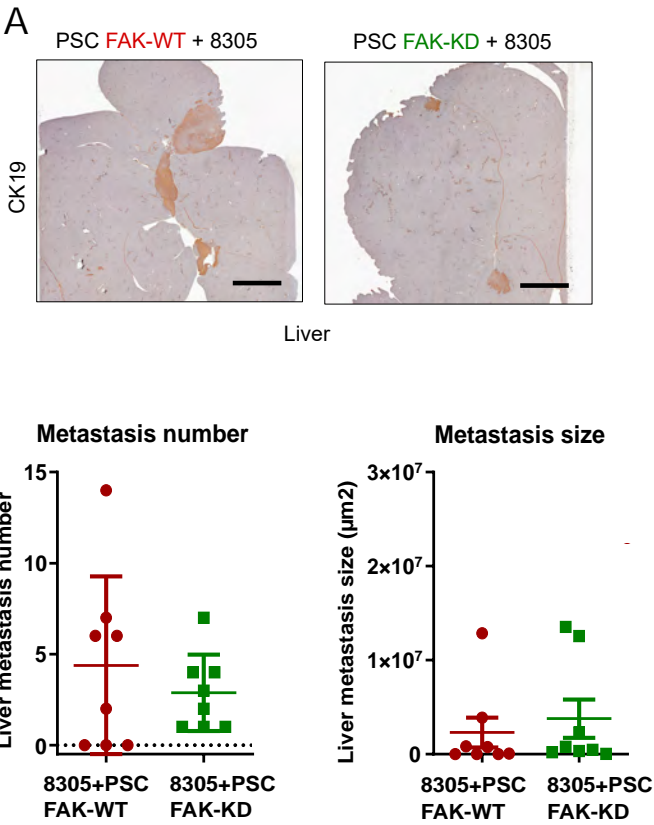


Figure Supp 3

A

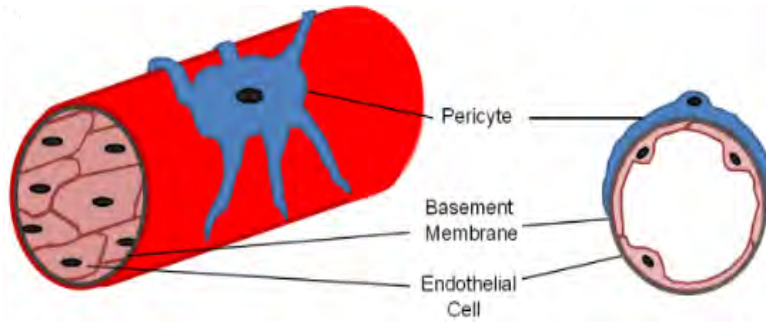


Figure Supp 4

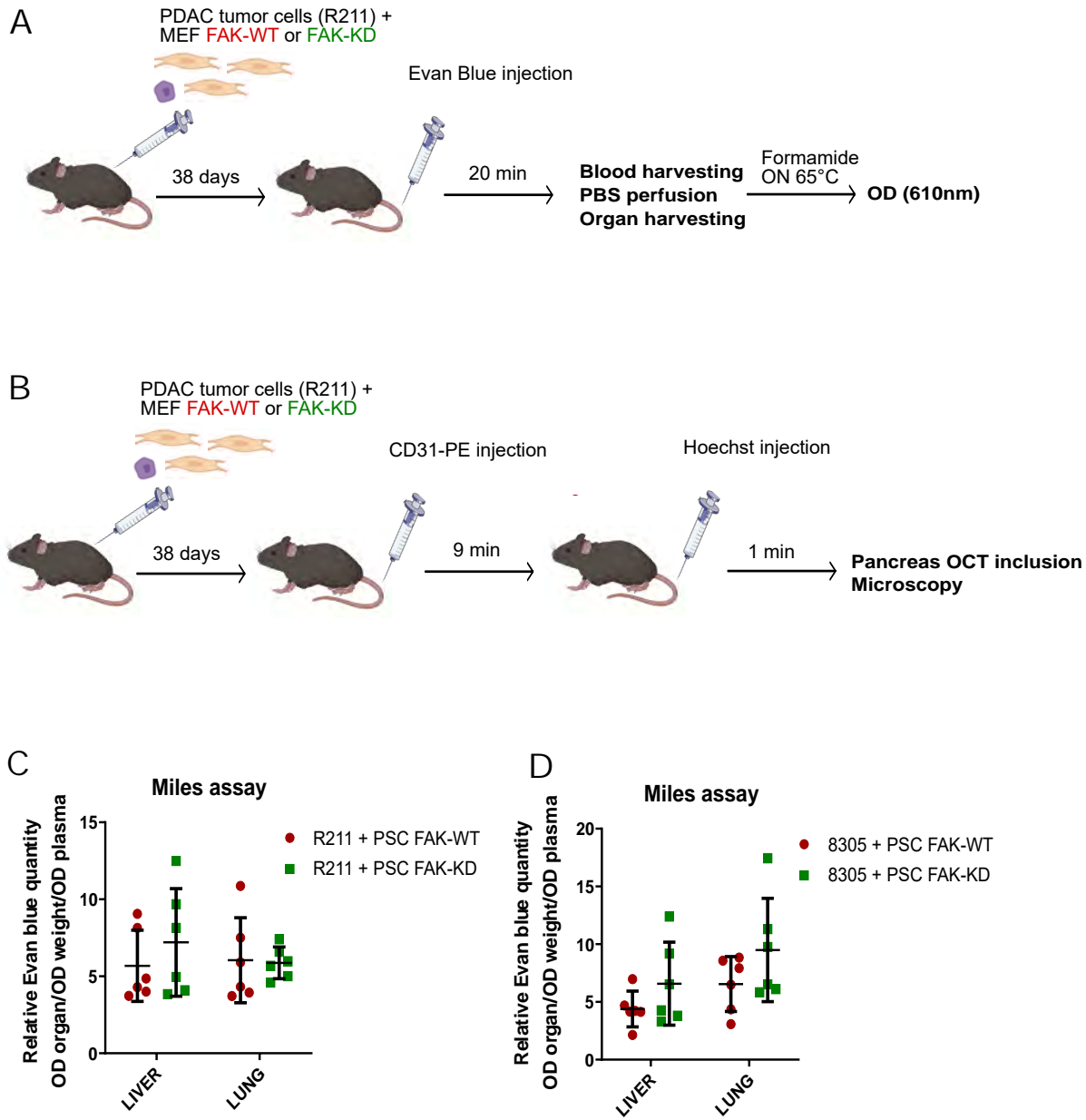
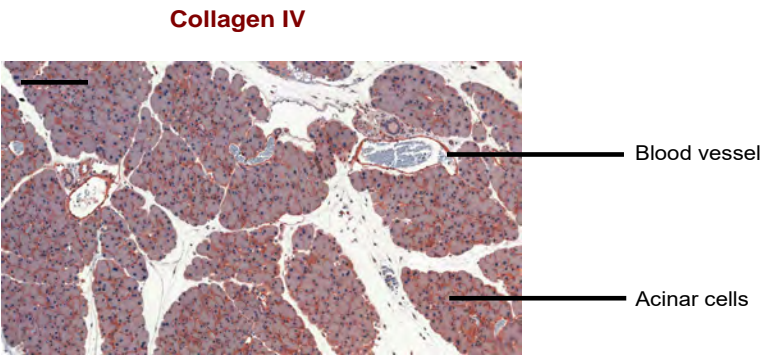


Figure Supp 5

A



Chapitre III: Résultats supplémentaires

A. Développement du modèle transgénique inducible

A.1. Croisements

Une limite de nos modèles de co-greffe est que dans le groupe FAK-KD, les fibroblastes endogènes expriment toujours un FAK-WT, faisant de ce modèle un modèle d'inactivation partielle. C'est pourquoi nous avons développé un modèle transgénique afin d'induire l'inactivation de FAK dans tous les fibroblastes pancréatiques (PSCs). Le double KD/KD étant létal au stade embryonnaire, nous avons utilisé un système inducible dans lequel la Cre est fusionnée à un récepteur modifié des oestrogènes qui se fixe au tamoxifène (Cre-ERT2). Ainsi, différents croisements ont été réalisés (Fig 25.A) dans le but d'obtenir des souris ayant un allèle FAK-fl (entouré par deux sites Lox reconnus par la Cre recombinase) et un allèle FAK-WT ou FAK-KD, et exprimant la Cre recombinase sous la dépendance d'un promoteur des PSCs. Aucun promoteur n'est complètement spécifique des fibroblastes pancréatiques mais plusieurs études montrent que la GFAP (glial fibrillary acidic protein) est un bon marqueur des PSCs. En effet, en 2009, Ding et ses collaborateurs montrent que le promoteur GFAP est capable de réguler l'expression des gènes rapporteurs exclusivement dans les PSCs immortalisées et primaires, ainsi que dans les PSCs de souris transgéniques GFAP-LacZ (Ding et al. 2009). Cabrera et ses collaborateurs montrent également que les PSCs humaines (isolées à partir de prélèvements à l'aiguille fine de tissus cancéreux du pancréas de patients atteints de PDAC localement avancé et non résécable) expriment la GFAP (Cabrera et al. 2014). Basé sur ces études et d'autres, plusieurs groupes ont utilisé le promoteur/marqueur GFAP pour les PSCs que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Swain et al. 2022). Ainsi, nous avons choisi un modèle dans lequel la Cre recombinase (ERT2) est sous le contrôle du promoteur GFAP. L'ajout de tamoxifène permet ainsi la translocation du complexe au noyau et donc l'activation de la Cre, et la délétion de l'allèle FAK-fl dans les cellules GFAP. Après traitement, les souris n'expriment donc plus qu'un allèle, soit FAK-WT soit FAK-KD selon le groupe, dans les cellules GFAP. Ainsi, les différents croisements présentés en Figure 25A, ont permis de générer des souris FAK^{fl/WT} GFAP-Cre-ERT2 et FAK^{fl/KD} GFAP-Cre-ERT2.

A.2. Traitements au tamoxifène

Dans un premier temps, nous avons choisi de traiter les souris au tamoxifène (2mg dilué dans 100µl d'huile de maïs) en injection intra-péritonéal (I.P) tous les deux jours pendant 15 jours (Fig 25.B) (Jean et al. 2014). 15 jours après la fin du traitement tamoxifène, les souris ont été greffées orthotopiquement avec 60 000 cellules tumorales de modèle KPC (cellules R211 qui métastasent préférentiellement aux poumons). Le confinement lié à l'épidémie de COVID-19 ne nous a pas permis de suivre la progression tumorale par échographie, cependant, au jour du sacrifice (35 jours après la

greffe), nous avons pu constater que l'inactivation de FAK dans les PSCs n'impactait pas la croissance tumorale (Fig 25.C).

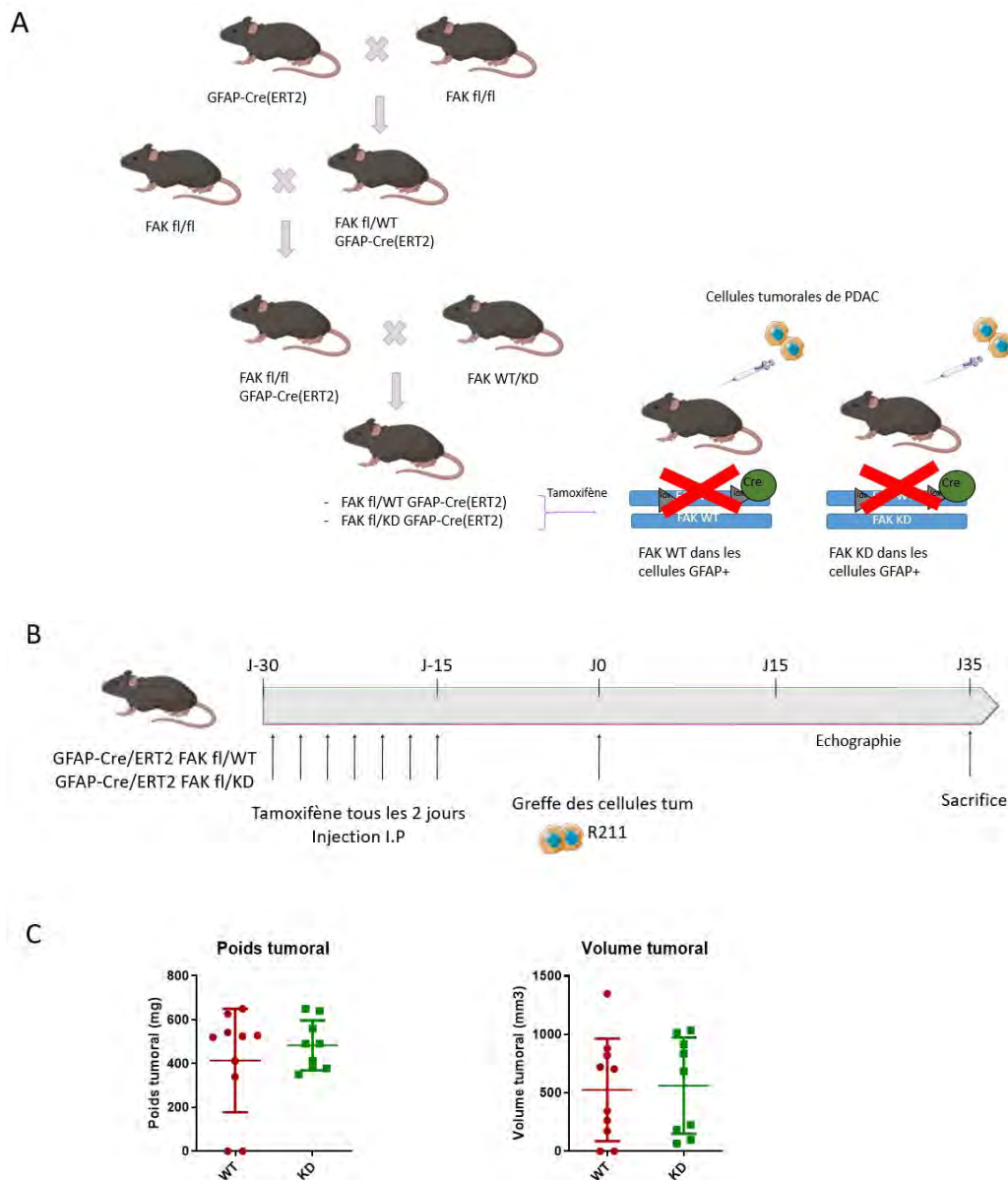


Figure 25 : (A) Schéma des croisements permettant d'obtenir le modèle transgénique inducible afin d'inactiver FAK dans les cellules GFAP+, (B) Schéma de traitement au tamoxifène et de la greffe orthotopique des cellules tumorales R211 (issues d'un modèle KPC développant spontanément un PDAC), (C) Poids et volume tumoraux des souris du modèle transgénique inducible (8 souris FAK-WT et 8 souris FAK-KD) au jour du sacrifice (J35). Les moyennes +/- SD sont représentées, *P<0.05, déterminé à l'aide d'un test de Student.

Nous avons également réalisé cette expérience avec les cellules tumorales issues du modèle KC (8305 qui métastasent préférentiellement au foie) (Fig 26.A). L'inactivation de FAK dans les cellules GFAP+ semble légèrement réduire le poids tumoral au jour du sacrifice (J41) (Fig 26.B). De manière

surprenante, lors du sacrifice de ces souris, nous avons constaté que le diaphragme était envahi de métastases, indépendamment du groupe de souris. Nous avons émis l'hypothèse que cela pouvait être dû à l'excipient du tamoxifène qui est de l'huile de maïs. En effet, plusieurs études montrent le rôle clé des adipocytes dans le microenvironnement tumoral, et plus précisément que des cellules tumorales murines et humaines cultivées avec des adipocytes présentent des capacités invasives fortement augmentées (Dirat et al. 2011).

Afin de déterminer si la présence de métastases dans le diaphragme était due au tamoxifène ou au véhicule, nous avons réalisé une cohorte test comprenant 4 souris traitées en IP au tamoxifène (tamoxifène + huile de maïs) et 4 souris traitées en IP avec l'huile de maïs seule. Des métastases de taille très importante dans le diaphragme ont été observées dans la condition avec l'huile de maïs montrant ainsi que ces métastases sont dues à cette huile et non au phénotype induit par le tamoxifène (Fig 26.C).

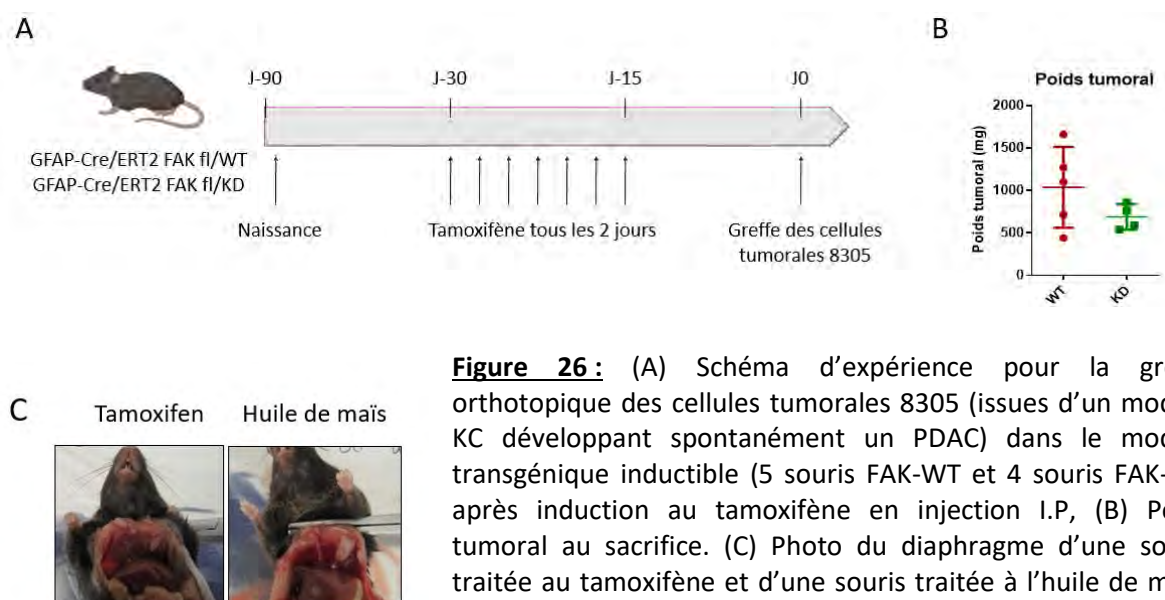


Figure 26 : (A) Schéma d'expérience pour la greffe orthotopique des cellules tumorales 8305 (issues d'un modèle KC développant spontanément un PDAC) dans le modèle transgénique inducible (5 souris FAK-WT et 4 souris FAK-KD) après induction au tamoxifène en injection I.P, (B) Poids tumoral au sacrifice. (C) Photo du diaphragme d'une souris traitée au tamoxifène et d'une souris traitée à l'huile de maïs. Les moyennes +/- SD sont représentées, P value déterminée à l'aide d'un test de Student.

Nous avons donc changé l'administration du tamoxifène, et avons choisi d'utiliser un régime alimentaire complétement de tamoxifène (0.25 g/kg tamoxifène + 5% saccharose). Ce régime étant peu appétant et conduisant à une perte de 2-3g, nous l'avons alterné avec un régime normal : 5 jours avec tamoxifène et 2 jours en régime normal durant 4 semaines (Fig 27.A). Deux semaines après la fin du traitement, les cellules tumorales 8305 ont été greffées et la progression tumorale suivie. L'inactivation de FAK dans les cellules GFAP+ a permis une réduction (non significative) du poids des tumeurs (Fig 27.C) mais également du nombre et de la taille des métastases hépatiques (Fig 27.D-E).

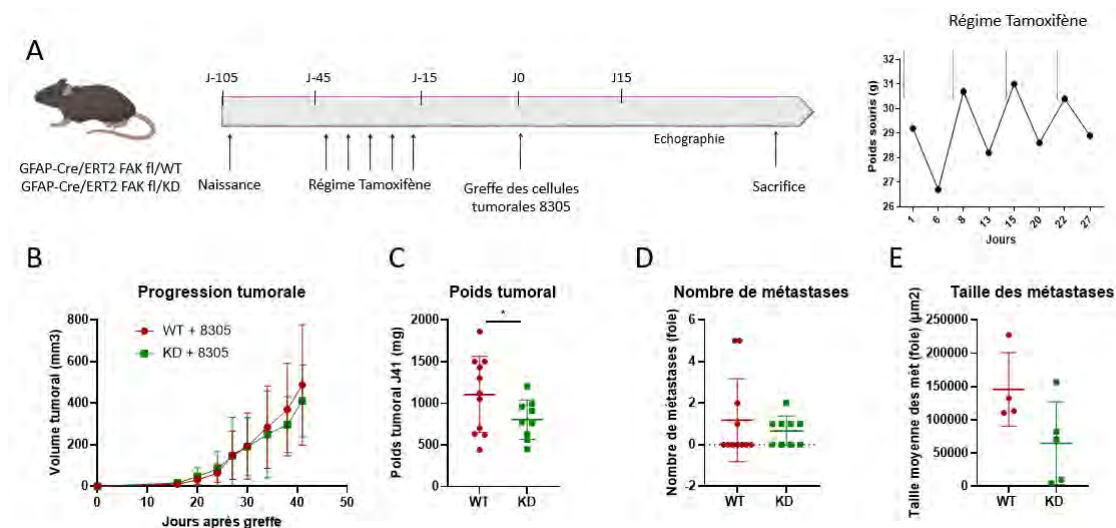
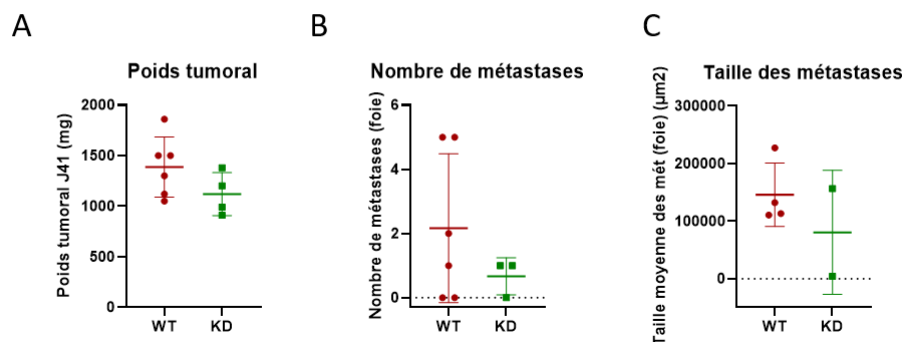


Figure 27 : (A) Schéma d'expérience pour la greffe orthotopique des cellules tumorales 8305 dans le modèle transgénique inducible (11 souris FAK-WT et 9 souris FAK-KD) après induction par régime contenant du tamoxifène pendant 4 semaines, et graphique représentant le poids des souris durant le traitement tamoxifène (reprise de poids en alternant avec un régime normal), (B) Progression tumorale, (C) Poids tumoral au sacrifice, (D) nombre et (E) taille des métastases hépatiques dans le modèle transgénique inducible. Les moyennes \pm SD sont représentées, * $P < 0.05$, déterminé à l'aide d'un test de de Student.

A.3. Importance du sexe dans notre modèle

Dans ce modèle inducible, toutes les souris ayant le génotype voulu (FAK^{-WT} GFAP-Cre-ERT2 et FAK^{-KD} GFAP-Cre-ERT2) ont été greffées, indépendamment de leur sexe. Cependant, nous nous sommes rendues compte que la progression tumorale était différente selon le sexe des souris. En effet, alors que les poids des tumeurs, le nombre et la taille des métastases sont diminués par l'inactivation de FAK dans les cellules GFAP⁺ chez les mâles (Fig 28.A-C), le poids tumoral est inchangé et les métastases sont augmentées chez les femelles (Fig 28.D-F).

Mâles



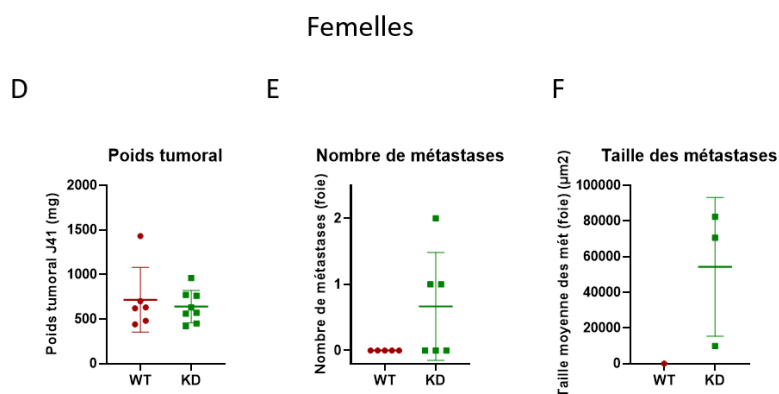


Figure 28 : (A, D) Poids tumoral, (B, E) nombre et (C, F) taille des métastases hépatiques dans le modèle transgénique inducible (greffé avec des cellules tumorales 8305) chez les mâles (A-C) et femelles (D-F). Les moyennes sont représentées \pm SD, P-value déterminée par test de Student.

Nos résultats montrent que l'inactivation de FAK dans les cellules GFAP+ induit une réduction du poids tumoral, indépendamment du sexe de la souris, et réduit légèrement le nombre et la taille des métastases hépatiques chez les souris mâles.

B. Remodelage matriciel dans le modèle transgénique inducible

Ayant précédemment observé un remodelage matriciel induit par l'inactivation de FAK dans les fibroblastes (MEFs et PSCs) des modèles de co-greffe, nous avons mesuré la dureté des tumeurs et quantifié certaines protéines de la matrice dans le modèle transgénique inducible. L'inactivation de FAK dans les cellules GFAP+ induit une diminution de la dureté des tumeurs au sacrifice (non significative) mesurée par élastographie (Fig 29.A-B). Cette diminution est plus prononcée chez les femelles que chez les mâles (Fig 29.C-D). Nous avons également quantifié les fibres de collagène par rouge sirius en lumière polarisée et nous observons une diminution (non significative) de l'expression des collagènes fibrillaires (type I et III) lorsque FAK est inactivée dans les cellules GFAP+ (Fig 29.E-F). Cette diminution est plus importante chez les femelles que chez les mâles ce qui est en accord avec les résultats obtenus sur la dureté des tumeurs (Fig 29.G-H). De plus, nous avons montré dans les modèles de co-greffe que l'inactivation de FAK dans les fibroblastes (MEFs et PSCs) induisait une augmentation de collagène IV dans les zones bien vascularisées et notamment autour des vaisseaux. Ce résultat est également observé dans le modèle transgénique inducible. En effet, dans les zones peu vascularisées, les tumeurs ayant un FAK actif (FAK-WT) dans les cellules GFAP+ produisent plus de collagène IV que dans les tumeurs GFAP FAK-KD, mais, dans les zones bien vascularisées, on peut voir que l'inactivation de FAK dans les cellules GFAP+ induit une augmentation de production de collagène IV (Fig 29.I). *Cette augmentation semble avoir lieu spécifiquement autour des vaisseaux mais cela doit être confirmé par des co-marquages collagène IV-CD31 (cellules endothéliales).* Enfin,

cette augmentation de collagène IV a lieu majoritairement chez les femelles, comparé aux mâles (Fig 29.J).

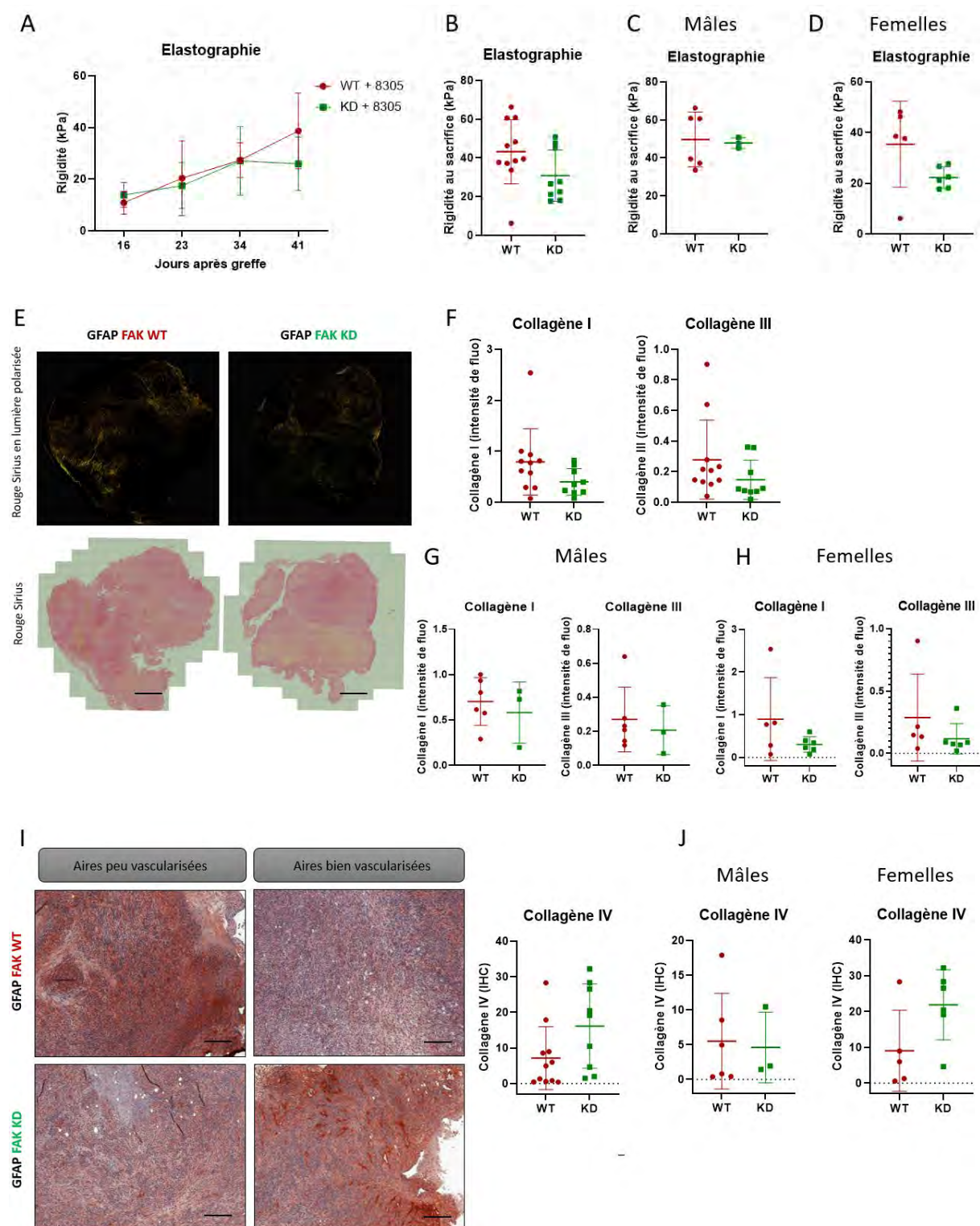


Figure 29 : (A) Progression de la rigidité tumorale du modèle inductible (greffé avec les cellules tumorales 8305), (B) rigidité tumorale au sacrifice sans différenciation de sexe, (C) chez les mâles, (D) chez les femelles. (E) Images de Rouge Sirius en lumière polarisée et quantification des fibres de collagène (Type I et III), échelle = 1000 μ m. (F) Quantification des collagènes fibrillaires globaux, (G)

chez les mâles, (H) chez les femelles. (I) Images IHC et quantification du collagène IV dans les zones peu et bien vascularisées, échelle = 200 μ m. (J) Quantification du collagène IV chez les mâles et femelles. Les moyennes \pm SD sont représentées, * $P < 0.05$, déterminé à l'aide d'un test de de Student.

Nos résultats mettent en évidence un remodelage matriciel avec notamment une diminution des collagènes fibrillaires et une augmentation du collagène IV particulièrement autour des vaisseaux. De plus, nous constatons que le remodelage matriciel est plus important chez les femelles que chez les mâles.

C. Perméabilité vasculaire dans le modèle transgénique inducible

Etant donné que la quantité de collagène IV semble être augmentée autour des vaisseaux, nous avons supposé, comme dans les modèles de co-greffe, que la perméabilité vasculaire pourrait être impactée. Nous avons donc réalisé le « Miles Assay » sur une petite cohorte de souris femelles (2 souris FAK^{-WT} GFAP-Cre-ERT et 3 souris FAK^{-KD} GFAP-Cre-ERT) (Fig 30.A). Il semble que la perméabilité vasculaire soit diminuée (et que les vaisseaux soient donc normalisés) lors de l'inactivation de FAK dans les cellules GFAP⁺ dans la tumeur primaire mais également dans les organes de métastases (Fig 30.B-C). *Ces résultats sont en cours de validation sur une cohorte plus grande.*

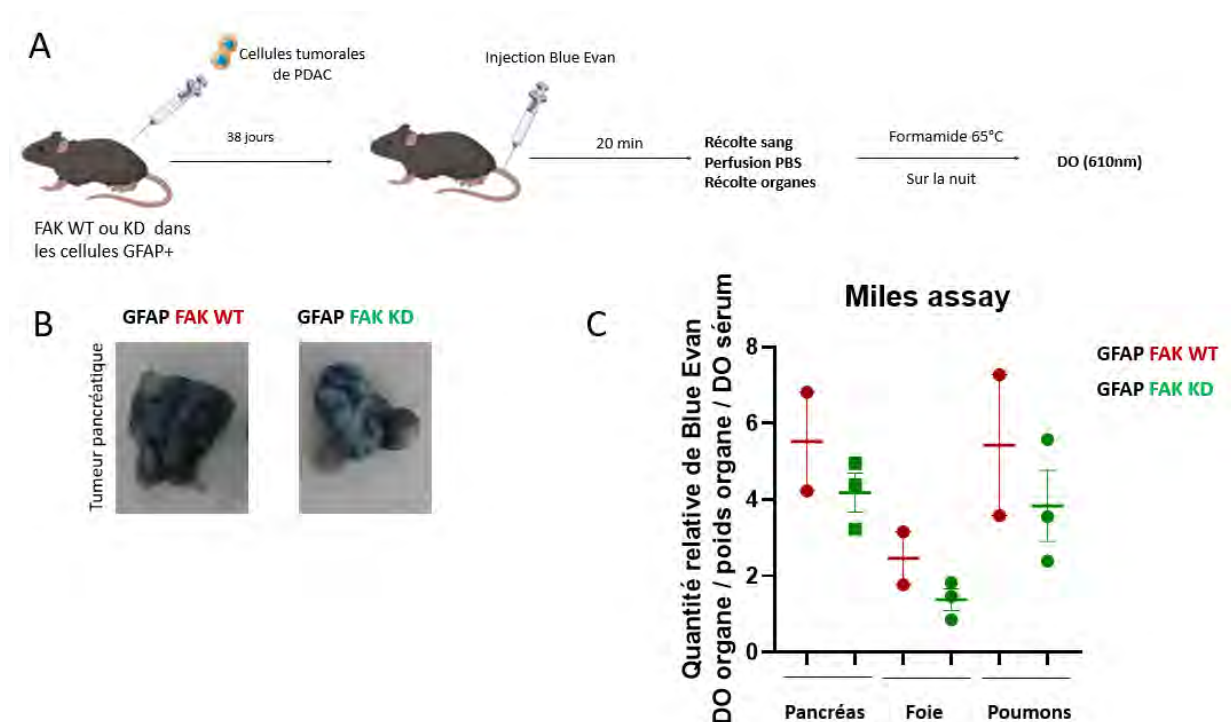


Figure 30 : (A) Schéma d'expérience du Miles assay dans le modèle transgénique inducible greffé avec les cellules tumorales 8305 (2 souris FAK^{-WT} GFAP-Cre-ERT et 3 souris FAK^{-KD} GFAP-Cre-ERT), (B) Photographie de tumeurs pancréatiques issues du Miles assay et (C) quantification du colorant Evan

bleue dans la tumeur primaire (pancréas) et les organes de métastases (foie et poumons). Les moyennes \pm SD sont représentées, * $P < 0.05$, déterminé à l'aide d'un test Kruskal-Wallis (non paramétrique).

Nos résultats préliminaires montrent que l'inactivation de FAK dans les cellules GFAP+ normalise les vaisseaux de la tumeur primaire et des organes métastatiques.

D. Impact de l'inactivation de FAK dans les fibroblastes des différents modèles sur l'infiltration immunitaire

Dans le modèle de co-greffe de MEF avec des cellules tumorales, nous avons identifié que l'inactivation de FAK diminue de manière significative le nombre de macrophages pro-tumoraux de type M2 sans affecter les autres populations immunitaires, mettant en évidence un dialogue entre, d'une part les CAFs et leur MEC, et d'autre part les cellules immunitaires (Zaghdoudi et al. 2020). De plus, même si l'inactivation de FAK dans les MEFs n'affecte pas le nombre de lymphocytes T CD8 dans l'ensemble de la tumeur, nous avons observé une augmentation de l'infiltration des LT CD8 spécifiquement dans les zones fibrotiques (Zaghdoudi et al. 2020). Intriguées par cette infiltration partielle des cellules immunitaires anti-tumorales, nous avons décidé d'étudier ce qu'il en était dans nos deux nouveaux modèles : le modèle de co-greffe avec les PSCs et le modèle transgénique inducible.

Comme évoqué dans l'introduction, les cellules T CD8 jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces lymphocytes T cytotoxiques sont spécifiquement capables de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales. Cependant, même lorsque des cellules T CD8 infiltrent le microenvironnement tumoral, le cancer du pancréas est souvent caractérisé par une faible activité des cellules T, ce qui limite leur efficacité contre la tumeur. Les mécanismes sous-jacents à cette dysfonction des cellules T CD8 dans le cancer du pancréas comprennent la présence d'une forte immunosuppression (présence de cellules myéloïdes suppressives et de cellules T régulatrices), ainsi que la présence d'une barrière physique formée par la matrice extracellulaire. En effet, pour que les cellules T CD8 puissent tuer les cellules tumorales, elles doivent migrer dans le microenvironnement tumoral et pénétrer dans la tumeur (Peranzoni et al. 2017). En comparant cinq modèles de tumeurs murines (modèle spontané MMTV-PyMT, modèles de greffe sous-cutanée de cellules tumorales mammaires (murines), pancréatiques (murines) et de cholangiocarcinome (humaines), et modèle murin de greffe orthotopique de cellules tumorales pancréatiques murines) avec des microenvironnements tumoraux hétérogènes, l'équipe du Pr. Emmanuel Donnadiu a établi un lien entre la vitesse de rigidification tumorale, la réorganisation de l'architecture de la MEC et l'impact de ces caractéristiques sur la migration des cellules T intra-tumorales. Cette équipe montre *in vivo* que la rigidité tumorale est fortement corrélée à la croissance tumorale et à la réticulation de

la MEC, mais est négativement corrélée à la migration des lymphocytes T. En interférant avec la stabilisation du collagène notamment en inhibant la LOX, la quantité de MEC et la rigidité tumorale sont réduites, ce qui améliore l'infiltration et la migration des cellules T et augmente l'efficacité d'anticorps anti-PD-1 utilisés afin de réactiver les cellules T et d'amplifier la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses dans le modèle murin de greffe sous-cutanée de cellules tumorales pancréatiques murines (Nicolas-Boluda et al. 2021). Ces résultats montrent l'importance du remodelage matriciel dans l'infiltration immunitaire intra-tumorale.

Plusieurs paramètres complémentaires sont à prendre en compte dans l'étude de la réponse immunitaire anti-tumorale impliquant les LT CD8. Comme je viens de l'évoquer, la quantité et la localisation des LT CD8, sont deux paramètres complémentaires clés. De plus, l'activation des LT CD8 est essentielle. Ces derniers doivent être activés et doivent reconnaître spécifiquement les antigènes présents sur les cellules tumorales. L'activation des LT CD8 est initiée par la présentation de l'antigène tumoral par les cellules présentatrices d'antigènes (comme les cellules dendritiques). L'expression de molécules inhibitrices est aussi à prendre en compte. Les cellules tumorales peuvent exprimer des ligands inhibiteurs (comme PD-L1) qui se lient à PD-1 sur les LT CD8, inhibant ainsi leur activité. Il est donc important de surveiller l'expression de ces molécules inhibitrices pour évaluer l'inhibition de la réponse immunitaire.

Nous avons donc évalué l'impact de l'inactivation de FAK fibroblastique sur l'immunité des tumeurs de nos deux modèles (co-greffe et transgénique inducible) :

D-1 Modèle de co-greffe

Dans le modèle de co-greffe, l'infiltration globale des LT CD8 est similaire entre les deux groupes même s'il y a une tendance à l'augmentation lorsque FAK est inactivé dans les PSCs (Fig 31.A). Cependant, de manière intéressante, dans les tumeurs FAK-KD, on observe un enrichissement des LT CD8 dans les couches en périphérie de la tumeur, qui sont riches en MEC (Fig 31.B). A l'aide d'un marquage rouge sirius analysé en lumière polarisée, nous avons précédemment montré qu'il n'y avait pas de différence significative dans la production de collagènes fibrillaires (type I et III) dans le groupe où FAK est inactif dans les PSCs (cf Article principal Fig 3.J). Cependant, dans la condition FAK-KD, nous mettons ici en évidence une corrélation négative significative entre la présence de collagènes fibrillaires et de LT CD8: une forte quantité en collagènes I ou III corrèle avec une faible présence de LT CD8 (Fig 31.C).

En parallèle, nous avons étudié s'il y avait un lien entre l'infiltration des LT CD8 et l'expression de la périostine, protéine de la MEC ayant des fonctions pro-tumorales dans le PDAC (Belhabib et al. 2021). Nous nous sommes intéressées à la périostine puisque nos résultats du matrisome montrent

qu'elle est fortement diminuée dans la condition où FAK est inactivée dans les fibroblastes. Le marquage en IHC valide que, dans ce modèle aussi, l'inactivation de FAK dans les fibroblastes induit une diminution (non significative) de la quantité de périostine dans les tumeurs (Fig 31.D). De manière intéressante, on observe qu'au sein d'une même tumeur, les dépôts de périostine sont très hétérogènes (Fig 31.E) et que les zones riches en périostine présentent une faible infiltration en LT CD8, et inversement (quel que soit le statut d'activation de FAK dans les PSCs).

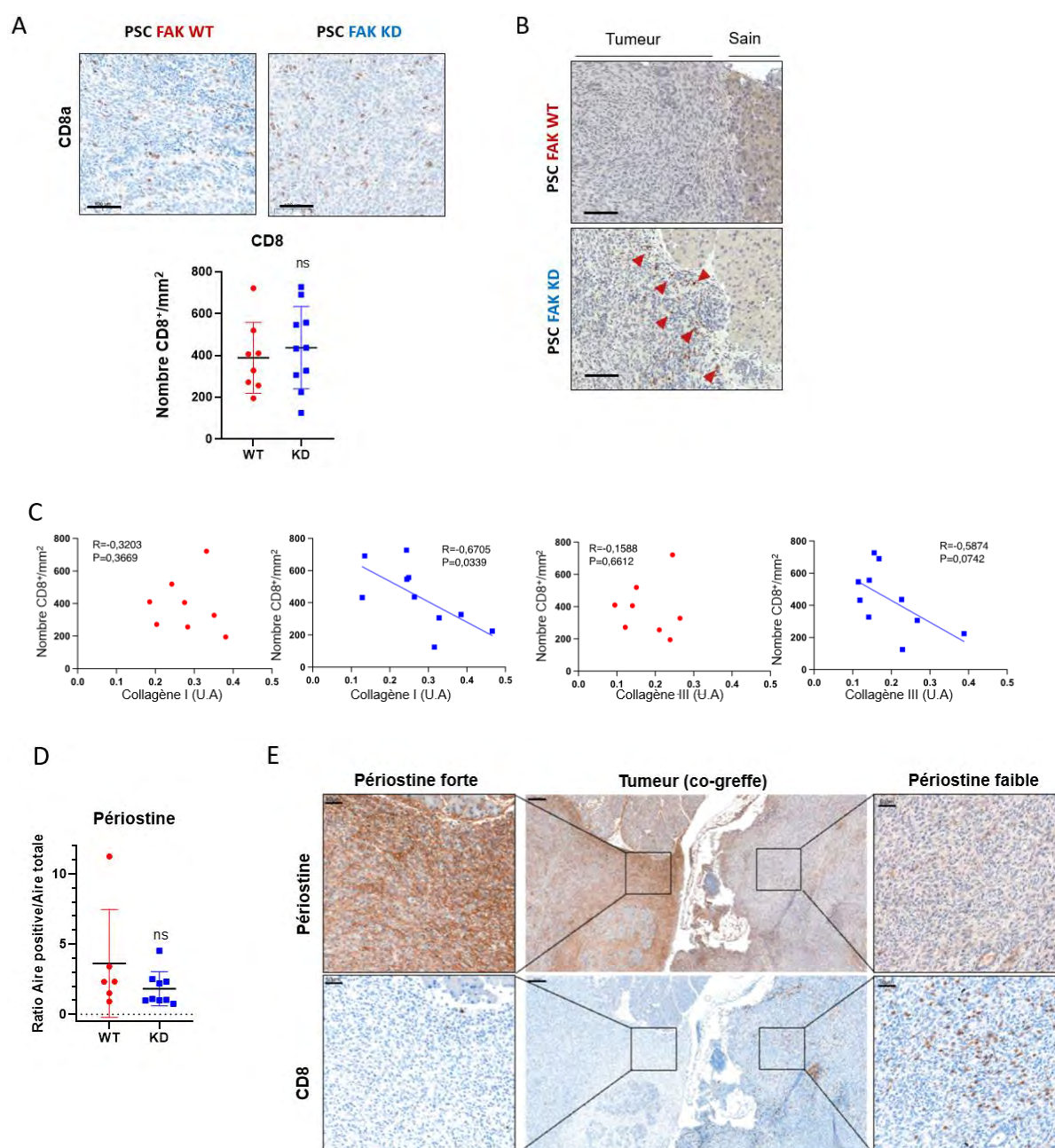


Figure 31 : (A, B) Images représentatives et quantification d'immunohistochimies contre CD8a sur des coupes de tumeurs primaires de souris femelles co-greffées avec des PSCs et cellules tumorales 8305, avec n=8 WT/10 KD, échelle = 100 μ m (C) Corrélations de Pearson entre le nombre de CD8+/mm² et la quantité de collagène, (D) Quantification et (E) Images représentatives et quantification d'immunohistochimies contre la périostine et CD8a ; échelle = 200 et 50 μ m. Les

moyennes \pm SD sont présentées. NS, non significativement différent, déterminé à l'aide d'un test de Student.

Ces résultats montrent que même si l'activité de FAK dans les PSCs ne semble pas impacter l'infiltration des LT CD8 dans la tumeur, la présence de ces lymphocytes corrèle négativement avec la quantité de collagène fibrillaire au sein des tumeurs dont FAK fibroblastique est inactivée. De plus, la présence de périostine semble exclure les LT CD8 dans les deux groupes. Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse d'un lien direct et d'une interaction entre la MEC et les LT CD8.

D-2 Modèle transgénique

Nous avons ensuite étudié l'infiltration des LT CD8 dans le modèle transgénique inducible. Les marquages IHC montrent que l'infiltration des LT CD8 dans la tumeur est drastiquement augmentée lorsque FAK est inactivée dans les cellules GFAP+ (Fig 32.A), et ce dans toute la tumeur. Comme montré précédemment dans la figure 29.E, les quantités des collagène I et III tendent à diminuer dans les tumeurs où FAK est inactivée dans les cellules GFAP+. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'augmentation d'infiltration des LT CD8 dans la tumeur pouvait être liée à la réduction des collagènes fibrillaires. Cependant, en considérant les mâles et les femelles ensemble, nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation entre l'expression des collagènes fibrillaires et l'infiltration des LT CD8 que ce soit de manière globale (Fig 32.B) ou en séparant chacun des groupes FAK^{-WT} GFAP-Cre-ERT et FAK^{-KD} GFAP-Cre-ERT (Fig 32.C).

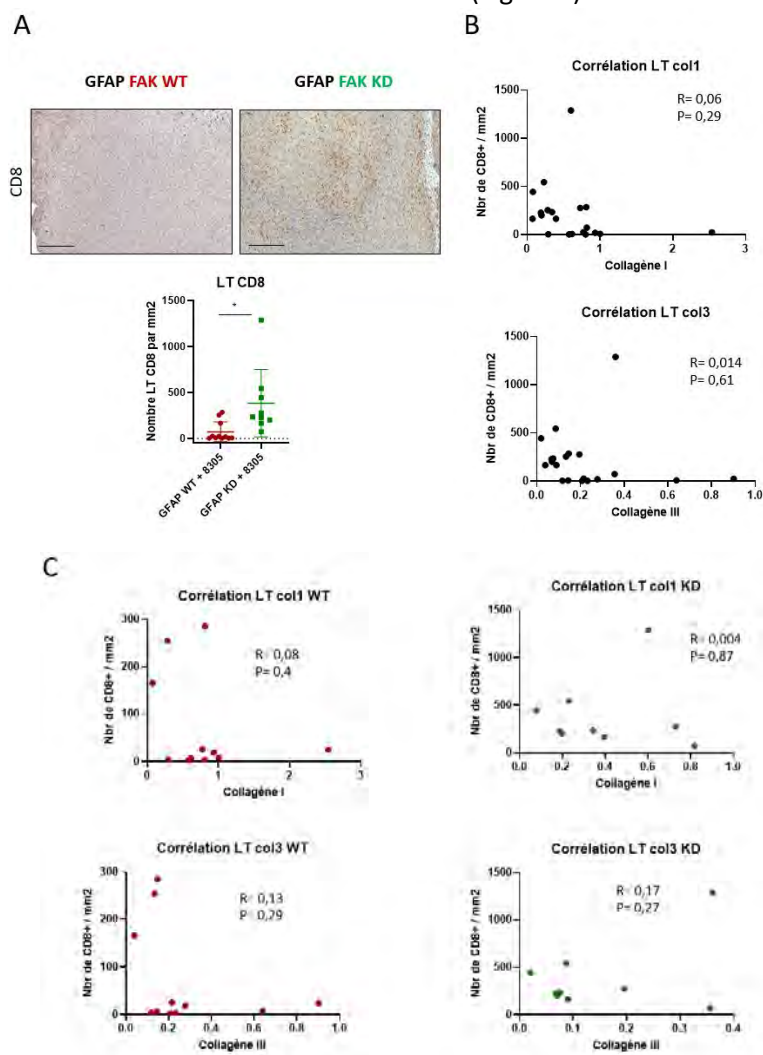


Figure 32 : (A) Images représentatives et quantification des marquages immuno-histochimiques de CD8a sur des coupes de tumeurs primaires de souris du modèle transgénique inducible greffées avec des cellules tumorales 8305, échelle = 100 μ m (B) Corrélations de Pearson entre le nombre de CD8+/mm² et la quantité de collagène de manière globale (B) ou selon le groupe (C). Les moyennes \pm SD sont représentées. * $p < 0.05$ déterminé à l'aide d'un test de Student.

En analysant séparément mâles et femelles, nous avons mis en évidence que chez les mâles, l'augmentation d'infiltration des LT CD8 dans le groupe FAK-KD est significative (Fig 33.A) mais qu'aucune corrélation n'existe entre le nombre de LT CD8 infiltrant la tumeur et la quantité de collagènes fibrillaires (Fig 33. B-C). Chez les femelles, l'inactivation de FAK dans les PSC induit une augmentation (non significative) de l'infiltration des LT CD8 (Fig 33.D). De plus, alors que le nombre de LT CD8 ne corrèle pas avec la quantité de collagènes fibrillaires de manière globale (Fig 33.E), il corrèle avec la quantité de collagène III dans le groupe FAK-KD (Fig 33.F).

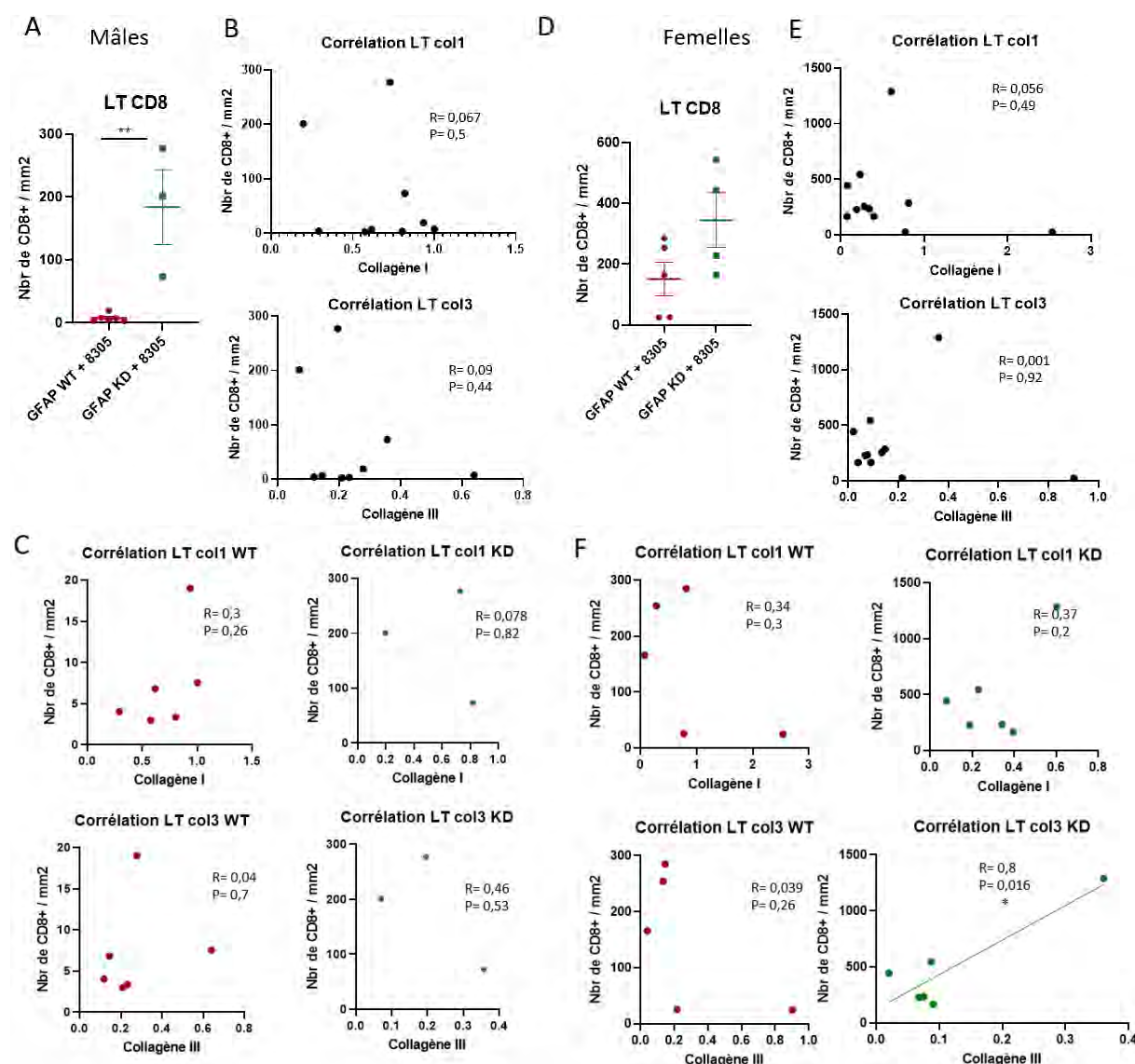


Figure 33 : (A) Quantification de marquages IHC contre CD8a sur des coupes de tumeurs primaires de souris mâles du modèle transgénique inducible greffées avec des cellules tumorales 8305, (B) Corrélations de Pearson entre le nombre de CD8+/mm² et la quantité de collagène de manière globale (B) ou selon le groupe (C) chez les mâles. (D) Quantification d'immunohistochimies contre CD8a sur des coupes de tumeurs primaires de souris femelles du modèle transgénique inducible greffées avec des cellules tumorales 8305, (E) Corrélations de Pearson entre le nombre de CD8+/mm² et la quantité de collagène de manière globale (E) ou selon le groupe (F) chez les femelles. Les moyennes +/- SD sont représentées. *p<0.05; ** p<0,01 déterminé à l'aide d'un test de Student.

Ces résultats mettent en évidence que l'inactivation de FAK dans les cellules GFAP+ induit une meilleure infiltration des LT CD8 dans la tumeur et que cette modification est plus importante chez les mâles que chez les femelles.

E. Structures lymphoïdes tertiaires et HEV

De manière intéressante, lors de nos marquages de LT CD8, nous nous sommes aperçues de la présence de structures lymphoïdes tertiaires au sein de certaines de nos tumeurs. Les structures lymphoïdes tertiaires (TLS) sont des organes lymphoïdes ectopiques qui se développent dans les tissus non lymphoïdes au niveau des sites d'inflammation. Dans le contexte du cancer, les TLS sont bien documentées et se composent de zones riches en lymphocytes T, cellules dendritiques et lymphocytes B. Les TLS jouent un rôle important dans la réponse immunitaire contre la tumeur et peuvent être impliquées dans la progression, le pronostic et le traitement du cancer. En effet, plusieurs études ont montré un lien entre les TLS associées à la tumeur et les résultats cliniques favorables dans différents types de cancer (W. Kang et al. 2021). Dans le PDAC, une étude faite sur des échantillons chirurgicaux montre que 46% des tumeurs contiennent des agrégats distincts de cellules T et B reflétant une "TLS au stade précoce" qui est corrélé avec un allongement de la survie globale (26 mois au lieu de 14) et sans progression (J Gunderson et al. 2021).

Nous montrons que le nombre de TLS est augmenté dans la condition FAK-KD comparé au groupe FAK-WT (Fig 34.A).

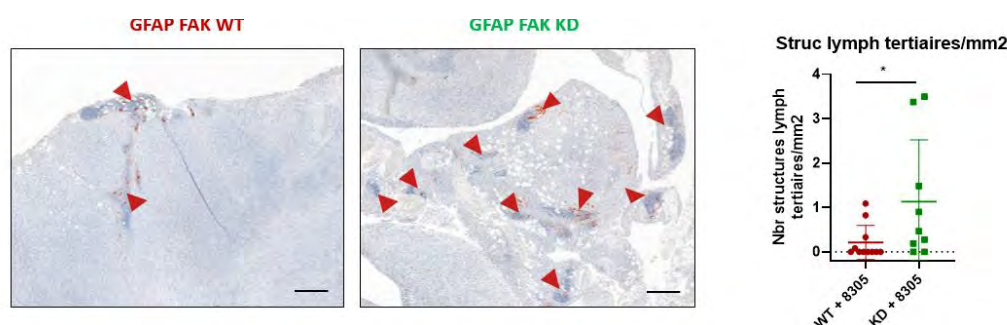


Figure 34 : Images représentatives et quantification des structures lymphoïdes tertiaires sur des coupes de tumeurs primaires de souris du modèle transgénique inducible, échelle = 200 μ m, les flèches représentent les structures lymphoïdes tertiaires.

Les TLS sont composées de vaisseaux spécifiques permettant l'infiltration immunitaire, les HEV. La présence de HEV dans ces structures est essentielle pour leur fonctionnement immunologique puisqu'ils facilitent le recrutement de lymphocytes T et B spécifiques contre les antigènes tumoraux. Ces lymphocytes activés peuvent alors infiltrer la tumeur et contribuer à l'élimination des cellules tumorales par des mécanismes cytotoxiques et immunologiques.

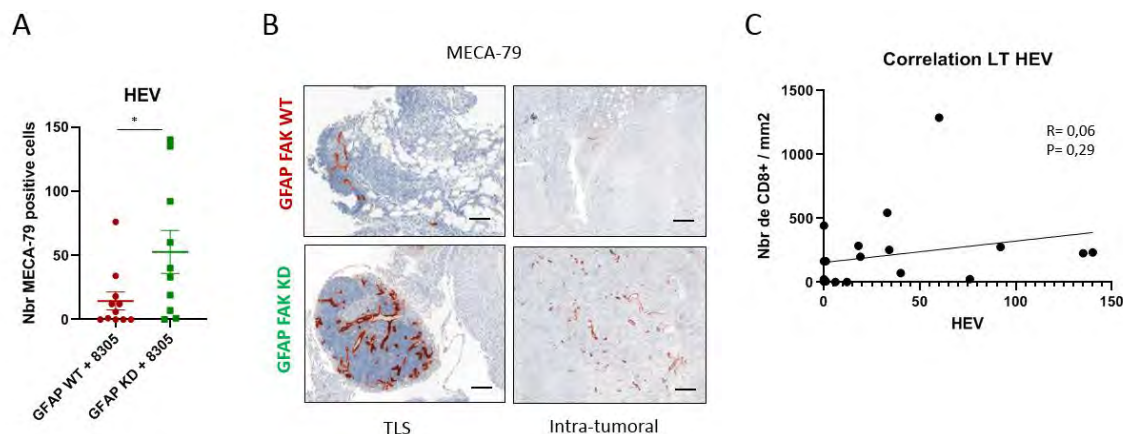


Figure 35 : (A) Quantification et (B) Images représentatives d'immunohistochimies contre le MECA-79 marqueur de HEVs, échelle = 100 μ m (C) Corrélation de Pearson entre le nombre de CD8+/mm² et la quantité de HEV dans les tumeurs. Les moyennes +/- SD sont représentées. * $p < 0.05$ déterminé à l'aide d'un test de Student.

A l'aide d'un marquage MECA-79, nous avons identifié les HEV dans nos tumeurs et mis en évidence une augmentation de leur nombre dans la condition FAK-KD (Fig 35.A) à la fois dans les TLS mais aussi dans la tumeur (Fig 35.B). Cependant, et de manière étonnante, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la présence des LT et la quantité de HEV dans la tumeur (Fig 35.C).

De manière intéressante, tout comme pour les LT CD8, l'augmentation de TLS et de HEV induite par l'inactivation de FAK dans les cellules GFAP+ est plus importante dans le groupe des mâles (Fig 36.A-D). De plus, dans ce groupe, la quantité de LT CD8 corrèle au nombre de HEV, ce qui n'est pas le cas pour le groupe des femelles (Fig 36. E-F).

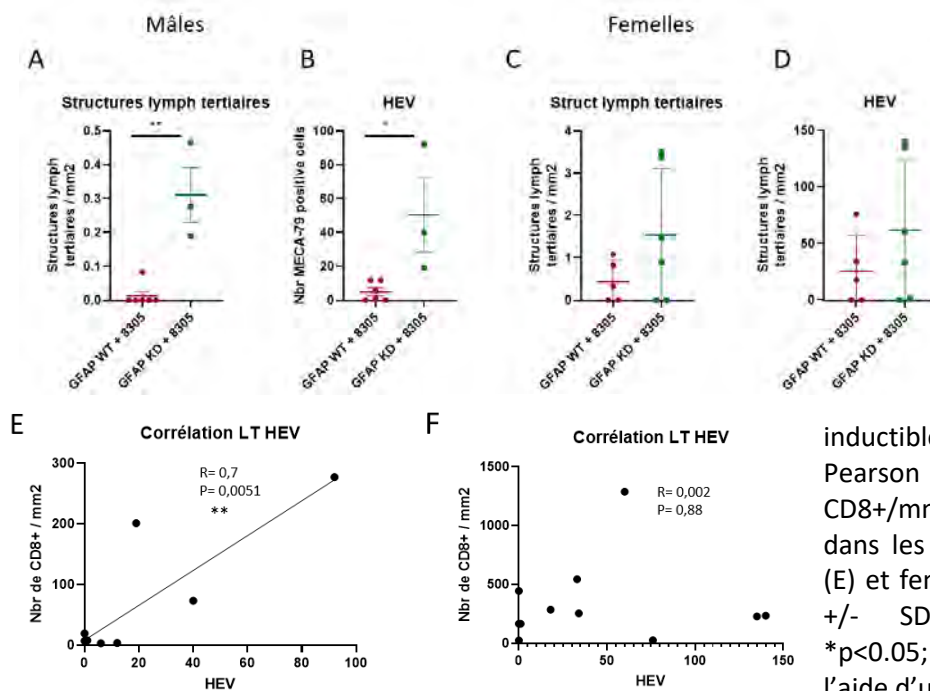


Figure 36 : (A ; C) Quantification des TLS et (B ; D) HEVs sur coupes de tumeurs primaires de souris mâles et femelles respectivement du modèle transgénique

inductible, (E ; F) Corrélations de Pearson entre le nombre de CD8+/mm² et la quantité de HEV dans les tumeurs chez les mâles (E) et femelles (F). Les moyennes +/- SD sont représentées. * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$ déterminé à l'aide d'un test de Student.

Ces résultats mettent en évidence que l'inactivation de FAK dans les cellules GFAP+ favorise la formation de TLS et de HEV dans la tumeur. Ces résultats sont amplifiés dans le groupe des souris mâles, groupe dans lequel l'infiltration des LT CD8 est corrélée au nombre de HEV.

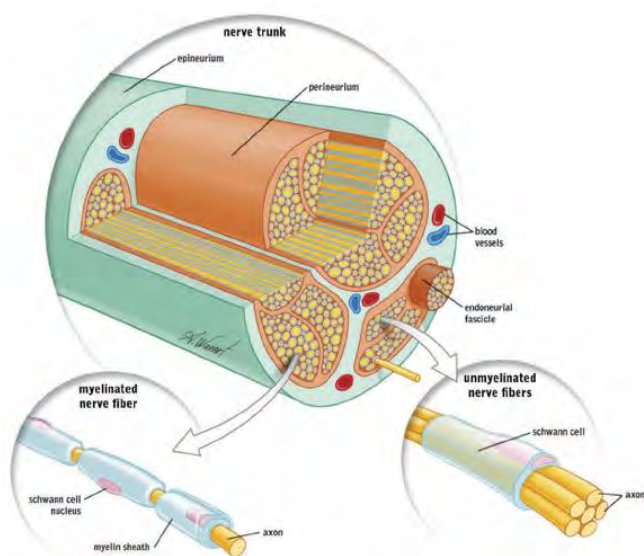
F. Implication potentielle des cellules de Schwann dans le modèle transgénique inducible

Quelques mois avant la fin de ma thèse, nous avons assisté à une conférence à l'AFRCP qui s'intitule « Rôle de la plasticité des cellules de Schwann dans l'innervation des lésions métaplasiques et des tumeurs pancréatiques » montrant l'expression de la GFAP par les cellules de Schwann dans le pancréas.

Des preuves émergentes mettent en évidence l'importance du système nerveux périphérique en tant que composant non tumoral essentiel dans le microenvironnement tumoral, régulant la croissance des tumeurs et leur évaison face au système immunitaire. Les interactions entre le système neuronal et le PDAC suscitent un vif intérêt car elles pourraient révéler de nouveaux mécanismes sous-jacents à la progression tumorale et permettre de découvrir des cibles thérapeutiques prometteuses. Je présenterai dans un premier temps le rôle et la composition des nerfs dans le pancréas sain, puis l'impact de l'innervation du PDAC dans la progression tumorale et enfin les interactions des nerfs avec les cellules tumorales et cellules du microenvironnement.

F.1. Rôle des nerfs dans le pancréas sain

Les nerfs sont composés de neurones (groupes de cellules) organisés en fascicules qui sont entourés d'une couche appelée perineurium (couche de cellules aplaties et de membrane basale). Les neurones et vaisseaux présents dans les fascicules sont stabilisés par un tissu connectif lâche, l'endoneurium. Enfin, le nerf est entouré de l'épineurium (tissu connectif) à sa surface externe



(Figure 37) (Sheffield 2017). Le pancréas est innervé à la fois par le système nerveux autonome (sympathique et parasympathique) et les nerfs sensoriels. La présence de ces nerfs dans le pancréas est cruciale pour maintenir ses fonctions normales.

Figure 37 : Anatomie d'un nerf (Ilfeld, Preciado, and Trescot 2016)

F.1.1. Nerfs parasympathiques

Les neurones parasympathiques pré-ganglionnaires proviennent du noyau moteur dorsal du nerf vague et activent les neurones post-ganglionnaires parasympathiques dans les ganglions pancréatiques *via* des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (Love, Yi, and Smith 2007). Les neurones parasympathiques du pancréas libèrent plusieurs neurotransmetteurs excitateurs ou inhibiteurs, dont l'acétylcholine, l'oxyde nitrique, le polypeptide intestinal vasoactif (VIP), le peptide de libération de la gastrine et le polypeptide activateur de l'adénylate cyclase de l'hypophyse (PACAP) (Love, Yi, and Smith 2007; Gilon and Henquin 2001; Di Cairano et al. 2016). Ces neurotransmetteurs jouent un rôle essentiel dans la régulation de la fonction pancréatique, notamment en régulant la sécrétion exocrine et endocrine. En effet, les nerfs parasympathiques favorisent la libération d'enzymes digestives et réduisent la sécrétion d'insuline déclenchée par le glucose (Makhmutova and Caicedo 2021).

F.1.2. Nerfs sympathiques

Les neurones sympathiques pré-ganglionnaires proviennent de la moelle épinière dans les segments thoraciques inférieurs et lombaires supérieurs. Les nerfs sympathiques s'étendent jusqu'au ganglion pancréatique, au système vasculaire, aux îlots endocriniens, aux canaux et ganglions lymphatiques (Radzimirska et al. 2020). Ils libèrent différents neurotransmetteurs, dont la norépinéphrine, la galanine et le neuropeptide Y (Di Cairano et al. 2016; E. Yi, Smith, and Love 2005; Åhrén 1999). Les nerfs sympathiques diminuent les niveaux d'insuline et augmentent la sécrétion de glucagon, contribuant ainsi à maintenir les niveaux glycémiques (Åhrén et al. 1987; Holst et al. 1986).

F.1.3. Nerfs sensoriels

Les nerfs sensoriels sont répartis dans tous les tissus exocrines et dans la plupart des îlots de Langerhans (Makhmutova and Caicedo 2021). Ils détectent les changements de l'environnement dans le pancréas et envoient des informations au système nerveux central (Lindsay et al. 2006). Certaines études ont suggéré que les nerfs sensoriels pourraient inhiber la sécrétion d'insuline (Karlsson, Sundler, and Åhrén 1992; Karlsson et al. 1994) et la sécrétion exocrine (Kirkwood et al. 1999).

F.1.4. Cellules de Schwann

Les cellules de Schwann sont des cellules neuronales responsables de la formation de la gaine de myéline autour des neurones du système nerveux périphérique et de l'apport de nutriments aux axones. La gaine de myéline améliore la transmission des impulsions électriques et est nécessaire pour isoler et protéger les axones des neurones. Les cellules de Schwann peuvent être soit

myélinisantes, soit non-myélinisantes. Les cellules de Schwann myélinisantes enroulent les axones des neurones moteurs et sensoriels pour former la gaine de myéline, tandis que les cellules de Schwann non-myélinisantes fournissent un soutien et un amortissement aux axones non myélinisés. Les deux types de cellules de Schwann sont vitaux dans le maintien et la régénération des axones des neurones. Les cellules de Schwann ne conduisent pas l'activité électrique elles-mêmes, mais elles contribuent à assurer la conduction normale des signaux électriques (Bhatheja and Field 2006).

Dans le pancréas, les cellules de Schwann forment un réseau associé aux nerfs périphériques qui sont généralement non myélinisés. Ces cellules présentent plusieurs marqueurs dont la GFAP et S100B (S. Winer et al. 2003). Chez l'Homme, les fibres gliales riches en S100B sont présentes autour des îlots ainsi que dans le parenchyme pancréatique (S.-C. Tang et al. 2018). L'association entre les îlots et les cellules de Schwann suggère que ces cellules pourraient influencer directement les cellules endocrines par des signaux paracrines. C'est par exemple le cas du GDNF (facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales) produit par les cellules de Schwann qui augmente la masse et la prolifération des cellules β mais aussi leur contenu en insuline chez la souris (Mwangi et al. 2008). Ce facteur protège également les îlots du stress lié à la privation de nutriments chez l'Homme (lors de la transplantation d'îlots) (Abadpour et al. 2017). Les cellules de Schwann ont donc un rôle protecteur dans le pancréas sain.

F.2. Rôle des nerfs dans le PDAC

Lorsque le pancréas normal évolue vers un PDAC, l'innervation pancréatique est constamment remodelée et joue un rôle crucial dans l'aggravation de la pathologie. La taille et le nombre de nerfs pancréatiques sont augmentés, la proportion de fibres nerveuses autonomes et de fibres nerveuses sensorielles est modifiée, et il y a une infiltration de cellules cancéreuses autour du nerf (IPN).

F.2.1. Innervation sympathique dans le PDAC

Le PDAC présente différentes innervations dont l'innervation sympathique qui favorise la croissance tumorale. Les cellules tumorales et les PSCs libèrent le NGF (Nerve Growth Factor) pour agir sur les récepteurs TrkA des nerfs sympathiques et favoriser l'innervation sympathique de la tumeur. Par la suite, le neurotransmetteur norepinephrine (NE) libéré par les nerfs sympathiques peut favoriser la prolifération des cellules tumorales *via* les récepteurs ADRB2 présents sur celles-ci. Il inhibe également la fonction immunitaire en se liant aux récepteurs des cellules immunitaires, favorisant ainsi la progression tumorale. La combinaison de NE et ADRB2 active la voie de signalisation PKA-STAT3, augmente le niveau de phosphorylation de STAT3 et favorise la libération de NGF, MMP2 et

MMP9 par les cellules tumorales favorisant ainsi leur croissance (K. Guo et al. 2013). Bloquer la voie de signalisation adrénergique pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse pour inhiber la progression du PDAC, avec des médicaments tels que le propranolol (Kim-Fuchs et al. 2014). Une étude a montré que son association à la gemcitabine réduit l'expression de NGF, la densité des nerfs et améliore le taux de survie des souris KPC (Renz et al. 2018).

F.2.2. Innervation parasympathique dans le PDAC

Le PDAC présente également une innervation parasympathique assurée par le nerf vague qui peut moduler la croissance tumorale. Des récepteurs parasympathiques et cholinergiques surexprimés ont été détectés dans les tissus tumoraux de PDAC de patients et de modèles murins (Lingfu Zhang, Guo, et al. 2016; Lingfu Zhang, Xiu, et al. 2016). Les patients atteints de PDAC présentant une densité parasympathique élevée ont une progression tumorale augmentée et des taux de récurrence plus précoces comparés aux patients ayant une densité parasympathique faible (Lingfu Zhang, Guo, et al. 2016). De plus, le signal cholinergique de l'innervation parasympathique favorise la croissance tumorale en inhibant la réponse des LT dans un modèle orthotopique de PDAC. Lorsque le nerf parasympathique est stimulé, l'acétylcholine est libérée par les fibres postganglionnaires. Cette dernière inhibe le recrutement des LT CD8 vers la tumeur par l'intermédiaire de CCL1 et inhibe directement la production d'IFN γ par les LT CD8, réduisant ainsi le ratio Th1/Th2 dans le microenvironnement tumoral (M.-W. Yang et al. 2020). Le blocage de l'innervation parasympathique par une vagotomie a permis une amélioration de la survie des souris atteintes de PDAC (Partecke et al. 2017).

F.2.3. Innervation sensorielle dans le PDAC

Enfin, le PDAC est innervé de fibres sensorielles. Les facteurs neurotrophiques sécrétés par les cellules tumorales peuvent induire la prolifération des fibres nerveuses, y compris des nerfs sensoriels. À leur tour, les nerfs sensoriels ont été montrés comme favorisant la migration et l'invasion des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* en libérant des facteurs neurotrophiques ou des chimiokines (Hirth et al. 2020; Jurcak et al. 2019; Bapat et al. 2016). Dans un microenvironnement pauvre en nutriments, les nerfs sensoriels en développement peuvent également sécréter de la sérine exogène pour maintenir la survie des cellules cancéreuses (Banh et al. 2020).

F.2.4. Invasion périnerveuse

L'invasion périnerveuse (IPN) est une caractéristique histologique observée dans différents cancers dont le PDAC, qui se définit par la présence de cellules tumorales dans au moins 33% de la circonférence des nerfs (Liebig et al. 2009). L'IPN a été observée chez plus de 80% des patients

atteints de PDAC et elle est associée à une rechute postopératoire et à l'apparition de métastases (Ferdoushi et al. 2021; N. Kondo et al. 2015). Parallèlement, les cellules tumorales peuvent produire et libérer des facteurs neurotrophiques tels que le NGF ou le BDNF (facteur neurotrophique dérivé du cerveau) pour favoriser l'innervation tumorale (Huan Wang et al. 2021). Dans le modèle murin KPC développant spontanément un PDAC, cette innervation est augmentée. En effet, le nombre et la densité des nerfs sensoriels (identifiés par le marqueur CGRP (calcitonin gene-related peptide)) sont multipliés par cinq (Hirth et al. 2020). De manière intéressante, l'analyse d'échantillons cliniques de patients atteints de PDAC montre également une corrélation négative entre la densité des fibres nerveuses (identifiées par le marqueur GAP-43 (Growth Associated Protein 43)) dans la tumeur et la survie des patients (Iwasaki et al. 2019).

F.3. Interactions des nerfs avec les cellules tumorales et stromales

L'IPN est un processus au cours duquel les cellules cancéreuses envahissent et se propagent le long des nerfs périphériques. L'IPN implique une interaction complexe entre les nerfs (comprenant les cellules de Schwann) et les cellules tumorales mais aussi différentes cellules du microenvironnement, notamment les cellules immunitaires et les CAFs (Faulkner et al. 2019; Reavis, Chen, and Drapkin 2020; Knops et al. 2020).

F.3.1. Dialogue des cellules tumorales vers les neurones

Les cellules tumorales interagissent étroitement avec les composants nerveux en libérant des facteurs neurotrophiques ou des exosomes, créant ainsi des niches périneurales qui fournissent un environnement favorable à leur survie et à leur invasion, stimulant à leur tour la croissance des nerfs (Silverman et al. 2021). Les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'IPN sont régulés par différents facteurs tels que le NGF, le facteur neurotrophique dérivé des lignées cellulaires gliales (GDNF) et les récepteurs correspondants (trkA et GFR α 1 respectivement) (Almagro et al. 2021). Les cellules tumorales peuvent endommager la gaine neuronale, activant ainsi les fibres nerveuses nociceptives *via* des médiateurs sécrétés (tels que CCL2, CXCL2...) ou de stimuli provenant de la MEC. Cela entraîne la libération de neuropeptides pro-inflammatoires à partir des terminaisons nerveuses périphériques, favorisant ainsi la propagation de la tumeur et provoquant des douleurs (W. Wang et al. 2020). Dans le PDAC, les cellules tumorales peuvent favoriser l'IPN *via* la sécrétion de chimiokines mais également l'expression de certains récepteurs. Par exemple, CX3CL1 est une chimiokine transmembranaire fortement exprimée par de nombreux neurones, et elle médie l'adhésion des cellules aux nerfs périphériques. La surexpression de son récepteur CX3CR1 dans le PDAC est associée à l'IPN et à une rechute précoce après opération (Marchesi et al. 2008). En dehors des

chimiokines, la Sémaforine 3D (SEMA3D, protéine sécrétée jouant un rôle clé dans le guidage axonal et le développement neuronal) produite par les cellules tumorales peut se fixer et activer la Plexine D1 (PLXND1, récepteur) des neurones du ganglion rachidien dorsal pour favoriser l'IPN et ainsi augmenter l'invasion des cellules tumorales du PDAC. Des niveaux d'expression élevés de SEMA3D et PLXND1 ont été confirmés dans des échantillons humains de PDAC associés à l'IPN (Jurcak et al. 2019). D'autres types cellulaires tels que les PSCs, surexprimant le NGF et le GDNF dans le microenvironnement tumoral, contribuent également à l'IPN. Une étude de Peng et ses collaborateurs montre que les exosomes dérivés de cellules tumorales pancréatiques humaines contenant le miR-21-5p, stimulé par le NGF provenant des PSCs, activent l'effet Warburg dans les neurones, augmentent l'expression de gènes de nocicepteurs et favorisent l'IPN (Peng et al. 2022).

F.3.2. Dialogue des neurones vers les cellules tumorales

Les cellules de Schwann entourant les neurones, en interaction avec les cellules tumorales de PDAC, participent également à l'apparition et au développement de l'IPN. En effet, la cytokine CCL7 sécrétée par les cellules de Schwann augmente la migration, l'invasion et l'expression de l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase 1 (TIMP1) des cellules tumorales pancréatiques humaines *via* la voie CCR1/STAT2. TIMP1 favorise à son tour la prolifération et la migration des cellules de Schwann en se liant au récepteur CD63 activant ainsi la signalisation PI3K/AKT (Z. Tian et al. 2022). Les cellules de Schwann peuvent aussi renforcer l'agressivité (migration, invasion, tumorigénicité) des cellules tumorales de PDAC en libérant du TGFβ. En effet, une étude de Roger et ses collaborateurs montre que le milieu conditionné par les cellules de Schwann contient de grandes quantités de TGFβ capable d'activer la voie de signalisation TGFβ-SMAD dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines *in vitro*. De plus, l'équipe montre que dans des échantillons humains de PDAC, des niveaux élevés d'activation de la signalisation du TGFβ sont positivement corrélés à l'invasion périnerveuse (Roger et al. 2020). Une autre étude menée par Deborde et ses collaborateurs montre que les cellules de Schwann humaines activées par les cellules cancéreuses pancréatiques humaines *via* c-Jun peuvent former des rails qui favorisent la migration (*in vitro*, en co-culture) et l'invasion (en 3D dans un matrigel) des cellules tumorales dans le cancer du pancréas. Les cellules de Schwann non myélinisantes formant ces rails d'invasion présentent des signatures d'expression génique associées à une survie réduite chez les patients atteints d'un PDAC (Deborde et al. 2022). Enfin, une étude récente de Sun et ses collaborateurs a caractérisé la signature génique des cellules de Schwann non myélinisantes associées aux tumeurs (TASc) dans le PDAC (par transcriptomique à cellule unique de cellules provenant de 24 patients atteints de PDAC). Cette équipe montre une corrélation entre l'abondance de TASc et un pronostic défavorable chez les patients atteints de PDAC. La déplétion *in vivo* des TASc (par la toxine diphtérique) dans le pancréas a atténué la tumorigénèse des souris KPC.

De plus, l'expression de PVT1 (ARN long non codant) par les TASC, induite par l'IL-6 sécrété par les cellules tumorales a permis de moduler le métabolisme de la kynurénine favorisant la croissance tumorale *in vitro*. Cette croissance est supprimée lorsque l'expression de PVT1 par les TASC est diminuée (par knock-out) (C. Sun et al. 2023).

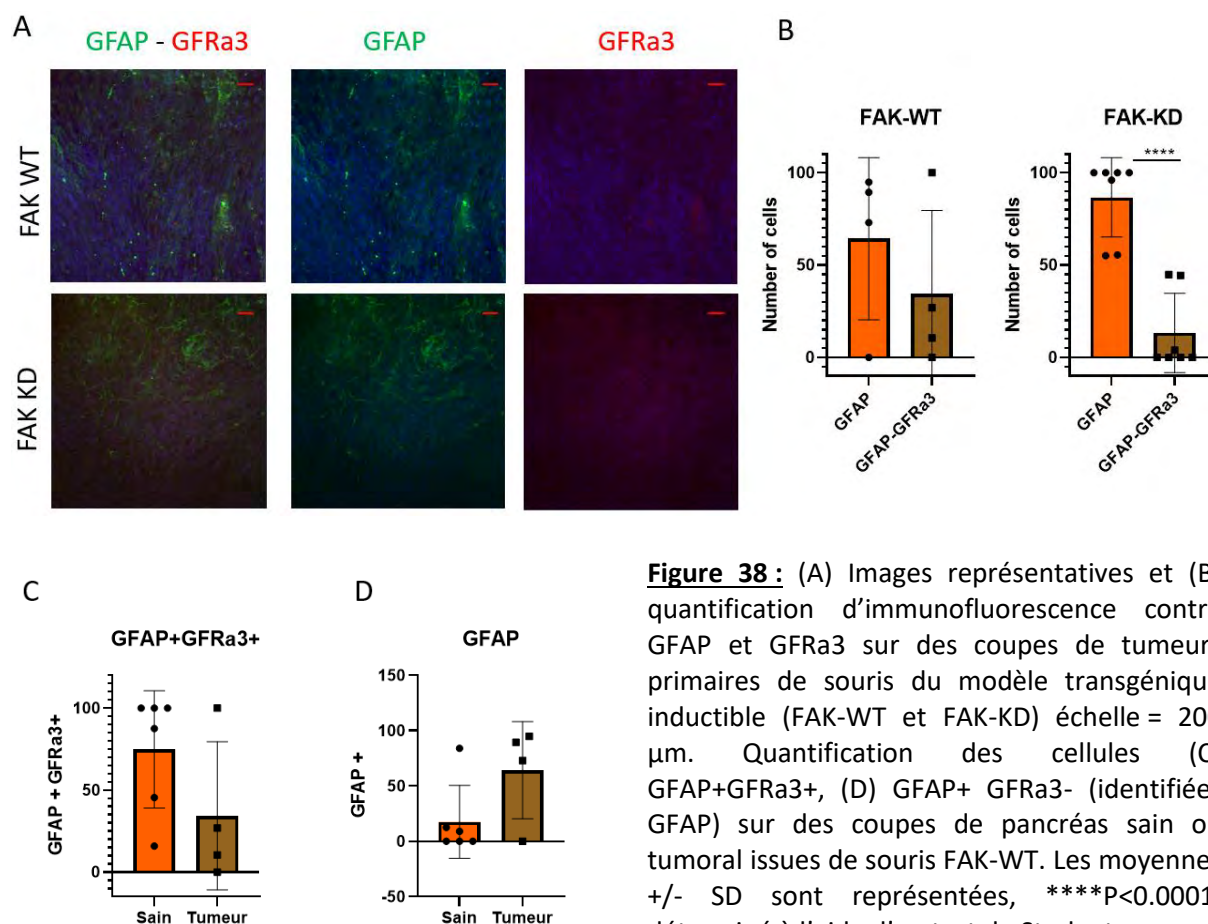
F.3.3. Interactions des neurones avec les cellules stromales

Les cellules de Schwann interagissent également avec les cellules du microenvironnement. Par exemple, la cytokine CCL2 libérée par les cellules de Schwann attire les monocytes inflammatoires exprimant CCR2, les recrutant préférentiellement sur le site de l'IPN (montré *in vivo* dans un modèle de souris greffées avec des cellules tumorales pancréatiques humaines dans le nerf sciatique), où ils se différencient en macrophages et renforcent l'invasion neuronale par des processus médiés par la cathepsine B (Bakst et al. 2017). De manière intéressante, dans l'étude récente menée par Sun et ses collaborateurs qui a caractérisé la signature génique des cellules de Schwann non myélinisantes associées aux tumeurs (TASC) dans le PDAC, les auteurs montrent une corrélation entre l'abondance de TASC et un microenvironnement tumoral immunosuppresseur chez les patients atteints de PDAC avec notamment une augmentation de la présence de MDSCs et de lymphocytes Tregs. De plus, les patients ayant une faible infiltration de TASC sont associés à une infiltration importante de lymphocytes T CD8. Enfin, la diminution des TASC par un inhibiteur, le fluorocitrate (inhibiteur du cycle de Krebs connu pour bloquer la prolifération des astrocytes et des cellules de Schwann) a rendu les souris (modèle de greffe orthotopique de cellules de schwann et cellules tumorales pancréatiques murines) plus sensibles à l'immunothérapie, soulignant le rôle important des TASC dans la résistance immunitaire du PDAC (C. Sun et al. 2023). Xue et ses collaborateurs ont récemment montré par des analyses de transcriptomique spatiale et séquençage ARN à l'échelle de la cellule unique, que les cellules de Schwann peuvent impacter l'agressivité des cellules du microenvironnement tumoral et notamment les CAFs. En effet, les cellules de Schwann induisent la différenciation des PSCs mais aussi des CAFs (avec des caractéristiques de myCAFs) issus de patients vers un sous-type plus malin, les iCAFs (CAFs inflammatoires), *via* la sécrétion d'IL-1 *ex vivo* (montré par ajout de milieu conditionné de cellules de schwann de rat sur les CAFs) (Xue et al. 2023).

F.4. Cellules de Schwann dans le modèle transgénique inducible

Dans notre modèle nous utilisons le promoteur GFAP afin d'inactiver FAK spécifiquement dans les PSCs. Il est maintenant clair que la GFAP n'est pas spécifique de ces cellules et qu'elle peut être exprimée par les cellules gliales du système nerveux telles que les astrocytes et les cellules de Schwann. Lorsque nous avons commencé le projet, peu de choses étaient connues sur le rôle des

cellules de Schwann dans le PDAC et notamment dans l'invasion tumorale. Nous avons donc réalisé une collaboration avec le Dr. Fanny Mann et Martha Montserrat qui étudient le rôle de la plasticité neurale dans le développement du cancer à l'Institut de Biologie du Développement de Marseille. Afin de déterminer la proportion de cellules GFAP+ qui sont des cellules de Schwann dans notre modèle transgénique, l'équipe du Dr Fanny Mann a transparisé des coupes épaisses de nos tumeurs et analyser par IF les cellules GFAP+ GFRa3- correspondant aux PSCs et les cellules GFAP+ GFRa3+ correspondant aux cellules de Schwann. Les résultats montrent, dans les tumeurs FAK-WT et FAK-KD, que les cellules GFAP+ GFRa3+ (Schwann) sont moins représentées que les cellules GFAP+ GFRa3- (PSCs) (Fig 38.A-B). De plus, des marquages sur coupes de pancréas sain ou tumoral issues de souris du groupe FAK-WT ont été réalisés. De manière intéressante, dans la tumeur, le nombre de cellules GFAP+ GFRa3+ correspondant aux cellules de Schwann est diminué comparé au tissu sain (Fig 38.C) alors que le nombre de PSCs (GFAP+ GFRa3-) est augmenté (Fig 38.D). Cependant, le nombre de cellules de Schwann est non négligeable. Etant donné que les cellules de Schwann peuvent favoriser l'invasion tumorale dans le PDAC, l'interprétation de nos résultats dans le modèle inductible doit prendre en compte l'implication possible des cellules de Schwann, et notamment de l'inactivation de FAK dans ces cellules. Ce point sera discuté dans la partie Discussion de ma thèse.



Matériel et Méthodes (supplémentaire)

La majorité des techniques utilisées dans le chapitre III (Résultats supplémentaires) ont été décrites dans l'article principal.

Modèle transgénique inductible:

Les souris ont été générées par différents croisements. Des souris FAK fl/fl généreusement fournies par le Dr. Guan (College of Medicine, Cincinnati, USA) ont d'abord été croisées avec des souris GFAP-Cre(ERT2) provenant du laboratoire Jackson (Jackson Repository), afin d'obtenir des souris FAK fl/WT GFAP-Cre(ERT2). Ces souris sont ensuite croisées avec des souris FAK fl/fl afin d'obtenir des souris FAK fl/fl GFAP-Cre(ERT2). Ces dernières sont ensuite croisées avec des souris FAK WT/KD (généreusement fournies par le Dr. Schlaepfer, UCSD San Diego, USA) afin d'obtenir des souris FAK fl/WT GFAP-Cre(ERT2) ou FAK fl/KD GFAP-Cre(ERT2). Afin de déléter l'allèle floxé de FAK, les souris sont ensuite traitées au tamoxifène, soit par injection intra-péritonéal (100µl) tous les 2 jours pendant 14 jours (7 injections) à 20mg/ml (Sigma #T5648) (dilué dans de l'huile de maïs) soit par l'alimentation contenant 0.25g/kg tamoxifène + 5% saccharose. Ce régime alimentaire a été donné aux souris pendant 4 semaines (5 jours de régime Tamoxifène et 2 jours de régime normal chaque semaine). Après 2 semaines de pause, les souris ont été greffées avec des cellules tumorales de PDAC en intra-pancréatique. Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux directives institutionnelles et à la législation européenne sur la protection des animaux et ont été approuvées par l'agence gouvernementale responsable (Numéro d'agrément : 2019061900061441).

Anticorps:

Anticorps	Usage	Référence	Companie	Dilution
anti-CD8a	IHC	98941S	Cell signaling	1/100
anti-périostine	IHC	Sc67233	Santa cruz	1/100
anti-MECA-79	IHC	553863	BD Biosciences	1/100
anti-GFAP	IF	Z0334	DAKO	1/500
anti-GFRa3	IF	AF2645	R&D systems	1/300

Transparisation sur coupes épaisses: Les souris ont été anesthésiées (100 mg/kg de kétamine et 10mg/kg xylazine), perfusées en intracardiaque avec 20mL d'une solution froide (4°C) de PBS 1X puis perfusées avec 50mL d'une solution froide (4°C) de PFA 4%. Le pancréas/tumeur a ensuite été récupéré et fixé dans la PFA 4% pendant 1h à RT sous agitation (20 rpm) puis lavé 3x10 min avec du PBS 1X à RT sous agitation (20 rpm) avant d'être inclus dans de l'agarose 4% puis coupé en tranches

de 500µm d'épaisseur au vibratome (Leica VT 1200S). L'agarose a ensuite été éliminée et les coupes conservées dans de la PFA 0.1% à 4°C toute la nuit. Les coupes ont été lavées 3x5min dans du PBS puis déshydratées dans des bains successifs de solutions de méthanol (MeOH) à 20%, 40%, 60%, 80%, 100% (diluées dans du PBS 1X), pendant 10 min, avant d'être blanchies 1h dans une solution fraîche (à RT et à l'obscurité) de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et MeOH (5 Volumes de 30% H₂O₂ dans 1 Volume de MeOH). Les coupes ont été réhydratées avec des bains successifs de solutions de méthanol à 100%, 80%, 60%, 40%, 20% (diluées dans du PBS 1X) puis lavées dans du PBS 1X pendant 10min avant d'être perméabilisées (400ml de solution PTX.2 (100ml PBS 10X + 2ml Triton X100) + 11.5g de glycine + 100ml DMSO + azide) à 37°C pendant 2h puis bloquées (solution contenant 42ml de PTX.2 + 3ml de sérum d'âne + 5ml DMSO + azide) toute la nuit sous agitation à 37°C. Les coupes ont été incubées avec les anticorps primaires dilués dans une solution de PTWH (100ml PBS 10X + 2ml Tween-20 + 1ml héparine à 10mg/ml + azide) 5% DMSO 3% sérum d'âne à 37°C sous agitation pendant 24h puis lavées 6x30min à RT dans la solution PTWH et incubées avec les anticorps secondaires couplés au fluorophore (dilués dans PTWH 3% sérum d'âne) sous agitation toute la nuit. Les coupes ont ensuite été lavées 6x30min à RT dans la solution PTWH puis transparisées. Pour la transparisation, les échantillons ont été déshydratés avec des bains successifs de solutions de MeOH à 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 100% pendant 10 min puis incubés 3h dans une solution de 2/3 dichlorométhane (DCM) 1/3 MeOH. Les coupes ont par la suite été incubées dans une solution de 100% DCM pendant 10 minutes (délipidation) puis dans du DBE pour ajuster l'indice de réfraction. Enfin, les coupes ont été montées avec du Kwik-sil epoxy sur une lame et observées au microscope confocal LSM 780.

CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Afin d'étudier le rôle de FAK dans les fibroblastes pancréatiques, nous avons tout d'abord développé des modèles de co-greffe avec soit des MEFs soit des PSCs. Les PSCs sont des fibroblastes pancréatiques plus différenciés que les MEFs qui sont des fibroblastes embryonnaires. Contrairement au modèle de MEFs, l'inactivation de FAK au sein des PSCs a entraîné une réduction significative de la croissance tumorale. Ce résultat met en évidence que, bien que les PSCs ne donnent naissance qu'à seulement 10% des CAFs qui sont principalement des CAFs myofibroblastiques (Helms et al. 2022), une fois activées par les cellules tumorales (Y. Zhou et al. 2019), elles deviennent des cellules stromales clés favorisant la progression tumorale notamment dépendantes de l'activité de FAK. De plus, dans le modèle de co-greffe avec les PSCs, bien que l'inactivation de FAK dans les fibroblastes n'ait pas normalisé les vaisseaux sanguins de manière significative, l'association de cette inactivation avec des chimiothérapies a renforcé la réduction tumorale induite par l'inactivation fibroblastique de FAK.

De manière surprenante, cette association avec les chimiothérapies montre un effet additif plutôt que l'effet synergique attendu en raison de la légère normalisation des vaisseaux. En se basant sur la littérature, nous pouvons imaginer que l'augmentation de la pression de fluide interstitiel (PFI) pourrait être la cause de ce phénomène. En effet, la délivrance des médicaments ne dépend pas uniquement de la perméabilité des vaisseaux, mais aussi de la barrière physique créée par la différence de pression entre les vaisseaux et les tissus environnants, notamment la PFI, qui est fortement augmentée en cas de cancer (Ferretti et al. 2009). Comme l'acteur principal de l'augmentation de la PFI est l'acide hyaluronique (HA), un glycosaminoglycane linéaire de grande taille à charge négative qui absorbe et retient l'eau (P P Provenzano et Hingorani 2013), il serait intéressant d'analyser son expression dans nos modèles.

Un inconvénient majeur des modèles de co-greffe est que l'inactivation de FAK dans les fibroblastes est partielle. En effet, dans le groupe FAK-KD, les fibroblastes endogènes expriment toujours un FAK-WT. C'est pourquoi nous avons développé le modèle transgénique qui nous permet d'inactiver FAK dans tous les fibroblastes pancréatiques. Globalement, le modèle transgénique résume ce qui est observé dans le modèle de co-greffe avec les PSCs à savoir que l'inactivation de FAK dans les cellules GFAP+ induit une réduction de la tumeur primaire, une tendance à la diminution des métastases et de la rigidité tumorale, un remodelage matriciel avec une tendance à la diminution des collagènes fibrillaires et à l'augmentation du collagène IV, ainsi qu'une normalisation vasculaire (qui doit être confirmée sur une plus grande cohorte). De plus, dans ce modèle, l'inactivation de FAK induit une meilleure infiltration des LT CD8 dans la tumeur par rapport au modèle de co-greffe avec les PSCs. Alors que dans les modèles de co-greffe nous n'avons utilisé que des souris femelles, dans le modèle transgénique, mâles et femelles ont été utilisés. De manière surprenante, nous avons observé des

différences selon le sexe. En effet, alors que l'inactivation de FAK dans les PSC chez les femelles semble induire un remodelage matriciel plus important que chez les mâles, l'inactivation de FAK chez les mâles impacte de manière plus importante la croissance de la tumeur primaire, les métastases, la formation de structures lymphoïdes tertiaires, la présence de HEV et l'infiltration des lymphocytes T CD8. De plus, nous avons observé que la progression tumorale est bien plus rapide chez les mâles que les femelles. Nous n'avons pas de réelle explication quant à ces résultats, cependant nous savons que le PDAC présente une incidence légèrement plus élevée chez les hommes par rapport aux femmes. En 2020, une étude reporte 5.7 nouveaux cas pour 100 000 hommes chaque année dans le monde, et 4.1 nouveaux cas pour 100 000 femmes chaque année dans le monde (Sung et al. 2021; Ferlay et al. 2021). Les estimations de l'American Cancer Society pour le cancer du pancréas aux États-Unis en 2023 sont les suivantes : environ 64 050 personnes (33 130 hommes et 30 920 femmes) recevront un diagnostic de cancer du pancréas et environ 50 550 personnes (26 620 hommes et 23 930 femmes) décéderont des suites de ce cancer ("Key Statistics for Pancreatic Cancer" n.d.). Les différences mâles / femelles ont été observées dans d'autres cancers solides tels que le mélanome. Dans ce cancer, les données épidémiologiques indiquent que les femmes ont un avantage par rapport aux hommes en termes d'incidence, de progression et de survie (avec 174 000 hommes touchés dans le monde en 2020 contre 151 000 femmes) (Sung et al. 2021). Dakup et ses collaborateurs montrent que les souris femelles développant un mélanome (par greffe sous-cutanée de cellules tumorales humaines) présentent un volume tumoral significativement réduit et une croissance tumorale plus lente par rapport aux souris mâles et que ceci est corrélé à des populations plus élevées de lymphocytes T CD4 et CD8 dans le sang circulant et les tumeurs. Ces constatations suggèrent que le système immunitaire pourrait jouer un rôle dans les différences sexuelles observées dans le cancer (Dakup et al. 2020). Or, dans notre modèle transgénique inductible nous observons également des populations plus élevées de LT CD8 chez les femelles (3 fois plus de LT CD8 dans la condition basale FAK^{/WT} GFAP-Cre-ERT) par rapport aux mâles, ce qui pourrait expliquer pourquoi la progression tumorale est plus lente chez les femelles. Le sexe peut influencer la progression tumorale chez les souris de plusieurs manières, principalement en raison des différences biologiques et hormonales entre les mâles et les femelles. En effet, en plus du système immunitaire qui est plus robuste chez les femelles et qui peut influencer la progression tumorale, les hormones sexuelles peuvent jouer un rôle important. Par exemple, les œstrogènes ont été montrés comme ayant un effet anti-tumoral dans les cancers du foie et du côlon (qui présentent une prédominance chez les hommes), mais un effet pro-tumoral pour les méningiomes et le cancer de la thyroïde (qui présentent une prédominance chez les femmes) (Rubin et al. 2020). La programmation épigénétique spécifique au sexe peut aussi jouer un rôle dans les différences de susceptibilité à la tumorigenèse entre les mâles et les femelles mais aussi dans l'hétérogénéité tumorale et la réponse aux

traitements (Rubin et al. 2020). Une étude menée par Dubois et ses collaborateurs a également montré une différence mâle/femelle dans l'angiogenèse tumorale. En effet, Dubois et ses collaborateurs montrent une plus grande lymphangiogenèse et angiogenèse dans l'adénocarcinome pulmonaire chez les femmes que chez les hommes et dans un modèle murin immunocompétent de xénogreffe de cellules tumorales murines (Dubois et al. 2019). Les différences entre les sexes au niveau des cellules endothéliales, des cellules progénitrices endothéliales et des facteurs angiogéniques circulants contribuent aux disparités sexuelles dans l'angiogenèse tumorale. Les cellules endothéliales mâles et femelles expriment des niveaux différents de récepteurs de facteurs de croissance, d'intégrines et de molécules d'adhésion cellulaire, ce qui entraîne des capacités de migration et de prolifération différentes, ainsi que des mécanismes angiogéniques dépendant du sexe (Robert 2023). Enfin, les mâles et femelles présentent des niveaux différents de facteurs circulants pro-angiogéniques et anti-angiogéniques, ce qui pourrait également contribuer aux différences entre les sexes dans l'angiogenèse tumorale (Rubin et al. 2020). Il serait intéressant d'étudier les mécanismes sous-jacents aux différences mâles/femelles dans notre modèle transgénique.

Notre étude montre que l'inactivation de FAK dans le modèle transgénique inducible induit un phénotype plus prononcé concernant l'infiltration immunitaire que dans le modèle de co-greffe. Dans le modèle de co-greffe, il est clair que l'inactivation de FAK n'a pas lieu dans tous les PSCs puisque les PSCs endogènes expriment encore un FAK actif ce qui peut réduire l'effet de l'inactivation. Dans le modèle transgénique, nous induisons l'inactivation de FAK dans tous les PSCs ce qui expliquerait les différences observées entre les deux modèles. L'utilisation du promoteur GFAP afin de cibler les PSCs est bien connue dans la littérature. L'équipe de Ding a démontré en 2009 que la GFAP est exprimée spécifiquement dans les PSCs *in vitro* et *in vivo*, et des études ultérieures l'ont confirmé dans les PSCs humaines de PDAC ainsi que chez le rat (Ding et al. 2009, 200; Cabrera et al. 2014; Kordes et al. 2012). Cependant, il est maintenant clair que dans notre modèle transgénique, l'inactivation de FAK a lieu dans toutes les cellules GFAP+ ce qui ne correspond pas seulement aux fibroblastes mais aussi aux cellules neuronales. En 2017, Nielsen et ses collaborateurs affirment même que la GFAP n'est pas exprimée dans les PSCs humaines de pancréas sain mais seulement dans les axones et cellules de Schwann (Nielsen, Mortensen, and Detlefsen 2017). Or, les cellules de Schwann exprimant la GFAP jouent un rôle crucial dans la progression tumorale en favorisant la migration, l'invasion et la tumorigénicité des cellules cancéreuses pancréatiques (Deborde et al. 2022). Nous montrons dans notre modèle, que quel que soit le groupe (FAK-WT ou -KD), la majorité des cellules GFAP+ correspondent aux PSCs. Malgré cela, un nombre non négligeable de cellules de

Schwann exprimant la GFAP subsiste dans notre modèle, nécessitant une considération essentielle de l'influence de FAK dans ces cellules en raison de leur capacité à favoriser l'invasion tumorale.

FAK est d'ailleurs essentielle pour le développement des cellules de Schwann chez la souris. En son absence (par utilisation de FRNK, ADNc codant pour une protéine non kinase apparentée à FAK, bloquant l'activité endogène de FAK), les cellules de Schwann de rat présentent une altération de prolifération *in vitro* et d'organisation autour des axones, et ne peuvent pas myéliniser les nerfs périphériques *in vivo*. De plus, FAK favorise l'extension et la contractilité des cellules de Schwann immatures (en favorisant l'activation "inside-out" des intégrines au niveau des adhésions naissantes), maintenant ainsi leur prolifération et empêchant leur différenciation prématurée (Grove and Brophy 2014). Une autre étude menée par la même équipe, montre que l'absence de FAK *in vivo* (modèle murin de délétion conditionnelle de FAK dans les cellules de Schwann (*Fak^{flox/flox}/Cnp-Cre*)) entraîne une sévère altération de la myélinisation par les cellules de Schwann, due à un défaut de prolifération cellulaire (voie indépendante de PI3K/AKT, impliquant probablement la laminine) plutôt qu'à des problèmes d'extension des allongements (Grove et al. 2007). Enfin, une étude menée par Qin et ses collaborateurs révèle que l'activation de FAK par l'intégrine $\beta 1$ participe à la prolifération des cellules de Schwann de rat induite par le Facteur de Croissance Concentré (CGF) *in vitro* (Qin et al. 2016). Afin de déterminer quel est l'impact de l'inactivation de FAK dans les cellules de Schwann dans notre modèle transgénique, il serait nécessaire de générer un modèle transgénique inducible dans lequel la Cre recombinase serait sous le contrôle du promoteur Sox10, exprimé par les cellules de Schwann (Finzsch et al. 2010). Après greffe intra-pancréatique des cellules tumorales, nous pourrions caractériser le modèle (croissance tumorale, métastases...) et comparer le phénotype à celui du modèle transgénique inducible sous la dépendance du promoteur GFAP. Ceci nous permettrait de déterminer la part du rôle de FAK dans les cellules de Schwann versus dans les PSCs dans la progression tumorale.

Nous montrons dans tous nos modèles (transgénique inducible et co-greffe avec PSC ou MEF) un remodelage matriciel important. En effet, des marquages Rouge Sirius nous ont permis d'observer une diminution (significative ou non, selon les modèles) des collagènes fibrillaires après inactivation de FAK dans les fibroblastes (MEF, PSC et cellules GFAP+). De plus, grâce au matrisome réalisé dans le modèle de co-greffe avec les MEFs, nous avons confirmé que l'inactivation de FAK dans les fibroblastes induit une diminution des collagènes fibrillaires (collagène I et III). Ceci confirme également les résultats de notre précédente étude qui a révélé que l'inactivation pharmacologique de FAK dans les CAFs humains réduisait l'expression et le dépôt de certaines protéines de la MEC, notamment le Col1a1 et Col1a2, qui sont associées à un mauvais pronostic chez les patients atteints de PDAC (Zaghdoudi et al. 2020). Les collagènes peuvent avoir un rôle pro-tumoral de par leur quantité mais aussi leur organisation. En effet, l'organisation du collagène proposée sur la base des

TACS (Tumor-Associated Collagen Signature) peut influencer la progression tumorale. Alors que les TACS-1 forment une coque autour de la tumeur empêchant ainsi sa dissémination, les TACS-3 sont alignées de sorte à favoriser l'invasion tumorale (Conklin et al. 2011). De plus, l'alignement des fibres de collagène par les CAFs peut empêcher l'infiltration de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T dans la tumeur (montré sur des tumeurs de patients atteints de cancer du poumon) (Grout et al. 2022). Il serait donc intéressant d'étudier l'organisation matricielle dans le modèle transgénique et de co-greffe avec les PSCs, d'autant plus que nous avons précédemment montré que l'inactivation de FAK dans les MEFs induisait une réorganisation de la MEC, qui passait de structures de type TACS-3 à une organisation similaire aux TACS-1 (Zaghdoudi et al. 2020). En outre, par leur simple présence, les collagènes peuvent faciliter la croissance tumorale (cf Introduction chapitre I). Par exemple, le collagène I, qui est diminué dans notre modèle d'inactivation de FAK, permet la formation de colonies et facilite la croissance de cellules tumorales gastriques humaines (dans une culture en 3D avec du collagène) (Lv et al. 2021). En plus des collagènes, certaines glycoprotéines telles que la périostine favorisent la progression tumorale. En effet, la périostine, qui est fortement exprimée dans le stroma du PDAC, est significativement associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de PDAC et favorise la tumorigénécité de ce cancer. La délétion de cette protéine (par shARN) dans les fibroblastes humains a permis de diminuer la prolifération tumorale et les métastases dans un modèle murin de greffe de cellules tumorales humaines et la clonogénicité des cellules tumorales *in vitro* (Yang Liu et al. 2016a). Une étude récente menée par Karakas et ses collaborateurs a montré que la suppression de périostine dans les fibroblastes humains par Crispr-Cas9 induit une réduction du collagène dans des sphéroïdes, une meilleure infiltration de cellules NK et la mort des cellules tumorales pancréatiques humaines (Karakas et al. 2023). De manière intéressante, nous montrons que cette protéine est diminuée dans le matrisome lorsque nous inactivons FAK dans les MEFs. Ces résultats soutiennent l'effet bénéfique de l'inactivation de FAK dans les fibroblastes. Il est nécessaire de refaire le matrisome dans le modèle de co-greffe avec les PSC et surtout dans le modèle transgénique, d'autant plus que nous montrons dans ce modèle une diminution de la rigidité tumorale au sacrifice lorsque FAK est inactivée dans les cellules GFAP+.

Malgré une diminution globale des protéines matricielles dans la condition où FAK est inactivé dans les MEFs, nous révélons grâce au matrisome une augmentation des protéines de la membrane basale telles que les laminines, le nidogène et le collagène IV. En 2018, Barrett et ses collègues ont réalisé un matrisome sur des souris du modèle KTC (Kras^{LSL-G12D}/+Tgfb^{r2flox/+}Ptf1a-Cre) développant un PDAC à différents stades de la pathologie. Ils ont identifié diverses signatures de la MEC et ont montré qu'au cours du développement tumoral, certaines protéines matricielles telles

que les laminines et le collagène IV sont diminuées tandis que d'autres protéines comme le biglycan sont augmentées (Barrett et al. 2018). Or, notre étude met en évidence une augmentation des laminines ($\alpha 2$, $\beta 1$, $\alpha 1$ et $\alpha 5$) et du collagène IV (normalement perdues au cours du développement tumoral). Il est essentiel de souligner qu'une étude rétrospective menée sur 231 patients atteints de PDAC a mis en évidence que la réduction de laminines est associée à une diminution de la survie globale et de la survie sans progression des patients (van der Zee et al. 2012). Ainsi, nos résultats confirment l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de FAK dans les fibroblastes permet d'empêcher, au moins partiellement, les changements d'expression des protéines de la MEC observés lors du développement d'un PDAC. Les protéines de la membrane basale (MB) sont impliquées dans la formation et la maturation des vaisseaux sanguins. L'inactivation de FAK dans les MEFs entraîne une augmentation d'au moins une de ces protéines, le collagène IV, autour des vaisseaux (nous confirmerons ces résultats prochainement en réalisant un co-marquage CD31-collagène IV sur des coupes de tumeurs murines issues de nos modèles de co-greffe), ce qui est associé à une diminution de la perméabilité vasculaire, un facteur clé dans la régulation des processus métastatiques des cellules tumorales. L'ensemble de ces résultats indique que l'inhibition de l'activité kinase de FAK dans les MEFs, en influençant le remodelage de la MEC, normalise la MB entourant les vaisseaux et améliore ainsi la perfusion vasculaire.

Dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur la protéine la plus abondante des MB, le collagène IV. Le collagène IV présent dans la MEC interstitielle favorise la croissance et la migration tumorale tout en inhibant l'apoptose des cellules tumorales pancréatiques humaines (Daniel Öhlund et al. 2013a). Cependant, sa localisation dans les MB joue un rôle crucial puisque sa diminution au fur et à mesure de la progression tumorale favorise l'apparition de métastases et contribue à la perméabilité vasculaire impliquée dans la dissémination tumorale (Koikawa et al. 2018; Barrett et al. 2018)(Kalluri 2003). Dans notre étude, nous avons observé que l'augmentation du collagène IV et son changement de localisation dans le groupe FAK-KD ne sont pas liés à une augmentation de la taille de la tumeur primaire mais au contraire à une diminution de celle-ci. Ces résultats suggèrent que dans la progression tumorale, c'est la localisation plutôt que la quantité de collagène IV qui joue un rôle crucial. Nous avons cherché à caractériser les mécanismes impliqués dans la régulation du collagène IV autour des vaisseaux et nous montrons que l'augmentation de production de collagène IV autour des vaisseaux n'est pas due à la production directe de collagène IV par les fibroblastes puisque lorsque ces derniers expriment un FAK inactif, ils produisent moins de collagène IV que lorsque FAK est actif (Zaghdoudi et al. 2020). Nos résultats ne valident pas non plus l'hypothèse d'un mimétisme vasculaire directement par les fibroblastes. Par contre, nos résultats (encore préliminaires) soutiennent l'hypothèse d'une interaction indirecte entre les fibroblastes, plus particulièrement les

myCAFs et les péricytes *via* des facteurs solubles résultant en la production de collagène IV par ces cellules. Dans le cas où nous confirmerions un dialogue passant par les péricytes, nous chercherons à déterminer quel(s) facteur(s) sécrété(s) par les CAFs est (sont) impliqué(s).

À ce jour, peu de choses sont connues sur la façon dont les cellules vasculaires régulent la sécrétion sélective de collagène IV. Une étude menée par Wang et ses collaborateurs montre que durant l'angiogenèse, l'oxyde nitrique favorise la synthèse du collagène IV par les cellules endothéliales de poumons (de cochon) *in vitro via* la voie de signalisation de la protéine kinase G (Huafang Wang and Su 2011). Or, les fibroblastes sont capables de produire de l'oxyde nitrique notamment lorsqu'ils sont stimulés par des cytokines ou lors d'une blessure favorisant ainsi leur synthèse de collagène (Witte et al. 2000). Une étude récente menée par Gross et ses collaborateurs a montré que la sécrétion du collagène IV dans la MB entourant les vaisseaux est régulée par la signalisation Notch dans les cellules endothéliales humaines. Par des techniques d'imagerie et de biochimie, l'équipe montre *in vitro* et *in vivo* que la GTPase Rab10, qui est sensible à Notch, joue un rôle crucial dans le trafic vésiculaire du collagène IV pendant le développement vasculaire (chez la souris et le poisson zèbre). En effectuant un knockdown de Rab10, une diminution de la sécrétion *de novo* de collagène IV est observée. De plus, Rab10 semble fonctionner en partenariat avec Rab25 pour acheminer l'enzyme lysyl hydroxylase 3 (LH3) vers les vésicules contenant le collagène IV, afin qu'elles soient sécrétées. Ainsi, la perte de Rab10 ou de Rab25 entraîne une déplétion de LH3 dans les vésicules contenant le collagène IV et une dégradation lysosomale rapide de ce collagène (Gross et al. 2021). Il serait donc intéressant de déterminer dans nos modèles si les fibroblastes peuvent interagir avec les cellules vasculaires (et plutôt les péricytes au vue de nos résultats) *via* la signalisation Notch ou la production d'oxyde nitrique afin de réguler la sécrétion du collagène IV.

Ayant observé une augmentation de production du collagène IV autour des vaisseaux, nous avons émis l'hypothèse que les vaisseaux seraient moins perméables et donc plus normaux. Dans un contexte tumoral, les vaisseaux présentent une structure désorganisée avec des cellules endothéliales qui perdent leur fonction de barrière résultant ainsi en une perméabilité vasculaire anormale (Hashizume et al. 2000). Nous pourrions penser que l'augmentation de perméabilité des vaisseaux est une bonne chose puisqu'en théorie elle permettrait une meilleure entrée des cellules immunitaires et des chimiothérapies. Cependant, cette perméabilité excessive ne favorise pas l'entrée des drogues dans la tumeur notamment à cause de l'augmentation de la pression de fluide interstitiel (qui est multipliée par 10 dans le PDAC) (Paolo P. Provenzano et al. 2012). En effet, l'entrée des drogues dans la tumeur dépend aussi de la barrière physique créée par la différence de pression entre les vaisseaux tortueux et perméables et le microenvironnement notamment la MEC qui est accumulée. Le principal acteur de cette pression de fluide interstitiel est l'acide hyaluronique

puisqu'il possède la capacité d'absorber et de retenir les molécules d'eau (P P Provenzano and Hingorani 2013). Réduire la perméabilité des vaisseaux est une caractéristique clé de la normalisation vasculaire. De manière intéressante, nous montrons dans le modèle de co-greffe avec les MEFs et dans le modèle transgénique (à confirmer sur une plus grande cohorte), que la perméabilité vasculaire est réduite dans la tumeur primaire et les sites métastatiques lorsque FAK est inactivée dans les fibroblastes. C'est pourquoi nous avons supposé que l'entrée des chimiothérapies serait meilleure dans la condition où FAK est inactivée dans les fibroblastes. Dans le modèle de co-greffe avec les MEFs, nous montrons de manière inattendue, que les chimiothérapies n'ont pas réduit la croissance tumorale (que ce soit dans le groupe FAK-WT ou -KD). Nous pourrions penser que ceci s'explique par une chimiorésistance intrinsèque des cellules tumorales mais ce n'est pas le cas puisque dans le deuxième modèle (PSC) de co-greffe, les chimiothérapies réduisent la croissance tumorale. Nos résultats montrent donc que la normalisation vasculaire induite par l'inactivation de FAK au sein des fibroblastes n'est pas suffisante pour améliorer la délivrance des chimiothérapies dans la tumeur, dans ce modèle, et que ceci pourrait s'expliquer par une pression de fluide interstitiel encore trop élevée. Il serait donc intéressant de mesurer l'acide hyaluronique (majoritairement responsable de cette pression de fluide interstitiel) présent dans les tumeurs issues du modèle de co-greffe avec les MEFs. Concernant le modèle de co-greffe des PSCs (avec R211 et 8305), nous observons une légère réduction de la perméabilité vasculaire dans la condition où FAK est inactivée dans les PSCs (comparé aux tumeurs où FAK est activée dans ces cellules). Nous avons ensuite combiné l'inactivation de FAK dans les PSCs avec soit de la gemcitabine soit du FOLFIRINOX. Dans notre étude, la combinaison des chimiothérapies avec l'inactivation de FAK dans les PSCs a permis de réduire considérablement les poids tumoraux que ce soit dans le modèle PSC + 8305 ou PSC + R211, en comparaison avec la condition non traitée où FAK est activée dans les PSCs. Il est important de noter que dans ces modèles, l'inactivation de FAK dans les PSCs, sans traitement, est suffisante pour réduire le poids des tumeurs (ce qui n'est pas le cas du modèle de co-greffe avec les MEFs), et que l'effet observé entre inhibition de FAK et chimiothérapie est un effet additif (mais non synergique). La normalisation vasculaire à elle seule n'est donc pas suffisante pour favoriser la délivrance des chimiothérapies, et supporte l'hypothèse de l'implication de la PFI et de l'HA dans les processus de résistance, comme évoqué dans le modèle de MEFs. Malgré cela, nos résultats montrant l'effet additif de l'inactivation de FAK avec les chimiothérapies sont encourageant d'autant plus qu'un inhibiteur de FAK (defactinib) est en essai clinique avec la gemcitabine. En effet, dans le PDAC, un essai de phase I (#NCT02546531) combinant le defactinib avec le pembrolizumab et la gemcitabine a été mené et semble prometteur. Parmi les 20 patients qui avaient un PDAC métastatique en progression après un traitement de première ligne (avant la combinaison des 3 médicaments), le taux de contrôle de la maladie était de 80 %, avec une réponse partielle et 15

patients présentant une maladie stable. La survie sans progression et la survie globale étaient respectivement de 3,6 et 7,8 mois (Wang-Gillam et al. 2022).

Il est important de noter que l'essai clinique inclut l'utilisation d'un inhibiteur de point de contrôle immunitaire (le pembrolizumab). Cette combinaison a été proposée sur la base des travaux du groupe de DeNardo rapportant que la suractivation de FAK dans les cellules tumorales de PDAC favorise la création d'un microenvironnement immunosuppresseur (modèle murin de PDAC), et que le traitement des souris avec un inhibiteur de FAK en combinaison avec la gemcitabine et des inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (anti-PD1 et/ou anti-CTLA4) prolonge considérablement la survie des animaux (Jiang et al. 2016). Nos travaux ont mis en évidence, à travers le modèle de co-greffe de cellules tumorales avec les MEFs, le rôle clé de l'activité kinase de FAK dans les fibroblastes puisque son inactivation induit une réduction d'infiltration des macrophages M2 dans la tumeur et augmentation des LT CD8 dans les zones fibrotiques (Zaghdoudi et al. 2020). Nous montrons dans le modèle de co-greffe avec les PSCs que l'inactivation fibroblastique de FAK entraîne une augmentation non significative de l'infiltration des LT CD8, mais dans ces tumeurs, une concentration accrue de LT CD8 est observée dans les zones périphériques riches en MEC, avec une corrélation négative significative entre la présence de collagènes fibrillaires et celle des LT CD8. De plus, nous montrons que les zones riches en périostine présentent une faible infiltration de LT CD8, indépendamment du statut d'activation de FAK dans les PSCs. Nos résultats soutiennent donc l'hypothèse d'une interaction entre l'infiltration immunitaire et les composants matriciels conduisant à leur séquestration en périphérie de la tumeur. De plus, l'inactivation de FAK dans les cellules GFAP+ du modèle transgénique entraîne également une augmentation (plus importante que le modèle de co-greffe) de l'infiltration des LT CD8 dans la tumeur. De manière intéressante, chez les femelles, le nombre de LT CD8 corrèle négativement avec la quantité de collagène III dans le groupe FAK-KD. Ces résultats sont très encourageants surtout dans le cadre du PDAC qui est un cancer dit « froid » (avec très peu d'infiltration immunitaire).

Dans notre étude, nous supposons que la quantité des protéines matricielles impacte l'infiltration des LT CD8 dans la tumeur mais la corrélation entre les deux n'a pas été montrée dans tous les groupes. Or, nous savons que l'infiltration des LT CD8 peut dépendre de l'organisation des collagènes et pas seulement de leur quantité. Salmon et ses collaborateurs ont pu montrer que sur des coupes de tumeurs humaines bronchiques non à petites cellules, les LT CD8 se concentrent au niveau des régions appauvries en fibronectine, protéine matricielle qui possède des sites de liaison au collagène I et qui conduit ainsi à différentes organisations (Salmon et al. 2012). Ainsi, l'étude de l'organisation et de la structure des collagènes fibrillaires dans nos modèles, plutôt que leur quantité, pourrait permettre de comprendre les facteurs régissant l'infiltration des LT CD8. Bien que la MEC joue un

rôle majeur dans l'influence de l'infiltration immunitaire, cette infiltration est un processus complexe dépendant de plusieurs paramètres essentiels, tels que l'activation des cellules par la présentation antigénique ou les facteurs solubles produits dans le microenvironnement, notamment les chimiokines qui régulent la migration des lymphocytes vers les tissus tumoraux. C'est pourquoi il serait également intéressant d'étudier les facteurs différenciellement sécrétés dans le plasma des souris FAK-WT vs FAK-KD dans nos deux modèles.

L'infiltration des LT CD8 peut aussi dépendre des structures lymphoïdes tertiaires (TLS). Les TLS sont des formations ressemblant à des ganglions lymphatiques qui se développent dans les tissus en réponse à une inflammation chronique ou à une infection persistante, notamment dans les tumeurs. Elles jouent un rôle crucial en favorisant et en organisant l'infiltration immunitaire et notamment en apportant différentes populations de cellules immunitaires, telles que les LT, les LB et les cellules dendritiques, renforçant ainsi la réponse du système immunitaire contre les cellules tumorales. Les TLS sont impliquées dans la progression, le pronostic et le traitement du cancer (Sautès-Fridman et al. 2016). Nous montrons dans notre modèle transgénique inductible une augmentation importante du nombre de TLS dans les tumeurs après inactivation de FAK dans les cellules GFAP+. Il serait intéressant de quantifier dans nos modèles les autres cellules immunitaires apportées par les TLS à savoir les lymphocytes B et les cellules dendritiques. La compréhension actuelle de la formation des TLS se réfère principalement aux organes lymphoïdes secondaires compte tenu de leur ressemblance anatomique (Mustapha et al. 2021). Ce processus est initié par la colonisation des cellules inductrices de tissu lymphoïde qui interagissent avec les cellules organisatrices du tissu lymphoïde par le biais de la signalisation des lymphotoxines. Ces interactions favorisent l'expression de molécules d'adhésion (par exemple VCAM1, ICAM1, la molécule d'adhésion cellulaire d'adressage vasculaire muqueux 1 (MAdCAM1) et PNA^d qui est un marqueur de HEV) et la production de chimiokines (CCL19, CCL21 et CXCL13), favorisant ainsi la vascularisation et le recrutement de cellules immunitaires (CHEN, CHEN, and WANG 2022). Dans la vascularisation apportant les cellules immunitaires à la tumeur, on retrouve les HEV qui sont des vaisseaux spécialisés dont le rôle principal est de permettre l'entrée sélective des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques et les structures lymphoïdes tertiaires depuis le sang circulant. Dans le modèle transgénique inductible, nous montrons que le nombre de HEV est augmenté à la fois dans les TLS et dans la tumeur elle-même lorsque FAK est inactivée dans les cellules GFAP+. Ces résultats sont très encourageants puisque l'étude du Dr Martinet et ses collaborateurs a montré que la présence de HEV dans les tumeurs de patients est corrélée à la densité intra-tumorale de lymphocytes T et B, ce qui est associé à une meilleure survie des patients atteints de cancer du sein (Martinet et al. 2011). De tels résultats ont également été rapportés dans les tumeurs gastriques dans lesquelles la présence concomitante de HEV et de LTCD8 est associée à

une pronostic favorable pour les patients(S. A. Hong et al. 2020). Tous les résultats que nous avons obtenus sur l'infiltration immunitaire, les TLS et les HEV soutiennent l'idée de combiner l'inactivation de FAK dans les CAFs avec une immunothérapie. Il serait donc intéressant de traiter nos modèles murins avec des immunothérapies.

En conclusion, l'inhibition de l'activité kinase de FAK dans les fibroblastes réduit la croissance tumorale et remodèle la matrice extracellulaire. Ce remodelage matriciel permet une meilleure infiltration immunitaire anti-tumorale au sein de la tumeur associée à une augmentation de HEV (vaisseaux spécialisés dans le transport de lymphocytes dans la tumeur) dans les structures lymphoïdes tertiaires et la tumeur elle-même (habituellement peu présentes dans le PDAC) lorsque FAK est inactivée dans les PSC (dans le modèle transgénique). D'autre part, l'inactivation de FAK induit un remodelage matriciel au niveau de la membrane basale entourant les vaisseaux favorisant ainsi leur normalisation et diminuant la perméabilité vasculaire. Cette normalisation vasculaire n'est cependant pas suffisante pour permettre un meilleur effet des chimiothérapies conventionnelles. Nous émettons l'hypothèse que cet effet pourrait être amélioré en réduisant la pression de fluide interstitiel notamment en ciblant l'acide hyaluronique. Malgré tout, la combinaison de l'inactivation de FAK dans le modèle des PSCs avec les chimiothérapies a permis de réduire considérablement la croissance tumorale, en comparaison avec la condition basale (FAK-WT dans les PSCs de souris non traitées). L'ensemble de nos résultats soutient donc le potentiel effet bénéfique d'une combinaison d'un inhibiteur de FAK avec une chimiothérapie et/ou immunothérapie.

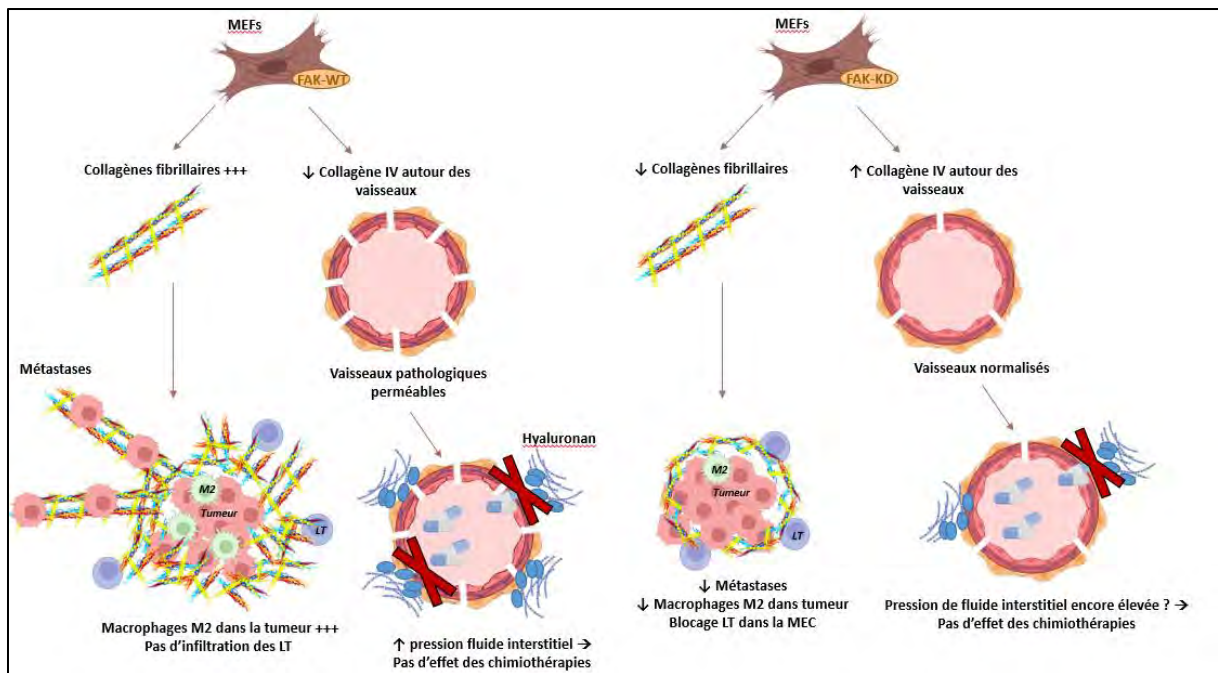


Figure 39 : Schéma de conclusion résumant les résultats obtenus dans le modèle de co-greffe avec les MEFs

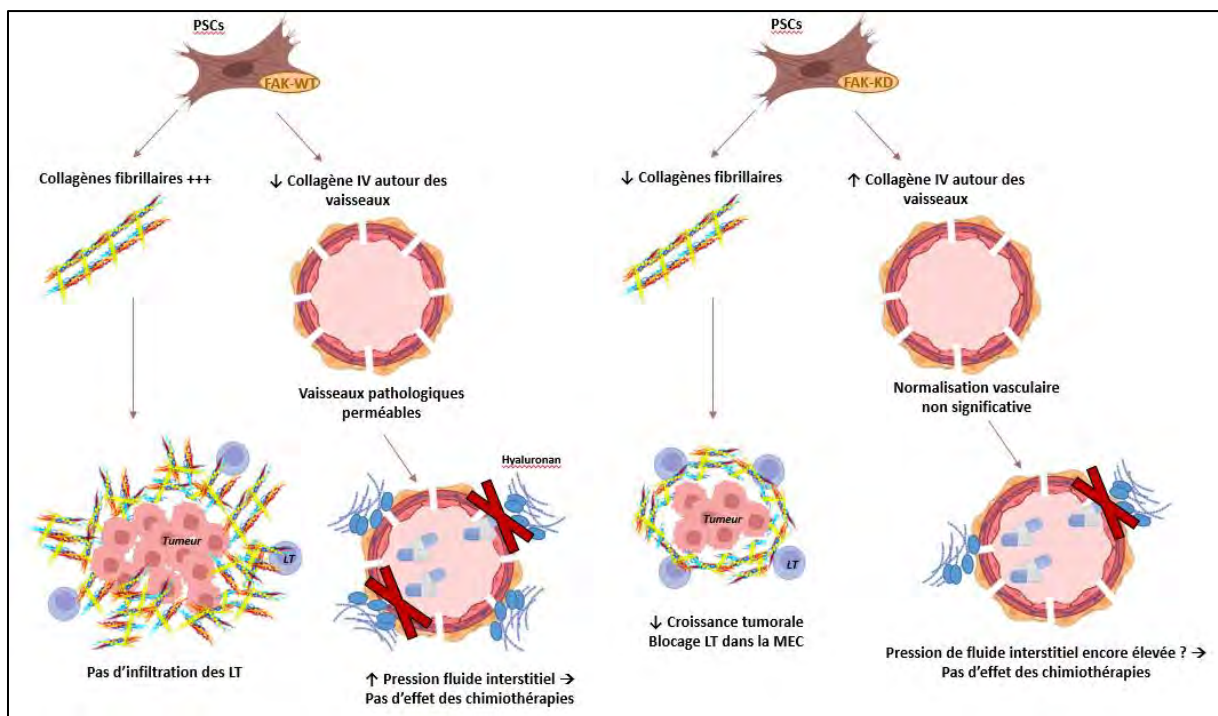


Figure 40 : Schéma de conclusion résumant les résultats obtenus dans le modèle de co-greffe avec les PSCs

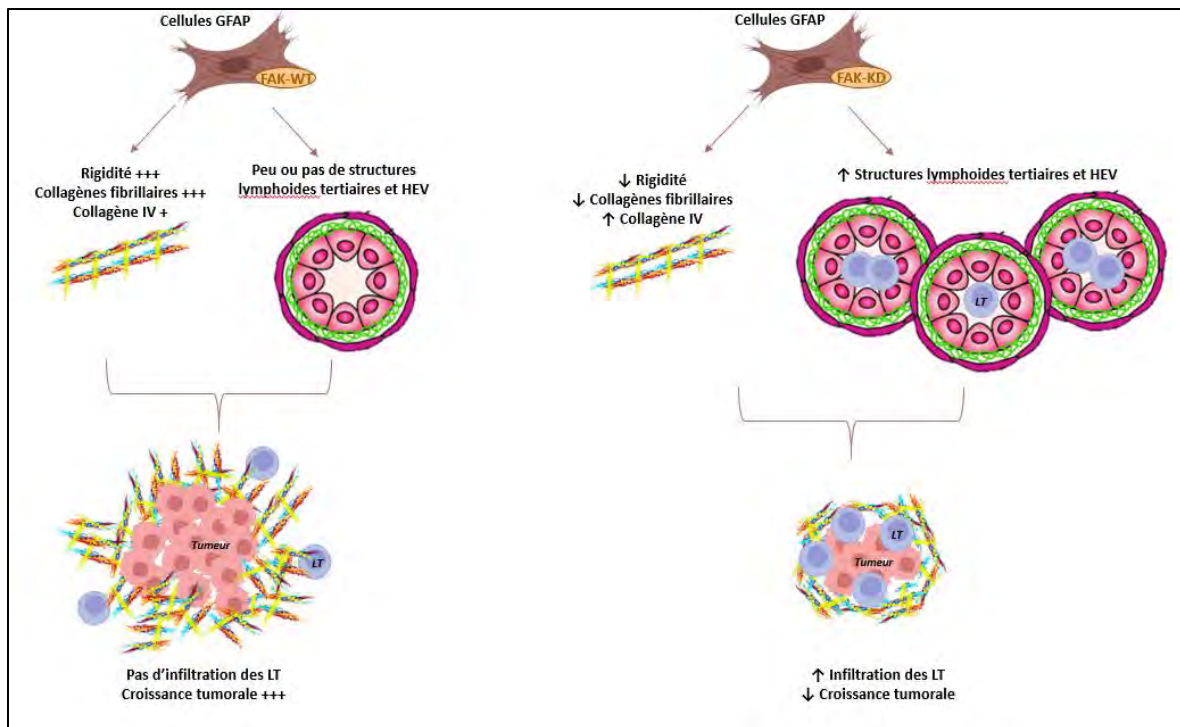


Figure 41 : Schéma de conclusion résumant les résultats obtenus dans le modèle transgénique inducible greffé avec des cellules tumorales de PDAC

BIBLIOGRAPHIE

- Abadpour, Shadab, Sven O. Göpel, Simen W. Schive, Olle Korsgren, Aksel Foss, and Hanne Scholz. 2017. "Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor Protects Human Islets from Nutrient Deprivation and Endoplasmic Reticulum Stress Induced Apoptosis." *Scientific Reports* 7 (1): 1575. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01805-1>.
- Abshire, Michelle Y., Keena S. Thomas, Katherine A. Owen, and Amy H. Bouton. 2011. "Macrophage Motility Requires Distinct A5 β 1/FAK and A4 β 1/Paxillin Signaling Events." *Journal of Leukocyte Biology* 89 (2): 251–57. <https://doi.org/10.1189/jlb.0710395>.
- Adur, Javier, Vitor B. Pelegati, Andre A. de Thomaz, Mariana O. Baratti, Liliana A. L. A. Andrade, Hernandes F. Carvalho, Fátima Bottcher-Luiz, and Carlos Lenz Cesar. 2014. "Second Harmonic Generation Microscopy as a Powerful Diagnostic Imaging Modality for Human Ovarian Cancer." *Journal of Biophotonics* 7 (1–2): 37–48. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200108>.
- Affo, Silvia, Ajay Nair, Francesco Brundu, Aashreya Ravichandra, Sonakshi Bhattacharjee, Michitaka Matsuda, LiKang Chin, et al. 2021. "Promotion of Cholangiocarcinoma Growth by Diverse Cancer-Associated Fibroblast Subpopulations." *Cancer Cell* 39 (6): 866–882.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.03.012>.
- Ager, Ann. 2017. "High Endothelial Venules and Other Blood Vessels: Critical Regulators of Lymphoid Organ Development and Function." *Frontiers in Immunology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00045>.
- Ager, Ann, and Michael J May. 2015. "Understanding High Endothelial Venules: Lessons for Cancer Immunology." *Oncoimmunology* 4 (6): e1008791. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1008791>.
- Agochiya, M., V. G. Brunton, D. W. Owens, E. K. Parkinson, C. Paraskeva, W. N. Keith, and M. C. Frame. 1999. "Increased Dosage and Amplification of the Focal Adhesion Kinase Gene in Human Cancer Cells." *Oncogene* 18 (41): 5646–53. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202957>.
- Ahmad, M., P. Theofanidis, and R. M. Medford. 1998. "Role of Activating Protein-1 in the Regulation of the Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Gene Expression by Tumor Necrosis Factor-Alpha." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (8): 4616–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.8.4616>.
- Ahn, Sunyoung, and Heonyong Park. 2010. "XIAP Is Essential for Shear Stress-Enhanced Tyr-576 Phosphorylation of FAK." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399 (2): 256–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.064>.
- Ahrén, B. 1999. "Regulation of Insulin Secretion by Nerves and Neuropeptides." *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 28 (1): 99–104.
- Ahrén, B., R. C. Veith, T. L. Paquette, and G. J. Taborsky. 1987. "Sympathetic Nerve Stimulation versus Pancreatic Norepinephrine Infusion in the Dog: 2). Effects on Basal Release of Somatostatin and Pancreatic Polypeptide." *Endocrinology* 121 (1): 332–39. <https://doi.org/10.1210/endo-121-1-332>.
- Alanko, Jonna, Anja Mai, Guillaume Jacquemet, Kristine Schauer, Riina Kaukonen, Markku Saari, Bruno Goud, and Johanna Ivaska. 2015. "Integrin Endosomal Signalling Suppresses Anoikis." *Nature Cell Biology* 17 (11): 1412–21. <https://doi.org/10.1038/ncb3250>.
- Albregues, Jean, Thomas Bertero, Eloise Grasset, Stephanie Bonan, Majdi Maiel, Isabelle Bourget, Claude Philippe, et al. 2015. "Epigenetic Switch Drives the Conversion of Fibroblasts into Proinvasive Cancer-Associated Fibroblasts." *Nature Communications* 6 (December): 10204. <https://doi.org/10.1038/ncomms10204>.
- Albregues, Jean, Isabelle Bourget, Catherine Pons, Vincent Butet, Paul Hofman, Sophie Tartare-Deckert, Chloe C. Feral, Guerrino Meneguzzi, and Cedric Gaggioli. 2014. "LIF Mediates Proinvasive Activation of Stromal Fibroblasts in Cancer." *Cell Reports* 7 (5): 1664–78. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.036>.
- Alcaraz, Lindsay B., Aude Mallavialle, Caroline Mollevi, Florence Boissière-Michot, Hanane Mansouri, Joelle Simony-Lafontaine, Valérie Laurent-Matha, et al. 2023. "SPARC in Cancer-Associated Fibroblasts Is an Independent Poor Prognostic Factor in Non-Metastatic Triple-Negative

- Breast Cancer and Exhibits pro-Tumor Activity." *International Journal of Cancer* 152 (6): 1243–58. <https://doi.org/10.1002/ijc.34345>.
- Alessandri, G., R. G. Chirivi, S. Fiorentini, R. Dossi, S. Bonardelli, S. M. Giulini, G. Zanetta, et al. 1999. "Phenotypic and Functional Characteristics of Tumour-Derived Microvascular Endothelial Cells." *Clinical & Experimental Metastasis* 17 (8): 655–62. <https://doi.org/10.1023/a:1006738901839>.
- Alexopoulou, Annika N., Colan M. Ho-Yen, Vassilis Papalazarou, George Elia, J. Louise Jones, and Kairbaan Hodivala-Dilke. 2014. "Tumour-Associated Endothelial-FAK Correlated with Molecular Sub-Type and Prognostic Factors in Invasive Breast Cancer." *BMC Cancer* 14 (April): 237. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-237>.
- Allen, Elizabeth, Arnaud Jabouille, Lee B. Rivera, Inge Lodewijckx, Rindert Missiaen, Veronica Steri, Kevin Feyen, et al. 2017. "Combined Antiangiogenic and Anti-PD-L1 Therapy Stimulates Tumor Immunity through HEV Formation." *Science Translational Medicine* 9 (385). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aak9679>.
- Almagro, Jorge, Hendrik A. Messal, May Zaw Thin, Jacco van Rheenen, and Axel Behrens. 2021. "Tissue Clearing to Examine Tumour Complexity in Three Dimensions." *Nature Reviews. Cancer* 21 (11): 718–30. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00382-w>.
- Amrutkar, Manoj, Monica Aasrum, Caroline S. Verbeke, and Ivar P. Gladhaug. 2019. "Biffi." *BMC Cancer* 19 (1): 596. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5803-1>.
- Anderson, Deirdre E. J., and Monica T. Hinds. 2012. "Extracellular Matrix Production and Regulation in Micropatterned Endothelial Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 427 (1): 159–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.034>.
- Andisha, Najla M., Donald C. McMillan, Fadia J. A. Gujam, Antonia Roseweir, and Joanne Edwards. 2019. "The Relationship between Phosphorylation Status of Focal Adhesion Kinases, Molecular Subtypes, Tumour Microenvironment and Survival in Patients with Primary Operable Ductal Breast Cancer." *Cellular Signalling* 60 (August): 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.04.006>.
- André, Fabrice, Thomas Bachelot, Mario Campone, Florence Dalenc, Jose M. Perez-Garcia, Sara A. Hurvitz, Nicholas Turner, et al. 2013. "Targeting FGFR with Dovitinib (TKI258): Preclinical and Clinical Data in Breast Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (13): 3693–3702. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0190>.
- Angara, Kartik, Thaiz F. Borin, and Ali S. Arbab. 2017. "Vascular Mimicry: A Novel Neovascularization Mechanism Driving Anti-Angiogenic Therapy (AAT) Resistance in Glioblastoma." *Translational Oncology* 10 (4): 650–60. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2017.04.007>.
- Araujo, R. P., and D. L. S. McElwain. 2004. "New Insights into Vascular Collapse and Growth Dynamics in Solid Tumors." *Journal of Theoretical Biology* 228 (3): 335–46. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.01.009>.
- Arina, Ainhua, Christian Idel, Elizabeth M. Hyjek, Maria-Luisa Alegre, Ying Wang, Vytautas P. Bindokas, Ralph R. Weichselbaum, and Hans Schreiber. 2016. "Tumor-Associated Fibroblasts Predominantly Come from Local and Not Circulating Precursors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (27): 7551–56. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600363113>.
- Armstrong, Thomas, Graham Packham, Lindsay B. Murphy, Adrian C. Bateman, John A. Conti, David R. Fine, Colin D. Johnson, R. Christopher Benyon, and John P. Iredale. 2004. "Type I Collagen Promotes the Malignant Phenotype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10 (21): 7427–37. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0825>.
- Armulik, Annika, Alexandra Abramsson, and Christer Betsholtz. 2005. "Endothelial/Pericyte Interactions." *Circulation Research* 97 (6): 512–23. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7>.

- Armulik, Annika, Guillem Genové, and Christer Betsholtz. 2011. "Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises." *Developmental Cell* 21 (2): 193–215. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>.
- Arnold, Shanna A., Lee B. Rivera, Andrew F. Miller, Juliet G. Carbon, Sean P. Dineen, Yang Xie, Diego H. Castrillon, et al. 2010. "Lack of Host SPARC Enhances Vascular Function and Tumor Spread in an Orthotopic Murine Model of Pancreatic Carcinoma." *Disease Models & Mechanisms* 3 (1–2): 57–72. <https://doi.org/10.1242/dmm.003228>.
- Arnold, Shanna, Emilia Mira, Sabeeha Muneer, Grzegorz Korpany, Adam W. Beck, Shane E. Holloway, Santos Mañes, and Rolf A. Brekken. 2008. "Forced Expression of MMP9 Rescues the Loss of Angiogenesis and Abrogates Metastasis of Pancreatic Tumors Triggered by the Absence of Host SPARC." *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 233 (7): 860–73. <https://doi.org/10.3181/0801-RM-12>.
- Asrir, Assia, Claire Tardiveau, Juliette Coudert, Robin Laffont, Lucas Blanchard, Elisabeth Bellard, Krystle Veerman, et al. 2022. "Tumor-Associated High Endothelial Venules Mediate Lymphocyte Entry into Tumors and Predict Response to PD-1 plus CTLA-4 Combination Immunotherapy." *Cancer Cell* 40 (3): 318–334.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.01.002>.
- Au, Anja von, Matthaeus Vassel, Sabrina Kraft, Carla Sens, Norman Hackl, Alexander Marx, Philipp Stroebel, et al. 2013. "Circulating Fibronectin Controls Tumor Growth." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 15 (8): 925–38.
- Aumailley, Monique. 2013. "The Laminin Family." *Cell Adhesion & Migration* 7 (1): 48–55. <https://doi.org/10.4161/cam.22826>.
- Aung, Aereas, Young N. Seo, Shaoying Lu, Yingxiao Wang, Colin Jamora, Juan C. del Álamo, and Shyni Varghese. 2014. "3D Traction Stresses Activate Protease-Dependent Invasion of Cancer Cells." *Biophysical Journal* 107 (11): 2528–37. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.078>.
- Avizienyte, Egle, Anne W. Wyke, Robert J. Jones, Gordon W. McLean, M. Andrew Westhoff, Valerie G. Brunton, and Margaret C. Frame. 2002. "Src-Induced de-Regulation of E-Cadherin in Colon Cancer Cells Requires Integrin Signalling." *Nature Cell Biology* 4 (8): 632–38. <https://doi.org/10.1038/ncb829>.
- Aznavorian, S., M. L. Stracke, H. Krutzsch, E. Schiffmann, and L. A. Liotta. 1990. "Signal Transduction for Chemotaxis and Haptotaxis by Matrix Molecules in Tumor Cells." *The Journal of Cell Biology* 110 (4): 1427–38. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.4.1427>.
- Baba, Yoshifumi, Ken-Ichi Iyama, Koei Ikeda, Shinji Ishikawa, Naoko Hayashi, Nobutomo Miyanari, Yoshikazu Sado, Yoshifumi Ninomiya, and Hideo Baba. 2008. "The Expression of Type IV Collagen Alpha6 Chain Is Related to the Prognosis in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *Annals of Surgical Oncology* 15 (2): 555–65. <https://doi.org/10.1245/s10434-007-9592-4>.
- Bae, Yong Ho, Keeley L. Mui, Bernadette Y. Hsu, Shu-Lin Liu, Alexandra Cretu, Ziba Razinia, Tina Xu, Ellen Puré, and Richard K. Assoian. 2014. "A FAK-Cas-Rac-Lamellipodin Signaling Module Transduces Extracellular Matrix Stiffness into Mechanosensitive Cell Cycling." *Science Signaling* 7 (330): ra57. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004838>.
- Bagaev, Alexander, Nikita Kotlov, Krystle Nomie, Viktor Svekolkina, Azamat Gafurov, Olga Isaeva, Nikita Osokin, et al. 2021. "Conserved Pan-Cancer Microenvironment Subtypes Predict Response to Immunotherapy." *Cancer Cell* 39 (6): 845–865.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.04.014>.
- Bagi, Cedo M., James Christensen, Darrel P. Cohen, Walter G. Roberts, Dean Wilkie, Terri Swanson, Theresa Tuthill, and Catharine J. Andresen. 2009. "Sunitinib and PF-562,271 (FAK/Pyk2 Inhibitor) Effectively Block Growth and Recovery of Human Hepatocellular Carcinoma in a Rat Xenograft Model." *Cancer Biology & Therapy* 8 (9): 856–65. <https://doi.org/10.4161/cbt.8.9.8246>.
- Bahcecioglu, Gokhan, Xiaoshan Yue, Erin Howe, Ian Guldner, M. Sharon Stack, Harikrishna Nakshatri, Siyuan Zhang, and Pinar Zorlutuna. 2021. "Aged Breast Extracellular Matrix Drives Mammary

- Epithelial Cells to an Invasive and Cancer-Like Phenotype." *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)* 8 (22): e2100128. <https://doi.org/10.1002/advs.202100128>.
- Bakst, Richard L., Huizhong Xiong, Chun-Hao Chen, Sylvie Deborde, Anna Lyubchik, Yi Zhou, Shizhi He, et al. 2017. "Inflammatory Monocytes Promote Perineural Invasion via CCL2-Mediated Recruitment and Cathepsin B Expression." *Cancer Research* 77 (22): 6400–6414. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1612>.
- Balabanov, R., R. Washington, J. Wagnerova, and P. Dore-Duffy. 1996. "CNS Microvascular Pericytes Express Macrophage-like Function, Cell Surface Integrin Alpha M, and Macrophage Marker ED-2." *Microvascular Research* 52 (2): 127–42. <https://doi.org/10.1006/mvre.1996.0049>.
- Banh, Robert S., Douglas E. Biancur, Keisuke Yamamoto, Albert S. W. Sohn, Beth Walters, Miljan Kuljanin, Ajami Gikandi, et al. 2020. "Neurons Release Serine to Support mRNA Translation in Pancreatic Cancer." *Cell* 183 (5): 1202–1218.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.016>.
- Bapat, Aditi A., Ruben M. Munoz, Daniel D. Von Hoff, and Haiyong Han. 2016. "Blocking Nerve Growth Factor Signaling Reduces the Neural Invasion Potential of Pancreatic Cancer Cells." *PloS One* 11 (10): e0165586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165586>.
- Barău, Anca, Amparo Ruiz-Sauri, Gerardo Valencia, Maria Del Carmen Gómez-Mateo, Luis Sabater, Antonio Ferrandez, and Antonio Llombart-Bosch. 2013. "High Microvessel Density in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Is Associated with High Grade." *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 462 (5): 541–46. <https://doi.org/10.1007/s00428-013-1409-1>.
- Barker, Holly E., Demelza Bird, Georgina Lang, and Janine T. Erler. 2013. "Tumor-Secreted LOXL2 Activates Fibroblasts through FAK Signaling." *Molecular Cancer Research: MCR* 11 (11): 1425–36. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0033-T>.
- Barrett, Alexander S., Ori Maller, Michael W. Pickup, Valerie M. Weaver, and Kirk C. Hansen. 2018. "Compartment Resolved Proteomics Reveals a Dynamic Matrisome in a Biomechanically Driven Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Journal of Immunology and Regenerative Medicine* 1 (March): 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.regen.2018.03.002>.
- Bartoschek, Michael, Nikolay Oskolkov, Matteo Bocci, John Lötvot, Christer Larsson, Mikael Sommarin, Chris D. Madsen, et al. 2018. "Spatially and Functionally Distinct Subclasses of Breast Cancer-Associated Fibroblasts Revealed by Single Cell RNA Sequencing." *Nature Communications* 9 (1): 5150. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07582-3>.
- Basilico, Bernadette, Ilaria Elena Palamà, Stefania D'Amone, Clotilde Lauro, Maria Rosito, Maddalena Grieco, Patrizia Ratano, et al. 2022. "Substrate Stiffness Effect on Molecular Crosstalk of Epithelial-Mesenchymal Transition Mediators of Human Glioblastoma Cells." *Frontiers in Oncology* 12: 983507. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.983507>.
- Basturk, Olca, Seung-Mo Hong, Laura D. Wood, N. Volkan Adsay, Jorge Albores-Saavedra, Andrew V. Biankin, Lodewijk A.A. Brosens, et al. 2015. "A REVISED CLASSIFICATION SYSTEM AND RECOMMENDATIONS FROM THE BALTIMORE CONSENSUS MEETING FOR NEOPLASTIC PRECURSOR LESIONS IN THE PANCREAS." *The American Journal of Surgical Pathology* 39 (12): 1730–41. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000533>.
- Beatty, Gregory L., Drew A. Torigian, E. Gabriela Chiorean, Babak Saboury, Alex Brothers, Abass Alavi, Andrea B. Troxel, et al. 2013. "A Phase I Study of an Agonist CD40 Monoclonal Antibody (CP-870,893) in Combination with Gemcitabine in Patients with Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (22): 10.1158/1078-0432.CCR-13-1320. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1320>.
- Becker, Andrew E., Yasmin G. Hernandez, Harold Frucht, and Aimee L. Lucas. 2014. "Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Risk Factors, Screening, and Early Detection." *World Journal of Gastroenterology* 20 (32): 11182–98. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i32.11182>.
- Behrens, Daniel Timo, Daniela Villone, Manuel Koch, Georg Brunner, Lydia Sorokin, Horst Robenek, Leena Bruckner-Tuderman, Peter Bruckner, and Uwe Hansen. 2012. "The Epidermal Basement Membrane Is a Composite of Separate Laminin- or Collagen IV-Containing

- Networks Connected by Aggregated Perlecan, but Not by Nidogens." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (22): 18700–709. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.336073>.
- Bekkhus, Tove, Teemu Martikainen, Anna Olofsson, Mathias Franzén Boger, Daniel Vasiliu Bacovia, Fredrik Wärnberg, and Maria H. Ulvmar. 2021. "Remodeling of the Lymph Node High Endothelial Venules Reflects Tumor Invasiveness in Breast Cancer and Is Associated with Dysregulation of Perivascular Stromal Cells." *Cancers* 13 (2): 211. <https://doi.org/10.3390/cancers13020211>.
- Belhabib, Ismahane, Sonia Zaghdoudi, Claire Lac, Corinne Bousquet, and Christine Jean. 2021. "Extracellular Matrices and Cancer-Associated Fibroblasts: Targets for Cancer Diagnosis and Therapy?" *Cancers* 13 (14): 3466. <https://doi.org/10.3390/cancers13143466>.
- Benson, Al B., Zev A. Wainberg, J. Randolph Hecht, Dmitry Vyushkov, Hua Dong, Johanna Bendell, and Fred Kudrik. 2017. "A Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Simtuzumab or Placebo in Combination with Gemcitabine for the First-Line Treatment of Pancreatic Adenocarcinoma." *The Oncologist* 22 (3): 241-e15. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0024>.
- Bergers, Gabriele, and Steven Song. 2005a. "The Role of Pericytes in Blood-Vessel Formation and Maintenance." *Neuro-Oncology* 7 (4): 452. <https://doi.org/10.1215/S1152851705000232>.
- . 2005b. "The Role of Pericytes in Blood-Vessel Formation and Maintenance." *Neuro-Oncology* 7 (4): 452–64. <https://doi.org/10.1215/S1152851705000232>.
- Betsholtz, Christer. 2004. "Insight into the Physiological Functions of PDGF through Genetic Studies in Mice." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15 (4): 215–28. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.005>.
- Bhatheja, Kanav, and Jeffrey Field. 2006. "Schwann Cells: Origins and Role in Axonal Maintenance and Regeneration." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (12): 1995–99. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.05.007>.
- Bhattacharjee, Sonakshi, Florian Hamberger, Aashreya Ravichandra, Maximilian Miller, Ajay Nair, Silvia Affo, Aveline Filliol, et al. 2021. "Y. WangY. Wang." *The Journal of Clinical Investigation* 131 (11): e146987, 146987. <https://doi.org/10.1172/JCI146987>.
- Biffi, Giulia, Tobiloba E. Oni, Benjamin Spielman, Yuan Hao, Ela Elyada, Youngkyu Park, Jonathan Preall, and David A. Tuveson. 2019. "IL-1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGF- β to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Discovery* 9 (2): 282–301. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0710>.
- Biffi, Giulia, and David A. Tuveson. 2021. "Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts." *Physiological Reviews* 101 (1): 147–76. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2019>.
- Blanchard, Lucas, and Jean-Philippe Girard. 2021. "High Endothelial Venules (HEVs) in Immunity, Inflammation and Cancer." *Angiogenesis* 24 (4): 719–53. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09792-8>.
- Bockorny, Bruno, Valerya Semenisty, Teresa Macarulla, Erkut Borazanci, Brian M. Wolpin, Salomon M. Stemmer, Talia Golan, et al. 2020. "BL-8040, a CXCR4 Antagonist, in Combination with Pembrolizumab and Chemotherapy for Pancreatic Cancer: The COMBAT Trial." *Nature Medicine* 26 (6): 878–85. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0880-x>.
- Borazanci, E., A. M. Schram, E. Garralda, I. Brana, M. Vieito Villar, A. Spreafico, M. Oliva, et al. 2022. "Phase I, First-in-Human Study of MSC-1 (AZD0171), a Humanized Anti-Leukemia Inhibitory Factor Monoclonal Antibody, for Advanced Solid Tumors." *ESMO Open* 7 (4): 100530. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100530>.
- Boudko, Sergei P., Neonila Danylevych, Billy G. Hudson, and Vadim K. Pedchenko. 2018. "Basement Membrane Collagen IV: Isolation of Functional Domains." *Methods in Cell Biology* 143: 171–85. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.08.010>.
- Boyd, David F., and Paul G. Thomas. 2017. "Towards Integrating Extracellular Matrix and Immunological Pathways." *Cytokine* 98 (October): 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.03.004>.

- Brami-Cherrier, Karen, Nicolas Gervasi, Diana Arsenieva, Katarzyna Walkiewicz, Marie-Claude Bouterin, Alvaro Ortega, Paul G. Leonard, et al. 2014. "FAK Dimerization Controls Its Kinase-Dependent Functions at Focal Adhesions." *The EMBO Journal* 33 (4): 356–70. <https://doi.org/10.1002/embj.201386399>.
- Brett, Elizabeth A., Matthias A. Sauter, Hans-Günther Machens, and Dominik Duscher. 2020. "Tumor-Associated Collagen Signatures: Pushing Tumor Boundaries." *Cancer & Metabolism* 8 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/s40170-020-00221-w>.
- Bussolati, Benedetta, Ilaria Deambrosis, Simona Russo, Maria Chiara Deregibus, and Giovanni Camussi. 2003. "Altered Angiogenesis and Survival in Human Tumor-Derived Endothelial Cells." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (9): 1159–61. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0557fje>.
- Butler, Jason M., Hideki Kobayashi, and Shahin Rafii. 2010. "Instructive Role of the Vascular Niche in Promoting Tumour Growth and Tissue Repair by Angiocrine Factors." *Nature Reviews. Cancer* 10 (2): 138–46. <https://doi.org/10.1038/nrc2791>.
- Byrne, Katelyn T., Courtney B. Betts, Rosemarie Mick, Shamilene Sivagnanam, David L. Bajor, Daniel A. Laheru, E. Gabriela Chiorean, et al. 2021. "Neoadjuvant Selicrelumab, an Agonist CD40 Antibody, Induces Changes in the Tumor Microenvironment in Patients with Resectable Pancreatic Cancer." *Clinical Cancer Research* 27 (16): 4574–86. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-1047>.
- Cabrera, M. Carla, Estifanos Tilahun, Rebecca Nakles, Edgar S. Diaz-Cruz, Aline Charabaty, Simeng Suy, Patrick Jackson, et al. 2014. "Human Pancreatic Cancer-Associated Stellate Cells Remain Activated after in Vivo Chemoradiation." *Frontiers in Oncology* 4 (May): 102. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00102>.
- Cance, W. G., J. E. Harris, M. V. Iacocca, E. Roche, X. Yang, J. Chang, S. Simkins, and L. Xu. 2000. "Immunohistochemical Analyses of Focal Adhesion Kinase Expression in Benign and Malignant Human Breast and Colon Tissues: Correlation with Preinvasive and Invasive Phenotypes." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 6 (6): 2417–23.
- Canel, Marta, Alan Serrels, Derek Miller, Paul Timpson, Bryan Serrels, Margaret C. Frame, and Valerie G. Brunton. 2010. "Quantitative in Vivo Imaging of the Effects of Inhibiting Integrin Signalling via Src and FAK on Cancer Cell Movement; Effects on E-Cadherin Dynamics." *Cancer Research* 70 (22): 9413–22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1454>.
- Cantelmo, Anna Rita, Lena-Christin Conradi, Aleksandra Brajic, Jermaine Goveia, Joanna Kalucka, Andreas Pircher, Pallavi Chaturvedi, et al. 2016. "Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy." *Cancer Cell* 30 (6): 968–85. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.006>.
- Cao, Yihai. 2004. "Antiangiogenic Cancer Therapy." *Seminars in Cancer Biology* 14 (2): 139–45. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2003.09.018>.
- Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, and J. C. Reed. 1998. "Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation." *Science (New York, N.Y.)* 282 (5392): 1318–21. <https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1318>.
- Carrière, Virginie, Renaud Colisson, Carine Jiguet-Jiglaire, Elisabeth Bellard, Gérard Bouche, Talal Al Saati, François Amalric, Jean-Philippe Girard, and Christine M'Rini. 2005. "Cancer Cells Regulate Lymphocyte Recruitment and Leukocyte-Endothelium Interactions in the Tumor-Draining Lymph Node." *Cancer Research* 65 (24): 11639–48. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1190>.
- Carstens, Julianne L., Pedro Correa de Sampaio, Dalu Yang, Souptik Barua, Huamin Wang, Arvind Rao, James P. Allison, Valerie S. LeBleu, and Raghu Kalluri. 2017. "Spatial Computation of Intratumoral T Cells Correlates with Survival of Patients with Pancreatic Cancer." *Nature Communications* 8 (April): 15095. <https://doi.org/10.1038/ncomms15095>.

- Carter, R. A., and I. P. Wicks. 2001. "Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (CD106): A Multifaceted Regulator of Joint Inflammation." *Arthritis and Rheumatism* 44 (5): 985–94. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200105\)44:5<985::AID-ANR176>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200105)44:5<985::AID-ANR176>3.0.CO;2-P).
- Cary, L. A., D. C. Han, T. R. Polte, S. K. Hanks, and J. L. Guan. 1998. "Identification of p130Cas as a Mediator of Focal Adhesion Kinase-Promoted Cell Migration." *The Journal of Cell Biology* 140 (1): 211–21. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.1.211>.
- Casanovas, Oriol, Daniel J. Hicklin, Gabriele Bergers, and Douglas Hanahan. 2005. "Drug Resistance by Evasion of Antiangiogenic Targeting of VEGF Signaling in Late-Stage Pancreatic Islet Tumors." *Cancer Cell* 8 (4): 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.09.005>.
- Casey, Theresa M., Jonathan Eneman, Abigail Crocker, Jeffrey White, Joseph Tessitore, Mary Stanley, Seth Harlow, et al. 2008. "Cancer Associated Fibroblasts Stimulated by Transforming Growth Factor Beta1 (TGF-Beta 1) Increase Invasion Rate of Tumor Cells: A Population Study." *Breast Cancer Research and Treatment* 110 (1): 39–49. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9684-7>.
- Cavaco, Ana C. Martins, Maryam Rezaei, Michele F. Caliendo, Augusto Martins Lima, Martin Stehling, Sameer A. Dhayat, Jörg Haier, Cord Brakebusch, and Johannes A. Eble. 2018. "The Interaction between Laminin-332 and A3 β 1 Integrin Determines Differentiation and Maintenance of CAFs, and Supports Invasion of Pancreatic Duct Adenocarcinoma Cells." *Cancers* 11 (1): 14. <https://doi.org/10.3390/cancers11010014>.
- Cavallaro, Ugo, and Elisabetta Dejana. 2011. "Adhesion Molecule Signalling: Not Always a Sticky Business." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (3): 189–97. <https://doi.org/10.1038/nrm3068>.
- Chadelle, Lucie, Jiaying Liu, Valérie Choesmel-Cadamuro, Andrei V. Karginov, Carine Froment, Odile Burlet-Schiltz, Sarah Gandarillas, et al. 2022. "PKC θ -Mediated Serine/Threonine Phosphorylations of FAK Govern Adhesion and Protrusion Dynamics within the Lamellipodia of Migrating Breast Cancer Cells." *Cancer Letters* 526 (February): 112–30. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.11.026>.
- Chakraborty, Mainak, Kevin Chu, Annie Shrestha, Xavier S. Revelo, Xiangyue Zhang, Matthew J. Gold, Saad Khan, et al. 2021. "Mechanical Stiffness Controls Dendritic Cell Metabolism and Function." *Cell Reports* 34 (2): 108609. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108609>.
- Chang, Julie, and Ovijit Chaudhuri. 2019. "Beyond Proteases: Basement Membrane Mechanics and Cancer Invasion." *The Journal of Cell Biology* 218 (8): 2456–69. <https://doi.org/10.1083/jcb.201903066>.
- Chen, Bing, Yuting Sang, Xiaojin Song, Dong Zhang, Lijuan Wang, Wenjing Zhao, Yiran Liang, Ning Zhang, and Qifeng Yang. 2021. "Exosomal miR-500a-5p Derived from Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Breast Cancer Cell Proliferation and Metastasis through Targeting USP28." *Theranostics* 11 (8): 3932–47. <https://doi.org/10.7150/thno.53412>.
- Chen, Ivy X., Vikash P. Chauhan, Jessica Posada, Mei R. Ng, Michelle W. Wu, Pichet Adstamongkonkul, Peigen Huang, Neal Lindeman, Robert Langer, and Rakesh K. Jain. 2019. "Blocking CXCR4 Alleviates Desmoplasia, Increases T-Lymphocyte Infiltration, and Improves Immunotherapy in Metastatic Breast Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (10): 4558–66. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815515116>.
- CHEN, Jing, Jian CHEN, and Lie WANG. 2022. "Tertiary Lymphoid Structures as Unique Constructions Associated with the Organization, Education, and Function of Tumor-Infiltrating Immunocytes." *Journal of Zhejiang University. Science. B* 23 (10): 812–22. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2200174>.
- Chen, Xiao Lei, Ju-Ock Nam, Christine Jean, Christine Lawson, Colin T. Walsh, Erik Goka, Ssang-Taek Lim, et al. 2012. "VEGF-Induced Vascular Permeability Is Mediated by FAK." *Developmental Cell* 22 (1): 146–57. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.11.002>.
- Chen, Yang, Jiha Kim, Sujuan Yang, Huamin Wang, Chang-Jiun Wu, Hikaru Sugimoto, Valerie S. LeBleu, and Raghu Kalluri. 2021. "Type I Collagen Deletion in α SMA⁺ Myofibroblasts Augments Immune Suppression and Accelerates Progression of Pancreatic Cancer." *Cancer Cell* 39 (4): 548-565.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.02.007>.

- Chen, Yang, Sujuan Yang, Jena Tavormina, Desiree Tampe, Michael Zeisberg, Huamin Wang, Krishnan K. Mahadevan, et al. 2022. "Oncogenic Collagen I Homotrimers from Cancer Cells Bind to A3 β 1 Integrin and Impact Tumor Microbiome and Immunity to Promote Pancreatic Cancer." *Cancer Cell* 40 (8): 818-834.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.06.011>.
- Chhoda, Ankit, Lingeng Lu, Barbara M. Clerkin, Harvey Risch, and James J. Farrell. 2019. "Current Approaches to Pancreatic Cancer Screening." *The American Journal of Pathology* 189 (1): 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.09.013>.
- Chirivì, Maila, Fabio Maiullari, Marika Milan, Dario Presutti, Chiara Cordiglieri, Mariacristina Crosti, Maria Lucia Sarnicola, et al. 2021. "Tumor Extracellular Matrix Stiffness Promptly Modulates the Phenotype and Gene Expression of Infiltrating T Lymphocytes." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11): 5862. <https://doi.org/10.3390/ijms22115862>.
- CHO, KAZUMITSU, YOKO MATSUDA, JUNJI UEDA, EIJI UCHIDA, ZENYA NAITO, and TOSHIYUKI ISHIWATA. 2011. "Keratinocyte Growth Factor Induces Matrix Metalloproteinase-9 Expression and Correlates with Venous Invasion in Pancreatic Cancer." *International Journal of Oncology* 40 (4): 1040–48. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1280>.
- Choi, Chang-Hoon, Bradley A. Webb, Michael S. Chimenti, Matthew P. Jacobson, and Diane L. Barber. 2013. "pH Sensing by FAK-His58 Regulates Focal Adhesion Remodeling." *Journal of Cell Biology* 202 (6): 849–59. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302131>.
- Chrenek, M. A., P. Wong, and V. M. Weaver. 2001. "Tumour-Stromal Interactions. Integrins and Cell Adhesions as Modulators of Mammary Cell Survival and Transformation." *Breast Cancer Research: BCR* 3 (4): 224–29. <https://doi.org/10.1186/bcr300>.
- Chronopoulos, Antonios, Benjamin Robinson, Muge Sarper, Ernesto Cortes, Vera Auernheimer, Dariusz Lachowski, Simon Attwood, et al. 2016. "ATRA Mechanically Reprograms Pancreatic Stellate Cells to Suppress Matrix Remodelling and Inhibit Cancer Cell Invasion." *Nature Communications* 7 (September): 12630. <https://doi.org/10.1038/ncomms12630>.
- Conklin, Matthew W., Jens C. Eickhoff, Kristin M. Ricking, Carolyn A. Pehlke, Kevin W. Eliceiri, Paolo P. Provenzano, Andreas Friedl, and Patricia J. Keely. 2011. "Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma." *The American Journal of Pathology* 178 (3): 1221–32. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.076>.
- Connor, Ashton A., and Steven Gallinger. 2022. "Pancreatic Cancer Evolution and Heterogeneity: Integrating Omics and Clinical Data." *Nature Reviews. Cancer* 22 (3): 131–42. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00418-1>.
- Conroy, Thierry, Pascal Hammel, Mohamed Hebbar, Meher Ben Abdelghani, Alice C. Wei, Jean-Luc Raoul, Laurence Choné, et al. 2018. "FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer." *The New England Journal of Medicine* 379 (25): 2395–2406. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775>.
- Cornelius, L. A., L. C. Nehring, E. Harding, M. Bolanowski, H. G. Welgus, D. K. Kobayashi, R. A. Pierce, and S. D. Shapiro. 1998. "Matrix Metalloproteinases Generate Angiostatin: Effects on Neovascularization." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161 (12): 6845–52.
- Cornillon, Jérôme, Lydia Campos, and Denis Guyotat. 2003. "Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples." *médecine/sciences* 19 (6–7): 743–52. <https://doi.org/10.1051/medsci/20031967743>.
- Corsi, Jean-Marc, Christophe Houbbron, Pierre Billuart, Isabelle Brunet, Karine Bouvrée, Anne Eichmann, Jean-Antoine Girault, and Hervé Enslen. 2009. "Autophosphorylation-Independent and -Dependent Functions of Focal Adhesion Kinase during Development." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (50): 34769–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067280>.
- Costa, Ana, Yann Kieffer, Alix Scholer-Dahirel, Florian Pelon, Brigitte Bourachot, Melissa Cardon, Philemon Sirven, et al. 2018. "Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer." *Cancer Cell* 33 (3): 463-479.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.011>.

- Cox, Braden D., Meera Natarajan, Michelle R. Stettner, and Candace L. Gladson. 2006. "New Concepts Regarding Focal Adhesion Kinase Promotion of Cell Migration and Proliferation." *Journal of Cellular Biochemistry* 99 (1): 35–52. <https://doi.org/10.1002/jcb.20956>.
- Cubilla, A. L., and P. J. Fitzgerald. 1976. "Morphological Lesions Associated with Human Primary Invasive Nonendocrine Pancreas Cancer." *Cancer Research* 36 (7 PT 2): 2690–98.
- Dai, Qian, Chunlian Zhang, Yaxu Wu, Holly McDonough, Ryan A. Whaley, Virginia Godfrey, Hui-Hua Li, et al. 2003. "CHIP Activates HSF1 and Confers Protection against Apoptosis and Cellular Stress." *The EMBO Journal* 22 (20): 5446–58. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg529>.
- Dakup, Panshak P., Kenneth I. Porter, Alexander A. Little, Hui Zhang, and Shobhan Gaddameedhi. 2020. "Sex Differences in the Association between Tumor Growth and T Cell Response in a Melanoma Mouse Model." *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 69 (10): 2157–62. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02643-3>.
- Dallal, Ramsey M., Peter Christakos, Kenneth Lee, Shinichi Egawa, Young-Ik Son, and Michael T. Lotze. 2002. "Paucity of Dendritic Cells in Pancreatic Cancer." *Surgery* 131 (2): 135–38. <https://doi.org/10.1067/msy.2002.119937>.
- D'Alterio, Crescenzo, Alessandro Giardino, Giosuè Scognamiglio, Giovanni Butturini, Luigi Portella, Giuseppe Guardascione, Isabella Frigerio, et al. 2022. "CXCR4-CXCL12-CXCR7 and PD-1/PD-L1 in Pancreatic Cancer: CXCL12 Predicts Survival of Radically Resected Patients." *Cells* 11 (21): 3340. <https://doi.org/10.3390/cells11213340>.
- D'Amico, Gabriela, Isabelle Fernandez, Jesús Gómez-Escudero, Hyojin Kim, Eleni Maniati, Muhammad Syahmi Azman, Faraz K. Mardakheh, et al. 2022. "ERG Activity Is Regulated by Endothelial FAK Coupling with TRIM25/USP9x in Vascular Patterning." *Development (Cambridge, England)* 149 (13): dev200528. <https://doi.org/10.1242/dev.200528>.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, and M. E. Greenberg. 1997. "Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery." *Cell* 91 (2): 231–41. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80405-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80405-5).
- Davidson, Catherine, David Taggart, Andrew H. Sims, David W. Loneragan, Marta Canel, and Alan Serrels. 2022. "FAK Promotes Stromal PD-L2 Expression Associated with Poor Survival in Pancreatic Cancer." *British Journal of Cancer* 127 (10): 1893–1905. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01966-5>.
- Deborde, Sylvie, Laxmi Gusain, Ann Powers, Andrea Marcadis, Yasong Yu, Chun-Hao Chen, Anna Frants, et al. 2022. "Reprogrammed Schwann Cells Organize into Dynamic Tracks That Promote Pancreatic Cancer Invasion." *Cancer Discovery* 12 (10): 2454–73. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1690>.
- Deicher, Anton, Roland Andersson, Bobby Tingstedt, Gert Lindell, Monika Bauden, and Daniel Ansari. 2018. "Targeting Dendritic Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Cell International* 18 (June): 85. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0585-0>.
- Demircioglu, Fevzi, Jun Wang, Juliana Candido, Ana S. H. Costa, Pedro Casado, Beatriz de Luxan Delgado, Louise E. Reynolds, et al. 2020. "Cancer Associated Fibroblast FAK Regulates Malignant Cell Metabolism." *Nature Communications* 11 (1): 1290. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15104-3>.
- Di Cairano, Eliana S., Stefania Moretti, Paola Marciani, Vellea Franca Sacchi, Michela Castagna, Alberto Davalli, Franco Folli, and Carla Perego. 2016. "Neurotransmitters and Neuropeptides: New Players in the Control of Islet of Langerhans' Cell Mass and Function." *Journal of Cellular Physiology* 231 (4): 756–67. <https://doi.org/10.1002/jcp.25176>.
- Di Maggio, Francesco, Prabhu Arumugam, Francesca R. Delvecchio, Silvia Batista, Tanguy Lechertier, Kairbaan Hodivala-Dilke, and Hemant M. Kocher. 2016. "Pancreatic Stellate Cells Regulate Blood Vessel Density in the Stroma of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Pancreatology* 16 (6): 995–1004. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2016.05.393>.
- Di Martino, Julie S., Ana Rita Nobre, Chandrani Mondal, Isra Taha, Eduardo F. Farias, Elana J. Fertig, Alexandra Naba, Julio A. Aguirre-Ghisso, and Jose Javier Bravo-Cordero. 2022. "A Tumor-

- Derived Type III Collagen-Rich ECM Niche Regulates Tumor Cell Dormancy." *Nature Cancer* 3 (1): 90–107. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00291-9>.
- Di Russo, Jacopo, Anna-Liisa Luik, Lema Yousif, Sigmund Budny, Hans Oberleithner, Verena Hofschroer, Juergen Klingauf, et al. 2017. "Endothelial Basement Membrane Laminin 511 Is Essential for Shear Stress Response." *The EMBO Journal* 36 (2): 183–201. <https://doi.org/10.15252/emboj.201694756>.
- Digiaco, Graziana, Ignazia Tusa, Marina Bacci, Maria Grazia Cipolleschi, Persio Dello Sbarba, and Elisabetta Rovida. 2016. "Fibronectin Induces Macrophage Migration through a SFK-FAK/CSF-1R Pathway." *Cell Adhesion & Migration* 11 (4): 327–37. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1221566>.
- Ding, Z., G. Maubach, A. Masamune, and L. Zhuo. 2009. "Glial Fibrillary Acidic Protein Promoter Targets Pancreatic Stellate Cells." *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 41 (3): 229–36. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.05.001>.
- Dirat, Béatrice, Ludvine Bochet, Marta Dabek, Danièle Daviaud, Stéphanie Dauvillier, Bilal Majed, Yuan Yuan Wang, et al. 2011. "Cancer-Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion." *Cancer Research* 71 (7): 2455–65. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3323>.
- Distler, M., D. Aust, J. Weitz, C. Pilarsky, and Robert Grützmann. 2014. "Precursor Lesions for Sporadic Pancreatic Cancer: PanIN, IPMN, and MCN." *BioMed Research International* 2014: 474905. <https://doi.org/10.1155/2014/474905>.
- Dittmer, Angela, and Jürgen Dittmer. 2022. "A CAF-Fueled TIMP-1/CD63/ITGB1/STAT3 Feedback Loop Promotes Migration and Growth of Breast Cancer Cells." *Cancers* 14 (20): 4983. <https://doi.org/10.3390/cancers14204983>.
- Djurec, Magdolna, Osvaldo Graña, Albert Lee, Kevin Troulé, Elisa Espinet, Lavinia Cabras, Carolina Navas, et al. 2018. "Saa3 Is a Key Mediator of the Protumorigenic Properties of Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Tumors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (6): E1147–56. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717802115>.
- Dolenšek, Jurij, Marjan Slak Rupnik, and Andraž Stožer. 2015. "Structural Similarities and Differences between the Human and the Mouse Pancreas." *Islets* 7 (1): e1024405. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>.
- Dominguez, Claudia X., Sören Müller, Shilpa Keerthivasan, Hartmut Koeppen, Jeffrey Hung, Sarah Gierke, Beatrice Breart, et al. 2020. "Single-Cell RNA Sequencing Reveals Stromal Evolution into LRRC15+ Myofibroblasts as a Determinant of Patient Response to Cancer Immunotherapy." *Cancer Discovery* 10 (2): 232–53. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0644>.
- Dubois, Charline, Natacha Rocks, Silvia Blacher, Irina Primac, Anne Gallez, Melissa García-Caballero, Céline Gérard, et al. 2019. "Lymph/Angiogenesis Contributes to Sex Differences in Lung Cancer through Oestrogen Receptor Alpha Signalling." *Endocrine-Related Cancer* 26 (2): 201–16. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0328>.
- Duijneveldt, Gemma van, Michael D.W. Griffin, and Tracy L. Putoczki. 2020. "Emerging Roles for the IL-6 Family of Cytokines in Pancreatic Cancer." *Clinical Science (London, England : 1979)* 134 (16): 2091–2115. <https://doi.org/10.1042/CS20191211>.
- Dunty, Jill M., Veronica Gabarra-Niecko, Michelle L. King, Derek F. J. Ceccarelli, Michael J. Eck, and Michael D. Schaller. 2004. "FERM Domain Interaction Promotes FAK Signaling." *Molecular and Cellular Biology* 24 (12): 5353–68. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5353-5368.2004>.
- Dzung, Andreas, Annalisa Saltari, Natascia Tiso, Ruth Lyck, Reinhard Dummer, and Mitchell P. Levesque. 2022. "STK11 Prevents Invasion through Signal Transducer and Activator of Transcription 3/5 and FAK Repression in Cutaneous Melanoma." *The Journal of Investigative Dermatology* 142 (4): 1171–1182.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.09.035>.

- Ellis, Lee M., and Daniel J. Hicklin. 2008. "VEGF-Targeted Therapy: Mechanisms of Anti-Tumour Activity." *Nature Reviews. Cancer* 8 (8): 579–91. <https://doi.org/10.1038/nrc2403>.
- Elosegui-Artola, Alberto, Roger Oria, Yunfeng Chen, Anita Kosmalka, Carlos Pérez-González, Natalia Castro, Cheng Zhu, Xavier Trepas, and Pere Roca-Cusachs. 2016. "Mechanical Regulation of a Molecular Clutch Defines Force Transmission and Transduction in Response to Matrix Rigidity." *Nature Cell Biology* 18 (5): 540–48. <https://doi.org/10.1038/ncb3336>.
- Elyada, Ela, Mohan Bolisetty, Pasquale Laise, William F. Flynn, Elise T. Courtois, Richard A. Burkhardt, Jonathan A. Teinor, et al. 2019. "Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts." *Cancer Discovery* 9 (8): 1102–23. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0094>.
- Ene-Obong, Abasi, Andrew J. Clear, Jennifer Watt, Jun Wang, Rewas Fatah, John C. Riches, John F. Marshall, et al. 2013. "Activated Pancreatic Stellate Cells Sequester CD8+ T-Cells to Reduce Their Infiltration of the Juxtatumoral Compartment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Gastroenterology* 145 (5): 1121–32. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.07.025>.
- Erler, Janine T., and Valerie M. Weaver. 2009. "Three-Dimensional Context Regulation of Metastasis." *Clinical & Experimental Metastasis* 26 (1): 35–49. <https://doi.org/10.1007/s10585-008-9209-8>.
- Evanko, Stephen P., Susan Potter-Perigo, Paul L. Bollyky, Gerald T. Nepom, and Thomas N. Wight. 2012. "Hyaluronan and Versican in the Control of Human T-Lymphocyte Adhesion and Migration." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 31 (2): 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.10.004>.
- Evans, J. D., A. Stark, C. D. Johnson, F. Daniel, J. Carmichael, J. Buckels, C. W. Imrie, P. Brown, and J. P. Neoptolemos. 2001. "A Phase II Trial of Marimastat in Advanced Pancreatic Cancer." *British Journal of Cancer* 85 (12): 1865–70. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.2168>.
- "FAK-SFK Signaling Integrates ECM Rigidity Sensing and Engagement of ERBB2 to Activate YAP and Promote Invasive Growth and Metastasis in Breast Cancer | bioRxiv." n.d. Accessed July 7, 2023. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.08.03.502677v1>.
- Fan, Huaping, Xiaofeng Zhao, Shaogang Sun, Ming Luo, and Jun-Lin Guan. 2013. "Function of Focal Adhesion Kinase Scaffolding to Mediate Endophilin A2 Phosphorylation Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Mammary Cancer Stem Cell Activities in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (5): 3322–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.420497>.
- Faulkner, Sam, Phillip Jobling, Brayden March, Chen Chen Jiang, and Hubert Hondermarck. 2019. "Tumor Neurobiology and the War of Nerves in Cancer." *Cancer Discovery* 9 (6): 702–10. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1398>.
- Feig, Christine, James O. Jones, Matthew Kraman, Richard J. B. Wells, Andrew Deonarine, Derek S. Chan, Claire M. Connell, et al. 2013. "Targeting CXCL12 from FAP-Expressing Carcinoma-Associated Fibroblasts Synergizes with Anti-PD-L1 Immunotherapy in Pancreatic Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (50): 20212–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320318110>.
- Feng, Feng, Xueyan Feng, Di Zhang, Qilong Li, and Li Yao. 2021. "Matrix Stiffness Induces Pericyte-Fibroblast Transition Through YAP Activation." *Frontiers in Pharmacology* 12 (May): 698275. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.698275>.
- Ferdoushi, Aysha, Nathan Griffin, Mark Marsland, Xiaoyue Xu, Sam Faulkner, Fangfang Gao, Hui Liu, et al. 2021. "Tumor Innervation and Clinical Outcome in Pancreatic Cancer." *Scientific Reports* 11 (1): 7390. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86831-w>.
- Ferlay, Jacques, Murielle Colombet, Isabelle Soerjomataram, Donald M. Parkin, Marion Piñeros, Ariana Znaor, and Freddie Bray. 2021. "Cancer Statistics for the Year 2020: An Overview." *International Journal of Cancer*, April. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>.
- Ferrara, Napoleone. 2005. "VEGF as a Therapeutic Target in Cancer." *Oncology* 69 Suppl 3: 11–16. <https://doi.org/10.1159/000088479>.
- Finzsch, Markus, Silke Schreiner, Tatjana Kichko, Peter Reeh, Ernst R. Tamm, Michael R. Bösl, Dies Meijer, and Michael Wegner. 2010. "Sox10 Is Required for Schwann Cell Identity and

- Progression beyond the Immature Schwann Cell Stage." *The Journal of Cell Biology* 189 (4): 701–12. <https://doi.org/10.1083/jcb.200912142>.
- Flies, Dallas B., Solomon Langermann, Christina Jensen, Morten A. Karsdal, and Nicholas Willumsen. 2023. "Regulation of Tumor Immunity and Immunotherapy by the Tumor Collagen Extracellular Matrix." *Frontiers in Immunology* 14: 1199513. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1199513>.
- Flowers, Brittany M., Hang Xu, Abigail S. Mulligan, Kathryn J. Hanson, Jose A. Seoane, Hannes Vogel, Christina Curtis, Laura D. Wood, and Laura D. Attardi. 2021. "Cell of Origin Influences Pancreatic Cancer Subtype." *Cancer Discovery* 11 (3): 660–77. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0633>.
- Foucher, Etienne D., Clément Ghigo, Salem Chouaib, Jérôme Galon, Juan Iovanna, and Daniel Olive. 2018. "Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Strong Imbalance of Good and Bad Immunological Cops in the Tumor Microenvironment." *Frontiers in Immunology* 9 (May): 1044. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01044>.
- Frame, Margaret C., Hitesh Patel, Bryan Serrels, Daniel Lietha, and Michael J. Eck. 2010. "The FERM Domain: Organizing the Structure and Function of FAK." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (11): 802–14. <https://doi.org/10.1038/nrm2996>.
- Franco, M., M. Pàez-Ribes, E. Cortez, O. Casanovas, and K. Pietras. 2011. "Use of a Mouse Model of Pancreatic Neuroendocrine Tumors to Find Pericyte Biomarkers of Resistance to Anti-Angiogenic Therapy." *Hormone and Metabolic Research*, September, 884–89. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1284381>.
- Franco, Marcela, Pernilla Roswall, Eliane Cortez, Douglas Hanahan, and Kristian Pietras. 2011. "Pericytes Promote Endothelial Cell Survival through Induction of Autocrine VEGF-A Signaling and Bcl-w Expression." *Blood* 118 (10): 2906–17. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-331694>.
- Friedl, Peter, and Bettina Weigelin. 2008. "Interstitial Leukocyte Migration and Immune Function." *Nature Immunology* 9 (9): 960–69. <https://doi.org/10.1038/ni.f.212>.
- Friedl, Peter, and Katarina Wolf. 2003a. "Proteolytic and Non-Proteolytic Migration of Tumour Cells and Leucocytes." *Biochemical Society Symposium*, no. 70: 277–85. <https://doi.org/10.1042/bss0700277>.
- . 2003b. "Tumour-Cell Invasion and Migration: Diversity and Escape Mechanisms." *Nature Reviews. Cancer* 3 (5): 362–74. <https://doi.org/10.1038/nrc1075>.
- Froeling, Fieke E. M., Christine Feig, Claude Chelala, Richard Dobson, Charles E. Mein, David A. Tuveson, Hans Clevers, Ian R. Hart, and Hemant M. Kocher. 2011. "Retinoic Acid-Induced Pancreatic Stellate Cell Quiescence Reduces Paracrine Wnt-β-Catenin Signaling to Slow Tumor Progression." *Gastroenterology* 141 (4): 1486–97, 1497.e1-14. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.047>.
- Fukunaga, Akira, Masaki Miyamoto, Yasushi Cho, Soichi Murakami, You Kwarada, Taro Oshikiri, Kentaro Kato, et al. 2004. "CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Together with CD4+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Dendritic Cells Improve the Prognosis of Patients with Pancreatic Adenocarcinoma." *Pancreas* 28 (1): e26-31. <https://doi.org/10.1097/00006676-200401000-00023>.
- Furuta, Y., D. Ilić, S. Kanazawa, N. Takeda, T. Yamamoto, and S. Aizawa. 1995. "Mesodermal Defect in Late Phase of Gastrulation by a Targeted Mutation of Focal Adhesion Kinase, FAK." *Oncogene* 11 (10): 1989–95.
- Gaggar, Amit, Patricia L. Jackson, Brett D. Noerager, Philip J. O'Reilly, D. Brent McQuaid, Steven M. Rowe, J. P. Clancy, and J. Edwin Blalock. 2008. "A Novel Proteolytic Cascade Generates an Extracellular Matrix-Derived Chemoattractant in Chronic Neutrophilic Inflammation." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (8): 5662–69.
- Galon, Jérôme, Anne Costes, Fatima Sanchez-Cabo, Amos Kirilovsky, Bernhard Mlecnik, Christine Lagorce-Pagès, Marie Tosolini, et al. 2006. "Type, Density, and Location of Immune Cells

- within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome." *Science (New York, N.Y.)* 313 (5795): 1960–64. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>.
- Gayrard, Charlène, Clément Bernaudin, Théophile Déjardin, Cynthia Seiler, and Nicolas Borghi. 2018. "Src- and Confinement-Dependent FAK Activation Causes E-Cadherin Relaxation and β -Catenin Activity." *The Journal of Cell Biology* 217 (3): 1063–77. <https://doi.org/10.1083/jcb.201706013>.
- Geng, Xinglong, Hongze Chen, Liang Zhao, Jisheng Hu, Wenbo Yang, Guanqun Li, Chundong Cheng, et al. 2021. "Cancer-Associated Fibroblast (CAF) Heterogeneity and Targeting Therapy of CAFs in Pancreatic Cancer." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9: 655152. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.655152>.
- gillam, Andrea wang-, Kian-Huat Lim, Robert R. McWilliams, Rama Suresh, A. Craig Lockhart, Amberly Brown, John Herndon, et al. 2022. "Phase I Dose Escalation and Expansion Study of Defactinib, Pembrolizumab, and Gemcitabine in Patients with Advanced Treatment-Refractory Pancreatic Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 40 (16_suppl): 4146–4146. https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.4146.
- Gilles, Maud-Emmanuelle, Federica Maione, Mélissande Cossutta, Gilles Carpentier, Laure Caruana, Silvia Di Maria, Claire Houppe, et al. 2016. "Nucleolin Targeting Impairs the Progression of Pancreatic Cancer and Promotes the Normalization of Tumor Vasculature." *Cancer Research* 76 (24): 7181–93. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0300>.
- Gilon, P., and J. C. Henquin. 2001. "Mechanisms and Physiological Significance of the Cholinergic Control of Pancreatic Beta-Cell Function." *Endocrine Reviews* 22 (5): 565–604. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.5.0440>.
- Gioelli, Noemi, Federica Maione, Chiara Camillo, Michela Ghitti, Donatella Valdembri, Noemi Morello, Marie Darce, et al. 2018. "A Rationally Designed NRP1-Independent Superagonist SEMA3A Mutant Is an Effective Anticancer Agent." *Science Translational Medicine* 10 (442): eaah4807. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4807>.
- Girard, J. P., and T. A. Springer. 1995. "High Endothelial Venules (HEVs): Specialized Endothelium for Lymphocyte Migration." *Immunology Today* 16 (9): 449–57. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80023-9](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80023-9).
- Giusti, Ilaria, Marianna Di Francesco, Giuseppina Poppa, Letizia Esposito, Sandra D'Ascenzo, and Vincenza Dolo. 2022. "Tumor-Derived Extracellular Vesicles Activate Normal Human Fibroblasts to a Cancer-Associated Fibroblast-Like Phenotype, Sustaining a Pro-Tumorigenic Microenvironment." *Frontiers in Oncology* 12 (February): 839880. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.839880>.
- Givant-Horwitz, Vered, Ben Davidson, and Reuven Reich. 2005. "Laminin-Induced Signaling in Tumor Cells." *Cancer Letters* 223 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.08.030>.
- Givel, Anne-Marie, Yann Kieffer, Alix Scholer-Dahirel, Philemon Sirven, Melissa Cardon, Floriane Pelon, Ilaria Magagna, et al. 2018. "miR200-Regulated CXCL12 β Promotes Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppression in Ovarian Cancers." *Nature Communications* 9 (1): 1056. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03348-z>.
- Goehrig, Delphine, Jérémy Nigri, Rémi Samain, Zhichong Wu, Paola Cappello, Gaëlle Gabiane, Xinyi Zhang, et al. 2019. "Stromal Protein Big-H3 Reprogrammes Tumour Microenvironment in Pancreatic Cancer." *Gut* 68 (4): 693–707. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317570>.
- Golubovskaya, Vita M., and William G. Cance. 2007. "Focal Adhesion Kinase and P53 Signaling in Cancer Cells." In *International Review of Cytology*, 263:103–53. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)63003-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)63003-4).
- Golubovskaya, Vita M., Richard Finch, and William G. Cance. 2005. "Direct Interaction of the N-Terminal Domain of Focal Adhesion Kinase with the N-Terminal Transactivation Domain of P53." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (26): 25008–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414172200>.
- Golubovskaya, Vita M., Richard Finch, Frederick Kweh, Nicole A. Massoll, Martha Campbell-Thompson, Margaret R. Wallace, and William G. Cance. 2008. "P53 Regulates FAK Expression

- in Human Tumor Cells." *Molecular Carcinogenesis* 47 (5): 373–82.
<https://doi.org/10.1002/mc.20395>.
- Golubovskaya, Vita M., Frederick A. Kweh, and William G. Cance. 2009. "Focal Adhesion Kinase and Cancer." *Histology and Histopathology* 24 (4): 503–10. <https://doi.org/10.14670/HH-24.503>.
- Gonçalves, A., M. Gilibert, E. François, L. Dahan, H. Perrier, R. Lamy, D. Re, et al. 2012. "BAYPAN Study: A Double-Blind Phase III Randomized Trial Comparing Gemcitabine plus Sorafenib and Gemcitabine plus Placebo in Patients with Advanced Pancreatic Cancer." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 23 (11): 2799–2805.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mds135>.
- Goncharov, N. V., P. I. Popova, P. P. Avdonin, I. V. Kudryavtsev, M. K. Serebryakova, E. A. Korf, and P. V. Avdonin. 2020. "Markers of Endothelial Cells in Normal and Pathological Conditions." *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A, Membrane and Cell Biology* 14 (3): 167–83.
<https://doi.org/10.1134/S1990747819030140>.
- Gonzalez, Hugo, Catharina Hagerling, and Zena Werb. 2018. "Roles of the Immune System in Cancer: From Tumor Initiation to Metastatic Progression." *Genes & Development* 32 (19–20): 1267–84. <https://doi.org/10.1101/gad.314617.118>.
- Gorchs, Laia, and Helen Kaipe. 2021. "Interactions between Cancer-Associated Fibroblasts and T Cells in the Pancreatic Tumor Microenvironment and the Role of Chemokines." *Cancers* 13 (12): 2995. <https://doi.org/10.3390/cancers13122995>.
- Griffith, Billie G. C., Rosanna Upstill-Goddard, Holly Brunton, Graeme R. Grimes, Andrew V. Biankin, Bryan Serrels, Adam Byron, and Margaret C. Frame. 2021. "FAK Regulates IL-33 Expression by Controlling Chromatin Accessibility at c-Jun Motifs." *Scientific Reports* 11 (1): 229.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-80111-9>.
- Gross, Stephen J., Amelia M. Webb, Alek D. Peterlin, Jessica R. Durrant, Rachel J. Judson, Qanber Raza, Jan K. Kitajewski, and Erich J. Kushner. 2021. "Notch Regulates Vascular Collagen IV Basement Membrane through Modulation of Lysyl Hydroxylase 3 Trafficking." *Angiogenesis* 24 (4): 789–805. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09791-9>.
- Grout, John A., Philémon Sirven, Andrew M. Leader, Shrisha Maskey, Eglantine Hector, Isabelle Puisieux, Fiona Steffan, et al. 2022. "Spatial Positioning and Matrix Programs of Cancer-Associated Fibroblasts Promote T Cell Exclusion in Human Lung Tumors." *Cancer Discovery* 12 (11): 2606–25. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1714>.
- Grove, Matthew, and Peter J. Brophy. 2014. "FAK Is Required for Schwann Cell Spreading on Immature Basal Lamina to Coordinate the Radial Sorting of Peripheral Axons with Myelination." *The Journal of Neuroscience* 34 (40): 13422–34.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1764-14.2014>.
- Grove, Matthew, Noboru H. Komiyama, Klaus-Armin Nave, Seth G. Grant, Diane L. Sherman, and Peter J. Brophy. 2007. "FAK Is Required for Axonal Sorting by Schwann Cells." *The Journal of Cell Biology* 176 (3): 277–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.200609021>.
- Grünwald, Barbara T., Antoine Devisme, Geoffroy Andrieux, Foram Vyas, Kazeera Aliar, Curtis W. McCloskey, Andrew Macklin, et al. 2021. "Spatially Confined Sub-Tumor Microenvironments in Pancreatic Cancer." *Cell* 184 (22): 5577–5592.e18.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.022>.
- Guan, Jian, Hui Zhang, Zhang Wen, Yumei Gu, Yin Cheng, Yang Sun, Tingting Zhang, Congwei Jia, Zhaohui Lu, and Jie Chen. 2014. "Retinoic Acid Inhibits Pancreatic Cancer Cell Migration and EMT through the Downregulation of IL-6 in Cancer Associated Fibroblast Cells." *Cancer Letters* 345 (1): 132–39. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.12.006>.
- Guijarro-Muñoz, Irene, Marta Compte, Ana Álvarez-Cienfuegos, Luis Álvarez-Vallina, and Laura Sanz. 2014. "Lipopolysaccharide Activates Toll-like Receptor 4 (TLR4)-Mediated NF-κB Signaling Pathway and Proinflammatory Response in Human Pericytes." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (4): 2457–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.521161>.
- Gunderson, Andrew J., Venkatesh Rajamanickam, Cynthia Bui, Brady Bernard, Joanna Pucilowska, Carmen Ballesteros-Merino, Mark Schmidt, et al. n.d. "Germinal Center Reactions in Tertiary

- Lymphoid Structures Associate with Neoantigen Burden, Humoral Immunity and Long-Term Survivorship in Pancreatic Cancer." *Oncoimmunology* 10 (1): 1900635. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1900635>.
- Guo, Jing-Qiang, Qing-Hui Zheng, Hui Chen, Liang Chen, Jin-Bo Xu, Min-Yuan Chen, Dian Lu, Zhao-Hong Wang, Hong-Fei Tong, and Shengzhang Lin. 2014. "Ginsenoside Rg3 Inhibition of Vasculogenic Mimicry in Pancreatic Cancer through Downregulation of VE-cadherin/EphA2/MMP9/MMP2 Expression." *International Journal of Oncology* 45 (3): 1065–72. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2500>.
- Guo, Kun, Qingyong Ma, Junhui Li, Zheng Wang, Tao Shan, Wei Li, Qinhong Xu, and Keping Xie. 2013. "Interaction of the Sympathetic Nerve with Pancreatic Cancer Cells Promotes Perineural Invasion through the Activation of STAT3 Signaling." *Molecular Cancer Therapeutics* 12 (3): 264–73. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0809>.
- Guo, Lifang, Nan Song, Ting He, Feifei Qi, Song Zheng, Xue-Gang Xu, Yan Fu, Hong-Duo Chen, and Yongzhang Luo. 2015. "Endostatin Inhibits the Tumorigenesis of Hemangioendothelioma via Downregulation of CXCL1." *Molecular Carcinogenesis* 54 (11): 1340–53. <https://doi.org/10.1002/mc.22210>.
- Habbe, Nils, Guanglu Shi, Robert A. Meguid, Volker Fendrich, Farzad Esni, Huiping Chen, Georg Feldmann, et al. 2008. "Spontaneous Induction of Murine Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (mPanIN) by Acinar Cell Targeting of Oncogenic Kras in Adult Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (48): 18913–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810097105>.
- Habtezion, Aida, Mouad Edderkaoui, and Stephen J. Pandol. 2016. "Macrophages and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Letters* 381 (1): 211–16. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.11.049>.
- Haj-Shomaly, Jozafina, Avital Vorontsova, Tamar Barenholz-Cohen, Oshrat Levi-Galibov, Mahesh Devarasetty, Michael Timaner, Ziv Raviv, et al. 2022. "T Cells Promote Metastasis by Regulating Extracellular Matrix Remodeling Following Chemotherapy." *Cancer Research* 82 (2): 278–91. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-1012>.
- Halder, Jyotsnabaran, Yvonne G. Lin, William M. Merritt, Whitney A. Spannuth, Alpa M. Nick, Toshiyuki Honda, Aparna A. Kamat, et al. 2007. "Therapeutic Efficacy of a Novel Focal Adhesion Kinase Inhibitor TAE226 in Ovarian Carcinoma." *Cancer Research* 67 (22): 10976–83. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2667>.
- Hallmann, Rupert, Melanie-Jane Hannocks, Jian Song, Xueli Zhang, Jacopo Di Russo, Anna-Liisa Luik, Miriam Burmeister, Hanna Gerwien, and Lydia Sorokin. 2020. "The Role of Basement Membrane Laminins in Vascular Function." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 127 (October): 105823. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105823>.
- Hallmann, Rupert, Xueli Zhang, Jacopo Di Russo, Lixia Li, Jian Song, Melanie-Jane Hannocks, and Lydia Sorokin. 2015. "The Regulation of Immune Cell Trafficking by the Extracellular Matrix." *Current Opinion in Cell Biology* 36 (October): 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.06.006>.
- Hamilton, Nicola B., David Attwell, and Catherine N. Hall. 2010. "Pericyte-Mediated Regulation of Capillary Diameter: A Component of Neurovascular Coupling in Health and Disease." *Frontiers in Neuroenergetics* 2 (May): 5. <https://doi.org/10.3389/fnene.2010.00005>.
- Hamzah, Juliana, Manfred Jugold, Fabian Kiessling, Paul Rigby, Mitali Manzur, Hugo H. Marti, Tamer Rabie, et al. 2008. "Vascular Normalization in Rgs5-Deficient Tumours Promotes Immune Destruction." *Nature* 453 (7193): 410–14. <https://doi.org/10.1038/nature06868>.
- Hartmann, Natalie, Nathalia A. Giese, Thomas Giese, Isabel Poschke, Rienk Offringa, Jens Werner, and Eduard Ryschich. 2014. "Prevailing Role of Contact Guidance in Intrastromal T-Cell Trapping in Human Pancreatic Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (13): 3422–33. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2972>.

- Hashizume, Hiroya, Peter Baluk, Shunichi Morikawa, John W. McLean, Gavin Thurston, Sylvie Roberge, Rakesh K. Jain, and Donald M. McDonald. 2000. "Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness." *The American Journal of Pathology* 156 (4): 1363–80. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65006-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65006-7).
- Hastings, Jordan F., Joanna N. Skhinas, Dirk Fey, David R. Croucher, and Thomas R. Cox. 2019. "The Extracellular Matrix as a Key Regulator of Intracellular Signalling Networks." *British Journal of Pharmacology* 176 (1): 82–92. <https://doi.org/10.1111/bph.14195>.
- He, Bo, Anna Johansson-Percival, Joseph Backhouse, Ji Li, Gabriel Yin Foo Lee, Juliana Hamzah, and Ruth Ganss. 2020. "Remodeling of Metastatic Vasculature Reduces Lung Colonization and Sensitizes Overt Metastases to Immunotherapy." *Cell Reports* 30 (3): 714–724.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.013>.
- Hecht, J. Randolph, Al B. Benson, Dmitry Vyushkov, Yingsi Yang, Johanna Bendell, and Udit Verma. 2017. "A Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Simtuzumab in Combination with FOLFIRI for the Second-Line Treatment of Metastatic KRAS Mutant Colorectal Adenocarcinoma." *The Oncologist* 22 (3): 243–e23. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0479>.
- Hellström, Mats, Li-Kun Phng, Jennifer J. Hofmann, Elisabet Wallgard, Leigh Coultas, Per Lindblom, Jackelyn Alva, et al. 2007. "Dll4 Signalling through Notch1 Regulates Formation of Tip Cells during Angiogenesis." *Nature* 445 (7129): 776–80. <https://doi.org/10.1038/nature05571>.
- Helm, Ole, Janka Held-Feindt, Evelin Grage-Griebenow, Norbert Reiling, Hendrik Ungefroren, Ilka Vogel, Uwe Krüger, et al. 2014. "Tumor-Associated Macrophages Exhibit pro- and Anti-Inflammatory Properties by Which They Impact on Pancreatic Tumorigenesis." *International Journal of Cancer* 135 (4): 843–61. <https://doi.org/10.1002/ijc.28736>.
- Helmlinger, G., P. A. Netti, H. C. Lichtenbeld, R. J. Melder, and R. K. Jain. 1997. "Solid Stress Inhibits the Growth of Multicellular Tumor Spheroids." *Nature Biotechnology* 15 (8): 778–83. <https://doi.org/10.1038/nbt0897-778>.
- Helms, Erin J., Mark W. Berry, R. Crystal Chaw, Christopher C. DuFort, Duanchen Sun, M. Kathrina Onate, Chet Oon, et al. 2022. "Mesenchymal Lineage Heterogeneity Underlies Nonredundant Functions of Pancreatic Cancer-Associated Fibroblasts." *Cancer Discovery* 12 (2): 484–501. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0601>.
- Henry, Brandon Michael, Bendik Skinningsrud, Karolina Saganiak, Przemysław A. Pękala, Jerzy A. Walocha, and Krzysztof A. Tomaszewski. 2019. "Development of the Human Pancreas and Its Vasculature - An Integrated Review Covering Anatomical, Embryological, Histological, and Molecular Aspects." *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft* 221 (January): 115–24. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.09.008>.
- Hezel, Aram F., Alec C. Kimmelman, Ben Z. Stanger, Nabeel Bardeesy, and Ronald A. Depinho. 2006. "Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Genes & Development* 20 (10): 1218–49. <https://doi.org/10.1101/gad.1415606>.
- Hida, Kyoko, Nako Maishi, Kosuke Akiyama, Hitomi Ohmura-Kakutani, Chisaho Torii, Noritaka Ohga, Takahiro Osawa, et al. 2017. "Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity Show Drug Resistance." *Cancer Science* 108 (11): 2195–2203. <https://doi.org/10.1111/cas.13388>.
- Hida, Kyoko, Nako Maishi, Ryo Takeda, and Yasuhiro Hida. 2022. "The Roles of Tumor Endothelial Cells in Cancer Metastasis." In *Metastasis*, edited by Consolato M. Sergi. Brisbane (AU): Exon Publications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK580883/>.
- Hingorani, Sunil R., Emanuel F. Petricoin, Anirban Maitra, Vinodh Rajapakse, Catrina King, Michael A. Jacobetz, Sally Ross, et al. 2003. "Preinvasive and Invasive Ductal Pancreatic Cancer and Its Early Detection in the Mouse." *Cancer Cell* 4 (6): 437–50. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00309-x](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00309-x).
- Hingorani, Sunil R., Lifu Wang, Asha S. Multani, Chelsea Combs, Therese B. Deramaudt, Ralph H. Hruban, Anil K. Rustgi, Sandy Chang, and David A. Tuveson. 2005. "Trp53R172H and

- KrasG12D Cooperate to Promote Chromosomal Instability and Widely Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice." *Cancer Cell* 7 (5): 469–83.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.023>.
- Hingorani, Sunil R., Lei Zheng, Andrea J. Bullock, Tara E. Seery, William P. Harris, Darren S. Sigal, Fadi Braiteh, et al. 2018. "HALO 202: Randomized Phase II Study of PEGPH20 Plus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine Versus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine in Patients With Untreated, Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 36 (4): 359–66.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.9564>.
- Hiraoka, Nobuyoshi, Kaoru Onozato, Tomoo Kosuge, and Setsuo Hirohashi. 2006. "Prevalence of FOXP3+ Regulatory T Cells Increases during the Progression of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Premalignant Lesions." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12 (18): 5423–34.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0369>.
- Hirth, Michael, Jagadeesh Gandla, Christiane Höper, Matthias M. Gaida, Nitin Agarwal, Manuela Simonetti, Aykut Demir, et al. 2020. "CXCL10 and CCL21 Promote Migration of Pancreatic Cancer Cells Toward Sensory Neurons and Neural Remodeling in Tumors in Mice, Associated With Pain in Patients." *Gastroenterology* 159 (2): 665–681.e13.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.037>.
- Hishinuma, Shoichi, Yoshiro Ogata, Moriaki Tomikawa, Iwao Ozawa, Kaoru Hirabayashi, and Seiji Igarashi. 2006. "Patterns of Recurrence after Curative Resection of Pancreatic Cancer, Based on Autopsy Findings." *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 10 (4): 511–18.
<https://doi.org/10.1016/j.gassur.2005.09.016>.
- Hoem, Dag, Oddbjørn Straume, Heike Immervoll, Lars A. Akslen, and Anders Molven. 2013. "Vascular Proliferation Is Associated with Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 121 (11): 1037–46.
<https://doi.org/10.1111/apm.12057>.
- Holst, J. J., T. W. Schwartz, S. Knuhtsen, S. L. Jensen, and O. V. Nielsen. 1986. "Autonomic Nervous Control of the Endocrine Secretion from the Isolated, Perfused Pig Pancreas." *Journal of the Autonomic Nervous System* 17 (1): 71–84. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(86\)90045-7](https://doi.org/10.1016/0165-1838(86)90045-7).
- Hong, JongWook, Nicholas P. Tobin, Helene Rundqvist, Tian Li, Marion Lavergne, Yaiza García-Ibáñez, Hanyu Qin, et al. 2015. "Role of Tumor Pericytes in the Recruitment of Myeloid-Derived Suppressor Cells." *Journal of the National Cancer Institute* 107 (10): djv209.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djv209>.
- Hong, Soon Auck, Hye Won Hwang, Min Kyoon Kim, Tae Jin Lee, Kwangil Yim, Hye Sung Won, Der Sheng Sun, Eun Young Kim, and Yoon Ho Ko. 2020. "High Endothelial Venule with Concomitant High CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Is Associated with a Favorable Prognosis in Resected Gastric Cancer." *Journal of Clinical Medicine* 9 (8): 2628.
<https://doi.org/10.3390/jcm9082628>.
- Horn, Lucas A., Paul L. Chariou, Sofia R. Gameiro, Haiyan Qin, Masafumi Iida, Kristen Fousek, Thomas J. Meyer, et al. 2022. "Remodeling the Tumor Microenvironment via Blockade of LAIR-1 and TGF- β Signaling Enables PD-L1-Mediated Tumor Eradication." *The Journal of Clinical Investigation* 132 (8): e155148. <https://doi.org/10.1172/JCI155148>.
- Horowitz, Jeffrey C., David S. Rogers, Vishal Sharma, Ragini Vittal, Eric S. White, Zongbin Cui, and Victor J. Thannickal. 2007. "Combinatorial Activation of FAK and AKT by Transforming Growth Factor-B1 Confers an Anoikis-Resistant Phenotype to Myofibroblasts." *Cellular Signalling* 19 (4): 761–71. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.10.001>.
- Horton, Edward R., Adam Byron, Janet A. Askari, Daniel H. J. Ng, Angélique Millon-Frémillon, Joseph Robertson, Ewa J. Koper, et al. 2015. "Definition of a Consensus Integrin Adhesome and Its Dynamics during Adhesion Complex Assembly and Disassembly." *Nature Cell Biology* 17 (12): 1577–87. <https://doi.org/10.1038/ncb3257>.

- Hosaka, Kayoko, Yunlong Yang, Takahiro Seki, Carina Fischer, Olivier Dubey, Erik Fredlund, Johan Hartman, et al. 2016a. "Pericyte-Fibroblast Transition Promotes Tumor Growth and Metastasis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (38): E5618-5627. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608384113>.
- . 2016b. "Pericyte-Fibroblast Transition Promotes Tumor Growth and Metastasis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (38): E5618-27. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608384113>.
- Hu, Chonghui, Renpeng Xia, Xiang Zhang, Tingting Li, Yuancheng Ye, Guolin Li, Rihua He, et al. 2022. "circFARP1 Enables Cancer-Associated Fibroblasts to Promote Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer via the LIF/STAT3 Axis." *Molecular Cancer* 21 (1): 24. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01501-3>.
- Hu, Dingyuan, Daniel Ansari, Qimin Zhou, Agata Sasor, Katarzyna Said Hilmersson, and Roland Andersson. 2019. "Stromal Fibronectin Expression in Patients with Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *World Journal of Surgical Oncology* 17 (February): 29. <https://doi.org/10.1186/s12957-019-1574-z>.
- Huang, Huocong, Zhaoning Wang, Yuqing Zhang, Rachana N. Pradhan, Debolina Ganguly, Raghav Chandra, Gilbert Murimwa, et al. 2022. "Mesothelial Cell-Derived Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts Induce Expansion of Regulatory T Cells in Pancreatic Cancer." *Cancer Cell* 40 (6): 656-673.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.04.011>.
- Huang, Yuhui, Jianping Yuan, Elda Righi, Walid S. Kamoun, Marek Ancukiewicz, Jean Nezivar, Michael Santosuosso, et al. 2012. "Vascular Normalizing Doses of Antiangiogenic Treatment Reprogram the Immunosuppressive Tumor Microenvironment and Enhance Immunotherapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (43): 17561-66. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215397109>.
- Huo, Xueyun, Wenjing Zhang, Guannan Zhao, Zhenwen Chen, Peixin Dong, Hidemichi Watari, Ramesh Narayanan, Todd D. Tillmanns, Lawrence M. Pfeffer, and Junming Yue. 2022. "FAK PROTAC Inhibits Ovarian Tumor Growth and Metastasis by Disrupting Kinase Dependent and Independent Pathways." *Frontiers in Oncology* 12: 851065. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.851065>.
- Hutton, Colin, Felix Heider, Adrian Blanco-Gomez, Antonia Banyard, Alexander Kononov, Xiaohong Zhang, Saadia Karim, et al. 2021. "Single-Cell Analysis Defines a Pancreatic Fibroblast Lineage That Supports Anti-Tumor Immunity." *Cancer Cell* 39 (9): 1227-1244.e20. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.06.017>.
- Hynes, Richard O. 2009. "Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils." *Science (New York, N.Y.)* 326 (5957): 1216-19. <https://doi.org/10.1126/science.1176009>.
- Hynes, Richard O., and Alexandra Naba. 2012. "Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (1): a004903. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>.
- Ilfeld, Brian M., Jessica Preciado, and Andrea M. Trescot. 2016. "Novel Cryoneurolysis Device for the Treatment of Sensory and Motor Peripheral Nerves." *Expert Review of Medical Devices* 13 (8): 713-25. <https://doi.org/10.1080/17434440.2016.1204229>.
- Ilić, D., Y. Furuta, S. Kanazawa, N. Takeda, K. Sobue, N. Nakatsuji, S. Nomura, J. Fujimoto, M. Okada, and T. Yamamoto. 1995. "Reduced Cell Motility and Enhanced Focal Adhesion Contact Formation in Cells from FAK-Deficient Mice." *Nature* 377 (6549): 539-44. <https://doi.org/10.1038/377539a0>.
- Insua-Rodríguez, Jacob, and Thordur Oskarsson. 2016. "The Extracellular Matrix in Breast Cancer." *Advanced Drug Delivery Reviews* 97 (February): 41-55. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.017>.
- Iodice, Simona, Sara Gandini, Patrick Maisonneuve, and Albert B. Lowenfels. 2008. "Tobacco and the Risk of Pancreatic Cancer: A Review and Meta-Analysis." *Langenbeck's Archives of Surgery* 393 (4): 535-45. <https://doi.org/10.1007/s00423-007-0266-2>.

- Iozzo, R. V., and I. Cohen. 1994. "Altered Proteoglycan Gene Expression and the Tumor Stroma." *EXS* 70: 199–214. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7545-5_12.
- Ishiguro, Hiroshi, Akiko Yamamoto, Miyuki Nakakuki, Lanjuan Yi, Mariko Ishiguro, Makoto Yamaguchi, Shiho Kondo, and Yuka Mochimaru. 2012. "Physiology and Pathophysiology of Bicarbonate Secretion by Pancreatic Duct Epithelium." *Nagoya Journal of Medical Science* 74 (1–2): 1–18.
- Ishihara, Jun, Ako Ishihara, Kazuto Fukunaga, Koichi Sasaki, Michael J. V. White, Priscilla S. Briquez, and Jeffrey A. Hubbell. 2018. "Laminin Heparin-Binding Peptides Bind to Several Growth Factors and Enhance Diabetic Wound Healing." *Nature Communications* 9 (June): 2163. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04525-w>.
- Iwasaki, Toshimitsu, Nobuyoshi Hiraoka, Yoshinori Ino, Kosei Nakajima, Yoji Kishi, Satoshi Nara, Minoru Esaki, Kazuaki Shimada, and Hitoshi Katai. 2019. "Reduction of Intrapancreatic Neural Density in Cancer Tissue Predicts Poorer Outcome in Pancreatic Ductal Carcinoma." *Cancer Science* 110 (4): 1491–1502. <https://doi.org/10.1111/cas.13975>.
- Izumi, Daisuke, Takatsugu Ishimoto, Keisuke Miyake, Hidetaka Sugihara, Kojiro Eto, Hiroshi Sawayama, Tadahito Yasuda, et al. 2016. "CXCL12/CXCR4 Activation by Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Integrin B1 Clustering and Invasiveness in Gastric Cancer." *International Journal of Cancer* 138 (5): 1207–19. <https://doi.org/10.1002/ijc.29864>.
- J Gunderson, Andrew, Venkatesh Rajamanickam, Cynthia Bui, Brady Bernard, Joanna Pucilowska, Carmen Ballesteros-Merino, Mark Schmidt, et al. 2021. "Germinal Center Reactions in Tertiary Lymphoid Structures Associate with Neoantigen Burden, Humoral Immunity and Long-Term Survivorship in Pancreatic Cancer." *Oncoimmunology* 10 (1): 1900635. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1900635>.
- Jacobetz, Michael A., Derek S. Chan, Albrecht Neesse, Tashinga E. Bapiro, Natalie Cook, Kristopher K. Frese, Christine Feig, et al. 2013. "Hyaluronan Impairs Vascular Function and Drug Delivery in a Mouse Model of Pancreatic Cancer." *Gut* 62 (1): 112–20. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302529>.
- Jain, R. K. 1999. "Transport of Molecules, Particles, and Cells in Solid Tumors." *Annual Review of Biomedical Engineering* 1: 241–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.1.1.241>.
- Jain, Rakesh K. 2005. "Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy." *Science (New York, N.Y.)* 307 (5706): 58–62. <https://doi.org/10.1126/science.1104819>.
- Jain, Saket, Jonathan W. Rick, Rushikesh S. Joshi, Angad Beniwal, Jordan Spatz, Sabraj Gill, Alexander Chih-Chieh Chang, et al. 2023. "Single-Cell RNA Sequencing and Spatial Transcriptomics Reveal Cancer-Associated Fibroblasts in Glioblastoma with Protumoral Effects." *The Journal of Clinical Investigation* 133 (5): e147087. <https://doi.org/10.1172/JCI147087>.
- Jang, Te-Hsuan, Wei-Chieh Huang, Shiao-Lin Tung, Sheng-Chieh Lin, Po-Ming Chen, Chun-Yu Cho, Ya-Yu Yang, et al. 2022. "MicroRNA-485-5p Targets Keratin 17 to Regulate Oral Cancer Stemness and Chemoresistance via the Integrin/FAK/Src/ERK/ β -Catenin Pathway." *Journal of Biomedical Science* 29 (1): 42. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00824-z>.
- Jansson, Malin, Jessica Lindberg, Gunilla Rask, Johan Svensson, Ola Billing, Anoosheh Nazemroaya, Anette Berglund, Fredrik Wärnberg, and Malin Sund. 2022. "Prognostic Value of Stromal Type IV Collagen Expression in Small Invasive Breast Cancers." *Frontiers in Molecular Biosciences* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2022.904526>.
- Jean, Christine, Xiao Lei Chen, Ju-Ock Nam, Isabelle Tancioni, Sean Uryu, Christine Lawson, Kristy K. Ward, et al. 2014. "Inhibition of Endothelial FAK Activity Prevents Tumor Metastasis by Enhancing Barrier Function." *The Journal of Cell Biology* 204 (2): 247–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.201307067>.
- Jeon, H., M. Ono, C. Kumagai, K. Miki, A. Morita, and Y. Kitagawa. 1996. "Pericytes from Microvessel Fragment Produce Type IV Collagen and Multiple Laminin Isoforms." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60 (5): 856–61. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.856>.

- Jerrell, Rachel J., and Aron Parekh. 2014. "Cellular Traction Stresses Mediate Extracellular Matrix Degradation by Invadopodia." *Acta Biomaterialia* 10 (5): 1886–96. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.058>.
- Jiang, Hong, Samarth Hegde, Brett L. Knolhoff, Yu Zhu, John M. Herndon, Melissa A. Meyer, Timothy M. Nywening, et al. 2016. "Targeting Focal Adhesion Kinase Renders Pancreatic Cancers Responsive to Checkpoint Immunotherapy." *Nature Medicine* 22 (8): 851–60. <https://doi.org/10.1038/nm.4123>.
- Jiang, Hong, Xiuting Liu, Brett L. Knolhoff, Samarth Hegde, Kyung Bae Lee, Hongmei Jiang, Ryan C. Fields, Jonathan A. Pachter, Kian-Huat Lim, and David G. DeNardo. 2020. "Development of Resistance to FAK Inhibition in Pancreatic Cancer Is Linked to Stromal Depletion." *Gut* 69 (1): 122–32. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317424>.
- Johansson-Percival, Anna, Zhi-Jie Li, Devina D. Lakhiani, Bo He, Xiao Wang, Juliana Hamzah, and Ruth Ganss. 2015. "Intratumoral LIGHT Restores Pericyte Contractile Properties and Vessel Integrity." *Cell Reports* 13 (12): 2687–98. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.004>.
- Jun, S., E. Thompson, M. Gottardis, J. Torri, K. Yamamura, M. Kibbey, W. Kim, and H. Kleinman. 1994. "Laminin Adhesion-Selected Primary Human Colon-Cancer Cells Are More Tumorigenic than the Parenteral and Nonadherent Cells." *International Journal of Oncology* 4 (1): 55–60.
- Jurcak, Noelle R., Agnieszka A. Rucki, Stephen Muth, Elizabeth Thompson, Rajni Sharma, Ding Ding, Qingfeng Zhu, et al. 2019. "Axon Guidance Molecules Promote Perineural Invasion and Metastasis of Orthotopic Pancreatic Tumors in Mice." *Gastroenterology* 157 (3): 838-850.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.05.065>.
- Kabacaoglu, Derya, Katrin J. Ciecielski, Dietrich A. Ruess, and Hana Algül. 2018. "Immune Checkpoint Inhibition for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current Limitations and Future Options." *Frontiers in Immunology* 9 (August): 1878. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01878>.
- Kadomoto, Suguru, Kouji Izumi, and Atsushi Mizokami. 2021. "Roles of CCL2-CCR2 Axis in the Tumor Microenvironment." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (16): 8530. <https://doi.org/10.3390/ijms22168530>.
- Kalluri, Raghu. 2003. "Basement Membranes: Structure, Assembly and Role in Tumour Angiogenesis." *Nature Reviews. Cancer* 3 (6): 422–33. <https://doi.org/10.1038/nrc1094>.
- Kalluri, Raghu, and Robert A. Weinberg. 2009. "The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition." *The Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1420–28. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.
- Kalluri, Raghu, and Michael Zeisberg. 2006. "Fibroblasts in Cancer." *Nature Reviews. Cancer* 6 (5): 392–401. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>.
- Kang, Tae-Yun, Federico Bocci, Mohit Kumar Jolly, Herbert Levine, José Nelson Onuchic, and Andre Levchenko. 2019. "Pericytes Enable Effective Angiogenesis in the Presence of Proinflammatory Signals." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (47): 23551–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913373116>.
- Kang, Wendi, Zhichao Feng, Jianwei Luo, Zhenhu He, Jun Liu, Jianzhen Wu, and Pengfei Rong. 2021. "Tertiary Lymphoid Structures in Cancer: The Double-Edged Sword Role in Antitumor Immunity and Potential Therapeutic Induction Strategies." *Frontiers in Immunology* 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.689270>.
- Kang, Yu, Wei Hu, Cristina Ivan, Heather J. Dalton, Takahito Miyake, Chad V. Pecot, Behrouz Zand, et al. 2013. "Role of Focal Adhesion Kinase in Regulating YB-1-Mediated Paclitaxel Resistance in Ovarian Cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 105 (19): 1485–95. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt210>.
- Karakas, Didem, Merve Erkisa, Remzi Okan Akar, Gizem Akman, Ezgi Yudum Senol, and Engin Ulukaya. 2023. "Targeting Periostin Expression Makes Pancreatic Cancer Spheroids More Vulnerable to Natural Killer Cells." *Biomedicines* 11 (2): 270. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020270>.
- Karlsson, S., A. J. Scheurink, A. B. Steffens, and B. Åhrén. 1994. "Involvement of Capsaicin-Sensitive Nerves in Regulation of Insulin Secretion and Glucose Tolerance in Conscious Mice." *The*

- American Journal of Physiology* 267 (4 Pt 2): R1071-1077.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.267.4.R1071>.
- Karlsson, S., F. Sundler, and B. Åhrén. 1992. "Neonatal Capsaicin-Treatment in Mice: Effects on Pancreatic Peptidergic Nerves and 2-Deoxy-D-Glucose-Induced Insulin and Glucagon Secretion." *Journal of the Autonomic Nervous System* 39 (1): 51–59.
[https://doi.org/10.1016/0165-1838\(92\)90250-k](https://doi.org/10.1016/0165-1838(92)90250-k).
- Karpińska, Monika, and Marian Czauderna. 2022. "Pancreas—Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism." *Frontiers in Physiology* 13 (March): 807632. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.807632>.
- Kaukonen, Riina, Guillaume Jacquemet, Hellyeh Hamidi, and Johanna Ivaska. 2017. "Cell-Derived Matrices for Studying Cell Proliferation and Directional Migration in a Complex 3D Microenvironment." *Nature Protocols* 12 (11): 2376–90.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2017.107>.
- Kennedy, Richard, and Esteban Celis. 2008. "Multiple Roles for CD4+ T Cells in Anti-Tumor Immune Responses." *Immunological Reviews* 222 (April): 129–44. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00616.x>.
- Kennel, Kilian B., Müge Bozlar, Adalbert F. De Valk, and Florian R. Greten. 2023. "Cancer-Associated Fibroblasts in Inflammation and Antitumor Immunity." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 29 (6): 1009–16.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-1031>.
- Kessenbrock, Kai, Vicki Plaks, and Zena Werb. 2010. "Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment." *Cell* 141 (1): 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>.
- "Key Statistics for Pancreatic Cancer." n.d. Accessed July 26, 2023.
<https://www.cancer.org/cancer/types/pancreatic-cancer/about/key-statistics.html>.
- Khoshnoodi, Jamshid, Vadim Pedchenko, and Billyg Hudson. 2008. "Mammalian Collagen IV." *Microscopy Research and Technique* 71 (5): 357–70. <https://doi.org/10.1002/jemt.20564>.
- Kikuta, Kazuhiro, Atsushi Masamune, Takashi Watanabe, Hiroyuki Ariga, Hiromichi Itoh, Shin Hamada, Kennichi Satoh, Shinichi Egawa, Michiaki Unno, and Tooru Shimosegawa. 2010. "Pancreatic Stellate Cells Promote Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 403 (3–4): 380–84.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.040>.
- Kim, Kimin, Yeh Joo Sohn, Ruri Lee, Hye Ju Yoo, Ji Yoon Kang, Nakwon Choi, Dokyun Na, and Ju Hun Yeon. 2020. "Cancer-Associated Fibroblasts Differentiated by Exosomes Isolated from Cancer Cells Promote Cancer Cell Invasion." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21): 8153. <https://doi.org/10.3390/ijms21218153>.
- Kim, Seung-Jin, Dipendra Khadka, and Jae Ho Seo. 2022. "Interplay between Solid Tumors and Tumor Microenvironment." *Frontiers in Immunology* 13 (May): 882718.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.882718>.
- Kim-Fuchs, Corina, Caroline P. Le, Matthew A. Pimentel, David Shackelford, Davide Ferrari, Eliane Angst, Frédéric Hollande, and Erica K. Sloan. 2014. "Chronic Stress Accelerates Pancreatic Cancer Growth and Invasion: A Critical Role for Beta-Adrenergic Signaling in the Pancreatic Microenvironment." *Brain, Behavior, and Immunity* 40 (August): 40–47.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.02.019>.
- Kindler, Hedy L., Gregory Friberg, Deepti A. Singh, Gershon Locker, Sreenivasa Nattam, Mark Kozloff, David A. Taber, et al. 2005. "Phase II Trial of Bevacizumab plus Gemcitabine in Patients with Advanced Pancreatic Cancer." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (31): 8033–40. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.9661>.
- Kindler, Hedy L., Tatsuya Ioka, Dirk J. Richel, Jaafar Bennouna, Richard Létourneau, Takuji Okusaka, Akihiro Funakoshi, et al. 2011. "Axitinib plus Gemcitabine versus Placebo plus Gemcitabine in Patients with Advanced Pancreatic Adenocarcinoma: A Double-Blind Randomised Phase 3 Study." *The Lancet. Oncology* 12 (3): 256–62. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70004-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70004-3).

- Kindler, Hedy Lee, Donna Niedzwiecki, Donna Hollis, Susan Sutherland, Deborah Schrag, Herbert Hurwitz, Federico Innocenti, et al. 2010. "Gemcitabine Plus Bevacizumab Compared With Gemcitabine Plus Placebo in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: Phase III Trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303)." *Journal of Clinical Oncology* 28 (22): 3617–22. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.1386>.
- Kirkwood, K. S., E. H. Kim, X. D. He, E. Q. Calastro, C. Domush, S. K. Yoshimi, E. F. Grady, J. Maa, N. W. Bunnett, and H. T. Debas. 1999. "Substance P Inhibits Pancreatic Exocrine Secretion via a Neural Mechanism." *The American Journal of Physiology* 277 (2): G314–320. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.277.2.G314>.
- Kleinschmidt, Elizabeth G., and David D. Schlaepfer. 2017. "Focal Adhesion Kinase Signaling in Unexpected Places." *Current Opinion in Cell Biology* 45 (April): 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.003>.
- Klement, John D., Dakota B. Poschel, Chunwan Lu, Alyssa D. Merting, Dafeng Yang, Priscilla S. Redd, and Kebin Liu. 2021. "Osteopontin Blockade Immunotherapy Increases Cytotoxic T Lymphocyte Lytic Activity and Suppresses Colon Tumor Progression." *Cancers* 13 (5): 1006. <https://doi.org/10.3390/cancers13051006>.
- Kloepper, Jonas, Lars Riedemann, Zohreh Amoozgar, Giorgio Seano, Katharina Susek, Veronica Yu, Nisha Dalvie, et al. 2016. "Ang-2/VEGF Bispecific Antibody Reprograms Macrophages and Resident Microglia to Anti-Tumor Phenotype and Prolongs Glioblastoma Survival." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (16): 4476–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525360113>.
- Knops, Alexander M., Andrew South, Ulrich Rodeck, Ubaldo Martinez-Outschoorn, Larry A. Harshyne, Jennifer Johnson, Adam J. Luginbuhl, and Joseph M. Curry. 2020. "Cancer-Associated Fibroblast Density, Prognostic Characteristics, and Recurrence in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis." *Frontiers in Oncology* 10 (November): 565306. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.565306>.
- Kobayashi, Hiroki, Krystyna A. Gieniec, Tamsin R. M. Lannagan, Tongtong Wang, Naoya Asai, Yasuyuki Mizutani, Tadashi Iida, et al. 2022. "The Origin and Contribution of Cancer-Associated Fibroblasts in Colorectal Carcinogenesis." *Gastroenterology* 162 (3): 890–906. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.11.037>.
- Kobayashi, Satoru, Kai Mao, Hanqiao Zheng, Xuejun Wang, Cam Patterson, Timothy D. O'Connell, and Qiangrong Liang. 2007. "Diminished GATA4 Protein Levels Contribute to Hyperglycemia-Induced Cardiomyocyte Injury." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (30): 21945–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703048200>.
- Kocher, Hemant M., Bristi Basu, Fieke E. M. Froeling, Debashis Sarker, Sarah Slater, Dominic Carlin, Nandita M. deSouza, et al. 2020. "Phase I Clinical Trial Repurposing All-Trans Retinoic Acid as a Stromal Targeting Agent for Pancreatic Cancer." *Nature Communications* 11 (September): 4841. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18636-w>.
- Koikawa, Kazuhiro, Kenoki Ohuchida, Yohei Ando, Shin Kibe, Hiromichi Nakayama, Shin Takesue, Sho Endo, et al. 2018. "Basement Membrane Destruction by Pancreatic Stellate Cells Leads to Local Invasion in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Letters* 425 (July): 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.03.031>.
- Kondo, Hiroshi, Shoichi Hazama, Toru Kawaoka, Shigefumi Yoshino, Shin Yoshida, Kazuhisa Tokuno, Motonari Takashima, Tomio Ueno, Yuji Hinoda, and Masaaki Oka. 2008. "Adoptive Immunotherapy for Pancreatic Cancer Using MUC1 Peptide-Pulsed Dendritic Cells and Activated T Lymphocytes." *Anticancer Research* 28 (1B): 379–87.
- Kondo, Naru, Yoshiaki Murakami, Kenichiro Uemura, Yasushi Hashimoto, Naoya Nakagawa, Hayato Sasaki, and Taijiro Sueda. 2015. "An Increased Number of Perineural Invasions Is Independently Associated With Poor Survival of Patients With Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Pancreas* 44 (8): 1345–51. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000413>.

- Kong, Deok-Hoon, Mi Ra Kim, Ji Hye Jang, Hee-Jun Na, and Sukmook Lee. 2017. "A Review of Anti-Angiogenic Targets for Monoclonal Antibody Cancer Therapy." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (8): 1786. <https://doi.org/10.3390/ijms18081786>.
- Kordes, Claus, Iris Sawitzka, Silke Götze, and Dieter Häussinger. 2012. "Stellate Cells from Rat Pancreas Are Stem Cells and Can Contribute to Liver Regeneration." *PloS One* 7 (12): e51878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051878>.
- Kumar Katakam, Sampath, Valeria Tria, Wey-Cheng Sim, George W. Yip, Stefano Molgora, Theodoros Karnavas, Eslam A. Elghonaimy, et al. 2021. "The Heparan Sulfate Proteoglycan Syndecan-1 Regulates Colon Cancer Stem Cell Function via a Focal Adhesion Kinase-Wnt Signaling Axis." *The FEBS Journal* 288 (2): 486–506. <https://doi.org/10.1111/febs.15356>.
- Kurahara, Hiroshi, Hiroyuki Shinichi, Yuko Matakai, Kousei Maemura, Hidetoshi Noma, Fumitake Kubo, Masahiko Sakoda, Shinichi Ueno, Shoji Natsugoe, and Sonshin Takao. 2011. "Significance of M2-Polarized Tumor-Associated Macrophage in Pancreatic Cancer." *The Journal of Surgical Research* 167 (2): e211-219. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.05.026>.
- Kyle, Alastair H., Lynsey A. Huxham, Devon M. Yeoman, and Andrew I. Minchinton. 2007. "Limited Tissue Penetration of Taxanes: A Mechanism for Resistance in Solid Tumors." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13 (9): 2804–10. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1941>.
- Lagares, David, Oscar Busnadiago, Rosa Ana García-Fernández, Mohit Kapoor, Shangxi Liu, David E. Carter, David Abraham, et al. 2012. "Inhibition of Focal Adhesion Kinase Prevents Experimental Lung Fibrosis and Myofibroblast Formation." *Arthritis and Rheumatism* 64 (5): 1653–64. <https://doi.org/10.1002/art.33482>.
- Lambert, Arthur W., Diwakar R. Pattabiraman, and Robert A. Weinberg. 2017. "EMERGING BIOLOGICAL PRINCIPLES OF METASTASIS." *Cell* 168 (4): 670–91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>.
- Lämmermann, Tim, Bernhard L. Bader, Susan J. Monkley, Tim Worbs, Roland Wedlich-Söldner, Karin Hirsch, Markus Keller, et al. 2008. "Rapid Leukocyte Migration by Integrin-Independent Flowing and Squeezing." *Nature* 453 (7191): 51–55. <https://doi.org/10.1038/nature06887>.
- Lark, Amy L., Chad A. Livas, Lynn Dressler, Dominic T. Moore, Robert C. Millikan, Joseph Geradts, Mary Iacocca, et al. 2005. "High Focal Adhesion Kinase Expression in Invasive Breast Carcinomas Is Associated with an Aggressive Phenotype." *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 18 (10): 1289–94. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800424>.
- Le, Dung T., Todd S Crocenzi, Jennifer N Urum, Eric R Lutz, Daniel A Laheru, Elizabeth A Sugar, Robert H Vonderheide, et al. 2015. "Randomized Phase II Study of the Safety, Efficacy and Immune Response of GVAX Pancreas (with Cyclophosphamide) and CRS-207 with or without Nivolumab in Patients with Previously Treated Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma (STELLAR)." *Journal for Immunotherapy of Cancer* 3 (Suppl 2): P155. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-3-S2-P155>.
- Le, Dung T., Vincent J. Picozzi, Andrew H. Ko, Zev A. Wainberg, Hedy Kindler, Andrea Wang-Gillam, Paul Oberstein, et al. 2019. "Results from a Phase IIb, Randomized, Multicenter Study of GVAX Pancreas and CRS-207 Compared with Chemotherapy in Adults with Previously Treated Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma (ECLIPSE Study)." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 25 (18): 5493–5502. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2992>.
- Le, Dung T., Andrea Wang-Gillam, Vincent Picozzi, Tim F. Greten, Todd Crocenzi, Gregory Springett, Michael Morse, et al. 2015. "Safety and Survival With GVAX Pancreas Prime and Listeria Monocytogenes–Expressing Mesothelin (CRS-207) Boost Vaccines for Metastatic Pancreatic Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 33 (12): 1325–33. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.4244>.
- Lee, Brian Y., Falko Hochgräfe, Hui-Ming Lin, Lesley Castillo, Jianmin Wu, Mark J. Raftery, S. Martin Shreeve, Lisa G. Horvath, and Roger J. Daly. 2014. "Phosphoproteomic Profiling Identifies

- Focal Adhesion Kinase as a Mediator of Docetaxel Resistance in Castrate-Resistant Prostate Cancer." *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (1): 190–201. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0225-T>.
- Lehman, Christine E., Adam Spencer, Sarah Hall, Jeremy J. P. Shaw, Julia Wulfschlegel, Emanuel F. Petricoin, Stefan Bekiranov, Mark J. Jameson, and Daniel Gioeli. 2021. "IGF1R and Src Inhibition Induce Synergistic Cytotoxicity in HNSCC through Inhibition of FAK." *Scientific Reports* 11 (1): 10826. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90289-1>.
- Leung, Cecilia S., Tsz-Lun Yeung, Kay-Pong Yip, Kwong-Kwok Wong, Samuel Y. Ho, Lingegowda S. Mangala, Anil K. Sood, et al. 2018. "Cancer-Associated Fibroblasts Regulate Endothelial Adhesion Protein LPP to Promote Ovarian Cancer Chemoresistance." *The Journal of Clinical Investigation* 128 (2): 589–606. <https://doi.org/10.1172/JCI95200>.
- Li, Aiqing, Tianhua Zhou, Lei Guo, and Jianmin Si. 2010. "Collagen Type I Regulates Beta-Catenin Tyrosine Phosphorylation and Nuclear Translocation to Promote Migration and Proliferation of Gastric Carcinoma Cells." *Oncology Reports* 23 (5): 1247–55. https://doi.org/10.3892/or_00000757.
- Li, Mingzhe, Huahu Guo, Qi Wang, Kai Chen, Kornmann Marko, Xiaodong Tian, and Yinmo Yang. 2020. "Pancreatic Stellate Cells Derived Exosomal miR-5703 Promotes Pancreatic Cancer by Downregulating CMTM4 and Activating PI3K/Akt Pathway." *Cancer Letters* 490 (October): 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.06.009>.
- Li, Wenjing, Guangjiao Yu, Yudan Liu, and Lei Sha. 2019. "Intrapancreatic Ganglia and Neural Regulation of Pancreatic Endocrine Secretion." *Frontiers in Neuroscience* 13: 21. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00021>.
- Li, Yue, Hailin Liu, Yujie Zhao, Dongsheng Yue, Chen Chen, Chenguang Li, Zhenfa Zhang, and Changli Wang. 2021. "Tumor-Associated Macrophages (TAMs)-Derived Osteopontin (OPN) Upregulates PD-L1 Expression and Predicts Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)." *Thoracic Cancer* 12 (20): 2698–2709. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14108>.
- Liebig, Catherine, Gustavo Ayala, Jonathan A. Wilks, David H. Berger, and Daniel Albo. 2009. "Perineural Invasion in Cancer: A Review of the Literature." *Cancer* 115 (15): 3379–91. <https://doi.org/10.1002/cncr.24396>.
- Lietha, Daniel, Xinming Cai, Derek F. J. Ceccarelli, Yiqun Li, Michael D. Schaller, and Michael J. Eck. 2007. "Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase." *Cell* 129 (6): 1177–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.041>.
- Lim, Ssang-Taek, Xiao Lei Chen, Yangmi Lim, Dan A. Hanson, Thanh-Trang Vo, Kyle Howerton, Nicholas Larocque, Susan J. Fisher, David D. Schlaepfer, and Dusko Ilic. 2008. "Nuclear FAK Promotes Cell Proliferation and Survival through FERM-Enhanced P53 Degradation." *Molecular Cell* 29 (1): 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.031>.
- Lim, Ssang-Taek, Xiao Lei Chen, Alok Tomar, Nichol L. G. Miller, Jiyeon Yoo, and David D. Schlaepfer. 2010. "Knock-in Mutation Reveals an Essential Role for Focal Adhesion Kinase Activity in Blood Vessel Morphogenesis and Cell Motility-Polarity but Not Cell Proliferation." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (28): 21526–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.129999>.
- Lim, Ssang-Taek, David Mikolon, Dwayne Stupack G., and David D. Schlaepfer. 2008. "FERM Control of FAK Function: Implications for Cancer Therapy." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7 (15): 2306–14.
- Lim, Ssang-Taek, Nichol L.G. Miller, Xiao Lei Chen, Isabelle Tancioni, Colin T. Walsh, Christine Lawson, Sean Uryu, Sara M. Weis, David A. Cheresch, and David D. Schlaepfer. 2012. "Nuclear-Localized Focal Adhesion Kinase Regulates Inflammatory VCAM-1 Expression." *The Journal of Cell Biology* 197 (7): 907–19. <https://doi.org/10.1083/jcb.201109067>.
- Lim, Ssang-Taek Steve. 2013. "Nuclear FAK: A New Mode of Gene Regulation from Cellular Adhesions." *Molecules and Cells* 36 (1): 1–6. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0139-1>.
- Lindahl, P., B. R. Johansson, P. Leveen, and C. Betsholtz. 1997. "Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice." *Science (New York, N.Y.)* 277 (5323): 242–45. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.242>.

- Lindsay, T. H., K. G. Halvorson, C. M. Peters, J. R. Ghilardi, M. A. Kuskowski, G. Y. Wong, and P. W. Mantyh. 2006. "A Quantitative Analysis of the Sensory and Sympathetic Innervation of the Mouse Pancreas." *Neuroscience* 137 (4): 1417–26.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.055>.
- Liou, Geou-Yarh, Heike Döppler, Brian Necela, Murli Krishna, Howard C. Crawford, Massimo Raimondo, and Peter Storz. 2013. "Macrophage-Secreted Cytokines Drive Pancreatic Acinar-to-Ductal Metaplasia through NF- κ B and MMPs." *The Journal of Cell Biology* 202 (3): 563–77.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201301001>.
- Lipinski, Christopher A., Nhan L. Tran, Emmanuel Menashi, Carole Rohl, Jean Kloss, R. Curtis Bay, Michael E. Berens, and Joseph C. Loftus. 2005. "The Tyrosine Kinase Pyk2 Promotes Migration and Invasion of Glioma Cells." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 7 (5): 435–45.
<https://doi.org/10.1593/neo.04712>.
- Liu, Chun, Miao Li, Zhao-Xia Dong, Dong Jiang, Xiaojing Li, Shuibin Lin, Demeng Chen, Xuenong Zou, Xing-Ding Zhang, and Gary D Luker. 2021. "Heterogeneous Microenvironmental Stiffness Regulates Pro-Metastatic Functions of Breast Cancer Cells." *Acta Biomaterialia* 131 (September): 326–40. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.07.009>.
- Liu, Hsuan-Chen, Daniel Davila Gonzalez, Dixita Ishani Viswanath, Robin Shae Vander Pol, Shani Zakiya Saunders, Nicola Di Trani, Yitian Xu, et al. 2023. "Sustained Intratumoral Administration of Agonist CD40 Antibody Overcomes Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Pancreatic Cancer." *Advanced Science* 10 (9): 2206873.
<https://doi.org/10.1002/advs.202206873>.
- Liu, Shangxi, Xu Shi-wen, Laura Kennedy, Daphne Pala, Yunliang Chen, Mark Eastwood, David E. Carter, Carol M. Black, David J. Abraham, and Andrew Leask. 2007. "FAK Is Required for TGF β -Induced JNK Phosphorylation in Fibroblasts: Implications for Acquisition of a Matrix-Remodeling Phenotype." *Molecular Biology of the Cell* 18 (6): 2169–78.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E06-12-1121>.
- Liu, Yang, Fan Li, Feng Gao, Lingxi Xing, Peng Qin, Xingxin Liang, Jiajie Zhang, et al. 2016a. "Role of Microenvironmental Periostin in Pancreatic Cancer Progression." *Oncotarget* 8 (52): 89552–65. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11533>.
- . 2016b. "Periostin Promotes the Chemotherapy Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Cancer." *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (11): 15283–91. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5321-6>.
- Liu, Yifan, Yansha Sun, Peng Wang, Songling Li, Yiwei Dong, Min Zhou, Bizhi Shi, Hua Jiang, Ruixin Sun, and Zonghai Li. 2023. "FAP-Targeted CAR-T Suppresses MDSCs Recruitment to Improve the Antitumor Efficacy of Claudin18.2-Targeted CAR-T against Pancreatic Cancer." *Journal of Translational Medicine* 21 (1): 255. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04080-z>.
- Liu, Ying, Li Li, Li Wang, Lu Lu, Ying Li, Guolin Huang, and Jinjing Song. 2023. "'Two-Faces' of Hyaluronan, a Dynamic Barometer of Disease Progression in Tumor Microenvironment." *Discover Oncology* 14 (1): 11. <https://doi.org/10.1007/s12672-023-00618-1>.
- Lo, Albert, Liang-Chuan S. Wang, John Scholler, James Monslow, Diana Avery, Kheng Newick, Shaun O'Brien, et al. 2015. "Tumor-Promoting Desmoplasia Is Disrupted by Depleting FAP-Expressing Stromal Cells." *Cancer Research* 75 (14): 2800–2810.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3041>.
- Loeffler, Markus, Jörg A. Krüger, Andreas G. Niethammer, and Ralph A. Reisfeld. 2006. "Targeting Tumor-Associated Fibroblasts Improves Cancer Chemotherapy by Increasing Intratumoral Drug Uptake." *The Journal of Clinical Investigation* 116 (7): 1955–62.
<https://doi.org/10.1172/JCI26532>.
- Longo, Vito, Oronzo Brunetti, Antonio Gnoni, Stefano Cascinu, Giampietro Gasparini, Vito Lorusso, Domenico Ribatti, and Nicola Silvestris. 2016. "Angiogenesis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Controversial Issue." *Oncotarget* 7 (36): 58649–58.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10765>.

- Lopes-Coelho, Filipa, Filipa Martins, Sofia A. Pereira, and Jacinta Serpa. 2021. "Anti-Angiogenic Therapy: Current Challenges and Future Perspectives." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (7): 3765. <https://doi.org/10.3390/ijms22073765>.
- Lord, Megan S., Christine Y. Chuang, James Melrose, Michael J. Davies, Renato V. Iozzo, and John M. Whitelock. 2014. "The Role of Vascular-Derived Perlecan in Modulating Cell Adhesion, Proliferation and Growth Factor Signaling." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 35 (April): 112–22. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.01.016>.
- Lorusso, Girieca, Christof B. Wyss, François Kuonen, Nicola Vannini, Clotilde Billottet, Nathalie Duffey, Raphael Pineau, et al. 2022. "Connexins Orchestrate Progression of Breast Cancer Metastasis to the Brain by Promoting FAK Activation." *Science Translational Medicine* 14 (661): eaax8933. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax8933>.
- Louault, Kévin, Rong-Rong Li, and Yves A. DeClerck. 2020. "Cancer-Associated Fibroblasts: Understanding Their Heterogeneity." *Cancers* 12 (11): 3108. <https://doi.org/10.3390/cancers12113108>.
- Love, Jeffrey A., Eunyoung Yi, and Tina G. Smith. 2007. "Autonomic Pathways Regulating Pancreatic Exocrine Secretion." *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 133 (1): 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.10.001>.
- Lu, Haibo, Li Wang, Wen Gao, Jieru Meng, Bingbing Dai, Shuhong Wu, John Minna, et al. 2013. "IGFBP2/FAK Pathway Is Causally Associated with Dasatinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Cells." *Molecular Cancer Therapeutics* 12 (12): 2864–73. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0233>.
- Lubbe, Wilhelm J., Zengyi Y. Zhou, Weili Fu, David Zuzga, Stephanie Schulz, Rafael Fridman, Ruth J. Muschel, Scott A. Waldman, and Giovanni M. Pitari. 2006. "Tumor Epithelial Cell Matrix Metalloproteinase 9 Is a Target for Antimetastatic Therapy in Colorectal Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12 (6): 1876–82. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2686>.
- Lugano, Roberta, Mohanraj Ramachandran, and Anna Dimberg. 2020. "Tumor Angiogenesis: Causes, Consequences, Challenges and Opportunities." *Cellular and Molecular Life Sciences* 77 (9): 1745–70. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>.
- Luo, Ming, Xiaofeng Zhao, Song Chen, Suling Liu, Max S. Wicha, and Jun-Lin Guan. 2013. "Distinct FAK Activities Determine Progenitor and Mammary Stem Cell Characteristics." *Cancer Research* 73 (17): 5591–5602. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1351>.
- Luo, Shi-Wen, Chun Zhang, Bin Zhang, Chang-Hoon Kim, Yuan-Zheng Qiu, Quan-Sheng Du, Lin Mei, and Wen-Cheng Xiong. 2009. "Regulation of Heterochromatin Remodelling and Myogenin Expression during Muscle Differentiation by FAK Interaction with MBD2." *The EMBO Journal* 28 (17): 2568–82. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.178>.
- Lutz, Eric R., Annie A. Wu, Elaine Bigelow, Rajni Sharma, Guanglan Mo, Kevin Soares, Sara Solt, et al. 2014. "Immunotherapy Converts Non-Immunogenic Pancreatic Tumors into Immunogenic Foci of Immune Regulation." *Cancer Immunology Research* 2 (7): 616–31. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0027>.
- Lv, Yalei, Yujie Shan, Lina Song, Yufei Zhao, Ruixue Lai, Junyan Su, and Xiaoyun Zhang. 2021. "Type I Collagen Promotes Tumor Progression of Integrin B1 Positive Gastric Cancer through a BCL9L/β-Catenin Signaling Pathway." *Aging (Albany NY)* 13 (14): 19064–76. <https://doi.org/10.18632/aging.203355>.
- Ma, Yunxia, Miljana Nenkov, Desiree Charlotte Schröder, Mohamed Abubrig, Nikolaus Gassler, and Yuan Chen. 2021. "Fibulin 2 Is Hypermethylated and Suppresses Tumor Cell Proliferation through Inhibition of Cell Adhesion and Extracellular Matrix Genes in Non-Small Cell Lung Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (21): 11834. <https://doi.org/10.3390/ijms222111834>.
- Ma, Yuze, Yu Fu, Xiaoli Fan, Qiang Ji, XiaoJiao Duan, Yanfeng Wang, Yongmin Zhang, Zhigang Wang, and Huifang Hao. 2023. "FAK/IL-8 Axis Promotes the Proliferation and Migration of Gastric Cancer Cells." *Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association*

- and the Japanese Gastric Cancer Association 26 (4): 528–41. <https://doi.org/10.1007/s10120-023-01384-3>.
- Mace, Thomas A, Mark Bloomston, and Gregory B Lesinski. 2013. “Pancreatic Cancer-Associated Stellate Cells.” *Oncoimmunology* 2 (7): e24891. <https://doi.org/10.4161/onci.24891>.
- Maione, Federica, Fabiola Molla, Claudia Meda, Roberto Latini, Lorena Zentilin, Mauro Giacca, Giorgio Seano, Guido Serini, Federico Bussolino, and Enrico Giraudo. 2009. “Semaphorin 3A Is an Endogenous Angiogenesis Inhibitor That Blocks Tumor Growth and Normalizes Tumor Vasculature in Transgenic Mouse Models.” *The Journal of Clinical Investigation* 119 (11): 3356–72. <https://doi.org/10.1172/JCI36308>.
- Maishi, Nako, Yusuke Ohba, Kosuke Akiyama, Noritaka Ohga, Jun-Ichi Hamada, Hiroko Nagao-Kitamoto, Mohammad Towfik Alam, et al. 2016. “Tumour Endothelial Cells in High Metastatic Tumours Promote Metastasis via Epigenetic Dysregulation of Biglycan.” *Scientific Reports* 6 (June): 28039. <https://doi.org/10.1038/srep28039>.
- Mak, Ki M., and Rena Mei. 2017. “Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease.” *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)* 300 (8): 1371–90. <https://doi.org/10.1002/ar.23567>.
- Makhmutova, Madina, and Alejandro Caicedo. 2021. “Optical Imaging of Pancreatic Innervation.” *Frontiers in Endocrinology* 12: 663022. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.663022>.
- Manoukian, Paul, Maarten Bijlsma, and Hanneke van Laarhoven. 2021. “The Cellular Origins of Cancer-Associated Fibroblasts and Their Opposing Contributions to Pancreatic Cancer Growth.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.743907>.
- Mao, Liping, Jinxue Yang, Jiaxin Yue, Yang Chen, Hongrui Zhou, Dongdong Fan, Qihua Zhang, Simone Buraschi, Renato V. Iozzo, and Xiuli Bi. 2021. “Decorin Deficiency Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Colon Cancer Metastasis.” *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 95 (January): 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2020.10.001>.
- Marchesi, Federica, Lorenzo Piemonti, Giuseppe Fedele, Annarita Destro, Massimo Roncalli, Luca Albarello, Claudio Doglioni, et al. 2008. “The Chemokine Receptor CX3CR1 Is Involved in the Neural Tropism and Malignant Behavior of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *Cancer Research* 68 (21): 9060–69. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1810>.
- Marstrand-Daucé, Louis, Diane Lorenzo, Anaïs Chassac, Pascal Nicole, Anne Couvelard, and Cécile Haumaitre. 2023. “Acinar-to-Ductal Metaplasia (ADM): On the Road to Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) and Pancreatic Cancer.” *International Journal of Molecular Sciences* 24 (12): 9946. <https://doi.org/10.3390/ijms24129946>.
- Martinet, Ludovic, Ignacio Garrido, Thomas Filleron, Sophie Le Guellec, Elisabeth Bellard, Jean-Jacques Fournie, Philippe Rochemaix, and Jean-Philippe Girard. 2011. “Human Solid Tumors Contain High Endothelial Venules: Association with T- and B-Lymphocyte Infiltration and Favorable Prognosis in Breast Cancer.” *Cancer Research* 71 (17): 5678–87. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0431>.
- Martinez-Bosch, Neus, Judith Vinaixa, and Pilar Navarro. 2018. “Immune Evasion in Pancreatic Cancer: From Mechanisms to Therapy.” *Cancers* 10 (1): 6. <https://doi.org/10.3390/cancers10010006>.
- Matsuda, Kohei, Noritaka Ohga, Yasuhiro Hida, Chikara Muraki, Kunihiro Tsuchiya, Takuro Kurosu, Tomoshige Akino, et al. 2010. “Isolated Tumor Endothelial Cells Maintain Specific Character during Long-Term Culture.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394 (4): 947–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.089>.
- McAndrews, Kathleen M., Karina Vázquez-Arreguín, Changsoo Kwak, Hikaru Sugimoto, Xiaofeng Zheng, Bingrui Li, Michelle L. Kirtley, Valerie S. LeBleu, and Raghu Kalluri. 2021. “ α SMA+ Fibroblasts Suppress Lgr5+ Cancer Stem Cells and Restrain Colorectal Cancer Progression.” *Oncogene* 40 (26): 4440–52. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01866-7>.

- McCarty, Marya F., Ray J. Somcio, Oliver Stoeltzing, Jane Wey, Fan Fan, Wenbiao Liu, Corazon Bucana, and Lee M. Ellis. 2007. "Overexpression of PDGF-BB Decreases Colorectal and Pancreatic Cancer Growth by Increasing Tumor Pericyte Content." *The Journal of Clinical Investigation* 117 (8): 2114–22. <https://doi.org/10.1172/JCI31334>.
- Mebius, R. E., P. R. Streeter, S. Michie, E. C. Butcher, and I. L. Weissman. 1996. "A Developmental Switch in Lymphocyte Homing Receptor and Endothelial Vascular Addressin Expression Regulates Lymphocyte Homing and Permits CD4⁺ CD3⁻ Cells to Colonize Lymph Nodes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (20): 11019. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11019>.
- Mei, Lin, and Wen-Cheng Xiong. 2010. "FAK Interaction with MBD2: A Link from Cell Adhesion to Nuclear Chromatin Remodeling?" *Cell Adhesion & Migration* 4 (1): 77–80. <https://doi.org/10.4161/cam.4.1.10343>.
- Mekapogu, Alpha R., Srinivasa P. Pothula, Romano C. Pirola, Jeremy S. Wilson, and Minoti V. Apte. 2020. "Pancreatic Stellate Cells in Health and Disease." *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*, November. <https://doi.org/10.3998/panc.2020.08>.
- Melisi, Davide, Do-Youn Oh, Antoine Hollebecque, Emiliano Calvo, Anna Varghese, Erkut Borazanci, Teresa Macarulla, et al. 2021. "Safety and Activity of the TGF β Receptor I Kinase Inhibitor Galunisertib plus the Anti-PD-L1 Antibody Durvalumab in Metastatic Pancreatic Cancer." *Journal for Immunotherapy of Cancer* 9 (3): e002068. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-002068>.
- Melzer, Michael Karl, Frank Arnold, Katja Stifter, Friedemann Zengerling, Ninel Azoitei, Thomas Seufferlein, Christian Bolenz, and Alexander Kleger. 2020. "An Immunological Glance on Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (9): 3345. <https://doi.org/10.3390/ijms21093345>.
- Miller, Bryan W., Jennifer P. Morton, Mark Pinese, Grazia Saturno, Nigel B. Jamieson, Ewan McGhee, Paul Timpson, et al. 2015. "Targeting the LOX/Hypoxia Axis Reverses Many of the Features That Make Pancreatic Cancer Deadly: Inhibition of LOX Abrogates Metastasis and Enhances Drug Efficacy." *EMBO Molecular Medicine* 7 (8): 1063–76. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404827>.
- Minami, T., and W. C. Aird. 2001. "Thrombin Stimulation of the Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Promoter in Endothelial Cells Is Mediated by Tandem Nuclear Factor-Kappa B and GATA Motifs." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (50): 47632–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108363200>.
- Mitra, Satyajit K., Daniel A. Hanson, and David D. Schlaepfer. 2005. "Focal Adhesion Kinase: In Command and Control of Cell Motility." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (1): 56–68. <https://doi.org/10.1038/nrm1549>.
- Mitra, Satyajit K., and David D. Schlaepfer. 2006. "Integrin-Regulated FAK-Src Signaling in Normal and Cancer Cells." *Current Opinion in Cell Biology* 18 (5): 516–23. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.08.011>.
- Miyai, Yuki, Daisuke Sugiyama, Tetsunari Hase, Naoya Asai, Tetsuro Taki, Kazuki Nishida, Takayuki Fukui, et al. 2022. "Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Enhance Tumor Response to Immune Checkpoint Blockade." *Life Science Alliance* 5 (6): e202101230. <https://doi.org/10.26508/lsa.202101230>.
- Miyamoto, Hidenori, Tatsuya Murakami, Kunihiro Tsuchida, Hiromu Sugino, Hidenori Miyake, and Seiki Tashiro. 2004. "Tumor-Stroma Interaction of Human Pancreatic Cancer: Acquired Resistance to Anticancer Drugs and Proliferation Regulation Is Dependent on Extracellular Matrix Proteins." *Pancreas* 28 (1): 38–44. <https://doi.org/10.1097/00006676-200401000-00006>.
- Miyazaki, Yoshihiro, Tatsuya Oda, Nobuhito Mori, and Yasuyuki S. Kida. 2020. "Bhattacharjee." *FEBS Open Bio* 10 (11): 2268–81. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12976>.
- Mizutani, Yasuyuki, Hiroki Kobayashi, Tadashi Iida, Naoya Asai, Atsushi Masamune, Akitoshi Hara, Nobutoshi Esaki, et al. 2019. "Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit

- Pancreatic Carcinogenesis." *Cancer Research* 79 (20): 5367–81.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0454>.
- Moatassim-Billah, Siham, Camille Duluc, Rémi Samain, Christine Jean, Aurélie Perraud, Emilie Decaup, Stéphanie Cassant-Sourdy, et al. 2016. "Anti-Metastatic Potential of Somatostatin Analog SOM230: Indirect Pharmacological Targeting of Pancreatic Cancer-Associated Fibroblasts." *Oncotarget* 7 (27): 41584–98. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9296>.
- Moffitt, Richard A., Raoud Marayati, Elizabeth L. Flate, Keith E. Volmar, S. Gabriela Herrera Loeza, Katherine A. Hoadley, Naim U. Rashid, et al. 2015. "Virtual Microdissection Identifies Distinct Tumor- and Stroma-Specific Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Nature Genetics* 47 (10): 1168–78. <https://doi.org/10.1038/ng.3398>.
- Monboisse, Jean Claude, Jean Baptiste Oudart, Laurent Ramont, Sylvie Brassart-Pasco, and François Xavier Maquart. 2014. "Matrikines from Basement Membrane Collagens: A New Anti-Cancer Strategy." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1840 (8): 2589–98.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.029>.
- Mongiat, Maurizio, Shawn M. Sweeney, James D. San Antonio, Jian Fu, and Renato V. Iozzo. 2003. "Endorepellin, a Novel Inhibitor of Angiogenesis Derived from the C Terminus of Perlecan." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (6): 4238–49.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M210445200>.
- Monteran, Lea, and Neta Erez. 2019. "The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment." *Frontiers in Immunology* 10: 1835. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01835>.
- Moore, M. J., J. Hamm, J. Dancey, P. D. Eisenberg, M. Dagenais, A. Fields, K. Hagan, et al. 2003. "Comparison of Gemcitabine versus the Matrix Metalloproteinase Inhibitor BAY 12-9566 in Patients with Advanced or Metastatic Adenocarcinoma of the Pancreas: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (17): 3296–3302.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.098>.
- Moreno-Layseca, Paulina, and Charles H. Streuli. 2014. "Signalling Pathways Linking Integrins with Cell Cycle Progression." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 34 (February): 144–53. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.011>.
- Moussion, Christine, and Jean-Philippe Girard. 2011. "Dendritic Cells Control Lymphocyte Entry to Lymph Nodes through High Endothelial Venules." *Nature* 479 (7374): 542–46.
<https://doi.org/10.1038/nature10540>.
- Mui, Keeley L., Christopher S. Chen, and Richard K. Assoian. 2016. "The Mechanical Regulation of Integrin–Cadherin Crosstalk Organizes Cells, Signaling and Forces." *Journal of Cell Science* 129 (6): 1093–1100. <https://doi.org/10.1242/jcs.183699>.
- Murakami, Mami, Mark J. Ernsting, Elijus Undzys, Nathan Holwell, Warren D. Foltz, and Shyh-Dar Li. 2013. "Docetaxel Conjugate Nanoparticles That Target α -Smooth Muscle Actin-Expressing Stromal Cells Suppress Breast Cancer Metastasis." *Cancer Research* 73 (15): 4862–71.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0062>.
- Murdamoothoo, Devadarssen, Zhen Sun, Alev Yilmaz, Gilles Riegel, Chérine Abou-Faycal, Claire Deligne, Ines Velazquez-Quesada, et al. 2021. "Tenascin-C Immobilizes Infiltrating T Lymphocytes through CXCL12 Promoting Breast Cancer Progression." *EMBO Molecular Medicine* 13 (6): e13270. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013270>.
- Mustapha, Rami, Kenrick Ng, James Monypenny, and Tony Ng. 2021. "Insights Into Unveiling a Potential Role of Tertiary Lymphoid Structures in Metastasis." *Frontiers in Molecular Biosciences* 8: 661516. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.661516>.
- Mwangi, Simon, Mallappa Anitha, Chaithanya Mallikarjun, Xiaokun Ding, Manami Hara, Alexander Parsadanian, Christian P. Larsen, et al. 2008. "Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Increases Beta-Cell Mass and Improves Glucose Tolerance." *Gastroenterology* 134 (3): 727–37. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.12.033>.

- Naba, Alexandra, Karl R. Clauser, Sebastian Hoersch, Hui Liu, Steven A. Carr, and Richard O. Hynes. 2012. "The Matrisome: In Silico Definition and In Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices." *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 11 (4): M111.014647. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014647>.
- Nagy, Tamas, Huijun Wei, Tang-Long Shen, Xu Peng, Chun-Chi Liang, Boyi Gan, and Jun-Lin Guan. 2007. "Mammary Epithelial-Specific Deletion of the Focal Adhesion Kinase Gene Leads to Severe Lobulo-Alveolar Hypoplasia and Secretory Immaturity of the Murine Mammary Gland." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (43): 31766–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705403200>.
- Nakamura, Kazumasa, Junpei Sasajima, Yusuke Mizukami, Yoshiaki Sugiyama, Madoka Yamazaki, Rie Fujii, Toru Kawamoto, et al. 2010. "Hedgehog Promotes Neovascularization in Pancreatic Cancers by Regulating Ang-1 and IGF-1 Expression in Bone-Marrow Derived pro-Angiogenic Cells." *PloS One* 5 (1): e8824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008824>.
- Nakaoka, Kazunori, Eizaburo Ohno, Naoto Kawabe, Teiji Kuzuya, Kohei Funasaka, Yoshihito Nakagawa, Mitsuo Nagasaka, et al. 2023. "Current Status of the Diagnosis of Early-Stage Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 13 (2): 215. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13020215>.
- Natarajan, Vikneshwari, Sangdeuk Ha, Alexander Delgado, Reed Jacobson, Lina Alhalhooly, Yongki Choi, and Jiha Kim. 2022. "Acquired α SMA Expression in Pericytes Coincides with Aberrant Vascular Structure and Function in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancers* 14 (10): 2448. <https://doi.org/10.3390/cancers14102448>.
- Navarro, Rocío, Marta Compte, Luis Álvarez-Vallina, and Laura Sanz. 2016. "Immune Regulation by Pericytes: Modulating Innate and Adaptive Immunity." *Frontiers in Immunology* 7 (November): 480. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00480>.
- Neoptolemos, J. P., J. A. Dunn, D. D. Stocken, J. Almond, K. Link, H. Beger, C. Bassi, et al. 2001. "Adjuvant Chemoradiotherapy and Chemotherapy in Resectable Pancreatic Cancer: A Randomised Controlled Trial." *Lancet (London, England)* 358 (9293): 1576–85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06651-x](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06651-x).
- Neoptolemos, John P., Daniel H. Palmer, Paula Ghaneh, Eftychia E. Psarelli, Juan W. Valle, Christopher M. Halloran, Olusola Faluyi, et al. 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 (London, England)* 389 (10073): 1011–24. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32409-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32409-6).
- Neuzillet, Cindy, Annemiläi Tijeras-Raballand, Jérôme Cros, Sandrine Faivre, Pascal Hammel, and Eric Raymond. 2013. "Stromal Expression of SPARC in Pancreatic Adenocarcinoma." *Cancer Metastasis Reviews* 32 (3–4): 585–602. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9439-3>.
- Newport, Emma, Ana Rita Pedrosa, Delphine Lees, Matthew Dukinfield, Edward Carter, Jesus Gomez-Escudero, Pedro Casado, et al. 2022. "Elucidating the Role of the Kinase Activity of Endothelial Cell Focal Adhesion Kinase in Angiocrine Signalling and Tumour Growth." *The Journal of Pathology* 256 (2): 235–47. <https://doi.org/10.1002/path.5833>.
- Ng, Kai-Yu, Queenie T. Shea, Tin-Lok Wong, Steve T. Luk, Man Tong, Chung-Mau Lo, Kwan Man, et al. 2021. "Chemotherapy-Enriched THBS2-Deficient Cancer Stem Cells Drive Hepatocarcinogenesis through Matrix Softness Induced Histone H3 Modifications." *Advanced Science* 8 (5): 2002483. <https://doi.org/10.1002/advs.202002483>.
- Nicolas-Boluda, Alba, Javier Vaquero, Lene Vimeux, Thomas Guilbert, Sarah Barrin, Chahrazade Kantari-Mimoun, Matteo Ponzio, et al. 2021. "Tumor Stiffening Reversion through Collagen Crosslinking Inhibition Improves T Cell Migration and Anti-PD-1 Treatment." *eLife* 10 (June): e58688. <https://doi.org/10.7554/eLife.58688>.
- Nielsen, Michael Friberg Bruun, Michael Bau Mortensen, and Sönke Detlefsen. 2017. "Identification of Markers for Quiescent Pancreatic Stellate Cells in the Normal Human Pancreas." *Histochemistry and Cell Biology* 148 (4): 359–80. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1581-5>.

- Nikitenko, L., and C. Boshoff. 2006. "Endothelial Cells and Cancer." *Handbook of Experimental Pharmacology*, no. 176 Pt 2: 307–34. https://doi.org/10.1007/3-540-36028-x_10.
- Nikolova, Ganka, Boris Strilic, and Eckhard Lammert. 2007. "The Vascular Niche and Its Basement Membrane." *Trends in Cell Biology* 17 (1): 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.11.005>.
- Ning, Xiaofei, Hongran Zhang, Cong Wang, and Xiuqi Song. 2018. "Exosomes Released by Gastric Cancer Cells Induce Transition of Pericytes Into Cancer-Associated Fibroblasts." *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 24 (April): 2350–59. <https://doi.org/10.12659/MSM.906641>.
- Nishida, Naoyo, Hirohisa Yano, Takashi Nishida, Toshiharu Kamura, and Masamichi Kojiro. 2006. "Angiogenesis in Cancer." *Vascular Health and Risk Management* 2 (3): 213–19. <https://doi.org/10.2147/vhrm.2006.2.3.213>.
- Nissen, Neel I., Morten Karsdal, and Nicholas Willumsen. 2019. "Collagens and Cancer Associated Fibroblasts in the Reactive Stroma and Its Relation to Cancer Biology." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 38 (1): 115. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1110-6>.
- Nobes, Catherine D., and Alan Hall. 1999. "Rho GTPases Control Polarity, Protrusion, and Adhesion during Cell Movement." *The Journal of Cell Biology* 144 (6): 1235–44.
- Noel, Marcus, Eileen M. O'Reilly, Brian M. Wolpin, David P. Ryan, Andrea J. Bullock, Carolyn D. Britten, David C. Linehan, et al. 2020. "Phase 1b Study of a Small Molecule Antagonist of Human Chemokine (C-C Motif) Receptor 2 (PF-04136309) in Combination with Nab-Paclitaxel/Gemcitabine in First-Line Treatment of Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Investigational New Drugs* 38 (3): 800–811. <https://doi.org/10.1007/s10637-019-00830-3>.
- Nywenning, Timothy M, Andrea Wang-Gillam, Dominic E Sanford, Brian A Belt, Roheena Z Panni, Brian M Cusworth, Adetunji T Toriola, et al. 2016. "Phase 1b Study Targeting Tumour Associated Macrophages with CCR2 Inhibition plus FOLFIRINOX in Locally Advanced and Borderline Resectable Pancreatic Cancer." *The Lancet. Oncology* 17 (5): 651–62. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)00078-4).
- Oettle, Helmut, Stefan Post, Peter Neuhaus, Klaus Gellert, Jan Langrehr, Karsten Ridwelski, Harald Schramm, et al. 2007. "Adjuvant Chemotherapy with Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer: A Randomized Controlled Trial." *JAMA* 297 (3): 267–77. <https://doi.org/10.1001/jama.297.3.267>.
- O'Hara, Mark H., Eileen M. O'Reilly, Gauri Varadhachary, Robert A. Wolff, Zev A. Wainberg, Andrew H. Ko, George Fisher, et al. 2021. "CD40 Agonistic Monoclonal Antibody APX005M (Sotigalimab) and Chemotherapy, with or without Nivolumab, for the Treatment of Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: An Open-Label, Multicentre, Phase 1b Study." *The Lancet. Oncology* 22 (1): 118–31. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30532-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30532-5).
- O'Hara, Mark H., Eileen Mary O'Reilly, Robert A. Wolff, Zev A. Wainberg, Andrew H. Ko, Osama E. Rahma, George A. Fisher, et al. 2021. "Gemcitabine (Gem) and Nab-Paclitaxel (NP) ± Nivolumab (Nivo) ± CD40 Agonistic Monoclonal Antibody APX005M (Sotigalimab), in Patients (Pts) with Untreated Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma (mPDAC): Phase (Ph) 2 Final Results." *Journal of Clinical Oncology* 39 (15_suppl): 4019–4019. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.4019.
- Öhlund, D, C Lundin, B Ardnor, M Öman, P Naredi, and M Sund. 2009. "Type IV Collagen Is a Tumour Stroma-Derived Biomarker for Pancreas Cancer." *British Journal of Cancer* 101 (1): 91–97. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605107>.
- Öhlund, Daniel, Ela Elyada, and David Tuveson. 2014. "Fibroblast Heterogeneity in the Cancer Wound." *The Journal of Experimental Medicine* 211 (8): 1503–23. <https://doi.org/10.1084/jem.20140692>.
- Öhlund, Daniel, Oskar Franklin, Erik Lundberg, Christina Lundin, and Malin Sund. 2013a. "Type IV Collagen Stimulates Pancreatic Cancer Cell Proliferation, Migration, and Inhibits Apoptosis

- through an Autocrine Loop." *BMC Cancer* 13 (1): 154. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-154>.
- . 2013b. "Type IV Collagen Stimulates Pancreatic Cancer Cell Proliferation, Migration, and Inhibits Apoptosis through an Autocrine Loop." *BMC Cancer* 13 (March): 154. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-154>.
- Öhlund, Daniel, Abram Handly-Santana, Giulia Biffi, Ela Elyada, Ana S. Almeida, Mariano Ponz-Sarvisé, Vincenzo Corbo, et al. 2017a. "Distinct Populations of Inflammatory Fibroblasts and Myofibroblasts in Pancreatic Cancer." *The Journal of Experimental Medicine* 214 (3): 579–96. <https://doi.org/10.1084/jem.20162024>.
- . 2017b. "Distinct Populations of Inflammatory Fibroblasts and Myofibroblasts in Pancreatic Cancer." *The Journal of Experimental Medicine* 214 (3): 579–96. <https://doi.org/10.1084/jem.20162024>.
- Olivares, Orianne, Jared R. Mayers, Victoire Gouirand, Margaret E. Torrence, Tristan Gicquel, Laurence Borge, Sophie Lac, et al. 2017. "Collagen-Derived Proline Promotes Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Survival under Nutrient Limited Conditions." *Nature Communications* 8 (July): 16031. <https://doi.org/10.1038/ncomms16031>.
- Orecchia, Paola, Romana Conte, Enrica Balza, Andrea Petretto, PierLuigi Mauri, Maria Cristina Mingari, and Barbara Carnemolla. 2013. "A Novel Human Anti-Syndecan-1 Antibody Inhibits Vascular Maturation and Tumour Growth in Melanoma." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 49 (8): 2022–33. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.019>.
- O'Reilly, Eileen M., Do-Youn Oh, Neesha Dhani, Daniel J. Renouf, Myung Ah Lee, Weijing Sun, George Fisher, et al. 2019. "Durvalumab With or Without Tremelimumab for Patients With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *JAMA Oncology* 5 (10): 1431–38. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.1588>.
- O'Reilly, M. S., T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W. S. Lane, E. Flynn, J. R. Birkhead, B. R. Olsen, and J. Folkman. 1997. "Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth." *Cell* 88 (2): 277–85. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81848-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81848-6).
- Orozco, Carlos A., Neus Martinez-Bosch, Pedro E. Guerrero, Judith Vinaixa, Tomás Dalotto-Moreno, Mar Iglesias, Mireia Moreno, et al. 2018. "Targeting Galectin-1 Inhibits Pancreatic Cancer Progression by Modulating Tumor–Stroma Crosstalk." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (16): E3769–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722434115>.
- Owen, Katherine A., Michelle Y. Abshire, Robert W. Tilghman, James E. Casanova, and Amy H. Bouton. 2011. "FAK Regulates Intestinal Epithelial Cell Survival and Proliferation during Mucosal Wound Healing." *PloS One* 6 (8): e23123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023123>.
- Özdemir, Berna C., Tsvetelina Pentcheva-Hoang, Julianne L. Carstens, Xiaofeng Zheng, Chia-Chin Wu, Tyler R. Simpson, Hanane Laklai, et al. 2014. "Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival." *Cancer Cell* 25 (6): 719–34. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.005>.
- Ozmadenci, Duygu, Jayanth S. Shankara Narayanan, Jacob Andrew, Marjaana Ojalill, Allison M. Barrie, Shulin Jiang, Samhita Iyer, et al. 2022. "Tumor FAK Orchestrates Immunosuppression in Ovarian Cancer via the CD155/TIGIT Axis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (17): e2117065119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117065119>.
- Pach, Elke, Maike Kümpfer, Julia E. Fromme, Jan Zamek, Fabian Metzen, Manuel Koch, Cornelia Mauch, and Paola Zigrino. 2021. "Extracellular Matrix Remodeling by Fibroblast-MMP14 Regulates Melanoma Growth." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (22): 12276. <https://doi.org/10.3390/ijms222212276>.
- Padoan, Andrea, Mario Plebani, and Daniela Basso. 2019. "Inflammation and Pancreatic Cancer: Focus on Metabolism, Cytokines, and Immunity." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (3): 676. <https://doi.org/10.3390/ijms20030676>.

- Paget, Stephen. 1889. "THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST." *The Lancet* 133 (3421): 571–73. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)49915-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)49915-0).
- Paku, Sándor, Katalin Dezső, Edina Bugyik, József Tóvári, József Tímár, Péter Nagy, Viktoria Laszlo, Walter Klepetko, and Balázs Döme. 2011. "A New Mechanism for Pillar Formation during Tumor-Induced Intussusceptive Angiogenesis: Inverse Sprouting." *The American Journal of Pathology* 179 (3): 1573–85. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.033>.
- Pan, Qionghui, Qingyu Wang, Tianshu Zhao, Xinyu Zhao, Yixin Liang, Mengyun Shi, Cong Chen, and Feng Lin. 2023. "FAK Inhibitor PF-562271 Inhibits the Migration and Proliferation of High-Grade Serous Ovarian Cancer Cells through FAK and FAK Mediated Cell Cycle Arrest." *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 40 (8): 215. <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02092-9>.
- Park, Joo Hyun, Byung-Lan Lee, Jiyeon Yoon, Jin Kim, Min A. Kim, Han-Kwang Yang, and Woo Ho Kim. 2010. "Focal Adhesion Kinase (FAK) Gene Amplification and Its Clinical Implications in Gastric Cancer." *Human Pathology* 41 (12): 1664–73. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.06.004>.
- Park, Wungki, Akhil Chawla, and Eileen M. O'Reilly. 2021. "Pancreatic Cancer: A Review." *JAMA* 326 (9): 851–62. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.13027>.
- Parsons, J. Thomas. 2003. "Focal Adhesion Kinase: The First Ten Years." *Journal of Cell Science* 116 (Pt 8): 1409–16. <https://doi.org/10.1242/jcs.00373>.
- Parsons, J. Thomas, Jill Slack-Davis, Robert Tilghman, and W. Gregory Roberts. 2008. "Focal Adhesion Kinase: Targeting Adhesion Signaling Pathways for Therapeutic Intervention." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14 (3): 627–32. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2220>.
- Partecke, Lars Ivo, André Käding, Dung Nguyen Trung, Stephan Diedrich, Matthias Sendler, Frank Weiss, Jens-Peter Kühn, et al. 2017. "Subdiaphragmatic Vagotomy Promotes Tumor Growth and Reduces Survival via TNF α in a Murine Pancreatic Cancer Model." *Oncotarget* 8 (14): 22501–12. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15019>.
- Patwardhan, Sejal, Pratiksha Mahadik, Omshree Shetty, and Shamik Sen. 2021. "ECM Stiffness-Tuned Exosomes Drive Breast Cancer Motility through Thrombospondin-1." *Biomaterials* 279 (December): 121185. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121185>.
- Paul, Ritama, Ming Luo, Xueying Mo, Jason Lu, Syn Kok Yeo, and Jun-Lin Guan. 2020. "FAK Activates AKT-mTOR Signaling to Promote the Growth and Progression of MMTV-Wnt1-Driven Basal-like Mammary Tumors." *Breast Cancer Research: BCR* 22 (1): 59. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01298-3>.
- Paulsson, M. 1992. "Basement Membrane Proteins: Structure, Assembly, and Cellular Interactions." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 27 (1–2): 93–127. <https://doi.org/10.3109/10409239209082560>.
- Peng, Tao, Yao Guo, Zheng Gan, Yan Ling, Jiongxin Xiong, Xueyi Liang, and Jing Cui. 2022. "Nerve Growth Factor (NGF) Encourages the Neuroinvasive Potential of Pancreatic Cancer Cells by Activating the Warburg Effect and Promoting Tumor Derived Exosomal miRNA-21 Expression." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2022 (October): 8445093. <https://doi.org/10.1155/2022/8445093>.
- Peranzoni, Elisa, Houcine Bougherara, Sarah Barrin, Audrey Mansuet-Lupo, Marco Alifano, Diane Damotte, and Emmanuel Donnadieu. 2017. "Ex Vivo Imaging of Resident CD8 T Lymphocytes in Human Lung Tumor Slices Using Confocal Microscopy." *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 130 (December): 55709. <https://doi.org/10.3791/55709>.
- Petridou, Nicoletta I., and Paris A. Skourides. 2014. "FAK Transduces Extracellular Forces That Orient the Mitotic Spindle and Control Tissue Morphogenesis." *Nature Communications* 5 (October): 5240. <https://doi.org/10.1038/ncomms6240>.
- Pickup, Michael W., Hanane Laklai, Irene Acerbi, Philip Owens, Agnieszka E. Gorska, Anna Chytil, Mary Aakre, Valerie M. Weaver, and Harold L. Moses. 2013. "Stromally Derived Lysyl Oxidase Promotes Metastasis of Transforming Growth Factor- β -Deficient Mouse Mammary

- Carcinomas." *Cancer Research* 73 (17): 5336–46. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0012>.
- Pietilä, Elina A., Jordi Gonzalez-Molina, Lidia Moyano-Galceran, Sanaz Jamalzadeh, Kaiyang Zhang, Laura Lehtinen, S. Pauliina Turunen, et al. 2021. "Co-Evolution of Matrisome and Adaptive Adhesion Dynamics Drives Ovarian Cancer Chemoresistance." *Nature Communications* 12 (1): 3904. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24009-8>.
- Pijnappel, Esther N., Nienke P. M. Wassenaar, Oliver J. Gurney-Champion, Remy Klaassen, Koen van der Lee, Marjolein C. H. Pleunis-van Empel, Dick J. Richel, et al. 2021. "Phase I/II Study of LDE225 in Combination with Gemcitabine and Nab-Paclitaxel in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer." *Cancers* 13 (19): 4869. <https://doi.org/10.3390/cancers13194869>.
- Pirone, Dana M., Wendy F. Liu, Sami Alom Ruiz, Lin Gao, Srivatsan Raghavan, Christopher A. Lemmon, Lewis H. Romer, and Christopher S. Chen. 2006. "(Newport et al. 2022." *The Journal of Cell Biology* 174 (2): 277–88. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510062>.
- Pirtskhalaishvili, G., and J. B. Nelson. 2000. "Endothelium-Derived Factors as Paracrine Mediators of Prostate Cancer Progression." *The Prostate* 44 (1): 77–87. [https://doi.org/10.1002/1097-0045\(20000615\)44:1<77::aid-pros10>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/1097-0045(20000615)44:1<77::aid-pros10>3.0.co;2-g).
- Plaza-Menacho, Iván, Andrea Morandi, Luca Mologni, Piet Boender, Carlo Gambacorti-Passerini, Anthony I. Magee, Robert M. W. Hofstra, Phillip Knowles, Neil Q. McDonald, and Clare M. Isacke. 2011. "Focal Adhesion Kinase (FAK) Binds RET Kinase via Its FERM Domain, Priming a Direct and Reciprocal RET-FAK Transactivation Mechanism." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (19): 17292–302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.168500>.
- Plotnikov, Sergey V., Ana M. Pasapera, Benedikt Sabass, and Clare M. Waterman. 2012. "Force Fluctuations within Focal Adhesions Mediate ECM-Rigidity Sensing to Guide Directed Cell Migration." *Cell* 151 (7): 1513–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.034>.
- Pöschl, Ernst, Ursula Schlötzer-Schrehardt, Bent Brachvogel, Kenji Saito, Yoshifumi Ninomiya, and Ulrike Mayer. 2004. "Collagen IV Is Essential for Basement Membrane Stability but Dispensable for Initiation of Its Assembly during Early Development." *Development (Cambridge, England)* 131 (7): 1619–28. <https://doi.org/10.1242/dev.01037>.
- Potente, Michael, Holger Gerhardt, and Peter Carmeliet. 2011. "Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis." *Cell* 146 (6): 873–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039>.
- Principe, Daniel R., Brian DeCant, Emman Mascariñas, Elizabeth A. Wayne, Andrew M. Diaz, Naomi Akagi, Rosa Hwang, et al. 2016. "TGFβ Signaling in the Pancreatic Tumor Microenvironment Promotes Fibrosis and Immune Evasion to Facilitate Tumorigenesis." *Cancer Research* 76 (9): 2525–39. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1293>.
- Provenzano, P P, and S R Hingorani. 2013. "Hyaluronan, Fluid Pressure, and Stromal Resistance in Pancreas Cancer." *British Journal of Cancer* 108 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.569>.
- Provenzano, Paolo P., Carlos Cuevas, Amy E. Chang, Vikas K. Goel, Daniel D. Von Hoff, and Sunil R. Hingorani. 2012. "Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Cell* 21 (3): 418–29. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.007>.
- Provenzano, Paolo P., Kevin W. Eliceiri, Jay M. Campbell, David R. Inman, John G. White, and Patricia J. Keely. 2006. "Collagen Reorganization at the Tumor-Stromal Interface Facilitates Local Invasion." *BMC Medicine* 4 (1): 38. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-4-38>.
- Pylayeva, Yuliya, Kelly M. Gillen, William Gerald, Hilary E. Beggs, Louis F. Reichardt, and Filippo G. Giancotti. 2009. "Ras- and PI3K-Dependent Breast Tumorigenesis in Mice and Humans Requires Focal Adhesion Kinase Signaling." *The Journal of Clinical Investigation* 119 (2): 252–66. <https://doi.org/10.1172/JCI37160>.
- Qin, Jie, Lin Wang, Ling Zheng, Xiaoyan Zhou, Yidi Zhang, Tingting Yang, and Yanmin Zhou. 2016. "Concentrated Growth Factor Promotes Schwann Cell Migration Partly through the Integrin B1-Mediated Activation of the Focal Adhesion Kinase Pathway." *International Journal of Molecular Medicine* 37 (5): 1363–70. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2520>.

- Qiu, Jingyao, and Karen K. Hirschi. 2019. "Endothelial Cell Development and Its Application to Regenerative Medicine." *Circulation Research* 125 (4): 489–501. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.311405>.
- Radzimirska, Malgorzata, Jacek Kuchinka, Elzbieta Nowak, Wojciech Trybus, and Aleksander Szczurkowski. 2020. "Cholinergic and Adrenergic Innervation of the Pancreas in Chinchilla (Chinchilla Laniger Molina)." *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 58 (1): 54–60. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2020.0005>.
- Rahman, Salman, Yatin Patel, Jacqueline Murray, Kirti V. Patel, Rushika Sumathipala, Michael Sobel, and Errol S. Wijelath. 2005. "Novel Hepatocyte Growth Factor (HGF) Binding Domains on Fibronectin and Vitronectin Coordinate a Distinct and Amplified Met-Integrin Induced Signalling Pathway in Endothelial Cells." *BMC Cell Biology* 6 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-6-8>.
- Ramanathan, Ramesh K., Shannon L. McDonough, Philip A. Philip, Sunil R. Hingorani, Jill Lacy, Jeremy S. Kortmansky, Jaykumar Thumar, et al. 2019. "Phase IB/II Randomized Study of FOLFIRINOX Plus Pegylated Recombinant Human Hyaluronidase Versus FOLFIRINOX Alone in Patients With Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: SWOG S1313." *Journal of Clinical Oncology* 37 (13): 1062–69. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01295>.
- Ray, Arja, Mackenzie K. Callaway, Nelson J. Rodríguez-Merced, Alexandra L. Crampton, Marjorie Carlson, Kenneth B. Emme, Ethan A. Ensminger, et al. 2022. "Stromal Architecture Directs Early Dissemination in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *JCI Insight* 7 (3): e150330. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.150330>.
- Raza, Ahmad, Michael J. Franklin, and Arkadiusz Z. Dudek. 2010. "Pericytes and Vessel Maturation during Tumor Angiogenesis and Metastasis." *American Journal of Hematology* 85 (8): 593–98. <https://doi.org/10.1002/ajh.21745>.
- Reavis, Hunter D., H. Isaac Chen, and Ronny Drapkin. 2020. "Tumor Innervation: Cancer Has Some Nerve." *Trends in Cancer* 6 (12): 1059–67. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.07.005>.
- Reddig, Peter J., and Rudy L. Juliano. 2005. "Clinging to Life: Cell to Matrix Adhesion and Cell Survival." *Cancer Metastasis Reviews* 24 (3): 425–39. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-5134-3>.
- Reich, R., M. Blumenthal, and M. Liscovitch. 1995. "Role of Phospholipase D in Laminin-Induced Production of Gelatinase A (MMP-2) in Metastatic Cells." *Clinical & Experimental Metastasis* 13 (2): 134–40. <https://doi.org/10.1007/BF00133618>.
- Reid, Steven E., Emily J. Kay, Lisa J. Neilson, Anne-Theres Henze, Jens Serneels, Ewan J. McGhee, Sandeep Dhayade, et al. 2017. "Tumor Matrix Stiffness Promotes Metastatic Cancer Cell Interaction with the Endothelium." *The EMBO Journal* 36 (16): 2373–89. <https://doi.org/10.15252/embj.201694912>.
- Renz, Bernhard W., Ryota Takahashi, Takayuki Tanaka, Marina Macchini, Yoku Hayakawa, Zahra Dantes, H. Carlo Maurer, et al. 2018. "B2 Adrenergic-Neurotrophin Feedforward Loop Promotes Pancreatic Cancer." *Cancer Cell* 34 (5): 863–67. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.10.010>.
- Rhim, Andrew D., Paul E. Oberstein, Dafydd H. Thomas, Emily T. Mirek, Carmine F. Palermo, Stephen A. Sastra, Erin N. Dekleva, et al. 2014. "Stromal Elements Act to Restrain, Rather than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Cell* 25 (6): 735–47. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.021>.
- Richards, K. E., A. E. Zeleniak, M. L. Fishel, J. Wu, L. E. Littlepage, and R. Hill. 2017. "Cancer-Associated Fibroblast Exosomes Regulate Survival and Proliferation of Pancreatic Cancer Cells." *Oncogene* 36 (13): 1770–78. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.353>.
- Ridgway, Rachel A., Bryan Serrels, Susan Mason, Andrew Kinnaird, Morwenna Muir, Hitesh Patel, William J. Muller, Owen J. Sansom, and Valerie G. Brunton. 2012. "Focal Adhesion Kinase Is Required for β -Catenin-Induced Mobilization of Epidermal Stem Cells." *Carcinogenesis* 33 (12): 2369–76. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs284>.

- Rivera, Lee B., and Rolf A. Brekken. 2011. "Hosaka." *The Journal of Cell Biology* 193 (7): 1305–19. <https://doi.org/10.1083/jcb.201011143>.
- Rizzuti, Ilaria Francesca, Pietro Mascheroni, Silvia Arcucci, Zacchari Ben-Mériem, Audrey Prunet, Catherine Barentin, Charlotte Rivière, et al. 2020. "Mechanical Control of Cell Proliferation Increases Resistance to Chemotherapeutic Agents." *Physical Review Letters* 125 (12): 128103. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.125.128103>.
- Robert, Jerome. 2023. "Sex Differences in Vascular Endothelial Cells." *Atherosclerosis* 0 (0). <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2023.117278>.
- Roberts, Walter Gregory, Ethan Ung, Pamela Whalen, Beth Cooper, Catherine Hulford, Christofer Autry, Daniel Richter, et al. 2008. "Antitumor Activity and Pharmacology of a Selective Focal Adhesion Kinase Inhibitor, PF-562,271." *Cancer Research* 68 (6): 1935–44. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5155>.
- Roda, Niccolò, Giada Blandano, and Pier Giuseppe Pelicci. 2021. "Blood Vessels and Peripheral Nerves as Key Players in Cancer Progression and Therapy Resistance." *Cancers* 13 (17): 4471. <https://doi.org/10.3390/cancers13174471>.
- Röder, Pia V, Bingbing Wu, Yixian Liu, and Weiping Han. 2016. "Pancreatic Regulation of Glucose Homeostasis." *Experimental & Molecular Medicine* 48 (3): e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>.
- Rodriguez, Anthony B., J. David Peske, Amber N. Woods, Katie M. Leick, Ileana S. Mauldin, Max O. Meneveau, Samuel J. Young, et al. 2021. "Immune Mechanisms Orchestrate Tertiary Lymphoid Structures in Tumors via Cancer-Associated Fibroblasts." *Cell Reports* 36 (3): 109422. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109422>.
- Roger, Elodie, Sylvie Martel, Adrien Bertrand-Chapel, Arnaud Depollier, Nicolas Chuvin, Roxane M. Pommier, Karam Yacoub, et al. 2020. "Correction: Schwann Cells Support Oncogenic Potential of Pancreatic Cancer Cells through TGFβ Signaling." *Cell Death & Disease* 11 (1): 57. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2262-1>.
- Romer, L. H., N. McLean, C. E. Turner, and K. Burridge. 1994. "Tyrosine Kinase Activity, Cytoskeletal Organization, and Motility in Human Vascular Endothelial Cells." *Molecular Biology of the Cell* 5 (3): 349–61. <https://doi.org/10.1091/mbc.5.3.349>.
- Romito, Ilaria, Manuela Porru, Maria Rita Braghini, Luca Pompili, Nadia Panera, Annalisa Crudele, Daniela Gnani, et al. 2021. "Focal Adhesion Kinase Inhibitor TAE226 Combined with Sorafenib Slows down Hepatocellular Carcinoma by Multiple Epigenetic Effects." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 40 (November): 364. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02154-8>.
- Rousselle, Patricia, and Jean Yves Scoazec. 2020. "Laminin 332 in Cancer: When the Extracellular Matrix Turns Signals from Cell Anchorage to Cell Movement." *Seminars in Cancer Biology* 62 (May): 149–65. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2019.09.026>.
- Royal, Richard E., Catherine Levy, Keli Turner, Aarti Mathur, Marybeth Hughes, Udai S. Kammula, Richard M. Sherry, et al. 2010. "Phase 2 Trial of Single Agent Ipilimumab (Anti-CTLA-4) for Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma." *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 33 (8): 828–33. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181eec14c>.
- Rubashkin, Matthew G., Luke Cassereau, Russell Bainer, Christopher C. DuFort, Yoshihiro Yui, Guanqing Ou, Matthew J. Paszek, Michael W. Davidson, Yunn-Yi Chen, and Valerie M. Weaver. 2014. "Force Engages Vinculin and Promotes Tumor Progression by Enhancing PI3K Activation of Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphate." *Cancer Research* 74 (17): 4597–4611. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3698>.
- Rubin, Joshua B., Joseph S. Lagas, Lauren Broestl, Jasmin Sponagel, Nathan Rockwell, Gina Rhee, Sarah F. Rosen, et al. 2020. "Sex Differences in Cancer Mechanisms." *Biology of Sex Differences* 11 (April): 17. <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00291-x>.
- Rupp, Tristan, Benoit Langlois, Maria M. Koczorowska, Agata Radwanska, Zhen Sun, Thomas Hussenet, Olivier Lefebvre, et al. 2016. "Tenascin-C Orchestrates Glioblastoma Angiogenesis

- by Modulation of Pro- and Anti-Angiogenic Signaling." *Cell Reports* 17 (10): 2607–19. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.012>.
- Saatci, Ozge, Aysegul Kaymak, Umar Raza, Pelin G. Ersan, Ozge Akbulut, Carolyn E. Banister, Vitali Sikirzhyski, et al. 2020. "Targeting Lysyl Oxidase (LOX) Overcomes Chemotherapy Resistance in Triple Negative Breast Cancer." *Nature Communications* 11 (1): 2416. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16199-4>.
- Sadozai, Hassan, Animesh Acharjee, Serenella Eppenberger-Castori, Beat Gloor, Thomas Gruber, Mirjam Schenk, and Eva Karamitopoulou. 2021. "Distinct Stromal and Immune Features Collectively Contribute to Long-Term Survival in Pancreatic Cancer." *Frontiers in Immunology* 12 (February): 643529. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.643529>.
- Saharinen, Pipsa, Lauri Eklund, and Kari Alitalo. 2017. "Therapeutic Targeting of the Angiopoietin-TIE Pathway." *Nature Reviews. Drug Discovery* 16 (9): 635–61. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.278>.
- Saitakis, Michael, Stéphanie Dogniaux, Christel Goudot, Nathalie Bui, Sophie Asnacios, Mathieu Maurin, Clotilde Randriamampita, Atef Asnacios, and Claire Hivroz. 2017. "Different TCR-Induced T Lymphocyte Responses Are Potentiated by Stiffness with Variable Sensitivity." *eLife* 6 (June): e23190. <https://doi.org/10.7554/eLife.23190>.
- Salmon, Hélène, Katarzyna Franciszkievicz, Diane Damotte, Marie-Caroline Dieu-Nosjean, Pierre Validire, Alain Trautmann, Fathia Mami-Chouaib, and Emmanuel Donnadieu. 2012. "Matrix Architecture Defines the Preferential Localization and Migration of T Cells into the Stroma of Human Lung Tumors." *The Journal of Clinical Investigation* 122 (3): 899–910. <https://doi.org/10.1172/JCI45817>.
- Samain, Rémi, Alexia Brunel, Thibault Douché, Marjorie Fanjul, Stéphanie Cassant-Sourdy, Julia Rochotte, Jérôme Cros, et al. 2021. "Pharmacologic Normalization of Pancreatic Cancer-Associated Fibroblast Secretome Impairs Prometastatic Cross-Talk With Macrophages." *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 11 (5): 1405–36. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.01.008>.
- Sanchez, Benjamin, Linan Li, Joshua Dulong, Géraldine Aimond, Jérôme Lamartine, Guangrong Liu, and Dominique Sigaudou-Roussel. 2019. "Impact of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells on Primary Dermal Fibroblasts in Response to Inflammatory Stress." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2019.00044>.
- Sato, Fumiaki, Atsunobu Sagara, Kaede Tajima, Shotaro Miura, Kenjiro Inaba, Yusuke Ando, Teruaki Oku, Takashi Murakami, Yoshinori Kato, and Tetsuro Yumoto. 2022. "COL8A1 Facilitates the Growth of Triple-Negative Breast Cancer via FAK/Src Activation." *Breast Cancer Research and Treatment* 194 (2): 243–56. <https://doi.org/10.1007/s10549-022-06635-y>.
- Sautès-Fridman, Catherine, Myriam Lawand, Nicolas A. Giraldo, Hélène Kaplon, Claire Germain, Wolf Herman Fridman, and Marie-Caroline Dieu-Nosjean. 2016. "Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention." *Frontiers in Immunology* 7 (October): 407. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00407>.
- Sautès-Fridman, Catherine, Florent Petitprez, Julien Calderaro, and Wolf Herman Fridman. 2019. "Tertiary Lymphoid Structures in the Era of Cancer Immunotherapy." *Nature Reviews. Cancer* 19 (6): 307–25. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0144-6>.
- Schaaf, Marco B., Abhishek D. Garg, and Patrizia Agostinis. 2018. "Defining the Role of the Tumor Vasculature in Antitumor Immunity and Immunotherapy." *Cell Death & Disease* 9 (2): 115. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0061-0>.
- Schaller, M. D., C. A. Borgman, B. S. Cobb, R. R. Vines, A. B. Reynolds, and J. T. Parsons. 1992. "pp125FAK a Structurally Distinctive Protein-Tyrosine Kinase Associated with Focal Adhesions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (11): 5192–96. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.5192>.
- Schaller, M. D., J. D. Hildebrand, J. D. Shannon, J. W. Fox, R. R. Vines, and J. T. Parsons. 1994. "Autophosphorylation of the Focal Adhesion Kinase, pp125FAK, Directs SH2-Dependent

- Binding of Pp60src." *Molecular and Cellular Biology* 14 (3): 1680–88.
<https://doi.org/10.1128/mcb.14.3.1680-1688.1994>.
- Schaller, Michael D. 2010. "Cellular Functions of FAK Kinases: Insight into Molecular Mechanisms and Novel Functions." *Journal of Cell Science* 123 (Pt 7): 1007–13.
<https://doi.org/10.1242/jcs.045112>.
- Schlaepfer, David D., Satyajit K. Mitra, and Dusko Ilic. 2004. "Control of Motile and Invasive Cell Phenotypes by Focal Adhesion Kinase." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1692 (2–3): 77–102.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.008>.
- Schoefl, G. I. 1972. "THE MIGRATION OF LYMPHOCYTES ACROSS THE VASCULAR ENDOTHELIUM IN LYMPHOID TISSUE." *The Journal of Experimental Medicine* 136 (3): 568–88.
- Schoumacher, Marie, Robert D. Goldman, Daniel Louvard, and Danijela M. Vignjevic. 2010. "Actin, Microtubules, and Vimentin Intermediate Filaments Cooperate for Elongation of Invadopodia." *The Journal of Cell Biology* 189 (3): 541–56.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200909113>.
- Schrama, David, Heike Voigt, Andreas O. Eggert, Rong Xiang, He Zhou, Ton N. M. Schumacher, Mads H. Andersen, Per thor Straten, Ralph A. Reisfeld, and Jürgen C. Becker. 2008. "Immunological Tumor Destruction in a Murine Melanoma Model by Targeted LTalpha Independent of Secondary Lymphoid Tissue." *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 57 (1): 85–95.
<https://doi.org/10.1007/s00262-007-0352-x>.
- Senger, Donald R., and George E. Davis. 2011. "Angiogenesis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (8): a005090. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005090>.
- Serrels, Alan, Tom Lund, Bryan Serrels, Adam Byron, Rhoanne C. McPherson, Alexander von Kriegsheim, Laura Gómez-Cuadrado, et al. 2015. "Nuclear FAK Controls Chemokine Transcription, Tregs, and Evasion of Anti-Tumor Immunity." *Cell* 163 (1): 160–73.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.001>.
- Serrels, Bryan, and Margaret C. Frame. 2012. "FAK and Talin: Who Is Taking Whom to the Integrin Engagement Party?" *The Journal of Cell Biology* 196 (2): 185–87.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201112128>.
- Sethi, Nilay, and Yibin Kang. 2011. "Unravelling the Complexity of Metastasis - Molecular Understanding and Targeted Therapies." *Nature Reviews. Cancer* 11 (10): 735–48.
<https://doi.org/10.1038/nrc3125>.
- Shapiro, Irina M., Vihren N. Kolev, Christian M. Vidal, Yuwaraj Kadariya, Jennifer E. Ring, Quentin Wright, David T. Weaver, et al. 2014. "Merlin Deficiency Predicts FAK Inhibitor Sensitivity: A Synthetic Lethal Relationship." *Science Translational Medicine* 6 (237): 237ra68.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008639>.
- Sharma, Bal Krishan, Duaa Mureb, Sumit Murab, Leah Rosenfeldt, Brenton Francisco, Rachel Cantrell, Rebekah Karns, et al. 2021. "Fibrinogen Activates Focal Adhesion Kinase (FAK) Promoting Colorectal Adenocarcinoma Growth." *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 19 (10): 2480–94. <https://doi.org/10.1111/jth.15440>.
- Sheffield, Scott. 2017. "Nerve Structure (Anatomy and Diagram)." GetBodySmart. October 17, 2017.
<https://www.getbodysmart.com/nerves/nerve-structure/>.
- Sherman, Mara H., Ruth T. Yu, Dannielle D. Engle, Ning Ding, Annette R. Atkins, Herve Tiriatic, Eric A. Collisson, et al. 2014. "Vitamin D Receptor-Mediated Stromal Reprogramming Suppresses Pancreatitis and Enhances Pancreatic Cancer Therapy." *Cell* 159 (1): 80–93.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.007>.
- Shi, Rongchen, Yi-Quan Tang, and Hongming Miao. 2020. "Metabolism in Tumor Microenvironment: Implications for Cancer Immunotherapy." *MedComm* 1 (1): 47–68.
<https://doi.org/10.1002/mco2.6>.
- Shiau, Jun-Ping, Cheng-Che Wu, Shu-Jyuan Chang, Mei-Ren Pan, Wangta Liu, Fu Ou-Yang, Fang-Ming Chen, Ming-Feng Hou, Shen-Liang Shih, and Chi-Wen Luo. 2021. "FAK Regulates VEGFR2 Expression and Promotes Angiogenesis in Triple-Negative Breast Cancer." *Biomedicines* 9 (12): 1789. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121789>.

- Shibue, Tsukasa, Mary W. Brooks, and Robert A. Weinberg. 2013. "An Integrin-Linked Machinery of Cytoskeletal Regulation That Enables Experimental Tumor Initiation and Metastatic Colonization." *Cancer Cell* 24 (4): 10.1016/j.ccr.2013.08.012. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.012>.
- Shibue, Tsukasa, and Robert A. Weinberg. 2009. "Integrin Beta1-Focal Adhesion Kinase Signaling Directs the Proliferation of Metastatic Cancer Cells Disseminated in the Lungs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (25): 10290–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904227106>.
- Shields, Mario A., Surabhi Dangi-Garimella, Seth B. Krantz, David J. Bentrem, and Hidayatullah G. Munshi. 2011. "Amrutkar." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (12): 10495–504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.195628>.
- Shrimali, Rajeev K., Zhiya Yu, Marc R. Theoret, Dhanalakshmi Chinnasamy, Nicholas P. Restifo, and Steven A. Rosenberg. 2010. "Antiangiogenic Agents Can Increase Lymphocyte Infiltration into Tumor and Enhance the Effectiveness of Adoptive Immunotherapy of Cancer." *Cancer Research* 70 (15): 6171–80. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0153>.
- Sieg, D. J., C. R. Hauck, D. Ilic, C. K. Klingbeil, E. Schaefer, C. H. Damsky, and D. D. Schlaepfer. 2000. "FAK Integrates Growth-Factor and Integrin Signals to Promote Cell Migration." *Nature Cell Biology* 2 (5): 249–56. <https://doi.org/10.1038/35010517>.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, Nikita Sandeep Wagle, and Ahmedin Jemal. 2023. "Cancer Statistics, 2023." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 73 (1): 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>.
- Siemann, Dietmar W., and Michael R. Horsman. 2015. "Modulation of the Tumor Vasculature and Oxygenation to Improve Therapy." *Pharmacology & Therapeutics* 153 (September): 107–24. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.06.006>.
- Silverman, Deborah A., Vena K. Martinez, Patrick M. Dougherty, Jeffrey N. Myers, George A. Calin, and Moran Amit. 2021. "Cancer-Associated Neurogenesis and Nerve-Cancer Cross-Talk." *Cancer Research* 81 (6): 1431–40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2793>.
- Sloan, Erica K, Normand Pouliot, Kym L Stanley, Jenny Chia, Jane M Moseley, Daphne K Hards, and Robin L Anderson. 2006. "Tumor-Specific Expression of Avβ3 Integrin Promotes Spontaneous Metastasis of Breast Cancer to Bone." *Breast Cancer Research* 8 (2): R20. <https://doi.org/10.1186/bcr1398>.
- Socovich, Alexandra M., and Alexandra Naba. 2019. "The Cancer Matrisome: From Comprehensive Characterization to Biomarker Discovery." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 89 (May): 157–66. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.06.005>.
- Song, Xinhua, Hongwei Xu, Pan Wang, Jingxiao Wang, Silvia Affo, Haichuan Wang, Meng Xu, et al. 2021. "Focal Adhesion Kinase (FAK) Promotes Cholangiocarcinoma Development and Progression via YAP Activation." *Journal of Hepatology* 75 (4): 888–99. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.05.018>.
- Sonoda, Y., Y. Matsumoto, M. Funakoshi, D. Yamamoto, S. K. Hanks, and T. Kasahara. 2000. "Anti-Apoptotic Role of Focal Adhesion Kinase (FAK). Induction of Inhibitor-of-Apoptosis Proteins and Apoptosis Suppression by the Overexpression of FAK in a Human Leukemic Cell Line, HL-60." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (21): 16309–15. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.21.16309>.
- Sorokin, L. M., F. Pausch, M. Frieser, S. Kröger, E. Ohage, and R. Deutzmann. 1997. "Developmental Regulation of the Laminin A5 Chain Suggests a Role in Epithelial and Endothelial Cell Maturation." *Developmental Biology* 189 (2): 285–300. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8668>.
- Stallcup, William B. 2002. "Betsholtz." *Journal of Neurocytology* 31 (6–7): 423–35. <https://doi.org/10.1023/a:1025731428581>.
- Stokes, Jayme B., Sara J. Adair, Jill K. Slack-Davis, Dustin M. Walters, Robert W. Tilghman, E. Dan Hershey, Bryce Lowrey, et al. 2011. "Inhibition of Focal Adhesion Kinase by PF-562,271 Inhibits the Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer Concomitant with Altering the

- Tumor Microenvironment." *Molecular Cancer Therapeutics* 10 (11): 2135–45.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0261>.
- Stone, Rebecca L, Keith A Baggerly, Guillermo N Armaiz-Pena, Yu Kang, Angela M Sanguino, Duangmani Thanappapasr, Heather J Dalton, et al. 2014. "Focal Adhesion Kinase." *Cancer Biology & Therapy* 15 (7): 919–29. <https://doi.org/10.4161/cbt.28882>.
- Stratman, Amber N., and George E. Davis. 2012. "Endothelial Cell-Pericyte Interactions Stimulate Basement Membrane Matrix Assembly: Influence on Vascular Tube Remodeling, Maturation and Stabilization." *Microscopy and Microanalysis : The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 18 (1): 68–80.
<https://doi.org/10.1017/S1431927611012402>.
- Stupp, Roger, Monika E. Hegi, Thierry Gorlia, Sara C. Erridge, James Perry, Yong-Kil Hong, Kenneth D. Aldape, et al. 2014. "Cilengitide Combined with Standard Treatment for Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma with Methylated MGMT Promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 Study): A Multicentre, Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial." *The Lancet. Oncology* 15 (10): 1100–1108. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70379-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70379-1).
- Sugden, Conor J., Valentina Iorio, Lee D. Troughton, Ke Liu, Mychel R. P. T. Morais, Rachel Lennon, George Bou-Gharios, and Kevin J. Hamill. 2022. "Laminin N-terminus A31 Expression during Development Is Lethal and Causes Widespread Tissue-specific Defects in a Transgenic Mouse Model." *The FASEB Journal* 36 (7): e22318. <https://doi.org/10.1096/fj.202002588RRR>.
- Sulzmaier, Florian J., Christine Jean, and David D. Schlaepfer. 2014. "FAK in Cancer: Mechanistic Findings and Clinical Applications." *Nature Reviews. Cancer* 14 (9): 598–610.
<https://doi.org/10.1038/nrc3792>.
- Sumpio, Bauer E., J. Timothy Riley, and Alan Dardik. 2002. "Cells in Focus: Endothelial Cell." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (12): 1508–12.
[https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00075-4](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00075-4).
- Sun, Chengcao, Youqiong Ye, Zhi Tan, Yuan Liu, Yajuan Li, Wei Hu, Ke Liang, et al. 2023. "Tumor-Associated Nonmyelinating Schwann Cell-Expressed PVT1 Promotes Pancreatic Cancer Kynurenine Pathway and Tumor Immune Exclusion." *Science Advances* 9 (5): eadd6995.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.add6995>.
- Sun, Qiqing, Bo Zhang, Qiangsheng Hu, Yi Qin, Wenyan Xu, Wensheng Liu, Xianjun Yu, and Jin Xu. 2018. "The Impact of Cancer-Associated Fibroblasts on Major Hallmarks of Pancreatic Cancer." *Theranostics* 8 (18): 5072–87. <https://doi.org/10.7150/thno.26546>.
- Sun, Xiujie, Bogang Wu, Huai-Chin Chiang, Hui Deng, Xiaowen Zhang, Wei Xiong, Junquan Liu, et al. 2021. "Tumour DDR1 Promotes Collagen Fibre Alignment to Instigate Immune Exclusion." *Nature* 599 (7886): 673–78. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04057-2>.
- Sun, Yixuan, Yuzhen Qian, Chunxia Chen, Hongfei Wang, Xiuman Zhou, Wenjie Zhai, Lu Qiu, et al. 2022. "Extracellular Vesicle IL-32 Promotes the M2 Macrophage Polarization and Metastasis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma via FAK/STAT3 Pathway." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 41 (1): 145. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02348-8>.
- Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, and Freddie Bray. 2021. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71 (3): 209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Suzuki, Jun, Keiju Aokage, Shinya Neri, Takashi Sakai, Hiroko Hashimoto, Yinghan Su, Shota Yamazaki, et al. 2021. "Relationship between Podoplanin-Expressing Cancer-Associated Fibroblasts and the Immune Microenvironment of Early Lung Squamous Cell Carcinoma." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 153 (March): 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.12.020>.
- Swain, Sandip M., Joelle M.-J. Romac, Steven R. Vigna, and Rodger A. Liddle. 2022. "Piezo1-Mediated Stellate Cell Activation Causes Pressure-Induced Pancreatic Fibrosis in Mice." *JCI Insight* 7 (8). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.158288>.

- Tabang, Dylan Nicholas, Yusi Cui, Daniel M. Tremmel, Megan Ford, Zihui Li, Sara Dutton Sackett, Jon S. Odorico, and Lingjun Li. 2021. "Analysis of Pancreatic Extracellular Matrix Protein Post-Translational Modifications via Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography Coupled with Mass Spectrometry." *Molecular Omics* 17 (5): 652–64. <https://doi.org/10.1039/d1mo00104c>.
- Takahashi, Kohta, Kristiina Kanerva, Lauri Vanharanta, Leonardo Almeida-Souza, Daniel Lietha, Vesa M. Olkkonen, and Elina Ikonen. 2021. "ORP2 Couples LDL-Cholesterol Transport to FAK Activation by Endosomal Cholesterol/PI(4,5)P2 Exchange." *The EMBO Journal* 40 (14): e106871. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106871>.
- Tan, Marcus C. B., Peter S. Goedegebuure, Brian A. Belt, Brian Flaherty, Narendra Sankpal, William E. Gillanders, Timothy J. Eberlein, Chyi-Song Hsieh, and David C. Linehan. 2009. "Disruption of CCR5-Dependent Homing of Regulatory T Cells Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Pancreatic Cancer." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (3): 1746–55.
- Tang, Philip Chiu-Tsun, Jeff Yat-Fai Chung, Vivian Wei-wen Xue, Jun Xiao, Xiao-Ming Meng, Xiao-Ru Huang, Shuang Zhou, et al. 2021. "Smad3 Promotes Cancer-Associated Fibroblasts Generation via Macrophage–Myofibroblast Transition." *Advanced Science* 9 (1): 2101235. <https://doi.org/10.1002/advs.202101235>.
- Tang, Shiue-Cheng, Luc Baeyens, Chia-Ning Shen, Shih-Jung Peng, Hung-Jen Chien, David W. Scheel, Chester E. Chamberlain, and Michael S. German. 2018. "Human Pancreatic Neuro-Insular Network in Health and Fatty Infiltration." *Diabetologia* 61 (1): 168–81. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4409-x>.
- Tansey, Etain A., Laura E. A. Montgomery, Joe G. Quinn, Sean M. Roe, and Christopher D. Johnson. 2019. "Understanding Basic Vein Physiology and Venous Blood Pressure through Simple Physical Assessments." *Advances in Physiology Education* 43 (3): 423–29. <https://doi.org/10.1152/advan.00182.2018>.
- Tavianatou, Anastasia-Gerasimoula, Zoi Piperigkou, Christos Koutsakis, Carlo Barbera, Riccardo Beninato, Marco Franchi, and Nikos K. Karamanos. 2021. "The Action of Hyaluronan in Functional Properties, Morphology and Expression of Matrix Effectors in Mammary Cancer Cells Depends on Its Molecular Size." *The FEBS Journal* 288 (14): 4291–4310. <https://doi.org/10.1111/febs.15734>.
- Tavora, Bernardo, Silvia Batista, Louise E. Reynolds, Shalini Jadeja, Stephen Robinson, Vassiliki Kostourou, Ian Hart, Marcus Fruttiger, Maddy Parsons, and Kairbaan M. Hodivala-Dilke. 2010. "Endothelial FAK Is Required for Tumour Angiogenesis." *EMBO Molecular Medicine* 2 (12): 516–28. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000106>.
- Theocharis, Achilleas D., and Nikos K. Karamanos. 2019. "Proteoglycans Remodeling in Cancer: Underlying Molecular Mechanisms." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 75–76 (January): 220–59. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.10.008>.
- Thiery, Jean Paul, and Jonathan P. Sleeman. 2006. "Complex Networks Orchestrate Epithelial-Mesenchymal Transitions." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (2): 131–42. <https://doi.org/10.1038/nrm1835>.
- Thomas, Keena S., Katherine A. Owen, Kathryn Conger, Ryan A. Llewellyn, Amy H. Bouton, and James E. Casanova. 2019. "Non-Redundant Functions of FAK and Pyk2 in Intestinal Epithelial Repair." *Scientific Reports* 9 (1): 4497. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41116-1>.
- Thompson, Curtis B., H. Michael Shepard, Patrick M. O'Connor, Salam Kadhim, Ping Jiang, Ryan J. Osgood, Louis H. Bookbinder, et al. 2010. "Enzymatic Depletion of Tumor Hyaluronan Induces Antitumor Responses in Preclinical Animal Models." *Molecular Cancer Therapeutics* 9 (11): 3052–64. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0470>.
- Tian, Chenxi, Ying Huang, Karl R. Clauser, Steffen Rickelt, Allison N. Lau, Steven A. Carr, Matthew G. Vander Heiden, and Richard O. Hynes. 2021. "Suppression of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Growth and Metastasis by Fibrillar Collagens Produced Selectively by Tumor Cells." *Nature Communications* 12 (1): 2328. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22490-9>.

- Tian, Hao, Fu-ju Chou, Jing Tian, Yong Zhang, Bosen You, Chi-Ping Huang, Shuyuan Yeh, Yuanjie Niu, and Chawnshang Chang. 2021. "ASC-J9® Suppresses Prostate Cancer Cell Proliferation and Invasion via Altering the ATF3-PTK2 Signaling." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* : CR 40 (January): 3. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01760-2>.
- Tian, Zhenfeng, Guangsheng Ou, Mingxin Su, Ruomeng Li, Lele Pan, Xingyi Lin, Jinmao Zou, et al. 2022. "TIMP1 Derived from Pancreatic Cancer Cells Stimulates Schwann Cells and Promotes the Occurrence of Perineural Invasion." *Cancer Letters* 546 (October): 215863. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215863>.
- Tomar, Alok, and David D. Schlaepfer. 2009. "Focal Adhesion Kinase: Switching between GAPs and GEFs in the Regulation of Cell Motility." *Current Opinion in Cell Biology* 21 (5): 676–83. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.05.006>.
- Trédan, Olivier, Carlos M. Galmarini, Krupa Patel, and Ian F. Tannock. 2007. "Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment." *Journal of the National Cancer Institute* 99 (19): 1441–54. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm135>.
- Tucker, William D., Yingyot Arora, and Kunal Mahajan. 2023. "Anatomy, Blood Vessels." In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470401/>.
- Ushio, Jun, Atsushi Kanno, Eriko Ikeda, Kozue Ando, Hiroki Nagai, Tetsuro Miwata, Yuki Kawasaki, et al. 2021. "Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Epidemiology and Risk Factors." *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 11 (3): 562. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11030562>.
- Üstün, Yasemin, Marion Reibetanz, Bent Brachvogel, Roswitha Nischt, Beate Eckes, Paola Zigrino, and Thomas Krieg. 2019. "Dual Role of Laminin-511 in Regulating Melanocyte Migration and Differentiation." *Matrix Biology* 80 (July): 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.09.006>.
- Vaish, Utpreksha, Tejeshwar Jain, Abhi C. Are, and Vikas Dudeja. 2021. "Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: An Update on Heterogeneity and Therapeutic Targeting." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (24): 13408. <https://doi.org/10.3390/ijms222413408>.
- Van Cutsem, Eric, Margaret A. Tempero, Darren Sigal, Do-Youn Oh, Nicola Fazio, Teresa Macarulla, Erika Hitre, et al. 2020. "Randomized Phase III Trial of Pegvorhyaluronidase Alfa With Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine for Patients With Hyaluronan-High Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma." *Journal of Clinical Oncology* 38 (27): 3185–94. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.00590>.
- Van Cutsem, Eric, Walter L. Vervenne, Jaafar Bennouna, Yves Humblet, Sharlene Gill, Jean-Luc Van Laethem, Chris Verslype, et al. 2009. "Phase III Trial of Bevacizumab in Combination with Gemcitabine and Erlotinib in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (13): 2231–37. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.0238>.
- Veerman, Krystle, Claire Tardiveau, Frédéric Martins, Juliette Coudert, and Jean-Philippe Girard. 2019. "Single-Cell Analysis Reveals Heterogeneity of High Endothelial Venules and Different Regulation of Genes Controlling Lymphocyte Entry to Lymph Nodes." *Cell Reports* 26 (11): 3116–3131.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.042>.
- Vijver, Saskia V., Akashdip Singh, Eline T. A. M. Mommers-Elshof, Jan Meeldijk, Ronald Copeland, Louis Boon, Sol Langermann, Dallas Flies, Linde Meyaard, and M. Inês Pascoal Ramos. 2021. "Collagen Fragments Produced in Cancer Mediate T Cell Suppression Through Leukocyte-Associated Immunoglobulin-Like Receptor 1." *Frontiers in Immunology* 12 (October): 733561. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.733561>.
- Vincent, Thierry, and Nadir Mechti. 2005. "Extracellular Matrix in Bone Marrow Can Mediate Drug Resistance in Myeloma." *Leukemia & Lymphoma* 46 (6): 803–11. <https://doi.org/10.1080/10428190500051448>.
- Vizio, Barbara, Fiorella Biasi, Tiziana Scirelli, Anna Novarino, Adriana Prati, Libero Ciuffreda, Giuseppe Montrucchio, Giuseppe Poli, and Graziella Bellone. 2013. "Pancreatic-Carcinoma-Cell-Derived pro-Angiogenic Factors Can Induce Endothelial-Cell Differentiation of a Subset of Circulating

- CD34+ Progenitors." *Journal of Translational Medicine* 11 (December): 314. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-314>.
- Vizio, Barbara, Anna Novarino, Alice Giacobino, Carmen Cristiano, Adriana Prati, Gabriele Brondino, Libero Ciuffreda, and Graziella Bellone. 2010. "Pilot Study to Relate Clinical Outcome in Pancreatic Carcinoma and Angiogenic Plasma Factors/Circulating Mature/Progenitor Endothelial Cells: Preliminary Results." *Cancer Science* 101 (11): 2448–54. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01692.x>.
- Walker, Cameron, Elijah Mojares, and Armando Del Río Hernández. 2018. "Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (10): 3028. <https://doi.org/10.3390/ijms19103028>.
- Walkiewicz, Katarzyna W., Jean-Antoine Girault, and Stefan T. Arold. 2015. "How to Awaken Your Nanomachines: Site-Specific Activation of Focal Adhesion Kinases through Ligand Interactions." *Progress in Biophysics and Molecular Biology, Protein-Protein Interaction Analysis and Modulation*, 119 (1): 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.06.001>.
- Wang, Fang-Tao, Wei Sun, Jing-Tao Zhang, and Yue-Zu Fan. 2019. "Cancer-Associated Fibroblast Regulation of Tumor Neo-Angiogenesis as a Therapeutic Target in Cancer." *Oncology Letters* 17 (3): 3055–65. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9973>.
- Wang, Feng, Xiaojun Xia, Chunying Yang, Jianliang Shen, Junhua Mai, Han-Cheon Kim, Dickson Kirui, et al. 2018. "SMAD4 Gene Mutation Renders Pancreatic Cancer Resistance to Radiotherapy through Promotion of Autophagy." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 24 (13): 3176–85. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3435>.
- Wang, Huafang, and Yunchao Su. 2011. "Collagen IV Contributes to Nitric Oxide-Induced Angiogenesis of Lung Endothelial Cells." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 300 (5): C979–88. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00368.2010>.
- Wang, Huan, Qiming Zheng, Zeyi Lu, Liya Wang, Lifeng Ding, Liqun Xia, Hao Zhang, Mingchao Wang, Yicheng Chen, and Gonghui Li. 2021. "Role of the Nervous System in Cancers: A Review." *Cell Death Discovery* 7 (April): 76. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00450-y>.
- Wang, Hui, Runling Ren, Zizhong Yang, Jun Cai, Shaoxia Du, and Xiaohong Shen. 2021. "The COL11A1/Akt/CREB Signaling Axis Enables Mitochondrial-Mediated Apoptotic Evasion to Promote Chemoresistance in Pancreatic Cancer Cells through Modulating BAX/BCL-2 Function." *Journal of Cancer* 12 (5): 1406–20. <https://doi.org/10.7150/jca.47032>.
- Wang, Liang, Dacheng Xie, and Daoyan Wei. 2019. "Pancreatic Acinar-to-Ductal Metaplasia and Pancreatic Cancer." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1882: 299–308. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8879-2_26.
- Wang, Neng, Shengqi Wang, Xuan Wang, Yifeng Zheng, Bowen Yang, Juping Zhang, Bo Pan, Jianli Gao, and Zhiyu Wang. 2021. "Research Trends in Pharmacological Modulation of Tumor-associated Macrophages." *Clinical and Translational Medicine* 11 (1): e288. <https://doi.org/10.1002/ctm2.288>.
- Wang, Tao, Faiyaz Notta, Roya Navab, Joella Joseph, Emin Ibrahimov, Jing Xu, Chang-Qi Zhu, Ayelet Borgida, Steven Gallinger, and Ming-Sound Tsao. 2017. "Senescent Carcinoma-Associated Fibroblasts Upregulate IL8 to Enhance Prometastatic Phenotypes." *Molecular Cancer Research: MCR* 15 (1): 3–14. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0192>.
- Wang, Wenjun, Lingyu Li, Naifei Chen, Chao Niu, Zhi Li, Jifan Hu, and Jiuwei Cui. 2020. "Nerves in the Tumor Microenvironment: Origin and Effects." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 601738. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.601738>.
- Wang, Wen-Quan, Liang Liu, Hua-Xiang Xu, Guo-Pei Luo, Tao Chen, Chun-Tao Wu, Yong-Feng Xu, et al. 2013. "Intratatumoral α -SMA Enhances the Prognostic Potency of CD34 Associated with Maintenance of Microvessel Integrity in Hepatocellular Carcinoma and Pancreatic Cancer." *PloS One* 8 (8): e71189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071189>.
- Wang, Yingyan, Wen Lan, Mingxin Xu, Jing Song, Jun Mao, Chunyan Li, Xiaohui Du, et al. 2021. "Cancer-Associated Fibroblast-Derived SDF-1 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition of

- Lung Adenocarcinoma via CXCR4/ β -Catenin/PPAR δ Signalling." *Cell Death & Disease* 12 (2): 214. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03509-x>.
- Wang-Gillam, Andrea, Kian-Huat Lim, Robert McWilliams, Rama Suresh, Albert C. Lockhart, Amberly Brown, Marcus Breden, et al. 2022. "Defactinib, Pembrolizumab, and Gemcitabine in Patients with Advanced Treatment Refractory Pancreatic Cancer: A Phase I Dose Escalation and Expansion Study." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 28 (24): 5254–62. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-0308>.
- Ward, Kristy K., Isabelle Tancioni, Christine Lawson, Nichol L. G. Miller, Christine Jean, Xiao Lei Chen, Sean Uryu, et al. 2013. "Inhibition of Focal Adhesion Kinase (FAK) Activity Prevents Anchorage-Independent Ovarian Carcinoma Cell Growth and Tumor Progression." *Clinical & Experimental Metastasis* 30 (5): 579–94. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9562-5>.
- Waters, Andrew M., and Channing J. Der. 2018. "KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8 (9): a031435. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031435>.
- Webb, Donna J., Karen Donais, Leanna A. Whitmore, Sheila M. Thomas, Christopher E. Turner, J. Thomas Parsons, and Alan F. Horwitz. 2004. "FAK-Src Signalling through Paxillin, ERK and MLCK Regulates Adhesion Disassembly." *Nature Cell Biology* 6 (2): 154–61. <https://doi.org/10.1038/ncb1094>.
- Wehrle-Haller, Bernhard. 2012. "Assembly and Disassembly of Cell Matrix Adhesions." *Current Opinion in Cell Biology* 24 (5): 569–81. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.06.010>.
- Wei, Lusheng, Qing Lin, Yanan Lu, Guolin Li, Leyi Huang, Zhiqiang Fu, Rufu Chen, and Quanbo Zhou. 2021. "Cancer-Associated Fibroblasts-Mediated ATF4 Expression Promotes Malignancy and Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer via the TGF- β 1/SMAD2/3 Pathway and ABCC1 Transactivation." *Cell Death & Disease* 12 (4): 334. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03574-2>.
- Weiner, T. M., E. T. Liu, R. J. Craven, and W. G. Cance. 1993. "Expression of Focal Adhesion Kinase Gene and Invasive Cancer." *Lancet (London, England)* 342 (8878): 1024–25. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92881-s](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92881-s).
- Wen, Yuan, Chun-Ting Wang, Tian-Tai Ma, Zhi-Yong Li, Li-Na Zhou, Bo Mu, Fei Leng, Hua-Shan Shi, Ya-Ou Li, and Yu-Quan Wei. 2010. "Immunotherapy Targeting Fibroblast Activation Protein Inhibits Tumor Growth and Increases Survival in a Murine Colon Cancer Model." *Cancer Science* 101 (11): 2325–32. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01695.x>.
- Whitcott, Clifford J., Caroline H. Diep, Ping Jiang, Aprill Watanabe, Janine LoBello, Chao Sima, Galen Hostetter, H. Michael Shepard, Daniel D. Von Hoff, and Haiyong Han. 2015. "Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21 (15): 3561–68. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1051>.
- Whitcomb, David C., and Mark E. Lowe. 2007. "Human Pancreatic Digestive Enzymes." *Digestive Diseases and Sciences* 52 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9589-z>.
- Whitelock, John M., James Melrose, and Renato V. Iozzo. 2008. "Diverse Cell Signaling Events Modulated by Perlecan." *Biochemistry* 47 (43): 11174–83. <https://doi.org/10.1021/bi8013938>.
- Wijelath, Errol S., Salman Rahman, Mayumi Namekata, Jacqueline Murray, Tomoaki Nishimura, Zohreh Mostafavi-Pour, Yatin Patel, Yasuo Suda, Martin J. Humphries, and Michael Sobel. 2006. "Heparin-II Domain of Fibronectin Is a Vascular Endothelial Growth Factor-Binding Domain: Enhancement of VEGF Biological Activity by a Singular Growth Factor/Matrix Protein Synergism." *Circulation Research* 99 (8): 853–60. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000246849.17887.66>.
- Winer, Arthur, Sylvia Adams, and Paolo Mignatti. 2018. "Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures into Future Successes." *Molecular Cancer Therapeutics* 17 (6): 1147–55. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0646>.

- Winer, Shawn, Hubert Tsui, Ambrose Lau, Aihua Song, Xiaomao Li, Roy K. Cheung, Anastazia Sampson, et al. 2003. "Autoimmune Islet Destruction in Spontaneous Type 1 Diabetes Is Not Beta-Cell Exclusive." *Nature Medicine* 9 (2): 198–205. <https://doi.org/10.1038/nm818>.
- Winkler, Juliane, Abisola Abisoye-Ogunniyan, Kevin J. Metcalf, and Zena Werb. 2020. "Concepts of Extracellular Matrix Remodelling in Tumour Progression and Metastasis." *Nature Communications* 11 (1): 5120. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18794-x>.
- Witte, M. B., F. J. Thornton, D. T. Efron, and A. Barbul. 2000. "Enhancement of Fibroblast Collagen Synthesis by Nitric Oxide." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 4 (6): 572–82. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0307>.
- Wolf, Katarina, Mariska Te Lindert, Marina Krause, Stephanie Alexander, Joost Te Riet, Amanda L. Willis, Robert M. Hoffman, Carl G. Figdor, Stephen J. Weiss, and Peter Friedl. 2013. "Physical Limits of Cell Migration: Control by ECM Space and Nuclear Deformation and Tuning by Proteolysis and Traction Force." *The Journal of Cell Biology* 201 (7): 1069–84. <https://doi.org/10.1083/jcb.201210152>.
- Wong, Carmen Chak-Lui, Aki Pui-Wah Tse, Yan-Ping Huang, Yan-Ting Zhu, David Kung-Chun Chiu, Robin Kit-Ho Lai, Sandy Leung-Kuen Au, et al. 2014. "Lysyl Oxidase-like 2 Is Critical to Tumor Microenvironment and Metastatic Niche Formation in Hepatocellular Carcinoma." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 60 (5): 1645–58. <https://doi.org/10.1002/hep.27320>.
- Wong, Ping-Pui, José M. Muñoz-Félix, Maruan Hijazi, Hyojin Kim, Stephen D. Robinson, Beatriz De Luxán-Delgado, Irene Rodríguez-Hernández, et al. 2020. "Cancer Burden Is Controlled by Mural Cell-B3-Integrin Regulated Crosstalk with Tumor Cells." *Cell* 181 (6): 1346–1363.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.003>.
- Wong, Victor W., Kristine C. Rustad, Satoshi Akaishi, Michael Sorkin, Jason P. Glotzbach, Michael Januszyk, Emily R. Nelson, et al. 2011. "Focal Adhesion Kinase Links Mechanical Force to Skin Fibrosis via Inflammatory Signaling." *Nature Medicine* 18 (1): 148–52. <https://doi.org/10.1038/nm.2574>.
- Wrona, Ewa, Piotr Potemski, Francesco Sclafani, and Maciej Borowiec. 2021. "Leukemia Inhibitory Factor: A Potential Biomarker and Therapeutic Target in Pancreatic Cancer." *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 69 (1): 2. <https://doi.org/10.1007/s00005-021-00605-w>.
- Wu, Hsin-Jung, Mingang Hao, Syn Kok Yeo, and Jun-Lin Guan. 2020. "FAK Signaling in Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Breast Cancer Cell Migration and Metastasis by Exosomal miRNAs-Mediated Intercellular Communication." *Oncogene* 39 (12): 2539–49. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1162-2>.
- Wu, Yi-Hui, Yu-Fang Huang, Tzu-Hao Chang, Chien-Chin Chen, Pei-Ying Wu, Soon-Cen Huang, and Cheng-Yang Chou. 2021. "COL11A1 Activates Cancer-Associated Fibroblasts by Modulating TGF- β 3 through the NF- κ B/IGFBP2 Axis in Ovarian Cancer Cells." *Oncogene* 40 (26): 4503–19. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01865-8>.
- Xiao, Hongjun, Yezhen Zhang, Zhaofeng Li, Bin Liu, Dan Cui, Fan Liu, Dafan Chen, Yingfu Liu, and Gaoliang Ouyang. 2021. "Periostin Deficiency Reduces Diethylnitrosamine-Induced Liver Cancer in Mice by Decreasing Hepatic Stellate Cell Activation and Cancer Cell Proliferation." *The Journal of Pathology* 255 (2): 212–23. <https://doi.org/10.1002/path.5756>.
- Xie, Meng, Mengyu Sun, Xiaoyu Ji, Dongxiao Li, Xiaoping Chen, Bixiang Zhang, Wenjie Huang, et al. 2022. "Overexpression of BACH1 Mediated by IGF2 Facilitates Hepatocellular Carcinoma Growth and Metastasis via IGF1R and PTK2." *Theranostics* 12 (3): 1097–1116. <https://doi.org/10.7150/thno.65775>.
- Xie, Peng, Hongliang Yu, Feijiang Wang, Feng Yan, and Xia He. 2019. "Inhibition of LOXL2 Enhances the Radiosensitivity of Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Associated with the Reversal of the EMT Process." *BioMed Research International* 2019 (January): 4012590. <https://doi.org/10.1155/2019/4012590>.

- Xing, Xiaoxia, Yaohui Wang, Xi Zhang, Xiangyu Gao, Miao Li, Sifan Wu, Yan Zhao, et al. 2021. "Matrix Stiffness-Mediated Effects on Macrophages Polarization and Their LOXL2 Expression." *The FEBS Journal* 288 (11): 3465–77. <https://doi.org/10.1111/febs.15566>.
- Xu, Chunyan, Wenlu Zhang, and Chengxia Liu. 2023. "FAK Downregulation Suppresses Stem-like Properties and Migration of Human Colorectal Cancer Cells." *PloS One* 18 (4): e0284871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284871>.
- Xue, Meilin, Youwei Zhu, Yongsheng Jiang, Lijie Han, Minmin Shi, Rui Su, Liwen Wang, et al. 2023. "Schwann Cells Regulate Tumor Cells and Cancer-Associated Fibroblasts in the Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Microenvironment." *Nature Communications* 14 (1): 4600. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40314-w>.
- Yamamoto, Tomohisa, Hiroaki Yanagimoto, Sohei Satoi, Hideyoshi Toyokawa, Jun Yamao, Songtae Kim, Naoyoshi Terakawa, Kanji Takahashi, and A.-Hon Kwon. 2012. "Circulating Myeloid Dendritic Cells as Prognostic Factors in Patients with Pancreatic Cancer Who Have Undergone Surgical Resection." *The Journal of Surgical Research* 173 (2): 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2010.09.027>.
- Yamao, Takanobu, Yo-Ichi Yamashita, Kensuke Yamamura, Yosuke Nakao, Masayo Tsukamoto, Shigeki Nakagawa, Hirohisa Okabe, Hiromitsu Hayashi, Katsunori Imai, and Hideo Baba. 2019. "Cellular Senescence, Represented by Expression of Caveolin-1, in Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Tumor Invasion in Pancreatic Cancer." *Annals of Surgical Oncology* 26 (5): 1552–59. <https://doi.org/10.1245/s10434-019-07266-2>.
- Yang, Jia, Su Hu, Junjie Shangguan, Aydin Eresen, Yu Li, Liang Pan, Quanhong Ma, et al. 2019. "Dendritic Cell Immunotherapy Induces Anti-Tumor Effect in a Transgenic Mouse Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *American Journal of Cancer Research* 9 (11): 2456–68.
- Yang, Jian, Dong-Ming Zhu, Xiao-Gang Zhou, Ni Yin, Yi Zhang, Zi-Xiang Zhang, De-Chun Li, and Jian Zhou. 2017. "HIF-2 α Promotes the Formation of Vasculogenic Mimicry in Pancreatic Cancer by Regulating the Binding of Twist1 to the VE-Cadherin Promoter." *Oncotarget* 8 (29): 47801–15. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17999>.
- Yang, Jine, Yang Lu, Ying-Ying Lin, Zhi-Yuan Zheng, Jian-Hong Fang, Shuai He, and Shi-Mei Zhuang. 2016. "Vascular Mimicry Formation Is Promoted by Paracrine TGF- β and SDF1 of Cancer-Associated Fibroblasts and Inhibited by miR-101 in Hepatocellular Carcinoma." *Cancer Letters* 383 (1): 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.09.012>.
- Yang, Min-Wei, Ling-Ye Tao, Yong-Sheng Jiang, Jian-Yu Yang, Yan-Miao Huo, De-Jun Liu, Jiao Li, et al. 2020. "Perineural Invasion Reprograms the Immune Microenvironment through Cholinergic Signaling in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Research* 80 (10): 1991–2003. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2689>.
- Yang, Xiaoxiao, Shifeng Li, Wande Li, Jingkao Chen, Xiao Xiao, Youqiong Wang, Guangmei Yan, and Lijun Chen. 2013. "Inactivation of Lysyl Oxidase by β -Aminopropionitrile Inhibits Hypoxia-Induced Invasion and Migration of Cervical Cancer Cells." *Oncology Reports* 29 (2): 541–48. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2146>.
- Yang, Yunlong, Patrik Andersson, Kayoko Hosaka, Yin Zhang, Renhai Cao, Hideki Iwamoto, Xiaojuan Yang, et al. 2016. "The PDGF-BB-SOX7 Axis-Modulated IL-33 in Pericytes and Stromal Cells Promotes Metastasis through Tumour-Associated Macrophages." *Nature Communications* 7 (May): 11385. <https://doi.org/10.1038/ncomms11385>.
- Yi, Eunyoung, Tina G. Smith, and Jeffrey A. Love. 2005. "Noradrenergic Innervation of Rabbit Pancreatic Ganglia." *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 117 (2): 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2004.11.004>.
- Yi, Ming, Dechao Jiao, Shuang Qin, Qian Chu, Kongming Wu, and Anping Li. 2019. "Synergistic Effect of Immune Checkpoint Blockade and Anti-Angiogenesis in Cancer Treatment." *Molecular Cancer* 18 (March): 60. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0974-6>.
- Yom, Cha Kyong, Dong-Young Noh, Woo Ho Kim, and Hee Sung Kim. 2011. "Clinical Significance of High Focal Adhesion Kinase Gene Copy Number and Overexpression in Invasive Breast

- Cancer." *Breast Cancer Research and Treatment* 128 (3): 647–55.
<https://doi.org/10.1007/s10549-010-1150-2>.
- Yu, Qi, Weikun Xiao, Songping Sun, Alireza Sohrabi, Jesse Liang, and Stephanie K. Seidlits. 2021. "Extracellular Matrix Proteins Confer Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance Through Integrin α_v in Glioblastoma Cells." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (March): 616580. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.616580>.
- Zachary, I. 1997. "Focal Adhesion Kinase." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 (7): 929–34. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(97\)00008-3](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(97)00008-3).
- Zaghdoudi, Sonia, Emilie Decaup, Ismahane Belhabib, Rémi Samain, Stéphanie Cassant-Sourdy, Julia Rochotte, Alexia Brunel, et al. 2020. "FAK Activity in Cancer-associated Fibroblasts Is a Prognostic Marker and a Druggable Key Metastatic Player in Pancreatic Cancer." *EMBO Molecular Medicine* 12 (11): e12010. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012010>.
- Zee, J. A. van der, C. H. J. van Eijck, W. C. J. Hop, K. Biermann, B. M. Dicheva, A. Lb Seynhaeve, G. A. Koning, A. M. M. Eggermont, and T. L. M. Ten Hagen. 2012. "Tumour Basement Membrane Laminin Expression Predicts Outcome Following Curative Resection of Pancreatic Head Cancer." *British Journal of Cancer* 107 (7): 1153–58. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.373>.
- Zegeye, Mulugeta M., Blanka Andersson, Allan Sirsjö, and Liza U. Ljungberg. 2020. "IL-6 Trans-Signaling Impairs Sprouting Angiogenesis by Inhibiting Migration, Proliferation and Tube Formation of Human Endothelial Cells." *Cells* 9 (6): 1414. <https://doi.org/10.3390/cells9061414>.
- Zeisberg, Elisabeth M., Scott Potenta, Liang Xie, Michael Zeisberg, and Raghu Kalluri. 2007. "Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts." *Cancer Research* 67 (21): 10123–28. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3127>.
- Zeltz, Cédric, Joseph Orgel, and Donald Gullberg. 2014. "Molecular Composition and Function of Integrin-Based Collagen Glues-Introducing COLINBRIs." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1840 (8): 2533–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.022>.
- Zeng, Z. S., A. M. Cohen, and J. G. Guillem. 1999. "Loss of Basement Membrane Type IV Collagen Is Associated with Increased Expression of Metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during Human Colorectal Tumorigenesis." *Carcinogenesis* 20 (5): 749–55. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.5.749>.
- Zhang, Aibin, Yigang Qian, Zhou Ye, Haiyong Chen, Haiyang Xie, Lin Zhou, Yan Shen, and Shusen Zheng. 2017. "Cancer-associated Fibroblasts Promote M2 Polarization of Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Medicine* 6 (2): 463–70. <https://doi.org/10.1002/cam4.993>.
- Zhang, Daoxiang, Lin Li, Hongmei Jiang, Qiong Li, Andrea Wang-Gillam, Jinsheng Yu, Richard Head, Jingxia Liu, Marianna B. Ruzinova, and Kian-Huat Lim. 2018. "Tumor-Stroma IL1 β -IRAK4 Feedforward Circuitry Drives Tumor Fibrosis, Chemoresistance, and Poor Prognosis in Pancreatic Cancer." *Cancer Research* 78 (7): 1700–1712. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1366>.
- Zhang, L., A. Gülses, N. Purcz, J. Weimer, J. Wiltfang, and Y. Açil. 2019. "A Comparative Assessment of the Effects of Integrin Inhibitor Cilengitide on Primary Culture of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) and HNSCC Cell Lines." *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 21 (8): 1052–60. <https://doi.org/10.1007/s12094-018-02025-3>.
- Zhang, Lingfu, Limei Guo, Ming Tao, Wei Fu, and Dianrong Xiu. 2016. "Parasympathetic Neurogenesis Is Strongly Associated with Tumor Budding and Correlates with an Adverse Prognosis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu* 28 (2): 180–86. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2016.02.05>.
- Zhang, Lingfu, Dianrong Xiu, Jun Zhan, Xiaokun He, Limei Guo, Jilian Wang, Ming Tao, Wei Fu, and Hongquan Zhang. 2016. "High Expression of Muscarinic Acetylcholine Receptor 3 Predicts

- Poor Prognosis in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *OncoTargets and Therapy* 9: 6719–26. <https://doi.org/10.2147/OTT.S111382>.
- Zhang, Tianyi, Yanxian Ren, Pengfei Yang, Jufang Wang, and Heng Zhou. 2022. "Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cell Death & Disease* 13 (10): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05351-1>.
- Zhang, Tongyue, Yijun Wang, Meng Xie, Xiaoyu Ji, Xiangyuan Luo, Xiaoping Chen, Bixiang Zhang, et al. 2022. "HGF-Mediated Elevation of ETV1 Facilitates Hepatocellular Carcinoma Metastasis through Upregulating PTK2 and c-MET." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 41 (1): 275. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02475-2>.
- Zhang, Zhaoyu, Jinlong Li, Simin Jiao, Guangda Han, Jiaming Zhu, and Tianzhou Liu. 2022. "Functional and Clinical Characteristics of Focal Adhesion Kinases in Cancer Progression." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10: 1040311. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1040311>.
- Zhao, Jihe, and Jun-Lin Guan. 2009. "Signal Transduction by Focal Adhesion Kinase in Cancer." *Cancer Metastasis Reviews* 28 (1–2): 35–49. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9165-4>.
- Zhao, Xue-Ke, Yiju Cheng, Ming Liang Cheng, Lei Yu, Mao Mu, Hong Li, Yang Liu, et al. 2016. "Focal Adhesion Kinase Regulates Fibroblast Migration via Integrin Beta-1 and Plays a Central Role in Fibrosis." *Scientific Reports* 6 (January): 19276. <https://doi.org/10.1038/srep19276>.
- Zhong, Chuanhong, Bei Tao, Fangli Tang, Xiaobo Yang, Tangming Peng, Jian You, Kaiguo Xia, Xiangguo Xia, Ligang Chen, and Lilei Peng. 2021. "Remodeling Cancer Stemness by Collagen/Fibronectin via the AKT and CDC42 Signaling Pathway Crosstalk in Glioma." *Theranostics* 11 (4): 1991–2005. <https://doi.org/10.7150/thno.50613>.
- Zhou, Jing, Camilo Aponte-Santamaría, Sebastian Sturm, Jakob Tómas Bullerjahn, Agnieszka Bronowska, and Frauke Gräter. 2015. "Mechanism of Focal Adhesion Kinase Mechanosensing." *PLoS Computational Biology* 11 (11): e1004593. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004593>.
- Zhou, Yunting, Bo Sun, Wei Li, Junming Zhou, Feng Gao, Xiaohang Wang, Min Cai, and Zilin Sun. 2019. "Pancreatic Stellate Cells: A Rising Translational Physiology Star as a Potential Stem Cell Type for Beta Cell Neogenesis." *Frontiers in Physiology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.00218>.
- Zhu, Yu, Brett L. Knolhoff, Melissa A. Meyer, Timothy M. Nywening, Brian L. West, Jingqin Luo, Andrea Wang-Gillam, S Peter Goedegebuure, David C. Linehan, and David G. DeNardo. 2014. "CSF1/CSF1R Blockade Reprograms Tumor-Infiltrating Macrophages and Improves Response to T Cell Checkpoint Immunotherapy in Pancreatic Cancer Models." *Cancer Research* 74 (18): 5057–69. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3723>.
- Zhuo, Meng, Cuncun Yuan, Ting Han, Hai Hu, Jiujie Cui, Feng Jiao, and Liwei Wang. 2019. "JQ1 Effectively Inhibits Vasculogenic Mimicry of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells via the ERK1/2-MMP-2/9 Signaling Pathway Both in Vitro and in Vivo." *American Journal of Translational Research* 11 (2): 1030–39.
- Zonneville, Justin, Alfiya Safina, Alexander M. Truskinovsky, Carlos L. Arteaga, and Andrei V. Bakin. 2018. "TGF- β Signaling Promotes Tumor Vasculature by Enhancing the Pericyte-Endothelium Association." *BMC Cancer* 18 (1): 670. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4587-z>.

ANNEXE

Cancer associated fibroblasts and extracellular matrices: targets for cancer diagnosis and therapy?

Ismahane Belhabib^{1,‡}, Sonia Zaghdoudi^{1,‡}, Corinne Bousquet¹, and Christine Jean^{1,*}

¹ Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), INSERM U1037, Université Toulouse III Paul Sabatier, ERL5294 CNRS, Toulouse, France

* Correspondence should be addressed to Christine Jean (email: christine.jean@inserm.fr)

‡ Authors contributed equally

Abstract: Solid cancer progression is dictated by neoplastic cell features and pro-tumoral crosstalks with their microenvironment. Stroma modifications, such as fibroblast activation into cancer-associated fibroblasts (CAFs) and extracellular matrix (ECM) remodeling, are now recognized as critical events for cancer progression and as potential therapeutic or diagnostic targets.

The recent appreciation of the key, complex and multiple roles of the ECM in cancer and of the CAF diversity, has revolutionized the field and raised innovative but challenging questions.

Here, we rapidly present CAF heterogeneity in link with their specific ECM remodeling features observed in cancer, before developing each of the impact of such ECM modifications on tumor progression (survival, angiogenesis, pre-metastatic niche, chemoresistance...), and on patient prognosis. Finally, based on preclinical studies and recent results obtained from clinical trials, we highlight key mechanisms or proteins that are, or may be, used as potential therapeutic or diagnostic targets, and we report and discuss benefits, disappointments, or even failures, of recently reported stroma-targeting strategies.

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Cancers* **2021**, *13*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Keywords: Cancer-Associated Fibroblasts; Extracellular Matrix; Cancer; therapeutic and diagnostic targets

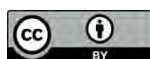
Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

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



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

More than a century ago, the "seed and soil" theory was proposed by Paget [1], seed being cancer cells and soil the stroma. Molecular characteristics of "seed (cancer cells)" were analyzed in depth and many oncogenes/suppressor genes have been identified and characterized. However, the "soil", microenvironment encompassing host stromal cells (vascular cells, fibroblasts, immune/inflammatory cells...), as well as non-cellular components (soluble factors, extracellular matrix...) generated by cancer cells themselves and stromal cells, is still under characterization because of its structural and functional complexity. Recent development of novel molecular technologies has revealed the biomedical significance of the "soil" that influences cancer cell biological behaviors and functions, such as proliferation, invasion and metastatic processes. It is now clear that not only the soil promotes the growth of the seed, but also that the seed "educates" the soil to support its needs. Indeed, stromal cells acquire a specific biological phenotype *via* direct or indirect interactions with cancer cells. As an example, fibroblasts, which are the major components of the tumor microenvironment in most of solid tumors, become activated into cancer-associated fibroblasts (CAFs) under cancer cell stimulation, and, in turn, favor cancer development [2] notably *via* their secretion of acellular component such as extracellular matrix (ECM) and soluble factors. This abnormal ECM is a key regulator of tumor survival, progression and chemoresistance and represents the "breeding ground" of cancer cells. Globally, as the soil promotes the acquisition and maintenance of each of the cancer hallmarks, over the years several approaches have been used to target it.

In this context, this review will focus on: 1) Cancer-associated fibroblasts as main actors of matrix remodeling, 2) The impact of ECM modifications by CAFs on tumor progression, and 3) The microenvironment as a diagnostic or therapeutic target.

2. Cancer-associated fibroblasts: main actors of matrix remodeling

2.1. Cancer-associated fibroblasts (CAFs)

Cancer-associated fibroblasts, the major stromal cells of most solid cancers such as breast and pancreatic cancers, have been widely described as key actors in tumor progression through numerous mechanisms including their ability to secrete various exacerbated soluble and insoluble factors (such as extracellular matrix (ECM) proteins). CAFs are defined as all fibroblastic, non-neoplastic, non-vascular, non-epithelial and non-inflammatory cells, activated and found in tumors and metastatic niches [3,4]. As opposed to the physiological activation (observed during wound healing for example), the "activated" phenotype of CAFs is persistent.

CAFs have been proposed to be defined as a cellular state rather than a cell type [5] because CAF origin is diverse: whereas they mainly come from the activation of quiescent fibroblasts residing in the tumor host tissue, they also originate from bone marrow derived cells (BMDC), trans-differentiation of pericytes, endothelial and epithelial cells [6,7]. Although there are currently no specific markers defining completely and exclusively CAFs, vimentin, α -SMA (smooth muscle actin), FAP (Fibroblast activation protein), PDGFR- α (Platelet-derived growth factor receptor- α), PDGFR- β and FSP-1 (also known as S100A4) are markers [3,4].

During tumorigenesis, quiescent fibroblasts are activated in response to various stimuli such as hypoxia [8], oxidative stress [9], growth factors (for example, transforming growth factor superfamily (TGF β) [10], platelet-derived growth factors (PDGF) [11], epidermal growth factors (EGF), fibroblast growth factors (FGF) [12] and sonic hedgehog (SHH) [13]), chemokines and cytokines. Such activation leads to an increase of CAF contractile capacities (with increased expression of α -SMA and vimentin), to a morphological modification, and to an exacerbated secretion of many factors (soluble and insoluble factors including ECM proteins). CAFs have been shown to first deposit fibronectin, generating supra-cellular structures under tension. This creates a positive feedback loop that keeps

the fibroblasts in an activated state in which YAP (Yes-associated protein) is translocated to the nucleus and α -SMA overexpressed [14]. Signals from the neo-synthesized ECM activate the Rho-ROCK-Myosin II signaling pathway and the incorporation of α -SMA into actin-myosin fibers leads to an increased contractility of activated fibroblasts [15,16]. These cells then generate tensile forces which, once transmitted to the matrix, trigger its remodeling at different levels. At the biochemical level, activated fibroblasts modify the matrix molecular composition by increasing the deposition of new matrix components, and by modulating the expression of matrix metalloproteinases (MMPs). Mechanically, these cells affect the physical properties of the matrix by modifying its organization and stiffness [17]. Such modifications induce the recruitment of new fibroblasts and their activation, and other components of ECM are produced thereby increasing the deposition of type I collagen, resulting in a decrease in fibronectin / collagen I ratio. While in a physiological context, when the collagen I network is crosslinked, fibronectin fibers are relaxed and fibroblasts resume their quiescence [14], in a tumor context, the ECM remodeling is continuous [18–20], altering the distribution of fibronectin zones by preventing the relaxation of fibronectin fibers [21].

Through these secretions, CAFs maintain their activated status, enhance their number and install a dialogue not only with tumor cells but also with the other stromal cells (endothelial cells, immune cells, for example) leading to complex and finely regulated tumor modifications. Indeed, while during years, researchers believed that CAFs had exclusively pro-tumoral functions (promoting tumor cell proliferation, survival, chemoresistance, angiogenesis [22] and immunosuppression [23]), in the past seven years, several publications have shown that CAF deletion or ECM modifications could result, depending on the context, on enhanced tumor progression.

Indeed, one CAF particularity to take into account when trying to understand their role in cancer, is the recent observation, based on single cell RNA seq analysis, that CAFs are heterogeneous, in term of morphology, functions and markers. This emergent concept of CAF subpopulations is based on several recent publications reporting the presence of CAF subgroups in PDAC (pancreatic ductal adenocarcinoma), breast carcinoma, colon carcinoma, lung adenocarcinoma and high-grade serous ovarian cancers [24] [25] (**table 1**). In breast cancer, Costa and al. distinguished four different CAF subpopulations (referred to as CAF-S1 to S4), that accumulate differentially depending on breast cancer subtypes (luminal, HER2, and triple-negative). Importantly, as authors identified that the CAF-S1 subset highly contributes to immunosuppression, they suggest that patient with CAF-S1 rich tumors may benefit from specific immunotherapeutic strategy [26]. In non-small cell lung cancer, CAF subgrouping, either based on the collagen aspect or on fibroblast density, has prognosis significance [27–29]. In PDAC, David Tuveson's teams was the first to report the presence of diverse CAF subtypes: a CAF subpopulation with elevated expression of α -smooth muscle actin (α SMA) located immediately adjacent to neoplastic cells called "myofibroblastic CAFs" (myCAF), and another CAF subpopulation located more distantly from neoplastic cells (lacking elevated α SMA expression) which secreted IL6 and additional inflammatory mediators called "inflammatory CAFs" (iCAF) [30]. Later on, by performing single cell analysis, this same team also identified a third subpopulation named "antigen-presenting CAFs" (ApCAFs) capable of activating CD4+ T cells in an antigen-specific manner, thus with putative immune-modulatory capacity (Elyada et al. 2019).

Over the years, several studies have looked for correlation between CAFs/ECM and PDAC patient prognosis. Erkan et al. showed in a cohort of 233 PDAC patients (who underwent surgical resection and received adjuvant therapy) that collagen deposition was an independent positive prognosis marker whereas the amount of α -SMA expression (CAF activity) was negatively correlated with patient survival, although statistically insignificant [31]. In this study, they defined four major patterns of collagen deposition with regard to PSC (pancreatic stellate cells (PSCs), the main cell origin of CAFs in PDAC [3,32,33] activity, and they showed that the combination of high stromal activity and low

collagen deposition was associated with worse prognosis, whereas the combination of high collagen deposition and low stromal activity was correlated with a better prognosis. Although these results are contradictory to the dogma that collagen-induced signals favor tumor aggressiveness, they have been confirmed in another publication. Indeed, Bever et al., using computer-aided quantitative method to correlate patient survival with stroma density and activity in pancreatic cancer, observed that high stromal density (ratio of the stroma area to total tumor area), but not stroma activity (measured by α -SMA expression), was significantly associated with longer disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in a cohort of 66 PDAC patients (who underwent pancreaticoduodenectomy and received adjuvant therapy) [34]. This year, R. Kalluri's group reported, by using a dual-recombinase genetic mouse model of spontaneous PDAC to delete type 1 collagen specifically in myofibroblasts, that reducing Col1 total stromal content accelerates PanINs (pancreatic intraepithelial neoplasia) and PDAC emergence and decreases mouse overall survival by the establishment of an immunosuppressive microenvironment (recruitment of myeloid-derived suppressor cells) [35]. In contrary, Weaver's group observed no significant association between the levels of fibrillary collagens and patient survival. Authors demonstrated, using second harmonic generation (SHG) microscopy, that the diameter of the collagen fibers adjacent to the pancreatic lesions was significantly thicker in PDAC patients with the shortest survival suggesting that collagen thickness is indicative of poor prognosis [36]. Following these findings, another group showed, using a SHG-based quantitative approach, that PDAC patients with high collagen alignment (induced by collagen crosslinking) had significantly reduced overall survival than patients with low alignment [37]. Then, according to these publications, collagen quality (thickness, alignment) rather than quantity is predictive of poor prognosis; therefore, not only CAF activation is important but also ECM modifications. This concept is supported by Moffitt's studies that defined, based on PDAC virtual microdissection, "normal" and "activated" stromal subtypes with prognostic and biological relevance; "activated" subtype, corresponding to a stroma encompassing activated CAFs and highly remodeled ECM, has the worse prognosis [38].

Cancer	CAF subpopulations	Secretion	Main characteristics	Markers / key Genes
Breast cancer [26,39] and	CAF-S1	CXCL12, CCL2, CCL11, CXCL14 [25,26,39]	-Attract CD4 ⁺ CD25 ⁺ T lymphocytes, promote their differentiation into Tregs and subsequent pro-tumoral functions [26] -Enhance cancer cell migration [39] - Initiate an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [39]	CD29 ^{Med} FAP ^{Hi} FSP1 ^{Low-Hi} α SMA ^{Hi} PDGFR β ^{Med-Hi} CAV1 ^{Low} [25,26]
	CAF-S2	ND	Inactivated CAF [39]	CD29 ^{Low} FAP ^{Neg} FSP1 ^{Neg-Low} α SMA ^{Neg} PDGFR β ^{Neg} CAV1 ^{Neg}

High-grade serous ovarian cancers [25]				[25,26]
	CAF-S3	ND	Inactivated CAF [39]	CD29 ^{Med} FAP ^{Neg} FSP1 ^{Med-Hi} αSMA ^{Neg-Low} PDGFRβ ^{Med} CAV1 ^{Neg-Low} [25,26]
	CAF-S4	CCL2, CCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14 [25,26,39]	Induce cancer cell invasion <i>via</i> NOTCH signaling [39]	CD29 ^{Hi} FAP ^{Neg} FSP1 ^{Low-Med} αSMA ^{Hi} PDGFRβ ^{Low-Med} CAV1 ^{Neg-Low} [25,26]
PDAC [40–44]	Myofibroblastic CAFs (myCAFs) [30,43]	ECM proteins	Anti-tumor, contractile, stroma-remodeling	FAP ⁺ αSMA ^{high} IL-6 ^{low} <i>Tnc</i> , <i>Tgfb1</i> , <i>Thy1</i> , <i>Tagln</i> , <i>Col12a1</i> , <i>Pdgfrb</i>
	Inflammatory CAFs (iCAFs) [30,43]	IL-6, IL-11, LIF <i>IL-8</i> , <i>CXCL1-2-12</i> , <i>CXCL2</i> , <i>CCL2</i>	Pro-tumor, secrete cytokines and chemokines involved in cancer progression	αSMA ^{low} IL-6 ^{high} <i>Clec3b</i> , <i>Col14a1</i> , <i>Gsn</i> , <i>Ly6c1</i> , <i>Cxcl12</i>
	Antigen-presenting CAFs (ApCAFs) [43]	ND	Present antigen to T cells	<i>CD74</i> , <i>Saa3</i> , <i>Slpi</i> , <i>H2-Ab1</i> , <i>Nkain4</i> , <i>Irf5</i> , CMH class II
	FB1 = iCAF like [42]	<i>Il-6</i> , <i>CXCL12</i> , <i>CCL2</i> , <i>CCL7</i>	Secretory phenotype	<i>Cxcl14</i> , <i>Ptn</i> , and genes mediating insulin-like growth factor signaling (<i>Igf1</i> , <i>Igfbp7</i> , <i>Igfbp4</i>), <i>Pdgfr</i>
	FB3 = myCAF like [42]		Contractile phenotype	mesothelial markers (<i>Lrrn4</i> , <i>Gpm6a</i> , <i>Nkain4</i> , <i>Lgals7</i> , and <i>Msln</i>); fibroblast markers (<i>Cav1</i> , <i>Cdh11</i> , and <i>Gas6</i>), <i>Acta2</i> and <i>Tagln</i> , MHC-II-associated genes
	CAF-c1 [44]	Collagen I, SPARC, ECM proteins	Early tumors	CD74 ⁺ /HLA-DRA ^{lo} / <i>Col1a1</i> ⁺ / <i>Col3a1</i> ⁺ /TIMP 1 ⁺ /FAP ⁺ , C7 ⁺ /ENG ⁺

	CAF-c2 = IL1-CAF [44]	IL1	Established tumors	<i>HAS1</i> ⁺ / <i>CXCL1</i> ⁺ / <i>CCL2</i> ⁺ / <i>FAP</i> ⁺ / <i>CD74</i> ^{hi} / <i>HLA-DRA</i> ⁺
	CAF-c0 = TGF α -CAF [44]	TGF α	Established tumors	<i>LRRC15</i> ⁺ / <i>TAGLN</i> ⁺ / <i>Col11a</i> ⁺ / <i>ACTA2</i> ⁺ / <i>FAP</i> ⁺ / <i>CD74</i> ^{hi} / <i>HLA-DRA</i> ⁺
	Subtype A [41]	ECM proteins	Associated with poor/intermediate prognosis	<i>POSTN</i> ^{high} / <i>MYH11</i> ^{low} / <i>PDPN</i> ^{low} / α <i>SMA</i> ^{low} / <i>PDGFR</i> α / <i>Vimentin</i> ^{low}
	Subtype B [41]	ECM proteins	Associated with intermediate prognosis and with cancer cell protection against gemcitabine	<i>MYH11</i> ^{high} / <i>POSTN</i> ^{low} / <i>PDGFR</i> α / α <i>SMA</i> ^{high} / <i>Vimentin</i> ^{high}
	Subtype C [41]	Inflammatory mediators and ECM proteins	Associated with “good” prognostic but with cancer cell protection against gemcitabine	<i>PDPN</i> ^{high} / <i>POSTN</i> ^{low-high} / <i>PDGFR</i> α
	Subtype D [41]	ECM proteins	Associated with bad prognosis and with cancer cell protection against gemcitabine	α <i>SMA</i> ^{high} / <i>Vimentin</i> ^{high}
Non-small cell lung carcinoma [29]	High desmoplastic CAFs	ND	Enhance collagen matrix remodeling, invasion and tumor growth	α <i>SMA</i> ⁺ <i>ITGA11</i> ⁺
	Low desmoplastic CAFs	ND	Pro-tumoral functions limited compared to HD-CAF	α <i>SMA</i> ⁺ <i>ITGA11</i> ⁺
Colorectal cancer [45]	<i>PDPN</i> ⁺ CAFs	ND	Associated with prolonged disease-free survival	<i>PDPN</i> ⁺
	<i>PDPN</i> ⁻ / α - <i>SMA</i> ^{high} CAFs	ND	Associated with aggressive tumors	<i>PDPN</i> ⁻ / α - <i>SMA</i> ^{high}
	<i>PDPN</i> ⁻ / <i>S100A4</i> ^{high} CAFs	ND	Associated with tumor budding and lymphovascular invasion	<i>PDPN</i> ⁻ / <i>S100A4</i> ^{high}

Table 1: CAF subgrouping in breast, ovarian, pancreatic, lung and colorectal cancers associated with identified secretions, main tumoral characteristic and markers. Italic refers to genes. Abbreviations : Acta2: Actin Alpha 2, Smooth Muscle; C7: Complement C7; CAV : Caveolin; CCL: C-C

162
163
164
165

Motif Chemokine Ligand; CD74: Cluster of Differentiation 74; Cdh11: Cadherin 11; Clec3b: C-Type Lectin Domain Family 3 Member B; CMH: major histocompatibility complex; Col: collagen; CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand; ENG: Endoglin; FAP: Fibroblast Activation Protein Alpha; FSP1: Fibroblast-Specific Protein-1 = S100A4: S100 Calcium Binding Protein A4; Gas6: Growth Arrest Specific 6; Gpm6a: Glycoprotein M6A; Gsn: Gelsolin; H2-Ab1: histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1; HAS1: Hyaluronan Synthase 1; HLA-DRA: Major Histocompatibility Complex, Class II, DR Alpha; Igf: Insulin Like Growth Factor; Irf5: Interferon regulatory factor 5; ITGA11: Integrin Subunit Alpha 11; Lgals7: Galectin 7; LRRC15: Leucine Rich Repeat Containing 15; Lrrn4: Leucine Rich Repeat Neuronal 4; Ly6c1: Lymphocyte antigen 6C1 precursor; Msln: Mesothelin; MYH11: myosin heavy chain 11; MYL9: myosin light chain 9; Nkain4: Sodium/Potassium Transporting ATPase Interacting 4; PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha; PDPN: Podoplanin; POSTN: Periostin; Ptn: Pleiotrophin; Saa3: Serum Amyloid A3Sip; Tagln: Transgelin; TGFb: Transforming Growth Factor Beta 1; Thy1: Thy-1 Cell Surface Antigen; TIMP1: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1; Tnc: Tenascin C.

2.2. Extracellular matrix (ECM)

One of the major features of CAFs is their ability to produce large amounts of ECM proteins, such as collagens, glycoproteins and proteoglycans [46]. The development of new technologies, mainly the “matrisome” approach which is based on mass spectrometry analysis of in vivo samples and enables to characterize the ECM biochemical composition, have revolutionized our understanding of tumoral ECM components and roles [47,48]. ECM is a complex scaffold composed of hundreds of proteins that provide anchoring and support to environmental cells under physiological and pathological conditions [47]. Major ECM structural components are collagens, proteoglycans, and hyaluronic acid that provide supportive framework within which other ECM components (such as laminin or fibronectin for example) and cells interact [46,49]. In addition to this architectural role, ECM proteins provide signals that cells interpret and transduce via cell surface receptors such as integrins. These signals, named mechanotransduction, activate cellular pathways that impact cellular functions such as proliferation, survival, morphology, adhesion and motility [50–52]. ECM represents also a growth factor reservoir as matrix proteins can sequester them and modify their signaling properties [53]. ECM modifications (biochemical composition, mechanical properties, integrity) are often observed in diseases such as fibrosis, cardiovascular or musculoskeletal diseases [54–56] and cancer [57,58]. It has recently become evident that ECM has biomechanical and physical properties that impact all cancer hallmarks, including the cellular processes that contribute to cancer initiation, progression, spreading [19,59] and metastatic niche formation [60,61]. Moreover, the extraordinarily dense fibrotic stroma, found in PDAC (PDAC fibrotic area accounts for up to 90% of the tumor area [62]) and breast cancer, impedes tumor perfusion and delivery of anticancer drugs [63]. ECM modifications within tumor (quantity, stiffness...) have been shown to correlate with more aggressive tumors and worse prognosis for patient [64–67].

Collagens are by far the most abundant and best characterized ECM components. Collagen I is responsible for the majority of the desmoplastic reaction [68–70], and high levels of its deposition have been associated with reduced survival in PDAC patients [71]. In breast cancer, as in PDAC, accumulation of fibrillary collagens I, III, and V occurs [72–74] and increased level of Col1a1 or Col3 is associated with a metastasis status [74] and correlates with shorter survival [75]. Mechanistically, fibrillary collagens regulate tumor cell functions *via* the integrin activation promoting tumor cell proliferation, migration and preventing apoptosis [76]. In contrast, type IV collagen, which is mainly present in the basement membrane (BM) that underlies epithelium and endothelial cells, is decreased in both PDAC and breast cancer [72]. In PDAC mouse model (KTC: *Tgfb2*^{flox/wt}; *Kras*^{LSL-G12D/+}*Tgfb2*^{flox/wt}*Ptf1a*-Cre)[77], as in human PDAC tumors [78], not only Col4 is decreased but also BM proteins in general. This BM destruction facilitates invasion and metastasis

in many cancers [59,79]. Interestingly, the ECM remodeling observed in tumors generates collagen fragments that, by themselves influence tumor progression. For example, increased level of MMP-mediated degradation of type I (C1M), type III (C3M) and type IV (C4M, C4M12a1) collagens, often found in PDAC patient serum, is associated with significantly shorter survival [80].

Glycoproteins are the second main ECM subgroup deregulated during cancer that encompasses fibronectin, laminins and many other proteins. Fibronectin (FN) is found to be overexpressed in several cancers and reported to participate to several steps of tumorigenesis including growth, invasion, and metastasis. When analyzed as a potential prognosis factor for cancer patient, FN role in cancer progression appears to be complex, as FN deposited in tumor microenvironment (TME) or FN tumor cell endogenous expression have opposite correlation with patient prognosis [81,82]. A better understanding of such paradoxical role of FN in tumorigenesis is of high interest and has been recently extensively well reviewed by Tsung-Cheng Lin et al [82]. In fibrotic solid tumors, FN expression is associated with poor clinical outcome [72], tumor aggressiveness [83], and participates to the resistance to radiotherapy *via* the FN-specific $\alpha_5\beta_1$ -integrin pathway [84]. Other glycoproteins such as periostin and galectin-1 are upregulated in PDAC [85,86] and their expressions are negatively correlated to patient survival [85–87]. Numbers of glycoproteins are found to be enhanced in cancer patient serum and used as biomarkers: for examples, CA125 and CA19-9 are two glycoproteins used as ovarian cancer and pancreatic cancer biomarkers, respectively [88].

Finally, proteoglycan expression is also modified during tumorigenesis and one major example is the hyaluronan (HA). HA is a negatively-charged glycosaminoglycan found to be highly accumulated in solid cancers [71,89,90]. HA expression within tumor, through a mechanism involving its high hydrophobic properties, enhances interstitial tumor pressure, and its accumulation correlates with poor prognosis [71] and metastasis [91].

3. Impact of ECM modifications induced by CAFs on tumor progression

Considering that fibroblast activation and ECM modifications observed in tumors are often associated with poor patient outcome, strategies interfering with the pro-tumoral role of CAFs and ECM remodeling appear as promising approaches for solid tumor treatment (Merika, Syrigos, et Saif 2012; Henke, Nandigama, et Ergün 2020). In the past decade, genetic and pharmacologic strategies to deplete CAFs leading to ECM modification were carried out in genetically engineered mouse models. Such preclinical studies and early phase clinical trials in PDAC patients have reported promising efficacy results. For example, targeting Sonic Hedgehog (shh) signaling pathway leads to a depletion of desmoplastic stroma (decrease in Collagen I content and in proliferation of α SMA positive stroma myofibroblasts) associated with an increase in vessel density, altogether resulting in enhanced intratumoral chemotherapy penetration and prolonged mice survival [92]. Unfortunately, once tested on large PDAC metastatic patient cohort in a phase I- II clinical trial (NCT01130142), the IPI 926 (Hedgehog pathway inhibitor), a well-tolerated component [93] in combination with gemcitabine, shortened patient survival mainly due to increased tumor angiogenesis [94].

This disappointing result was the first to reveal the complexity of stroma-targeting approaches. As for CAF targeting, more recent publications have reported that targeting specific ECM (HA for example) may have unexpected and dramatic effect on patient survival highlighting the importance to acquire a precise understanding of each ECM-induced tumor function in order to develop rationalized ECM-targeting strategies and to anticipate possible impacts of such targeted strategy on all of the tumor hallmarks.

In this part, we will delineate which, and how, ECM modifications influence tumorigenesis steps.

3.1. Impact on cancer cell proliferation and survival

Cancer cell proliferation is an important part of cancer development and progression. Cancer cell proliferation is stimulated by the activation of many signal transduction pathways triggered by both intrinsic mutational and epigenetic events, and stromal-derived signals. Integrin activation, induced by ECM binding, is the major regulator of ECM-induced cell proliferation (for review, see [95]).

Key ECM components involved in cancer cell proliferation are collagens [72–74]. For example, type I collagen, found to accumulate in many solid cancers [96], promotes β -catenin phosphorylation, dissociation from E-cadherin and translocation into the nucleus, enhancing β -catenin transcriptional activity-dependent proliferation of gastric carcinoma cells [97]. Collagen VI, also overexpressed in some solid cancers, correlates with poor breast cancer patient prognosis [98,99], and stimulates tumor growth in part by signaling through the NG2/chondroitin sulfate proteoglycan receptor expressed on the surface of tumor cells [100]. Type V collagen which is upregulated in human breast cancer [101,102], also appears to be involved in cancer cell proliferation, as the ablation of the $\alpha 3$ chain of collagen V in MMTV-PyMT mouse model inhibits tumor progression by reducing glypican-1-dependent tumor cell proliferation [103].

Cancer cell proliferation and survival are also dependent on the collagen crosslinking status [104,105] mainly regulated by the crosslinking enzymes lysyl oxidases (LOXs). LOXs are copper-dependent enzymes mainly secreted by CAFs, that oxidize primary amine substrates to reactive aldehydes [106–110]. Levental's group showed *in vivo* that LOX-mediated collagen crosslinking promotes growth and invasion of premalignant mammary organoids injected into the mammary gland [104]. Collagen crosslinking increases matrix stiffness [111] and activates the Rho/ROCK pathway to induce actomyosin-mediated cellular tension to re-establish force equilibrium [112]. This activated pathway promotes β -catenin nuclear translocation, transcriptional activation and consequent squamous carcinoma cell hyperproliferation [112].

In addition to collagen and its crosslinking, some glycoproteins are also involved in tumor growth. One of them is the fibronectin, which accumulates in several human cancers [72,84] and correlates with a shorter patient survival in colorectal cancer (CRC) [113]. Fibronectin knockdown, besides reducing cell invasion, decreases CRC SW480 cell proliferation [113]. Fibronectin promotes the activation of proliferation-related signaling pathways, *p*-ERK1/2 and cyclin D1, in glioma stem-like cells, and enhances their adhesive properties and differentiation in a concentration-dependent manner [114]. Regarding hyaluronan, a glycosaminoglycan upregulated both in the cancer cells themselves and in the surrounding stroma, and a prognosis factor for breast cancer patient survival [115], was also shown to regulate cancer cell proliferation. Indeed, hyaluronan interaction with its receptor, CD44, stimulates cancer cell growth through Rho and PI3K-AKT signaling pathways [116]. Inhibition of the hyaluronan synthase 2, enzyme that regulates hyaluronan synthesis, inhibits breast carcinoma cell proliferation and migration *in vitro* and blocks metastasis *in vivo*, leading to prolonged animal survival [117]. Finally, a global increase of ECM protein deposition and crosslinking induces biochemical and biophysical modifications that promote cancer cell proliferation.

Interestingly, some ECM proteins have opposite effects on tumor growth. A key example is the calcium-binding matricellular glycoprotein SPARC (Secreted Protein Acidic Cysteine-Rich, also named BM-40 and Osteonectin). In PDAC, SPARC is secreted by both cancer cells and CAFs [118] but very poorly expressed within pancreatic cancer cells [119]. *In vitro*, exogenous SPARC protein addition to PDAC cells inhibits their proliferation, while its expression downregulation increases proliferation and reduces apoptosis [120]. Surprisingly, SPARC expression in PDAC fibroblasts is correlated with a

shorter overall patient survival (15 months versus 30, $p < 0.001$) and is an independent prognosis factor [121], raising the complex role of this matrix protein in PDAC progression [120].

3.2. Impact on tumor invasion

Invasion, a key step of the metastatic process, is also induced by mechanisms dependent on the expression of specific matrix proteins, ECM crosslinking/stiffness and ECM organization.

ECM remodeling in tumor involves high production of matrix proteins, ECM assembly and crosslinking, as well as ECM degradation by MMPs. This remodeling contributes to ECM stiffness, which occurs mainly through an increase in collagen deposition, crosslinking and fiber parallel reorientation [122,123]. The collagen crosslinking, dependent on LOX, generates more rigid ECM [124–127]. The increase in ECM stiffness induces in CAFs, an "outside-in" signaling *via* integrin engagement facilitating the formation of focal adhesions [128]. This phenomenon leads to the activation of pathways such as FAK, Rho-A or Src, acto-myosin reorganization that further increases CAF contractility [129], and maintains their activated state. These same signaling pathways activate tumor cell invasion [104,130,131], since LOX inhibition using β -aminopropionitrile (BAPN) was shown to abrogate cervical carcinoma cell invasion and migration [132].

As in CAFs, increasing ECM stiffness promotes the formation of actomyosin beams in tumor cells, that lead to increased invadopodia formation and matrix degradation dependent on their contractility [133,134]. Hence, invadopodia are actin-rich protrusions of the plasma membrane enriched in MMPs that are involved in the ECM degradation and in the formation of pores or tunnels through which cancer cells can pass [135,136]. Invadopodia were first identified in fibroblasts transformed by the oncogene v-src [137]. More recently, it has been described that CAFs are able to degrade the surrounding ECM by using a mechanism dependent on tubular organization and independent on invadopodia. Indeed, unlike invadopodia, this degradation does not require the action of Src kinase, Cdc42 or Dyn2. In contrast, inhibition of Dyn2 in fibroblasts causes a dramatic increase in stromal matrix degradation. Deterioration of ECM by CAFs requires an increase on MT1-MMP (MMP-14) cell surface expression or on MMP-2 activation [138]. This CAF-induced remodeled matrix increases tumor cell invasive capacities, illustrating how the tumor microenvironment can contribute to metastases [138]. Of course, tumor cells themselves also secrete MMPs, and, ECM protein themselves can activate cellular signaling pathways resulting in MMP secretion. As an example, collagen XI α 1, an ECM protein upregulated in several solid cancers (ovarian, breast, pancreatic, non-small cell lung cancer and glioblastoma) and correlated with poor patient prognosis, promotes ovarian cancer invasion and metastasis *via* the activation of the Ets-1-MMP3 pathway [139,140]. SPARC also favors cell invasion through the induction of MMP expression by CAFs and monocytes [120,141,142]. In addition to their role on MMP expression, ECM-induced integrin engagement in tumor cells also activates signaling pathways leading to tumor invasion: collagen XIII, through β 1 integrin activation, enhances cancer cell invasion, migration and mammosphere formation dependent on TGF- β signaling [143]. As for collagen XIII, fibronectin and laminins also induce integrin-dependent tumor cell invasion [144,145]. SPARC is a very interesting ECM protein that, depending on the cancer, can promote (glioblastomas, melanoma, breast cancer and prostate cancer) or inhibit (neuroblastoma, ovarian cancer, pancreatic cancer, colorectal cancer and gastric cancer) metastasis (for review see [146]).

Finally, in addition to ECM quantity and stiffness, ECM organization plays a critical role in tumor invasion. This is illustrated by the fact that an organizational classification of tumoral ECM, proposed on the basis of "tumor-associated collagen signatures (TACS)", correlates with patient prognosis [147,148]. Compared to normal tissues where collagen

fibers are corrugated with an isotropic orientation (TACS-1), they are found strained, anisotropic and oriented either parallel to the tumor boundary (TACS-2) in non-invasive tumors, or perpendicular to the edge of the tumor (TACS-3) in invasive tumors. While cell density impedes cell migration through ECM [149], the orientation of collagen fibers perpendicular to the tumor mass and the paracrine signals of stromal cells guiding the directional migration of tumor cells promote tumor invasion by facilitating the migration of tumor cells to the vascular system [150,151]. As for collagen, fibronectin parallel fiber organization enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells [152].

Such matrix organizational changes are dependent on ECM composition modification [153], on integrin engagement [144], on expression of specific peptidase such as FAP (fibroblast activation protein) [152], and on actomyosin-dependent contractility of cells (CAFs and tumor cells) that allow to modify the alignment of ECM fibers [107,154–158]. While CAFs and tumor cells are able to generate such matrix tracks that tumor cells use to invade [159], non-activated fibroblasts, less contractile, cannot align ECM fibers and therefore do not promote directional migration of cancer cells [155,157], nor their proliferation [107]. Importantly, collagen fibers alignment correlates with tumor progression [148].

3.3. Impact of ECM modifications on angiogenesis

The vascular ECM is composed of two different compartments: the basement membrane (BM) and the interstitial ECM. In capillaries, the vascular wall is limited to the BM. This specialized macromolecular assembly of proteins separates the endothelium from the surrounding stromal tissue [160]. It forms a continuous sheet-like structure from 50 to 150 nm thick that surrounds the basal surface of the endothelial monolayer and envelops the perivascular cells, which also participate in BM synthesis and organization [161,162]. Since the capillaries lack smooth muscle cells and associated interstitial ECM, BM alone provides the structural and mechanical features that support the endothelium and vascular integrity, and allows the distribution of nutrients and oxygen. The main components of vascular BM are type IV collagen, laminins, heparan sulfate proteoglycans (HSPG) and nidogen / entactin; the minor components include agrin, SPARC, fibulins, type XV and XVIII collagens [163–165]. Laminins and collagen IV are self-assembled into macromolecular sheets interconnected by nidogen and perlecan. The most abundant laminins in BM are composed of $\alpha 4$ and $\alpha 5$ chains combined with $\beta 1$ and $\gamma 1$ laminin chains to form the laminins 411 and 511 [163,164,166]. The laminin $\alpha 2$ is expressed during development (laminin 211) and also in mature BM (laminin 221).

Tumor angiogenesis is dependent on BM drastic modifications [167]. Its composition and structure are modified in many ways to generate specialized and context-specific assemblages [168]. Angiogenesis is associated with degradation and reformation of BM [167]. In response to growth factors impacting endothelial cells and the presence of MMPs, BM undergoes changes in degradation and structure. This transition of mature BM into a temporary matrix promotes the proliferation and migration of vascular endothelial cells. Growth factors, such as VEGF, FGF- β and PDGF produced by tumor cells, fibroblasts and immune cells and pre-stored in BM, are released throughout its degradation by MMPs [167]. This leads to the formation of an intermediate BM, and then of a new (mature) complex matrix. The BM is involved, with vascular endothelial cells and pericytes, in the formation of new blood vessels, and its degradation plays a crucial role in the regulation of angiogenesis [167]. Indeed, BM proteins have been shown to participate to the neoformation of vessels. For example, perlecan exerts a pro-angiogenic activity mainly through the regulation of a FGF-2 signaling pathway involved in cell proliferation, motility and adhesion, and contributing to the maintenance of endothelial integrity and barrier function [169]. Moreover, this proteoglycan can bind to many growth

factors and pro-angiogenic proteins, representing a reservoir of factors, that are released upon perlecan degradation by MMPs or heparanase [170]. Perlecan aberrant expression or fluctuations in its expression levels may occur during tumor progression, resulting in increased invasiveness and metastatic potential [171,172]. In contrast to perlecan which has a pro-angiogenic activity, the protein resulting from its degradation by MMPs, called endorepelin, has anti-angiogenic properties. *Via* its association with $\alpha 2\beta 1$ integrin, endorepelin activates a signaling cascade in endothelial cells inhibiting their proliferation and migration [173].

In addition to endorepelin, other fragments of ECM protein cleavage depending on MMP activity have been reported to play an anti-angiogenic role: endostatin, a fragment of collagen XVIII, is an endogenous inhibitor of angiogenesis with anti-tumor functions [174]. However, high levels of circulating endostatin have been observed in several human cancers, such as colorectal cancer (CRC) where this increase correlates positively with systemic inflammation and invasion and negatively with recruitment of mast cells and dendritic cells into the tumor dependently on the anti-angiogenic role of endostatin [175]. Angiostatin is another example of endogenous inhibitor of angiogenesis produced by the action of MMP-2, -7 and -9 or -12 on precursors such as plasminogen, [176–178].

In addition to these ECM protein fragments, SPARC plays a key role in PDAC angiogenesis. Indeed, mouse tumors lacking SPARC show bigger tumors associated with abnormal vessels (less vessels but more permeable due to the decrease in BM and pericyte recovery around them), increased pro-tumor macrophage recruitment within primary tumor and enhanced metastasis [179]. Interestingly, the same group showed that forced expression of MMP-9 rescues the loss of angiogenesis and abrogates metastasis of pancreatic tumors triggered by the absence of host SPARC [180]. These data imply that SPARC and MMP-9 interact to regulate angiogenesis and tumor invasion in PDAC. Another matrix protein with anti-angiogenic properties is the collagen IV. Indeed, this major component of BM was shown to reduce angiogenesis and tumor growth in melanoma particularly through its NC1 domains [181–183] supporting the idea that these specific domains could be used as angiogenesis inhibitors.

Altogether, while in physiology BM plays the role of wall around vessels, in cancer BM becomes highly porous [184,185], thus facilitating the dissemination of tumor cells and the infiltration of pro-tumor immune cells promoting cancer progression [186,187]. Similarly, the lymphatic system can also transport tumor and immune cells. Studies have shown that the $\alpha 9\beta 1$ integrin plays an important role in lymphatic vessel formation [188,189], suggesting that ECM is likely to play a role in tumor lymphangiogenesis. In conclusion, the amount of ECM, its composition, its organization as well as its cleavage proteins play a key role in tumor angiogenesis.

Finally, the extensive extracellular matrix synthesis and remodeling taking place during tumor progression generates the accumulation of biomechanical forces responsible for blood and lymphatic vessel compression, reduction of perfusion rates and increased hypoxia. While almost all matrix proteins participate to the accumulation of such forces, also named “solid stress”, collagen and hyaluronic acid (HA or hyaluronan) are the main actors [190]. Collagen fibers, highly cross-linked in cancer, are remarkably stiff in tension, provide tensile strength to tissues and resist to stretching, altogether contributing to growth-induced stress. On the other hand, HA, a highly negatively charged protein, provides compressive resistance because of its capacity to trap water molecules and to generate electrostatic repulsion. Water is incompressible and because water molecules cannot escape from the tumor, they resist the compressive stress developed within the tumor. HA also induces electromechanical swelling of the matrix leading to the compression of the surrounding capillaries. This electromechanical swelling matrix associated with phenomena frequently found in the tumor such as increased vascular permeability (leakage) [191] and loss of lymphatic drainage [192,193] contributes to an increase of hypoxia and interstitial fluid pressure [191,193].

3.4. Impact on pre-metastatic niche preparation and on metastasis development

Matrix remodeling not only facilitates tumor cell evasion from the primary tumor but represents also a critical event for the formation of the so-called pre-metastatic niche, a key step of the metastatic process. Indeed, the niche preparation consists in ECM remodeling and in stroma cell (bone marrow-derived cells (BMDCs), endothelial cells and fibroblasts) recruitment and/or activation. Recent studies have shown that factors secreted by the primary tumor, such as LOX, MMPs and exosomes [194,195], initiate the formation of this niche even before the dissemination of tumor cells [195–197]. Similarly as for the primary tumor, in the metastatic niche, the ECM remodeling (matrix stiffening, crosslinking...) favors tumor cell adhesion, migration, proliferation and survival.

In human hepatocellular carcinoma, the level of circulating LOXL2 (lysyl oxidase-like-2) is highly increased and correlates with metastasis occurrence. This LOXL2 overexpression in tumor cells is induced by hypoxia, TGF- β and SMAD4 pathways. LOXL2 secretion induces, at distance to the tumor, collagen crosslinking, ECM stiffness and durotaxis-dependent bone marrow-derived cell (BMDC) recruitment [194]. BMDCs are crucial actors in the pre-metastatic niche development [198] contributing to hepatic cancer cell invasion and colonization into the lung [110,194]. LOX expression, highly induced in breast hypoxic tumors, promotes collagen IV crosslinking in the lung, inducing CD11b⁺ myeloid cell recruitment. Once adhered to collagen IV, these cells secrete MMPs, leading to collagen degradation and enhanced BMDC and tumor cell recruitment [110]. It is important to note that LOX activity and expression is also highly increased in response to surgical resection of primary tumor. Indeed, Rachman-Tzemah and collaborators show that, in breast cancer, surgery-induced hypoxia promotes LOX secretion that, by enhancing fibrillary collagen crosslinking and focal adhesion signaling pathway, favors metastasis development and decreases mouse survival [199]. These results have to be carefully considered since surgery remains the most successful curative treatment for cancer and that some patients with early-stage disease who undergo surgery eventually succumb to distant metastasis.

MMPs are also key actors of the niche preparation particularly by modifying vascularization. Indeed, orthotopic grafting of melanoma or breast tumor cells compromises vessel integrity at the pre-metastatic niche site (lung) due to an up-regulation of MMPs and angiopoietin. Intrapleural injection of RNAi (interference) against MMP-3 / -10 and angiopoietin alleviates vessel changes, blocks myeloid cell recruitment and metastases, showing their key role in the tumor cell and myeloid cell recruitment and retention at the pro-metastatic site [200].

In addition to LOX and MMPs, tumor-derived exosomes actively participate to the metastatic niche preparation. Exosomes are small membrane vesicles (30 to 100 nm) that carry parental cell cargos including lipids, metabolites, proteins, nucleic acids [201–204], which enable local and systemic cellular communications [205]. Tumor cells produce high numbers of exosomes that can, at distance from the primary tumor site, remodel the ECM, induce BMDC recruitment, activate fibroblasts and modify vasculature, altogether leading to the generation of sites suitable for metastasis development [195]. As exosomes express distinct integrin expression patterns, they are differently uptaken by organ-specific cells. For example, exosomal $\alpha 6 \beta 4$ and $\alpha 6 \beta 1$ integrins, which preferentially bind to lung fibroblasts and epithelial cells, favor lung metastases, whereas exosomal $\alpha v \beta 5$ integrins which interact with Kupffer cells rather favors hepatic metastases [195]. Uptake of PDAC-derived exosomes by Kupffer cells causes TGF- β secretion and upregulation of fibronectin production by hepatic stellate cells, *via* a mechanism dependent on macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression, resulting in the development of a fibrotic microenvironment and in the recruitment of BMDC [197]. Mela-

noma cell exosomes are preferentially captured by sentinel lymph nodes where they induce ECM deposition and lymph node vascular proliferation, therefore favoring the recruitment of circulating melanoma cells [206]. In addition, tumor-derived exosomes can regulate MMP activity leading to ECM modification at specific sites. Indeed, glioblastoma-, breast cancer-, fibrosarcoma- and melanoma-derived exosomes contain and release MMP-2 activators, such as Hsp90 (heat shock proteins (HSPs) and/or MMP-14, that, *in fine*, enhance cancer cell invasion by degrading collagen and gelatin [207–209]. Altogether, tumor-derived exosomes prepare a favorable microenvironment at specific i.e. non-random, pre-metastatic niches.

3.5. Impact on tumor-associated inflammation

ECM impacts immune cell function in tumors through both its architectural properties by acting as a physical barrier or providing invading tracks, and through its biochemical properties by trapping and releasing cytokines, or inducing intracellular signaling pathways.

ECM density, organization and composition play key roles in immune cell migration and spatial distribution [53,210]. Indeed, dendritic and T cells are able to migrate along collagen I fibrils independently of integrins and adhesion molecules (amoeboid migration), whereas tumor and mesenchymal cells use a migration dependent on proteases and integrins (mesenchymal migration) in order to penetrate dense matrix [211–213]. In dense tumoral ECM matrix, T cells use ECM fibers as substrate for their migration and squeeze through matrix gaps, following the paths of least resistance under the guidance of chemokines secreted by cancer cells [214]. In PDAC, collagen I fibers represent guides for T cell migration that prevails on tumor cell chemokine guidance; it leads to their aberrant accumulation into pan-stromal compartment [215], a feature correlated with patient shorten survival [216]. In lung cancer, the chemokine-dependent T lymphocyte infiltration occurs in regions where fibronectin and collagen are lost, whereas it is altered in dense matrix fibers surrounding the tumor islets, leading to a preferential T cell accumulation in the stroma and to their limited intratumoral infiltration [217]. ECM properties also affect myeloid cell localization and activity in cancer. Indeed, ECM stiffness, compaction, and plasticity influence recruitment, polarization and function of macrophages [218,219]. One underlying mechanism depends on the ECM stiffening-induced tumor cell and CAF production of macrophage chemoattractants, such as CCL2 and CSF1 [220,221]. ECM composition, in addition to its organization and density, governs immune cell infiltration as it can enhance (e.g. fibronectin or hyaluronan) or abrogate (e.g. tenascin or versican) T cell migration and activation [222–226], and promote (Hyaluronan and collagen-rich ECM) or block (SPARC) pro-tumoral M2 macrophage recruitment and activation [227–230]. Thus, features of tumor ECM govern immune cell migration, localization and activation, thereby precluding T cell interaction with cancer cells and antitumoral responses [231], thus worsening patient clinical prognosis [216,232].

Moreover, ECM is a major source of molecules with immunomodulatory activities [233]. There are many examples of cytokines and growth factors secreted by cells and trapped by ECM proteins, as well as peptidic fragments produced from the matrix protease activity, which affect proliferation, migration, and differentiation of immune cells. [233]. For example, fibronectin binds to VEGF or HGF [234,235], and perlecan, abundant in ECM, binds to FGF, resulting in the sequestration of these molecules for storage [236]. The proteolytic cleavage of ECM proteins releases growth factors and contributes to localized cell proliferation and differentiation [236]. Moreover, as many ECM proteins are composed of chemokine and cytokine-like structure domains [230], their proteolysis releases ECM fragments that can regulate many processes, including migration, adhesion and differentiation, and affect immune cell behaviors and pro-inflammatory functions [237]. Such fragments are called matrikines. For example, N-acetyl Pro-Gly-Pro (PGP) is

a collagen I bioactive fragment produced by a MMP-8- and MMP-9-dependent cleavage. PGP shares a structural homology with CXCR1 and CXCR2 to attract neutrophils into inflammation sites [238]. These studies show the importance of ECM fragments on immune cell migration control.

3.6. Impact of ECM modifications on chemoresistance

Many cancer cell types have been shown to use their environment interactions to acquire a drug resistance, either in the primary tumor, or in a metastasis dissemination context [239–243]. ECM not only participate to the establishment of a physical barrier to drug penetration (hypoxia, pH and interstitial fluid pressure) but also, upon ECM/cell adhesion, induces chemoresistant signaling pathways within cells.

In many cases, the penetration of therapeutic agents in interstitial spaces inside and around a tumor relies on diffusion and convection under pressure and most anti-cancer therapeutic agents have a limited penetration in solid tumors [244]. Indeed, the increased ECM-induced interstitial fluid is one of the major factors that inhibit the penetration of macromolecules such as chemotherapy [245,246]. The electromechanical swelling matrix not only impacts the interstitial fluid pressure but also leads to the generation of a compressive stress supported by the local growth of cancer cells [247]. This compressive stress was reported to increase PDAC chemoresistance [248]; hence, when applied to pancreatic tumor cell spheroids, such mechanical stress was shown to decrease cell proliferation, thereby reducing chemotherapy efficacy, such as gemcitabine [248]. Altogether, ECM-induced mechanical forces represent a physical barrier and strongly influence drug diffusion [249,250].

Chemoresistance has also been linked to the presence into tumors of specific ECM proteins, such as laminins, collagens, HA, SPARC and periostin. For examples, laminin-332 was shown to be involved in maintaining the self-renewal abilities of human hepatic cancer stem cells and in their resistance to sorafenib and doxorubicin [251]; In stage III colorectal cancer patients, adjuvant chemotherapy drives no survival benefit for patients with tumors expressing high level of laminin $\beta 3$ chain, while it does in the low laminin $\beta 3$ chain group [252]; Laminin- and fibronectin-induced chemoresistances are dependent on activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway in lung, ovarian and breast cancers [251,253,254]; Periostin, overexpressed in almost all solid cancers and a factor of poor prognosis in ovarian carcinoma, promotes cisplatin, 5-FU and Akt-dependent paclitaxel resistance [255–257]; SPARC regulates the fibrillary ECM deposition of TGFBI (Transforming Growth Factor Beta Induced), subsequently influencing ovarian cancer cell motility and decreasing response to paclitaxel [258]; Collagen VI overexpression in ovarian tumor promotes cisplatin-resistance *in vivo* [259]; HA, via a cooperative engagement of CD44 and integrin αV , enhances glioblastoma resistance to alkylating chemotherapies [260].

Finally, cell adhesion to ECM through integrins also induces cancer cell chemoresistance via the induction of various survival pathways [60,261,262] such as PI3K / Akt, MAPK / p53, ERK / MAPK and Rho / ROCK. Based on their key role in chemoresistance, these signaling pathways have become a major axis of anticancer treatment [263–266].

4. Therapeutic targeting of the microenvironment

4.1. CAF targeting

Based on extensive literature showing that CAFs stimulate tumorigenesis and drug resistance, different strategies aimed at targeting CAFs have been developed.

The first strategy to be tested was CAFs depletion. An approach has consisted in the use of a vaccine that targets the protein FAP, a surface glycoprotein serine protease. This vaccine was shown to inhibit primary tumor growth and pulmonary metastases in colon cancer through increased CD8(+) T-cell-mediated tumor cell killing in tumor-bearing mice [267]. In addition, Reisfeld's group showed that the FAP vaccine kills CAFs in breast carcinoma, thus increasing the intratumor uptake of chemotherapeutic drugs [268]. In PDAC models, the genetic depletion of FAP+ CAFs in combination with radiation was associated with increased CD8+ T cell infiltration, but did not improve animal survival [269]. Nevertheless, FAP+ CAFs depletion disrupted a CAF / cancer cell dialog through CXCR4/CXCL12 pathway inhibition, thereby restoring an immune control of tumor growth [270]. In addition to FAP, another CAF marker, α -SMA, has been targeted. While α -SMA+ CAFs targeting was beneficial to suppress breast cancer metastases [271], it had dramatic deleterious effect in PDAC. Indeed, the genetic depletion of α -SMA-expressing cells in a genetically engineered pancreatic cancer mouse model increased tumor aggressiveness (with undifferentiated and highly metastatic tumor cells), ultimately reducing animal survival [272]. α -SMA+ cell depletion totally destabilized tumor stroma resulting in immune surveillance suppression associated with a decreased Teff/Treg ratio and a significant elevation in Ctl4 expression and demonstrated no therapeutic advantage even in combination with gemcitabine. However, α -SMA+ cell depletion associated with an immunotherapeutic treatment (anti-CTLA-4 antibody) prolonged the animal survival [272] suggesting that stratifying patients based on their fibrosis score might offer better responses to immuncheckpoint inhibitors. Another strategy has been to target the Sonic hedgehog (SHH) pathway involved in PDAC stromal desmoplasia [13,273,274]. Pre-clinical treatment with the SHH inhibitor IPI-926, a compound presented by Olive et al. as a drug that *in vivo* depleted the tumor-associated stromal tissue, i.e., decreased α -SMA+ myofibroblast proliferation and profoundly modified the tumor vasculature, was responsible for enhanced intratumoral chemotherapy delivery [92]. However, clinical trials combining gemcitabine with Saridegib (a SHH inhibitor) were discontinued because of reduced patient survival compared to gemcitabine alone [275] (NCT01130142). The principal cause of such treatment failure was an enhanced tumor aggressiveness and metastasis due to a drastic stroma modification, e.g. increased intratumoral vascularization induced by the SHH inhibitor [94]. These studies demonstrated that, although CAFs are mainly pro-tumoral actors, their direct genetic deletion or indirect pharmacologic depletion can promote dramatic tumor stroma modifications leading to tumor dissemination and chemoresistance. Thus, this highlights the importance of targeting stromal cells with caution, and of taking into account that different CAF subpopulations may have fundamentally different or even opposite functions [5], in the regulation of tumor initiation and progression [276].

Instead of CAFs deletion, arose another idea of CAF reprogramming into non-activated or quiescent fibroblasts. TGF β is one of the main factor involved in CAF activation [277]. TGF β pathway inhibition has been evaluated in diverse cancers, demonstrating that CAF activity, proliferation and pro-fibrotic features were disrupted, resulting in cancer regression and enhanced therapeutic sensitivities. In colorectal cancer, as in metastatic urothelial cancer, the blockade of TGF β signaling increased tumor sensitivity to anti-PD-L1 by facilitating T lymphocyte infiltration [278,279]. In PDAC and hepatocellular carcinoma, TGF β inhibition significantly decreased tumor growth and is associated with reduced fibrosis in the tumor microenvironment [280,281]. TGF β antagonists also reduced cancer cell invasiveness and metastasis in colon and colorectal cancer [282,283]. Molecules targeting TGF β signaling such as Trabedersen, Galunisertib, and LY2157299 are, in combination with other therapies, currently in clinical trials in solid cancers including rectal and pancreatic cancer (NCT02688712, NCT00844064, NCT01373164). In PDAC, the all-trans retinoic acid (ATRA), an active metabolite of vitamin A, was shown to restore quiescence of pancreatic fibroblasts (pancreatic stellate cells, PSCs), thereby reducing their ability to generate high traction forces and subsequent force-mediated

ECM remodeling [284]. Such stroma modification resulted in cancer cell invasion inhibition [284], mechanistically through reduced proliferation and increased apoptosis of surrounding pancreatic cancer cells [285], and increased T cell infiltration into tumors, thereby improving animal survival [286]. The vitamin D receptor (VDR) activation (by the VDR ligand calcipotriol, a potent and nonhypercalcemic vitamin D analog) also holds promise in the stromal-reprogramming strategy, as it increases intratumoral gemcitabine delivery, reduces tumor volume and increases mouse survival compared to chemotherapy alone in PDAC [287]. In colorectal cancer, high VDR expression showed protective effects improving patient survival [288]. Thus, ATRA and vitamin D are currently evaluated in clinical trials, in association or not with chemotherapies, for many solid cancers.

The last strategies aimed at “normalizing” the stroma and currently evaluated, consist in targeting either pathways involved in the acquisition of CAF pro-tumoral features, or pro-tumoral pathways induced by CAFs on target cells. Regarding this last strategy, the pharmacologic inhibition of CAF-dependent chemokine signaling involving CXCR4, a receptor of the chemokine CXCL12, is a good example. Hence, treatment of KPC mice (a genetically engineered PDAC mouse model) with a CXCR4 inhibitor promoted T cell recruitment into the tumor, enhancing the efficacy of anti-PD-L1 agents, and drastically reducing PDAC progression [270]. As in PDAC, blocking CXCR4 axis in breast and gastric cancer has anti-tumoral effects. Indeed, it alleviated desmoplasia and improved immunotherapy treatment by enhancing T lymphocyte infiltration in breast cancer [289], and it decreased $\alpha 1$ -integrin-dependent tumor cell invasiveness in gastric cancer [290]. CXCR4 inhibitors are currently evaluated in multiple clinical trials, alone or in combination with other drugs, for solid cancers. Regarding strategies aimed at normalizing the stroma by blocking CAF pro-tumoral features, over multiple examples, we choose to focus on somatostatin analogues and on FAK (Focal Adhesion Kinase) inhibitors. Since CAF-induced cancer progression is mainly dependent on CAF secretion (of proteins such as ECM components, and soluble growth, angiogenic and inflammatory factors), a pharmacological approach aimed at reducing CAF protein synthesis and secretion using somatostatin analogs was recently described as an original and interesting therapeutic strategy. Somatostatin is a natural neuropeptide that transduces an inhibitory signal on the PI3K/mTOR pathway, and thereby on the process of mRNA translation, and also on protein secretion [291]. Treatment of CAFs isolated either from human PDAC [292] or from human pituitary neuroendocrine tumor [293], with the somatostatin analog (SOM230) targeting the somatostatin receptor subtype 1 specifically expressed in CAFs, down-regulated CAF-secreted molecules, including IL6, CSF-1 and CCL2. By inhibiting CAF secretory activity, SOM230 not only abrogated CAF-mediated tumor growth and metastasis in a murine xenografted model of pancreatic cancer [294,295], but also CAF-mediated drug resistance as revealed by the increased survival of KPC mice when co-treated with SOM230 and gemcitabine [292,295]. Importantly, SOM230 normalized the tumor stroma by reducing pancreatic stellate cell activity, tumor-associated macrophage presence, ECM deposits and angiogenesis, altogether leading to a robust decrease in tumor progression and chemoresistance [295].

In vivo pharmacologic FAK inhibitor treatment of various solid cancers resulted in stroma normalization by impacting angiogenesis, immune cell recruitment, CAF activation and ECM production, altogether leading to decreased tumor progression, aggressiveness and chemoresistance [296–307]. Importantly, this kinase, involved in normal fibroblast adhesion and migration, was recently shown to play a key role in CAF-mediated breast and pancreatic tumor progression. Hence, our work showed that a robust FAK activity increase (phosphorylation on tyrosine 397) in CAFs from PDAC patients (compared to fibroblasts from healthy pancreas) is an independent prognosis marker for disease-free and overall survival of PDAC patients. Specific FAK inactivation (kinase

activity inhibition) in CAFs normalized the PDAC stroma *in vivo*, decreasing both fibrosis and immunosuppressive cell accumulation within primary tumors, which led to drastic decrease of tumor spread [308]. Fibroblastic FAK knockout in a breast cancer model also suppressed cancer metastasis *via* a mechanism involving inhibition of tumor cell migration induced by FAK-dependent CAF-secreted exosomes [309]. Previous studies reported that pharmacological FAK inhibition in immunocompetent genetic PDAC (KPC) [307] or PDAC-grafted mouse models [310], decreased tumour-infiltration with immunosuppressive cells, and lengthened animal survival when the FAK inhibitor was combined with immunotherapy [307]. Based on these studies and on the deleterious role of FAK activity in both tumor and stromal (endothelial and fibroblastic) cells [305,308,311], pharmacologic FAK inhibitors are now tested in several clinical trials, in combination with chemotherapies and/or with immunotherapies (NCT02546531, NCT02758587, NCT03287271, NCT04109456). Preliminary results from a phase I study testing defactinib (FAK inhibitor) combined with pembrolizumab (humanized monoclonal antibody directed against PD-1 receptor) and with gemcitabine in PDAC patients showed that the regimen is well tolerated. Importantly, such treatment presents encouraging efficacy in patients with stable disease on front-line gemcitabine/nab-paclitaxel (maintenance cohort: over 10 patients, 10% had partial response, 60% stable disease, and 50% progressive disease) and patients who progressed on at least one line of therapy (refractory cohort: over 10 patients, 50% had stable disease, and 40% progressive disease, 1 not evaluated). PDAC paired biopsies (before and after treatment) revealed a modification of the immune components within the primary tumor with increased proliferative CD8+ lymphocytes and decreased macrophages and stromal density [312], validating the impact of the treatment on PDAC stromal normalization.

4.2. ECM targeting

In addition to CAF targeting, several studies have evaluated the efficacy of targeting, either directly or indirectly, the CAF-secreted ECM, which not only promotes tumor progression but also acts as a barrier to chemotherapies [313,314].

4.2.1. Direct targeting of ECM proteins

The first matrix protein being therapeutically targeted is the hyaluronan (HA), which plays a key role in tumor progression [313]. The use of hyaluronidase (HA degrading enzyme), in osteosarcoma and melanoma mouse models, was shown to promote ECM network degradation and to improve the penetration and distribution into tumors of macromolecules (e.g., FITC-dextran 150 kDa, and small hairpin RNA of PD-L1, respectively) [315,316]. In a high-HA prostate cancer mouse model, the PEGylated recombinant human PH20 hyaluronidase (PEGPH20) treatment induced an antitumor response in monotherapy, and also improving the efficacy of co-administrated chemotherapies (docetaxel and liposomal doxorubicin), probably by facilitating the chemotherapeutic agent accumulation into the primary tumor [317]. In pancreatic cancer, PEGPH20 was shown to decrease tumoral water and interstitial fluid pressure (IFP), leading to tumor vasculature decompression, increased tumor vascular perfusion and enhanced drug delivery [313,314]. Clinical trials were performed based on those encouraging studies. Clinical trial (HALO 109-202, phase 2) evaluating the combination of PEGPH20 with gemcitabine and nab-paclitaxel chemotherapy as first-line therapy in patients with metastatic, shows a progression-free survival significantly improved especially in subgroup of patients with high level of intra-tumoral HA [318]. Based on these promising results, a phase III study of PEGPH20 plus gemcitabine and nab-paclitaxel (compared to gemcitabine and paclitaxel) has been conducted on patients with high tumor HA content (immunohistochemistry pre-screening). Results were disappointing as the overall sur-

vival of patients within the PEGPH20 plus chemotherapy arm was 11.2 months compared to 11.5 months in the chemotherapy arm (HR 1.00, $P = 0.97$), and PFS was 7.1 months in both arms (HR 0.97) [319]. Another study combining PEGPH20 with modified FOLFIRINOX (mFOLFIRINOX) versus mFOLFIRINOX alone (NCT01959139, phase Ib/II) on 138 treatment-naïve patients with metastatic PDAC, revealed a detrimental effect of the PEGPH20 leading to shorter patient overall survival [320]. One important feature to take into account in this disappointing result is that, due to increased toxicity in the PEGPH20 arm, the number of FOLFIRINOX cycles had to be reduced in this arm compared to mFOLFIRINOX alone (median of four cycles versus eight). Nevertheless, four out of 55 patients in the mFOLFIRINOX plus PEGPH20 arm presented a complete response (CR) compared to zero CR in mFOLFIRINOX arm. Altogether, these disappointing results led to PEGPH20 program discontinuation. Nevertheless, better understanding the reason of such failure may allow to propose combination therapies that may benefit from patients. Experts have proposed some very interesting hypotheses [321] that require further investigation.

Besides hyaluronan, collagens are also targetable. Indeed, therapies using collagen-degrading enzymes such as collagenases are currently evaluated in the context of cancer. As drugs have difficulties to reach the tumor because of an elevated interstitial fluid pressure (IFP), the use of collagenases is thought to be a good strategy because these enzymes degrade the ECM and therefore reduce IFP. In human osteosarcoma xenografts, Eikenes's group observed that collagenase-induced IFP reduction led to increased drug uptake (monoclonal antibodies) into the tumor [322]. Similarly, in a melanoma model, the diffusion of a 500 kDa molecule (FITC-dextran) was shown to be 40 times decreased, compared to its diffusion in water. Intratumoral injection of collagenase or cathepsin C (an enzyme degrading decorin) reversed at least partially this phenomenon [323]. However it is important to take into account that degrading the ECM may have adverse effect such as enhanced metastasis for example (for review see [324–326]). Indeed, many publications reported the key role of endogenous collagenases (such as MMP1, 8 and 13) in tumor invasion, leading to the idea that MMPs should be inhibited to improve patient survival [327,328]. Such strategy, consisting in targeting indirectly the ECM, is developed in the next paragraph.

4.2.2. Indirect targeting of ECM proteins

As mentioned, the ECM-remodeling enzymes MMPs appear to be interesting therapeutic targets, since they were described to present multiple pro-tumoral roles, including in tumor spread, angiogenesis and chemoresistance [329]. As these endopeptidases are overexpressed in multiple solid cancers in correlation with poor patient prognosis [330,331], multiple clinical trials were developed to test the increasing therapeutic interest of agents targeting MMPs [328]. Despite promising results in preclinical studies, such as the *in vitro* and *in vivo* inhibitory effect on tumor cell spread of the MMP-9 inhibitor in colorectal cancer [332], clinical trials using MMP inhibitors, e.g., Tanomastat, Prinomastat, Rebimastat) were unsuccessful and mostly stopped in phase III because they showed severe side effects, no improvement of patient survival and no reduction of tumor growth [329]. In order to increase safety and specificity, researchers have developed monoclonal (humanized or not) antibodies directed against specific MMPs. Andecaliximab, a fully humanized antibody against MMP-9, showed anti-tumoral effect in a colorectal cancer preclinical assay [333], and is currently under evaluation in phase II in combination with immunotherapy (NCT02864381) and phase III with chemotherapy (NCT02545504) for gastric or gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma patients. DX-2400, DX-2802 and DX-2712 are three other monoclonal antibodies directed against MMP-14, MMP-9 and MMP-12, respectively, currently evaluated in preclinical cancer models [328,334].

Besides MMPs, heparanase, another enzyme responsible for ECM degradation and remodeling, and found to be upregulated in several tumor types in association with the presence of metastases [335], was considered as an interesting target [336]. The heparanase inhibitor, SST0001, was shown to inhibit tumor cell proliferation and to decrease VEGF, HGF and MMP-9 levels in multiple myeloma [337], to abolish the increased pancreatic cancer cell invasion dependent on radiotherapy-induced heparanase level [338], and to delay sarcoma tumor growth (when administered alone), or even induce a complete regression (in 5 out of 8 mice), when administered in combination with Irinotecan [339]. This inhibitor, also called Roneparstat, was tested in a phase I clinical trial in patients with relapsed/refractory multiple myeloma (NCT01764880). Despite excellent safety and tolerability profiles, Roneparstat showed very modest efficacy [340], and its efficacy in combination with other therapies has to be tested. Necuparanib, a multi-targeting heparan sulfate mimetic (a rationally engineered low-molecular-weight heparin), showed no benefit (no improvement of overall survival) in a randomized multicenter phase II trial (NCT01621243) when combined with gemcitabine/nab-paclitaxel in untreated (first line treatment) metastatic PDAC patients, but when evaluated [341]. Another heparanase inhibitor named Muparfostat (Pi-88) is currently under clinical evaluation (NCT00130442, phase 2) in combination with Dacarbazine in patients with metastatic melanoma.

As a matrix indirect targeting, the inhibition of the Lysyl Oxidases (LOX), proteins responsible for collagen crosslinking and stabilization, has shown mitigated results. LOX inhibition (through β -aminopropionitrile (BAPN) a specific inhibitor of LOX activity) not only reduced collagen crosslinking and fibronectin assembly but also increased drug penetration and re-sensitized tumors to doxorubicin treatment in breast cancer [342], and enhanced sensitivity to radiotherapy in prostate cancer [343]. In PDAC, when given as a single drug at very early time of the disease (in KPC mice), a LOX function-blocking antibody reduced ECM crosslinking and inhibited metastases [344]. The combination between this antibody and gemcitabine prolonged tumor-free survival of KPC mice with early-stage tumors but not with locally advanced tumors (comprising a well-established and already cross-linked matrix) [344], highlighting the fact that therapeutic agents targeting ECM and ECM remodeling may have beneficial effects depending on the tumor stage. However, a recent study, by H. Jiang et al, reported that, in multiple immunocompetent experimental PDAC mouse models, anti-LOXL-2 treatment reduced fibrosis, decreased tissue tension reduction which, in turn, enhanced tumor progression (even in combination with gemcitabine) [345]. Nevertheless, a clinical trial combining a LOX inhibitor (Simtuzumab) with gemcitabine given as a first-line PDAC treatment was initiated but, unfortunately did not improve clinical outcomes maybe due to the metastatic stage of the recruited patient [346]. As for PDAC, combining Simtuzumab with FOLFIRI (leucovorin plus irinotecan and fluorouracil) in patients with metastatic and KRAS mutated colorectal carcinoma did not improve the clinical outcome.

4.2.3. Targeting of ECM-induced intracellular signaling

Other approaches have been developed to target the ECM-induced intracellular signaling [52].

The first strategy consists in targeting the main cellular ECM receptor: the integrins. Different approaches such as the inhibition of integrin function or of its downstream signaling, have been developed in cancer. For example, Cilengitide, an antagonist of the $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$ integrins, inhibited cancer cell proliferation of both primary cultures and cell lines of head and neck squamous cell carcinoma [347]. Endostatin, an endogenous antagonists of angiogenesis and tumor growth, and an $\alpha V\beta 1$ integrin inhibitor, inhibited NF- κB -induced CXCL1 (chemokine ligand 1) expression hemangioendothelioma tumorigenesis inhibition [348]. Moreover, the inactivation of the ECM-induced PI3K/AKT/Snail signaling pathway, induced by the inhibition of collagen- $\alpha 2\beta 1$ integrin binding (using E7820 inhibitor in colorectal cancer, potentiated the efficacy of chemotherapies (oxaliplatin and

5-fluorouracil) (X. Wu et al. 2019). Multiples clinical trials have tested the efficacy of combining chemotherapies with integrin inhibition (e.g., Abituzumab, a humanized monoclonal antibody targeting against integrin αv heterodimers, or Cilengitide, a selective inhibitor of $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ integrins), but none of them improved cancer patient outcomes (in glioblastoma, advanced non-small-cell lung cancer, recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck, or colorectal cancer) (Hecht et al. 2017; Stupp et al. 2014; Vansteenkiste et al. 2015; Élez et al. 2015; Vermorken et al. 2014)).

Matrix modifications and mechanotransduction regulate and are regulated by various proteins (including mechanosensors) and signaling pathways (such as FAK, MMPs, SerpinB2, RhoA, JAK/STAT, YAP/TAZ, CDK4 and PAK). Such proteins, which play a key role in mechano-reciprocity and cancer development, can be targeted to prevent tumor progression [36,307,355–359]. FAK is a key mechanotransduction regulator, controlling both outside/in and inside/out signaling pathways. This mechanosensor is activated upon ECM-induced integrin engagement dependent on ECM modifications such as increased ECM stiffness and pressure for example [360]. As mentioned in the precedent sections, FAK activity is increased in stromal cells in tumors [308], but also in many cancer cells, enhancing tumor cell migration/invasion [361], proliferation and chemoresistance [301,311]. FAK inhibitors are currently tested in more than 20 clinical trials for solid cancers (ovarian, pancreatic, non-small lung, lung, mesothelioma, lymphoma, melanoma, breast...).

ECM modifications also activate the ROCK signaling pathway, which is a key regulator of actomyosin contractility and of cell shape, and thereby controls functions such as cell proliferation, differentiation, motility and adhesion. ROCK1 and ROCK2 expression was shown to be increased in human pancreatic tumors, in correlation with shorter patient survival [362]. ROCK2 activation in non-invasive pancreatic cancer cells promotes their invasiveness in a collagen matrix in association with an increased ECM remodeling [362]. Increased cell contractility also triggers stiffening of the ECM and of the whole tissue [363,364], and transient tissue priming by Fasudil (a ROCK inhibitor) reduced pancreatic cancer fibrosis, thus improving response to gemcitabine/Abraxane at both primary and secondary sites [365,366]. On breast cancer cells, Fasudil inhibited cell migration [367] while it led to a pro-migratory cell phenotype in colon cancer because of an over-activation of the Nav1.5 voltage-gated sodium channel [368]. Altogether, the use of ROCK inhibitors may be promising for anticancer purposes but should be tightly controlled and probably restricted to specific cancers.

4.2.4. New perspectives for ECM as circulatory tool in solid tumor diagnosis

In the last decades, cancer research has focused on the identification, based on histological parameters or gene signatures, of ECM / stroma characteristics that may have diagnostic and/or prognostic significance in most of cancers [369–374]. The tumor stroma is also a potential source of new biomarkers such as molecules generated by the matrix remodeling and released in the bloodstream [80,375]. Therefore, there is now a growing interest in studying such circulating biomarker molecules.

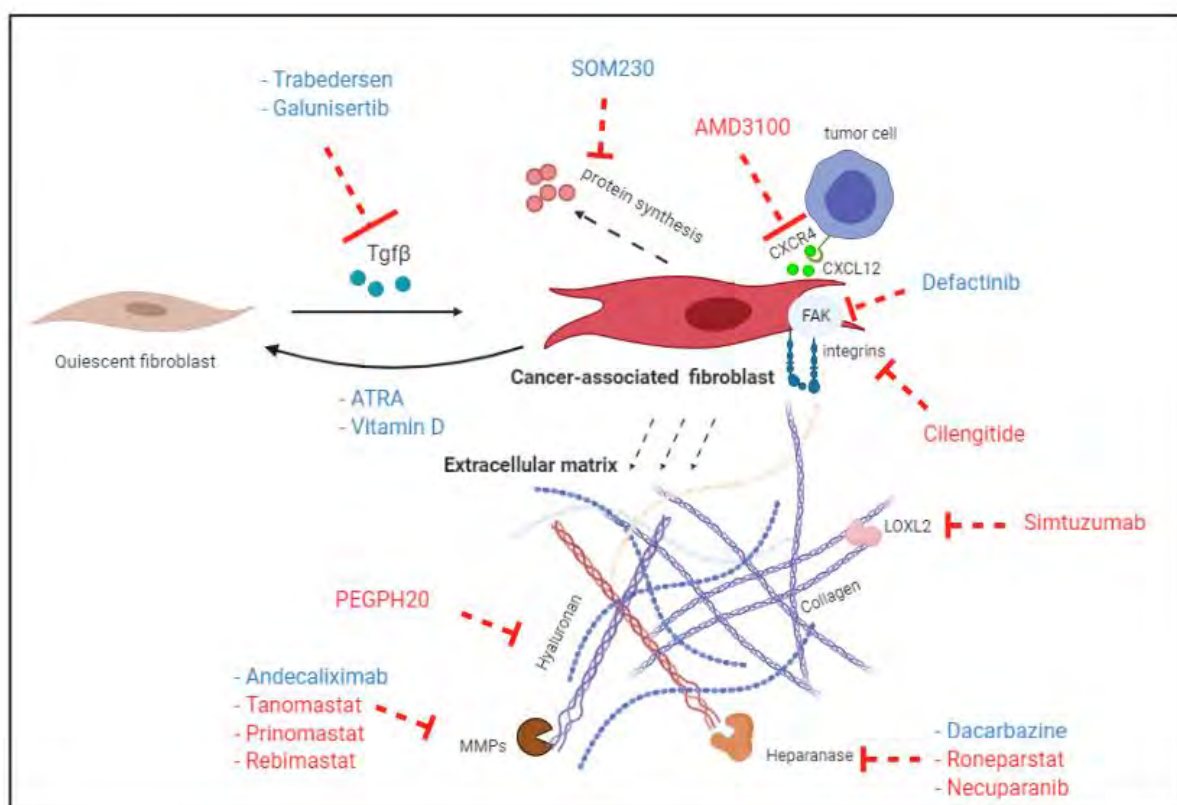
In breast cancer patients, a positive correlation between expression profiles of specific matrix proteins in the tumor and in the blood stream (as quantified by immunohistochemical staining or ELISA, respectively) was shown and differentiation between breast cancer patients and those with a benign disease was possible using the blood markers [376]. Collagens are the main proteins of stromal origin detected in the blood. In particular, collagen IV expression (measured by enzyme immunoassay) is significantly higher in breast cancer patient sera than in healthy donors [377]. Other ECM-derived molecules have been detected in the plasma, such as the cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and fibronectin. In particular, the combined presence of COMP, collagen XI and collagen X in the

blood makes possible to discriminate between patients with breast cancer, healthy donors and patients with benign breast disease [376].

MMP-9 level in patient serum was shown to be significantly higher in colorectal cancer (CRC) patients than in healthy subjects [378–382]. However, MMP-9 proteolytic activity in the serum of patients with adenomas remained systematically in the same range as in healthy subjects, suggesting the interest of this biomarker in differentiating patients with precancerous lesions (adenomas) from those with CRC [380]. Another protein that enabled to distinguish between malignant and non-malignant lesions is the tissue inhibitor of type 1 metalloprotease (TIMP-1), which was shown to be significantly higher in serum from CRC patients than from patients with colorectal adenoma or healthy subjects [381]. The collagens degradation fragments, C1M, C3M and PRO-C3 (from collagen I, III and immature collagen III, respectively) were not only increased in the serum of CRC patients as compared to that of patients with adenomas, but also proved to be discriminating serum biomarkers between the metastatic IV stage and all other stages in CRC [383].

For PDAC, in view of the urgent clinical need for early diagnostic biomarkers, stromal-derived circulating molecules may be of particular interest. Among those, collagens and their degradation fragments were the most frequently identified PDAC diagnostic biomarkers. Hence, a pilot study revealed an increase of MMP-generated collagen I, III and IV fragments in the serum of PDAC patients compared to healthy subjects [80,384]. A panel of MMPs was also analyzed in the serum of PDAC patients, showing that the concentrations of MMP-1, -3, -7, -9, -10 and -12 were increased, and of MMP-2 decreased, in those patients compared to healthy subjects, and that MMP-7 and MMP-12 were discriminating markers [385,386]. A recent study demonstrated that the combination of CA19.9 (a pancreatic tumor-associated antigen used in clinic) with MMP-7 and connective tissue growth factor (CCN2) differentiates PDAC patients from healthy patients [387], whereas a panel composed of CCN2, plasminogen (PGL), fibronectin, collagen IV and CA19.9 distinguishes PDAC patients from patients with chronic pancreatitis [387]. Franklin and colleagues evaluated ECM-derived fragments (type IV collagen and endostatin / type XVIII collagen) and matricellular proteins (OPN and TNC) as biomarkers of PDAC [388], and found that the levels of those four ECM fragments are elevated in the circulation at PDAC diagnosis, compared to healthy patients). In comparison, conventional cancer cell-derived tumor markers (i.e., cancer antigens CA 19.9, CA 125, CEA and TPS (tissue polypeptide specific antigen)), were also found upregulated but their level ranges were broader. Authors concluded that combining both tumor stroma-derived and cancer cell specific proteins might improve the sensitivity and specificity of a diagnosis panel test. Importantly, high levels of a panel of stromal markers (i.e., type IV collagen, endostatin/type XVIII collagen and OPN) were reported, when analyzed in the post-operative setting, as predictive of poor overall survival, while conventional markers were not [388]. Another group also reported a biomarker signature comprising TFPI (plasma tissue factor pathway inhibitors), tenascin C (TNC-FN III-C) and CA 19-9 that significantly improves, compared to CA 19-9 alone, early detection of PDAC (i.e., at a stage amenable to surgical resection of patients [389]. Similarly, immunoassay dosages of TIMP1 and LRG1 (leucin rich alpha 2 glycoprotein) were reported to significantly improve, compared to CA19-9 alone, PDAC detection at an early stage [390].

In conclusion, these studies demonstrated that ECM remodeling is a promising source of new biomarkers in tumor progression. The search for new circulating tumor biomarkers beyond the cancer cell itself is a new non-invasive diagnostic and prognosis approach.



Schematic of stroma key events involved in tumor progression and under investigation in clinical trials. Blue: ongoing clinical trials; red: drugs that failed in clinical trials; ATRA : all-trans retinoic acid; MMPs: matrix metalloproteinases.

5. Conclusion

Cancer is the first or second leading cause of death before the age of 70 years in 112 of 183 countries. Patient survival is dependent on, of course, cancer type, but, less expected, on its own composition. Tumor microenvironment has been shown to influence patient prognosis, but understanding the role of each of its components, in order to target the ones implicated in tumor progression and thus in patient death, is challenging. Not only CAF subpopulations have been identified and appears to have opposite roles but also ECM quantity, quality, organization and stiffness can differentially impact cancer progression. Based on our current knowledge and on scientifically fascinating and clinically promising data, clinical trials targeting either CAFs (activation, acquisition of CAF pro-tumoral features or CAF-induced pro-tumoral pathways) or ECM (direct and indirect targeting of ECM proteins or ECM-induced intracellular signaling pathway) have been developed. Unfortunately, most of them failed and have been discontinued. However, some showed promising results, and, as opposed to strategies aiming at destroying the tumor microenvironment (PEGPH or CAF depletion), those encouraging trials are aimed at reprogramming CAFs into non-activated cells (ATRA or vitamin D), or “normalizing” the stroma by targeting signaling pathways involved in its pro-tumor features (SMO230 or FAK inhibitors).

Importantly, it is now clear that ECM proteins may help for cancer patient diagnosis. Indeed, as a consequence of matrix remodeling in cancer, a high number of ECM proteins and fragments are released in blood and can be used as circulating biomarkers for clinical diagnosis. It could be particularly interesting for very aggressive tumors, often diagnosed at non-resectable advanced stage such as PDAC for example.

Funding: This work was supported by LNCC (Ligue Nationale Contre le Cancer RAB21012BBA), and the French National Institute of Cancer (PCSI2019 and RPT18001BBP). I.B is a recipient of LNCC fellowship (IP/SC16060).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Paget, S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet* **1889**, *133*, 571–573, doi:10.1016/S0140-6736(00)49915-0.
2. Socovich, A.M.; Naba, A. The Cancer Matrisome: From Comprehensive Characterization to Biomarker Discovery. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2019**, *89*, 157–166, doi:10.1016/j.semcdb.2018.06.005.
3. Kalluri, R.; Zeisberg, M. Fibroblasts in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 392–401, doi:10.1038/nrc1877.
4. Öhlund, D.; Elyada, E.; Tuveson, D. Fibroblast Heterogeneity in the Cancer Wound. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 1503–1523, doi:10.1084/jem.20140692.
5. Kalluri, R. The Biology and Function of Fibroblasts in Cancer. *Nat Rev Cancer* **2016**, *16*, 582–98, doi:10.1038/nrc.2016.73.
6. Potenta, S.; Zeisberg, E.; Kalluri, R. The Role of Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Progression. *Br. J. Cancer* **2008**, *99*, 1375–1379, doi:10.1038/sj.bjc.6604662.
7. Kalluri, R.; Weinberg, R.A. The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 1420–1428, doi:10.1172/JCI39104.
8. Kugeratski, F.G.; Atkinson, S.J.; Neilson, L.J.; Lilla, S.; Knight, J.R.P.; Serneels, J.; Juin, A.; Ismail, S.; Bryant, D.M.; Markert, E.K.; et al. Hypoxic Cancer-Associated Fibroblasts Increase NCBP2-AS2/HIAR to Promote Endothelial Sprouting through Enhanced VEGF Signaling. *Sci. Signal.* **2019**, *12*, doi:10.1126/scisignal.aan8247.
9. Chan, J.S.K.; Tan, M.J.; Sng, M.K.; Teo, Z.; Phua, T.; Choo, C.C.; Li, L.; Zhu, P.; Tan, N.S. Cancer-Associated Fibroblasts Enact Field Cancerization by Promoting Extratumoral Oxidative Stress. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2562, doi:10.1038/cddis.2016.492.
10. Casey, T.M.; Eneman, J.; Crocker, A.; White, J.; Tessitore, J.; Stanley, M.; Harlow, S.; Bunn, J.Y.; Weaver, D.; Muss, H.; et al. Cancer Associated Fibroblasts Stimulated by Transforming Growth Factor Beta1 (TGF-Beta 1) Increase Invasion Rate of Tumor Cells: A Population Study. *Breast Cancer Res. Treat.* **2008**, *110*, 39–49, doi:10.1007/s10549-007-9684-7.
11. Rizvi, S.; Mertens, J.C.; Bronk, S.F.; Hirsova, P.; Dai, H.; Roberts, L.R.; Kaufmann, S.H.; Gores, G.J. Platelet-Derived Growth Factor Primes Cancer-Associated Fibroblasts for Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 22835–22849, doi:10.1074/jbc.M114.563064.
12. Bordignon, P.; Bottoni, G.; Xu, X.; Popescu, A.S.; Truan, Z.; Guenova, E.; Kofler, L.; Jafari, P.; Ostano, P.; Röcken, M.; et al. Dualism of FGF and TGF- β Signaling in Heterogeneous Cancer-Associated Fibroblast Activation with ETV1 as a Critical Determinant. *Cell Rep.* **2019**, *28*, 2358–2372.e6, doi:10.1016/j.celrep.2019.07.092.
13. Yauch, R.L.; Gould, S.E.; Scales, S.J.; Tang, T.; Tian, H.; Ahn, C.P.; Marshall, D.; Fu, L.; Januario, T.; Kallop, D.; et al. A Paracrine Requirement for Hedgehog Signalling in Cancer. *Nature* **2008**, *455*, 406–410, doi:10.1038/nature07275.
14. Kollmannsberger, P.; Bidan, C.M.; Dunlop, J.W.C.; Fratzl, P.; Vogel, V. Tensile Forces Drive a Reversible Fibroblast-to-Myofibroblast Transition during Tissue Growth in Engineered Clefts. *Sci. Adv.* **2018**, *4*, eaao4881, doi:10.1126/sciadv.aao4881.
15. Provenzano, P.P.; Keely, P.J. Mechanical Signaling through the Cytoskeleton Regulates Cell Proliferation by Coordinated Focal Adhesion and Rho GTPase Signaling. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 1195–1205, doi:10.1242/jcs.067009.
16. Gaggioli, C.; Hooper, S.; Hidalgo-Carcedo, C.; Grosse, R.; Marshall, J.F.; Harrington, K.; Sahai, E. Fibroblast-Led Collective Invasion of Carcinoma Cells with Differing Roles for RhoGTPases in Leading and Following Cells. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 1392–1400, doi:10.1038/ncb1658.

17. Jang, I.; Beningo, K.A. Integrins, CAFs and Mechanical Forces in the Progression of Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11050721. 1060
18. Leight, J.L.; Drain, A.P.; Weaver, V.M. Extracellular Matrix Remodeling and Stiffening Modulate Tumor Phenotype and Treatment Response. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2017**, *1*, 313–334, doi:10.1146/annurev-cancerbio-050216-034431. 1061
19. Pickup, M.W.; Mouw, J.K.; Weaver, V.M. The Extracellular Matrix Modulates the Hallmarks of Cancer. *EMBO Rep* **2014**, *15*, 1243–53, doi:10.15252/embr.201439246. 1062
20. Cox, T.R.; Erler, J.T. Remodeling and Homeostasis of the Extracellular Matrix: Implications for Fibrotic Diseases and Cancer. *Dis. Model. Mech.* **2011**, *4*, 165–178, doi:10.1242/dmm.004077. 1063
21. Barbazán, J.; Matic Vignjevic, D. Cancer Associated Fibroblasts: Is the Force the Path to the Dark Side? *Curr. Opin. Cell Biol.* **2019**, *56*, 71–79, doi:10.1016/j.ceb.2018.09.002. 1064
22. Orimo, A.; Gupta, P.B.; Sgroi, D.C.; Arenzana-Seisdedos, F.; Delaunay, T.; Naeem, R.; Carey, V.J.; Richardson, A.L.; Weinberg, R.A. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell* **2005**, *121*, 335–348, doi:10.1016/j.cell.2005.02.034. 1065
23. Kraman, M.; Bambrough, P.J.; Arnold, J.N.; Roberts, E.W.; Magiera, L.; Jones, J.O.; Gopinathan, A.; Tuveson, D.A.; Fearon, D.T. Suppression of Antitumor Immunity by Stromal Cells Expressing Fibroblast Activation Protein-Alpha. *Science* **2010**, *330*, 827–830, doi:10.1126/science.1195300. 1066
24. Bartoschek, M.; Oskolkov, N.; Bocci, M.; Lötvot, J.; Larsson, C.; Sommarin, M.; Madsen, C.D.; Lindgren, D.; Pekar, G.; Karlsson, G.; et al. Spatially and Functionally Distinct Subclasses of Breast Cancer-Associated Fibroblasts Revealed by Single Cell RNA Sequencing. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–13, doi:10.1038/s41467-018-07582-3. 1067
25. Givel, A.-M.; Kieffer, Y.; Scholer-Dahirel, A.; Sirven, P.; Cardon, M.; Pelon, F.; Magagna, I.; Gentric, G.; Costa, A.; Bonneau, C.; et al. MiR200-Regulated CXCL12 β Promotes Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppression in Ovarian Cancers. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1056, doi:10.1038/s41467-018-03348-z. 1068
26. Costa, A.; Kieffer, Y.; Scholer-Dahirel, A.; Pelon, F.; Bourachot, B.; Cardon, M.; Sirven, P.; Magagna, I.; Fuhrmann, L.; Bernard, C.; et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 463–479.e10, doi:10.1016/j.ccell.2018.01.011. 1069
27. Takahashi, Y.; Ishii, G.; Taira, T.; Fujii, S.; Yanagi, S.; Hishida, T.; Yoshida, J.; Nishimura, M.; Nomori, H.; Nagai, K.; et al. Fibrous Stroma Is Associated with Poorer Prognosis in Lung Squamous Cell Carcinoma Patients. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **2011**, *6*, 1460–1467, doi:10.1097/JTO.0b013e318229189d. 1070
28. Minami, Y.; Matsuno, Y.; Iijima, T.; Morishita, Y.; Onizuka, M.; Sakakibara, Y.; Noguchi, M. Prognostication of Small-Sized Primary Pulmonary Adenocarcinomas by Histopathological and Karyometric Analysis. *Lung Cancer Amst. Neth.* **2005**, *48*, 339–348, doi:10.1016/j.lungcan.2004.11.016. 1071
29. Hao, J.; Zeltz, C.; Pintilie, M.; Li, Q.; Sakashita, S.; Wang, T.; Cabanero, M.; Martins-Filho, S.N.; Wang, D.Y.; Pasko, E.; et al. Characterization of Distinct Populations of Carcinoma-Associated Fibroblasts from Non-Small Cell Lung Carcinoma Reveals a Role for ST8SIA2 in Cancer Cell Invasion. *Neoplasia N. Y. N* **2019**, *21*, 482–493, doi:10.1016/j.neo.2019.03.009. 1072
30. Öhlund, D.; Handly-Santana, A.; Biffi, G.; Elyada, E.; Almeida, A.S.; Ponz-Sarvise, M.; Corbo, V.; Oni, T.E.; Hearn, S.A.; Lee, E.J.; et al. Distinct Populations of Inflammatory Fibroblasts and Myofibroblasts in Pancreatic Cancer. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 579–596, doi:10.1084/jem.20162024. 1073
31. Erkan, M.; Michalski, C.W.; Rieder, S.; Reiser-Erkan, C.; Abiatari, I.; Kolb, A.; Giese, N.A.; Esposito, I.; Friess, H.; Kleeff, J. The Activated Stroma Index Is a Novel and Independent Prognostic Marker in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **2008**, *6*, 1155–1161, doi:10.1016/j.cgh.2008.05.006. 1074
32. Erkan, M.; Reiser-Erkan, C.; Michalski, C.W.; Kong, B.; Esposito, I.; Friess, H.; Kleeff, J. The Impact of the Activated Stroma on Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Biology and Therapy Resistance. *Curr Mol Med* **2012**, *12*, 288–303. 1075

33. Erkan, M.; Hausmann, S.; Michalski, C.W.; Fingerle, A.A.; Dobritz, M.; Kleeff, J.; Friess, H. The Role of Stroma in Pancreatic Cancer: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *9*, 454–467, doi:10.1038/nrgastro.2012.115.
34. Bever, K.M.; Sugar, E.A.; Bigelow, E.; Sharma, R.; Laheru, D.; Wolfgang, C.L.; Jaffee, E.M.; Anders, R.A.; De Jesus-Acosta, A.; Zheng, L. The Prognostic Value of Stroma in Pancreatic Cancer in Patients Receiving Adjuvant Therapy. *HPB* **2015**, *17*, 292–298, doi:10.1111/hpb.12334.
35. Chen, Y.; Kim, J.; Yang, S.; Wang, H.; Wu, C.-J.; Sugimoto, H.; LeBleu, V.S.; Kalluri, R. Type I Collagen Deletion in ASMA+ Myofibroblasts Augments Immune Suppression and Accelerates Progression of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **2021**, *39*, 548–565.e6, doi:10.1016/j.ccell.2021.02.007.
36. Laklai, H.; Miroshnikova, Y.A.; Pickup, M.W.; Collisson, E.A.; Kim, G.E.; Barrett, A.S.; Hill, R.C.; Lakins, J.N.; Schlaepfer, D.D.; Mouw, J.K.; et al. Genotype Tunes Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Tissue Tension to Induce Matricellular Fibrosis and Tumor Progression. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 497–505, doi:10.1038/nm.4082.
37. Drifka, C.R.; Loeffler, A.G.; Mathewson, K.; Keikhosravi, A.; Eickhoff, J.C.; Liu, Y.; Weber, S.M.; Kao, W.J.; Eliceiri, K.W. Highly Aligned Stromal Collagen Is a Negative Prognostic Factor Following Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Resection. *Oncotarget* **2016**, *7*, 76197–76213, doi:10.18632/oncotarget.12772.
38. Moffitt, R.A.; Marayati, R.; Flate, E.L.; Volmar, K.E.; Loeza, S.G.H.; Hoadley, K.A.; Rashid, N.U.; Williams, L.A.; Eaton, S.C.; Chung, A.H.; et al. Virtual Microdissection Identifies Distinct Tumor- and Stroma-Specific Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 1168–1178, doi:10.1038/ng.3398.
39. Pelon, F.; Bourachot, B.; Kieffer, Y.; Magagna, I.; Mermet-Meillon, F.; Bonnet, I.; Costa, A.; Givel, A.-M.; Attieh, Y.; Barbazan, J.; et al. Cancer-Associated Fibroblast Heterogeneity in Axillary Lymph Nodes Drives Metastases in Breast Cancer through Complementary Mechanisms. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–20, doi:10.1038/s41467-019-14134-w.
40. Ohlund, D.; Handly-Santana, A.; Biffi, G.; Elyada, E.; Almeida, A.S.; Ponz-Sarvise, M.; Corbo, V.; Oni, T.E.; Hearn, S.A.; Lee, E.J.; et al. Distinct Populations of Inflammatory Fibroblasts and Myofibroblasts in Pancreatic Cancer. *J Exp Med* **2017**, *214*, 579–596, doi:10.1084/jem.20162024.
41. Neuzillet, C.; Tijeras-Raballand, A.; Ragulan, C.; Cros, J.; Patil, Y.; Martinet, M.; Erkan, M.; Kleeff, J.; Wilson, J.; Apte, M.; et al. Inter- and Intra-Tumoural Heterogeneity in Cancer-Associated Fibroblasts of Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Pathol* **2019**, *248*, 51–65, doi:10.1002/path.5224.
42. Hosein, A.N.; Huang, H.; Wang, Z.; Parmar, K.; Du, W.; Huang, J.; Maitra, A.; Olson, E.; Verma, U.; Brekken, R.A. Cellular Heterogeneity during Mouse Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression at Single-Cell Resolution. *JCI Insight* **2019**, *4*, e129212, doi:10.1172/jci.insight.129212.
43. Elyada, E.; Bolisetty, M.; Laise, P.; Flynn, W.F.; Courtois, E.T.; Burkhart, R.A.; Teinor, J.A.; Belleau, P.; Biffi, G.; Lucito, M.S.; et al. Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 1102–1123, doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0094.
44. Dominguez, C.X.; Müller, S.; Keerthivasan, S.; Koeppen, H.; Hung, J.; Gierke, S.; Breart, B.; Foreman, O.; Bainbridge, T.W.; Castiglioni, A.; et al. Single-Cell RNA Sequencing Reveals Stromal Evolution into LRRC15+ Myofibroblasts as a Determinant of Patient Response to Cancer Immunotherapy. *Cancer Discov.* **2020**, *10*, 232–253, doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0644.
45. Choi, S.-Y.; Sung, R.; Lee, S.-J.; Lee, T.-G.; Kim, N.; Yoon, S.M.; Lee, E.J.; Chae, H.B.; Youn, S.J.; Park, S.M. Podoplanin, α -Smooth Muscle Actin or S100A4 Expressing Cancer-Associated Fibroblasts Are Associated with Different Prognosis in Colorectal Cancers. *J. Korean Med. Sci.* **2013**, *28*, 1293–1301, doi:10.3346/jkms.2013.28.9.1293.
46. Walker, C.; Mojares, E.; Del Río Hernández, A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19103028.
47. Hynes, R.O.; Naba, A. Overview of the Matrisome—an Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a004903, doi:10.1101/cshperspect.a004903.

48. Naba, A.; Clauser, K.R.; Hoersch, S.; Liu, H.; Carr, S.A.; Hynes, R.O. The Matrisome: In Silico Definition and in Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2012**, *11*, M111.014647, doi:10.1074/mcp.M111.014647.
49. Mouw, J.K.; Ou, G.; Weaver, V.M. Extracellular Matrix Assembly: A Multiscale Deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 771–785, doi:10.1038/nrm3902.
50. Rozario, T.; DeSimone, D.W. The Extracellular Matrix in Development and Morphogenesis: A Dynamic View. *Dev. Biol.* **2010**, *341*, 126–140, doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.026.
51. Charras, G.; Sahai, E. Physical Influences of the Extracellular Environment on Cell Migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 813–824, doi:10.1038/nrm3897.
52. Hastings, J.F.; Skhinas, J.N.; Fey, D.; Croucher, D.R.; Cox, T.R. The Extracellular Matrix as a Key Regulator of Intracellular Signalling Networks. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 82–92, doi:10.1111/bph.14195.
53. Hynes, R.O. Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science* **2009**, *326*, 1216–1219, doi:10.1126/science.1176009.
54. Bonnans, C.; Chou, J.; Werb, Z. Remodelling the Extracellular Matrix in Development and Disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 786–801, doi:10.1038/nrm3904.
55. Lu, P.; Takai, K.; Weaver, V.M.; Werb, Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, doi:10.1101/cshperspect.a005058.
56. Iozzo, R.V.; Gubbiotti, M.A. Extracellular Matrix: The Driving Force of Mammalian Diseases. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2018**, *71–72*, 1–9, doi:10.1016/j.matbio.2018.03.023.
57. Kaukonen, R.; Jacquemet, G.; Hamidi, H.; Ivaska, J. Cell-Derived Matrices for Studying Cell Proliferation and Directional Migration in a Complex 3D Microenvironment. *Nat Protoc* **2017**, *12*, 2376–2390, doi:10.1038/nprot.2017.107.
58. Theocharis, A.D.; Karamanos, N.K. Proteoglycans Remodeling in Cancer: Underlying Molecular Mechanisms. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2019**, *75–76*, 220–259, doi:10.1016/j.matbio.2017.10.008.
59. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
60. Oskarsson, T. Extracellular Matrix Components in Breast Cancer Progression and Metastasis. *Breast Edinb. Scotl.* **2013**, *22 Suppl 2*, S66–72, doi:10.1016/j.breast.2013.07.012.
61. Høye, A.M.; Erler, J.T. Structural ECM Components in the Premetastatic and Metastatic Niche. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2016**, *310*, C955–967, doi:10.1152/ajpcell.00326.2015.
62. Xie, D.; Xie, K. Pancreatic Cancer Stromal Biology and Therapy. *Genes Dis.* **2015**, *2*, 133–143, doi:10.1016/j.gendis.2015.01.002.
63. Au, J.L.-S.; Yeung, B.Z.; Wientjes, M.G.; Lu, Z.; Wientjes, M.G. Delivery of Cancer Therapeutics to Extracellular and Intracellular Targets: Determinants, Barriers, Challenges and Opportunities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *97*, 280–301, doi:10.1016/j.addr.2015.12.002.
64. Beck, A.H.; Sangoi, A.R.; Leung, S.; Marinelli, R.J.; Nielsen, T.O.; van de Vijver, M.J.; West, R.B.; van de Rijn, M.; Koller, D. Systematic Analysis of Breast Cancer Morphology Uncovers Stromal Features Associated with Survival. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 108ra113, doi:10.1126/scitranslmed.3002564.
65. Park, J.; Yoon, J. Schizandrin Inhibits Fibrosis and Epithelial-Mesenchymal Transition in Transforming Growth Factor-B1-Stimulated AML12 Cells. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *25*, 276–284, doi:10.1016/j.intimp.2015.02.014.
66. Ahn, S.G.; Dong, S.M.; Oshima, A.; Kim, W.H.; Lee, H.M.; Lee, S.A.; Kwon, S.-H.; Lee, J.-H.; Lee, J.M.; Jeong, J.; et al. LOXL2 Expression Is Associated with Invasiveness and Negatively Influences Survival in Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *141*, 89–99, doi:10.1007/s10549-013-2662-3.
67. Huijbers, A.; Tollenaar, R. a. E.M.; v Pelt, G.W.; Zeestraten, E.C.M.; Dutton, S.; McConkey, C.C.; Domingo, E.; Smit, V.T.H.B.M.; Midgley, R.; Warren, B.F.; et al. The Proportion of Tumor-Stroma as a Strong Prognosticator for Stage II and III Colon Cancer Patients: Validation in the VICTOR Trial. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2013**, *24*, 179–185, doi:10.1093/annonc/mds246.

68. Imamura, T.; Manabe, T.; Ohshio, G.; Wang, Z.; Yamaki, K.; Yoshimura, T.; Suwa, H.; Imamura, M. Immunohistochemical Staining for Type IV Collagen and Laminin in the Stroma of Human Pancreatic Cancer. *Int. J. Pancreatol.* **1995**, *18*, 95–99, doi:10.1007/BF02785882.
69. Mollenhauer, J.; Roether, I.; Kern, H.F. Distribution of Extracellular Matrix Proteins in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Influence on Tumor Cell Proliferation in Vitro. *Pancreas* **1987**, *2*, 14–24, doi:10.1097/00006676-198701000-00003.
70. Linder, S.; Castaños-Velez, E.; von Rosen, A.; Biberfeld, P. Immunohistochemical Expression of Extracellular Matrix Proteins and Adhesion Molecules in Pancreatic Carcinoma. *Hepatogastroenterology*. **2001**, *48*, 1321–1327.
71. Whatcott, C.J.; Diep, C.H.; Jiang, P.; Watanabe, A.; LoBello, J.; Sima, C.; Hostetter, G.; Shepard, H.M.; Von Hoff, D.D.; Han, H. Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2015**, *21*, 3561–3568, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1051.
72. Insua-Rodríguez, J.; Oskarsson, T. The Extracellular Matrix in Breast Cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *97*, 41–55, doi:10.1016/j.addr.2015.12.017.
73. Badaoui, M.; Mimsy-Julienne, C.; Saby, C.; Van Gulick, L.; Peretti, M.; Jeannesson, P.; Morjani, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Collagen Type 1 Promotes Survival of Human Breast Cancer Cells by Overexpressing Kv10.1 Potassium and Orai1 Calcium Channels through DDR1-Dependent Pathway. *Oncotarget* **2017**, *9*, 24653–24671, doi:10.18632/oncotarget.19065.
74. Kauppila, S.; Stenbäck, F.; Risteli, J.; Jukkola, A.; Risteli, L. Aberrant Type I and Type III Collagen Gene Expression in Human Breast Cancer in Vivo. *J. Pathol.* **1998**, *186*, 262–268, doi:10.1002/(SICI)1096-9896(1998110)186:3<262::AID-PATH191>3.0.CO;2-3.
75. Liu, J.; Shen, J.-X.; Wu, H.-T.; Li, X.-L.; Wen, X.-F.; Du, C.-W.; Zhang, G.-J. Collagen 1A1 (COL1A1) Promotes Metastasis of Breast Cancer and Is a Potential Therapeutic Target. *Discov. Med.* **2018**, *25*, 211–223.
76. Armstrong, T.; Packham, G.; Murphy, L.B.; Bateman, A.C.; Conti, J.A.; Fine, D.R.; Johnson, C.D.; Benyon, R.C.; Iredale, J.P. Type I Collagen Promotes the Malignant Phenotype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7427–7437, doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0825.
77. Barrett, A.S. Compartment Resolved Proteomics Reveals a Dynamic Matrisome in a Biomechanically Driven Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Immunol. Regen. Med.* **2018**, *1*, 67–75, doi:10.1016/j.regen.2018.03.002.
78. Ryschich, E.; Khamidjanov, A.; Kerkadze, V.; Büchler, M.W.; Zöller, M.; Schmidt, J. Promotion of Tumor Cell Migration by Extracellular Matrix Proteins in Human Pancreatic Cancer. *Pancreas* **2009**, *38*, 804–810, doi:10.1097/MPA.0b013e3181b9dfda.
79. Lochter, A.; Bissell, M.J. Involvement of Extracellular Matrix Constituents in Breast Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **1995**, *6*, 165–173, doi:10.1006/scbi.1995.0017.
80. Willumsen, N.; Bager, C.L.; Leeming, D.J.; Smith, V.; Karsdal, M.A.; Dornan, D.; Bay-Jensen, A.-C. Extracellular Matrix Specific Protein Fingerprints Measured in Serum Can Separate Pancreatic Cancer Patients from Healthy Controls. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 554, doi:10.1186/1471-2407-13-554.
81. Takei, H.; Iino, Y.; Horiguchi, J.; Yokoe, T. Immunohistochemical Fibronectin Staining Pattern and Prognosis in Invasive Breast Carcinoma. *Oncology* **1995**, *52*, 106–111, doi:10.1159/000227439.
82. Lin, T.-C.; Yang, C.-H.; Cheng, L.-H.; Chang, W.-T.; Lin, Y.-R.; Cheng, H.-C. Fibronectin in Cancer: Friend or Foe. *Cells* **2019**, *9*, doi:10.3390/cells9010027.
83. Bae, Y.K.; Kim, A.; Kim, M.K.; Choi, J.E.; Kang, S.H.; Lee, S.J. Fibronectin Expression in Carcinoma Cells Correlates with Tumor Aggressiveness and Poor Clinical Outcome in Patients with Invasive Breast Cancer. *Hum. Pathol.* **2013**, *44*, 2028–2037, doi:10.1016/j.humpath.2013.03.006.
84. Yao, H.; Zeng, Z.-Z.; Fay, K.S.; Veine, D.M.; Staszewski, E.D.; Morgan, M.; Wilder-Romans, K.; Williams, T.M.; Spalding, A.C.; Ben-Josef, E.; et al. Role of $\alpha(5)\beta(1)$ Integrin Up-Regulation in Radiation-Induced Invasion by Human Pancreatic Cancer Cells. *Transl. Oncol.* **2011**, *4*, 282–292, doi:10.1593/tlo.11133.

85. Chen, R.; Pan, S.; Ottenhof, N.A.; de Wilde, R.F.; Wolfgang, C.L.; Lane, Z.; Post, J.; Bronner, M.P.; Willmann, J.K.; Maitra, A.; et al. Stromal Galectin-1 Expression Is Associated with Long-Term Survival in Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, *13*, 899–907, doi:10.4161/cbt.20842. 1227–1229
86. Chen, R.; Dawson, D.W.; Pan, S.; Ottenhof, N.A.; de Wilde, R.F.; Wolfgang, C.L.; May, D.H.; Crispin, D.A.; Lai, L.A.; Lay, A.R.; et al. Proteins Associated with Pancreatic Cancer Survival in Patients with Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **2015**, *95*, 43–55, doi:10.1038/labinvest.2014.128. 1230–1232
87. Astorgues-Xerri, L.; Riveiro, M.E.; Tijeras-Raballand, A.; Serova, M.; Neuzillet, C.; Albert, S.; Raymond, E.; Faivre, S. Unraveling Galectin-1 as a Novel Therapeutic Target for Cancer. *Cancer Treat. Rev.* **2014**, *40*, 307–319, doi:10.1016/j.ctrv.2013.07.007. 1233–1234
88. Kailemia, M.J.; Park, D.; Lebrilla, C.B. Glycans and Glycoproteins as Specific Biomarkers for Cancer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 395–410, doi:10.1007/s00216-016-9880-6. 1235–1236
89. Delpech, B.; Chevallier, B.; Reinhardt, N.; Julien, J.-P.; Duval, C.; Maingonnat, C.; Bastit, P.; Asselain, B. Serum Hyaluronan (Hyaluronic Acid) in Breast Cancer Patients. *Int. J. Cancer* **1990**, *46*, 388–390, doi:10.1002/ijc.2910460309. 1237–1238
90. Schwertfeger, K.L.; Cowman, M.K.; Telmer, P.G.; Turley, E.A.; McCarthy, J.B. Hyaluronan, Inflammation, and Breast Cancer Progression. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 236, doi:10.3389/fimmu.2015.00236. 1239–1240
91. Schmaus, A.; Sleeman, J.P. Hyaluronidase-1 Expression Promotes Lung Metastasis in Syngeneic Mouse Tumor Models without Affecting Accumulation of Small Hyaluronan Oligosaccharides in Tumor Interstitial Fluid. *Glycobiology* **2015**, *25*, 258–268, doi:10.1093/glycob/cwu106. 1241–1243
92. Olive, K.P.; Jacobetz, M.A.; Davidson, C.J.; Gopinathan, A.; McIntyre, D.; Honess, D.; Madhu, B.; Goldgraben, M.A.; Caldwell, M.E.; Allard, D.; et al. Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science* **2009**, *324*, 1457–1461, doi:10.1126/science.1171362. 1244–1246
93. Jimeno, A.; Weiss, G.J.; Miller, W.H.; Gettinger, S.; Eigl, B.J.C.; Chang, A.L.S.; Dunbar, J.; Devens, S.; Faia, K.; Skliris, G.; et al. Phase I Study of the Hedgehog Pathway Inhibitor IPI-926 in Adult Patients with Solid Tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2013**, *19*, 2766–2774, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3654. 1247–1249
94. Rhim, A.D.; Oberstein, P.E.; Thomas, D.H.; Mirek, E.T.; Palermo, C.F.; Sastra, S.A.; Dekleva, E.N.; Saunders, T.; Becerra, C.P.; Tattersall, I.W.; et al. Stromal Elements Act to Restrain, Rather than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 735–747, doi:10.1016/j.ccr.2014.04.021. 1250–1252
95. Moreno-Layseca, P.; Streuli, C.H. Signalling Pathways Linking Integrins with Cell Cycle Progression. *Matrix Biol.* **2014**, *34*, 144–153, doi:10.1016/j.matbio.2013.10.011. 1253–1254
96. Nissen, N.I.; Karsdal, M.; Willumsen, N. Collagens and Cancer Associated Fibroblasts in the Reactive Stroma and Its Relation to Cancer Biology. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **2019**, *38*, 115, doi:10.1186/s13046-019-1110-6. 1255–1256
97. Li, A.; Zhou, T.; Guo, L.; Si, J. Collagen Type I Regulates Beta-Catenin Tyrosine Phosphorylation and Nuclear Translocation to Promote Migration and Proliferation of Gastric Carcinoma Cells. *Oncol. Rep.* **2010**, *23*, 1247–1255, doi:10.3892/or_00000757. 1257–1258
98. Owusu-Ansah, K.G.; Song, G.; Chen, R.; Edo, M.I.A.; Li, J.; Chen, B.; Wu, J.; Zhou, L.; Xie, H.; Jiang, D.; et al. COL6A1 Promotes Metastasis and Predicts Poor Prognosis in Patients with Pancreatic Cancer. *Int. J. Oncol.* **2019**, *55*, 391–404, doi:10.3892/ijo.2019.4825. 1259–1260
99. Karousou, E.; D'Angelo, M.L.; Kouvidi, K.; Vigetti, D.; Viola, M.; Nikitovic, D.; De Luca, G.; Passi, A. Collagen VI and Hyaluronan: The Common Role in Breast Cancer. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 606458, doi:10.1155/2014/606458. 1261–1262
100. Iyengar, P.; Espina, V.; Williams, T.W.; Lin, Y.; Berry, D.; Jelicks, L.A.; Lee, H.; Temple, K.; Graves, R.; Pollard, J.; et al. Adipocyte-Derived Collagen VI Affects Early Mammary Tumor Progression in Vivo, Demonstrating a Critical Interaction in the Tumor/Stroma Microenvironment. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1163–1176, doi:10.1172/JCI23424. 1263–1265
101. Barsky, S.H.; Green, W.R.; Grotendorst, G.R.; Liotta, L.A. Desmoplastic Breast Carcinoma as a Source of Human Myofibroblasts. *Am J Pathol* **1984**, *115*, 329–33. 1266–1267

102. Ren, W.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Lin, Q.; Zhang, J.; Xu, G. Overexpression of Collagen Type V A1 Chain in Human Breast Invasive Ductal Carcinoma Is Mediated by TGF- β 1. *Int. J. Oncol.* **2018**, *52*, 1694–1704, doi:10.3892/ijo.2018.4317. 1268 1269
103. Huang, G.; Ge, G.; Izzi, V.; Greenspan, D.S. A3 Chains of Type V Collagen Regulate Breast Tumour Growth via Glypican-1. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, doi:10.1038/ncomms14351. 1270 1271
104. Levental, K.R.; Yu, H.; Kass, L.; Lakins, J.N.; Egeblad, M.; Erler, J.T.; Fong, S.F.; Csiszar, K.; Giaccia, A.; Weninger, W.; et al. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell* **2009**, *139*, 891–906, doi:10.1016/j.cell.2009.10.027. 1272 1273
105. Kirschmann, D.A.; Seftor, E.A.; Fong, S.F.T.; Nieva, D.R.C.; Sullivan, C.M.; Edwards, E.M.; Sommer, P.; Csiszar, K.; Hendrix, M.J.C. A Molecular Role for Lysyl Oxidase in Breast Cancer Invasion. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4478–4483. 1274 1275
106. Cox, T.R.; Bird, D.; Baker, A.-M.; Barker, H.E.; Ho, M.W.-Y.; Lang, G.; Erler, J.T. LOX-Mediated Collagen Crosslinking Is Responsible for Fibrosis-Enhanced Metastasis. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1721–1732, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2233. 1276 1277
107. Kaukonen, R.; Mai, A.; Georgiadou, M.; Saari, M.; De Franceschi, N.; Betz, T.; Sihto, H.; Ventelä, S.; Elo, L.; Jokitalo, E.; et al. Normal Stroma Suppresses Cancer Cell Proliferation via Mechanosensitive Regulation of JMJD1a-Mediated Transcription. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12237, doi:10.1038/ncomms12237. 1278 1279 1280
108. Mohammadi, H.; Sahai, E. Mechanisms and Impact of Altered Tumour Mechanics. *Nat. Cell Biol.* **2018**, *20*, 766–774, doi:10.1038/s41556-018-0131-2. 1281 1282
109. Rodriguez-Pascual, F.; Slatter, D.A. Collagen Cross-Linking: Insights on the Evolution of Metazoan Extracellular Matrix. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37374, doi:10.1038/srep37374. 1283 1284
110. Erler, J.T.; Weaver, V.M. Three-Dimensional Context Regulation of Metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2009**, *26*, 35–49, doi:10.1007/s10585-008-9209-8. 1285 1286
111. Boyle, S.T.; Samuel, M.S. Mechano-Reciprocity Is Maintained between Physiological Boundaries by Tuning Signal Flux through the Rho-Associated Protein Kinase. *Small GTPases* **2016**, *7*, 139–146, doi:10.1080/21541248.2016.1173771. 1287 1288
112. Samuel, M.S.; Lopez, J.I.; McGhee, E.J.; Croft, D.R.; Strachan, D.; Timpson, P.; Munro, J.; Schröder, E.; Zhou, J.; Brunton, V.G.; et al. Actomyosin-Mediated Cellular Tension Drives Increased Tissue Stiffness and β -Catenin Activation to Induce Interfollicular Epidermal Hyperplasia and Tumor Growth. *Cancer Cell* **2011**, *19*, 776–791, doi:10.1016/j.ccr.2011.05.008. 1289 1290 1291
113. Yi, W.; Xiao, E.; Ding, R.; Luo, P.; Yang, Y. High Expression of Fibronectin Is Associated with Poor Prognosis, Cell Proliferation and Malignancy via the NF- κ B/P53-Apoptosis Signaling Pathway in Colorectal Cancer. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 3145–3153, doi:10.3892/or.2016.5177. 1292 1293 1294
114. Yu, Q.; Xue, Y.; Liu, J.; Xi, Z.; Li, Z.; Liu, Y. Fibronectin Promotes the Malignancy of Glioma Stem-Like Cells Via Modulation of Cell Adhesion, Differentiation, Proliferation and Chemoresistance. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, doi:10.3389/fnmol.2018.00130. 1295 1296
115. Auvinen, P.; Tammi, R.; Parkkinen, J.; Tammi, M.; Agren, U.; Johansson, R.; Hirvikoski, P.; Eskelinen, M.; Kosma, V.M. Hyaluronan in Peritumoral Stroma and Malignant Cells Associates with Breast Cancer Spreading and Predicts Survival. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 529–536, doi:10.1016/S0002-9440(10)64757-8. 1297 1298 1299
116. Bourguignon, L.Y.W.; Singleton, P.A.; Zhu, H.; Diedrich, F. Hyaluronan-Mediated CD44 Interaction with RhoGEF and Rho Kinase Promotes Grb2-Associated Binder-1 Phosphorylation and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Leading to Cytokine (Macrophage-Colony Stimulating Factor) Production and Breast Tumor Progression. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29420–29434, doi:10.1074/jbc.M301885200. 1300 1301 1302 1303
117. Udabage, L.; Brownlee, G.R.; Waltham, M.; Blick, T.; Walker, E.C.; Heldin, P.; Nilsson, S.K.; Thompson, E.W.; Brown, T.J. Antisense-Mediated Suppression of Hyaluronan Synthase 2 Inhibits the Tumorigenesis and Progression of Breast Cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6139–6150, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1622. 1304 1305 1306
118. Brekken, R.A.; Sage, E.H. SPARC, a Matricellular Protein: At the Crossroads of Cell-Matrix Communication. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2001**, *19*, 816–827, doi:10.1016/s0945-053x(00)00133-5. 1307 1308

119. Lunardi, S.; Muschel, R.J.; Brunner, T.B. The Stromal Compartments in Pancreatic Cancer: Are There Any Therapeutic Targets? *Cancer Lett* **2014**, *343*, 147–55, doi:10.1016/j.canlet.2013.09.039. 1309
120. Neuzillet, C.; Tijeras-Raballand, A.; Cros, J.; Faivre, S.; Hammel, P.; Raymond, E. Stromal Expression of SPARC in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Metastasis Rev.* **2013**, *32*, 585–602, doi:10.1007/s10555-013-9439-3. 1310
121. Infante, J.R.; Matsubayashi, H.; Sato, N.; Tonascia, J.; Klein, A.P.; Riall, T.A.; Yeo, C.; Iacobuzio-Donahue, C.; Goggins, M. Peritumoral Fibroblast SPARC Expression and Patient Outcome with Resectable Pancreatic Adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 319–325, doi:10.1200/JCO.2006.07.8824. 1311
122. Butcher, D.T.; Alliston, T.; Weaver, V.M. A Tense Situation: Forcing Tumour Progression. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 108–122, doi:10.1038/nrc2544. 1312
123. Kumar, S.; Weaver, V.M. Mechanics, Malignancy, and Metastasis: The Force Journey of a Tumor Cell. *Cancer Metastasis Rev.* **2009**, *28*, 113–127, doi:10.1007/s10555-008-9173-4. 1313
124. Jolly, L.A.; Novitskiy, S.; Owens, P.; Massoll, N.; Cheng, N.; Fang, W.; Moses, H.L.; Franco, A.T. Fibroblast-Mediated Collagen Remodeling Within the Tumor Microenvironment Facilitates Progression of Thyroid Cancers Driven by BrafV600E and Pten Loss. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 1804–1813, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2351. 1314
125. Pankova, D.; Chen, Y.; Terajima, M.; Schliekelman, M.J.; Baird, B.N.; Fahrenholtz, M.; Sun, L.; Gill, B.J.; Vadakkan, T.J.; Kim, M.P.; et al. Cancer-Associated Fibroblasts Induce a Collagen Cross-Link Switch in Tumor Stroma. *Mol. Cancer Res. MCR* **2016**, *14*, 287–295, doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0307. 1315
126. Chen, Y.; Terajima, M.; Yang, Y.; Sun, L.; Ahn, Y.-H.; Pankova, D.; Puperi, D.S.; Watanabe, T.; Kim, M.P.; Blackmon, S.H.; et al. Lysyl Hydroxylase 2 Induces a Collagen Cross-Link Switch in Tumor Stroma. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 1147–1162, doi:10.1172/JCI74725. 1316
127. Lee, J.; Condello, S.; Yakubov, B.; Emerson, R.; Caperell-Grant, A.; Hitomi, K.; Xie, J.; Matei, D. Tissue Transglutaminase Mediated Tumor-Stroma Interaction Promotes Pancreatic Cancer Progression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2015**, *21*, 4482–4493, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0226. 1317
128. Elosgui-Artola, A.; Oria, R.; Chen, Y.; Kosmalska, A.; Pérez-González, C.; Castro, N.; Zhu, C.; Trepát, X.; Roca-Cusachs, P. Mechanical Regulation of a Molecular Clutch Defines Force Transmission and Transduction in Response to Matrix Rigidity. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 540–548, doi:10.1038/ncb3336. 1318
129. Sun, Z.; Guo, S.S.; Fässler, R. Integrin-Mediated Mechanotransduction. *J. Cell Biol.* **2016**, *215*, 445–456, doi:10.1083/jcb.201609037. 1319
130. Pickup, M.W.; Laklai, H.; Acerbi, I.; Owens, P.; Gorska, A.E.; Chytil, A.; Aakre, M.; Weaver, V.M.; Moses, H.L. Stromally Derived Lysyl Oxidase Promotes Metastasis of Transforming Growth Factor- β -Deficient Mouse Mammary Carcinomas. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 5336–5346, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0012. 1320
131. Rubashkin, M.G.; Cassereau, L.; Bainer, R.; DuFort, C.C.; Yui, Y.; Ou, G.; Paszek, M.J.; Davidson, M.W.; Chen, Y.-Y.; Weaver, V.M. Force Engages Vinculin and Promotes Tumor Progression by Enhancing PI3K Activation of Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphate. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 4597–4611, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3698. 1321
132. Yang, X.; Li, S.; Li, W.; Chen, J.; Xiao, X.; Wang, Y.; Yan, G.; Chen, L. Inactivation of Lysyl Oxidase by β -Aminopropionitrile Inhibits Hypoxia-Induced Invasion and Migration of Cervical Cancer Cells. *Oncol. Rep.* **2013**, *29*, 541–548, doi:10.3892/or.2012.2146. 1322
133. Aung, A.; Seo, Y.N.; Lu, S.; Wang, Y.; Jamora, C.; del Álamo, J.C.; Varghese, S. 3D Traction Stresses Activate Protease-Dependent Invasion of Cancer Cells. *Biophys. J.* **2014**, *107*, 2528–2537, doi:10.1016/j.bpj.2014.07.078. 1323
134. Jerrell, R.J.; Parekh, A. Cellular Traction Stresses Mediate Extracellular Matrix Degradation by Invadopodia. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 1886–1896, doi:10.1016/j.actbio.2013.12.058. 1324
135. Kessenbrock, K.; Plaks, V.; Werb, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* **2010**, *141*, 52–67, doi:10.1016/j.cell.2010.03.015. 1325

136. Schoumacher, M.; Goldman, R.D.; Louvard, D.; Vignjevic, D.M. Actin, Microtubules, and Vimentin Intermediate Filaments Cooperate for Elongation of Invadopodia. *J. Cell Biol.* **2010**, *189*, 541–556, doi:10.1083/jcb.200909113. 1351–1352
137. Chen, W.T. Proteolytic Activity of Specialized Surface Protrusions Formed at Rosette Contact Sites of Transformed Cells. *J. Exp. Zool.* **1989**, *251*, 167–185, doi:10.1002/jez.1402510206. 1353–1354
138. Cao, H.; Eppinga, R.D.; Razidlo, G.L.; Krueger, E.W.; Chen, J.; Qiang, L.; McNiven, M.A. Stromal Fibroblasts Facilitate Cancer Cell Invasion by a Novel Invadopodia-Independent Matrix Degradation Process. *Oncogene* **2016**, *35*, 1099–1110, doi:10.1038/onc.2015.163. 1355–1357
139. Sok, J.C.; Lee, J.A.; Dasari, S.; Joyce, S.; Contrucci, S.C.; Egloff, A.M.; Trevelline, B.K.; Joshi, R.; Kumari, N.; Grandis, J.R.; et al. Collagen Type XI A1 Facilitates Head and Neck Squamous Cell Cancer Growth and Invasion. *Br. J. Cancer* **2013**, *109*, 3049–3056, doi:10.1038/bjc.2013.624. 1358–1360
140. Wu, Y.-H.; Chang, T.-H.; Huang, Y.-F.; Huang, H.-D.; Chou, C.-Y. COL11A1 Promotes Tumor Progression and Predicts Poor Clinical Outcome in Ovarian Cancer. *Oncogene* **2014**, *33*, 3432–3440, doi:10.1038/onc.2013.307. 1361–1362
141. Tremble, P.M.; Lane, T.F.; Sage, E.H.; Werb, Z. SPARC, a Secreted Protein Associated with Morphogenesis and Tissue Remodeling, Induces Expression of Metalloproteinases in Fibroblasts through a Novel Extracellular Matrix-Dependent Pathway. *J. Cell Biol.* **1993**, *121*, 1433–1444, doi:10.1083/jcb.121.6.1433. 1363–1365
142. Shankavaram, U.T.; DeWitt, D.L.; Funk, S.E.; Sage, E.H.; Wahl, L.M. Regulation of Human Monocyte Matrix Metalloproteinases by SPARC. *J. Cell. Physiol.* **1997**, *173*, 327–334, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199712)173:3<327::AID-JCP4>3.0.CO;2-P. 1366–1368
143. Zhang, H.; Fredericks, T.; Xiong, G.; Qi, Y.; Rychahou, P.G.; Li, J.-D.; Pihlajaniemi, T.; Xu, W.; Xu, R. Membrane Associated Collagen XIII Promotes Cancer Metastasis and Enhances Anoikis Resistance. *Breast Cancer Res. BCR* **2018**, *20*, 116, doi:10.1186/s13058-018-1030-y. 1369–1370
144. Attieh, Y.; Clark, A.G.; Grass, C.; Richon, S.; Pocard, M.; Mariani, P.; Elkhatab, N.; Betz, T.; Gurchenkov, B.; Vignjevic, D.M. Cancer-Associated Fibroblasts Lead Tumor Invasion through Integrin-B3-Dependent Fibronectin Assembly. *J. Cell Biol.* **2017**, *216*, 3509–3520, doi:10.1083/jcb.201702033. 1372–1374
145. Baba, Y.; Iyama, K.; Hirashima, K.; Nagai, Y.; Yoshida, N.; Hayashi, N.; Miyanari, N.; Baba, H. Laminin-332 Promotes the Invasion of Oesophageal Squamous Cell Carcinoma via PI3K Activation. *Br. J. Cancer* **2008**, *98*, 974–980, doi:10.1038/sj.bjc.6604252. 1375–1376
146. Feng, J.; Tang, L. SPARC in Tumor Pathophysiology and as a Potential Therapeutic Target. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 6182–6190, doi:10.2174/1381612820666140619123255. 1377–1378
147. Conklin, M.W.; Eickhoff, J.C.; Riching, K.M.; Pehlke, C.A.; Eliceiri, K.W.; Provenzano, P.P.; Friedl, A.; Keely, P.J. Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma. *Am. J. Pathol.* **2011**, *178*, 1221–1232, doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.076. 1379–1381
148. Provenzano, P.P.; Eliceiri, K.W.; Campbell, J.M.; Inman, D.R.; White, J.G.; Keely, P.J. Collagen Reorganization at the Tumor-Stromal Interface Facilitates Local Invasion. *BMC Med* **2006**, *4*, 38, doi:10.1186/1741-7015-4-38. 1382–1383
149. Wirtz, D.; Konstantopoulos, K.; Searson, P.C. The Physics of Cancer: The Role of Physical Interactions and Mechanical Forces in Metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 512–522, doi:10.1038/nrc3080. 1384–1385
150. Condeelis, J.; Pollard, J.W. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cell* **2006**, *124*, 263–266, doi:10.1016/j.cell.2006.01.007. 1386–1387
151. Tang, H.; Leung, L.; Saturno, G.; Viros, A.; Smith, D.; Di Leva, G.; Morrison, E.; Niculescu-Duvaz, D.; Lopes, F.; Johnson, L.; et al. Lysyl Oxidase Drives Tumour Progression by Trapping EGF Receptors at the Cell Surface. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14909, doi:10.1038/ncomms14909. 1388–1390

152. Lee, H.-O.; Mullins, S.R.; Franco-Barraza, J.; Valianou, M.; Cukierman, E.; Cheng, J.D. FAP-Overexpressing Fibroblasts Produce an Extracellular Matrix That Enhances Invasive Velocity and Directionality of Pancreatic Cancer Cells. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 245, doi:10.1186/1471-2407-11-245.
153. Brisson, B.K.; Mauldin, E.A.; Lei, W.; Vogel, L.K.; Power, A.M.; Lo, A.; Dopkin, D.; Khanna, C.; Wells, R.G.; Puré, E.; et al. Type III Collagen Directs Stromal Organization and Limits Metastasis in a Murine Model of Breast Cancer. *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 1471–1486, doi:10.1016/j.ajpath.2015.01.029.
154. Glentis, A.; Oertle, P.; Mariani, P.; Chikina, A.; El Marjou, F.; Attieh, Y.; Zaccarini, F.; Lae, M.; Loew, D.; Dingli, F.; et al. Cancer-Associated Fibroblasts Induce Metalloprotease-Independent Cancer Cell Invasion of the Basement Membrane. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 924, doi:10.1038/s41467-017-00985-8.
155. Erdogan, B.; Webb, D.J. Cancer-Associated Fibroblasts Modulate Growth Factor Signaling and Extracellular Matrix Remodeling to Regulate Tumor Metastasis. *Biochem Soc Trans* **2017**, *45*, 229–236, doi:10.1042/BST20160387.
156. Gopal, S.; Veracini, L.; Grall, D.; Butori, C.; Schaub, S.; Audebert, S.; Camoin, L.; Baudelet, E.; Radwanska, A.; Beghelli-de la Forest Divonne, S.; et al. Fibronectin-Guided Migration of Carcinoma Collectives. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14105, doi:10.1038/ncomms14105.
157. Attieh, Y.; Vignjevic, D.M. The Hallmarks of CAFs in Cancer Invasion. *Eur. J. Cell Biol.* **2016**, *95*, 493–502, doi:10.1016/j.ejcb.2016.07.004.
158. Franco-Barraza, J.; Francescone, R.; Luong, T.; Shah, N.; Madhani, R.; Cukierman, G.; Dulaimi, E.; Devarajan, K.; Egleston, B.L.; Nicolas, E.; et al. Matrix-Regulated Integrin $\text{Av}\beta 5$ Maintains $\text{A}\beta 1$ -Dependent Desmoplastic Traits Prognostic of Neoplastic Recurrence. *eLife* **2017**, *6*, doi:10.7554/eLife.20600.
159. Riching, K.M.; Cox, B.L.; Salick, M.R.; Pehlke, C.; Riching, A.S.; Ponik, S.M.; Bass, B.R.; Crone, W.C.; Jiang, Y.; Weaver, A.M.; et al. 3D Collagen Alignment Limits Protrusions to Enhance Breast Cancer Cell Persistence. *Biophys. J.* **2014**, *107*, 2546–2558, doi:10.1016/j.bpj.2014.10.035.
160. Davis, G.E.; Senger, D.R. Endothelial Extracellular Matrix: Biosynthesis, Remodeling, and Functions during Vascular Morphogenesis and Neovessel Stabilization. *Circ. Res.* **2005**, *97*, 1093–1107, doi:10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3.
161. Armulik, A.; Genové, G.; Betsholtz, C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Dev. Cell* **2011**, *21*, 193–215, doi:10.1016/j.devcel.2011.07.001.
162. Stratman, A.N.; Davis, G.E. Endothelial Cell-Pericyte Interactions Stimulate Basement Membrane Matrix Assembly: Influence on Vascular Tube Remodeling, Maturation, and Stabilization. *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Can.* **2012**, *18*, 68–80, doi:10.1017/S1431927611012402.
163. Sorokin, L.M.; Pausch, F.; Frieser, M.; Kröger, S.; Ohage, E.; Deutzmann, R. Developmental Regulation of the Laminin Alpha5 Chain Suggests a Role in Epithelial and Endothelial Cell Maturation. *Dev. Biol.* **1997**, *189*, 285–300, doi:10.1006/dbio.1997.8668.
164. Iivanainen, A.; Sainio, K.; Sariola, H.; Tryggvason, K. Primary Structure and Expression of a Novel Human Laminin A4 Chain. *FEBS Lett.* **1995**, *365*, 183–188, doi:10.1016/0014-5793(95)00462-I.
165. Chioran, A.; Duncan, S.; Catalano, A.; Brown, T.J.; Ringuette, M.J. Collagen IV Trafficking: The inside-out and beyond Story. *Dev. Biol.* **2017**, *431*, 124–133, doi:10.1016/j.ydbio.2017.09.037.
166. Sorokin, L.; Girg, W.; Göpfert, T.; Hallmann, R.; Deutzmann, R. Expression of Novel 400-KDa Laminin Chains by Mouse and Bovine Endothelial Cells. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *223*, 603–610, doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb19031.x.
167. Kalluri, R. Basement Membranes: Structure, Assembly and Role in Tumour Angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 422–433, doi:10.1038/nrc1094.
168. Uechi, G.; Sun, Z.; Schreiber, E.M.; Halfter, W.; Balasubramani, M. Proteomic View of Basement Membranes from Human Retinal Blood Vessels, Inner Limiting Membranes, and Lens Capsules. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 3693–3705, doi:10.1021/pr5002065.

169. Lord, M.S.; Chuang, C.Y.; Melrose, J.; Davies, M.J.; Iozzo, R.V.; Whitelock, J.M. The Role of Vascular-Derived Perlecan in Modulating Cell Adhesion, Proliferation and Growth Factor Signaling. *Matrix Biol.* **2014**, *35*, 112–122, doi:10.1016/j.matbio.2014.01.016.
170. Whitelock, J.M.; Melrose, J.; Iozzo, R.V. Diverse Cell Signaling Events Modulated by Perlecan. *Biochemistry* **2008**, *47*, 11174–11183, doi:10.1021/bi8013938.
171. Iozzo, R.V.; Cohen, I. Altered Proteoglycan Gene Expression and the Tumor Stroma. *EXS* **1994**, *70*, 199–214, doi:10.1007/978-3-0348-7545-5_12.
172. Iozzo, R.V. Perlecan: A Gem of a Proteoglycan. *Matrix Biol.* **1994**, *14*, 203–208, doi:10.1016/0945-053X(94)90183-X.
173. Mongiat, M.; Sweeney, S.M.; San Antonio, J.D.; Fu, J.; Iozzo, R.V. Endorepellin, a Novel Inhibitor of Angiogenesis Derived from the C Terminus of Perlecan. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4238–4249, doi:10.1074/jbc.M210445200.
174. O'Reilly, M.S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W.S.; Flynn, E.; Birkhead, J.R.; Olsen, B.R.; Folkman, J. Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* **1997**, *88*, 277–285, doi:10.1016/s0092-8674(00)81848-6.
175. Kantola, T.; Väyrynen, J.P.; Klintrup, K.; Mäkelä, J.; Karppinen, S.M.; Pihlajaniemi, T.; Autio-Harmainen, H.; Karttunen, T.J.; Mäkinen, M.J.; Tuomisto, A. Serum Endostatin Levels Are Elevated in Colorectal Cancer and Correlate with Invasion and Systemic Inflammatory Markers. *Br. J. Cancer* **2014**, *111*, 1605–1613, doi:10.1038/bjc.2014.456.
176. Cornelius, L.A.; Nehring, L.C.; Harding, E.; Bolanowski, M.; Welgus, H.G.; Kobayashi, D.K.; Pierce, R.A.; Shapiro, S.D. Matrix Metalloproteinases Generate Angiostatin: Effects on Neovascularization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **1998**, *161*, 6845–6852.
177. Patterson, B.C.; Sang, Q.A. Angiostatin-Converting Enzyme Activities of Human Matrilysin (MMP-7) and Gelatinase B/Type IV Collagenase (MMP-9). *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 28823–28825, doi:10.1074/jbc.272.46.28823.
178. Wen, W.; Moses, M.A.; Wiederschain, D.; Arbiser, J.L.; Folkman, J. The Generation of Endostatin Is Mediated by Elastase. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 6052–6056.
179. Arnold, S.A.; Rivera, L.B.; Miller, A.F.; Carbon, J.G.; Dineen, S.P.; Xie, Y.; Castrillon, D.H.; Sage, E.H.; Puolakkainen, P.; Bradshaw, A.D.; et al. Lack of Host SPARC Enhances Vascular Function and Tumor Spread in an Orthotopic Murine Model of Pancreatic Carcinoma. *Dis. Model. Mech.* **2010**, *3*, 57–72, doi:10.1242/dmm.003228.
180. Arnold, S.; Mira, E.; Muneer, S.; Korpanty, G.; Beck, A.W.; Holloway, S.E.; Mañes, S.; Brekken, R.A. Forced Expression of MMP9 Rescues the Loss of Angiogenesis and Abrogates Metastasis of Pancreatic Tumors Triggered by the Absence of Host SPARC. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **2008**, *233*, 860–873, doi:10.3181/0801-RM-12.
181. Petitclerc, E.; Boutaud, A.; Prestayko, A.; Xu, J.; Sado, Y.; Ninomiya, Y.; Sarras, M.P.; Hudson, B.G.; Brooks, P.C. New Functions for Non-Collagenous Domains of Human Collagen Type IV. Novel Integrin Ligands Inhibiting Angiogenesis and Tumor Growth in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8051–8061, doi:10.1074/jbc.275.11.8051.
182. Neve, A.; Cantatore, F.P.; Maruotti, N.; Corrado, A.; Ribatti, D. Extracellular Matrix Modulates Angiogenesis in Physiological and Pathological Conditions. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 756078, doi:10.1155/2014/756078.
183. Colorado, P.C.; Torre, A.; Kamphaus, G.; Maeshima, Y.; Hopfer, H.; Takahashi, K.; Volk, R.; Zamborsky, E.D.; Herman, S.; Sarkar, P.K.; et al. Anti-Angiogenic Cues from Vascular Basement Membrane Collagen. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2520–2526.
184. Hewitt, R.E.; Powe, D.G.; Morrell, K.; Balley, E.; Leach, I.H.; Ellis, I.O.; Turner, D.R. Laminin and Collagen IV Subunit Distribution in Normal and Neoplastic Tissues of Colorectum and Breast. *Br. J. Cancer* **1997**, *75*, 221–229.
185. Hashizume, H.; Baluk, P.; Morikawa, S.; McLean, J.W.; Thurston, G.; Roberge, S.; Jain, R.K.; McDonald, D.M. Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 1363–1380.
186. Ruoslahti, E. Specialization of Tumour Vasculature. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 83–90, doi:10.1038/nrc724.
187. Egeblad, M.; Nakasone, E.S.; Werb, Z. Tumors as Organs: Complex Tissues That Interface with the Entire Organism. *Dev. Cell* **2010**, *18*, 884–901, doi:10.1016/j.devcel.2010.05.012.

188. Huang, X.Z.; Wu, J.F.; Ferrando, R.; Lee, J.H.; Wang, Y.L.; Farese, R.V.; Sheppard, D. Fatal Bilateral Chylothorax in Mice Lacking the Integrin Alpha9beta1. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 5208–5215, doi:10.1128/mcb.20.14.5208-5215.2000. 1473
1474
189. Avraamides, C.J.; Garmy-Susini, B.; Varner, J.A. Integrins in Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 604–617, doi:10.1038/nrc2353. 1475
1476
190. Kalli, M.; Stylianopoulos, T. Defining the Role of Solid Stress and Matrix Stiffness in Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Front Oncol* **2018**, *8*, 55, doi:10.3389/fonc.2018.00055. 1477
1478
191. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Principles and Mechanisms of Vessel Normalization for Cancer and Other Angiogenic Diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 417–27, doi:10.1038/nrd3455. 1479
1480
192. Stylianopoulos, T.; Martin, J.D.; Snuderl, M.; Mpekris, F.; Jain, S.R.; Jain, R.K. Coevolution of Solid Stress and Interstitial Fluid Pressure in Tumors during Progression: Implications for Vascular Collapse. *Cancer Res* **2013**, *73*, 3833–41, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4521. 1481
1482
1483
193. Chauhan, V.P.; Boucher, Y.; Ferrone, C.R.; Roberge, S.; Martin, J.D.; Stylianopoulos, T.; Bardeesy, N.; DePinho, R.A.; Padera, T.P.; Munn, L.L.; et al. Compression of Pancreatic Tumor Blood Vessels by Hyaluronan Is Caused by Solid Stress and Not Interstitial Fluid Pressure. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 14–5, doi:10.1016/j.ccr.2014.06.003. 1484
1485
1486
194. Wong, C.C.-L.; Tse, A.P.-W.; Huang, Y.-P.; Zhu, Y.-T.; Chiu, D.K.-C.; Lai, R.K.-H.; Au, S.L.-K.; Kai, A.K.-L.; Lee, J.M.-F.; Wei, L.L.; et al. Lysyl Oxidase-like 2 Is Critical to Tumor Microenvironment and Metastatic Niche Formation in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatol. Baltim. Md* **2014**, *60*, 1645–1658, doi:10.1002/hep.27320. 1487
1488
1489
195. Hoshino, A.; Costa-Silva, B.; Shen, T.-L.; Rodrigues, G.; Hashimoto, A.; Tesic Mark, M.; Molina, H.; Kohsaka, S.; Di Giannatale, A.; Ceder, S.; et al. Tumour Exosome Integrins Determine Organotropic Metastasis. *Nature* **2015**, *527*, 329–335, doi:10.1038/nature15756. 1490
1491
1492
196. Peinado, H.; Zhang, H.; Matei, I.R.; Costa-Silva, B.; Hoshino, A.; Rodrigues, G.; Psaila, B.; Kaplan, R.N.; Bromberg, J.F.; Kang, Y.; et al. Pre-Metastatic Niches: Organ-Specific Homes for Metastases. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 302–317, doi:10.1038/nrc.2017.6. 1493
1494
197. Costa-Silva, B.; Aiello, N.M.; Ocean, A.J.; Singh, S.; Zhang, H.; Thakur, B.K.; Becker, A.; Hoshino, A.; Mark, M.T.; Molina, H.; et al. Pancreatic Cancer Exosomes Initiate Pre-Metastatic Niche Formation in the Liver. *Nat Cell Biol* **2015**, *17*, 816–26, doi:10.1038/ncb3169. 1495
1496
1497
198. Sethi, N.; Kang, Y. Unravelling the Complexity of Metastasis - Molecular Understanding and Targeted Therapies. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 735–748, doi:10.1038/nrc3125. 1498
1499
199. Rachman-Tzemah, C.; Zaffryar-Eilot, S.; Grossman, M.; Ribero, D.; Timaner, M.; Mäki, J.M.; Myllyharju, J.; Bertolini, F.; Herschkovitz, D.; Sagi, I.; et al. Blocking Surgically Induced Lysyl Oxidase Activity Reduces the Risk of Lung Metastases. *Cell Rep.* **2017**, *19*, 774–784, doi:10.1016/j.celrep.2017.04.005. 1500
1501
1502
200. Huang, Y.; Song, N.; Ding, Y.; Yuan, S.; Li, X.; Cai, H.; Shi, H.; Luo, Y. Pulmonary Vascular Destabilization in the Premetastatic Phase Facilitates Lung Metastasis. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 7529–7537, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4382. 1503
1504
201. Théry, C.; Zitvogel, L.; Amigorena, S. Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 569–579, doi:10.1038/nri855. 1505
1506
202. Iero, M.; Valenti, R.; Huber, V.; Filipazzi, P.; Parmiani, G.; Fais, S.; Rivoltini, L. Tumour-Released Exosomes and Their Implications in Cancer Immunity. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 80–88, doi:10.1038/sj.cdd.4402237. 1507
1508
203. Ratajczak, J.; Wysoczynski, M.; Hayek, F.; Janowska-Wieczorek, A.; Ratajczak, M.Z. Membrane-Derived Microvesicles: Important and Underappreciated Mediators of Cell-to-Cell Communication. *Leukemia* **2006**, *20*, 1487–1495, doi:10.1038/sj.leu.2404296. 1509
1510
204. Cocucci, E.; Racchetti, G.; Meldolesi, J. Shedding Microvesicles: Artefacts No More. *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 43–51, doi:10.1016/j.tcb.2008.11.003. 1511
1512
205. Valadi, H.; Ekström, K.; Bossios, A.; Sjöstrand, M.; Lee, J.J.; Lötvall, J.O. Exosome-Mediated Transfer of MRNAs and MicroRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 654–659, doi:10.1038/ncb1596. 1513
1514

206. Hood, J.L.; San, R.S.; Wickline, S.A. Exosomes Released by Melanoma Cells Prepare Sentinel Lymph Nodes for Tumor Metastasis. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 3792–3801, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4455.
207. McCready, J.; Sims, J.D.; Chan, D.; Jay, D.G. Secretion of Extracellular Hsp90alpha via Exosomes Increases Cancer Cell Motility: A Role for Plasminogen Activation. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 294, doi:10.1186/1471-2407-10-294.
208. Hannafon, B.N.; Ding, W.-Q. Intercellular Communication by Exosome-Derived MicroRNAs in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 14240–14269, doi:10.3390/ijms140714240.
209. Hakulinen, J.; Sankkila, L.; Sugiyama, N.; Lehti, K.; Keski-Oja, J. Secretion of Active Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase (MMP-14) into Extracellular Space in Microvesicular Exosomes. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *105*, 1211–1218, doi:10.1002/jcb.21923.
210. Hallmann, R.; Zhang, X.; Di Russo, J.; Li, L.; Song, J.; Hannocks, M.J.; Sorokin, L. The Regulation of Immune Cell Trafficking by the Extracellular Matrix. *Curr Opin Cell Biol* **2015**, *36*, 54–61, doi:10.1016/j.ceb.2015.06.006.
211. Friedl, P.; Wolf, K. Proteolytic and Non-Proteolytic Migration of Tumour Cells and Leucocytes. *Biochem. Soc. Symp.* **2003**, 277–285, doi:10.1042/bss0700277.
212. Lämmermann, T.; Bader, B.L.; Monkley, S.J.; Worbs, T.; Wedlich-Söldner, R.; Hirsch, K.; Keller, M.; Förster, R.; Critchley, D.R.; Fässler, R.; et al. Rapid Leukocyte Migration by Integrin-Independent Flowing and Squeezing. *Nature* **2008**, *453*, 51–55, doi:10.1038/nature06887.
213. Wolf, K.; te Lindert, M.; Krause, M.; Alexander, S.; te Riet, J.; Willis, A.L.; Hoffman, R.M.; Figdor, C.G.; Weiss, S.J.; Friedl, P. Physical Limits of Cell Migration: Control by ECM Space and Nuclear Deformation and Tuning by Proteolysis and Traction Force. *J. Cell Biol.* **2013**, *201*, 1069–1084, doi:10.1083/jcb.201210152.
214. Friedl, P.; Weigelin, B. Interstitial Leukocyte Migration and Immune Function. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 960–969, doi:10.1038/ni.f.212.
215. Hartmann, N.; Giese, N.A.; Giese, T.; Poschke, I.; Offringa, R.; Werner, J.; Ryschich, E. Prevailing Role of Contact Guidance in Intrastromal T-Cell Trapping in Human Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2014**, *20*, 3422–3433, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2972.
216. Carstens, J.L.; Correa de Sampaio, P.; Yang, D.; Barua, S.; Wang, H.; Rao, A.; Allison, J.P.; LeBleu, V.S.; Kalluri, R. Spatial Computation of Intratumoral T Cells Correlates with Survival of Patients with Pancreatic Cancer. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15095, doi:10.1038/ncomms15095.
217. Salmon, H.; Franciszkiewicz, K.; Damotte, D.; Dieu-Nosjean, M.C.; Validire, P.; Trautmann, A.; Mami-Chouaib, F.; Donnadieu, E. Matrix Architecture Defines the Preferential Localization and Migration of T Cells into the Stroma of Human Lung Tumors. *J Clin Invest* **2012**, *122*, 899–910, doi:10.1172/JCI45817.
218. Van Goethem, E.; Poincloux, R.; Gauffre, F.; Maridonneau-Parini, I.; Le Cabec, V. Matrix Architecture Dictates Three-Dimensional Migration Modes of Human Macrophages: Differential Involvement of Proteases and Podosome-like Structures. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2010**, *184*, 1049–1061, doi:10.4049/jimmunol.0902223.
219. McWhorter, F.Y.; Davis, C.T.; Liu, W.F. Physical and Mechanical Regulation of Macrophage Phenotype and Function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2015**, *72*, 1303–1316, doi:10.1007/s00018-014-1796-8.
220. Acerbi, I.; Cassereau, L.; Dean, I.; Shi, Q.; Au, A.; Park, C.; Chen, Y.Y.; Liphardt, J.; Hwang, E.S.; Weaver, V.M. Human Breast Cancer Invasion and Aggression Correlates with ECM Stiffening and Immune Cell Infiltration. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* **2015**, *7*, 1120–1134, doi:10.1039/c5ib00040h.
221. Nielsen, S.R.; Quaranta, V.; Linford, A.; Emeagi, P.; Rainer, C.; Santos, A.; Ireland, L.; Sakai, T.; Sakai, K.; Kim, Y.-S.; et al. Macrophage-Secreted Granulin Supports Pancreatic Cancer Metastasis by Inducing Liver Fibrosis. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 549–560, doi:10.1038/ncb3340.

222. Loike, J.D.; Cao, L.; Budhu, S.; Hoffman, S.; Silverstein, S.C. Blockade of Alpha 5 Beta 1 Integrins Reverses the Inhibitory Effect of Tenascin on Chemotaxis of Human Monocytes and Polymorphonuclear Leukocytes through Three-Dimensional Gels of Extracellular Matrix Proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2001**, *166*, 7534–7542, doi:10.4049/jimmunol.166.12.7534.
223. Evanko, S.P.; Potter-Perigo, S.; Bollyky, P.L.; Nepom, G.T.; Wight, T.N. Hyaluronan and Versican in the Control of Human T-Lymphocyte Adhesion and Migration. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2012**, *31*, 90–100, doi:10.1016/j.matbio.2011.10.004.
224. O'Connor, R.S.; Hao, X.; Shen, K.; Bashour, K.; Akimova, T.; Hancock, W.W.; Kam, L.C.; Milone, M.C. Substrate Rigidity Regulates Human T Cell Activation and Proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2012**, *189*, 1330–1339, doi:10.4049/jimmunol.1102757.
225. Bollyky, P.L.; Wu, R.P.; Falk, B.A.; Lord, J.D.; Long, S.A.; Preisinger, A.; Teng, B.; Holt, G.E.; Standifer, N.E.; Braun, K.R.; et al. ECM Components Guide IL-10 Producing Regulatory T-Cell (TR1) Induction from Effector Memory T-Cell Precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 7938–7943, doi:10.1073/pnas.1017360108.
226. He, J.; Baum, L.G. Presentation of Galectin-1 by Extracellular Matrix Triggers T Cell Death. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4705–4712, doi:10.1074/jbc.M311183200.
227. Kuang, D.-M.; Wu, Y.; Chen, N.; Cheng, J.; Zhuang, S.-M.; Zheng, L. Tumor-Derived Hyaluronan Induces Formation of Immunosuppressive Macrophages through Transient Early Activation of Monocytes. *Blood* **2007**, *110*, 587–595, doi:10.1182/blood-2007-01-068031.
228. Iijima, J.; Konno, K.; Itano, N. Inflammatory Alterations of the Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment. *Cancers* **2011**, *3*, 3189–3205, doi:10.3390/cancers3033189.
229. Kobayashi, N.; Miyoshi, S.; Mikami, T.; Koyama, H.; Kitazawa, M.; Takeoka, M.; Sano, K.; Amano, J.; Isogai, Z.; Niida, S.; et al. Hyaluronan Deficiency in Tumor Stroma Impairs Macrophage Trafficking and Tumor Neovascularization. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7073–7083, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4687.
230. Sorokin, L. The Impact of the Extracellular Matrix on Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 712–723, doi:10.1038/nri2852.
231. Seo, Y.D.; Jiang, X.; Sullivan, K.M.; Jalikis, F.G.; Smythe, K.S.; Abbasi, A.; Vignali, M.; Park, J.O.; Daniel, S.K.; Pollack, S.M.; et al. Mobilization of CD8+ T Cells via CXCR4 Blockade Facilitates PD-1 Checkpoint Therapy in Human Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 3934–3945, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0081.
232. Fukunaga, A.; Miyamoto, M.; Cho, Y.; Murakami, S.; Kawarada, Y.; Oshikiri, T.; Kato, K.; Kurokawa, T.; Suzuoki, M.; Nakakubo, Y.; et al. CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Together with CD4+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Dendritic Cells Improve the Prognosis of Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreas* **2004**, *28*, e26-31, doi:10.1097/00006676-200401000-00023.
233. Boyd, D.F.; Thomas, P.G. Towards Integrating Extracellular Matrix and Immunological Pathways. *Cytokine* **2017**, *98*, 79–86, doi:10.1016/j.cyto.2017.03.004.
234. Rahman, S.; Patel, Y.; Murray, J.; Patel, K.V.; Sumathipala, R.; Sobel, M.; Wijelath, E.S. Novel Hepatocyte Growth Factor (HGF) Binding Domains on Fibronectin and Vitronectin Coordinate a Distinct and Amplified Met-Integrin Induced Signalling Pathway in Endothelial Cells. *BMC Cell Biol.* **2005**, *6*, 8, doi:10.1186/1471-2121-6-8.
235. Wijelath, E.S.; Rahman, S.; Namekata, M.; Murray, J.; Nishimura, T.; Mostafavi-Pour, Z.; Patel, Y.; Suda, Y.; Humphries, M.J.; Sobel, M. Heparin-II Domain of Fibronectin Is a Vascular Endothelial Growth Factor-Binding Domain: Enhancement of VEGF Biological Activity by a Singular Growth Factor/Matrix Protein Synergism. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 853–860, doi:10.1161/01.RES.0000246849.17887.66.
236. Goetz, R.; Mohammadi, M. Exploring Mechanisms of FGF Signalling through the Lens of Structural Biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 166–180, doi:10.1038/nrm3528.
237. Monboisse, J.C.; Oudart, J.B.; Ramont, L.; Brassart-Pasco, S.; Maquart, F.X. Matrikines from Basement Membrane Collagens: A New Anti-Cancer Strategy. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 2589–2598, doi:10.1016/j.bbagen.2013.12.029.

238. Gagar, A.; Jackson, P.L.; Noerager, B.D.; O'Reilly, P.J.; McQuaid, D.B.; Rowe, S.M.; Clancy, J.P.; Blalock, J.E. A Novel Proteolytic Cascade Generates an Extracellular Matrix-Derived Chemoattractant in Chronic Neutrophilic Inflammation, *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2008**, *180*, 5662–5669.
239. Mitsiades, C.S.; Mitsiades, N.S.; Munshi, N.C.; Richardson, P.G.; Anderson, K.C. The Role of the Bone Microenvironment in the Pathophysiology and Therapeutic Management of Multiple Myeloma: Interplay of Growth Factors, Their Receptors and Stromal Interactions. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **2006**, *42*, 1564–1573, doi:10.1016/j.ejca.2005.12.025.
240. Vincent, T.; Mechti, N. Extracellular Matrix in Bone Marrow Can Mediate Drug Resistance in Myeloma. *Leuk. Lymphoma* **2005**, *46*, 803–811, doi:10.1080/10428190500051448.
241. Sloan, E.K.; Pouliot, N.; Stanley, K.L.; Chia, J.; Moseley, J.M.; Hards, D.K.; Anderson, R.L. Tumor-Specific Expression of Alphavbeta3 Integrin Promotes Spontaneous Metastasis of Breast Cancer to Bone. *Breast Cancer Res. BCR* **2006**, *8*, R20, doi:10.1186/bcr1398.
242. Chrenek, M.A.; Wong, P.; Weaver, V.M. Tumour-Stromal Interactions. Integrins and Cell Adhesions as Modulators of Mammary Cell Survival and Transformation. *Breast Cancer Res. BCR* **2001**, *3*, 224–229, doi:10.1186/bcr300.
243. Damiano, J.S.; Dalton, W.S. Integrin-Mediated Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Leuk. Lymphoma* **2000**, *38*, 71–81, doi:10.3109/10428190009060320.
244. Jain, R.K. Transport of Molecules, Particles, and Cells in Solid Tumors. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **1999**, *1*, 241–263, doi:10.1146/annurev.bioeng.1.1.241.
245. Trédan, O.; Galmarini, C.M.; Patel, K.; Tannock, I.F. Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *99*, 1441–1454, doi:10.1093/jnci/djm135.
246. Kyle, A.H.; Huxham, L.A.; Yeoman, D.M.; Minchinton, A.I. Limited Tissue Penetration of Taxanes: A Mechanism for Resistance in Solid Tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2007**, *13*, 2804–2810, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1941.
247. Helmlinger, G.; Netti, P.A.; Lichtenbeld, H.C.; Melder, R.J.; Jain, R.K. Solid Stress Inhibits the Growth of Multicellular Tumor Spheroids. *Nat Biotechnol* **1997**, *15*, 778–83, doi:10.1038/nbt0897-778.
248. Rizzuti, I.F.; Mascheroni, P.; Arcucci, S.; Ben-Mériem, Z.; Prunet, A.; Barentin, C.; Rivière, C.; Delanoë-Ayari, H.; Hatzikirou, H.; Guillermet-Guibert, J.; et al. Mechanical Control of Cell Proliferation Increases Resistance to Chemotherapeutic Agents. *Phys. Rev. Lett.* **2020**, *125*, 128103, doi:10.1103/PhysRevLett.125.128103.
249. Netti, P.A.; Berk, D.A.; Swartz, M.A.; Grodzinsky, A.J.; Jain, R.K. Role of Extracellular Matrix Assembly in Interstitial Transport in Solid Tumors. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2497–2503.
250. Jang, S.H.; Wientjes, M.G.; Lu, D.; Au, J.L.S. Drug Delivery and Transport to Solid Tumors. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1337–1350, doi:10.1023/a:1025785505977.
251. Govaere, O.; Wouters, J.; Petz, M.; Vandewynckel, Y.-P.; Van den Eynde, K.; Van den Broeck, A.; Verhulst, S.; Dollé, L.; Gremeaux, L.; Ceulemans, A.; et al. Laminin-332 Sustains Chemoresistance and Quiescence as Part of the Human Hepatic Cancer Stem Cell Niche. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 609–617, doi:10.1016/j.jhep.2015.11.011.
252. Fukazawa, S.; Shinto, E.; Tsuda, H.; Ueno, H.; Shikina, A.; Kajiwar, Y.; Yamamoto, J.; Hase, K. Laminin B3 Expression as a Prognostic Factor and a Predictive Marker of Chemoresistance in Colorectal Cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2015**, *45*, 533–540, doi:10.1093/jjco/hyv037.
253. Tsurutani, J.; West, K.A.; Sayyah, J.; Gills, J.J.; Dennis, P.A. Inhibition of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Mammalian Target of Rapamycin Pathway but Not the MEK/ERK Pathway Attenuates Laminin-Mediated Small Cell Lung Cancer Cellular Survival and Resistance to Imatinib Mesylate or Chemotherapy. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 8423–8432, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0058.
254. Xing, H.; Weng, D.; Chen, G.; Tao, W.; Zhu, T.; Yang, X.; Meng, L.; Wang, S.; Lu, Y.; Ma, D. Activation of Fibronectin/PI-3K/Akt2 Leads to Chemoresistance to Docetaxel by Regulating Survivin Protein Expression in Ovarian and Breast Cancer Cells. *Cancer Lett.* **2008**, *261*, 108–119, doi:10.1016/j.canlet.2007.11.022.

255. Sung, P.-L.; Jan, Y.-H.; Lin, S.-C.; Huang, C.-C.; Lin, H.; Wen, K.-C.; Chao, K.-C.; Lai, C.-R.; Wang, P.-H.; Chuang, C.-M.; et al. Periostin in Tumor Microenvironment Is Associated with Poor Prognosis and Platinum Resistance in Epithelial Ovarian Carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *7*, 4036–4047, doi:10.18632/oncotarget.6700. 1638–1639–1640
256. Tumbarello, D.A.; Temple, J.; Brenton, J.D. SS3 Integrin Modulates Transforming Growth Factor Beta Induced (TGFBI) Function and Paclitaxel Response in Ovarian Cancer Cells. *Mol. Cancer* **2012**, *11*, 36, doi:10.1186/1476-4598-11-36. 1641–1642
257. Moniuszko, T.; Wincewicz, A.; Koda, M.; Domysławska, I.; Sulkowski, S. Role of Periostin in Esophageal, Gastric and Colon Cancer. *Oncol. Lett.* **2016**, *12*, 783–787, doi:10.3892/ol.2016.4692. 1643–1644
258. Tumbarello, D.A.; Andrews, M.R.; Brenton, J.D. SPARC Regulates Transforming Growth Factor Beta Induced (TGFBI) Extracellular Matrix Deposition and Paclitaxel Response in Ovarian Cancer Cells. *PloS One* **2016**, *11*, e0162698, doi:10.1371/journal.pone.0162698. 1645–1646–1647
259. Sherman-Baust, C.A.; Weeraratna, A.T.; Rangel, L.B.A.; Pizer, E.S.; Cho, K.R.; Schwartz, D.R.; Shock, T.; Morin, P.J. Remodeling of the Extracellular Matrix through Overexpression of Collagen VI Contributes to Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 377–386, doi:10.1016/s1535-6108(03)00058-8. 1648–1649–1650
260. Xiao, W.; Wang, S.; Zhang, R.; Sohrabi, A.; Yu, Q.; Liu, S.; Ehsanipour, A.; Liang, J.; Bierman, R.D.; Nathanson, D.A.; et al. Bioengineered Scaffolds for 3D Culture Demonstrate Extracellular Matrix-Mediated Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Glioblastoma. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2020**, *85–86*, 128–146, doi:10.1016/j.matbio.2019.04.003. 1651–1652–1653
261. Glinisky, G.V. Anti-Adhesion Cancer Therapy. *Cancer Metastasis Rev.* **1998**, *17*, 177–185, doi:10.1023/a:1006050302406. 1654
262. Juliano, R.L.; Varner, J.A. Adhesion Molecules in Cancer: The Role of Integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1993**, *5*, 812–818, doi:10.1016/0955-0674(93)90030-T. 1655–1656
263. Zhao, J.; Guan, J.-L. Signal Transduction by Focal Adhesion Kinase in Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2009**, *28*, 35–49, doi:10.1007/s10555-008-9165-4. 1657–1658
264. Zhao, X.; Guan, J.-L. Focal Adhesion Kinase and Its Signaling Pathways in Cell Migration and Angiogenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 610–615, doi:10.1016/j.addr.2010.11.001. 1659–1660
265. Bommert, K.; Bargou, R.C.; Stühmer, T. Signalling and Survival Pathways in Multiple Myeloma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **2006**, *42*, 1574–1580, doi:10.1016/j.ejca.2005.12.026. 1661–1662
266. Carragher, N.O.; Frame, M.C. Focal Adhesion and Actin Dynamics: A Place Where Kinases and Proteases Meet to Promote Invasion. *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 241–249, doi:10.1016/j.tcb.2004.03.011. 1663–1664
267. Wen, Y.; Wang, C.-T.; Ma, T.-T.; Li, Z.-Y.; Zhou, L.-N.; Mu, B.; Leng, F.; Shi, H.-S.; Li, Y.-O.; Wei, Y.-Q. Immunotherapy Targeting Fibroblast Activation Protein Inhibits Tumor Growth and Increases Survival in a Murine Colon Cancer Model. *Cancer Sci.* **2010**, *101*, 2325–2332, doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01695.x. 1665–1666–1667
268. Loeffler, M.; Krüger, J.A.; Niethammer, A.G.; Reisfeld, R.A. Targeting Tumor-Associated Fibroblasts Improves Cancer Chemotherapy by Increasing Intratumoral Drug Uptake. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1955–1962, doi:10.1172/JCI26532. 1668–1669
269. Gunderson, A.J.; Yamazaki, T.; McCarty, K.; Phillips, M.; Alice, A.; Bambina, S.; Zebertavage, L.; Friedman, D.; Cottam, B.; Newell, P.; et al. Blockade of Fibroblast Activation Protein in Combination with Radiation Treatment in Murine Models of Pancreatic Adenocarcinoma. *PloS One* **2019**, *14*, e0211117, doi:10.1371/journal.pone.0211117. 1670–1671–1672
270. Feig, C.; Jones, J.O.; Kraman, M.; Wells, R.J.B.; Deonarine, A.; Chan, D.S.; Connell, C.M.; Roberts, E.W.; Zhao, Q.; Caballero, O.L.; et al. Targeting CXCL12 from FAP-Expressing Carcinoma-Associated Fibroblasts Synergizes with Anti-PD-L1 Immunotherapy in Pancreatic Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 20212–20217, doi:10.1073/pnas.1320318110. 1673–1674–1675
271. Murakami, M.; Ernsting, M.J.; Undzys, E.; Holwell, N.; Foltz, W.D.; Li, S.-D. Docetaxel Conjugate Nanoparticles That Target α -Smooth Muscle Actin-Expressing Stromal Cells Suppress Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 4862–4871, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0062. 1676–1677–1678

272. Ozdemir, B.C.; Pentcheva-Hoang, T.; Carstens, J.L.; Zheng, X.; Wu, C.C.; Simpson, T.R.; Laklai, H.; Sugimoto, H.; Kahlert, C.; Novitskiy, S.V.; et al. Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 719–34, doi:10.1016/j.ccr.2014.04.005.
273. Hidalgo, M.; Cascinu, S.; Kleeff, J.; Labianca, R.; Löhr, J.-M.; Neoptolemos, J.; Real, F.X.; Van Laethem, J.-L.; Heinemann, V. Addressing the Challenges of Pancreatic Cancer: Future Directions for Improving Outcomes. *Pancreatology* **2015**, *15*, 8–18, doi:10.1016/j.pan.2014.10.001.
274. Bailey, J.M.; Swanson, B.J.; Hamada, T.; Eggers, J.P.; Caffery, T.; Ouellette, M.M.; Hollingsworth, M.A. Sonic Hedgehog Promotes Desmoplasia in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2008**, *14*, 5995–6004, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0291.
275. Amakye, D.; Jagani, Z.; Dorsch, M. Unraveling the Therapeutic Potential of the Hedgehog Pathway in Cancer. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1410–1422, doi:10.1038/nm.3389.
276. Wagner, E.F. Cancer: Fibroblasts for All Seasons. *Nature* **2016**, *530*, 42–43, doi:10.1038/530042a.
277. Neuzillet, C.; Tijeras-Raballand, A.; Cohen, R.; Cros, J.; Faivre, S.; Raymond, E.; de Gramont, A. Targeting the TGF β Pathway for Cancer Therapy. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *147*, 22–31, doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.001.
278. Mariathasan, S.; Turley, S.J.; Nickles, D.; Castiglioni, A.; Yuen, K.; Wang, Y.; Kadel, E.E.; Koeppen, H.; Astarita, J.L.; Cubas, R.; et al. TGF- β Attenuates Tumour Response to PD-L1 Blockade by Contributing to Exclusion of T Cells. *Nature* **2018**, *554*, 544–548, doi:10.1038/nature25501.
279. Tauriello, D.V.F.; Palomo-Ponce, S.; Stork, D.; Berenguer-Llargo, A.; Badia-Ramentol, J.; Iglesias, M.; Sevillano, M.; Ibiza, S.; Cañellas, A.; Hernando-Momblona, X.; et al. TGF β Drives Immune Evasion in Genetically Reconstituted Colon Cancer Metastasis. *Nature* **2018**, *554*, 538–543, doi:10.1038/nature25492.
280. Medicherla, S.; Li, L.; Ma, J.Y.; Kapoun, A.M.; Gaspar, N.J.; Liu, Y.-W.; Mangadu, R.; O'Young, G.; Protter, A.A.; Schreiner, G.F.; et al. Antitumor Activity of TGF-Beta Inhibitor Is Dependent on the Microenvironment. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 4149–4157.
281. Mazzocca, A.; Fransvea, E.; Dituri, F.; Lupo, L.; Antonaci, S.; Giannelli, G. Down-Regulation of Connective Tissue Growth Factor by Inhibition of Transforming Growth Factor Beta Blocks the Tumor-Stroma Cross-Talk and Tumor Progression in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatol. Baltim. Md* **2010**, *51*, 523–534, doi:10.1002/hep.23285.
282. Zhang, B.; Halder, S.K.; Zhang, S.; Datta, P.K. Targeting Transforming Growth Factor-Beta Signaling in Liver Metastasis of Colon Cancer. *Cancer Lett.* **2009**, *277*, 114–120, doi:10.1016/j.canlet.2008.11.035.
283. Calon, A.; Espinet, E.; Palomo-Ponce, S.; Tauriello, D.V.F.; Iglesias, M.; Céspedes, M.V.; Sevillano, M.; Nadal, C.; Jung, P.; Zhang, X.H.-F.; et al. Dependency of Colorectal Cancer on a TGF-Beta-Driven Programme in Stromal Cells for Metastasis Initiation. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 571–584, doi:10.1016/j.ccr.2012.08.013.
284. Chronopoulos, A.; Robinson, B.; Sarper, M.; Cortes, E.; Auernheimer, V.; Lachowski, D.; Attwood, S.; García, R.; Ghassemi, S.; Fabry, B.; et al. ATRA Mechanically Reprograms Pancreatic Stellate Cells to Suppress Matrix Remodelling and Inhibit Cancer Cell Invasion. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12630, doi:10.1038/ncomms12630.
285. Froeling, F.E.M.; Feig, C.; Chelala, C.; Dobson, R.; Mein, C.E.; Tuveson, D.A.; Clevers, H.; Hart, I.R.; Kocher, H.M. Retinoic Acid-Induced Pancreatic Stellate Cell Quiescence Reduces Paracrine Wnt- β -Catenin Signaling to Slow Tumor Progression. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 1486–1497, 1497.e1–14, doi:10.1053/j.gastro.2011.06.047.
286. Ene-Obong, A.; Clear, A.J.; Watt, J.; Wang, J.; Fatah, R.; Riches, J.C.; Marshall, J.F.; Chin-Aleong, J.; Chelala, C.; Gribben, J.G.; et al. Activated Pancreatic Stellate Cells Sequester CD8 $^{+}$ T Cells to Reduce Their Infiltration of the Juxtatumoral Compartment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology* **2013**, *145*, 1121–1132, doi:10.1053/j.gastro.2013.07.025.
287. Sherman, M.H.; Yu, R.T.; Engle, D.D.; Ding, N.; Atkins, A.R.; Tiriach, H.; Collisson, E.A.; Connor, F.; Van Dyke, T.; Kozlov, S.; et al. Vitamin D Receptor-Mediated Stromal Reprogramming Suppresses Pancreatitis and Enhances Pancreatic Cancer Therapy. *Cell* **2014**, *159*, 80–93, doi:10.1016/j.cell.2014.08.007.

288. Ferrer-Mayorga, G.; Gómez-López, G.; Barbáchano, A.; Fernández-Barral, A.; Peña, C.; Pisano, D.G.; Cantero, R.; Rojo, F.; Muñoz, A.; Larriba, M.J. Vitamin D Receptor Expression and Associated Gene Signature in Tumour Stromal Fibroblasts Predict Clinical Outcome in Colorectal Cancer. *Gut* **2017**, *66*, 1449–1462, doi:10.1136/gutjnl-2015-310977.
289. Chen, I.X.; Chauhan, V.P.; Posada, J.; Ng, M.R.; Wu, M.W.; Adstamongkonkul, P.; Huang, P.; Lindeman, N.; Langer, R.; Jain, R.K. Blocking CXCR4 Alleviates Desmoplasia, Increases T-Lymphocyte Infiltration, and Improves Immunotherapy in Metastatic Breast Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 4558–4566, doi:10.1073/pnas.1815515116.
290. Izumi, D.; Ishimoto, T.; Miyake, K.; Sugihara, H.; Eto, K.; Sawayama, H.; Yasuda, T.; Kiyozumi, Y.; Kaida, T.; Kurashige, J.; et al. CXCL12/CXCR4 Activation by Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Integrin B1 Clustering and Invasiveness in Gastric Cancer. *Int. J. Cancer* **2016**, *138*, 1207–1219, doi:10.1002/ijc.29864.
291. Günther, T.; Tulipano, G.; Dournaud, P.; Bousquet, C.; Csaba, Z.; Kreienkamp, H.-J.; Lupp, A.; Korbonits, M.; Castaño, J.P.; Wester, H.-J.; et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **2018**, *70*, 763–835, doi:10.1124/pr.117.015388.
292. Duluc, C.; Moatassim-Billah, S.; Chalabi-Dchar, M.; Perraud, A.; Samain, R.; Breibach, F.; Gayral, M.; Cordelier, P.; Delisle, M.B.; Bousquet-Dubouch, M.P.; et al. Pharmacological Targeting of the Protein Synthesis MTOR/4E-BP1 Pathway in Cancer-Associated Fibroblasts Abrogates Pancreatic Tumour Chemoresistance. *EMBO Mol Med* **2015**, *7*, 735–53, doi:10.15252/emmm.201404346.
293. Marques, P.; Barry, S.; Carlsen, E.; Collier, D.; Ronaldson, A.; Awad, S.; Dorward, N.; Grieve, J.; Mendoza, N.; Muquit, S.; et al. Pituitary Tumour Fibroblast-Derived Cytokines Influence Tumour Aggressiveness. *Endocr. Relat. Cancer* **2019**, *26*, 853–865, doi:10.1530/ERC-19-0327.
294. Moatassim-Billah, S.; Duluc, C.; Samain, R.; Jean, C.; Perraud, A.; Decaup, E.; Cassant-Sourdy, S.; Bakri, Y.; Selves, J.; Schmid, H.; et al. Anti-Metastatic Potential of Somatostatin Analog SOM230: Indirect Pharmacological Targeting of Pancreatic Cancer-Associated Fibroblasts. *Oncotarget* **2016**, *7*, 41584–41598, doi:10.18632/oncotarget.9296.
295. Samain, R.; Brunel, A.; Douché, T.; Fanjul, M.; Cassant-Sourdy, S.; Rochotte, J.; Cros, J.; Neuzillet, C.; Raffenne, J.; Duluc, C.; et al. Pharmacological Normalization of Pancreatic Cancer–Associated Fibroblast Secretome Impairs Pro-Metastatic Cross-Talk With Macrophages. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, S2352345X2100014X, doi:10.1016/j.jcmgh.2021.01.008.
296. Kanteti, R.; Mirzapozova, T.; Riehm, J.J.; Dhanasingh, I.; Mambetsariev, B.; Wang, J.; Kulkarni, P.; Kaushik, G.; Seshacharyulu, P.; Ponnusamy, M.P.; et al. Focal Adhesion Kinase a Potential Therapeutic Target for Pancreatic Cancer and Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Biol. Ther.* **2018**, *19*, 316–327, doi:10.1080/15384047.2017.1416937.
297. Lahlou, H.; Sanguin-Gendreau, V.; Zuo, D.; Cardiff, R.D.; McLean, G.W.; Frame, M.C.; Muller, W.J. Mammary Epithelial-Specific Disruption of the Focal Adhesion Kinase Blocks Mammary Tumor Progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 20302–20307, doi:10.1073/pnas.0710091104.
298. Sood, A.K.; Coffin, J.E.; Schneider, G.B.; Fletcher, M.S.; DeYoung, B.R.; Gruman, L.M.; Gershenson, D.M.; Schaller, M.D.; Hendrix, M.J.C. Biological Significance of Focal Adhesion Kinase in Ovarian Cancer: Role in Migration and Invasion. *Am. J. Pathol.* **2004**, *165*, 1087–1095, doi:10.1016/S0002-9440(10)63370-6.
299. Heffler, M.; Golubovskaya, V.M.; Conroy, J.; Liu, S.; Wang, D.; Cance, W.G.; Dunn, K.B. FAK and HAS Inhibition Synergistically Decrease Colon Cancer Cell Viability and Affect Expression of Critical Genes. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 584–594, doi:10.2174/1871520611313040008.
300. Diaz Osterman, C.J.; Ozmadenci, D.; Kleinschmidt, E.G.; Taylor, K.N.; Barrie, A.M.; Jiang, S.; Bean, L.M.; Sulzmaier, F.J.; Jean, C.; Tancioni, I.; et al. FAK Activity Sustains Intrinsic and Acquired Ovarian Cancer Resistance to Platinum Chemotherapy. *eLife* **2019**, *8*, doi:10.7554/eLife.47327.
301. Sulzmaier, F.J.; Jean, C.; Schlaepfer, D.D. FAK in Cancer: Mechanistic Findings and Clinical Applications. *Nat Rev Cancer* **2014**, *14*, 598–610, doi:10.1038/nrc3792.

302. Tancioni, I.; Uryu, S.; Sulzmaier, F.J.; Shah, N.R.; Lawson, C.; Miller, N.L.; Jean, C.; Chen, X.L.; Ward, K.K.; Schlaepfer, D.D. FAK Inhibition Disrupts a Beta5 Integrin Signaling Axis Controlling Anchorage-Independent Ovarian Carcinoma Growth. *Mol Cancer Ther* **2014**, *13*, 2050–61, doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-1063. 1763
303. Tancioni, I.; Miller, N.L.; Uryu, S.; Lawson, C.; Jean, C.; Chen, X.L.; Kleinschmidt, E.G.; Schlaepfer, D.D. FAK Activity Protects Nucleostemin in Facilitating Breast Cancer Spheroid and Tumor Growth. *Breast Cancer Res* **2015**, *17*, 47, doi:10.1186/s13058-015-0551-x. 1764
304. Shah, N.R.; Tancioni, I.; Ward, K.K.; Lawson, C.; Chen, X.L.; Jean, C.; Sulzmaier, F.J.; Uryu, S.; Miller, N.L.; Connolly, D.C.; et al. Analyses of Merlin/NF2 Connection to FAK Inhibitor Responsiveness in Serous Ovarian Cancer. *Gynecol Oncol* **2014**, *134*, 104–11, doi:10.1016/j.ygyno.2014.04.044. 1765
305. Jean, C.; Chen, X.L.; Nam, J.-O.; Tancioni, I.; Uryu, S.; Lawson, C.; Ward, K.K.; Walsh, C.T.; Miller, N.L.G.; Ghassemian, M.; et al. Inhibition of Endothelial FAK Activity Prevents Tumor Metastasis by Enhancing Barrier Function. *J. Cell Biol.* **2014**, *204*, 247–263, doi:10.1083/jcb.201307067. 1766
306. Ward, K.K.; Tancioni, I.; Lawson, C.; Miller, N.L.; Jean, C.; Chen, X.L.; Uryu, S.; Kim, J.; Tarin, D.; Stupack, D.G.; et al. Inhibition of Focal Adhesion Kinase (FAK) Activity Prevents Anchorage-Independent Ovarian Carcinoma Cell Growth and Tumor Progression. *Clin Exp Metastasis* **2013**, *30*, 579–94, doi:10.1007/s10585-012-9562-5. 1767
307. Jiang, H.; Hegde, S.; Knolhoff, B.L.; Zhu, Y.; Herndon, J.M.; Meyer, M.A.; Nywening, T.M.; Hawkins, W.G.; Shapiro, I.M.; Weaver, D.T.; et al. Targeting Focal Adhesion Kinase Renders Pancreatic Cancers Responsive to Checkpoint Immunotherapy. *Nat Med* **2016**, *22*, 851–60, doi:10.1038/nm.4123. 1768
308. Zaghdoudi, S.; Decaup, E.; Belhabib, I.; Samain, R.; Cassant-Sourdy, S.; Rochotte, J.; Brunel, A.; Schlaepfer, D.; Cros, J.; Neuzillet, C.; et al. FAK Activity in Cancer-Associated Fibroblasts Is a Prognostic Marker and a Druggable Key Metastatic Player in Pancreatic Cancer. *EMBO Mol. Med.* **2020**, *12*, e12010, doi:10.15252/emmm.202012010. 1769
309. Wu, H.-J.; Hao, M.; Yeo, S.K.; Guan, J.-L. FAK Signaling in Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Breast Cancer Cell Migration and Metastasis by Exosomal MiRNAs-Mediated Intercellular Communication. *Oncogene* **2020**, *39*, 2539–2549, doi:10.1038/s41388-020-1162-2. 1770
310. Stokes, J.B.; Adair, S.J.; Slack-Davis, J.K.; Walters, D.M.; Tilghman, R.W.; Hershey, E.D.; Lowrey, B.; Thomas, K.S.; Bouton, A.H.; Hwang, R.F.; et al. Inhibition of Focal Adhesion Kinase by PF-562,271 Inhibits the Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer Concomitant with Altering the Tumor Microenvironment. *Mol Cancer Ther* **2011**, *10*, 2135–45, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0261. 1771
311. Murphy, J.M.; Rodriguez, Y.A.R.; Jeong, K.; Ahn, E.-Y.E.; Lim, S.-T.S. Targeting Focal Adhesion Kinase in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 877–886, doi:10.1038/s12276-020-0447-4. 1772
312. Wang-Gillam, A.; McWilliams, R.; Lockhart, A.C.; Tan, B.R.; Suresh, R.; Lim, K.-H.; Pedersen, K.S.; Trikalinos, N.; Aranha, O.; Park, H.; et al. Abstract CT118: Phase I Study of Defactinib Combined with Pembrolizumab and Gemcitabine in Patients with Advanced Cancer: Experiences of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) Patients. *Cancer Res.* **2020**, *80*, CT118–CT118, doi:10.1158/1538-7445.AM2020-CT118. 1773
313. Provenzano, P.P.; Cuevas, C.; Chang, A.E.; Goel, V.K.; Von Hoff, D.D.; Hingorani, S.R. Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 418–429, doi:10.1016/j.ccr.2012.01.007. 1774
314. Jacobetz, M.A.; Chan, D.S.; Neesse, A.; Bapiro, T.E.; Cook, N.; Frese, K.K.; Feig, C.; Nakagawa, T.; Caldwell, M.E.; Zecchini, H.I.; et al. Hyaluronan Impairs Vascular Function and Drug Delivery in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Gut* **2013**, *62*, 112–120, doi:10.1136/gutjnl-2012-302529. 1775
315. Eikenes, L.; Tufte, I.; Schnell, E.A.; Bjørkøy, A.; De Lange Davies, C. Effect of Collagenase and Hyaluronidase on Free and Anomalous Diffusion in Multicellular Spheroids and Xenografts. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 359–368. 1776

316. Guan, X.; Lin, L.; Chen, J.; Hu, Y.; Sun, P.; Tian, H.; Maruyama, A.; Chen, X. Efficient PD-L1 Gene Silence Promoted by Hyaluronidase for Cancer Immunotherapy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2019**, *293*, 104–112, doi:10.1016/j.jconrel.2018.11.022. 1804 1805 1806
317. Thompson, C.B.; Shepard, H.M.; O'Connor, P.M.; Kadhim, S.; Jiang, P.; Osgood, R.J.; Bookbinder, L.H.; Li, X.; Sugarman, B.J.; Connor, R.J.; et al. Enzymatic Depletion of Tumor Hyaluronan Induces Antitumor Responses in Preclinical Animal Models. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 3052–3064, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0470. 1807 1808 1809
318. Hingorani, S.R.; Zheng, L.; Bullock, A.J.; Seery, T.E.; Harris, W.P.; Sigal, D.S.; Braithe, F.; Ritch, P.S.; Zalupski, M.M.; Bahary, N.; et al. HALO 202: Randomized Phase II Study of PEGPH20 Plus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine Versus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine in Patients With Untreated, Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 359–366, doi:10.1200/JCO.2017.74.9564. 1810 1811 1812 1813
319. Van Cutsem, E.; Tempero, M.A.; Sigal, D.; Oh, D.-Y.; Fazio, N.; Macarulla, T.; Hitre, E.; Hammel, P.; Hendifar, A.E.; Bates, S.E.; et al. Randomized Phase III Trial of Pegvorhyaluronidase Alfa With Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine for Patients With Hyaluronan-High Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 3185–3194, doi:10.1200/JCO.20.00590. 1814 1815 1816
320. Ramanathan, R.K.; McDonough, S.L.; Philip, P.A.; Hingorani, S.R.; Lacy, J.; Kortmansky, J.S.; Thumar, J.; Chiorean, E.G.; Shields, A.F.; Behl, D.; et al. Phase IB/II Randomized Study of FOLFIRINOX Plus Pegylated Recombinant Human Hyaluronidase Versus FOLFIRINOX Alone in Patients With Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: SWOG S1313. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 1062–1069, doi:10.1200/JCO.18.01295. 1817 1818 1819 1820
321. Hakim, N.; Patel, R.; Devoe, C.; Saif, M.W. Why HALO 301 Failed and Implications for Treatment of Pancreatic Cancer. *Pancreas Fairfax Va* **2019**, *3*, e1–e4, doi:10.17140/POJ-3-e010. 1821 1822
322. Eikenes, L.; Bruland, Ø.S.; Brekken, C.; Davies, C. de L. Collagenase Increases the Transcapillary Pressure Gradient and Improves the Uptake and Distribution of Monoclonal Antibodies in Human Osteosarcoma Xenografts. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4768–4773, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-1472. 1823 1824 1825
323. Magzoub, M.; Jin, S.; Verkman, A.S. Enhanced Macromolecule Diffusion Deep in Tumors after Enzymatic Digestion of Extracellular Matrix Collagen and Its Associated Proteoglycan Decorin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2008**, *22*, 276–284, doi:10.1096/fj.07-9150com. 1826 1827 1828
324. Dolor, A.; Szoka, F.C. Digesting a Path Forward: The Utility of Collagenase Tumor Treatment for Improved Drug Delivery. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 2069–2083, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00319. 1829 1830
325. Hauge, A.; Rofstad, E.K. Antifibrotic Therapy to Normalize the Tumor Microenvironment. *J. Transl. Med.* **2020**, *18*, 207, doi:10.1186/s12967-020-02376-y. 1831 1832
326. Paolillo, M.; Schinelli, S. Extracellular Matrix Alterations in Metastatic Processes. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20194947. 1833 1834
327. Bassiouni, W.; Ali, M.A.M.; Schulz, R. Multifunctional Intracellular Matrix Metalloproteinases: Implications in Disease. *FEBS J. n/a*, doi:https://doi.org/10.1111/febs.15701. 1835 1836
328. Alaseem, A.; Alhazzani, K.; Dondapati, P.; Alobid, S.; Bishayee, A.; Rathinavelu, A. Matrix Metalloproteinases: A Challenging Paradigm of Cancer Management. *Semin. Cancer Biol.* **2019**, *56*, 100–115, doi:10.1016/j.semcancer.2017.11.008. 1837 1838
329. Winer, A.; Adams, S.; Mignatti, P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures into Future Successes. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 1147–1155, doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0646. 1839 1840
330. Cathcart, J.; Pulkoski-Gross, A.; Cao, J. Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. *Genes Dis.* **2015**, *2*, 26–34, doi:10.1016/j.gendis.2014.12.002. 1841 1842
331. Coussens, L.M.; Fingleton, B.; Matrisian, L.M. Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer: Trials and Tribulations. *Science* **2002**, *295*, 2387–2392, doi:10.1126/science.1067100. 1843 1844

332. Lubbe, W.J.; Zhou, Z.Y.; Fu, W.; Zuzga, D.; Schulz, S.; Fridman, R.; Muschel, R.J.; Waldman, S.A.; Pitari, G.M. Tumor Epithelial Cell Matrix Metalloproteinase 9 Is a Target for Antimetastatic Therapy in Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2006**, *12*, 1876–1882, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2686.
333. Marshall, D.C.; Lyman, S.K.; McCauley, S.; Kovalenko, M.; Spangler, R.; Liu, C.; Lee, M.; O’Sullivan, C.; Barry-Hamilton, V.; Ghermazien, H.; et al. Selective Allosteric Inhibition of MMP9 Is Efficacious in Preclinical Models of Ulcerative Colitis and Colorectal Cancer. *PLoS One* **2015**, *10*, e0127063, doi:10.1371/journal.pone.0127063.
334. Devy, L.; Huang, L.; Naa, L.; Yanamandra, N.; Pieters, H.; Frans, N.; Chang, E.; Tao, Q.; Vanhove, M.; Lejeune, A.; et al. Selective Inhibition of Matrix Metalloproteinase-14 Blocks Tumor Growth, Invasion, and Angiogenesis. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 1517–1526, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3255.
335. Nadir, Y.; Brenner, B. Heparanase Multiple Effects in Cancer. *Thromb. Res.* **2014**, *133 Suppl 2*, S90-94, doi:10.1016/S0049-3848(14)50015-1.
336. Harisi, R.; Jeney, A. Extracellular Matrix as Target for Antitumor Therapy. *OncoTargets Ther.* **2015**, *8*, 1387–1398, doi:10.2147/OTT.S48883.
337. Ritchie, J.P.; Ramani, V.C.; Ren, Y.; Naggi, A.; Torri, G.; Casu, B.; Penco, S.; Pisano, C.; Carminati, P.; Tortoreto, M.; et al. SST0001, a Chemically Modified Heparin, Inhibits Myeloma Growth and Angiogenesis via Disruption of the Heparanase/Syndecan-1 Axis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2011**, *17*, 1382–1393, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2476.
338. Meirovitz, A.; Hermano, E.; Lerner, I.; Zcharia, E.; Pisano, C.; Peretz, T.; Elkin, M. Role of Heparanase in Radiation-Enhanced Invasiveness of Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 2772–2780, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3402.
339. Cassinelli, G.; Favini, E.; Dal Bo, L.; Tortoreto, M.; De Maglie, M.; Dagrada, G.; Pilotti, S.; Zunino, F.; Zaffaroni, N.; Lanzi, C. Antitumor Efficacy of the Heparan Sulfate Mimic Roneparstat (SST0001) against Sarcoma Models Involves Multi-Target Inhibition of Receptor Tyrosine Kinases. *Oncotarget* **2016**, *7*, 47848–47863, doi:10.18632/oncotarget.10292.
340. Galli, M.; Chatterjee, M.; Grasso, M.; Specchia, G.; Magen, H.; Einsele, H.; Celeghini, I.; Barbieri, P.; Paoletti, D.; Pace, S.; et al. Phase I Study of the Heparanase Inhibitor Roneparstat: An Innovative Approach for Multiple Myeloma Therapy. *Haematologica* **2018**, *103*, e469–e472, doi:10.3324/haematol.2017.182865.
341. O’Reilly, E.M.; Barone, D.; Mahalingam, D.; Bekaii-Saab, T.; Shao, S.H.; Wolf, J.; Rosano, M.; Krause, S.; Richards, D.A.; Yu, K.H.; et al. Randomised Phase II Trial of Gemcitabine and Nab-Paclitaxel with Necuparanib or Placebo in Untreated Metastatic Pancreas Ductal Adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **2020**, *132*, 112–121, doi:10.1016/j.ejca.2020.03.005.
342. Saatci, O.; Kaymak, A.; Raza, U.; Ersan, P.G.; Akbulut, O.; Banister, C.E.; Sikirzhyski, V.; Tokat, U.M.; Aykut, G.; Ansari, S.A.; et al. Targeting Lysyl Oxidase (LOX) Overcomes Chemotherapy Resistance in Triple Negative Breast Cancer. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2416, doi:10.1038/s41467-020-16199-4.
343. Xie, P.; Yu, H.; Wang, F.; Yan, F.; He, X. Inhibition of LOXL2 Enhances the Radiosensitivity of Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Associated with the Reversal of the EMT Process. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 4012590, doi:10.1155/2019/4012590.
344. Miller, B.W.; Morton, J.P.; Pinese, M.; Saturno, G.; Jamieson, N.B.; McGhee, E.; Timpson, P.; Leach, J.; McGarry, L.; Shanks, E.; et al. Targeting the LOX/Hypoxia Axis Reverses Many of the Features That Make Pancreatic Cancer Deadly: Inhibition of LOX Abrogates Metastasis and Enhances Drug Efficacy. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7*, 1063–1076, doi:10.15252/emmm.201404827.
345. Jiang, H.; Torphy, R.J.; Steiger, K.; Hongo, H.; Ritchie, A.J.; Kriegsmann, M.; Horst, D.; Umetsu, S.E.; Joseph, N.M.; McGregor, K.; et al. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression Is Restrained by Stromal Matrix. *J. Clin. Invest.* **2020**, *130*, 4704–4709, doi:10.1172/JCI136760.
346. Benson, A.B.; Wainberg, Z.A.; Hecht, J.R.; Vyushkov, D.; Dong, H.; Bendell, J.; Kudrik, F. A Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Simtuzumab or Placebo in Combination with Gemcitabine for the First-Line Treatment of Pancreatic Adenocarcinoma. *The Oncologist* **2017**, *22*, 241–e15, doi:10.1634/theoncologist.2017-0024.

347. Zhang, L.; Gülses, A.; Purcz, N.; Weimer, J.; Wiltfang, J.; Açı, Y. A Comparative Assessment of the Effects of Integrin Inhibitor Cilengitide on Primary Culture of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) and HNSCC Cell Lines. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* **2019**, *21*, 1052–1060, doi:10.1007/s12094-018-02025-3. 1886–1888
348. Guo, L.; Song, N.; He, T.; Qi, F.; Zheng, S.; Xu, X.-G.; Fu, Y.; Chen, H.-D.; Luo, Y. Endostatin Inhibits the Tumorigenesis of Hemangioendothelioma via Downregulation of CXCL1. *Mol. Carcinog.* **2015**, *54*, 1340–1353, doi:10.1002/mc.22210. 1889–1890
349. Wu, X.; Cai, J.; Zuo, Z.; Li, J. Collagen Facilitates the Colorectal Cancer Stemness and Metastasis through an Integrin/PI3K/AKT/Snail Signaling Pathway. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **2019**, *114*, 108708, doi:10.1016/j.biopha.2019.108708. 1891–1893
350. Stupp, R.; Hegi, M.E.; Gorlia, T.; Erridge, S.C.; Perry, J.; Hong, Y.-K.; Aldape, K.D.; Lhermitte, B.; Pietsch, T.; Grujicic, D.; et al. Cilengitide Combined with Standard Treatment for Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma with Methylated MGMT Promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 Study): A Multicentre, Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 1100–1108, doi:10.1016/S1470-2045(14)70379-1. 1894–1897
351. Vansteenkiste, J.; Barlesi, F.; Waller, C.F.; Bennouna, J.; Gridelli, C.; Goekkurt, E.; Verhoeven, D.; Szczesna, A.; Feurer, M.; Milanowski, J.; et al. Cilengitide Combined with Cetuximab and Platinum-Based Chemotherapy as First-Line Treatment in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients: Results of an Open-Label, Randomized, Controlled Phase II Study (CERTO). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2015**, *26*, 1734–1740, doi:10.1093/annonc/mdv219. 1898–1901
352. Élez, E.; Kocáková, I.; Höhler, T.; Martens, U.M.; Bokemeyer, C.; Van Cutsem, E.; Melichar, B.; Smakal, M.; Csősz, T.; Topuzov, E.; et al. Abituzumab Combined with Cetuximab plus Irinotecan versus Cetuximab plus Irinotecan Alone for Patients with KRAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: The Randomised Phase I/II POSEIDON Trial. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2015**, *26*, 132–140, doi:10.1093/annonc/mdu474. 1902–1905
353. Vermorken, J.B.; Peyrade, F.; Krauss, J.; Mesía, R.; Remenar, E.; Gauler, T.C.; Keilholz, U.; Delord, J.P.; Schafhausen, P.; Erfán, J.; et al. Cisplatin, 5-Fluorouracil, and Cetuximab (PFE) with or without Cilengitide in Recurrent/Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Results of the Randomized Phase I/II ADVANTAGE Trial (Phase II Part). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2014**, *25*, 682–688, doi:10.1093/annonc/mdu003. 1906–1909
354. Hecht, J.R.; Benson, A.B.; Vyushkov, D.; Yang, Y.; Bendell, J.; Verma, U. A Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Simtuzumab in Combination with FOLFIRI for the Second-Line Treatment of Metastatic KRAS Mutant Colorectal Adenocarcinoma. *The Oncologist* **2017**, *22*, 243–e23, doi:10.1634/theoncologist.2016-0479. 1910–1912
355. Harris, N.L.E.; Vennin, C.; Conway, J.R.W.; Vine, K.L.; Pinese, M.; Cowley, M.J.; Shearer, R.F.; Lucas, M.C.; Herrmann, D.; Allam, A.H.; et al. SerpinB2 Regulates Stromal Remodelling and Local Invasion in Pancreatic Cancer. *Oncogene* **2017**, *36*, 4288–4298, doi:10.1038/onc.2017.63. 1913–1915
356. Nobis, M.; Herrmann, D.; Warren, S.C.; Kadir, S.; Leung, W.; Killen, M.; Magenau, A.; Stevenson, D.; Lucas, M.C.; Reischmann, N.; et al. A RhoA-FRET Biosensor Mouse for Intravital Imaging in Normal Tissue Homeostasis and Disease Contexts. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 274–288, doi:10.1016/j.celrep.2017.09.022. 1916–1918
357. Chakraborty, S.; Njah, K.; Pobbati, A.V.; Lim, Y.B.; Raju, A.; Lakshmanan, M.; Tergaonkar, V.; Lim, C.T.; Hong, W. Agrin as a Mechanotransduction Signal Regulating YAP through the Hippo Pathway. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 2464–2479, doi:10.1016/j.celrep.2017.02.041. 1919–1921
358. Yeo, D.; Phillips, P.; Baldwin, G.S.; He, H.; Nikfarjam, M. Inhibition of Group 1 P21-Activated Kinases Suppresses Pancreatic Stellate Cell Activation and Increases Survival of Mice with Pancreatic Cancer. *Int. J. Cancer* **2017**, *140*, 2101–2111, doi:10.1002/ijc.30615. 1922–1923
359. Chou, A.; Froio, D.; Nagrial, A.M.; Parkin, A.; Murphy, K.J.; Chin, V.T.; Wohl, D.; Steinmann, A.; Stark, R.; Drury, A.; et al. Tailored First-Line and Second-Line CDK4-Targeting Treatment Combinations in Mouse Models of Pancreatic Cancer. *Gut* **2018**, *67*, 2142–2155, doi:10.1136/gutjnl-2017-315144. 1924–1926

360. Craig, D.H.; Haimovich, B.; Basson, M.D. Alpha-Actinin-1 Phosphorylation Modulates Pressure-Induced Colon Cancer Cell Adhesion through Regulation of Focal Adhesion Kinase-Src Interaction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2007**, *293*, C1862–1874, doi:10.1152/ajpcell.00118.2007.
361. Provenzano, P.P.; Inman, D.R.; Eliceiri, K.W.; Keely, P.J. Matrix Density-Induced Mechanoregulation of Breast Cell Phenotype, Signaling, and Gene Expression through a FAK-ERK Linkage. *Oncogene* **2009**, *28*, 4326–4343, doi:10.1038/onc.2009.299.
362. Rath, N.; Morton, J.P.; Julian, L.; Helbig, L.; Kadir, S.; McGhee, E.J.; Anderson, K.I.; Kalna, G.; Mullin, M.; Pinho, A.V.; et al. ROCK Signaling Promotes Collagen Remodeling to Facilitate Invasive Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Tumor Cell Growth. *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 198–218, doi:10.15252/emmm.201606743.
363. Chin, V.T.; Nagrial, A.M.; Chou, A.; Biankin, A.V.; Gill, A.J.; Timpson, P.; Pajic, M. Rho-Associated Kinase Signalling and the Cancer Microenvironment: Novel Biological Implications and Therapeutic Opportunities. *Expert Rev. Mol. Med.* **2015**, *17*, e17, doi:10.1017/erm.2015.17.
364. Holvoet, T.; Devriese, S.; Castermans, K.; Boland, S.; Leysen, D.; Vandewynckel, Y.-P.; Devisscher, L.; Van den Bossche, L.; Van Welden, S.; Dullaers, M.; et al. Treatment of Intestinal Fibrosis in Experimental Inflammatory Bowel Disease by the Pleiotropic Actions of a Local Rho Kinase Inhibitor. *Gastroenterology* **2017**, *153*, 1054–1067, doi:10.1053/j.gastro.2017.06.013.
365. Vennin, C.; Chin, V.T.; Warren, S.C.; Lucas, M.C.; Herrmann, D.; Magenau, A.; Melenec, P.; Walters, S.N.; Del Monte-Nieto, G.; Conway, J.R.W.; et al. Transient Tissue Priming via ROCK Inhibition Uncouples Pancreatic Cancer Progression, Sensitivity to Chemotherapy, and Metastasis. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, doi:10.1126/scitranslmed.aai8504.
366. Vennin, C.; Rath, N.; Pajic, M.; Olson, M.F.; Timpson, P. Targeting ROCK Activity to Disrupt and Prime Pancreatic Cancer for Chemotherapy. *Small GTPases* **2020**, *11*, 45–52, doi:10.1080/21541248.2017.1345712.
367. Guerra, F.S.; Oliveira, R.G. de; Fraga, C.A.M.; Mermelstein, C. dos S.; Fernandes, P.D. ROCK Inhibition with Fasudil Induces Beta-Catenin Nuclear Translocation and Inhibits Cell Migration of MDA-MB 231 Human Breast Cancer Cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13723, doi:10.1038/s41598-017-14216-z.
368. Poisson, L.; Lopez-Charcas, O.; Chadet, S.; Bon, E.; Lemoine, R.; Brisson, L.; Ouaisi, M.; Baron, C.; Besson, P.; Roger, S.; et al. Rock Inhibition Promotes Na V 1.5 Sodium Channel-Dependent SW620 Colon Cancer Cell Invasiveness. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 13350, doi:10.1038/s41598-020-70378-3.
369. Giussani, M.; Merlino, G.; Cappelletti, V.; Tagliabue, E.; Daidone, M.G. Tumor-Extracellular Matrix Interactions: Identification of Tools Associated with Breast Cancer Progression. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *35*, 3–10, doi:10.1016/j.semcancer.2015.09.012.
370. Triulzi, T.; Casalini, P.; Sandri, M.; Ratti, M.; Carcangiu, M.L.; Colombo, M.P.; Balsari, A.; Ménard, S.; Orlandi, R.; Tagliabue, E. Neoplastic and Stromal Cells Contribute to an Extracellular Matrix Gene Expression Profile Defining a Breast Cancer Subtype Likely to Progress. *PLoS One* **2013**, *8*, e56761, doi:10.1371/journal.pone.0056761.
371. Naba, A.; Clauser, K.R.; Whittaker, C.A.; Carr, S.A.; Tanabe, K.K.; Hynes, R.O. Extracellular Matrix Signatures of Human Primary Metastatic Colon Cancers and Their Metastases to Liver. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 518, doi:10.1186/1471-2407-14-518.
372. Lim, S.B.; Tan, S.J.; Lim, W.-T.; Lim, C.T. An Extracellular Matrix-Related Prognostic and Predictive Indicator for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1734, doi:10.1038/s41467-017-01430-6.
373. Yuzhalin, A.E.; Urbonas, T.; Silva, M.A.; Muschel, R.J.; Gordon-Weeks, A.N. A Core Matrisome Gene Signature Predicts Cancer Outcome. *Br. J. Cancer* **2018**, *118*, 435–440, doi:10.1038/bjc.2017.458.
374. Van den Eynden, J.; Larsson, E. Mutational Signatures Are Critical for Proper Estimation of Purifying Selection Pressures in Cancer Somatic Mutation Data When Using the DN/DS Metric. *Front. Genet.* **2017**, *8*, 74, doi:10.3389/fgene.2017.00074.
375. Sund, M.; Kalluri, R. Tumor Stroma Derived Biomarkers in Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2009**, *28*, 177–183, doi:10.1007/s10555-008-9175-2.
376. Giussani, M.; Landoni, E.; Merlino, G.; Turdo, F.; Veneroni, S.; Paolini, B.; Cappelletti, V.; Miceli, R.; Orlandi, R.; Triulzi, T.; et al. Extracellular Matrix Proteins as Diagnostic Markers of Breast Carcinoma. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 6280–6290, doi:10.1002/jcp.26513.

377. Mazouni, C.; Arun, B.; André, F.; Ayers, M.; Krishnamurthy, S.; Wang, B.; Hortobagyi, G.N.; Buzdar, A.U.; Pusztai, L. Collagen IV Levels Are Elevated in the Serum of Patients with Primary Breast Cancer Compared to Healthy Volunteers. *Br. J. Cancer* **2008**, *99*, 68–71, doi:10.1038/sj.bjc.6604443.
378. Wilson, S.; Damery, S.; Stocken, D.D.; Dowswell, G.; Holder, R.; Ward, S.T.; Redman, V.; Wakelam, M.J.; James, J.; Hobbs, F.D.R.; et al. Serum Matrix Metalloproteinase 9 and Colorectal Neoplasia: A Community-Based Evaluation of a Potential Diagnostic Test. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 1431–1438, doi:10.1038/bjc.2012.93.
379. Emara, M.; Cheung, P.-Y.; Grabowski, K.; Sawicki, G.; Wozniak, M. Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 and Conventional Tumor Markers (CEA and CA 19-9) in Patients with Colorectal and Gastric Cancers. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2009**, *47*, 993–1000, doi:10.1515/CCLM.2009.212.
380. Biasi, F.; Guina, T.; Maina, M.; Nano, M.; Falcone, A.; Arosio, E.; Saracco, G.M.; Papotti, M.; Leonarduzzi, G.; Poli, G. Progressive Increase of Matrix Metalloprotease-9 and Interleukin-8 Serum Levels during Carcinogenic Process in Human Colorectal Tract. *PloS One* **2012**, *7*, e41839, doi:10.1371/journal.pone.0041839.
381. Mroczko, B.; Groblewska, M.; Okulczyk, B.; Kedra, B.; Szmitkowski, M. The Diagnostic Value of Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases 1 (TIMP-1) Determination in the Sera of Colorectal Adenoma and Cancer Patients. *Int. J. Colorectal Dis.* **2010**, *25*, 1177–1184, doi:10.1007/s00384-010-0991-9.
382. Gimeno-García, A.Z.; Triñanes, J.; Quintero, E.; Salido, E.; Nicolás-Pérez, D.; Adrián-de-Ganzo, Z.; Alarcón-Fernández, O.; Abrante, B.; Romero, R.; Carrillo, M.; et al. Plasma Matrix Metalloproteinase 9 as an Early Surrogate Biomarker of Advanced Colorectal Neoplasia. *Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *39*, 433–441, doi:10.1016/j.gastrohep.2015.10.002.
383. Kehlet, S.N.; Sanz-Pamplona, R.; Brix, S.; Leeming, D.J.; Karsdal, M.A.; Moreno, V. Excessive Collagen Turnover Products Are Released during Colorectal Cancer Progression and Elevated in Serum from Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30599, doi:10.1038/srep30599.
384. Öhlund, D.; Lundin, C.; Ardnor, B.; Öman, M.; Naredi, P.; Sund, M. Type IV Collagen Is a Tumour Stroma-Derived Biomarker for Pancreas Cancer. *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 91–97, doi:10.1038/sj.bjc.6605107.
385. Kahlert, C.; Fiala, M.; Musso, G.; Halama, N.; Keim, S.; Mazzone, M.; Lasitschka, F.; Pecqueux, M.; Klupp, F.; Schmidt, T.; et al. Prognostic Impact of a Compartment-Specific Angiogenic Marker Profile in Patients with Pancreatic Cancer. *Oncotarget* **2014**, *5*, 12978–12989, doi:10.18632/oncotarget.2651.
386. Mroczko, B.; Lukaszewicz-Zajac, M.; Wereszczynska-Siemiatkowska, U.; Groblewska, M.; Gryko, M.; Kedra, B.; Jurkowska, G.; Szmitkowski, M. Clinical Significance of the Measurements of Serum Matrix Metalloproteinase-9 and Its Inhibitor (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1) in Patients with Pancreatic Cancer: Metalloproteinase-9 as an Independent Prognostic Factor. *Pancreas* **2009**, *38*, 613–618, doi:10.1097/MPA.0b013e3181a488a0.
387. Resovi, A.; Bani, M.R.; Porcu, L.; Anastasia, A.; Minoli, L.; Allavena, P.; Cappello, P.; Novelli, F.; Scarpa, A.; Morandi, E.; et al. Soluble Stroma-Related Biomarkers of Pancreatic Cancer. *EMBO Mol. Med.* **2018**, *10*, doi:10.15252/emmm.201708741.
388. Franklin, O.; Öhlund, D.; Lundin, C.; Öman, M.; Naredi, P.; Wang, W.; Sund, M. Combining Conventional and Stroma-Derived Tumour Markers in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers* **2015**, *15*, 1–10, doi:10.3233/CBM-140430.
389. Balasenthil, S.; Huang, Y.; Liu, S.; Marsh, T.; Chen, J.; Stass, S.A.; KuKuruga, D.; Brand, R.; Chen, N.; Frazier, M.L.; et al. A Plasma Biomarker Panel to Identify Surgically Resectable Early-Stage Pancreatic Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109*, doi:10.1093/jnci/djw341.
390. Capello, M.; Bantis, L.E.; Scelo, G.; Zhao, Y.; Li, P.; Dhillon, D.S.; Patel, N.J.; Kundnani, D.L.; Wang, H.; Abbruzzese, J.L.; et al. Sequential Validation of Blood-Based Protein Biomarker Candidates for Early-Stage Pancreatic Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109*, doi:10.1093/jnci/djw266.

Titre : FAK inhibiteur et chimiothérapie : une nouvelle stratégie prometteuse pour les patients atteints de cancer pancréatique

Mots clés : kinase d'adhésion focale, adénocarcinome pancréatique canalaire, fibroblastes associés au cancer, Vaisseaux, matrice extracellulaire

Résumé : Les chimiothérapies atteignent la tumeur par le système vasculaire, faisant de la quantité et la qualité des vaisseaux sanguins un régulateur clé de l'efficacité des drogues. Or, dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC), les vaisseaux sont peu nombreux, tortueux et perméables, et ceci est notamment dû à une importante réaction desmoplastique. Nous pensons que réduire cette réaction pourrait favoriser la normalisation des vaisseaux et ainsi améliorer l'entrée des chimiothérapies dans la tumeur. Nous avons récemment identifié que l'activation de Focal Adhesion Kinase (FAK) dans les fibroblastes associés au cancer (CAF) est un facteur de mauvais pronostic pour le patient. Dans un modèle de co-greffe orthotopique de cellules tumorales de PDAC avec des MEF (mouse embryonic fibroblasts) exprimant une forme active (Wild Type, WT) ou inactive (Kinase Dead, KD) de FAK, nous avons montré que l'inactivation FAK fibroblastique réduit la production de certaines protéines matricielles responsables de la desmoplasie, et que ce remodelage matriciel corrèle avec une diminution des métastases. Nous postulons donc que l'activité kinase de FAK dans les CAF participe au maintien de la réaction desmoplastique et par conséquent à la génération d'un réseau vasculaire anormal participant à la dissémination métastatique. L'inactivation de FAK, en normalisant le stroma, pourrait alors rendre les vaisseaux moins perméables et ainsi favoriser l'accès des drogues à la tumeur. Pour étudier le rôle de FAK dans les CAF, j'ai poursuivi l'analyse du modèle de co-greffe (MEF) et ai également développé deux autres modèles murins immunocompétents et orthotopiques de PDAC, dans lesquels les CAF expriment un FAK WT ou KD : 1- modèle de co-greffe de PSC (pancreatic stellate cells) FAK-WT ou KD avec des cellules de PDAC et 2- un modèle d'inactivation (FAK^{fl}/WT ou FAK^{fl}/KD) inducible (Cre(ERT2)) de FAK spécifiquement dans les PSC (promoteur GFAP) greffé avec des cellules tumorales de PDAC. Dans ces modèles, l'inactivation de FAK dans les CAF semble réduire la croissance tumorale et les métastases et induit un remodelage matriciel dans la tumeur primaire. L'analyse précise de l'expression des protéines matricielles (spectrométrie de masse) des tumeurs dans le modèle de co-greffe de MEFs montre que l'inactivation de FAK dans les CAF induit une diminution importante des "protéines matricielles pro-tumorales" associée à une forte augmentation de protéines de la membrane basale (MB). L'analyse immunohistochimique de ces protéines de la MB révèle une accumulation de collagène IV spécifiquement autour des vaisseaux. Ces modifications de la MB autour des vaisseaux s'accompagne d'une diminution de la perméabilité vasculaire dans la condition où FAK fibroblastique est inactivé, révélant une normalisation vasculaire. Nous observons la même tendance (non significative, peu d'animaux) à la diminution de la perméabilité vasculaire dans la tumeur primaire et organes de métastases dans le modèle inducible. Au vue de cette normalisation vasculaire, nous avons évalué l'impact d'un co-traitement avec des chimiothérapies (gemcitabine et folfirinix) par injection intraveineuse. La combinaison des chimiothérapies avec l'inactivation de FAK dans les fibroblastes réduit drastiquement la croissance tumorale dans tous nos modèles soutenant ainsi l'idée de combiner les chimiothérapies avec un inhibiteur de FAK chez les patients atteints de PDAC. Enfin, dans le modèle inducible lorsque FAK est inactif dans les fibroblastes, nous observons une infiltration massive de lymphocytes T CD8 associée à une augmentation du nombre de structures lymphoïdes tertiaires et de HEV (high endothelial venules) connus pour permettre l'entrée des lymphocytes dans la tumeur facilitant ainsi l'immunité anti-tumorale. Ces derniers résultats ouvrent de nombreuses perspectives intéressantes telles que des co-traitement avec des checkpoints inhibiteurs, à l'heure actuel inefficaces dans le PDAC.

Title: FAK inhibitor and chemotherapy : a new promising strategy for patients with pancreatic cancer

Key words: cancer-associated fibroblasts, pancreatic ductal adenocarcinoma, focal adhesion kinase, Blood vessels, extracellular matrix

Abstract: Chemotherapies reach the tumor via the vascular system, making the quantity and quality of blood vessels a key regulator of drug efficacy. However, in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), the vessels are few, tortuous and permeable, and this is notably due to a significant desmoplastic reaction. We hypothesize that reducing this reaction could promote vessel normalization and thus improve the entry of chemotherapies into the tumor. We recently identified that activation of Focal Adhesion Kinase (FAK) in cancer-associated fibroblasts (CAF) is a poor prognostic factor for the patient. In an orthotopic co-graft model of PDAC tumor cells with MEF (mouse embryonic fibroblasts) expressing an active (Wild Type, WT) or inactive (Kinase Dead, KD) form of FAK, we identified that fibroblast FAK inactivation reduces the production of certain matrix proteins responsible for desmoplasia, and that this matrix remodeling correlates with a reduction in metastasis. We therefore postulate that FAK kinase activity in CAFs participates in the maintenance of the desmoplastic reaction and consequently in the generation of an abnormal vascular network involved in metastatic dissemination. Inactivation of FAK, by normalizing the stroma, could render the vessels less permeable, thereby facilitating drug delivery to the tumor. To investigate the role of FAK in CAFs, I continued the analysis of the co-transplant model (MEF) and also developed two other immunocompetent, orthotopic mouse models of PDAC, in which CAF express FAK WT or KD: 1- a model of co-graft of FAK-WT or KD PSCs (pancreatic stellate cells) with PDAC cells and 2- a model of inducible (Cre(ERT2)) inactivation (FAK^{fl}/WT or FAK^{fl}/KD) of FAK specifically in PSC (GFAP promoter) grafted with PDAC tumor cells. In these models, FAK inactivation in PSC appears to reduce tumor growth and metastasis, and induces matrix remodeling in the primary tumor. Precise analysis of tumor matrix protein expression (by mass spectrometry) in the MEF co-transplant model shows that FAK inactivation in CAF induces a significant decrease in "pro-tumoral matrix proteins" associated with a strong increase in basement membrane (BM) proteins. Immunohistochemical analysis of these MB proteins reveals a significant accumulation of collagen IV around blood vessels. These changes in MB around the vessels are associated with a decrease in vascular permeability in the condition where fibroblastic FAK is inactivated, revealing vascular normalization. We observe the same trend (not significant, few animals) towards reduced vascular permeability in the primary tumor and metastatic organs in the inducible model. In view of this vascular normalization, we assessed the impact of co-treatment with chemotherapies (gemcitabine and folfirinix) by intravenous injection. Combining chemotherapies with FAK inactivation in fibroblasts drastically reduced tumor growth in all our models, thus supporting the idea of combining chemotherapies with a FAK inhibitor in PDAC patients. Finally, in the inducible model when FAK is inactivated in fibroblasts, we observe a massive infiltration of CD8 T lymphocytes associated with an increase in the number of tertiary lymphoid structures and HEVs (high endothelial venules) known to allow lymphocyte infiltration within the tumor, thus facilitating anti-tumor immune response. These latest results open up a number of interesting prospects, such as co-treatment with checkpoint inhibitors, which are currently ineffective in PDAC patients.