

- **Vasseur R**, Skrypek N, Duchêne B, Van Seuninghen I & Jonckheere N. Regulation of the mucin MUC4 by K-ras oncogene in pancreatic carcinogenesis. Mucins in health and disease, 12th International Workshop on Carcinoma-associated Mucins, Robinson College, Cambridge (UK), 27-31 July 2013.

PRESENTATIONS PAR AFFICHES

- Skrypek N, Kotzmann L, **Vasseur R**, Lahdaoui L, Duchêne B, van Seuningen I and Jonckheere N. The MUC4 membrane-bound mucin mediates FOLFIRINOX drugs resistance of human pancreatic cancer cells. Pancreatic cancer symposium, Marseille, 28-30 octobre 2015.
- **Vasseur R**, Skrypek N, Duchêne B, Porchet N, Van Seuningen I & Jonckheere N. The MUC4 mucin regulation by K-ras oncogene in pancreatic cancer. 47th Annual Meeting of the European Pancreatic Club, Toledo (Spain), 24-26 June 2015.
- Skrypek N, Kotzmann L, **Vasseur R**, Lahdaoui L, Duchêne B, van Seuningen I and Jonckheere N. The MUC4 membrane-bound mucin mediates FOLFIRINOX drugs resistance of human pancreatic cancer cells. Anticancer Drug Action and Drug Resistance: from Cancer Biology to the Clinic, Florence (Italia), 20-23 June 2015.
- **Vasseur R**, Skrypek N, Duchêne B, Porchet N, Van Seuningen I & Jonckheere N. Régulation de la mucine MUC4 par l'oncogène K-ras dans la cancérogenèse pancréatique. 8^{èmes} Journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, 10-12 juin 2015.
- **Vasseur R**, Skrypek N, Duchêne B, Porchet N, Van Seuningen I & Jonckheere N. Etude de la régulation transcriptionnel de la mucine MUC4 par l'oncogène K-ras dans le cancer du pancréas. 1^{er} Journée Scientifique de l'Association Française de la Recherche sur le Cancer Pancréatique (AFRCP), Paris, 17 septembre 2014.
- Skrypek N, **Vasseur R**, Vincent A, Duchêne B, Van Seuningen I and Jonckheere N. Silencing of ErbB2 promotes gemcitabine sensitivity and SN-38 resistance in human pancreatic cancer via hCNT1/3 transporters and MRP2 multidrug resistance protein.

1^{ère} journée scientifique de l'Association Française de la Recherche sur le Cancer du Pancréas (AFRCP), Paris, 17 septembre 2014.

- **Vasseur R**, Skrypek N, Duchêne B, Porchet N, Van Seuningen I & Jonckheere N. Regulation of the mucin MUC4 by K-ras oncogene in pancreatic carcinogenesis. 14^{ème} Journée André Verbert, Lille, 11 septembre 2014.
- **Vasseur R**, Skrypek N, Duchêne B, Porchet N, Van Seuningen I and Jonckheere N. Etude de la régulation transcriptionnelle de la mucine MUC4 par l'oncogène K-ras dans le cancer du pancréas. 7^{èmes} Journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, 14-16 mai 2014. **Premier prix poster.**
- **Vasseur R**, Skrypek N, Duchêne B, Porchet N, Van Seuningen I and Jonckheere N. Etude de la régulation transcriptionnelle de la mucine MUC4 par l'oncogène K-ras dans le cancer du pancréas. 17^{èmes} Journées Jeunes Chercheurs de la Fondation ARC, Paris, 23-24 octobre 2014.
- Skrypek N, **Vasseur R**, Duchêne B, Van Seuningen I and Jonckheere N. ErbB2 oncogenic receptor mediates gemcitabine and SN-38/irinotecan resistance of human pancreatic cancer cells. 1st International congress of the Grenoble Institute of Cancer Research (GIRC), Grenoble, 3-4 October 2013.
- **Vasseur R**, Skrypek N, Duchêne B, Porchet N, Van Seuningen I and Jonckheere N. Etude de la régulation transcriptionnelle de la mucine MUC4 par l'oncogène K-ras dans le cancer du pancréas. 6^{èmes} Journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, 15-17 mai 2013.

- **Vasseur R**, Skrypek N, Duchêne B, Porchet N, Van Seuningen I and Jonckheere N. Regulation of the mucin MUC4 by K-ras oncogene in pancreatic carcinogenesis. 5th PhD Student Day of Jean-Pierre Aubert Research Center, Lille, 27 March 2012.
- **Jonckheere N**, **Vasseur R**, Skrypek N, Duchêne B, Leteurtre E and Van Seuningen I. La mucine transmembranaire MUC4 est-elle une cible de K-ras lors de l'initiation de la cancérogenèse pancréatique? 5^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, 10-11 mai 2012.

RESUME

L'oncogène K-ras est une petite GTPase de la super famille RAS, fréquemment impliquée dans les cancers, en particulier celui du pancréas, l'un des plus mortels dans les pays occidentaux. Les mutations de l'oncogène K-ras sont considérées comme l'un des événements initiateurs de la cancérogenèse pancréatique et son activité oncogénique est un élément indispensable à la progression tumorale. Cependant, le ciblage thérapeutique de K-ras reste inefficace à ce jour. Se focaliser sur les cibles précoces de son activité oncogénique semble être une stratégie alternative intéressante. La mucine membranaire MUC4 est une glycoprotéine de haut poids moléculaire fréquemment dérégulée dans les cancers. Dans le cancer du pancréas, MUC4 est néo-exprimée dès les stades préneoplasiques et est impliquée dans les propriétés biologiques permettant la progression tumorale et la chimiorésistance. La régulation de MUC4 par K-ras dans la cancérogenèse pancréatique reste à décrypter. En utilisant le modèle murin de cancérogenèse pancréatique Pdx1-Cre; LStopL-K-ras^{G12D}, nous avons mis en évidence que la néo-expression précoce de la mucine Muc4 est corrélée avec l'activation des voies de signalisation ERK, JNK et NF-κB dans les lésions pancréatiques préneoplasiques intraépithéliales (PanINs) formées suite à la présence du K-ras muté. *In vitro*, la transfection de mutants constitutivement activés de K-ras^{G12V} dans les cellules tumorales humaines induit une augmentation de l'expression de MUC4. Cette activation intervient au niveau transcriptionnel par le recrutement des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB *via* les voies MAPK, JNK and NF-κB et au niveau post-transcriptionnel par un mécanisme impliquant la RalB GTPase. Ensemble, ces résultats démontrent que MUC4 est une cible transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'activité oncogénique de K-ras dans le cancer du pancréas. Ces résultats ouvrent de nouvelles pistes pour développer des stratégies ciblant les étapes précoces de ce cancer.

SUMMARY

K-ras oncogene is a small GTPase of the RAS superfamily, highly implicated in cancer, mainly in pancreatic cancer, one of the most deadly cancers in occidental countries. K-ras mutations are considered as an initiating event of pancreatic carcinogenesis and K-ras oncogenic activities are necessary components of cancer progression. However, K-ras clinical targeting remains ineffective until now. Focus on early downstream K-ras signalling may thus appear as an interesting strategy target in this cancer. The membrane-bound mucin MUC4 is a high molecular weight glycoprotein frequently deregulated in cancer. In pancreatic cancer, MUC4 is neo-expressed in the preneoplastic stages and thereafter is involved in cancer cell properties leading to cancer progression and chemoresistance. MUC4 regulation by K-ras in pancreatic carcinogenesis remains unknown. Using the Pdx1-Cre; LStopL-K-ras^{G12D} mouse model of pancreatic carcinogenesis, we showed that the in vivo early neo-expression of the mucin Muc4 in pancreatic intraepithelial neoplastic lesions (PanINs) induced by mutated K-ras is correlated with the activation of ERK, JNK and NF-κB signalling pathways. In vitro, transfection of constitutively activated K-ras^{G12V} in human pancreatic cancer cells led to the transcriptional upregulation of MUC4. This activation was mediated at the transcriptional level by AP-1 and NF-κB transcription factors via MAPK, JNK and NF-κB pathways and at the post-transcriptional level by a mechanism involving the RalB GTPase. Altogether, these results identifies MUC4 as a transcriptional and post-transcriptional target of K-ras in pancreatic cancer. This opens avenues in developing new approaches to target the early steps of this deadly cancer.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

TABLES DES FIGURES	7
ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION GENERALE	12
LE PANCREAS	13
I. Structure et fonctions du pancréas	13
A. Structure du pancréas	13
B. Fonctions	13
II. Cancer et statistiques	14
III. Détection et traitements	15
A. Symptômes et examens cliniques	15
B. Prise en charge et traitements	16
C. Chimiothérapies	17
IV. Origine et développement	18
A. Néoplasmes pancréatiques intra-épithéliaux	19
B. Lésions intracanalaires papillaires mucineuses	20
C. Néoplasmes kystiques mucineux	21
D. Evolution vers l'adénocarcinome	22
V. Altérations génétiques	22
ONCOGENE RAS	24
I. Ras GTPases	24
A. Super-famille des Ras GTPases	24
B. Structure et mode d'action	25
II. Ras en cancérologie	27
A. Découverte et mutations	27
B. K-ras dans le cancer	28

III. Signalisation K-ras	30
A. Généralités.....	30
B. Mitogen activated protein kinase.....	30
C. Nuclear factor – kappa B.....	34
D. Ral GTPases	35
IV. Stratégies thérapeutiques	36
A. Ciblage direct de l’oncogène K-ras	36
B. Ciblage indirect de l’oncogène K-ras	38
C. Ciblage de ses effecteurs	39
LES MUCINES	41
I. Familles de mucines	41
A. Généralité	41
B. Mucines sécrétées.....	43
C. Mucines membranaires.....	45
II. MUC4 structure et fonctions	46
A. Origine et orthologues	46
B. Structure de la mucine MUC4.....	47
C. Expression physiologique et rôles	48
III. Promoteurs et Régulation de MUC4.....	49
A. Structure des promoteurs de MUC4.....	49
B. Régulation de la mucine MUC4.....	50
IV. La mucine MUC4 dans le cancer du pancréas.....	51
A. Expression de MUC4 et diagnostic	51
B. Rôles dans les propriétés des cellules tumorales.....	53
OBJECTIFS DES TRAVAUX	55
RESULTATS	57

PARTIE 1: ETUDE DE LA REGULATION DE LA MUCINE MUC4 PAR L'ONCOGENE K-RAS	58
I. MUC4 est régulé par K-ras <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	59
A. Expression de la mucine Muc4 <i>in vivo</i> dans le modèle murin.....	59
B. Implication de K-ras sur l'expression de MUC4 <i>in vitro</i>	59
II. Voies de signalisation impliquées	60
A. Expression des voies de signalisation dans le modèle murin.....	60
B. Implication des voies de signalisation activées par K-ras ^{G12V}	62
III. Régulation transcriptionnelle de la mucine MUC4.....	63
A. Activation des promoteurs de MUC4 par K-ras.....	63
B. Recrutement des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB	64
IV. Implication de la voie RalB dans la régulation de MUC4.....	66
A. Surexpression <i>in vivo</i> des Ral GTPases	66
B. Implication de la RalB dans l'expression de la mucine MUC4	67
PARTIE 2: ROLE DU COMPLEXE MUC4-ERBB2 DANS LA CANCEROGENESE PANCREATIQUE	69
I. Le modèle murin Muc4 ^{KO}	70
A. Mise en place du modèle Muc4 ^{KO}	70
B. Caractérisation du modèle Muc4 ^{KO}	70
C. Réponse du modèle au stress et à l'inflammation	72
II. Traitement à la Céruléine et à la Deltarasine	73
A. Inflammation pancréatique.....	73
B. Traitement à la Deltarasine.....	73
III. Croisement des modèles transgéniques.....	74
IV. Rôle d'ErbB2 dans la chimiorésistance	75
A. Implication dans la chimiorésistance à la Gemcitabine	76
B. Implication dans la chimiosensibilité au SN-38.....	76
C. Etudes <i>in vivo</i> de la chimiosensibilité	76

DISCUSSION	78
I. Etude de la régulation de la mucine MUC4 par K-ras dans le cancer du pancréas.....	78
A. Détection de la néo expression de Muc4 dans les lésions pré-tumorales.....	78
B. Importance de l'oncogène K-ras	79
C. Implication des voies de signalisation.....	80
D. Régulation transcriptionnelle de la mucine MUC4.....	82
E. Implication de la voie des RalGTPases	82
F. Conclusion	83
II. Partie 2 : Rôle du complexe MUC4-ErbB2 dans la cancérogenèse pancréatique.....	84
A. Réponse du modèle Muc4 ^{KO}	84
B. Traitement Deltarasine	84
C. Rôle d'erbB2 dans la chimiorésistance	85
D. Conclusion.....	85
CONCLUSION	87
PERSPECTIVES	88
APPENDICE TECHNIQUE	91
I. Expérimentation animale.....	91
A. Lignées murines transgéniques	91
C. Xénogreffes de cellules tumorales.....	91
B. Traitements et injections chez les souris	92
II. Culture cellulaire	92
A. Lignées cellulaires humaines	92
B. Conditions de culture.....	94
C. Cryoconservation et décongélation des lignées.....	95
D. Détection de mycoplasmes.....	96
E. Transfection transitoire	96
III. Biologie moléculaire	98

A. Extraction des ARN totaux	98
B. Rétro-transcription des ARNs en ADNc	99
C. Extraction d'ADN génomique.....	100
D. Polymerase chain reaction.....	100
IV. Bactériologie.....	104
A. Transformation bactérienne et sélection clonale.....	104
B. Préparation plasmidique	104
V. Biochimie	105
A. Extraction des protéines totales.....	105
B. Dosage protéique : BCA.....	106
C. Extraction et dosage luciférase.....	106
D. Western Blot.....	107
E. Immunoprécipitations de chromatine	110
F. Immunohistochimie	113
VI. Statistiques.....	116
BIBLIOGRAPHIE	118
ANNEXES	141

TABLES DES FIGURES

Figure 1 : Structure et anatomie du pancréas

Figure 2 : Classification TNM et grades tumoraux

Figure 3 : Diagnostic et prise en charge des tumeurs

Figure 4 : Lésions pré-néoplasiques précurseurs des adénocarcinomes

Figure 5 : Lésions néoplasiques intra-épithéliales pancréatiques

Figure 6 : Lésions intra-canalaires papillaires mucineuses du pancréas

Figure 7 : Lésions kystiques mucineuses

Figure 8 : Altérations génétiques

Figure 9 : La super-famille des Ras GTPases

Figure 10 : Structure des protéines Ras

Figure 11 : Cycle de fonctionnement des Ras GTPases

Figure 12 : Gène et transcrits de K-ras

Figure 13 : Mutations des oncogènes Ras.

Figure 14 : Représentation schématique des principales voies de signalisation activées par K-ras.

Figure 15 : La voie p42/44 MAPK

Figure 16 : La voie p38 MAPK

Figure 17 : La voie JNK

Figure 18 : La voie NF- κ B

Figure 19 : La voie des RalGTPases

Figure 20 : Stratégies thérapeutiques de ciblage de l'oncogène K-ras

Figure 21 : Représentation schématique de la structure des mucus

Figure 22 : Glycosylation des mucines

Figure 23 : Gène et transcrits de la mucine MUC4

Figure 24 : Représentation schématique des promoteurs de MUC4

- Figure 25 : Expression de la mucine MUC4 dans le pancréas néoplasique et tumoral.
- Figure 26 : Effets de l'expression de mutants K-ras sur l'expression de la mucine MUC4.
- Figure 27 : Expression des voies MAPKs dans le modèle murin.
- Figure 28 : Expression des voies JNK et NF- κ B dans le modèle murin.
- Figure 29 : Activation *in vitro* des voies de signalisation par K-ras et implication dans l'expression de MUC4.
- Figure 30 : Activation des promoteurs de MUC4 par K-ras muté.
- Figure 31 : Recrutement des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B induit par K-ras muté.
- Figure 32 : Fixation des facteurs de transcription c-fos, c-jun et NF- κ B sur les promoteurs de MUC4
- Figure 33 : Expression des RalGTPases
- Figure 34 : Implication de RalB dans l'expression de MUC4
- Figure 35 : Mise en place du modèle murin Muc4 déficient
- Figure 36 : Caractérisation phénotypique du modèle Muc4 déficient
- Figure 37 : Analyse de la délétion de la mucine Muc4 dans le modèle MUC4^{KO}
- Figure 38 : Expression des mucines Muc1, Muc2 et Muc5ac et du récepteur ErbB2 dans le modèle Muc4^{KO}
- Figure 39 : Réponse du modèle Muc4^{KO} à une colite inflammatoire induite par le DSS
- Figure 40 : Traitement à la Céruléine dans le modèle de cancérogenèse pancréatique
- Figure 41 : Impact de l'invalidation de la mucine MUC4 dans la réponse à la Déltarasine
- Figure 42 : Croisement des modèles transgéniques
- Figure 43 : La perte du récepteur ErbB2 modifie *in vivo* la chimiosensibilité à la Gemcitabine et au SN-38

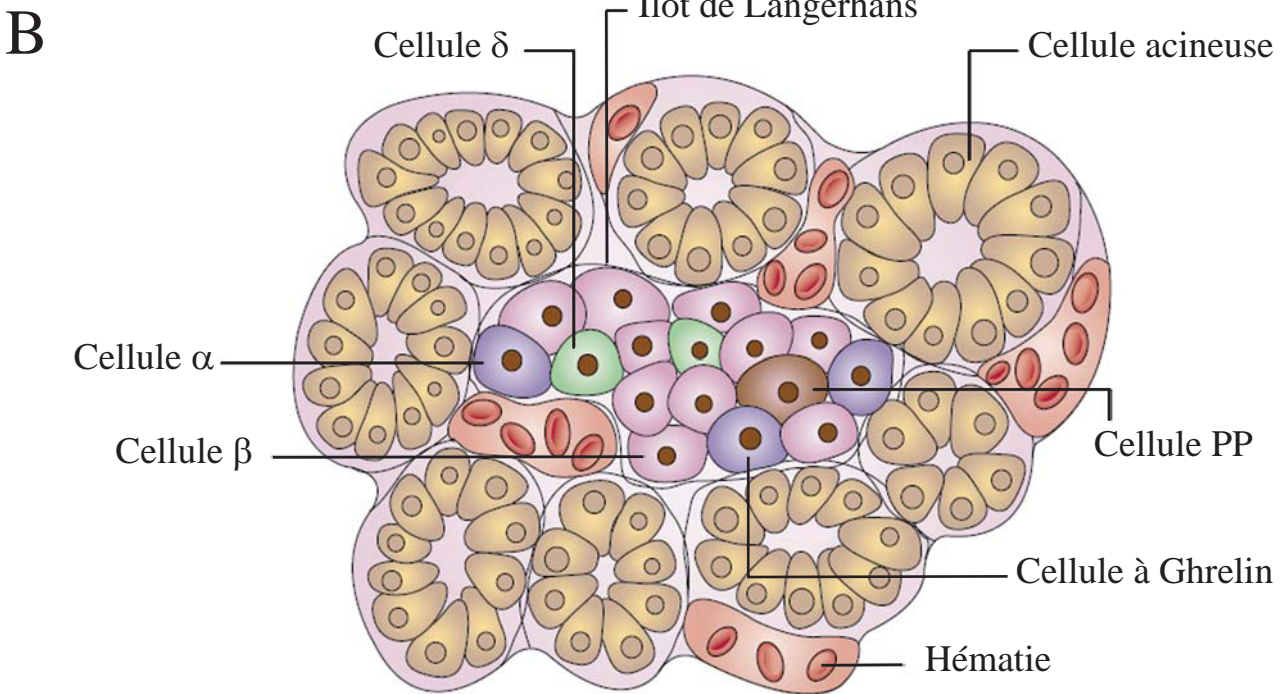
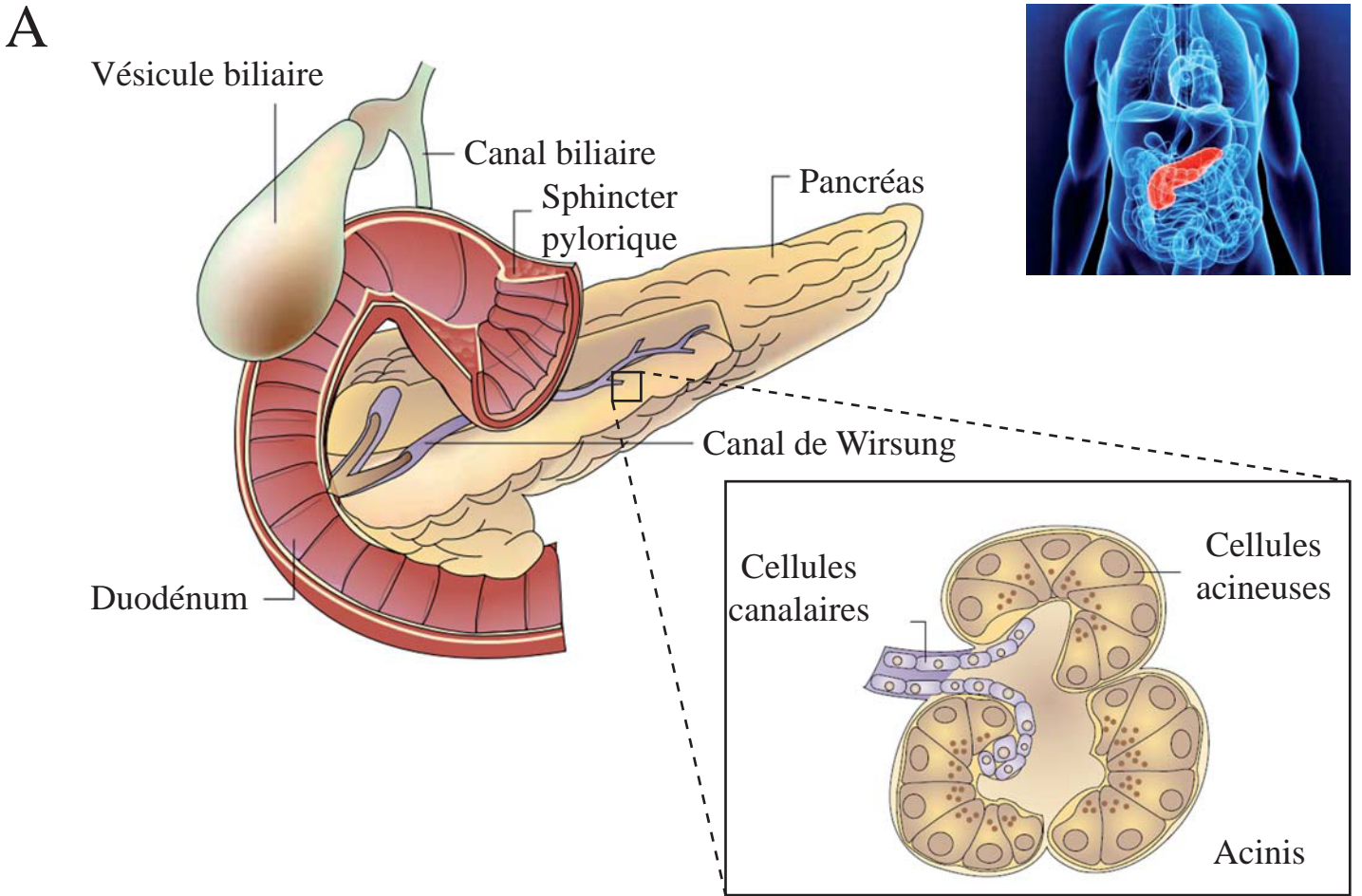
ABBREVIATIONS

5-FU :	5-Fluorouracile
aa :	acide aminé
AP-1 :	<i>Activator Protein-1</i>
AMOP :	<i>Adhesion-associated domain present in MUC4 and other proteins</i>
ASGP-1/2 :	<i>Ascites sialoglycoprotein-1/2</i>
ATP :	Adénosine triphosphate
BCA :	Acide bicinchoninique
bp :	<i>Base pair</i>
BSA :	Sérum albumine bovine
ChIP :	Chromatine immunoprécipitation
hCNT1 :	<i>human Concentrative Nucleoside Transporter 1</i>
Ct :	Carboxy-terminal
DMEM :	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
D-PBS :	<i>Dubelcco-Phosphate-buffered saline</i>
DPC :	Duodéno-pancréatectomie céphalique
DSS :	Sulfate de dextran
EDTA :	acide éthylène diamine tétraacétique
EGF/EGFR :	<i>Epidermal Growth Factor / EGF receptor</i>
hENT1 :	<i>human Equilibrative Nucleoside Transporter 1</i>
ErbB :	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>
ERK :	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
EUS-FNA :	<i>Endoscopic Ultrasound-guided Fine-Needle Aspiration</i>
Fuc :	Fucose
Gal :	Galactose
GalNAc :	<i>N-acétylgalactosamine</i>
GAP :	<i>GTPase activating protein</i>
GAPDH :	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GlcNAc :	<i>N-acétylglucosamine</i>
GDP :	Guanosine diphosphate
GDPH :	Glycine/Aspartate/Proline/Histidine

GEF :	<i>GTP exchange factor</i>
GEO :	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GTP :	Guanosine triphosphate
GTPases :	Hydrolases de guanosine triphosphate
HPDE :	<i>Human Pancreatic Duct Epithelial cell</i>
HER :	<i>Human EGFR</i>
Het :	Hétérozygote
HPNE :	<i>Human Pancreatic Nestin Expressing cell</i>
HVR :	<i>Hyper variable region</i>
IC50 :	<i>Inhibitory Concentration 50</i>
IHC :	Immunohistochimie
IPMN :	<i>Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm</i>
IRM :	Image par résonance magnétique
JNK :	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
KD :	<i>Knock-down</i>
KO :	<i>Knock-out</i>
LUC :	Luciférase
MAPK :	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCN :	<i>Mucinous Cystic Neoplasm</i>
MTT :	sel de tétrazolium
NeuAc :	acide neuraminique
NF-κB :	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NIDO :	Nidogène
Nt :	Amino-terminal
NT :	<i>Non-targeting</i>
NTP :	Nucléoside trisphosphate
PanIN :	<i>Pancreatic Intraepithelial Neoplasm</i>
PDAC :	<i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i>
PI3K :	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC :	Protéine Kinase C
PLCγ :	Phospholipase-C gamma
PMSF :	Fluorure de phénylméthane sulfonyle
PTS :	Proline/Thréonine/Sérine
p/v :	rapport poids / volume

PVDF :	Fluorure de polyvinylidène
RPMI :	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-qPCR :	<i>Retro-transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SDS :	Dodécylsulfate de sodium
SEA :	<i>Sea urchin sperm protein Enterokinase and Agrin</i>
Sh :	<i>short hairpin</i>
SH :	<i>Src-homology domain</i>
SMC :	<i>Sialomucin complex</i>
SPARC:	<i>Secreted protein acidic rich in cysteine</i>
SPG :	Spléno-pancréatectomie gauche
STAT :	<i>Signal Transduction and Activator of Transcription</i>
SVF :	Sérum de veau foetal
TEM :	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF α/β :	<i>Transforming Growth Factor alpha/beta</i>
TNM :	<i>Tumor, Node, Metastases</i>
TR :	<i>Tandem Repeat</i>
UTR :	<i>Untranslated region</i>
VNTR :	<i>Variable Number of Tandem Repeat</i>
vWF :	<i>von Willebrand Factor</i>
WT :	<i>Wild type</i>

INTRODUCTION GENERALE



Adaptation de Bardeesy et Del Pinho, 2002

Figure 1 : Structure et anatomie du pancréas. (A) Localisation et structure du pancréas. Organisation des acinis dans le pancréas exocrine. (B) Structure et composition des îlots de Langerhans.

LE PANCREAS

I. Structure et fonctions du pancréas

A. Structure du pancréas

Le pancréas est une petite glande de forme allongée, moue et friable. Il mesure de 15 à 20 cm de long, 2 à 4 cm de haut et 1 à 2 cm de large. Il peut atteindre un volume de 60 à 100 mm³ et peser 60 à 100 g. Le pancréas se situe profondément dans la cavité abdominale où il est entouré par de nombreux organes. Il est localisé dans un espace formé par l'estomac et l'anse duodénale vers le haut, le foie le recouvrant partiellement vers le haut et la droite, la rate à sa gauche et la colonne vertébrale contre laquelle il est plaqué à l'arrière. C'est un organe très vascularisé enchâssé au creux de l'abdomen à proximité de nombreux vaisseaux importants comme l'aorte, la veine cave inférieure, la veine porte, l'artère hépatique, l'artère et la veine mésentérique supérieure (irriguant l'intestin) et les vaisseaux de l'estomac et de la rate (Levy, P., 2006).

Le pancréas a une structure anatomiquement séparée en trois parties : la tête, accolée à l'anse duodénale et recouverte partiellement par le foie, le corps au centre et la queue du pancréas accolée à la rate (mais non reliée à celle-ci). Toutefois, cette séparation anatomique est purement structurelle et ne correspond pas à une séparation fonctionnelle.

B. Fonctions

Le pancréas est une glande amphicrine faisant partie des glandes annexes du système digestif qui possède plusieurs rôles biologiques majeurs.

Le pancréas endocrine est le régulateur majeur de la glycémie et assure un rôle essentiel dans la prise alimentaire. Il se compose de cellules *Alpha* (synthèse du glucagon), de cellules *Bêta* (synthèse de l'insuline), de cellules *Delta* (synthèse de la somatostatine), de cellules PP (synthèse du polypeptide pancréatique) et de cellules à *Ghréline* (synthèse de la ghréline) regroupées en îlots appelés îlots de Langerhans (Wierup, N. *et al.*, 2013). Ces îlots sont dispersés le long du tissu pancréatique en gradient de la tête vers la queue. Toutefois, le pancréas endocrine ne représente que 2 % du tissu pancréatique (Figure 1).

Le pancréas exocrine représente la majorité du tissu pancréatique. Il est responsable de la synthèse des enzymes nécessaires à la digestion (sous forme de pro-enzymes inactives). Cette synthèse est réalisée par des cellules spécialisées, appelées cellules acineuses. Ces cellules sont regroupées en acini, débouchant dans une lumière qui est prolongée par des cellules canalaire formant les canaux pancréatiques. Ceux-ci se jettent dans le canal de Wirsung qui centralise les sécrétions pancréatiques. Le canal Wirsung se prolonge pour déboucher dans le duodénum au niveau de l'ampoule de Vater où il est rejoint par le canal biliaire (cholédoque). Dans le duodénum, les pro-enzymes sont activées sous l'action d'entérokinases puis elles participent à l'activation des autres protéases impliquées dans la digestion (Bardeesy, N. and Depinho, R. A., 2002).

II. Cancer et statistiques

Le cancer du pancréas peut être d'origine endocrine ou exocrine. Les adénocarcinomes du pancréas exocrine représentent plus de 90 % de ces cancers. Nos travaux, développés dans ce manuscrit, se sont donc focalisés sur les adénocarcinomes du pancréas exocrine. Ce type de cancer est de très mauvais pronostic. Dans les pays développés, l'incidence du cancer du pancréas, (186 400 nouveaux cas en 2012 soit 3,1 % des nouveaux cas de cancer), est proche de la mortalité (184 400 décès en 2012 soit 6,1 % des morts par cancers) (Torre, L. A. *et al.*, 2015). Ces sombres statistiques s'observent également en France, avec une incidence du cancer du pancréas de 10,2 cas pour 100 000 habitants et une mortalité de 10 cas pour 100 000 habitants (Ferlay, J. *et al.*, 2013; Jemal, A. *et al.*, 2011). L'incidence est légèrement plus élevée chez les hommes avec une prédominance chez les personnes âgées (âge moyen = 70 ans).

Malgré les efforts réalisés tant aux niveaux des thérapies qu'en chirurgie contre ce cancer, peu de traitements ont conduit à une amélioration significative du taux de survie des patients atteints par ce type de cancer (Cancer Research UK, 2014). C'est un cancer très chimiorésistant et en constante progression qui est prédit comme la seconde cause de mortalité par cancer dans le futur (O'Reilly, E. M., 2009).

Avec une médiane de survie à 6 mois et un taux de survie à 5 ans inférieur à 5 %, le cancer du pancréas est l'un des cancers avec le plus mauvais pronostic. Ces sombres statistiques s'expliquent pour plusieurs raisons : la détection tardive due à la localisation profonde et la

Figure 2 manuscrit Romain VASSEUR

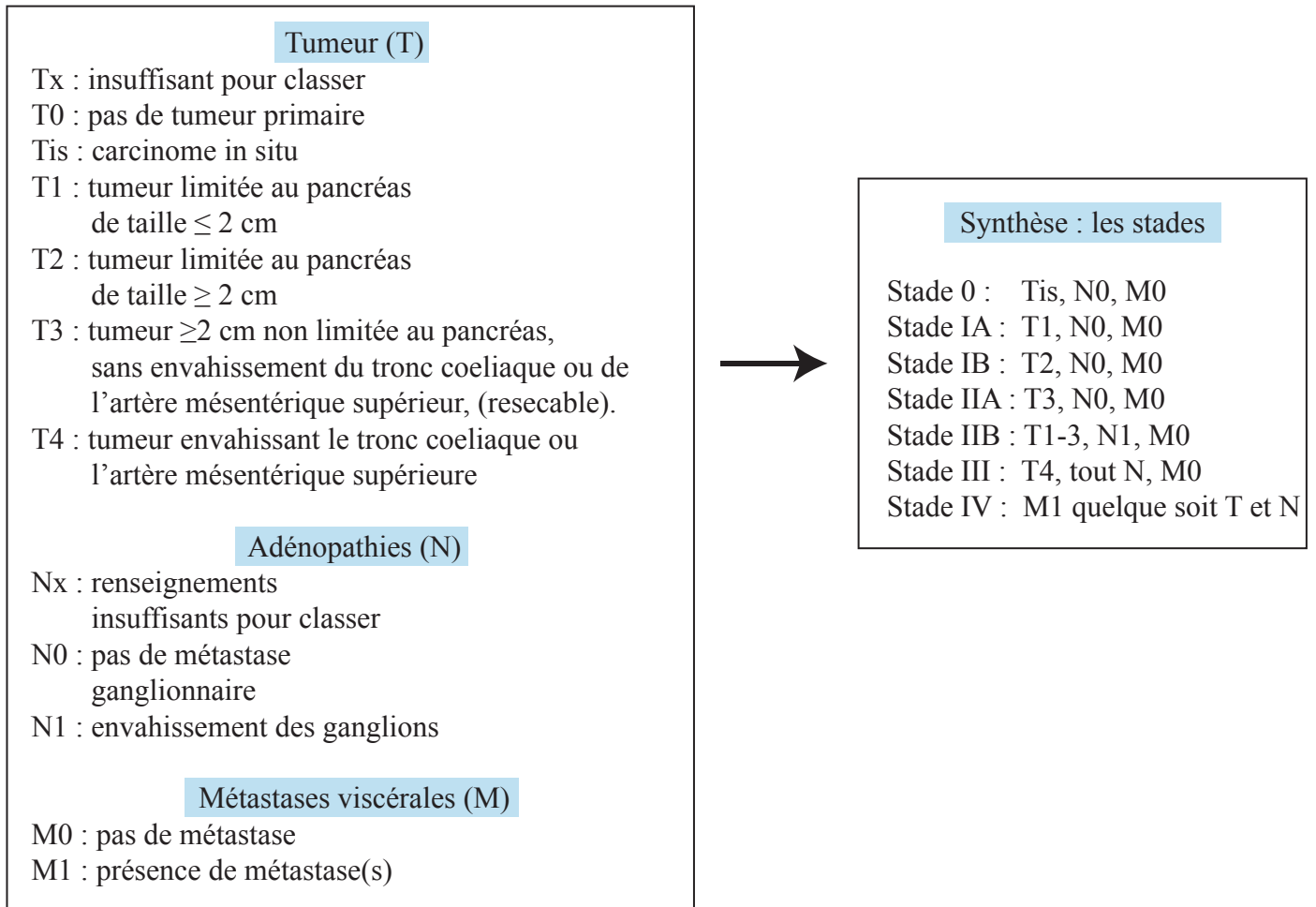


Figure 2 : **Classification TNM et grades tumoraux.** Critères d'évaluation des tumeurs (T), de l'envahissement ganglionnaire (N) et de la présence de métastase (M). Synthèse de la classification TNM et grades tumoraux.

faible innervation du tissu pancréatique rendant ce cancer asymptomatique avant les stades avancés ; et le manque de thérapie efficace contre cette pathologie.

III. Détection et traitements

A. Symptômes et examens cliniques

Le plus souvent, les stades précoces de l'adénocarcinome pancréatique sont asymptomatiques. La plupart des patients ($\approx 80\%$) atteints par ce cancer sont diagnostiqués à des stades avancés ou métastatiques (Del Chiaro, M. *et al.*, 2014). Ces patients présentent des symptômes tels que des douleurs abdominales, des ictères obstructifs (souvent associés à une obstruction des canaux pancréatiques) et une perte de poids rapide et importante. D'autres symptômes plus courants tels que des thromboses, des nausées, des vomissements sont également observés. Enfin, à ces symptômes, s'ajoutent parfois des pancréatites dues à l'obstruction du canal de Wirsung, un diabète et une intolérance au glucose.

La détection d'un adénocarcinome pancréatique est difficile car le pancréas n'est pas visible en radiographie. L'examen standard consiste à faire une reconstruction tridimensionnelle du tissu par tomodensitométrie (mesure par tranche de l'absorption des rayons X) à acquisition spiralée après injection d'un produit de contraste (souvent à base d'iode). Cet examen non-invasif permet d'établir, dans plus de 80 % des cas, le diagnostic et d'évaluer la résecabilité.

L'écho-endoscopie qui permet l'imagerie du tissu pancréatique par ultrason à haute fréquence (de 7,5 à 12 MHz) offre l'avantage d'avoir une meilleure résolution ($< 1\text{ mm}$) et de pouvoir être couplée à une biopsie par aspiration avec une aiguille fine (*fine-needle aspiration*, FNA), pour le diagnostic cytologique, ce qui permet de déterminer le grade et l'éventuelle résecabilité. Toutefois, cette procédure est invasive et nécessite une grande expertise des echoendoscopistes ; elle peut entraîner des complications, souvent liées à la biopsie.

Une IRM (imagerie par résonance magnétique) est réalisée pour les patients ne pouvant supporter ni une échoendoscopie car trop invasive, ni le produit de contraste de la tomographie. Ceci permet de détecter et estimer la taille des tumeurs pancréatiques (Vincent, A. *et al.*, 2004); (Evans, D. B. *et al.*, 2002); (<http://www.tncd.org/>). Une fois le diagnostic d'adénocarcinome pancréatique établi, l'évaluation anatomique et cytologique permet

Figure 3 manuscrit Romain VASSEUR

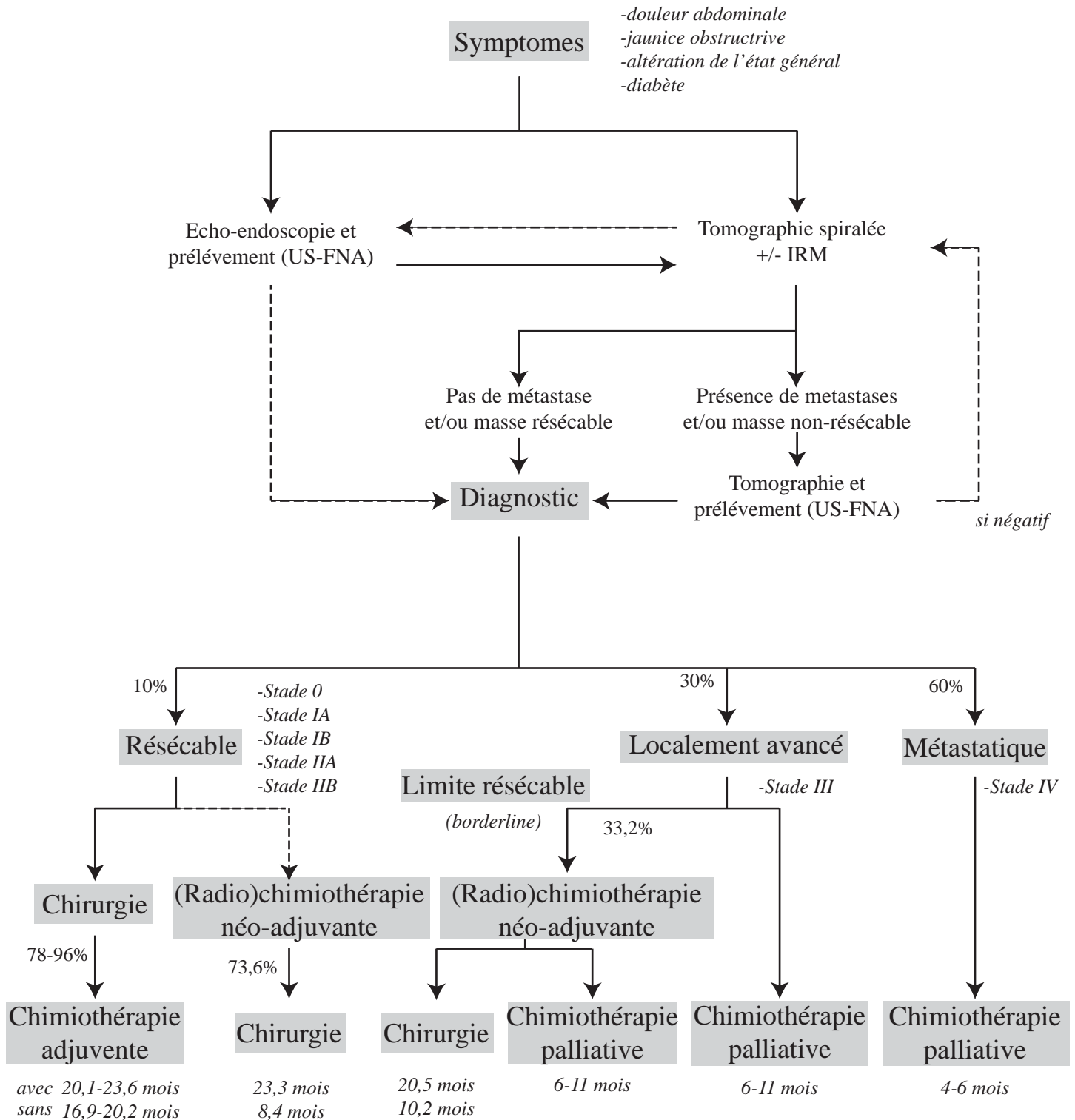


Figure 3 : **Diagnostic et prise en charge des tumeurs.** Tests diagnostics et classification des tumeurs. Répartition des prises en charge selon les critères TNM (% de patients) et taux de survie (mois) avec ou sans réponse aux traitements. US-FNA: aspiration par aiguille fine sous écho-endoscopie, IRM: imagerie par résonance magnétique.

d'évaluer les tumeurs selon la classification TNM (Figure 2). Cette classification permet ensuite de stratifier les tumeurs en différents stades. Cette stratification se base sur l'envahissement locorégional, vasculaire et ganglionnaire et sur la présence de métastases (Figure 3). La prise en charge et le traitement des patients sont déterminés en fonction de ces stades.

B. Prise en charge et traitements

Selon les critères de classification, les patients sont classés en 4 catégories : (i) résécables ; (ii) à la limite de la résécabilité (*borderline*) ; (iii) localement avancés et (iv) métastatiques (Figure 3).

B.1. Tumeurs directement résécables

Les tumeurs directement résécables représentent environ 10 % des tumeurs détectées chez les patients. Le traitement de référence est la chirurgie. C'est une intervention à morbidité élevée mais qui reste à l'heure actuelle le seul traitement curatif. La procédure standard, appelée le *Whipple*, est réalisé pour des tumeurs de la tête du pancréas et consiste en une duodéno-pancréatectomie céphalique (DPC) (Evans et al. 2002). Une spléno-pancréatectomie gauche (SPG, le pancréas et la rate) est réalisée pour les tumeurs de la queue ou du corps du pancréas. Ces résections sont généralement suivies par une reconstruction par anastomose pancréatico-gastrique ou pancréatico-jéjunale selon l'état du parenchyme pancréatique. Enfin, une pancréatectomie totale peut être réalisée mais cette intervention, non systématique, est limitée aux patients issus de familles à haut risque présentant des anomalies pancréatiques diffuses. La chirurgie est le plus souvent suivie d'une chimiothérapie adjuvante car plus de 70 % des patients développeront des récives systémiques et des récives locales dans plus de 20 % des cas. De ce fait, une approche de chimiothérapie (\pm radiothérapie) néo-adjuvante est débattue mais reste limitée aux essais cliniques (Paulson, A. S. *et al.*, 2013) (<http://www.tncd.org/>).

B.2. Tumeurs à la limite de la résécabilité ("borderline")

Une radiochimiothérapie néo-adjuvante peut être proposée pour des patients sélectionnés présentant des tumeurs à la limite de la résécabilité ou des tumeurs localement avancées non métastatiques (de 1 % à 30 % selon les critères de non-résécabilité), (Choti, M. A. *et al.*, 2009) (<http://www.tncd.org/>). Si la tumeur régresse ou reste stable sous l'effet du traitement, les patients bénéficient d'une chirurgie à visée curative et seront pris en charge de façon

similaire à ceux directement résecables. Suite à cette procédure les patients présentent un taux de survie similaire à ceux directement résecés. Toutefois, en cas d'échec du traitement néo-adjuvant, les patients sont placés sous (radio) chimiothérapie palliative et suivis principalement pour pallier les symptômes.

B.3. Tumeurs localement avancées non-résécables

Le cancer est considéré comme non-résécable lorsque les tumeurs sont de tailles trop importantes, localement trop étendues ou présentant un envahissement important des grands axes vasculaires à proximité. La prise en charge est principalement axée sur un traitement palliatif des symptômes. La procédure standard recommande une (radio) chimiothérapie palliative. Chez certains patients, une chirurgie palliative peut être entreprise par anastomose cholédoco-jéjunale afin de palier la sténose duodénale et les risques de récurrences d'ictères fréquents. De manière alternative, l'installation de prothèses biliaires et duodénales permet de maintenir l'alimentation orale chez la majorité des patients.

B.4. Tumeurs métastatiques

La présence de métastases lors du bilan préopératoire est un critère de non-résécabilité. Des métastases viscérales ou péritonéales non détectées en imagerie (10-15 % des cas) peuvent être détectées au moment de la laparoscopie (exploration visuelle de la cavité abdominale). La présence d'un envahissement ganglionnaire à distance est équivalente à un diagnostic métastatique. Une chimiothérapie palliative, reste la seule prise en charge actuellement.

C. Chimiothérapies

Le traitement de chimiothérapie de référence dans le cancer du pancréas est un traitement à base de **Gemcitabine**. C'est un anti-métabolite, analogue de la déoxycytidine qui s'incorpore dans l'ADN au moment de la réplication et entraîne un blocage irréversible de sa synthèse (Mackey, J. R. *et al.*, 1998). Cette procédure est aujourd'hui utilisée comme la chimiothérapie adjuvante de référence pour les patients bénéficiant d'une résection chirurgicale mais également pour les patients métastatiques en première ligne de traitement. Pour les patients présentant des tumeurs localement avancées ou à la limite de la résécabilité, une radiothérapie associée à une chimiothérapie à base de 5-fluorouracile (5FU), un autre anti-métabolite, est proposée.

Le protocole émergent **FOLFIRINOX** combine l'action de différentes drogues de chimiothérapies : la leucovorine ou acide folinique (FOL) associée avec le 5-FU (F) dont il potentialise l'effet, l'irinotecan (IRIN) qui est métabolisé par le foie en son métabolite actif le SN-38, est un inhibiteur de topoisomérase I et l'oxaliplatine (OX), un dérivé platine créant des pontages dans la molécule d'ADN entraînant le blocage de sa réplication. Ce protocole permet une amélioration de la médiane de survie à 11,1 mois comparée à 6,8 mois pour les patients traités par Gemcitabine ainsi qu'un meilleur taux de réponse (31,6 % contre 9,4 % pour la Gemcitabine) (Conroy, T. *et al.*, 2011). Toutefois, le protocole FOLFIRINOX est plus toxique que la Gemcitabine avec des effets délétères plus marqués (neutropénie, thrombose, diarrhée, neuropathie sensorielle, ...) ce qui limite son accessibilité aux patients relativement jeunes avec de bonnes performances physiques.

Une combinaison de la Gemcitabine avec le **Paclitaxel**, un antimétabolite, est également utilisée. Le Paclitaxel est un ester d'alcaloïde de la famille des taxanes qui entraîne la stabilisation des microtubules polymérisés et conduit au blocage de la réplication et à l'apoptose. Toutefois, le Paclitaxel est peu soluble. Pour le délivrer, une stratégie utilisant des nanoparticules d'albumine a été développée ce qui facilite son absorption et sa biodistribution : le **Nab-Paclitaxel** (Joerger, M., 2014). C'est en particulier le cas dans le stroma des tumeurs pancréatiques qui secrètent des protéines acides et riches en résidus cystéines (SPARC) facilitant l'absorption des nanoparticules d'albumine (Al-Batran, S.-E. *et al.*, 2014). Ce protocole permet une amélioration de la survie des patients à 8,7 mois comparée à 6,6 mois pour les patients traités à la Gemcitabine seule (Goldstein, D. *et al.*, 2015). Toutefois, tout comme le protocole FOLFIRINOX, ce protocole est plus toxique que la Gemcitabine seule ce qui limite son accessibilité aux patients jeunes avec de bonnes performances physiques.

IV. Origine et développement

Le cancer du pancréas suit une séquence caractéristique des cancers épithéliaux : hyperplasie, dysplasie, carcinome *in situ* puis carcinome invasif. Il se développe à partir de lésions néoplasiques précancéreuses. Ces lésions répondent à des critères précis : (i) leur présence est associée à une augmentation du risque de cancer ; (ii) le cancer se développe à partir de cellules dérivées de la lésion précancéreuse ; (iii) les cellules des lésions précancéreuses sont différentes à la fois du tissu sain et du tissu tumoral (Berman, J. J. *et al.*,

Figure 4 manuscrit Romain VASSEUR

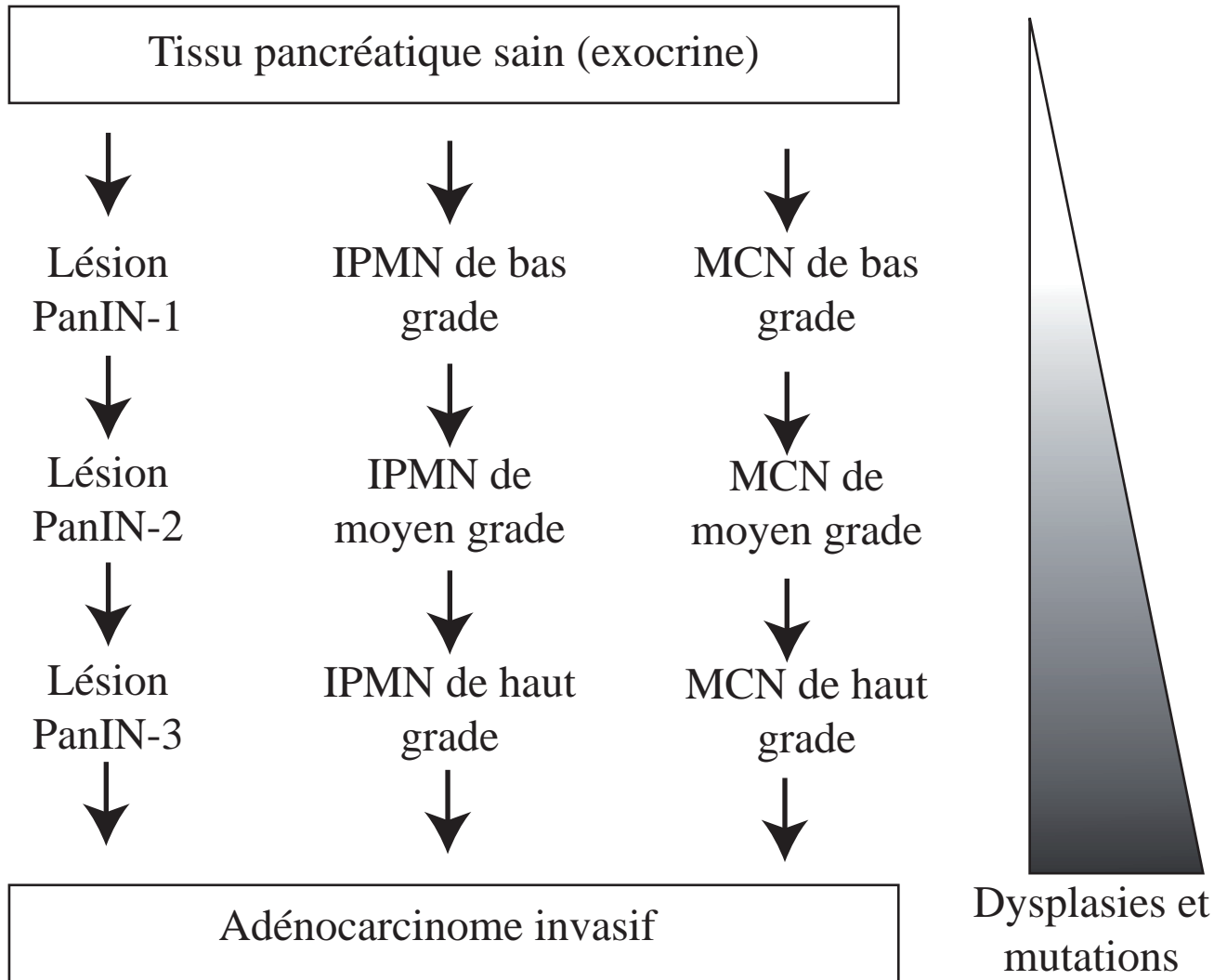


Figure 4 : **Lésions pré-néoplasiques précurseurs des adénocarcinomes.** Evolution schématique des lésions néoplasiques intra-épithéliales pancréatiques (PanINs), des lésions intra-canaliaires papillaires mucineuses du pancréas (IPMN) et des lésions kystiques mucineuses (MCN) vers l'adénocarcinome.

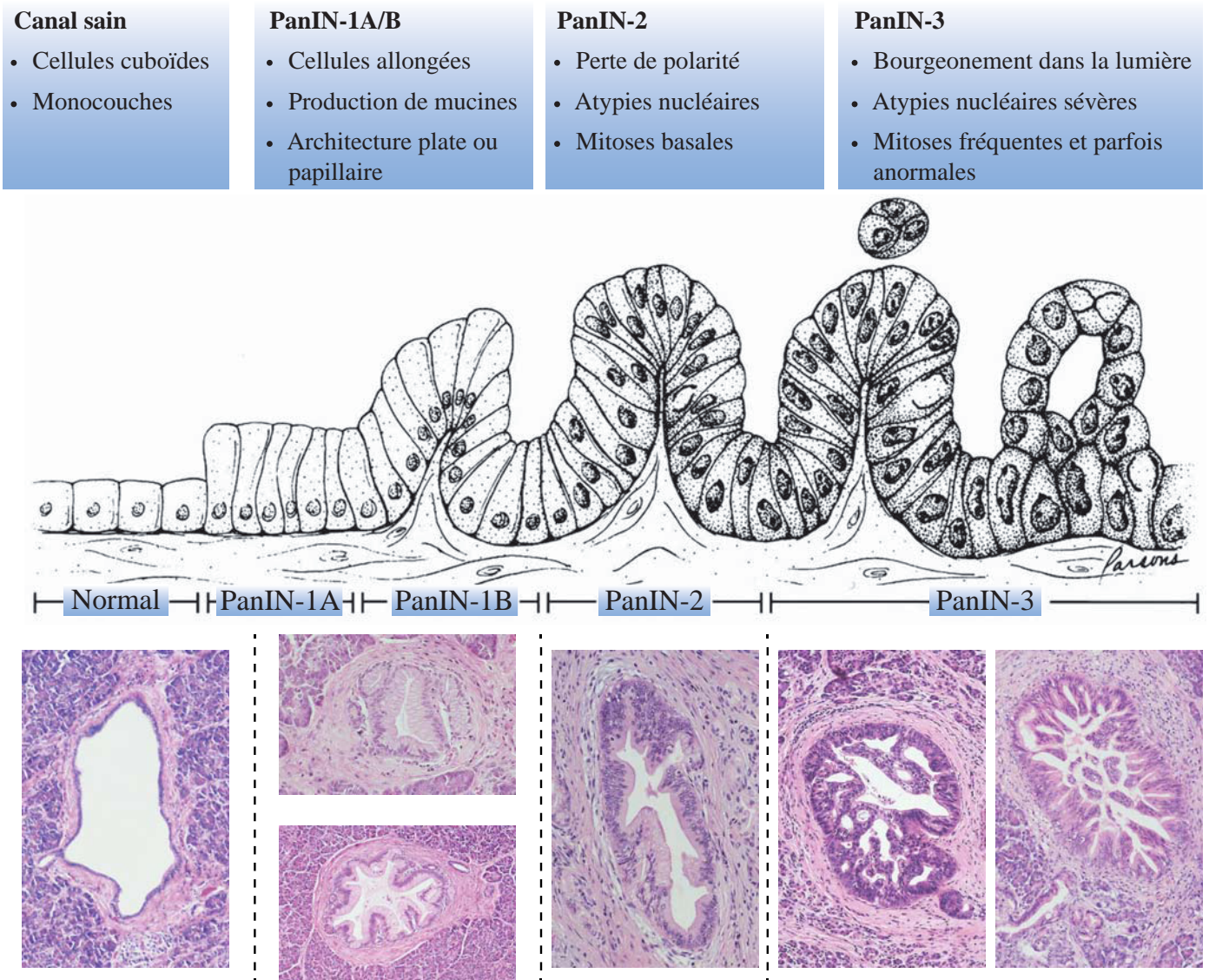
2006). En majorité, ces lésions n'évoluent pas ou peuvent régresser. Cependant, certaines de ces lésions peuvent évoluer vers un adénocarcinome. À ce jour, il n'y a aucun moyen de différencier les lésions qui vont régresser de celles qui vont évoluer. Dans le cancer du pancréas, trois types de lésions précancéreuses ont été décrites : (i) les lésions kystiques mucineuses aussi appelées **MCN** (*Mucinous Cystic Neoplasms*) ; (ii) les tumeurs intracanalaires papillaires mucineuses du pancréas (TIPMP) aussi appelées **IPMN** (*Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms*) et les néoplasies intra-épithéliales pancréatiques (*Pancreatic Intraepithelial Neoplasms* ou **PanIN**) (Figure 4), (Del Chiaro, M. *et al.*, 2014). Ces lésions sont généralement asymptomatiques jusqu'à des stades avancés. Leur fréquence augmente avec l'âge. Leur découverte, bien que souvent fortuite, est toutefois fréquente en cas d'adénocarcinome. Les PanINs représentent plus de 90% des lésions conduisant à un adénocarcinome. Longtemps débattue, l'une des origines de ces lésions serait attribuée aux cellules acineuses capables d'une grande plasticité (De Waele, E. *et al.*, 2014). En particulier dans des conditions inflammatoires (pancréatites chroniques ou aiguës), ces cellules seraient capables de transitions acino-canalaires pour se transformer en cellules possédant des caractéristiques canalaire (Bhanot, U. and Möller, P., 2009; Guerra, C. *et al.*, 2007; Kopp, J. L. *et al.*, 2012).

A. Néoplasmes pancréatiques intra-épithéliaux

Les néoplasies intra-épithéliales pancréatiques (PanIN) sont les lésions précancéreuses les plus fréquentes et les mieux caractérisées conduisant à l'adénocarcinome (> 90 %). Les travaux développés dans ce manuscrit sont focalisés sur le cancer du pancréas se développant à partir des PanINs. A la différence des MCNs et des IPMNs, les PanINs sont des lésions non visibles en imagerie (< 5 mm) mais détectables en microscopie. Ces lésions sont fréquentes et couramment multiples (lésions multifocales) mais restent asymptomatiques. Elles se développent préférentiellement au niveau des canaux sécréteurs et des canaux secondaires. Les lésions PanINs se composent de cellules caractérisées par l'accumulation progressive d'atypies architecturales et d'altérations génétiques. Selon le degré d'atypie, 3 stades de progression de l'état hyperplasique au carcinome *in situ* ont été identifiés : (i) PanIN-1A/B, (ii) PanIN-2 et (iii) PanIN-3 (Figure 5) (Hruban, R. H. *et al.*, 2000; Hruban, R. H. *et al.*, 2001).

-PanIN-1A/B, (faibles atypies) : les cellules présentent une structure épithéliale allongée avec un noyau de petite taille au pôle basal et une expression importante de mucines

Figure 5 manuscrit Romain VASSEUR



Adaptation de Hruban et al., 2001
<http://pathology.jhu.edu/pancreas/>

Figure 5 : Lésions néoplasiques intra-épithéliales pancréatiques. Classification et caractéristiques histologiques des lésions PanINs

cytoplasmiques supra-nucléaires. Une distinction est faite entre les lésions plates nommées -1A et les lésions papillaires nommées -1B.

-PanIN-2, (atypies modérées) : les cellules présentent des caractères de cellules épithéliales mais perdent progressivement leur polarité avec un noyau de taille plus importante qui n'est plus limité au pôle basal. Ces lésions peuvent être plates mais sont le plus couramment papillaires. Les mitoses sont rares et ne s'observent que du côté basal.

-PanIN-3, (atypies importantes) : les cellules ont perdu leur polarité et ont des noyaux de grandes tailles, proéminents et parfois irréguliers. Ces lésions sont papillaires et présentent des structures cribriformes (percées de cavités) vers la lumière du canal. Les mitoses ne sont plus restreintes au pôle basal et sont parfois anormales. Le stade PanIN-3 (carcinome *in situ*) présente des caractéristiques proches de l'adénocarcinome mais n'est pas invasif.

Les stades PanIN-1 et -2 sont fréquents, à l'inverse du stade PanIN-3 plus rares qui est souvent associé à l'adénocarcinome (Hruban, R. H. *et al.*, 2007; Vincent, A. *et al.*, 2004). Ces lésions s'observent avec une fréquence qui augmente progressivement avec l'âge et en cas de pancréatite (Guerra, C. *et al.*, 2007). La progression des PanINs est accompagnée par un développement stromal fibreux important, dense et hypovascularisé ainsi qu'une accumulation de mutations génétiques similaires à celles observées dans l'adénocarcinome (Erkan, M. *et al.*, 2012).

B. Lésions intracanales papillaires mucineuses

Les lésions intracanales papillaires mucineuses (IPMN) sont des lésions non invasives et visibles en imagerie (> 1 cm). Elles se composent de cellules collonoïdes muco-sécrétantes exprimant des caractères de cellules canalaire, organisées en papilles. Ces structures papillaires se forment au niveau du canal principal (Wirsung) et/ou au niveau des canaux secondaires avec lesquels les IPMNs communiquent. De ce fait, les IPMNs entraînent fréquemment des dilatations canalaire. Ces structures muco-sécrétantes sont classées en quatre sous-types : (i) gastrique, (ii) intestinal, (iii) pancréatito-biliaire ou (iv) oncocytique (Figure 6) (Fernández-del Castillo, C. and Adsay, N. V., 2010).

-Le type gastrique se présente de façon identique à la muqueuse gastrique avec l'expression des mucines MUC6 et MUC5AC. C'est un sous-type peu prolifératif qui évolue

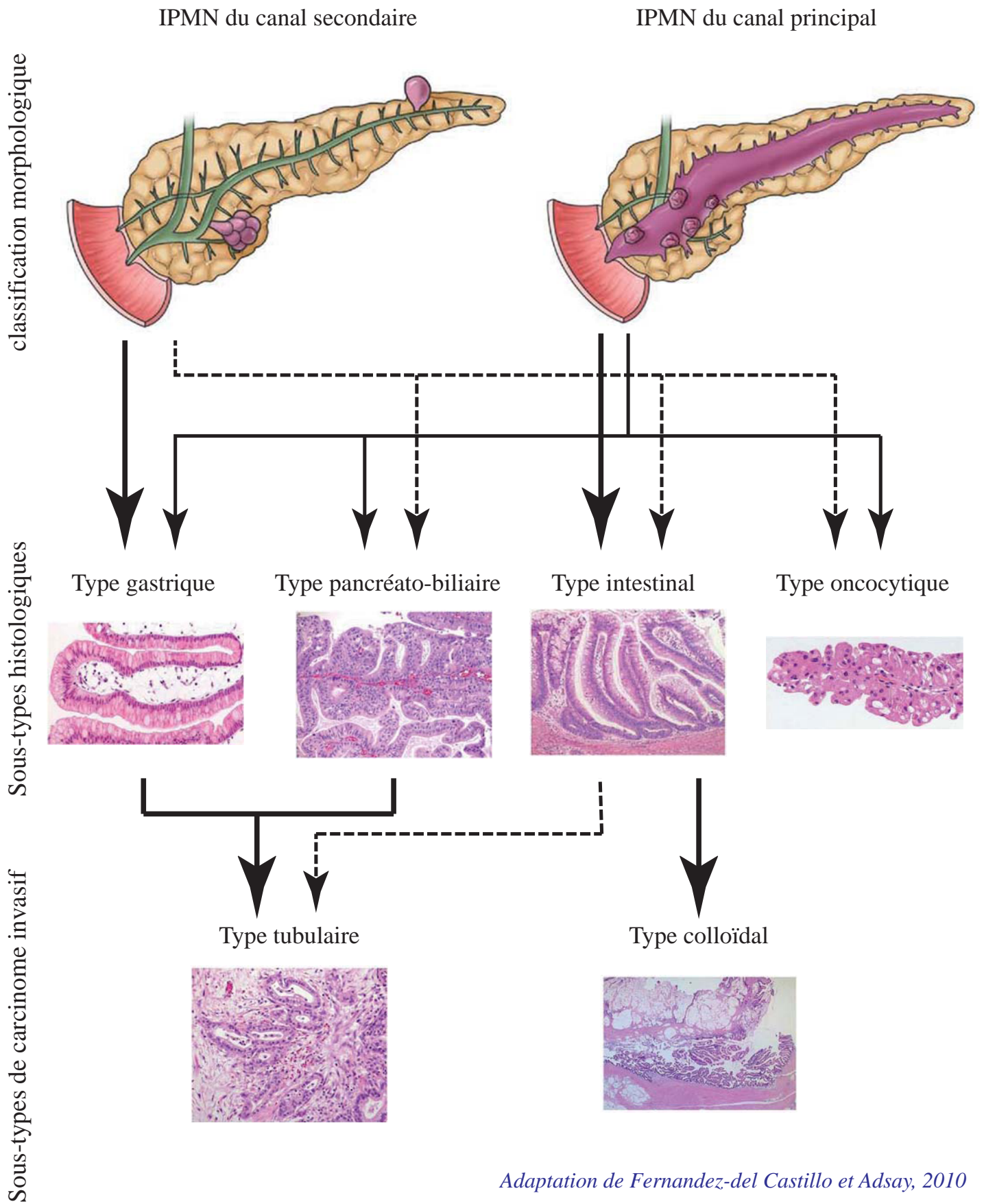


Figure 6 : **Lésions intra-canaliaires papillaires mucineuses du pancréas.** Classification histologiques et évolution des lésions IPMNs.

rarement vers un état invasif. Toutefois, lorsque cela se produit, il évolue le plus souvent vers un adénocarcinome de type canalaire (= tubulaire).

-Le type intestinal est plus large et complexe. Les lésions de ce sous-type expriment des marqueurs de différenciation intestinale (CDX2 et les mucines MUC2 et MUC5AC). C'est le sous-type qui évolue le plus fréquemment vers un carcinome, majoritairement de type colloïde (mucineux et non kystique).

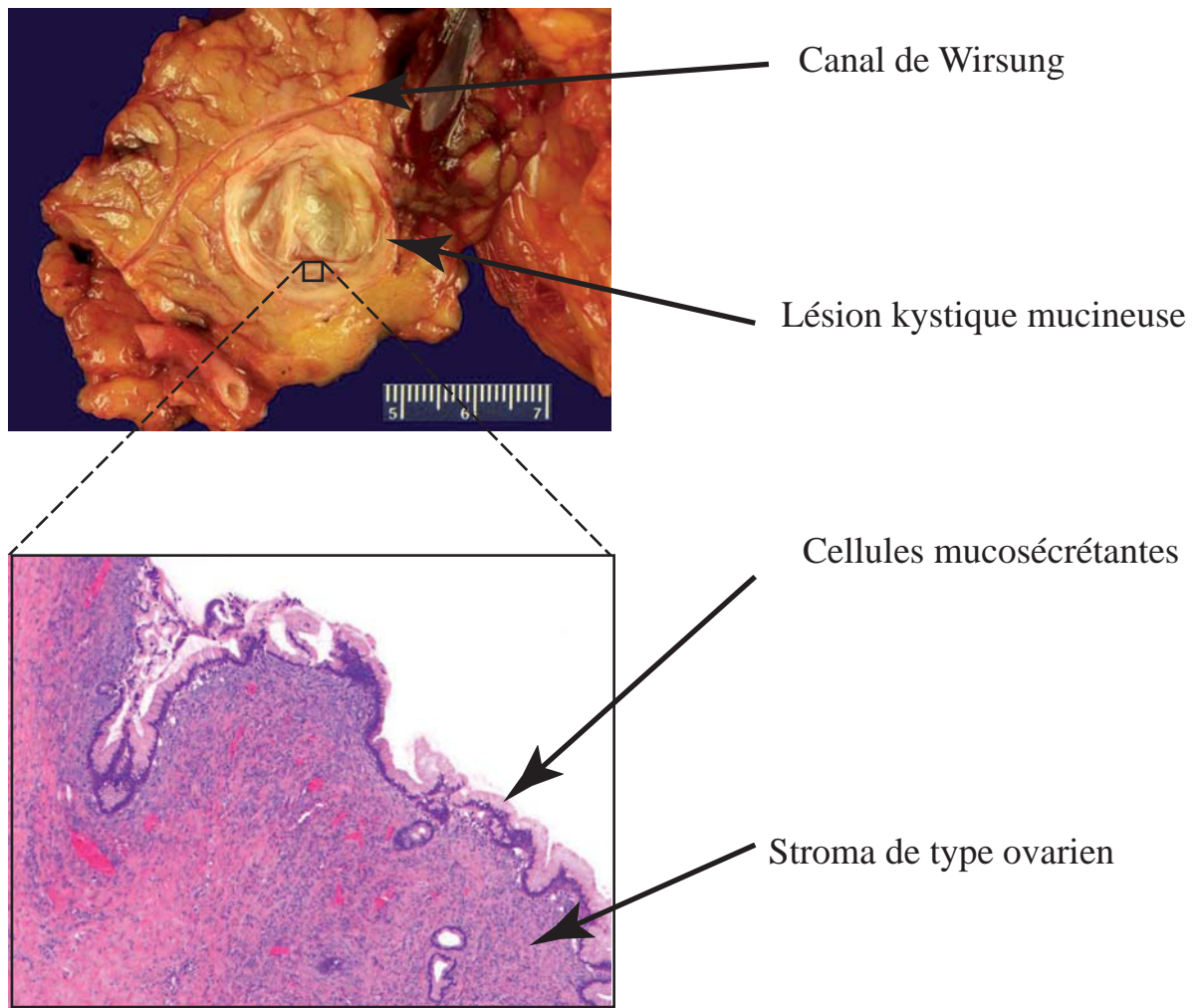
-Le type pancréato-biliaire est plus rare. Les lésions de ce sous-type se composent de cellules cuboïdes avec de fortes atypies organisées en structures papillaires complexes. Il est caractérisé par l'expression de marqueur d'agressivité tumorale (MUC1) mais l'absence des marqueurs intestinaux. Dans la majorité des cas, ce sous-type évolue vers un carcinome canalaire agressif (ou tubulaire).

-Le type oncocytique présente des structures papillaires avec une arborescence complexe. Il se compose de cellules caractéristiques avec l'expression des mucines MUC1 et MUC6, de nombreuses mitochondries et de volumineux granules acidophiles, et de cellules caliciformes. Ce sous-type présente des cellules fortement prolifératives avec de nombreuses atypies cytologiques.

Les IPMNs sont associées à un meilleur pronostic. En effet, seule un tiers des IPMNs détectées vont évoluer vers un stade d'adénocarcinome. La prise en charge consiste à réaliser une résection chirurgicale si la taille de l'IPMN est ≥ 3 cm ou dès l'apparition de symptômes. Si la taille est inférieure, seul un suivi régulier par imagerie est réalisé. La survie à 10 ans est $> 95\%$ en cas de résection complète. Si l'IPMN a évolué vers un stade invasif, le pronostic est plus péjoratif (survie à 5 ans de 40-50 %). Toutefois, ce sont des lésions peu fréquentes qui ne représentent que 1 % des adénocarcinomes pancréatiques (Fernández-del Castillo, C. and Adsay, N. V., 2010; Hruban, R. H. *et al.*, 2007).

C. Néoplasmes kystiques mucineux

Les néoplasmes kystiques mucineux (MCN) sont des lésions néoplasiques non invasives également visibles en imagerie (> 1 cm). Elles se composent de cellules colloïdales muco-sécrétantes (MUC2, MUC5AC et MUC1 pour les hauts grades) organisées en larges kystes non communicants avec les canaux pancréatiques. Ces kystes sont caractérisés par la présence d'un stroma de type ovarien exprimant les récepteurs à la progestérone et à l'œstrogène. De ce fait, ces lésions se retrouvent majoritairement chez la femme. Les MCNs sont classés selon le



Adaptation de Dudeja et Allen, 2015

Figure 7 : Lésions kystiques mucineuses. Structure macroscopique et caractéristiques histologiques des MCNs.

degré de dysplasie cellulaire en MCNs de bas grade (faible dysplasie), de moyen grade (dysplasie modérée) et de haut grade (dysplasie importante) (Figure 7) (Dudeja, V. and Allen, P. J., 2015).

Les MCNs sont associés à un très bon pronostic. En effet, les MCNs sont en majorité uniques et localisées (lésions unifocales) et seules 13 % de ces lésions détectées évoluent vers un stade malin (Distler, M. *et al.*, 2014). La prise en charge est similaire à celle des IPMNs et consiste à réaliser une résection chirurgicale. La survie à 5 ans pour les MCNs non invasifs est de 100 % et chute à 60 % pour celles ayant évoluées vers un stade invasif (Hruban, R. H. *et al.*, 2007; Vincent, A. *et al.*, 2004). Toutefois, ces lésions sont également peu fréquentes (< 1 %).

D. Evolution vers l'adénocarcinome

L'adénocarcinome pancréatique évolue majoritairement à partir des lésions PanINs par accumulation progressive de mutations. C'est un mécanisme lent. Le temps nécessaire au développement d'une tumeur a été estimé à plus de 11 ans et l'apparition de capacité métastatique nécessiterait 6 années supplémentaires (Yachida, S. *et al.*, 2010). Ce laps de temps important laisse envisager une fenêtre d'action pour la détection et le traitement de l'adénocarcinome.

V. Altérations génétiques

L'adénocarcinome pancréatique présente des caractéristiques cytologiques, architecturales et génétiques proches du stade PanIN-3 avec une structure papillaire complexe qui est capable de franchir la lame basale et d'envahir le stroma environnant. Le cancer du pancréas se caractérise par une forte hétérogénéité à la fois inter-individuelle mais également intra-tumorale (Jones, S. *et al.*, 2008; Waddell, N. *et al.*, 2015). Malgré le caractère clonal des métastases, cette hétérogénéité perdure entre les individus mais également entre les différentes métastases d'un même individu (Campbell, P. J. *et al.*, 2010; Maddipati, R. and Stanger, B. Z., 2015). Ces altérations géniques regroupent des mutations, des sur- ou sous-expressions ainsi que des insertions et délétions dont la majorité touche des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la balance survie/apoptose, la stabilité et la réparation de l'ADN (Biankin, A. V *et al.*, 2012; Hezel, A. F. *et al.*, 2006; Jones, S. *et al.*, 2008). La majorité de

Figure 8 manuscrit Romain VASSEUR

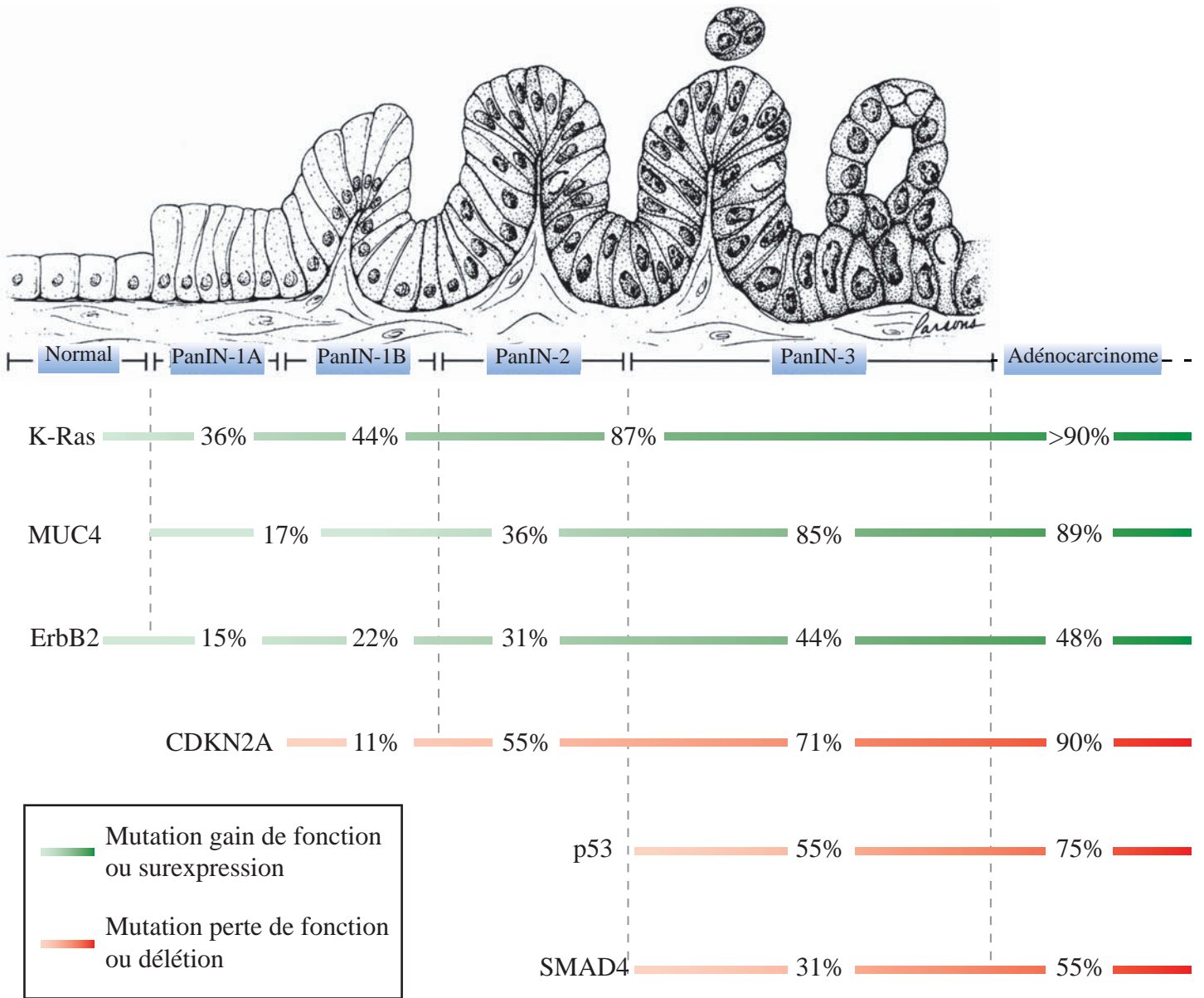
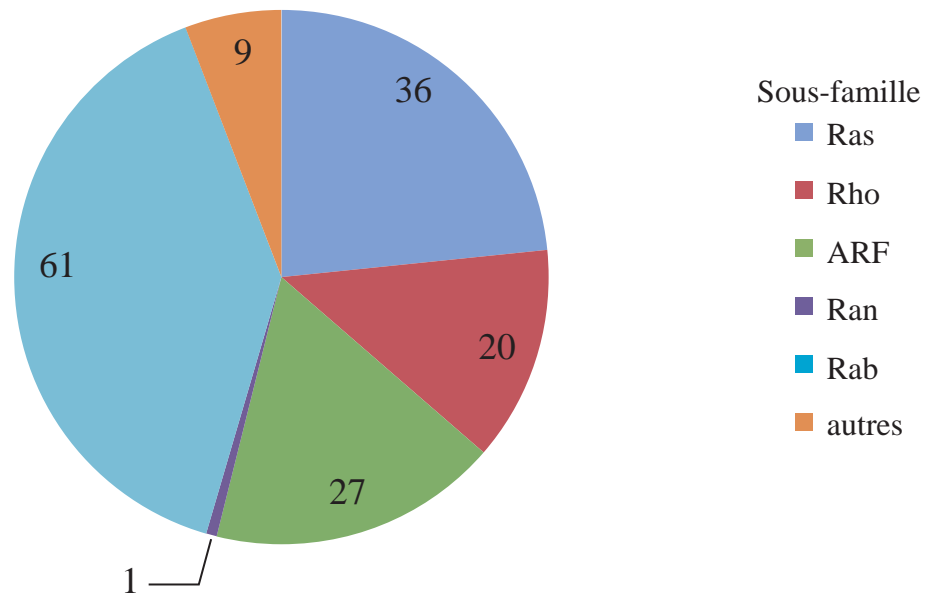


Figure 8 : **Altérations génétiques.** Fréquences et stades d'apparitions des altérations génétiques les plus fréquentes conduisant à l'adénocarcinome pancréatique

ces altérations sont associées à un mauvais pronostic dans le cancer du pancréas (Figure 8) (Shin, S. *et al.*, 2013).

Parmi les altérations précoces, la mucine MUC4 est néo-exprimée dès le stade PanIN-1A avec une fréquence qui augmente progressivement jusqu'au stade de l'adénocarcinome (89 %) (Kanda, M. *et al.*, 2013; Swartz, M. J. *et al.*, 2002). La surexpression de son partenaire membranaire, le récepteur ErbB2/HER2 est également précoce mais moins fréquente (< 50 %) (Hermanová, M. *et al.*, 2004). La perte de gènes suppresseurs de tumeur tels que CDKN2A, dès le stade PanIN-2, et p53 et SMAD4, à partir du stade PanIN-3, est également couramment détectée (Bardeesy, N. and Depinho, R. A., 2002; Neuzillet, C. *et al.*, 2013). Au cours de cette progression, des altérations de gènes impliqués dans la réparation et la stabilité de l'ADN (comme BRCA2, ATM et MLH1) sont également détectées mais avec des fréquences moindres (< 10 %). Parmi toutes les altérations détectées, les mutations de l'oncogène K-ras sont les plus précoces et sont virtuellement systématiques (> 90 %), (Almoguera, C. *et al.*, 1988; Löhr, M. *et al.*, 2005). Ces mutations de l'oncogène K-ras sont considérées comme l'événement initiateur de la cancérogenèse pancréatique (Figure 8) (Collins, M. A. *et al.*, 2012a).

A



B

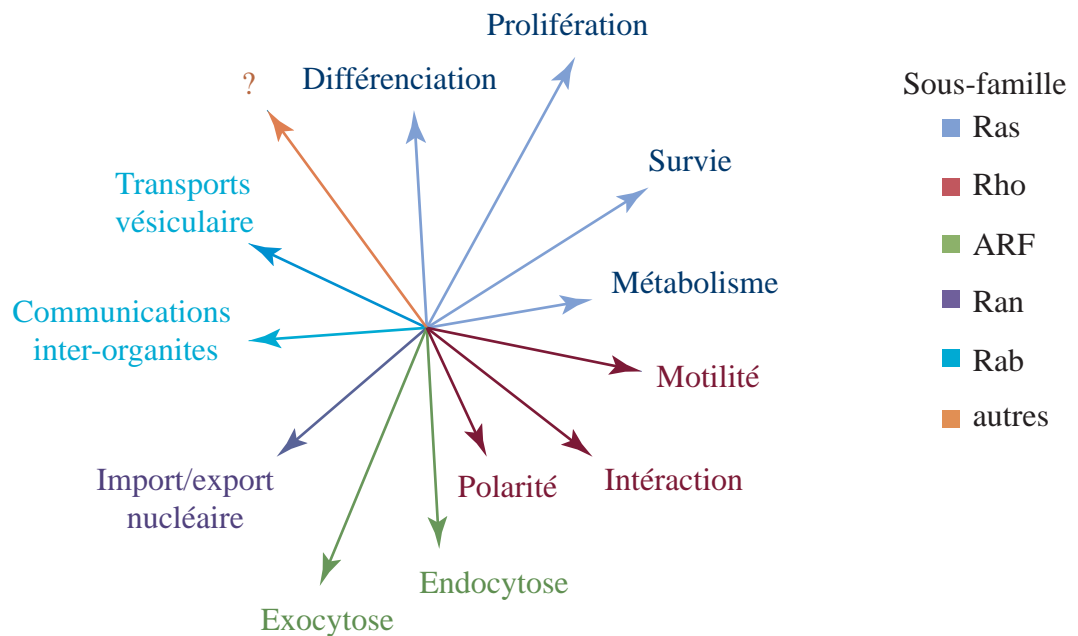


Figure 9 : **La super-famille des Ras GTPases.** (A) Les différentes sous-familles de Ras GTPases et le nombre de protéines identifiées dans chacune d'elles. (B) Principales fonctions des différentes sous-familles.

ONCOGENE RAS

I. Ras GTPases

A. Super-famille des Ras GTPases

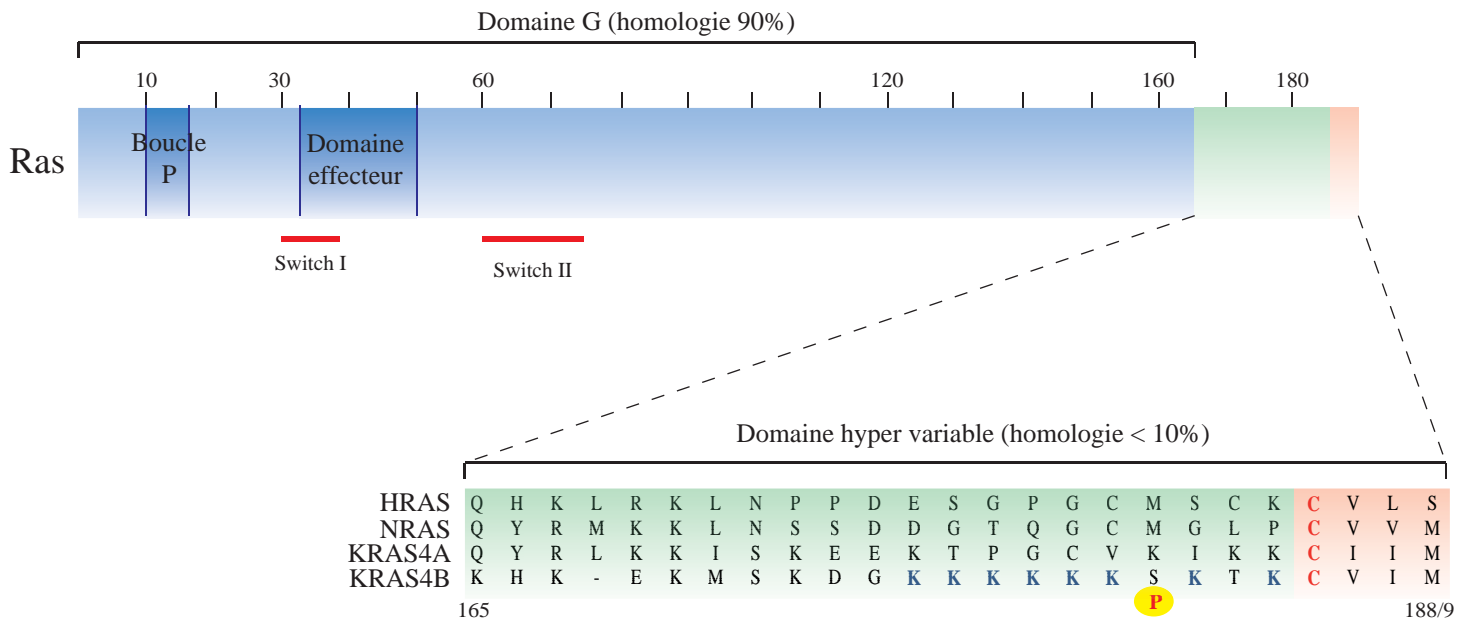
La super-famille des protéines Ras fait partie de la classe des petites protéines G. Elle regroupe un ensemble de plus de 150 hydrolases de guanosine tri-phosphates (GTPases) monomériques (contrairement aux autres protéines G qui sont trimériques) qui présentent une forte homologie de séquence et de structure (Wennerberg, K. *et al.*, 2005). Fortement conservée au cours de l'évolution, cette famille de protéines joue des rôles majeurs en permettant la transduction, l'intégration et la propagation des signaux venant des récepteurs membranaires vers l'intérieur de la cellule (Saad, I. I. *et al.*, 2014). Cette super famille est divisée en 5 branches principales formant les sous-familles : (i) Ras, (ii) Rho, (iii) Rab, (iv) ARF et (v) Ran (Figure 9) (Van Dam, T. J. P. *et al.*, 2011; Saad, I. I. *et al.*, 2014) :

-La sous-famille des protéines Ras (*Rat sarcoma*) est composée de 36 membres, impliqués dans l'activation des voies de signalisation conduisant à une grande variété de réponses biologiques. Les protéines Ras sont impliquées principalement dans la régulation de gènes jouant un rôle dans la prolifération, la différenciation, le métabolisme et la survie. Cette sous-famille comprend notamment H-, N- et K-Ras, membres fondateurs à l'origine de la caractérisation de la super famille. C'est le sous-groupe principalement impliqué dans les cancers.

-La sous-famille des protéines Rho (*Ras homologous*) est composée de 20 membres qui sont des acteurs clefs dans la régulation du cytosquelette d'actine. Principalement, ces GTPases sont impliquées dans la motilité, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice ainsi que dans la polarité cellulaire *via* la régulation et la modulation du cytosquelette.

-La sous-famille des protéines Rab (*Ras-like protein in brain*) est composée de 61 membres. Majoritairement, ces GTPases sont impliquées dans le transport vésiculaire et dans la communication entre les vésicules et les différents organites intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique ou l'appareil de golgi.

Figure 10 manuscrit Romain VASSEUR



Adaptation de Cox et al., 2014

Figure 10 : **Représentation schématique des protéines Ras.** Organisation des domaines de liaison au phosphate (Boucle P), de liaisons aux effecteurs, de changement de conformation (Switch I et II) et des domaines hyper variables et le domaine N-terminal CAAX. Longueur relative en acides aminés.

-La sous-famille des protéines ARF (*ADP ribosylation factor*) est composée de 27 membres, également impliqués dans le transport vésiculaire. Principalement, ces protéines associées en complexe jouent des rôles dans la régulation de l'endocytose et l'exocytose ainsi que dans le transport rétrograde de l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique.

-La sous-famille Ran (*Ras-like nuclear*) n'est composée que d'un seul membre. Principalement, la protéine Ran est une GTPase impliquée dans l'import/export nucléaire d'ARN et de protéines. Cependant, c'est une protéine également impliquée dans l'assemblage des fuseaux mitotiques, la réplication de l'ADN et l'assemblage de l'enveloppe nucléaire.

A ces 5 sous-familles, s'ajoute encore 9 GTPases appartenant à la super-famille mais qui ne sont pas classées car leur fonction reste inconnue. Le sous-groupe des protéines Ras est la sous-famille principalement impliquée en oncologie. Les travaux développés dans ce manuscrit sont focalisés sur cette sous-famille comprenant, notamment, les trois gènes *HRAS*, *NRAS* et *KRAS*, qui codent pour les quatre protéines H-ras, N-ras, K-ras4A et K-ras4B (issues d'un épissage alternatif de l'exon 4). Généralement, la désignation Ras fait référence à ces quatre protéines, membres particuliers de la sous-famille Ras. La désignation K-ras désigne la protéine K-ras4B dont l'expression est ubiquitaire contrairement au variant d'épissage K-ras4A dont l'expression est plus variable (Tsai, F. D. *et al.*, 2015).

B. Structure et mode d'action

B.1. Structure des protéines Ras

L'ensemble des protéines Ras est composé de petites GTPases de 21 kDa (188-189 acides aminés). Elles ont la particularité de posséder une structure tridimensionnelle très similaire, ainsi qu'une forte homologie de séquences entre-elles. Ces protéines se composent principalement de 2 domaines (Schubert, S. *et al.*, 2007) (Figure 10) :

-Un domaine G (1^{er} au 165^{ème} aa) fortement conservé du côté N-terminal. Ce domaine est subdivisé en différentes régions. Une région conservée à 100 % (1^{er} à 85^{ème} aa) qui inclut une boucle P (boucle de liaison au phosphate du 10^{ème} au 16^{ème} aa), un domaine de liaison aux effecteurs (32^{ème} au 40^{ème} aa) et deux régions, *Switch I* (32^{ème} au 38^{ème} aa) et *Switch II* (59^{ème} au 76^{ème} aa), responsables du changement de conformation. Il est poursuivi par une région centrale fortement conservée (du 85^{ème} au 165^{ème} aa) dans toute la super-famille des Ras GTPases (85 à 90 % d'homologie). C'est un domaine dont la structure est très similaire à celle des sous-unités α des petites protéines G trimériques.

Figure 11 manuscrit cycle GDP GTP

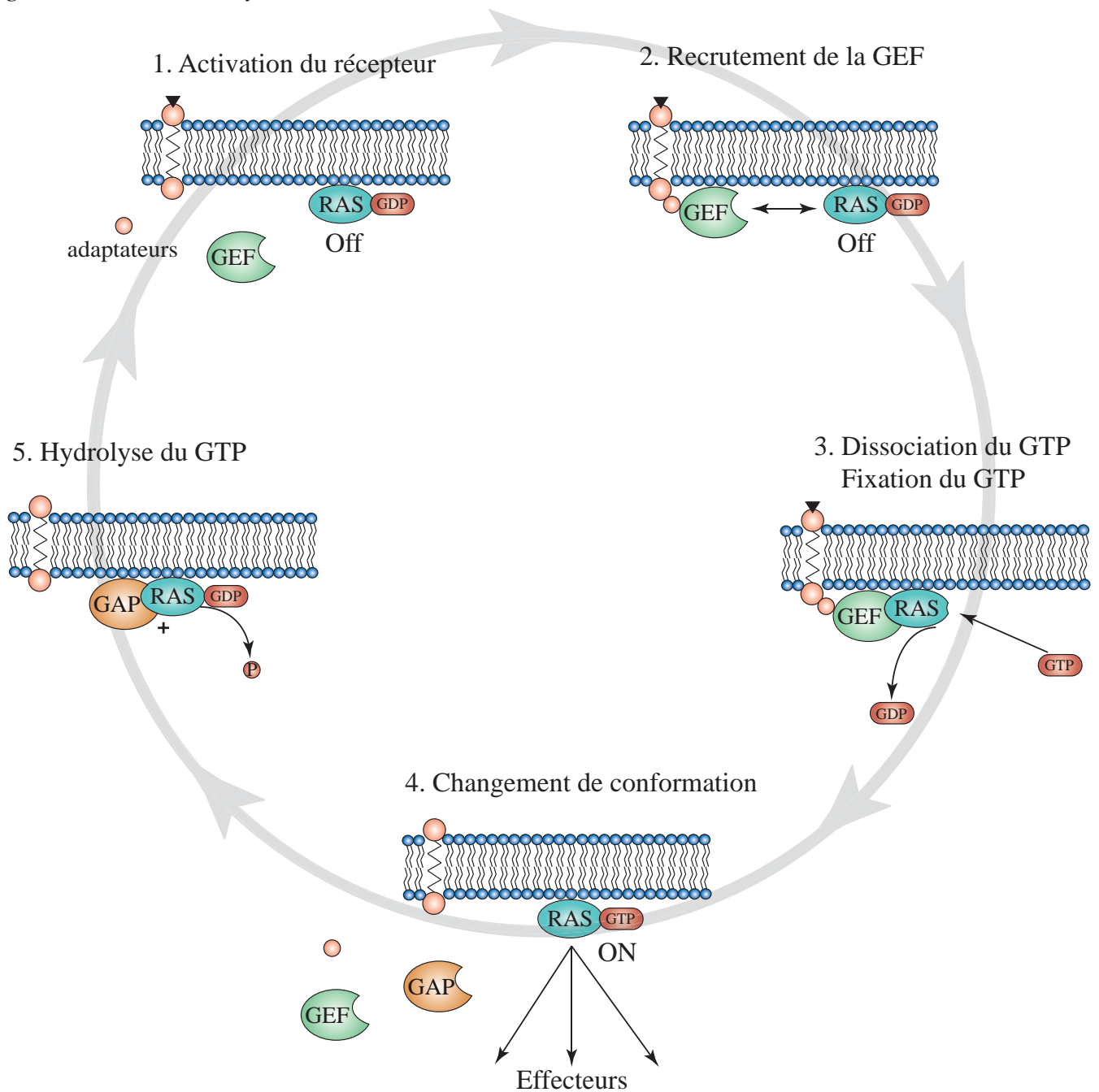


Figure 11 : Cycle de fonctionnement des Ras GTPases. Recrutement à la membrane d'une GTPase échange factor (GEF) par des protéines adaptatrices. Recrutement de la protéine Ras et dissociation du GDP. Fixation du GTP qui entraîne le changement de conformation. Activation des effecteurs et hydrolyse du GTP stimulée par une GTPase activating protein (GAP) pour retourner en conformation initiale.

-Un domaine HVR (*Hyper variable region*) présentant de fortes différences entre les différents membres du côté C-terminal (165^{ème} au 188/9^{ème} aa). Ce domaine inclut une région de régulation de la fixation à la membrane et le domaine conservé CAAX (A = acide aminé aliphatique et X = n'importe quel acide aminé), siège d'une modification post-transcriptionnelle (farnésylation sur la cystéine) qui permet l'ancrage sous-membranaire. Ce domaine HRV contient également une séquence siège de palmytoylation qui permet de stabiliser l'ancrage sous-membranaire. Seule la protéine K-ras4B ne possède pas cette séquence. Dans le domaine HRV de la protéine K-ras4B, ce site est remplacé par une séquence basique riche en résidus lysines (chargée positivement) permettant une stabilisation électrostatique sous-membranaire (chargée négativement).

B.2. Mode d'action des Ras GTPases.

Les protéines Ras sont des GTPases qui fonctionnent comme des interrupteurs on/off (Figure 11) (Adjei, A. A., 2001; Bos, J. L. *et al.*, 2007). A l'état basal, les protéines Ras fixées à la surface interne de la membrane plasmique sont liées à une guanosine di-phosphates (GDP) dans un état inactif. L'activation d'un récepteur membranaire entraîne le recrutement d'une protéine RasGEF (*Ras Guanidine exchange factor*) à la membrane plasmique *via* des protéines adaptatrices contenant des domaines SH2 et SH3 (*Sequence homology*).

Ce recrutement à la membrane permet l'interaction de la RasGEF avec la protéine Ras et entraîne la dissociation du GDP. La concentration de GTP intracellulaire étant dix fois supérieure à celle du GDP, la protéine Ras libre va rapidement fixer une molécule de GTP (Feig, L. A., 1999). Cette fixation provoque la dissociation de la GEF et un changement de conformation de la protéine Ras, la faisant passer sous une forme active. Sous cette forme, Ras peut recruter et activer ces différents effecteurs (pouvant inclure d'autres GEFs) entraînant la propagation du signal membranaire vers les voies de signalisation à l'intérieur de la cellule.

L'activation de Ras est transitoire. Après stimulation de ces effecteurs, la GTPase va hydrolyser le GTP en GDP ce qui provoque la dissociation des complexes et le retour à la conformation inactive. Toutefois, l'activité GTPasique de ces protéines est très faible. Pour provoquer cette hydrolyse de façon efficace, Ras a besoin d'une GAP (*GTPase activating protein*) qui permet de stimuler et favoriser son activité (multipliée par 300) pour la rendre compatible avec sa fonction biologique (Bos, J. L. *et al.*, 2007; Malumbres, M. and Barbacid, M., 2003). Cette activité cyclique entre la conformation active et la conformation inactive est

intensément régulée par les très nombreuses GEFs et les GAPs qui possèdent chacune un panel de cible propre et en partie redondant (intégration des signaux) (Feig, L. A., 1999; Mitin, N. *et al.*, 2005; Wennerberg, K. *et al.*, 2005).

II. Ras en cancérologie

A. Découverte et mutations

A.1 Emergence des oncogènes Ras

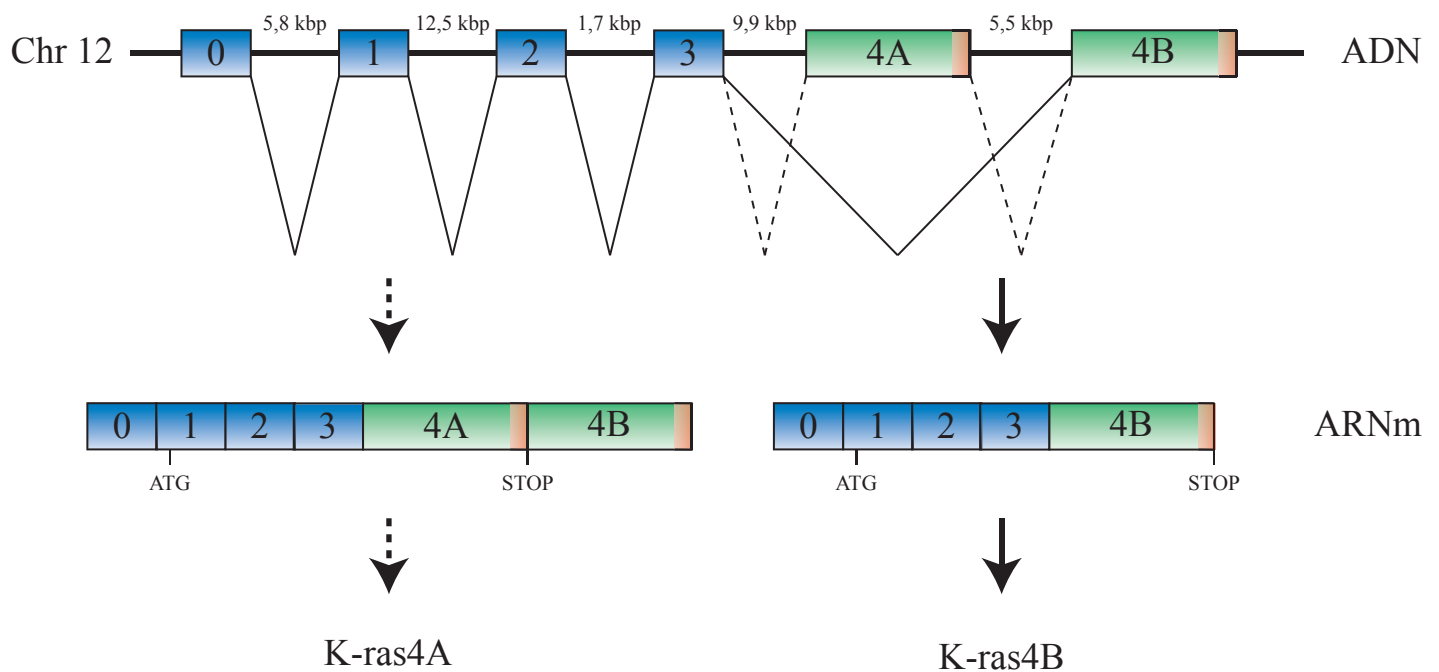
Dans les années 1960, des études intensives portant sur les rétrovirus isolés chez les rongeurs (rats et souris) ont permis la découverte des premiers éléments transformant. L'habilité de ces rétrovirus à former des sarcomes chez l'animal est à l'origine de leur nom RAS (*rat sarcoma virus*). Les variants ont été différenciés plus tard et nommés selon l'auteur de leur découverte : *Harvey rat sarcoma virus* (v-H-ras, Harvey 1964) et *Kirsten rat sarcoma virus* (v-K-ras, Kirsten & Mayer 1967). Ce sont les premiers éléments génétiques identifiés des années plus tard dans le génome humain qui ont permis la découverte puis la caractérisation des oncogènes *HRAS* et *KRAS* (Cox, A. D. and Der, C. J., 2010). Le gène *NRAS* fut identifié plus tardivement à partir d'une lignée de neuroblastome (Shimizu, K. *et al.*, 1983). Dans les années 1980, il a été découvert que la capacité de transformation de ces oncogènes Ras était la conséquence de mutations ponctuelles (Capon, D. J. *et al.*, 1983).

A.2. Gene de KRAS

Le proto-oncogène *KRAS* se situe en sens inverse (*reverse strand*) du bras court (en p12.1) sur le chromosome 12. Son gène s'étend sur une région de 46 kb et code pour 6 exons : (i) l'exon 0 et le début de l'exon 1 codent le 5'-UTR. (ii) Les exons 1, 2 et 3 codent la partie N-terminale conservée dans toute la super famille. (iii) Les exons 4A et AB, subissant un épissage alternatif, codent pour la partie C-terminale hyper variable (Domaine HRV) et un long 3'-UTR (McGrath, J. P. *et al.*, 1983). Deux ARN messagers sont produits à partir de ce gène : l'ARNm de K-ras4A et l'ARNm de K-ras4B qui diffèrent fortement dans leur partie terminale (Figure 12).

L'ARNm de K-ras4A contient les 6 exons du gène (0, 1, 2, 3, 4A et 4B) bien que l'exon 4B ne soit pas traduit du fait de la présence d'un codon stop dans la partie terminale de l'exon 4A. La protéine produite possède une séquence et une structure terminale proche de H- et N-ras, siège de palmytoylation pour son ancrage sous-membranaire.

Figure 12 manuscrit Romain VASSEUR



Tissus	K-ras4A (%)	K-ras4B (%)
Foie	30 ± 2,6	70 ± 2,6
Rein	15 ± 5,4	85 ± 5,4
Cœur	15 ± 5,1	85 ± 5,1
Poumons	34 ± 7,6	66 ± 7,6
Cerveau	4 ± 1,4	96 ± 1,4
Moelle épinière	10 ± 4,4	90 ± 4,4
Estomac	30 ± 4,2	70 ± 4,2
Intestin grêle	52 ± 2,2	48 ± 2,2
Colon	50 ± 2,4	50 ± 2,4

Adaptation de Pells et al 1997

Figure 12 : **Gène et transcrits de K-ras.** Représentation schématique de la structure du gène de K-ras et de ses transcrits. Expression relative des différents transcrits K-ras4A et K-ras4B dans l'organisme.

L'ARNm de K-ras4B ne contient que 5 exons. L'exon 4A est excisé par un mécanisme d'épissage alternatif. Sans la présence de cet exon, l'exon 4B est traduit pour produire la protéine K-ras4B avec sa région terminale riche en lysine.

B.2. Isoformes K-ras4A et K-ras4B

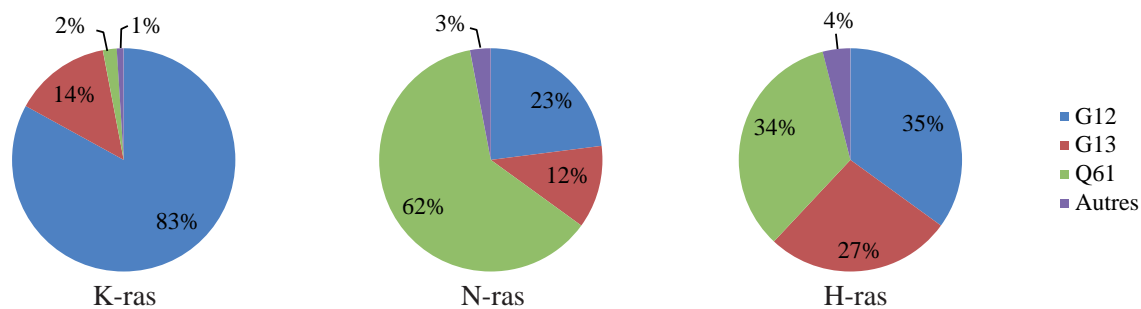
Les mutations de l'oncogène K-ras touchent majoritairement des codons de l'exon 1 (Glycine 12 ou Glycine 13). L'allèle porteur de mutation continue de subir un l'épissage alternatif et entraîne donc la production de deux protéines mutées et constitutivement activées. Le gène de *KRAS* est exprimé de façon ubiquitaire, majoritairement pendant le développement. Toutefois, l'épissage alternatif des exons terminaux ne se produit pas de manière équivalente dans tous les tissus. L'isoforme K-ras4B est majoritaire et est exprimé par tous les tissus à partir de l'embryogenèse. A l'inverse, l'isoforme K-ras4A a une expression plus restreinte, limitée à quelques tissus et de façon très variable (Figure 12) (Pells, S. *et al.*, 1997; Tsai, F. D. *et al.*, 2015). Pour la suite de ce manuscrit, K-ras désignera l'isoforme K-ras4B, majoritaire dans les adénocarcinomes pancréatiques.

B. K-ras dans le cancer

B.1 Mutations Ras et cancer

Les mutations des oncogènes Ras sont retrouvées dans environ 30 % des cancers (COSMIC database <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>) et 97 à 99 % de ces mutations Ras touchent les codons 12 (Glycine12), 13 (Glycine13) et 61 (Glutamine61). Ces mutations de la glycine 12 ou de la glycine 13 entraînent un encombrement stérique dans la molécule provoquant le décalage spatial de la glutamine 61 indispensable à l'interaction avec la GAP (Bos, J. L. *et al.*, 2007). Il en résulte donc une accumulation de protéines Ras liées au GTP, incapables de l'hydrolyser et donc un blocage en une conformation active. Les mutations affectant d'autres résidus, en dehors de ces trois codons, ne sont observées que dans de très rares cas. Toutefois, toutes les protéines Ras ne sont pas mutées de manière équivalente : certaines mutations touchent préférentiellement une isoforme et certaines isoformes sont mutées préférentiellement dans certains cancers (Figure 13) (Castellano, E. and Santos, E., 2011; Cox, A. D. *et al.*, 2014). Toutefois, la signification biologique de ces prédominances reste aujourd'hui largement incomprise et semble être, dans la majorité des cas, dépendante du type cellulaire touché (Guerra, C. *et al.*, 2003).

Figure 13 manuscrit Romain VASSEUR



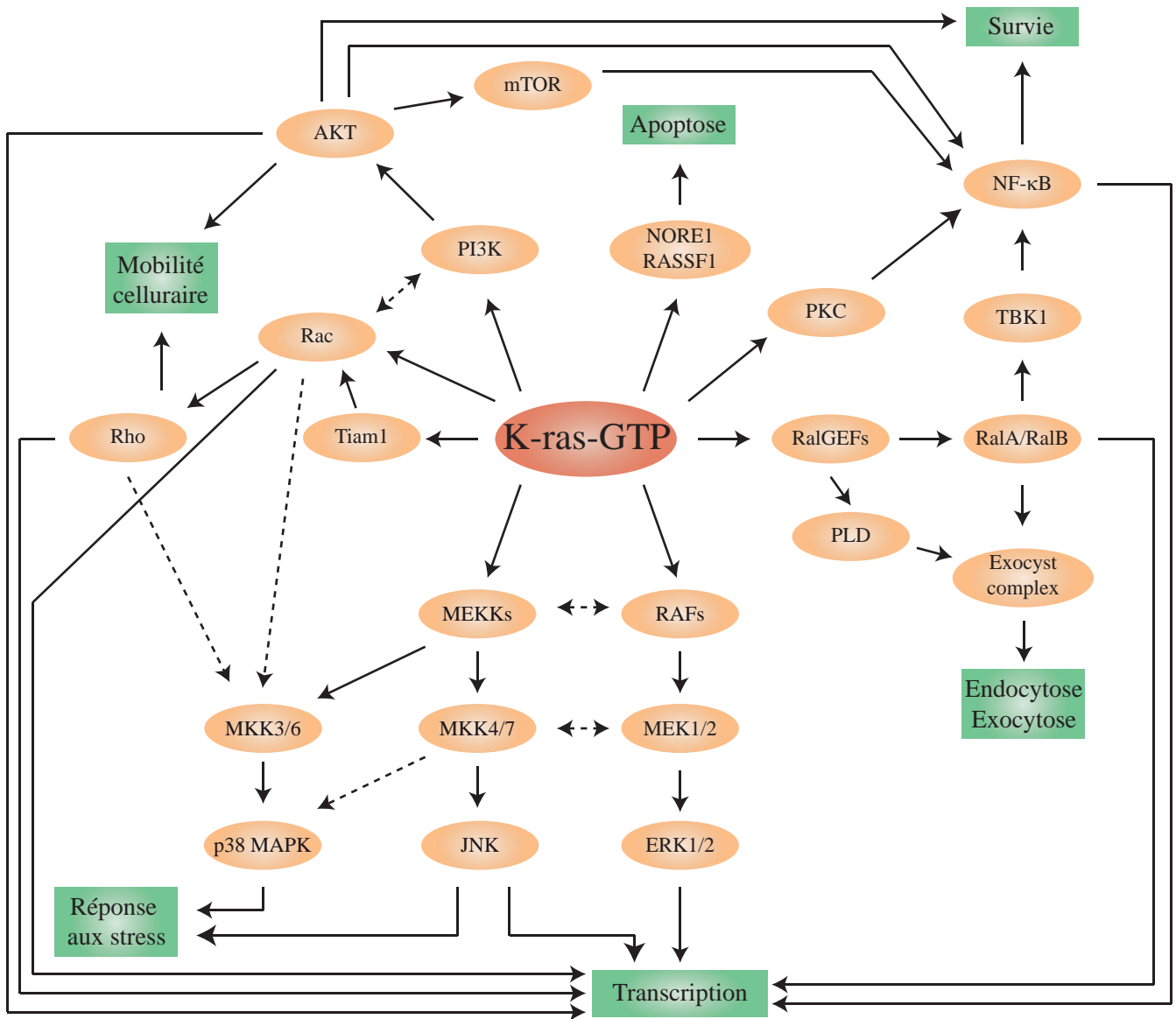
Cancer	% K-ras	% N-ras	% H-ras	Total
Adénocarcinome pancréatique canalaire	97,7	0,0	0,0	97,7
Adénocarcinome colorectal	44,7	7,5	0,0	52,2
Myélome multiple	22,8	19,9	0,0	42,6
Adénocarcinome pulmonaire	30,9	0,9	0,3	32,2
Mélanome cutané	0,8	27,6	1,0	29,1
Carcinome utérin de l'endomètre	21,4	3,6	0,4	24,6
Carcinosarcome utérin	12,3	1,8	0,0	14,3
Carcinome thyroïdien	1,0	8,5	3,5	12,5
Leucémie myéloïde aigue	3,1	6,7	1,6	11,4
Carcinome urothéliale de la vessie	3,1	1,4	5,9	10,6
Adénocarcinome gastrique	11,4	0,9	0,0	10,0
Adénocarcinome de l'utérus	8,3	0,0	0,0	8,3
Carcinome squameux de la tête et du cou	0,5	0,3	4,7	5,5
Lymphome diffus à grandes cellules B	5,2	0,0	0,0	5,2
Adénocarcinome œsophagien	3,8	0,0	0,6	4,4
Leucémie chronique lymphocytaire	1,9	2,5	0,0	4,4
Carcinome pulmonaire non à petites cellules	2,2	0,0	2,2	4,4
Carcinome pulmonaire à petites cellules	1,4	0,0	1,4	2,8
Carcinome rénal papillaire	1,2	0,6	0,6	2,4
Carcinome adénoïde kystique	0,0	0,0	1,7	1,7
Carcinome rénal à cellules chromophobes	0,0	1,5	0,0	1,5
Carcinome hépatocellulaire	0,8	0,4	0,0	1,4
Carcinome mammaire invasif	0,7	0,4	0,3	1,4
Cancer du col de l'utérus	1,3	0,0	0,0	1,3
Adénocarcinome ovarien séreux	0,6	0,6	0,0	1,3
Carcinome corticosurrénalien	1,1	0,0	0,0	1,1
Autres	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%

Adaptation de Cox et al., 2014

Figure 13 : **Mutations des oncogènes Ras.** Répartition des différentes mutations observées dans K-, N- et H-ras. Fréquence de mutations des différentes Ras protéines dans les cancers. Exprimée en % de Ras mutées.

B.2. *K-ras* dans le cancer du pancréas.

Les mutations de l'oncogène K-ras sont les mutations les plus fréquemment détectées des protéines Ras (85 % des mutations). Dans les cancers, l'oncogène K-ras présente la prévalence la plus importante parmi les membres de la super famille puisque ces mutations sont détectées dans 21 % des cancers (Cox, A. D. and Der, C. J., 2010). Les mutations de K-ras sont retrouvées dans 50 % des cancers du côlon et 25 % des cancers du poumon. Sa prévalence est la plus importante dans le cancer du pancréas (Bos, J. L., 1989; Capon, D. J. *et al.*, 1983). De plus, sa détection est associée à un mauvais pronostic (Urban, T. *et al.*, 1993). Dans l'adénocarcinome pancréatique, les mutations de l'oncogène K-ras sont quasiment systématiques (> 90 %) alors qu'elles ne s'observent que peu fréquemment dans les autres pathologies pancréatiques (Almoguera, C. *et al.*, 1988; Löhr, M. *et al.*, 2005; Maire, F. *et al.*, 2002). L'importance et le rôle majeur de cet oncogène dans l'initiation de la cancérogenèse pancréatique ont été démontrés par l'utilisation de modèles murins transgéniques. En particulier, le modèle murin développé par le docteur Tuveson et son équipe permet l'expression d'un mutant constitutivement actif K-ras^{G12D} spécifiquement dans le tissu pancréatique par l'utilisation d'un système cre-lox sous contrôle du facteur Pdx1, acteur clés dans la détermination pancréatique (Hingorani, S. R. *et al.*, 2003; Kim, S. K. and MacDonald, R. J., 2002). Dans ce modèle, l'expression seule du mutant suffit à reproduire la formation de PanINs révélant son rôle majeur dans l'initiation de la cancérogenèse pancréatique. Une fois les lésions apparues, l'oncogène K-ras reste un acteur indispensable à leur survie et leur progression, en dépit d'une évolution lente qui nécessite le concours d'altérations géniques additionnelles pour induire la formation d'une tumeur (Aguirre, A. J. *et al.*, 2003; Collins, M. A. *et al.*, 2012a). Enfin, une fois l'adénocarcinome pancréatique développé, K-ras participe aux propriétés de prolifération, de survie et de migration ainsi qu'aux capacités de chimiorésistance des cellules tumorales (Bryant, K. L. *et al.*, 2014; Collins, M. A. *et al.*, 2012b; Réjiba, S. *et al.*, 2007; Singh, A. *et al.*, 2009). Ces nombreux rôles induits, par les mutants K-ras, sont médiés par l'activation et le recrutement d'un grand nombre de voies de signalisation affectants profondément et de manière dynamique l'état cellulaire.



Adaptation de Malumbres et al., 2003

Figure 14 : **Représentation schématique des principales voies de signalisation activées par K-ras.** Principales voies de signalisations canoniques (flèches continues) et interconnexions (flèches discontinues) activées par l'oncogène K-ras et fonctions associées.

III. Signalisation K-ras

A. Généralités

Dans sa conformation liée au GTP, K-ras est capable de se lier physiquement et d'activer à un très grand nombre d'effecteurs. La majorité de ces effecteurs sont des éléments clés qui initient l'activation de voies de signalisation. Ces cibles possèdent l'un des domaines particuliers de liaison avec K-ras (partagés avec H- et N-ras) : (i) le domaine RBD (*Ras-Binding Domain*), (ii) le domaine RA (*Ras Association*) ou le domaine PI3K-RBD (*phosphoinositide 3-kinase-RBD*) (Repasky, G. A. *et al.*, 2004).

L'activation du mutant K-ras participe à de nombreuses propriétés biologiques parfois contradictoires par la régulation directe et indirecte de voies de signalisation (Herrmann, C., 2003; Herrmann, C. and Nassar, N., 1997). Son activité est impliquée dans l'induction de la prolifération, la migration, la survie, l'apoptose, la sénescence, la différenciation ou le métabolisme (Bryant, K. L. *et al.*, 2014; Drosten, M. *et al.*, 2010; Guerrero, S. *et al.*, 2000; Pylayeva-Gupta, Y. *et al.*, 2011; Shen, L. *et al.*, 2012). L'effet biologique résultant de l'activation de ces voies par K-ras sera alors dépendant du tissu et de l'état cellulaire au moment de l'activation. Les effecteurs directs les mieux caractérisés entraînent l'activation des voies de signalisation MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), de la voie PI3K (*Phosphoinositide 3-Kinase*) et de la voie RalGEF (*Ral Guanidine exchange factor*) (Shields, J. M. *et al.*, 2000). L'action sur les voies de stress p38 MAPK et JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) et sur la voie du NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) peut être induite par K-ras, soit *via* l'interconnexion avec d'autres voies de signalisation avec lesquelles elles communiquent, soit en réponse au stress provoqué par son action oncogénique (production d'espèces réactives de l'oxygène par exemple) (Ji, B. *et al.*, 2010; Pylayeva-Gupta, Y. *et al.*, 2011; Wang, P. *et al.*, 2015) (Figure 14).

B. Mitogen activated protein kinase

Les *mitogen activated protein kinase* (MAPKs) font partie des effecteurs les plus étudiés et les mieux caractérisés. Les MAPKs regroupent la plus vaste famille de protéine codant pour des kinases (518 gènes soit 1,7 % du génome) dont émergent 4 branches principales (i) la voie *extra-cellular-regulated kinase* (ERK) 1/2 impliquée notamment dans la régulation des processus mitotiques, (ii) la voie JNK impliquée dans la survie et la réponse aux stress, (iii) la voie p38 MAPK impliquée dans la réponse inflammatoire et la réponse aux stress et (iv) la

Figure 15 *manuscrit Romain VASSEUR*

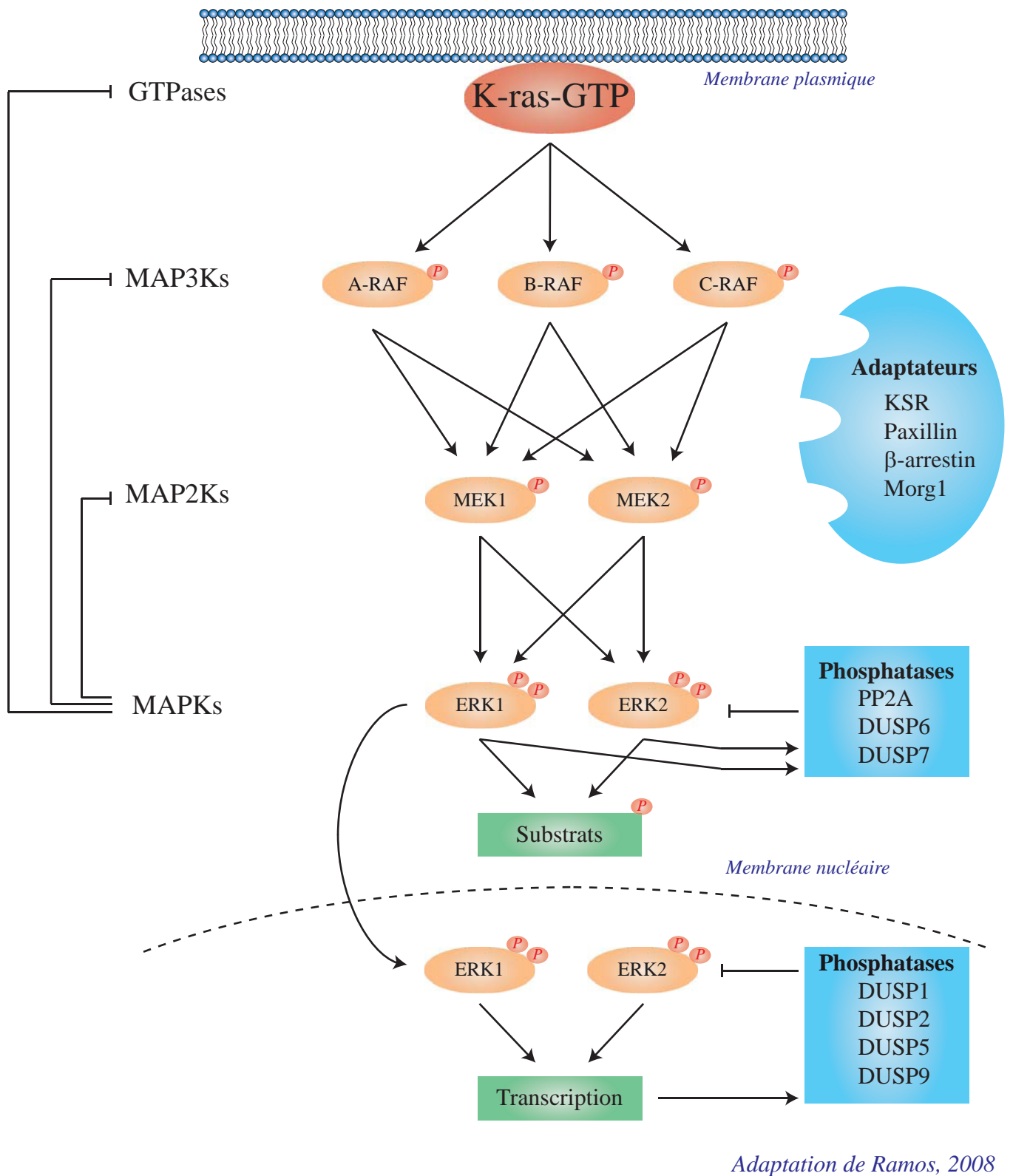


Figure 15 : **La voie p42/44 MAPK.** Principaux composants de la cascade des MAPKs et protéines régulatrices de la voie

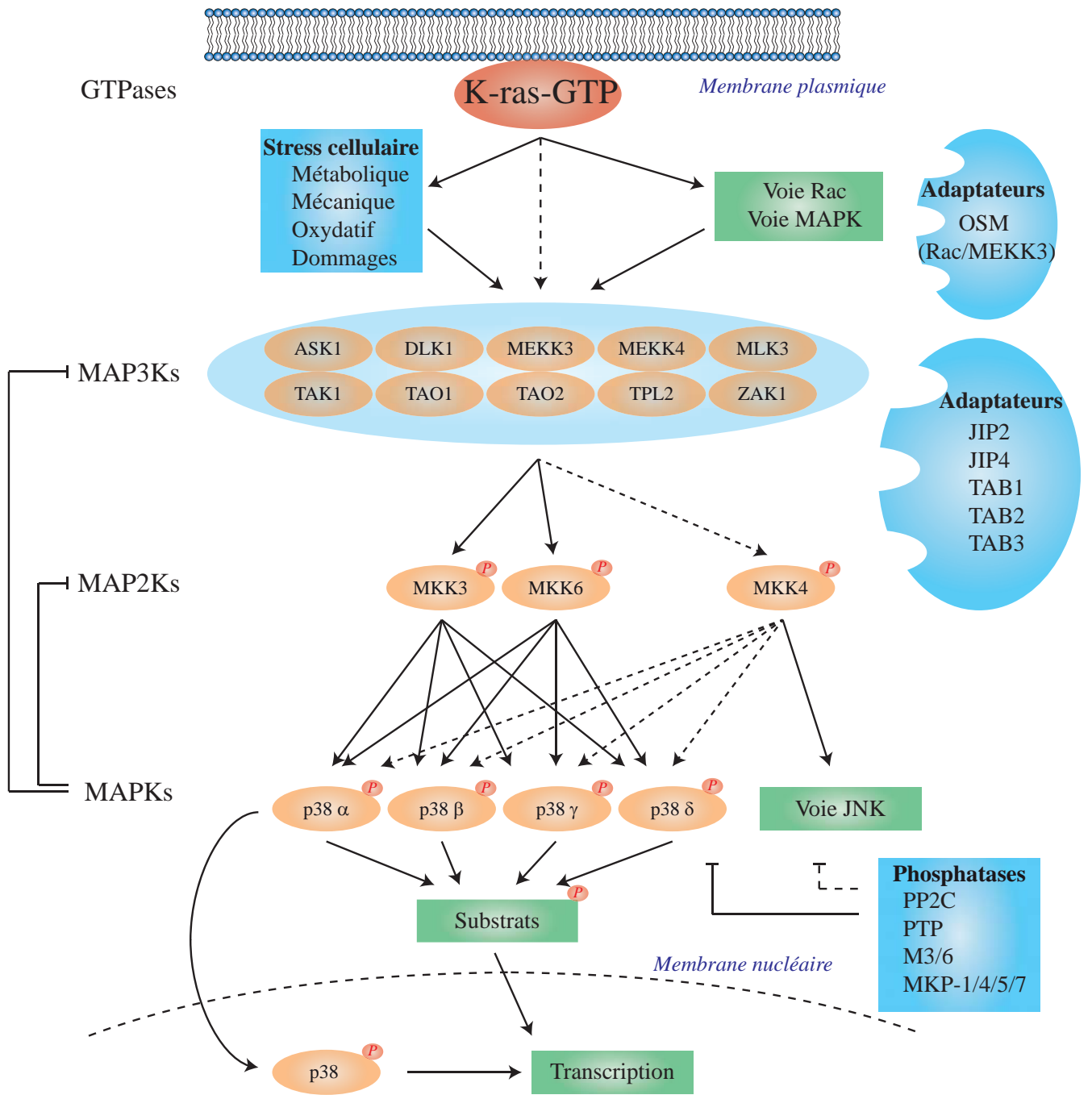
voie ERK5, moins bien caractérisée, impliquée dans la réponse inflammatoire (Finegan, K. G. *et al.*, 2015; Johnson, G. L. and Lapadat, R., 2002; Roskoski Jr, R., 2012). L'ensemble de ces voies fonctionne en cascade permettant l'intégration et la propagation des signaux par phosphorylation venant de la membrane plasmique.

B.1 voie p42/44 MAPK

Les composants de la voie ERK (p42/44 MAPK) font partie des protéines les plus conservées au cours de l'évolution et sont exprimées de façons ubiquitaire. C'est la voie de signalisation majoritaire dans les cellules pour permettre la communication de la membrane au noyau et notamment dans la régulation de la division cellulaire. Du fait de son importance, la voie ERK est généralement désignée simplement comme la voie MAPK. C'est la voie majoritaire recrutée par la signalisation des protéines Ras.

Cette voie se compose de 3 phospho-relais : (i) les MAPK kinase kinase (MAP3Ks) comprenant A-Raf, B-Raf et C-Raf qui sont des cibles directes de K-ras (Chong, H. *et al.*, 2003). (ii) Les MAPK kinase (MAP2Ks) comprenant MEK1 (= MKK1) et MEK2 (= MKK2) qui sont des substrats des MAP3Ks et activent (iii) les MAPKs ERK1 (= MAPK1, = p44 MAPK) et ERK2 (= MAPK2, = p42 MAPK), effecteurs de la voie (Roskoski, R., 2012) (Figure 15). Les kinases ERK1 et ERK2 (aussi appelées p44/42 MAPK en raison de leur taille) sont capables d'activer un très grand nombre de substrat, tant cytoplasmique que nucléaire. Parmi leurs substrats, de nombreux facteurs de transcription, de kinase et des composants d'autres voies de signalisation sont régulés (Yoon, S. and Seger, R., 2006). En particulier, le complexe facteur de transcription AP-1 (*Activator Protein-1*), composé des facteurs de transcription c-Fos et c-Jun, est une cible majeure de la voie (González, J. M. *et al.*, 2008; Milde-Langosch, K., 2005). L'ensemble de la voie est activée en amont principalement par des signaux provenant des GTPases et des petites protéines G recrutées par l'activation des récepteurs aux facteurs de croissances. A l'inverse, la voie est inhibée en aval par la régulation transcriptionnelle de ces composants et par une famille de phosphatase DUSP (*Dual-Specificity protein Phosphatases*) (Owens, D. M. and Keyse, S. M., 2007). Des protéines adaptatrices s'ajoutent à la voie ERK en interagissant avec ces divers composants (Ramos, J. W., 2008). Cette interaction permet un rapprochement spatial des différents relais au sein de la cellule et assure la spécificité du message transmis (Figure 15) (Garrington, T. and Johnson, G., 1999; Tanoue, T. and Nishida, E., 2003).

Figure 16 manuscrit Romain VASSEUR



Adaptation de Cuadrado et al., 2008

Figure 16 : La voie p38 MAPK. Principaux composants de la voie p38 MAPK et les protéines régulatrices de la voie.

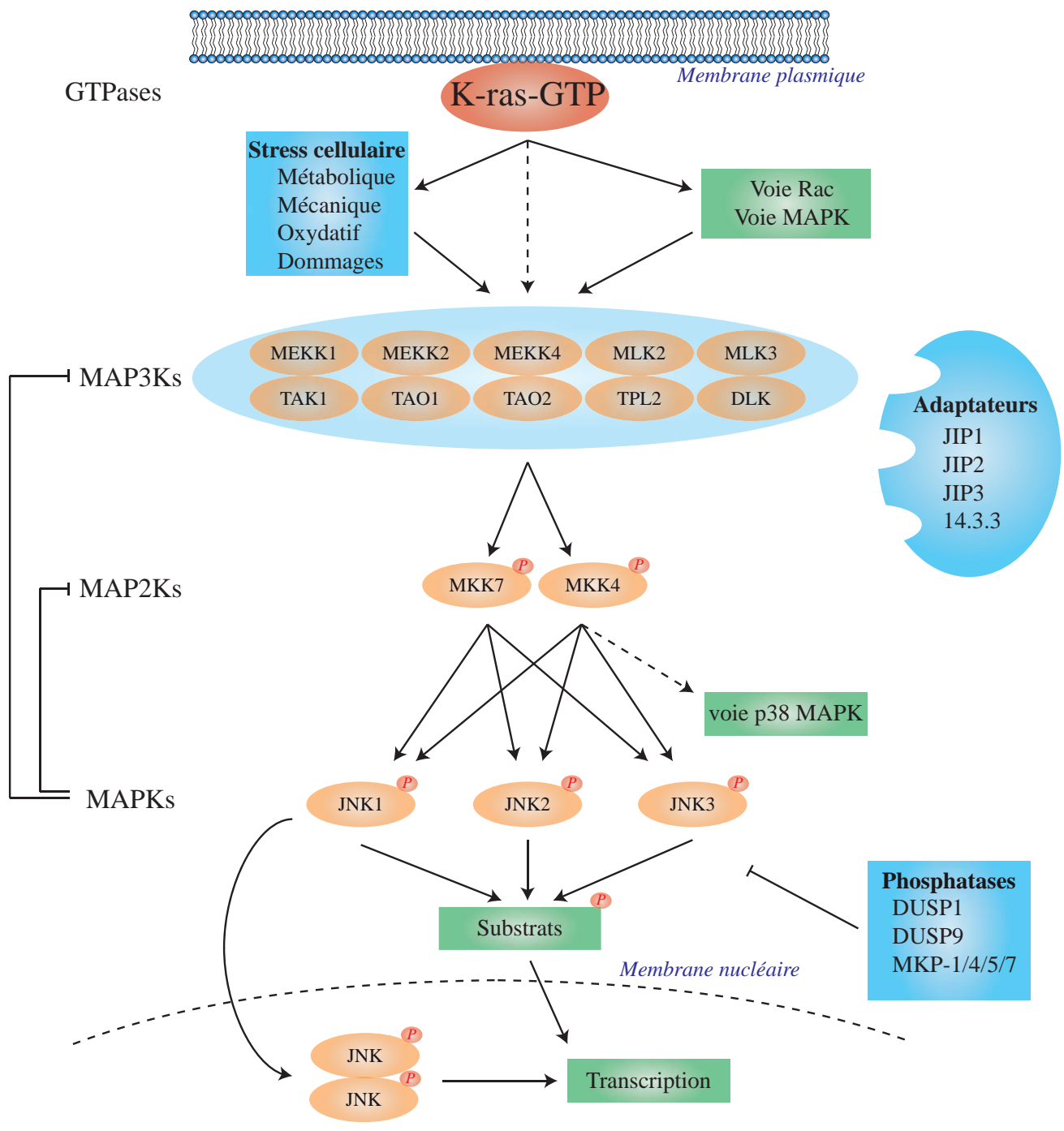
Dans les cancers et plus particulièrement dans celui du pancréas, les mutations de l'oncogène K-ras conduisent à l'activation constitutive de la voie p42/44 MAPK (Chapnick, D. A. *et al.*, 2011; Furukawa, T., 2015). Cette activation de la voie est associée à un mauvais pronostic (Handra-Luca, A. *et al.*, 2012). L'activation par K-ras de la voie ERK permet de soutenir les capacités de prolifération et la croissance sans ancrage des cellules tumorales pancréatiques (Ji, B. *et al.*, 2010; Tuveson, D. A. *et al.*, 2004). Son activation est également impliquée dans la balance survie/apoptose (Neuzillet, C. *et al.*, 2013) et dans les propriétés de migration et d'invasion des tumeurs pancréatiques (Endo, H. *et al.*, 2009; Zhao, S. *et al.*, 2011). Enfin, la voie p42/44 MAPK contribue à la chimiorésistance des tumeurs pancréatiques (Zheng, C. *et al.*, 2013) et soutient l'inflammation (Shin, S. young *et al.*, 2012).

B.2 Voie p38 MAPK

Les composants essentiels de la voie p38 MAPK sont les 4 kinases de 38 kDa p38 α (=MAPK14), p38 β (=MAPK11), p38 γ (=MAPK12, =ERK6, = SAPK3 (*Stress-activated protein kinase*)) et p38 δ (=MAPK13, =SAPK4) (Johnson, G. L. and Lapadat, R., 2002). La p38 α qui est la mieux caractérisée a une expression ubiquitaire. Les autres p38 MAPK ont une expression plus restreinte : la p38 β est détectée uniquement dans le cerveau, la p38 γ est exprimée par les cellules des muscles squelettiques et la p38 δ est détectée dans les cellules endocrines (Cuadrado, A. and Nebreda, A. R., 2010). Ces kinases partagent 60 % d'homologie de séquences et possèdent chacune une redondance partielle et une spécificité de substrat partielle (Cuenda, A. and Rousseau, S., 2007).

La voie p38 MAPK est organisée comme la voie ERK en 3 phospho-relais. Toutefois, ces composants sont plus nombreux et interagissent avec d'autres voies (Figure 16). Les 4 p38 MAPKs sont activées spécifiquement par des MAP2Ks comprenant MKK3 et MKK6 et par une MAP2K capable également d'activer la voie JNK : la MKK4 (Cuadrado, A. and Nebreda, A. R., 2010). Ces MAP2Ks sont régulées par une grande variété de MAP3Ks, dont la majorité sont des senseurs de stress cellulaire. L'ensemble de la voie est activée en amont par un large panel de stimuli regroupant la majorité des stress cellulaires tel que les stress métabolique, mécanique et oxydatif ou les dommages cellulaires. En aval, la voie est régulée négativement par l'action de différentes phosphatases dont beaucoup régulent également la voie JNK. Enfin, de nombreuses protéines adaptatrices permettent un rapprochement spatial et assurent une réponse spécifique à un stress particulier (Cuadrado, A. and Nebreda, A. R., 2010; Cuenda, A. and Rousseau, S., 2007).

Figure 17 manuscrit Romain VASSEUR



Adaptation de Wagner et al., 2009

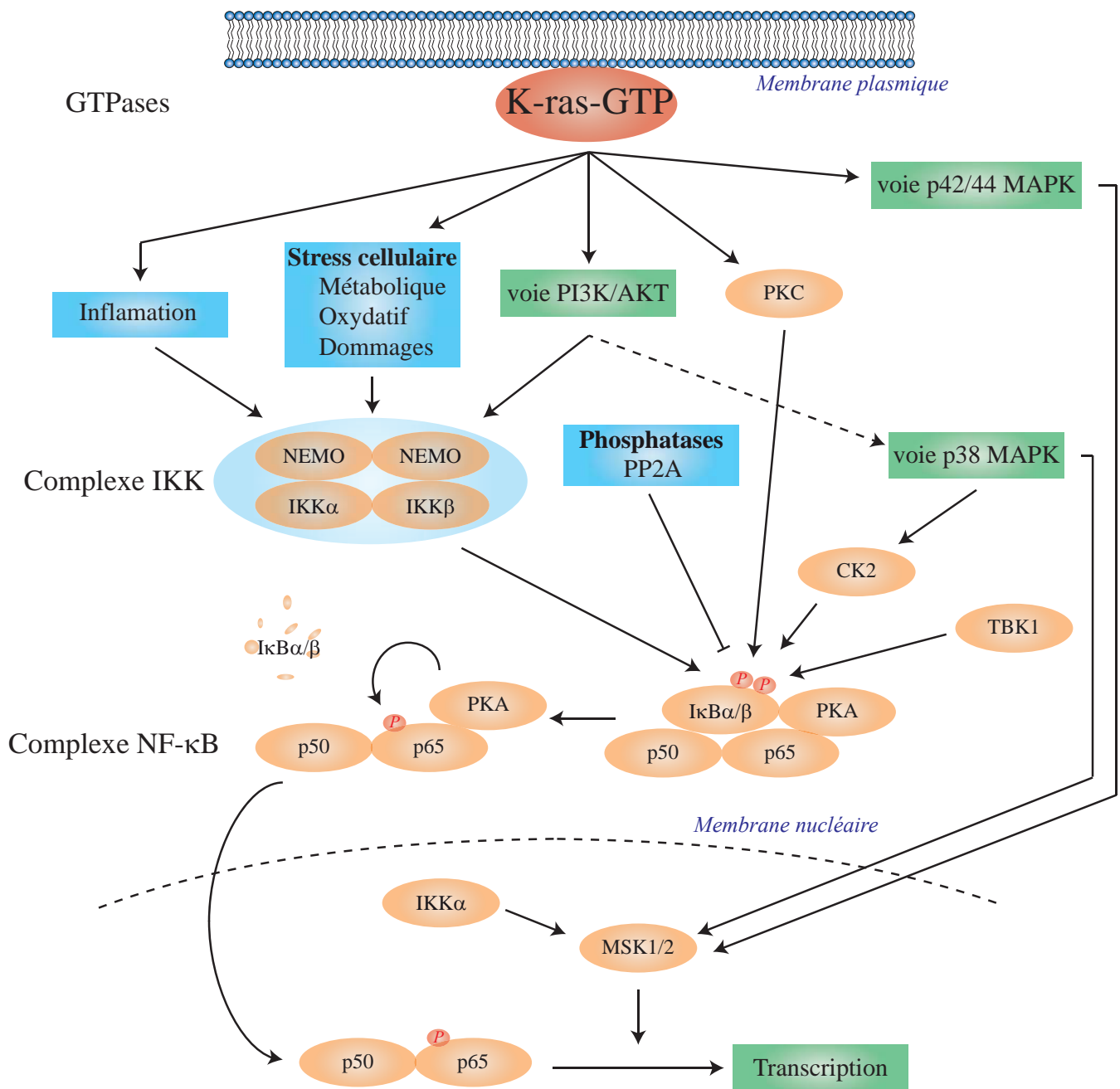
Figure 17 : **La voie JNK**. Principaux composants de la voie JNK et les protéines régulatrices de la voie.

Dans les cancers, le rôle de la voie p38 MAPK est très controversé. La majeure partie de ces fonctions favorise l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation, la réparation de l'ADN et l'apoptose ce qui en fait une voie s'opposant au processus tumoraux (Hui, L. *et al.*, 2007). Toutefois, la voie p38 MAPK est fortement impliquée dans les mécanismes de chimiotactisme ainsi que dans l'induction de sécrétion pro-inflammatoire ce qui favorise les processus tumoraux (Kim, M. *et al.*, 2003). En particulier dans le cancer du pancréas, la voie p38 MAPK est impliquée dans les capacités invasives des cellules tumorales (Taniuchi, K. *et al.*, 2015). La détection de son activation est associée à un bon pronostic (Korc, M., 2014). Enfin, cette voie de signalisation joue également un rôle dans la capacité de transformation de l'oncogène K-ras mais par un mécanisme, indépendant de la phosphorylation et l'activation de la voie, qui reste à élucider (Tang, J. *et al.*, 2005).

B. 3 Voie JNK

Les composants majeurs de la voie JNK sont codés par 3 gènes *JNK1* (=MAPK8, =SAPK γ), *JNK2* (=MAPK9, =SAPK α) et *JNK3* (=MAPK10, =SAPK β) donnant naissance à une dizaine de variants d'épissage de 46 et 54 kDa (Bogoyevitch, M. A. and Kobe, B., 2006). L'expression des JNK1 et 2 est ubiquitaire à l'inverse de JNK3 dont l'expression est restreinte au cerveau et au cœur (Sabapathy, K., 2011).

La voie de signalisation c-Jun N-terminal kinase est organisée en cascade de phosphorelais de manière similaire à la voie p38 MAPK avec qui elle partage un grand nombre d'activateurs, d'effecteurs et de protéines régulatrices (Bandyopadhyay, S. *et al.*, 2011; Wagner, E. F. and Nebreda, A. R., 2009) (Figure 17). La voie JNK est également une voie de réponse aux stress. Les 3 kinases de la voie JNK sont activées par phosphorylation *via* 2 MAP2Ks : MKK7 spécifique de la voie JNK et MKK4 capable également de phosphoryler les p38 MAPKs. En amont, ces MAP2Ks sont régulées par un grand nombre de MAP3Ks dont la majorité est activée en réponse aux stress. En aval, la voie est inhibée par différentes phosphatases communes pour toutes les MAPKs. Les kinases JNKs régulent de nombreux substrats cytoplasmiques et nucléaires pour moduler la différenciation, la prolifération, l'apoptose, l'inflammation et la réponse immunitaire (Sabapathy, K., 2011; Weston, C. R. and Davis, R. J., 2007). Parmi les cibles, c-Jun est le substrat majoritaire de la voie et permet la formation du facteur de transcription AP-1, médiateur majeur des effets transcriptionnels (Eferl, R. and Wagner, E. F., 2003; Shaulian, E., 2010; Shaulian, E. and Karin, M., 2001).



Adaptation de Viatour et al., 2005

Figure 18 : **La voie NF- κ B**. Représentation schématique des composants de la voie NF- κ B et de ses mécanismes d'activation.

Dans les cancers, la voie JNK est souvent dérégulée. Majoritairement en étant pro-tumorale, son action s'oppose à la voie p38 MAPK. Dans le cancer du pancréas plus particulièrement, la voie JNK est activée par l'oncogène K-ras pour induire la formation de tumeur (Okada, M. *et al.*, 2014). La voie favorise également les processus autophagiques pour permettre la survie des cellules tumorales (Kang, R. and Tang, D., 2012). Enfin, la voie JNK est impliquée dans les capacités de chimiorésistance et d'invasion des cellules tumorales pancréatiques (Endo, H. *et al.*, 2009; Liu, F. *et al.*, 2014).

C. Nuclear factor – kappa B

Les composants essentiels de la voie du *nuclear factor – kappa B* (NF- κ B) sont RelA (=p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (=p105/p50) et NF- κ B2 (=p102/p52). Ces protéines sont des facteurs de transcription qui fonctionnent en dimères, capables de se fixer l'ADN et qui possèdent un domaine RHD (*NF- κ B/Rel homology domain*) (Schmitz, M. L. *et al.*, 2004). Toutefois, seules les protéines p65, c-Rel et RelB possèdent un domaine trans-activateur. L'association p65/p50 est le dimère NF- κ B le plus abondant et qui possède la plus grande activité trans-activatrice.

Au repos, les dimères sont séquestrés dans le cytoplasme par une protéine de la famille des I κ B (*inhibitor of κ B*) comprenant I κ B α et I κ B β exprimées de façon ubiquitaire, I κ B γ et I κ B ϵ dont l'expression se limite aux cellules lymphoïdes (Mercurio, F. and Manning, A., 1999; Schmitz, M. L. *et al.*, 2004). Sous l'action de signaux multiples en amont de la voie, les I κ Bs vont être dégradées par le protéasome, libérant ainsi le domaine NLS (*nuclear localisation sequence*) des sous-unités du complexe NF- κ B. Cette dégradation est induite majoritairement par trois voies d'activation : (i) la voie classique (NEMO dépendante), (ii) la voie apoptotique et (iii) la voie non-classique (NEMO indépendante) (Schmitz, M. L. *et al.*, 2004; Viatour, P. *et al.*, 2005).

La voie classique est la voie majoritaire d'activation du dimère p65/p50 et fait intervenir le complexe IKK (I κ B kinase). Ce complexe cytoplasmique d'activation se compose des kinases IKK α et IKK β associées à un dimère de protéines NEMO (=IKK ϵ) (Joyce, D. *et al.*, 2001; Viatour, P. *et al.*, 2005) (Figure 18). La voie apoptotique active également le dimère p65/p50 mais indépendamment du complexe IKK. L'activation se fait par la kinase spécifique caséine kinase 2 (CK2) principalement recrutée par l'activation de la voie p38 MAPK en réponse aux dommages à l'ADN. Enfin, la voie NEMO indépendante limitée aux cellules lymphocytaires fait intervenir le dimère p100/RelB par l'action de la kinase *NF- κ B inducing kinase* (NIK).

Figure 19 manuscrit Romain VASSEUR

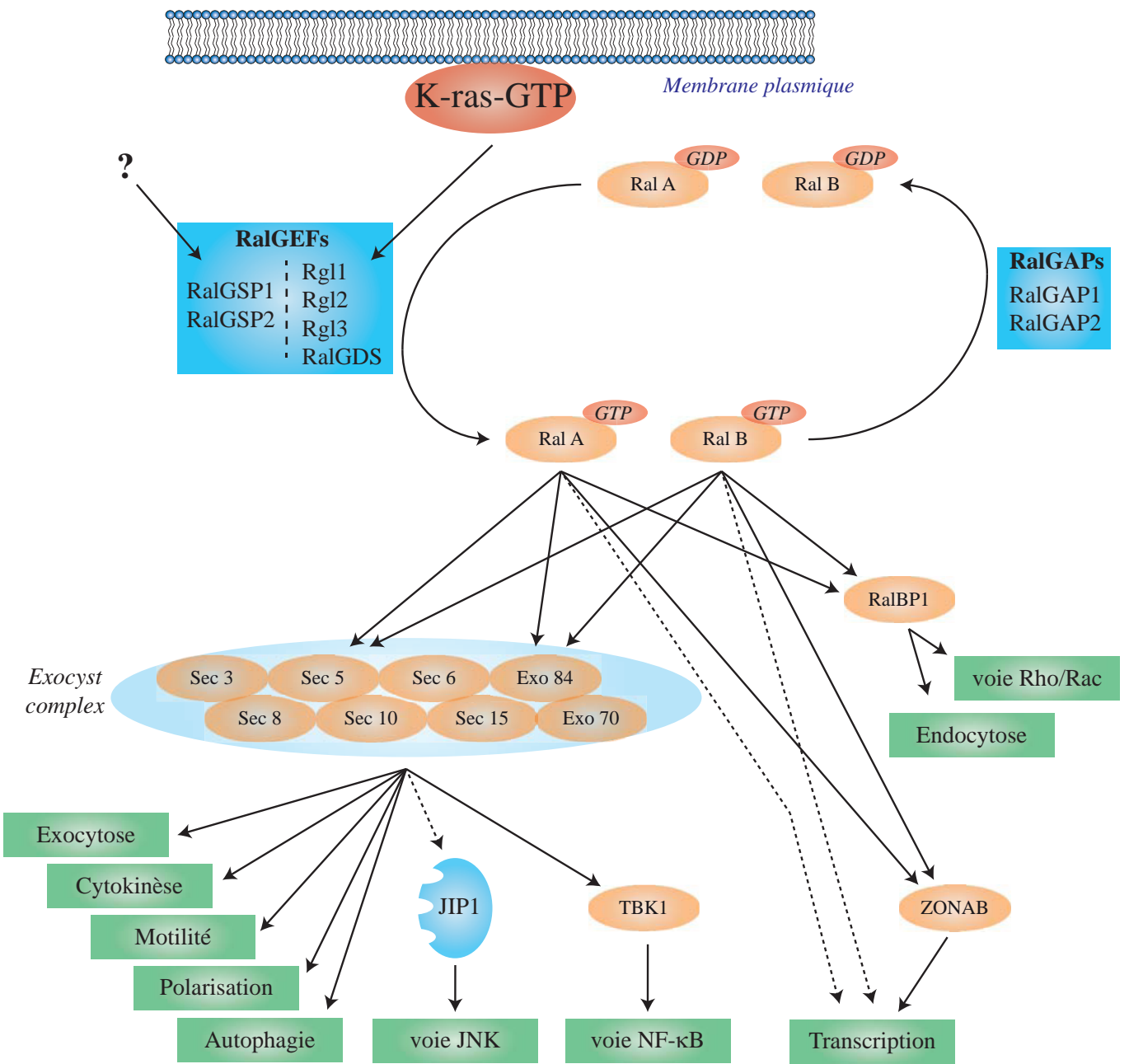


Figure 19 : **La voie des RalGTPases.** Représentation schématique des principaux composants de la voie des RalGTPases et de ses mécanismes d'action.

L'ensemble de ces voies est régulée en amont, majoritairement, par des signaux de stress et des signaux pro-inflammatoires mais également par d'importantes interconnexions avec d'autres voies de signalisation. A l'inverse, la voie NF- κ B est inhibée en aval par l'action de phosphatases et par la régulation transcriptionnelle de ces composants (Viatour, P. *et al.*, 2005; Yamamoto, Y. and Gaynor, R. B., 2004).

Dans les cancers, en particulier dans un contexte tumoral Ras muté, la voie NF- κ B est fréquemment activée (Chaturvedi, M. M. *et al.*, 2011; Finco, T. S. *et al.*, 1997). Dans le cancer du pancréas, la voie NF- κ B est constitutivement activée (Sclabas, G. M. *et al.*, 2003). De plus, bien que n'étant pas une cible directe de K-ras, la voie NF- κ B est activée par K-ras et joue un rôle essentiel dans la carcinogenèse et l'inflammation par l'action d'une boucle d'amplification (Daniluk, J. *et al.*, 2012; Ling, J. *et al.*, 2012; Prabhu, L. *et al.*, 2014). Enfin, la voie NF- κ B est également impliquée dans les capacités d'invasion et de métastases des cellules tumorales pancréatiques (Rachagani, S. *et al.*, 2011).

D. Ral GTPases

Les acteurs essentiels de la voie des Ral GTPases sont des membres de la sous famille des Ras protéines. Les Ral GTPases sont codées par 2 gènes : *RALA* et *RALB* (Feig, L. A. *et al.*, 1996; Neel, N. *et al.*, 2011). Ces deux GTPases sont exprimées de façon ubiquitaire et fonctionnent comme K-ras en cyclant entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP (Figure 19). Le passage à la conformation active est régulé par une famille de GEFs particulières les RalGEFs qui se compose de six membres. Parmi ces RalGEFs, quatre d'entre elles (RalGDS, RGL1, RGL2 et RGL3) sont des cibles directes de K-ras (Peterson, S. N. *et al.*, 1996; White, M. A. *et al.*, 1996). Les deux RalGEFs restantes (RalGSP1 et RalGSP2) sont Ras indépendantes et leur activation reste encore à élucider. Le retour à la conformation inactive des Ral GTPases est stimulé par deux GAPs spécifiques RalGAP1 (hétérodimère composé des sous-unités RalGAP α 1/RalGAP β) et RalGAP2 (hétérodimère composé des sous-unités RalGAP α 2/RalGAP β) dont la régulation reste également à décrypter.

En aval, les Ral A et Ral B GTPases activent un grand nombre d'effecteurs (Figure 19) (Bodemann, B. O. and White, M. A., 2008). Les mieux caractérisés sont les protéines Sec5 et Exo84 qui font partie d'un complexe octamérique l'*exocyst complex*. Ce complexe joue des rôles majeurs dans la régulation de l'endocytose, de la cytokinèse, de la motilité cellulaire et dans la polarisation des cellules (Cascone, I. *et al.*, 2008; Shipitsin, M. and Feig, L. A., 2004; Shirakawa, R. and Horiuchi, H., 2015). La *Ral Binding Protein 1* (RalBP1 = RLIP76) est

également un effecteur de la voie et joue des rôles importants dans la régulation de l'endocytose. Enfin, les RalGTPases régulent un grand nombre de facteurs de transcription dont c-fos et c-jun (Gentry, L. R. *et al.*, 2014; Okazaki, M. *et al.*, 1997; De Ruiter, N. D. *et al.*, 2000). Toutefois, le mécanisme de ces régulations reste à éclaircir.

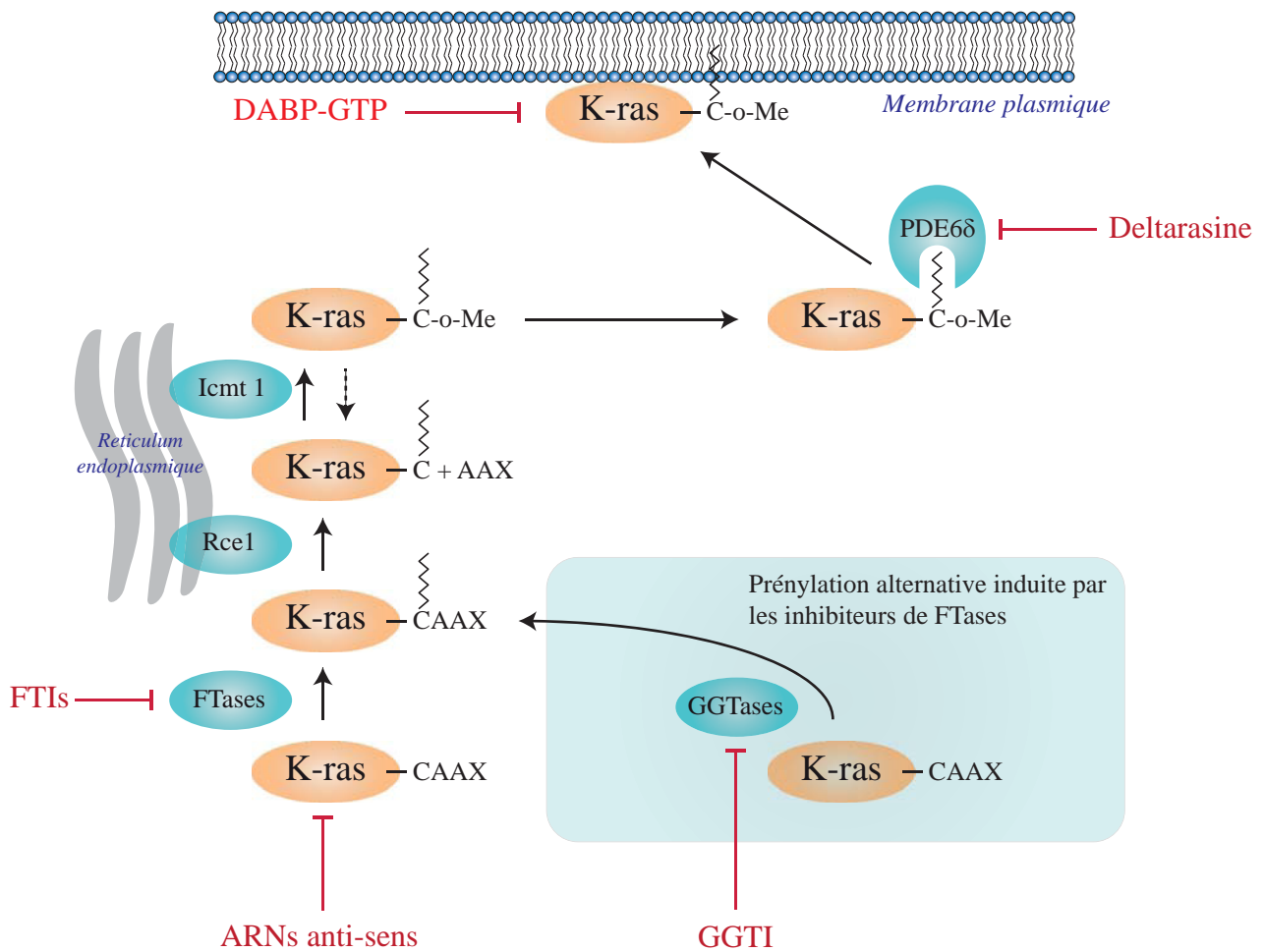
Les GTPases RalA et Ral B sont impliquées dans de nombreux cancer, en particulier les cancers présentant des mutations K-ras (Lim, K. *et al.*, 2005; Martin, T. D. and Der, C. J., 2012; Peschard, P. *et al.*, 2012). En effet, la voie Ral initialement caractérisée comme un actrice mineure de la transformation chez les rongeurs, est une composante essentielle de la transformation par les oncogènes Ras des cellules humaines (Hamad, N. M. *et al.*, 2002; Lim, K. *et al.*, 2005; Rangarajan, A. *et al.*, 2004). Dans le cancer du pancréas, les Ral GTPases sont activées par K-ras et sont impliquées dans les propriétés de croissances sans ancrage et de survie (Lim, K. *et al.*, 2006; Vigil, D. *et al.*, 2010). Enfin, la voie des Ral GTPase est impliquée dans les propriétés de chimiorésistance et radiorésistance des tumeurs pancréatiques (Kidd, A. R. *et al.*, 2011; Seguin, L. *et al.*, 2014).

IV. Stratégies thérapeutiques

L'importance de l'oncogène K-ras dans le cancer du pancréas et la multitude de fonctions pro-tumorales qu'il régule en font une cible thérapeutique potentielle majeure. Le ciblage de cette GTPase est un enjeu primordial de la recherche de nouvelle thérapie contre cette pathologie au sein duquel l'activité de K-ras est nécessaire à la fois pour l'émergence mais également pour le maintien et le développement tumoral (Collins, M. A. *et al.*, 2012a; Pasca di Magliano, M. and Logsdon, C. D., 2014). De très nombreuses études ont permis le développement de stratégies permettant le ciblage de K-ras à différents niveaux : (i) un ciblage direct de la protéine K-ras, (ii) un ciblage indirect de la protéine K-ras et (iii) un ciblage de son activité oncogénique par le biais de ces effecteurs (Downward, J., 2003) (Figure 20).

A. Ciblage direct de l'oncogène K-ras

Différentes stratégies ont été développées pour cibler directement la protéine K-ras. Ces stratégies ont pour but d'inhiber son expression ou de rendre la protéine inactive.



Adaptation de Cox et al., 2015

Figure 20 : **Stratégies thérapeutiques de ciblage de l'oncogène K-ras.** Représentation schématique des modifications post-traductionnelles de l'oncogène K-ras et stratégies thérapeutiques les ciblant. FTases : Farnesyltransferase, FTI : inhibiteurs de FTases, GGTases : Geranylgeranyltransferase, GGTI : inhibiteurs de GGTases, Me : groupement méthyl.

A.1. ARN anti-sens et système LODDER

Le développement de petites séquences nucléotidiques anti-sens ciblant directement l'ARNm de K-ras fait partie des premières stratégies développées visant à inhiber son expression. Le peptide nucléotidique ISI6957 a montré une efficacité *in vitro* dans l'inhibition de l'expression de K-ras (Chen, G. *et al.*, 1996). Toutefois, la stabilité de ces séquences, ainsi que leur forte toxicité n'ont pas permis de conduire à une utilisation clinique.

Malgré cet échec, cette stratégie a été reprise plus récemment avec le développement du système LODDER (Khvalevsky, E. Z. *et al.*, 2013). En effet, pour réduire la toxicité induite, une séquence anti-sens ciblant uniquement le mutant K-ras^{G12D} est utilisée et insérée dans un polymère biodégradable permettant de protéger l'ARN anti-sens de la dégradation. Ce système permet également le relargage progressif et sur une longue période de temps de la séquence au sein du tissu pancréatique cible. Bien qu'encourageant, les résultats de cette stratégie nécessitent d'être approfondis et ne sont pas encore utilisables en clinique (Golan, T. *et al.*, 2015).

A.2. Inhibiteur de mutant G12C

La caractérisation de la structure de l'oncogène K-ras a conduit au développement de petites molécules inhibitrices pouvant interagir directement et spécifiquement avec les mutants K-ras. Cette stratégie a permis la création d'un inhibiteur irréversible spécifique du mutant K-ras^{G12C} (Lim, S. M. *et al.*, 2014; Ostrem, J. M. *et al.*, 2013). La fixation de l'inhibiteur entraîne un encombrement stérique interne bloquant le changement de conformation nécessaire à l'activation de la protéine. Malgré l'intérêt de cette stratégie, la mutation G12C est peu fréquente dans le cancer du pancréas (< 3 % des mutations K-ras) et d'autres composés ciblant les mutants G12D et G12V, beaucoup plus fréquent, restent à développer.

A.3. GTP modifié

Le ciblage de K-ras en inhibant son interaction avec le GTP est considéré comme impossible à cause de la trop haute affinité de K-ras pour le GTP (de l'ordre du pico molaire) et de la forte concentration intracellulaire de GTP (de l'ordre du milli molaire). De ce fait, une stratégie visant à modifier le GTP pour le rendre hydrolysable par le mutant K-ras a été développée. Un analogue du GTP, le DABP-GTP (*Diamino-benzophenone-phosphoramidate-GTP*) a démontré la faisabilité de cette stratégie. En effet, le DABP-GTP

peut être hydrolysé par les mutants G12 de K-ras plus efficacement que par la forme non mutée (Ahmadian, M. R. *et al.*, 1999). Toutefois, aucun composé dérivé de cette stratégie n'a encore dépassé le stade de l'étude *in vitro*.

B. Ciblage indirect de l'oncogène K-ras

Les modifications post-traductionnelles de la protéine K-ras, nécessaires à sa localisation sous-membranaire, sont indispensables à sa fonction. De nombreuses stratégies thérapeutiques ciblant ces modifications ont donc été développées afin de permettre de cibler indirectement l'oncogène K-ras.

B.1. Les inhibiteurs de prénylation

La première étape de modification post-traductionnelle des protéines H-, N- et K-ras est une prénylation (farnesylation) au niveau de la cystéine dans la séquence terminale CAAX (Adjei, A. A., 2001). Cette modification qui permet l'ajout d'une chaîne hydrophobe pour la stabilisation membranaire, est réalisée par une famille d'enzyme les farnesyl transférase (FTases). De nombreux inhibiteurs de FTases ont donc été développés pour cibler cette modification et inhiber l'adressage membranaire de K-ras (Cox, A. D. *et al.*, 2014; Laheru, D. A. *et al.*, 2013). En particulier le Tipifarnib (R115777), un peptidomimétique du domaine CAAX, a été testé jusqu'en phase III dans le cancer du pancréas (Van Cutsem, E. *et al.*, 2004; End, D. W. *et al.*, 2001). Toutefois, ces inhibiteurs se sont révélés inefficaces. En présence d'inhibiteur de FTase, un mécanisme de prénylation alternatif intervient (géranylgeranylation) et implique une autre enzyme la géranylgeranyl transférase (GGTase) (Tamanoi, F. and Lu, J., 2013). La découverte de ce mécanisme alternatif a amené au développement d'inhibiteurs de GGTase. Malheureusement, les protéines Ras n'étant pas des cibles exclusives de ces enzymes, l'inhibition conjointe des FTase et GGTase entraîne une toxicité trop importante pour être utilisée en clinique.

B.2. Inhibiteur de Rce et Icmt

A la suite de la prénylation, la protéine Ras subit un clivage du domaine AAX terminale et une méthylation de l'isoprénylcystéine formée. Ces deux étapes sont successivement réalisées par deux enzymes : Rce1 (*Ras converting enzyme 1*) et Icmt1 (*Isoprénylcystéine carboxymethyl transférase 1*) respectivement. Le ciblage de ces deux enzymes clés a donc été entrepris. L'inhibition de la Rce1 s'est très vite révélée impossible car provoquant des cardiomyopathies sévères, les efforts se sont focalisés sur l'inhibition de la Icmt1 (Bergo, M.

O. *et al.*, 2000; Bergo, M. O. *et al.*, 2004). Le ciblage de *Icmt1* a été entrepris dans les cancers et en particulier dans le cancer du pancréas. Toutefois, l'inhibition de *Icmt1* dans le modèle murin de cancérogenèse pancréatique a révélé, contre toutes attentes, une augmentation de PanINs formées et une augmentation de leur évolution en adénocarcinome (Court, H. *et al.*, 2013).

B.3. Inhibiteur de PDE δ , la Deltarasine

La dernière étape permettant à la protéine K-ras d'être fonctionnelle implique son adressage à la membrane plasmique. Ce trafic est assuré par la prise en charge de la prénylation hydrophobe par une protéine chaperonne : la *phospho diesterase 6 δ* (PDE6 δ). Des inhibiteurs de la PDE δ ont donc été développés. En particulier, la **Deltarasine** a montré des résultats prometteurs. En effet, dans les cellules tumorales pancréatiques mutées pour K-Ras, la **Deltarasine** bloque l'interaction PDE δ -K-ras empêchant sa localisation membranaire. *In vitro*, ce blocage induit la rapide diminution de la prolifération (avec diminution de l'activation de la voie MAPK) et augmentation de l'apoptose. *In vivo*, la xénogreffe de cellules tumorales pancréatiques montre une réduction de la croissance tumoral dose-dépendante (Spiegel, J. *et al.*, 2014; Zimmermann, G. *et al.*, 2013). Toutefois, cette stratégie, encore récente, reste à l'étude et n'est pas encore utilisable en clinique.

C. Ciblage de ses effecteurs

Dès les premiers échecs dans la recherche d'une stratégie permettant de cibler directement la GTPase K-ras dans les cancers, les efforts se sont orientés sur le ciblage de ces effecteurs. Ces efforts ont amené au développement d'un très grand nombre d'inhibiteurs ciblant les différents composant des voies de signalisation en aval de l'oncogène (Baines, A. T. *et al.*, 2011; Campbell, P. M. *et al.*, 2006; Stephen, A. G. *et al.*, 2014).

Les principaux efforts focalisés sur le ciblage de la voie MAPK ont permis le développement d'inhibiteurs des kinases de Rafs et Erks utilisables en thérapies (De Luca, A. *et al.*, 2012; Yeh, J. J. and Der, C. J., 2007). Toutefois, dans le contexte particulier du cancer du pancréas, les inhibiteurs de Rafs tel que le Sorafenib, se sont révélés inefficaces. En effet, l'inhibition de Raf entraîne paradoxalement l'augmentation d'activité de la voie MAPK, principalement par la diminution à court terme des mécanismes de rétrocontrôles négatifs de effecteurs de la voie (Lito, P. *et al.*, 2013). De même, un ciblage des kinases MEK plus en aval de la voie par des composés comme le CI-1040, n'a montré dans les cancers

pancréatiques qu'une réponse partielle sans rapport avec le statut mutationnel de K-ras (LoRusso, P. M. *et al.*, 2005). Ces échecs sont expliqués par la forte interconnexion des différentes voies de signalisation (De Luca, A. *et al.*, 2012; Stephen, A. G. *et al.*, 2014).

L'inhibition d'autres voies de signalisation, comme la voie PI3K, la voie JNK et la voie NF- κ B a également été envisagée. Toutefois, dans la majorité des cas, ces traitements sont encore au stade expérimental, ou se révèlent inefficaces (Baines, A. T. *et al.*, 2011; Cox, A. D. *et al.*, 2015; Okada, M. *et al.*, 2014; Yeh, J. J. and Der, C. J., 2007).

Le ciblage de l'oncogène K-ras, bien qu'encore activement à l'étude, est toujours impossible cliniquement aujourd'hui. La recherche active de nouvelles cibles thérapeutiques, médiateurs importants de K-ras dans les mécanismes tumoraux, pourrait être une stratégie alternative envisageable.

Figure 21 manuscrit Romain VASSEUR

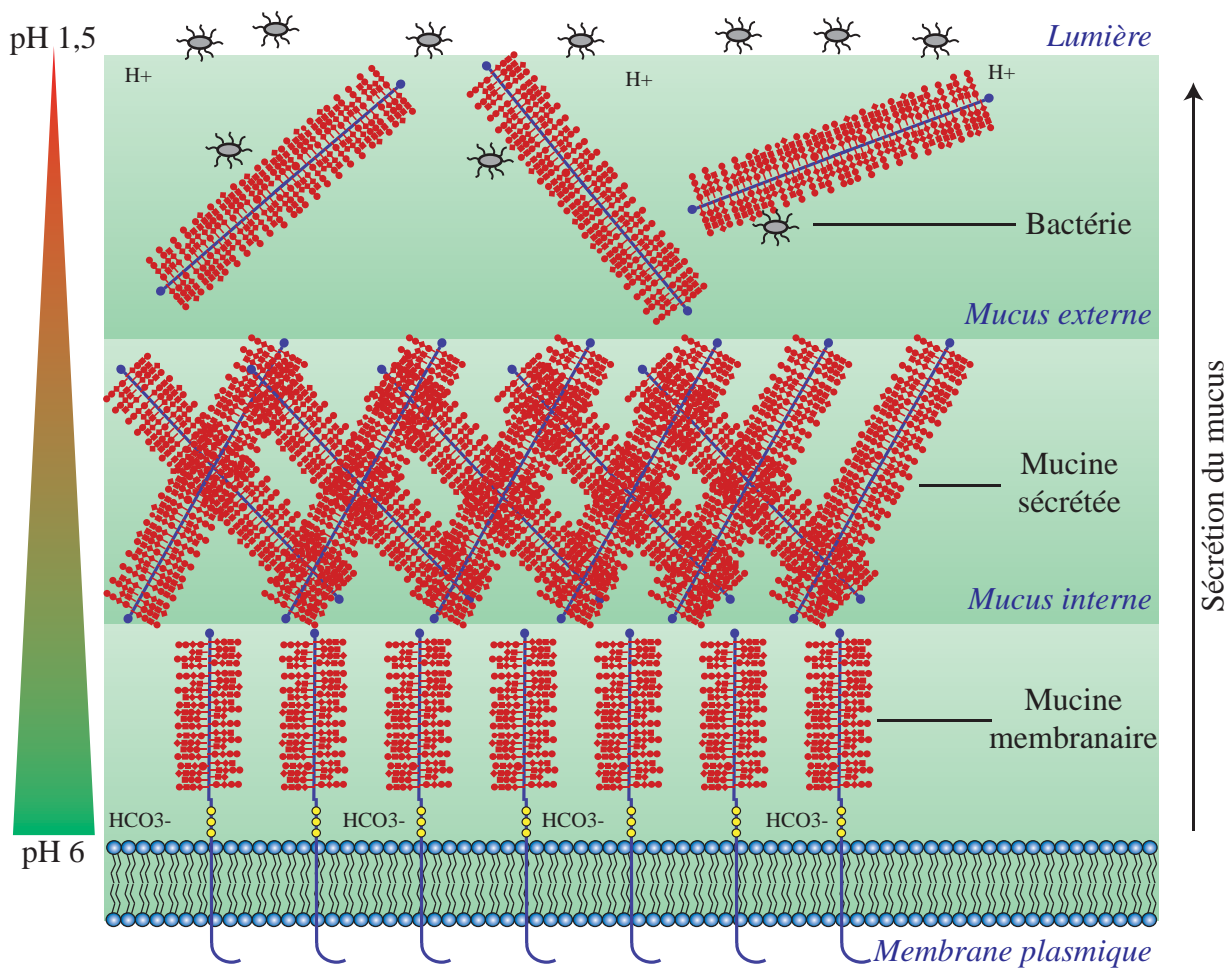


Figure 21 : **Représentation schématique de la structure des Mucus.** Organisation de la structure des mucus. Représentations schématiques de son rôle dans la protection contre le pH au niveau gastrique et de son rôle de barrière contre les pathogènes étrangers.

LES MUCINES

I. Familles de mucines

A. Généralité

A.1 Les mucines

Les épithéliums sont un élément essentiel de l'organisme permettant d'assurer le maintien de son intégrité. C'est une zone majeure de l'organisme qui sert à la fois de barrière avec l'extérieur mais également de région d'échange importante. Les épithéliums sont des tissus régulés, en équilibre entre la prolifération des cellules qui les composent et leur destruction (apoptose, desquamation, ect...). Cette balance, appelée homéostasie, est assurée par un grand nombre de signaux complexes. En particulier, cette homéostasie est favorisée grâce au mucus (Hansson, G. C., 2012).

Conservés dans l'évolution depuis les métazoaires, les mucus participent à la protection des épithéliums contre l'environnement (agression physique, pH, toxines,...), à l'hydratation, au maintien de l'équilibre ionique et la protection contre les pathogènes étrangers (Lang, T. *et al.*, 2007). En particulier chez l'Homme, les mucus jouent des rôles majeurs au niveau des tractus digestif, respiratoire et reproducteur. Les mucus sont composés essentiellement d'eau (98%), d'ions et d'une famille de glycoprotéines particulières : les mucines (Figure 21). Cette famille de protéines est fréquemment dérégulée dans les pathologies dont les cancers, perturbant ainsi l'homéostasie des tissus qui les expriment.

La famille des mucines est composée de glycoprotéines hétérogènes de hauts poids moléculaires (> 100 kDa) très fortement O-glycosylées (50-80 % du poids). A l'origine, les mucines désignaient les protéines sécrétées, capables de former les gels de mucus et responsables de ses propriétés rhéologiques (viscosité, adhérence et élasticité) (Dekker, J. *et al.*, 2002; Hansson, G. C., 2012). Avec l'évolution des techniques de biologie moléculaire, cette famille a été étendue aux mucines membranaires, exprimées à la surface des épithéliums et participant aux interactions cellules-cellules et cellules-matrices extracellulaires ainsi qu'à l'activation de voie de signalisation.

Les mucines sont regroupées dans une famille d'O-glycoprotéines désignées par la nomenclature MUC, approuvée par le *Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee* (HUGO/GNC). Les mucines se composent de 2 parties : une longue chaîne polypeptidique appelée apomucine et un complexe de chaînes polysaccharidiques.

A.2 Caractéristiques des apomucines

L'apomucine se compose d'un domaine peptidique central fortement glycosylé. Ce domaine de longue taille est appelé domaine PTS car il est très riche en résidus serine (S) thréonine (T) et proline (P), composant de 20 à 50% des acides aminés qui le compose. Les résidus S et T sont le siège d'O-glycosylations alors que les résidus P assurent la conformation linéaire de l'apomucine indispensable à sa riche glycosylation (Jonckheere, N. *et al.*, 2013). Ce domaine est fréquemment répété en tandem (*tandem repeats*, TR) avec un polymorphisme du nombre de répétition (*variable number of TR*, VNTR). Le reste de l'apomucine se compose de plusieurs domaines spécifiques conservés. En N-terminal, la présence d'un peptide signal permet *via* un passage dans le réticulum endoplasmique, un adressage à la voie de sécrétion ou à la membrane. En C-terminal, la présence de sites de N-glycosylation peut être détectée.

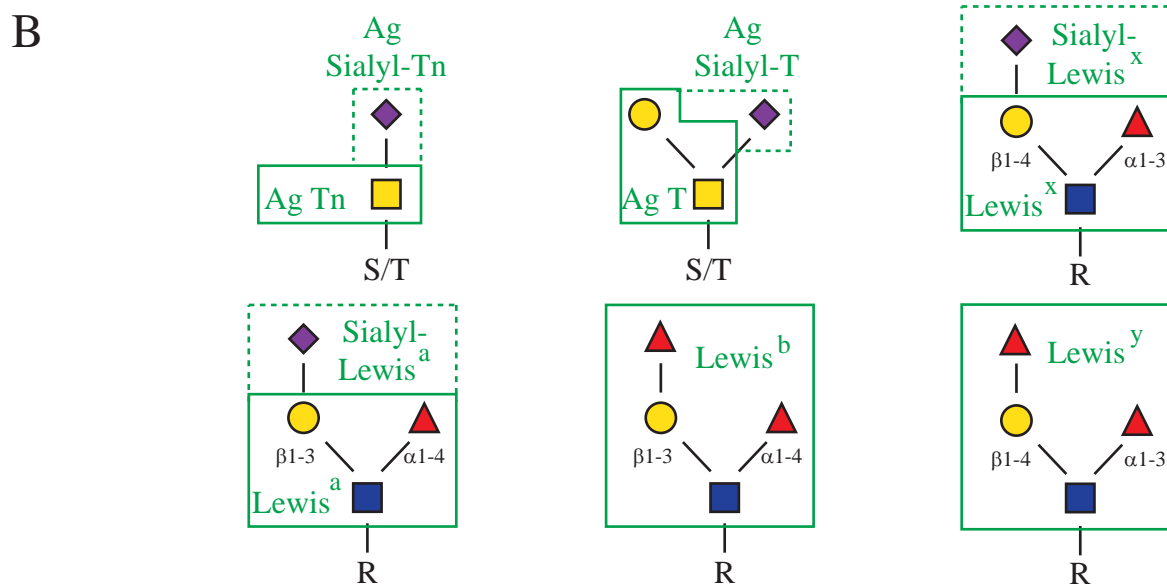
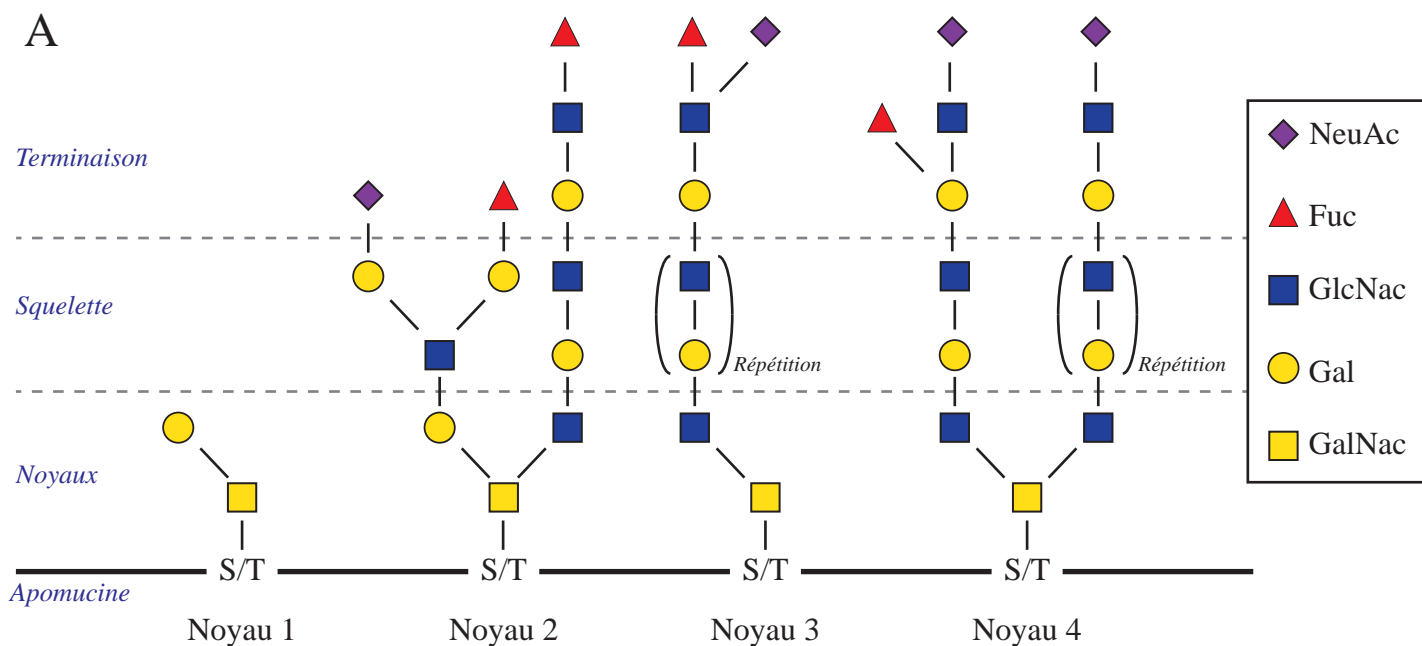
En fonction de leur ancrage membranaire ou non, la famille des mucines est subdivisée en deux sous-familles : les mucines sécrétées et les mucines membranaires.

A.3 Les chaînes oligosaccharidiques

Le domaine central des mucines est une région très riche en résidus serine et thréonine. Ces résidus sont le siège d'une O-glycosylation dense, complexe et très variable pouvant atteindre 80 % du poids de la mucine (Robbe-Masselot, C. *et al.*, 2009). Cette complexité est due à une forte diversité dans la composition en saccharides et une variabilité de l'assemblage des différentes chaînes lors du passage au Golgi pendant la synthèse. La glycosylation se décompose en 3 parties : (i) le noyau, (ii) le squelette saccharidique et (iii) la terminaison périphérique (Figure 22 A).

Le noyau commence par la O-glycosylation des résidus S/T avec la fixation d'une N-acétylgalactosamine (GalNac), caractéristique de la glycosylation des mucines (Bennett, E. P. *et al.*, 2012). Il existe quatre noyaux différents selon le ou les glycanes qui s'y fixent ensuite. Dans le noyau 1 un résidu galactose (Gal) est ajouté en β 1-3, pour le noyau 2 un résidu de N-acétylglucosamine (GlcNac) est additionné sur la GalNac du noyau 1 en β 1-6.

Figure 22 manuscrit Romain VASSEUR



Adaptation de Pinho et al., 2015

Figure 22 : **Glycosylation des mucines.** (A) Composition et structure des chaînes glycaniques portées par les mucines. (B) Principaux antigènes glycaniques retrouvés dans les cancers.

Dans le noyau 3, un GlcNac est fixé en β 1-3 sur la GalNac et pour le noyau 4, s'ajoute en β 1-6 un second résidu GlcNac. Le squelette central se compose de polymères (de 2 à 20) de GlcNac et Gal relié en β 1-3 ou β 1-4 avec des ramifications possibles reliées en β 1-6 sur lesquelles peuvent venir se greffer d'autres chaînes. Ces chaînes se terminent en périphérie par des résidus Gal, GalNac, fucose (Fuc) et d'acide sialique (N-acétylneuraminique, NeuAc) avec parfois l'ajout de groupement sulfatés. Ces terminaisons forment des motifs caractéristiques des groupes sanguins (A, B, H et Lewis) (Vasconcelos-dos-Santos, A. *et al.*, 2015).

Dans un contexte tumoral, la glycosylation des protéines notamment celle des mucines est altérée. Cette altération progressive est induite par la synthèse incomplète des chaînes glycaniques et la modification des résidus qui les composent. Ces modifications entraînent l'apparition de chaînes plus courtes et moins ramifiées avec un enrichissement terminal important et plus précoces de sialylations. Il se forme ainsi des motifs antigéniques caractéristiques tels que les antigènes T, Tn et Lewis et leurs formes sialylées (ST, STn et SLewis) (Figure 22 B) fortement retrouvés dans les tumeurs dont en particulier les tumeurs du pancréas (Remmers, N. *et al.*, 2013). La modification de ces chaînes glycaniques est associée à la modification des propriétés des mucines qui les portent. En particulier, ces motifs tumoraux permettent de nouvelles interactions avec les lectines. Les motifs SLe^a et SL^x sont reconnus par la E-sélectine exprimée par les cellules endothéliales et favorise ainsi les mécanismes d'extravasation et de métastases tumorales. Les motifs Tn et Sialyl-Tn, fortement exprimés dans les tumeurs pancréatiques, empêchent la reconnaissance par les *natural-killers* et les lymphocytes T du système immunitaire, favorisant l'échappement immunitaire des cellules tumorales. Ces motifs modifient également les interactions entre les cellules tumorales et celles du microenvironnement. Enfin, le raccourcissement des chaînes glycaniques est associées à une diminution de l'encombrement stérique à la surface des cellules ce qui favoriserait l'activation de signalisation anormale (en particulier par les mucines membranaires) (Glavey, S. V *et al.*, 2015; Pinho, S. S. and Reis, C. A., 2015)

B. Mucines sécrétées

B.1 Caractéristiques des mucines sécrétées

Les mucines sécrétées se composent de mucines très conservées MUC6, MUC2, MUC5AC et MUC5B regroupées dans un cluster génomique en p15.5 du chromosome 11 et de MUC19 localisée en 12q12 (Nguyen, V. C. *et al.*, 1990; Zhu, L. *et al.*, 2011). Toutes ces

mucines sécrétées possèdent le peptide signal et un domaine PTS caractéristique de la famille. Elles possèdent également un ou plusieurs domaines D du *von Willebrand Factor* (vWF) leur permettant de s'oligomériser et un domaine CYS, riche en cystéine permettant des interactions hydrophobes (Brunelli, R. *et al.*, 2007). Cette sous-famille inclue également les mucines MUC7 et MUC9 qui ont la particularité d'être sécrétées mais de ne pas posséder ces domaines d'oligomérisation.

Les mucines sont sécrétées par des cellules spécialisées appelées cellules caliciformes ou cellules à mucus (Birchenough, G. M. H. *et al.*, 2015). La composition en mucines d'un mucus varie selon l'épithélium qui le secrète : la mucine MUC5AC est la mucine majoritaire dans l'estomac alors que le colon exprime principalement la mucine MUC2 (Hansson, G. C., 2012). Dans le pancréas sain, les mucines MUC5B et MUC6 sont exprimées au niveau des cellules centro-acinaires et des cellules canalaire. La mucine MUC2 est peu ou pas exprimée et la mucine MUC5AC n'est détectée que très rarement. (Behera, S. K. *et al.*, 2015; Jonckheere, N. *et al.*, 2010).

B.2 Fonction des mucines sécrétées

Les mucines sécrétées composent la partie essentielle des gels de mucus en participant à leurs propriétés rhéologiques et viscoélastiques. Ces mucines forment un réseau tridimensionnel en s'associant *via* les domaines d'oligomérisation. Ce réseau dense, fortement attaché à l'épithélium, forme la couche proximale du mucus pouvant atteindre 50 à 200 μm d'épaisseur et joue le rôle de barrière. Cette barrière protège l'épithélium des agressions physiques, des bactéries et virus pathogènes, de l'inflammation et du pH (Hansson, G. C., 2012).

Au-dessus de la couche interne, le mucus comporte une couche externe plus lâche et plus perméable par clivage des mucines qui le composent (Lidell, M. E. and Hansson, G. C., 2006). Cette couche externe participe à la protection de l'épithélium sous-jacent mais possède également un rôle dans la régulation du microbiote (Birchenough, G. M. H. *et al.*, 2015; Johansson, M. E. V *et al.*, 2011).

C. Mucines membranaires

C.1 Caractéristiques des mucines membranaires

Les mucines membranaires se composent de MUC1, MUC4, MUC13, MUC15, MUC16, MUC20, MUC21, MUC22 et du cluster génomique 7q22.1 comprenant les mucines MUC3A/B, MUC12 (=MUC11) et MUC17 (Desseyn, J.-L. *et al.*, 2008; Hijikata, M. *et al.*, 2011; Jonckheere, N. and Van Seuning, I., 2008). Les mucines membranaires sont composées de deux sous-unités. La sous-unité N-terminale, dite “*mucin-like*” contient le peptide signal et les domaines PTS répétés caractéristiques à toute la famille. La sous-unité C-terminale, de type facteur de croissance, contient des domaines de type *epidermal growth factor* (EGF), un domaine *sea urchin sperm protein enterokinase and agrin* (SEA), un court domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique contenant des résidus tyrosines phosphorylables. Les domaines de type EGF (absents de MUC1, MUC15 et MUC20) sont impliqués dans les interactions entre les mucines et les membres de la famille ErbB (Carraway, K. L. *et al.*, 2003; Jonckheere, N. *et al.*, 2012). Le domaine SEA (absent de MUC4, MUC15, et MUC20) est un domaine possédant une activité auto-protéolytique permettant la séparation des deux sous-unités durant la synthèse (Macao, B. *et al.*, 2006; Parry, S. *et al.*, 2001).

Les mucines membranaires sont exprimées au pôle apical des cellules épithéliales dans un grand nombre de tissus (Behera, S. K. *et al.*, 2015). Dans le pancréas sain, la mucine MUC1 est exprimée par les cellules acinaires et les cellules canalaire alors que l’expression de la mucine MUC4 n’est pas détectée (Swartz, M. J. *et al.*, 2002).

C.2 Fonction des mucines membranaires

Les fonctions des mucines membranaires assurent une continuité avec celles des mucines sécrétées. Elles participent à la protection du pôle apical des cellules épithéliales. Les mucines membranaires seraient également impliquées dans les interactions cellules-cellules et cellules matrice-extracellulaires. Ce sous-groupe de mucines possède également un rôle de senseur à la membrane en permettant la transduction de signaux soit *via* les domaines de type EGF, soit *via* des phosphorylation de la queue cytoplasmique (Hatstrup, C. L. and Gendler, S. J., 2008; Hollingsworth, M. A. and Swanson, B. J., 2004; Jonckheere, N. *et al.*, 2012). Le réseau formé à la membrane par les mucines membranaires permettrait de piéger des facteurs de croissances et des cytokines rapidement relarguées en cas d’agression de l’épithélium. Enfin,

en cas de clivage, un rôle encore mal caractérisé de facteur de croissance est proposée (Hollingsworth, M. A. and Swanson, B. J., 2004).

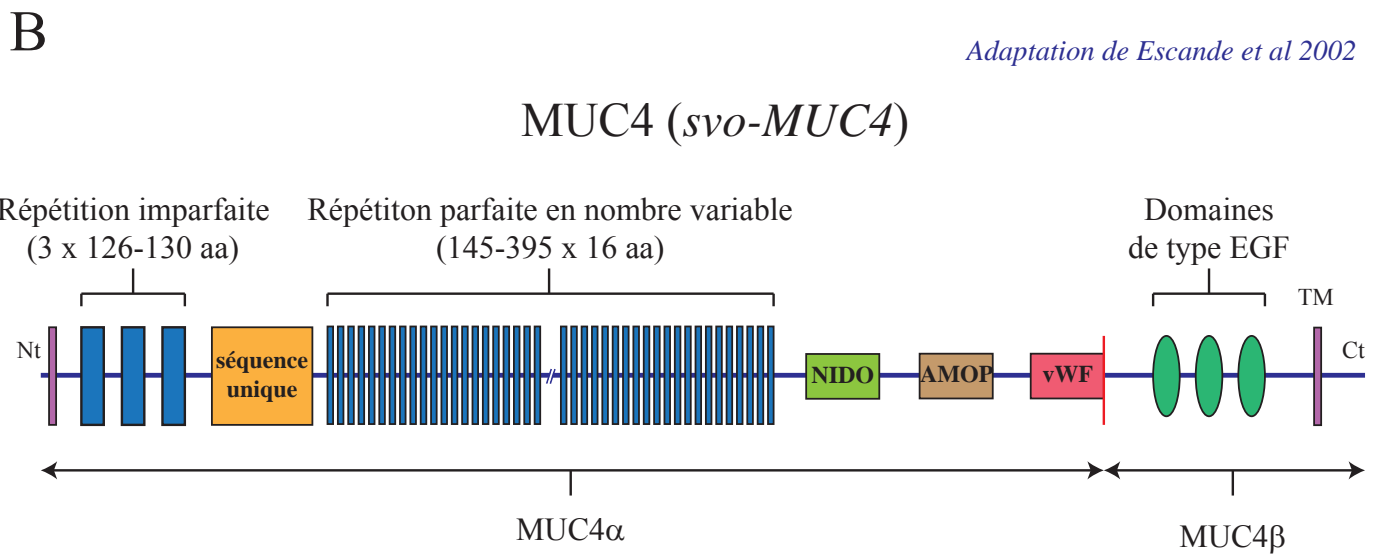
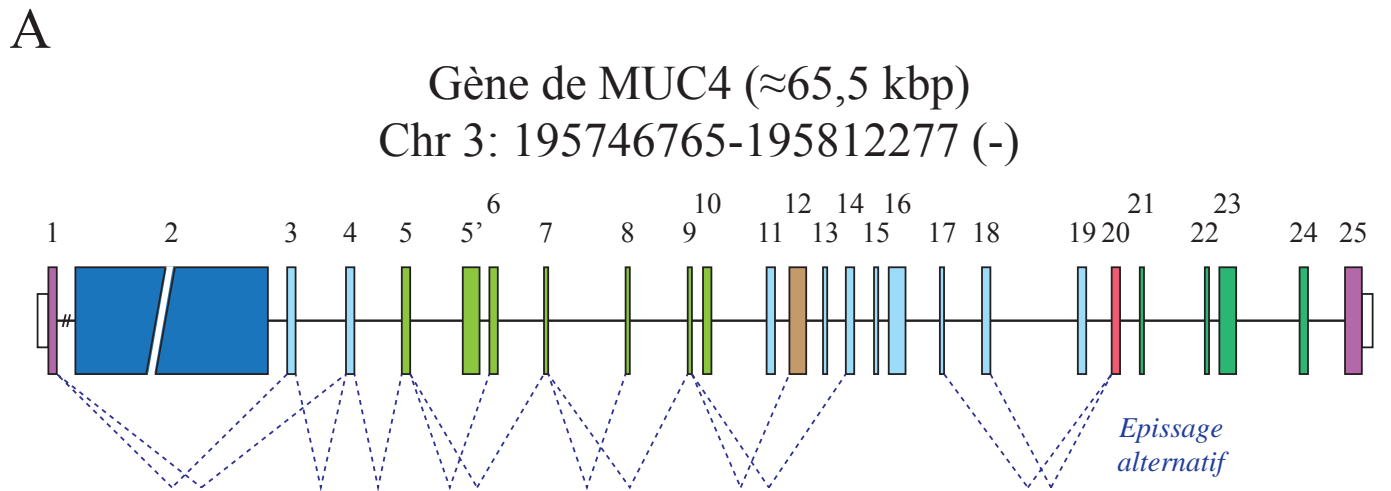
Au cours de ses travaux, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la mucine membranaire MUC4.

II. MUC4 structure et fonctions

A. Origine et orthologues

La mucine MUC4 a initialement été découverte par homologie avec son orthologue chez le rat appelé le *SialoMucin Complex* (SMC) à partir d'adénocarcinomes mammaires (Sherblom, A. P. *et al.*, 1980). Le SMC, renommé par la suite rMuc4, présente 60% d'homologie de séquence avec le MUC4 humain. Il se compose de 2 sous-unités clivées à partir d'un même précurseur (Sheng, Z. *et al.*, 1992). L'*ascite sialoglycoprotéine-1* (ASGP-1) correspond au domaine extracellulaire de type mucine avec une séquence répétée 11 fois de 154 aa fortement homologue à la sous-unité MUC4 α humaine. La sous-unité ASGP-2 correspond au domaine type facteur de croissance fortement homologue à la sous-unité MUC4 β humaine avec la présence du domaine transmembranaire et de deux domaines EGF (Sheng, Z. *et al.*, 1992). Le SMC/rMuc4 est associé aux propriétés tumorales. En particulier, la surexpression du SMC/rMuc4 dans les tumeurs est associée à la perte de contact entre les cellules par encombrement stérique à la surface et par la délocalisation de protéine d'interaction comme la E-cadhérine (Komatsu, M. *et al.*, 1997; Pino, V. *et al.*, 2006). Enfin, l'interaction du SMC/rMuc4 avec le récepteur ErbB2 a été décrite et conduit à la phosphorylation du récepteur ErbB2 et à l'activation des voies de signalisation en aval (Price-Schiavi, S. A. *et al.*, 2005).

A l'inverse de l'orthologue de rat, celui de la souris, appelé Muc4 (ou mMuc4) a été découvert à posteriori par homologie avec la mucine humaine (Desseyn, J.-L. *et al.*, 2002). La mucine murine Muc4 présente 60% d'homologie avec la mucine humaine avec un long TR composé de 124-126 aa répété 20 fois dans sa partie de type mucine et la présence du 3 domaines EGF dans la partie type facteur de croissance (Desseyn, J.-L. *et al.*, 2002). Le gène murin de *Muc4* est codé sur le chromosome 16 et réparti sur 25 exons dans une région qui est fortement similaire à celle qui code MUC4 chez l'homme (synténie) avec conservation de la structure exon/intron observée.



Adaptation de Hatrup et al 2008

Figure 23 : Gène et transcrits de la mucine MUC4. (A) Représentation schématique de la structure du gène de MUC4 humain et de ses évènements d'épissages potentiels. (B) Structure de la protéine MUC4 (variant majoritaire).

B. Structure de la mucine MUC4

B.1 Gène et transcrits de MUC4

Le gène de *MUC4* a été découvert et caractérisé au laboratoire à partir d'une banque humaine d'ADNc trachéobronchiale (Porchet, N. *et al.*, 1991). Il est codé en sens inverse sur le bras long du chromosome 3 en q29. Le gène de *MUC4* s'étend sur plus de 60 kb et se compose de 26 exons (Gross, M. S. *et al.*, 1992; Nollet, S. *et al.*, 1998). L'exon 1 code pour une courte région 5' non traduite (5'UTR) et le peptide signal. L'exon 2, séparé du premier exon par un long intron, code pour une longue séquence centrale contenant des séquences répétées en nombre variable en tandem (VNTR). Le gène se poursuit par 24 exons de 65 à 607 bp codant le reste de la protéine avec notamment un exon alternatif. (Figure 23 A). En particulier, on peut noter la présence dans l'intron 3 d'un polymorphisme micro-satellitaire et de séquences répétées dans l'intron 4 et l'exon 5.

La séquence du gène de *MUC4* est également le siège d'évènements d'épissages alternatifs complexes donnant naissance à 24 transcrits (Escande, F. *et al.*, 2002). Ces variants sont appelés *sv0-* à *sv21-MUC4*, *MUC4X* et *MUC4Y*. Parmi ces variants, 6 codent potentiellement pour des isoformes membranaires et 18 pour des isoformes sécrétées. Les variants *MUC4X* et *MUC4Y* ont la particularité d'être des variants membranaires dépourvus de la région centrale répétée caractéristique des mucines (Moniaux, N. *et al.*, 2001). L'isoforme *sv0-MUC4*, codant pour la forme pleine longueur, est la forme majoritaire exprimée dans les tissus humains. Pour les autres variants d'épissage, l'expression au niveau protéique reste à démontrer.

B.2 Protéine MUC4

La protéine pleine longueur de *MUC4*, codée par le variant *sv0-MUC4*, possède une structure classique de mucine membranaire à laquelle s'ajoute des domaines spécifiques. La protéine forme une longue chaîne extracellulaire de 2,12 µm de long, ancrée à la membrane. Elle se compose de la partie *MUC4α* fortement O-glycosylée (sous-unité de type mucine) et de la partie *MUC4β* contenant les domaines de type facteur de croissance (Moniaux, N. *et al.*, 2001) (Figure 23 B). La partie *MUC4α* en N-terminal contient la séquence de 27 aa du peptide signal et la région centrale contenant des TR fortement glycolysés. Cette région centrale comprend une répétition imparfaite d'un motif de 126-130 aa reproduit trois fois, puis d'une séquence unique de 554 aa et une répétition parfaite d'un motif de 16 aa, reproduit

de 145 à 395 fois (VNTR). L'ensemble de cette région est riche en résidus proline serine et thréonine et est le siège d'une importante O-glycosylation.

La partie MUC4 β en C-terminal est subdivisée en 12 domaines (CT1 à CT12) (Figure 23 B), (Chaturvedi, P. *et al.*, 2008a). Cette partie contient un domaine spécifique de MUC4 les domaines NIDO et AMOP contenant des sites de N-glycosylation. Le domaine NIDO est potentiellement impliqué dans les interactions protéines-protéines avec la matrice extracellulaire (Senapati, S. *et al.*, 2012). Cependant, sa séquence, similaire au domaine G-1 du nidogène, est suspectée d'être impliquée dans les interactions protéine-protéine (Senapati, S. *et al.*, 2012). Le domaine AMOP (*adhesion-associated domain in MUC4 and other proteins*) est un domaine d'une centaine d'acides aminés peu retrouvé chez d'autres protéines. Sa fonction n'est pas encore connue mais sa structure suggère son implication dans les mécanismes d'adhésion (Cicarelli, F. D. *et al.*, 2002). La protéine MUC4 se poursuit par un domaine vWF-D impliqué dans les mécanismes d'oligomérisation en impliquant des ponts disulfures chez les mucines sécrétées. Toutefois, le domaine vWF-D de MUC4 est dégénéré et ne possède pas les cystéines indispensables à ces ponts disulfures suggérant une perte de fonction de ce domaine au cours de l'évolution (Jonckheere, N. *et al.*, 2013). La protéine contient également 3 domaines de type EGF conservés et impliqués dans l'interaction avec le récepteur oncogénique ErbB2 (Carraway, K. L. *et al.*, 2003; Jonckheere, N. *et al.*, 2012; Singh, P. K. and Hollingsworth, M. A., 2006). La protéine comprend un court domaine transmembranaire hydrophobe de 14 acides aminés et une courte queue cytoplasmique de 22 acides aminés.

C. Expression physiologique et rôles

L'expression de la mucine MUC4 est détectée dans de nombreux tissus à la fois chez l'adulte mais également dès les stades embryonnaires. La mucine transmembranaire MUC4 est exprimée dans la trachée, les bronches et les bronchioles alors qu'elle est absente au niveau des alvéoles pulmonaires (Buisine, M.-P. *et al.*, 1999). MUC4 est également détectée sous forme sécrétée dans le lait humain où elle permet d'inhiber la fixation de virus pathogènes (Ruvoën-Clouet, N. *et al.*, 2006; Zhang, J. *et al.*, 2005). La mucine MUC4 est fortement exprimée dans le tractus reproducteur et dans la cornée où elle joue un rôle important dans l'hydratation et la protection des épithéliums sous-jacents (Corrales, R. M. *et al.*, 2003; Gipson, I. K. *et al.*, 1997). Enfin, son expression est détectée chez l'adulte au niveau des glandes salivaires, le long du tractus digestif au pôle apical des cellules épithéliales

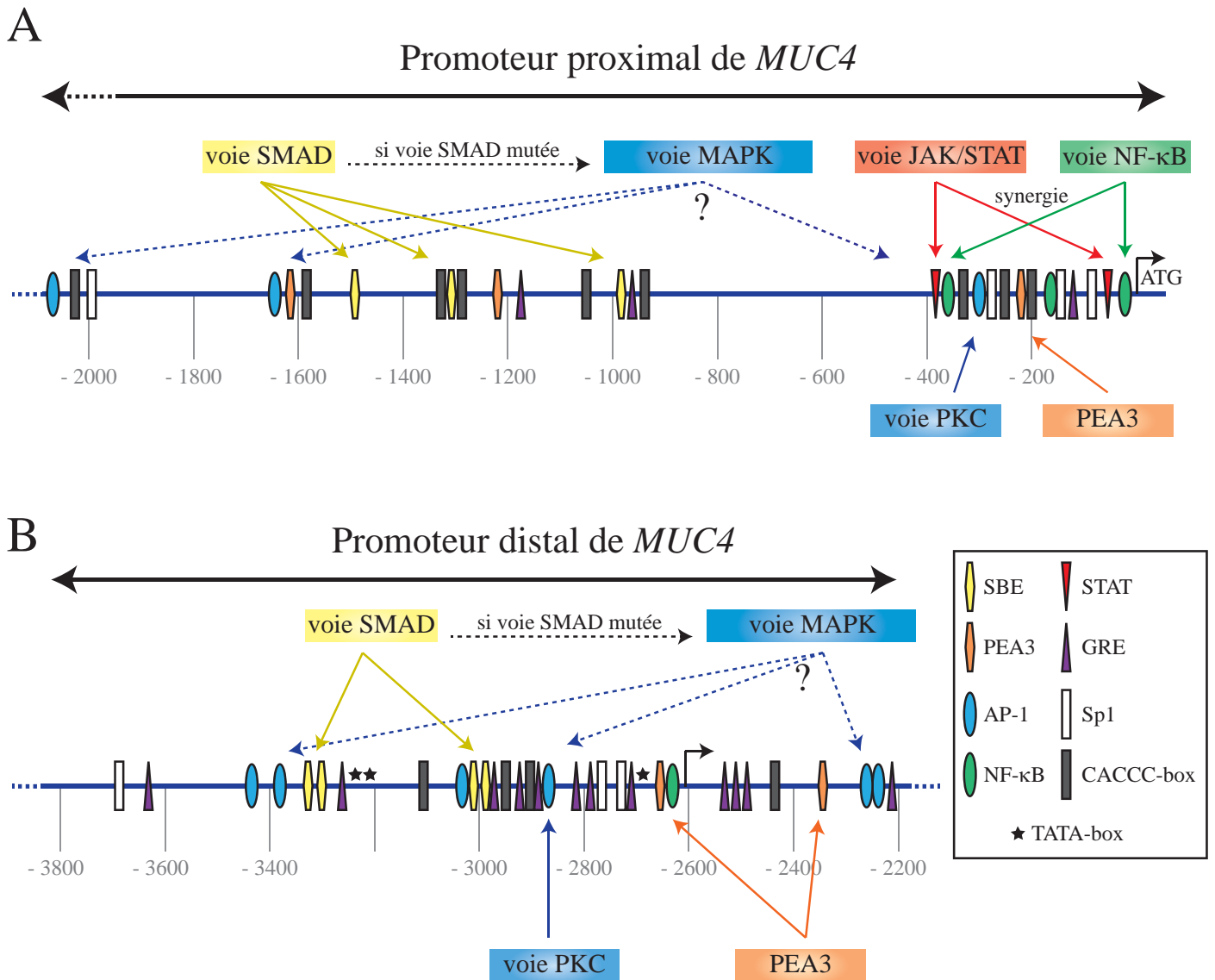


Figure 24 : Représentations schématiques des promoteurs de *MUC4*. (A) Promoteur proximal de la mucine *MUC4*. (B) Promoteur distal de la mucine *MUC4*. Représentation des différents éléments de réponse présents.

dans l'œsophage, l'estomac et le colon. Durant l'embryogenèse, la mucine MUC4 est exprimée dès la formation de l'intestin primitif qui donnera le tractus respiratoire et digestif (Buisine, M.-P. *et al.*, 2000b; Buisine, M.-P. *et al.*, 2000a; Liu, B. *et al.*, 2002). Toutefois, l'expression de la mucine MUC4 est absente des glandes annexes du tube digestif telles que le pancréas et la vésicule biliaire. Cependant, la mucine MUC4 est ré-exprimée dans les cellules des lésions PanINs dès leur apparition dans le pancréas (Rachagani, S. *et al.*, 2012).

III. Promoteurs et Régulation de MUC4

A. Structure des promoteurs de MUC4

L'expression de la mucine MUC4 est régulée par une longue séquence génomique en 5' du gène caractérisé sur 3,7 kb (GenBank : AF241535). Cette région se caractérise par la présence de 4 sites d'initiation de la transcription en -199, -2603, -2604 et -2605 séparant la région promotrice en un promoteur proximal et un promoteur distal (Figure 24) (Perrais, M. *et al.*, 2001).

A.1 Le promoteur proximal

Le promoteur proximal se caractérise par une séquence très riche en GC mais ne possède pas de TATA-box. Toutefois, c'est une région très dense en sites de fixation de facteur de croissance avec notamment des éléments de réponse CACCC box, Sp1, Sp3, GRE (*glucocorticoid response element*), AP-1, AP-2, AP-4 et PEA3 fréquemment impliqués dans l'initiation de la transcription dans les promoteurs dépourvus de TATA-box (Weis, L. and Reinberg, D., 1997). Ce promoteur contient également de nombreux éléments de réponses aux cytokines et interleukines avec des sites de fixation NF- κ B, STAT et *SMAD binding element* (SBE) (Figure 24 A) (Jonckheere, N. *et al.*, 2004). Des études fonctionnelles ont montré que le promoteur proximal est principalement actif dans la région -219/-145 dans les lignées tumorales pancréatiques (Perrais, M. *et al.*, 2001).

A.2 Le promoteur distal

Le promoteur distal de la mucine MUC4 se caractérise par la présence d'une TATA-box en -2672/-2668. La présence supplémentaire de deux sites de fixation TATA-box en -324/-3239 et -3253/-3248 a également été détectée mais aucune activité transcriptionnelle de la région dans laquelle ces sites se trouvent n'a encore été détectée (Perrais, M. *et al.*, 2001). Le promoteur distal est très riche en sites de fixation de facteur de transcription (Figure 24 B).

Cette région contient également des éléments de réponse aux facteurs AP-1, AP-2, AP-4, Sp1, *Ying Yang 1* (YY1) et NF- κ B. De plus, le promoteur distal est riche en éléments de réponse pour des facteurs de transcription de la différenciation gastro-intestinales tel que GATA, CDX, HNF et FOXA (Jonckheere, N. *et al.*, 2007). Des études fonctionnelles ont déterminé que le promoteur distal est principalement actif dans la région -2781/-2572 dans les lignées tumorales pancréatiques (Perrais, M. *et al.*, 2001).

B. Régulation de la mucine MUC4

La régulation de la mucine transmembranaire MUC4 est donc un mécanisme complexe faisant intervenir un grand nombre de voies de signalisation et un grand nombre de facteurs de transcription. En particulier, cette régulation a intensivement été étudiée dans les cancers dans lesquelles l'expression de la mucine MUC4 est altérée comme le cancer du pancréas (Jonckheere, N. *et al.*, 2010).

B.1 Régulation transcriptionnelle

La forte densité en éléments de réponse nous a conduit à caractériser la régulation complexe de la mucine MUC4 au niveau transcriptionnel. En particulier dans les cellules tumorales pancréatiques, l'expression de MUC4 peut être induite par l'action synergique de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance (Figure 24).

L'action combinée de l'interféron γ (IFN- γ) et du *transforming growth factor α* (TGF- α) ou de l'IFN- γ avec le *tumor necrosis factor α* (TNF- α) permet l'activation synergique des voies JAK/STAT et NF- κ B sur les promoteurs de MUC4 (Perrais, M. *et al.*, 2001). De même, une activation transcriptionnelle synergique induite par l'INF- γ et l'acide rétinoïque a été mise en évidence dans les tumeurs pancréatiques (Andrianifahanana, M. *et al.*, 2005). MUC4 est également régulée par la voie du TGF- β par un mécanisme SMAD dépendant et par un mécanisme SMAD indépendant (*via* les voies PI3K et MAPK) lorsque la voie est mutée (Jonckheere, N. *et al.*, 2004). Le facteur PEA3 favorise lui aussi l'activation des promoteurs de MUC4 en interagissant avec les facteurs sp1 et c-jun (Fauquette, V. *et al.*, 2005). Enfin, la nicotine augmente l'expression de MUC4 dans les cellules tumorales pancréatiques en stimulant la voie JAK/STAT par l'activation de la sous-unité $\alpha 7$ du récepteur nicotinique à l'acétylcholine (Kunigal, S. *et al.*, 2012; Momi, N. *et al.*, 2013).

A l'inverse, l'expression de la mucine MUC4 est réprimée au niveau transcriptionnel par l'action du facteur AP-2 α sur le promoteur proximal (Fauquette, V. *et al.*, 2007). De même, le

facteur de transcription Ying Yang 1 (YY1) réprime l'expression de la mucine MUC4 en se fixant sur son promoteur distal (Zhang, J. *et al.*, 2013).

B.2 Régulation post-transcriptionnelle

La régulation de la mucine MUC4, très complexe, fait également intervenir d'autres mécanismes épigénétiques et post-transcriptionnels.

Dans le cancer du pancréas, une diminution de l'expression du *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) est inversement corrélée avec l'expression de la mucine MUC4 (Singh, A. P. *et al.*, 2007). Le CFTR est un canal chlorique dont les mutations sont associées à une augmentation du risque de d'adénocarcinome (McWilliams, R. *et al.*, 2005). Ce canal réprime l'expression de MUC4 à la fois au niveau transcriptionnel mais également par un mécanisme de stabilité/dégradation de la protéine MUC4 (Singh, A. P. *et al.*, 2007). De la même façon, la voie du TGF- β est également impliquée dans la régulation de la dégradation protéosomale de la mucine MUC4 (Lomako, W. M. *et al.*, 2010).

L'expression de la mucine MUC4 est, comme de nombreuses mucines, soumise à une régulation épigénétique, en particulier dans le cancer du pancréas (Vincent, A. *et al.*, 2007). La néo-expression de la mucine MUC4 dans le cancer du pancréas fait intervenir la déméthylation progressive des îlots CpG situé dans sa région promotrice. Cette déméthylation est associée avec l'acétylation des histones permettant l'ouverture de la chromatine et la fixation des facteurs de transcription (Vincent, A. *et al.*, 2008; Yamada, N. *et al.*, 2009). Ces mécanismes font également intervenir au niveau de l'ARN messenger la fixation directe du micro ARN miR-219-1-3p sur le 3'UTR de l'ARN de MUC4 inhibant ainsi son expression (Lahdaoui, F. *et al.*, 2014). De même, le miR-150 entraîne l'inhibition de MUC4 en se fixant sur son 3'UTR (Srivastava, S. K. *et al.*, 2011). La fixation du miR-200c au niveau de l'exon 1 entraîne également une diminution de son expression (Radhakrishnan, P. *et al.*, 2013).

IV. La mucine MUC4 dans le cancer du pancréas

A. Expression de MUC4 et diagnostic

A.1 Expression dans le cancer et les lésions précurseurs

L'expression de la mucine MUC4 est fréquemment dérégulée dans les cancers tels que le cancer de l'œsophage, de la vésicule biliaire, des glandes salivaires ou du poumon (Arul, G.

S. *et al.*, 2000; Handra-Luca, A. *et al.*, 2005; Llinares, K. *et al.*, 2004). En particulier dans le cancer du pancréas, la mucine MUC4 est néoexprimée dès les stades précurseurs PanINs et les IPMNs alors qu'elle n'est pas détectée dans le pancréas sain (Jonckheere, N. *et al.*, 2010; Moniaux, N. *et al.*, 2004). A l'inverse, son expression n'est pas altérée dans les autres pathologies pancréatiques. Ainsi, MUC4 n'est pas détectée dans les pancréatites chroniques (Andrianifahanana, M. *et al.*, 2001).

Dans les PanINs, l'expression de MUC4 augmente graduellement avec la progression des lésions : elle est détectée dans 12 % des PanIN-1, 36 % des PanIN-2, 85 % des PanIN-3 et 89 % des adénocarcinomes (Swartz, M. J. *et al.*, 2002). A des stades plus avancées, l'expression de MUC4, détectée au sein des tumeurs primaires, est également retrouvée dans les métastases des ganglions périphériques associées (Ansari, D. *et al.*, 2013).

Toutefois, la mucine MUC4 est un marqueur de cellules épithéliales. Ainsi, la perte des caractères de différenciation aux stades tumoraux avancés est associée avec la perte de l'expression de la mucine MUC4 (Brychtova, V. *et al.*, 2014).

A. 2 Détection de la mucine, implication diagnostic ?

La néoexpression de la mucine MUC4 dans les tumeurs du pancréas ont conduit à proposer MUC4 comme marqueur de diagnostic/pronostic potentiel. La détection de MUC4 a été mise en évidence sur biopsies par aspiration avec une aiguille fine (FNA), et est associée à la présence de cancer du pancréas avec une sensibilité à 74 % et une spécificité à 100 % (Horn, A. *et al.*, 2013). Cependant, la biopsie reste un geste invasif inutilisable en routine diagnostique. De plus, l'expression de MUC4 dans la majorité des adénocarcinomes (93 % d'une cohorte de 114 patients) n'a pas permis d'associer son expression avec une valeur pronostique (Higashi, M. *et al.*, 2015). Une nouvelle technologique *Surface-Enhanced Raman Scattering* (SERS) basée sur une immunocapture sérique est en cours développement et suggère la possibilité de quantifier l'expression de MUC4 dans le sang des patients à des fins diagnostiques. Cette stratégie a permis de détecter l'augmentation de l'expression de MUC4 chez les patients atteints d'un cancer du pancréas comparée à celle détectée chez les patients contrôles mais nécessite d'être validée en routine avant une utilisation clinique potentielle (Wang, G. *et al.*, 2011). Pour le moment, en clinique, seule la détection des motifs glycaniques altérés est utilisée pour le suivi des tumeurs (CA19.9) mais ces motifs ne sont pas spécifiques de la mucine MUC4 ni du cancer du pancréas.

B. Rôles dans les propriétés des cellules tumorales

La protéine MUC4 est impliquée dans de nombreuses propriétés des cellules tumorales *via* sa fonction de mucine fortement O-glycosylée, ou *via* sa fonction de signalisation. En effet, la mucine MUC4 peut interagir et stabiliser à la membrane le récepteur oncogénique ErbB2 ou, si celui-ci est absent, ErbB3 et altérer ainsi la signalisation cellulaire (Chaturvedi, P. *et al.*, 2008b; Lakshmanan, I. *et al.*, 2015). En particulier, dans les cellules tumorales pancréatiques, l'interaction MUC4-ErbB2 entraîne l'activation des voies p42/44 MAPK (*via* ErbB2) et JNK (*via* MUC4). Cette activation favorise la prolifération, diminue l'apoptose et augmente les capacités d'invasion des cellules tumorales (Jonckheere, N. *et al.*, 2012). La présence de MUC4 à la membrane favorise la survie et les capacités invasives et métastatiques des cellules tumorales en bloquant les interactions intégrines-matrice extracellulaire (Chaturvedi, P. *et al.*, 2007; Singh, A. P. *et al.*, 2004). Enfin, une étude récente a mis en évidence le rôle du complexe MUC4-ErbB2 dans les capacités d'invasion des fibres nerveuses à partir des tumeurs pancréatiques (événement fréquent dans les tumeurs) *via* la régulation de la netrin-1, une protéine de guidage axonal (Wang, L. *et al.*, 2015).

L'expression de la mucine MUC4 est également associée à la chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques. En particulier, MUC4 est impliquée dans la chimiorésistance à la Gemcitabine, chimiothérapie de référence dans le cancer du pancréas, en favorisant la survie *via* la phosphorylation et la séquestration cytoplasmique de la protéine pro-apoptotique Bad et la diminution du rapport Bax/Bclxl. L'invalidation de la mucine MUC4 induit la diminution de l'activation de la voie NF- κ B et réduit sensibilité à la Gemcitabine *via* la répression de l'*Equilibrative/Concentrative Nucleoside Transporter 1* (hCNT1) (Bafna, S. *et al.*, 2009; Skrypek, N. *et al.*, 2013). Enfin, MUC4 favorise également la chimiorésistance en augmentant le potentiel souche tumoral des cellules CD133+ (Mimeault, M. *et al.*, 2010).

La mucine MUC4 est donc une protéine favorisant la croissance, la survie, le développement, la dissémination et la résistance des tumeurs pancréatiques. Décrypter et caractériser sa régulation notamment dans les étapes précoces de la cancérogenèse pancréatique semble une stratégie intéressante. En particulier, l'implication de l'oncogène K-ras dans la régulation de la mucine MUC4 néoexprimée précocement restait à élucider.

OBJECTIFS DES TRAVAUX

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Le cancer du pancréas est un cancer de très mauvais pronostic. Ces sombres statistiques s'expliquent majoritairement par un diagnostic tardif avec un cancer déjà métastatique dans plus de 80 % des cas et un manque de thérapie efficace. La caractérisation des stades précurseurs, et en particulier des PanINs représentant plus de 95 % de ces stades, est donc primordiale pour permettre l'identification et la caractérisation de nouvelles cibles diagnostiques et/ou thérapeutiques. Les mutations de l'oncogène K-ras sont un évènement précoce et initiateur de la cancérogenèse pancréatique. Toutefois, aucune thérapie efficace et utilisable en clinique ciblant K-ras n'est actuellement disponible. Précocement, la néo-expression de la mucine membranaire MUC4 est également détectée dans les PanINs. Nos travaux antérieurs ont démontré l'implication de la mucine MUC4, associée à son partenaire membranaire le récepteur oncogénique ErbB2, dans les propriétés de prolifération, de survie et de résistances aux drogues de chimiothérapie. Les mutations de l'oncogène K-ras et la néo-expression de la mucine MUC4 étant tous deux précoces, nous avons émis l'hypothèse que MUC4 puisse être une cible de K-ras au cours des phases précoces de la cancérogenèse pancréatique.

Les objectifs de mes travaux de thèse étaient donc :

Partie 1 : Etudier la régulation de la mucine MUC4 par l'oncogène K-ras dans le cancer du pancréas.

- A. -Identifier les voies de signalisation activées par l'oncogène K-ras dans les phases précoces à l'aide du modèle murin de cancérogenèse pancréatique.
- B. -Etudier, *in vitro*, la régulation de la mucine MUC4 par l'oncogène K-ras.

Partie 2 : Rôle du complexe MUC4-ErbB2 dans la cancérogenèse pancréatique

- A. – Etudier, *in vivo*, le rôle de MUC4 dans les étapes précoces de la cancérogenèse pancréatique par la mise en place et la caractérisation du modèle murin MUC4 déficient. Ce modèle a ensuite été croisé avec le modèle de cancérogenèse pancréatique.

B. – Décrypter l'implication de son partenaire ErbB2 dans les propriétés de chimiorésistance aux drogues de chimiothérapies Gemcitabine et aux drogues du protocole FOLFIRINOX.

RESULTATS

PARTIE 1:
**ETUDE DE LA REGULATION DE LA MUCINE MUC4
PAR L'ONCOGENE K-RAS**

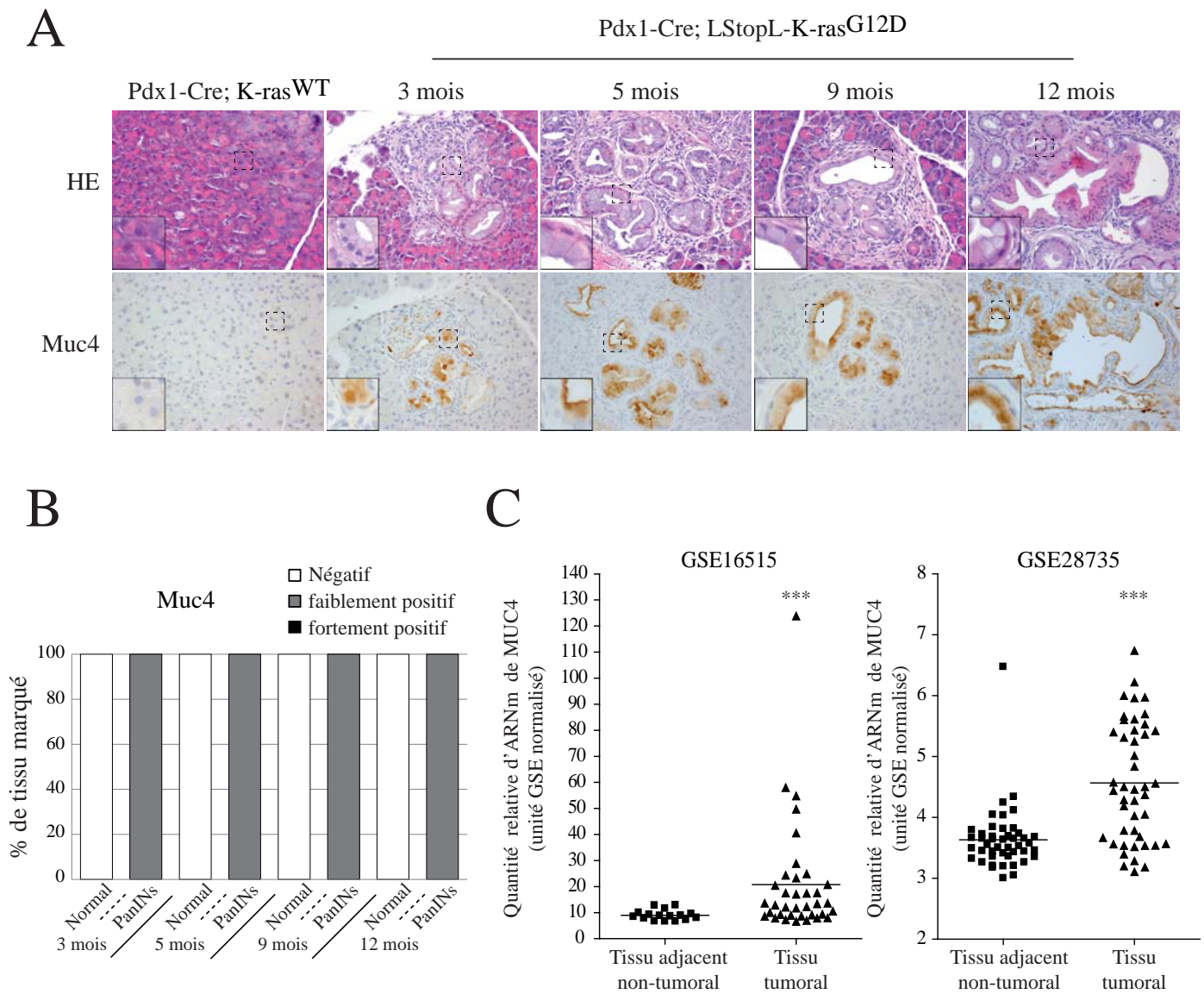


Figure 25 : Expression de la mucine MUC4 dans le pancréas pré-néoplasique et tumoral.
 (A) Expression de la mucine Muc4 par immunohistochimie et marquage à l'hématoxyline et l'éosine du tissu pancréatique de souris Pdx1-Cre; LStopL-K-ras^{G12D} et de souris contrôles (x200). (B) Quantification du marquage immunohistochimique de Muc4. (C) Expression de la mucine MUC4 dans le tissu tumoral et le tissu non-tumoral adjacent issus de bases des données génomiques NCBI Gene Expression Omnibus GSE 16515 and GSE 28735. Analyse statistique par t-test (***) $p < 0.001$.

I. MUC4 est régulé par K-ras *in vivo* et *in vitro*

A. Expression de la mucine Muc4 *in vivo* dans le modèle murin

L'expression de la mucine Muc4 a été évaluée par immunohistochimie (IHC) dans le modèle transgénique de cancérogenèse pancréatique induite par K-ras^{G12D}. Le marquage à l'hématoxyline et l'éosine (HE) du tissu pancréatique de souris Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} sacrifiées à 3, 5, 9 et 12 mois (5 souris par âge et par groupe) révèle la formation de lésions PanINs qui augmentent en nombre et en taille au cours du temps, alors qu'aucune lésion PanIN n'est détectée dans le tissu pancréatique de souris contrôles Pdx1-Cre ; K-ras^{WT}, à tous les âges (Figure 25 A). Comme attendu, l'essentiel des lésions formées correspondent à des PanINs de bas grade.

La néo-expression de la mucine Muc4 est détectée au niveau du pôle apical et dans le cytoplasme des cellules de lésions PanINs observées (100% des PanINs). Cette expression est observée dès l'apparition de lésions PanINs et quel que soit l'âge des souris Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D}. A l'inverse, son expression n'est détectée ni dans le tissu pancréatique sain environnant ni dans le pancréas exocrine des souris contrôles Pdx1-Cre ; K-ras^{WT}, quels que soient leurs âges (Figure 25 A et B). De plus, aucun marquage n'est observé sans anticorps primaire, assurant la validité du marquage (Figure supplémentaire 3 du Vasseur et al., 2015). Ce profil d'expression confirme celui observé dans le modèle murin de cancérogenèse pancréatique et reproduit la néo-expression de la mucine MUC4 observée chez l'Homme dans les tumeurs pancréatiques (Figure 25 C; (Andrianifahanana, M. *et al.*, 2001).

B. Implication de K-ras sur l'expression de MUC4 *in vitro*

L'implication de l'oncogène K-ras sur l'expression de la mucine membranaire MUC4 a ensuite été étudiée *in vitro* en utilisant des lignées cellulaires humaines d'adénocarcinomes pancréatiques BxPC3 (K-ras^{WT}) et CAPAN-2 (K-ras^{G12V}). La surexpression de mutants de K-ras a été réalisée par transfections transitoires de vecteurs codant le mutant K-ras ou du vecteur vide contrôle. L'enrichissement de l'expression du mutant K-ras^{G12V} après transfection a été confirmé dans les lignées cellulaires BxPC3 (21,3 fois) et CAPAN-2 (4,7 fois) par une analyse RT-qPCR (Figure 26 A). De plus, la quantité de K-ras en conformation active a été évaluée par immunoprecipitation. La quantité de K-ras lié au GTP est augmentée dans la lignée CAPAN-2 transfecté avec le mutant K-ras^{G12V} (5,86) comparé à la condition contrôle (1,93), confirmant l'augmentation de K-ras liée au GTP (Figure 26 B). L'expression

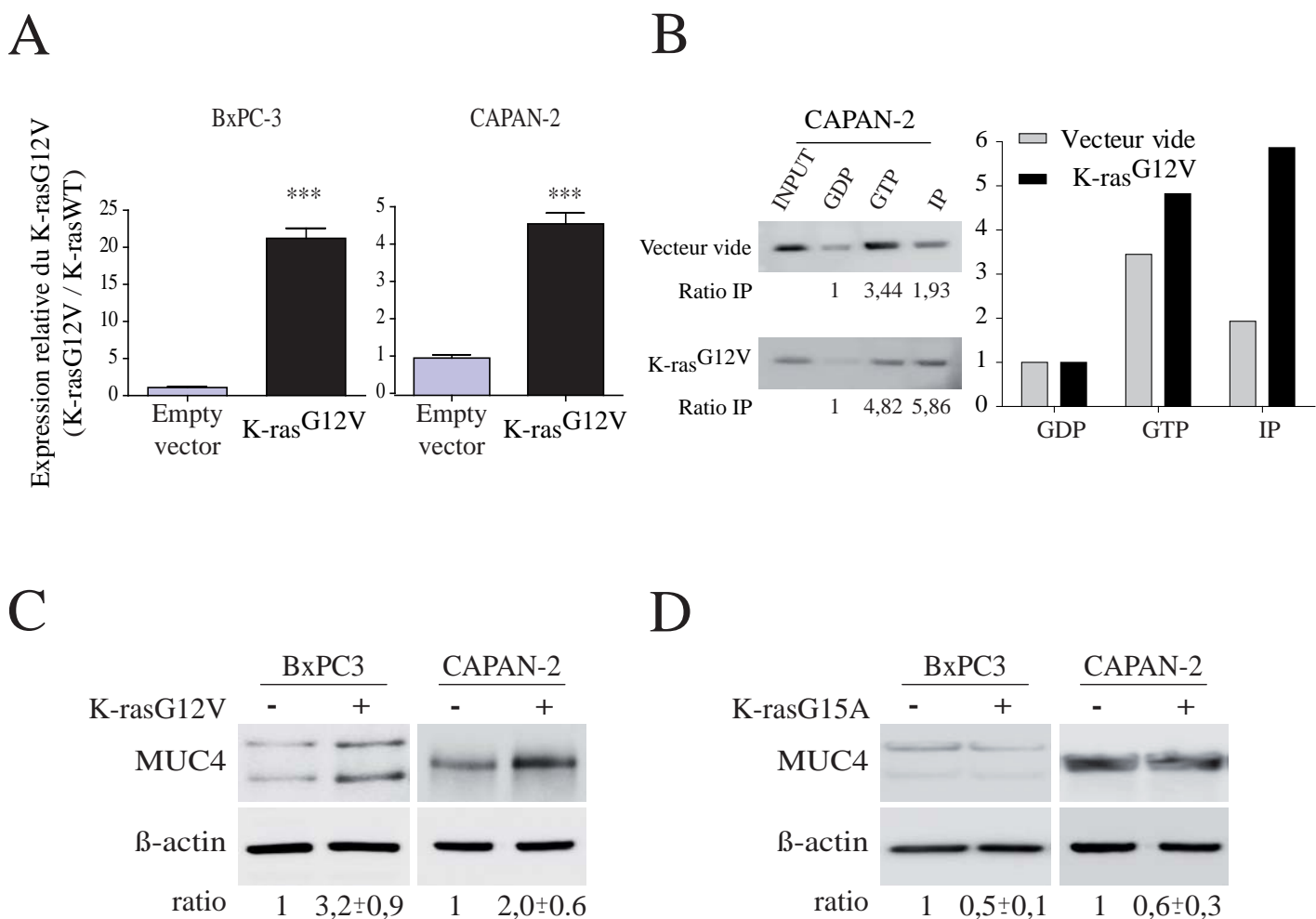


Figure 26 : *Effets de l'expression de mutants K-ras sur l'expression de la mucine MUC4.* (A) *Enrichissement par qRT-PCR de l'expression du mutant K-rasG12V transfecté dans les lignées BxPC3 et CAPAN-2.* (B) *Dosage d'activité GTPasique dans les CAPAN-2 transfectées par le mutant K-rasG12V.* (C) *Expression par Western Blot de la mucine MUC4 suite à la transfection du mutant actif K-rasG12V.* (D) *Expression par Western Blot de la mucine MUC4 suite à la transfection du mutant inactif K-rasG15A.*

de la mucine MUC4 a ensuite été évaluée au niveau protéique par Western Blot. Pour les deux lignées cellulaires, une augmentation de l'expression de la mucine MUC4 a été observée en réponse à la surexpression du mutant constitutivement activé K-ras^{G12V} (Figure 26 C). La transfection d'un mutant inactif de K-ras, le mutant G15A, induisant un encombrement stérique empêchant la liaison du GTP, a également été réalisée. A l'inverse, la surexpression de ce mutant inactif K-ras^{G15A} induit une diminution de l'expression de la mucine MUC4 dans ces deux lignées cellulaires BxPC3 et CAPAN-2 (Figure 26 D).

Ces résultats indiquent que la néo-expression de la mucine membranaire Muc4 est observée, *in vivo*, précocement dans les lésions PanINs qui se forment suite à l'expression du K-ras muté dans le pancréas. De plus, le mutant constitutivement activé K-ras^{G12V} induit l'augmentation de l'expression de MUC4 dans les lignées tumorales pancréatiques humaines. L'ensemble de ces résultats suggère que le mutant K-ras est capable d'induire l'expression de la mucine MUC4 dans les phases précoces de la cancérogenèse pancréatique.

II. Voies de signalisation impliquées

A. Expression des voies de signalisation dans le modèle murin

L'expression et l'activation des voies de signalisation MAPKs (ERK et p38 MAPK), JNK et NF-κB, décrites dans la littérature comme des voies de signalisation cibles de l'activité oncogénique de K-ras, ont été évaluées *in vivo* dans le modèle murin pré-clinique de cancérogenèse pancréatique (Herrmann, C. and Nassar, N., 1997; Malumbres, M. and Barbacid, M., 2003). Le marquage immunohistochimique de différents composants de ces voies de signalisation a été réalisé dans le pancréas de souris Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} et de souris contrôles Pdx1-Cre; K-ras^{WT} âgées de 3, 5, 9 et 12 mois. La spécificité des marquages est validée par un marquage sans anticorps primaire (Figure supplémentaire 3 du Vasseur *et al.*, 2015).

A.1 Expression et activation de la voie p42/44 MAPK

L'expression nucléaire de phospho-p42/44 MAPK (phospho-Erk1/2, Thr202/Tyr204) a été détectée dans les cellules des lésions PanINs formées dans les souris Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} dès l'âge de 3 mois et se maintient dans les souris plus âgées alors qu'aucun marquage n'est détecté dans le tissu exocrine sain environnant ou dans le tissu des souris

Pdx1-Cre; LStopL-K-rasG12D

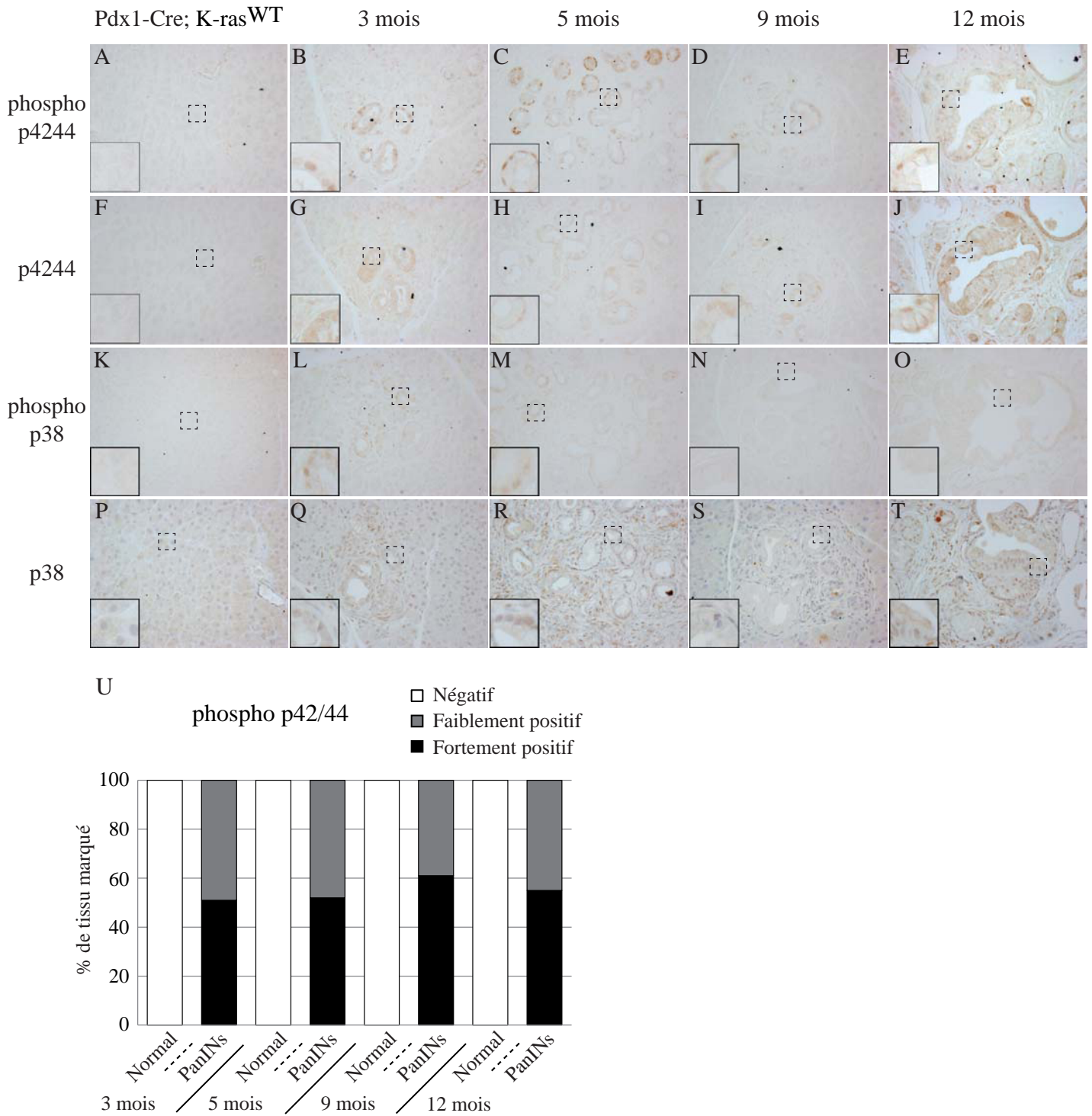


Figure 27 : **Expression des voies MAPKs dans le modèle murin.** Expression de phospho p42/44 MAPK (A-E), p42/44 MAPK (F-J), phospho p38 MAPK (K-O) et p38 MAPK (P-T) analysées par immunohistochimie dans le tissu pancréatique des souris Pdx1-Cre;LStopL-K-rasG12D et des souris contrôles (x200). (U) Quantification du marquage phospho p42/44 MAPK.

contrôle Pdx1-Cre ; K-ras^{WT} (Figure 27 A-E et quantification en U). Le profil d'expression de la forme totale p42/44 MAPK est similaire à celui de la forme phosphorylée dans les cellules des lésions PanINs et est détectée plus faiblement dans le cytoplasme dans toutes les autres cellules (Figure 27 F-J).

Ces résultats suggèrent que la voie p42/44 MAPK est activée dès les stades précoces dans les PanINs formées suite à l'expression du K-ras muté alors qu'elle ne l'est pas dans le tissu sain et que cette activation est maintenue au cours du temps dans les PanINs.

A.2 Expression et activation de la voie p38 MAPK

L'expression nucléaire de phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) a été observée dans les cellules des lésions PanINs formées dans les souris Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} à l'âge de 3 mois et plus faiblement à 5 mois alors qu'aucun marquage n'est détecté dans les lésions des souris plus âgées, dans le tissu exocrine sain environnant ou dans le tissu des souris contrôles Pdx1-Cre ; K-ras^{WT} (Figure 27 K-O). La forme totale de p38 MAPK est faiblement détectée dans le cytoplasme de toutes les cellules du pancréas exocrine et à tous les âges quel que soit le génotype de la souris (Figure 27 P-T).

Ces résultats suggèrent que la voie p38 MAPK est activée dès les stades précoces dans les PanINs formées suite à l'expression du K-ras muté mais que cette activation est transitoire puis disparaît cours du temps.

A.3 Expression et activation de la voie JNK

L'expression nucléaire de phospho-JNK (Thr183/Tyr185) a été faiblement détectée dans les cellules des PanINs formées dans les souris Pdx1-Cre ; LStop-K-ras^{G12D} à partir de 3 mois avec une intensité croissante avec l'âge (Figure 28 A-E). A l'inverse, aucun marquage n'est observé dans le tissu exocrine sain environnant ou dans celui des souris contrôles Pdx1-Cre ; K-ras^{WT}. Le profil d'expression de la forme totale JNK est observé dans les noyaux de toutes les cellules des lésions PanINs, dans celles du tissu exocrine environnant, ainsi que dans toutes les cellules du tissu exocrine des souris contrôles (Figure 28 F-J).

Ces résultats suggèrent que la voie JNK est activée dès les stades précoces dans les PanINs formées suite à l'expression du K-ras muté et que cette activation s'amplifie au cours du temps dans les lésions PanINs.

Figure 28 manuscrit Romain VASSEUR

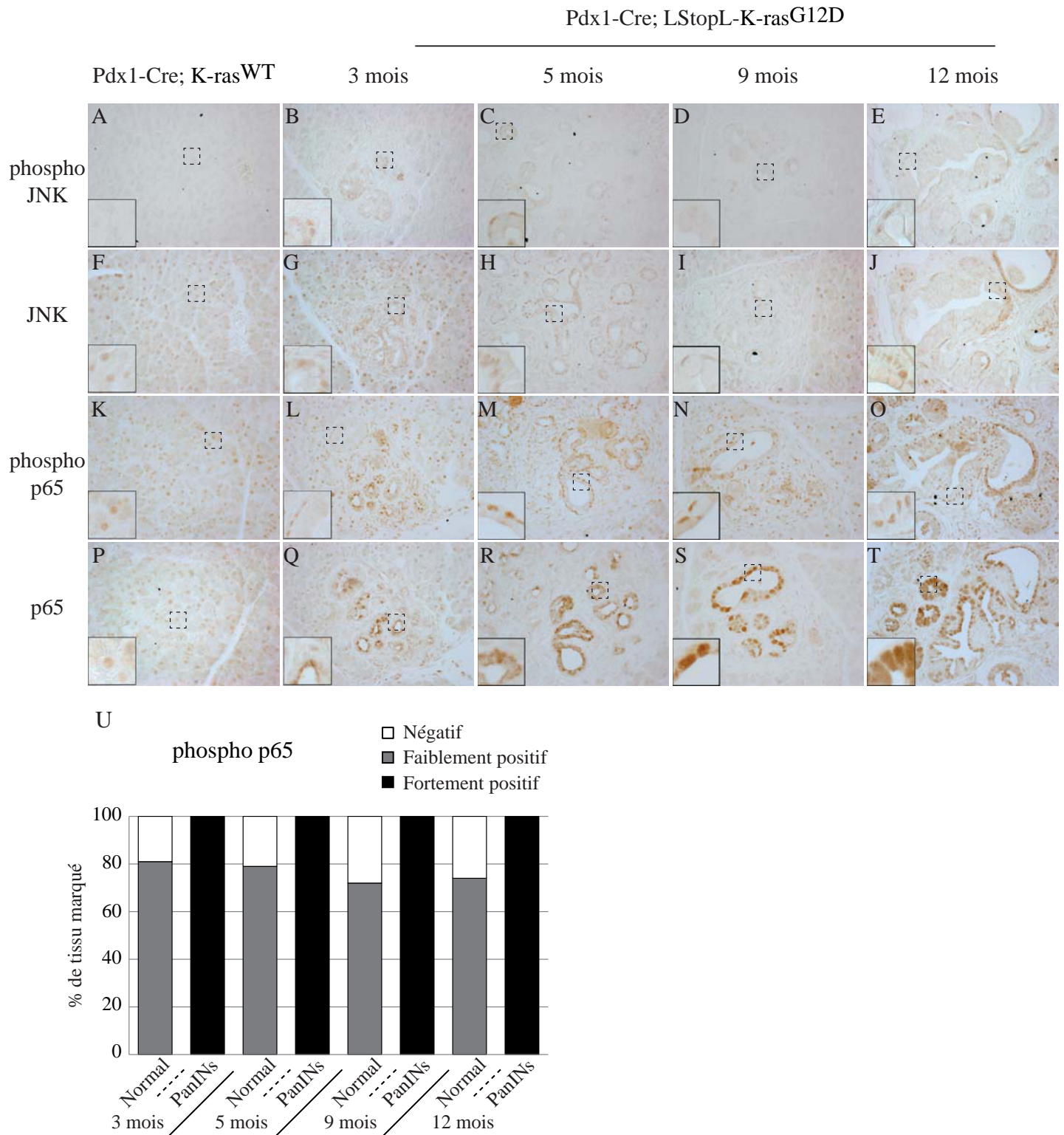


Figure 28 : Expression des voies JNK et NF- κ B dans le modèle murin. Expression de phospho JNK (A-E), JNK (F-J), phospho p65 NF- κ B (K-O) et p65 NF- κ B (P-T) analysées par immunohistochimie dans le tissu pancréatique des souris Pdx1-Cre;LStopL-K-rasG12D et des souris contrôles (x200). (U) Quantification du marquage phospho p65 NF- κ B.

A.4 Expression et activation de la voie NF-κB

Enfin, un fort marquage nucléaire de phospho-p65 NF-κB (Ser 536) est observé dans les cellules des PanINs (100% des PanINs) formées dans le tissu des souris Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} dès l'âge de 3 mois et se maintient dans les souris plus âgées. La phosphorylation de la sous-unité p65 NF-κB est également détectée plus faiblement dans toutes les cellules du tissu exocrine environnant et dans le pancréas sain (72-81 % des cellules) des souris contrôles Pdx1-Cre ; K-ras^{WT} (Figure 28 K-O et quantification en U). La forme totale p65 NF-κB n'est observée que faiblement dans tous les noyaux du tissu exocrine alors qu'elle est fortement exprimée dans le cytoplasme des cellules des PanINs à tous les âges et dès 3 mois (Figure 28 P-T).

Ces résultats suggèrent que la voie NF-κB est fortement surexprimée et activée dès les stades précoces dans les lésions PanINs formées suite à l'expression du K-ras muté et que cette activation est maintenue au cours du temps.

L'ensemble de ces résultats révèlent que l'activation précoce des voies de signalisation p42/44 MAPK, JNK et NF-κB dans les lésions PanINs formées suite à l'expression du K-ras muté est corrélée avec la néo-expression également précoce de la mucine Muc4.

B. Implication des voies de signalisation activées par K-ras^{G12V}

B.1 Activation in vitro des voies de signalisation par K-ras^{G12V}

Des transfections transitoires d'un vecteurs codant le mutant K-ras^{G12V} ou d'un vecteur contrôle ont été réalisées dans les lignées cellulaires humaines tumorales BxPC3 et CAPAN-2, afin de confirmer que la signalisation oncogénique du K-ras muté conduise à l'activation des voies de signalisation p42/44 MAPK, p38 MAPK, JNK et NF-κB. L'expression et l'activation des voies de signalisation ont été évaluées par Western Blot.

L'analyse du ratio forme phosphorylée/forme totale indique que le mutant K-ras^{G12V} induit l'activation de la voie p42/44 MAPK (1,76 fois) et de la voie NF-κB (3,02 fois) dans la lignée CAPAN-2 ainsi que de la voie p42/44 MAPK dans les BxPC3 (10.3 fois). A l'inverse, nous n'observons pas d'altération significative des voies p38 MAPK (1,08 fois dans les CAPAN-2 et non détectable dans les BxPC3) et JNK (respectivement 0,92 fois et 0.70 fois dans les lignées CAPAN-2 et BxPC3) suite à la transfection du mutant K-ras^{G12V} (Figure 29 A et B).

Figure 29 manuscrit Romain VASSEUR

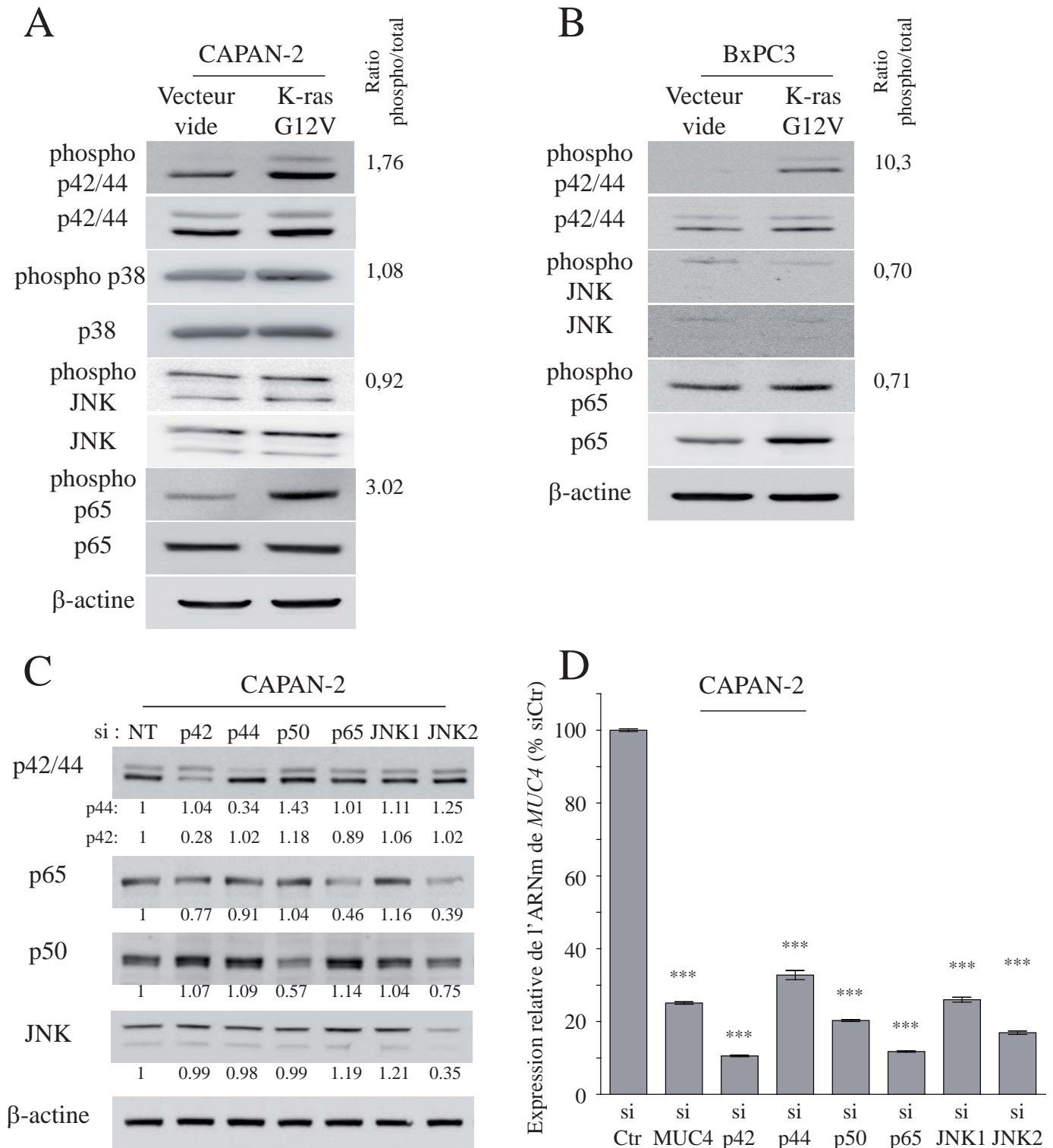


Figure 29 : **Activation in vitro des voies de signalisation par K-ras et implication dans l'expression de MUC4.** Analyse par Western Blot de l'expression des voies p42/44 MAPK, p38 MAPK, JNK et NF-κB dans les lignées tumorales pancréatiques CAPAN-2 (A) et BxPC3 (B). L'expression de la voie p38 MAPK n'est pas détectable dans les BxPC3. (C) Invalidation par ARN interférents de p42/44 MAPK, p50/p65 NF-κB et JNK1/2 ise en évidence par Western Blot dans les cellules CAPAN-2. (D) Expression de MUC4 par qRT-PCR après invalidation des différentes voies de signalisation ou suite à l'inhibition de MUC4.

Ces résultats suggèrent que, *in vitro*, K-ras^{G12V} active les voies de signalisation p42/44 MAPK et NF-κB dans les lignées tumorales pancréatiques. A l'inverse, l'activation des voies p38 MAPK et JNK détectée n'est pas altérée.

B.2. Implication des voies de signalisation sur l'expression de MUC4

Afin d'identifier quelles voies de signalisation sont impliquées dans l'expression de la mucine MUC4, l'inhibition par ARN interférents des différents composants de ces voies a été réalisée. L'expression de MUC4 a été étudiée après inhibition par ARN interférents ciblant MUC4, p42 MAPK, p44 MAPK, JNK1, JNK2, la sous-unité p50 du NF κB et la sous-unité p65 du NF κB dans la lignée tumorale pancréatique CAPAN-2. L'inhibition a été contrôlée par Western Blot (Figure 29 C). Une forte diminution significative ($p < 0,001$) de l'expression de l'ARN messager de MUC4 a été observée après inhibition des composants des voies de signalisation p42/44 MAPK, JNK et NF κB (Figure 29 D).

Ces résultats *in vitro* suggèrent que les différentes voies de signalisation p42/44 MAPK, JNK et NF-κB coopèrent pour induire l'expression de MUC4 au niveau transcriptionnel.

III. Régulation transcriptionnelle de la mucine MUC4

A. Activation des promoteurs de MUC4 par K-ras

L'implication de l'oncogène K-ras sur l'activité du promoteur de *MUC4* a été étudiée. Des co-transfections de vecteurs codant le mutant K-ras^{G12V} ou son vecteur contrôle ont été réalisées avec des vecteurs plasmidiques pGL3 contenant le gène rapporteur de la luciférase (LUC) sous contrôle de fragments du promoteur proximal ou distal de *MUC4* (Figure 30 A), (Perrais, M. *et al.*, 2001).

Dans la lignée tumorale humaine CAPAN-2, la surexpression du mutant K-ras^{G12V} induit une augmentation significative de l'activité des fragments proximaux -461/-1 ($p < 0,001$) et -1187/-1 ($p < 0,05$) (Figure 30 B). De manière intéressante, dans la lignée non tumorale HPNE transfectée stablement par l'oncogène K-ras^{G12D}, une activité significativement plus importante du fragment distal -3135/-2570 ($p < 0,01$) et dans une moindre mesure du fragment proximal -1187/-1 ($p < 0,05$) est observée par rapport à celle mesurée dans la lignée HPNE (Figure 30 C).

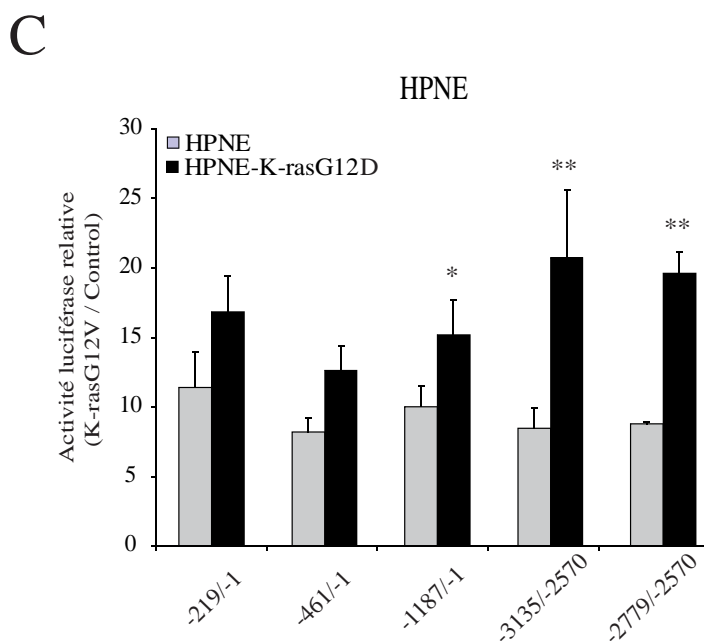
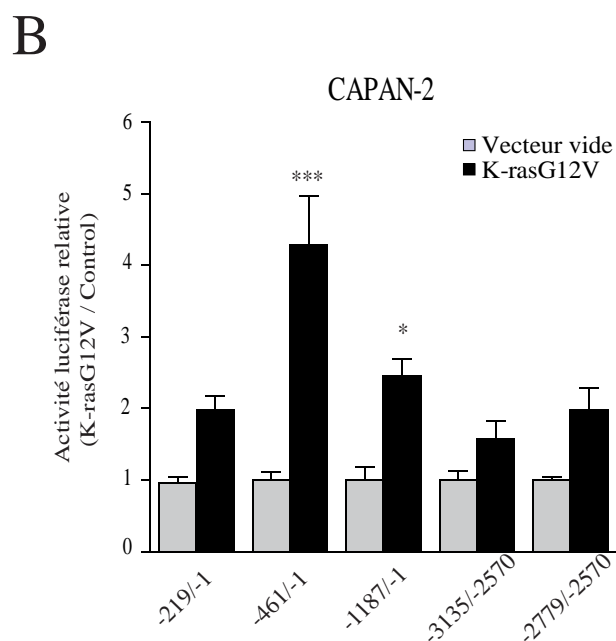
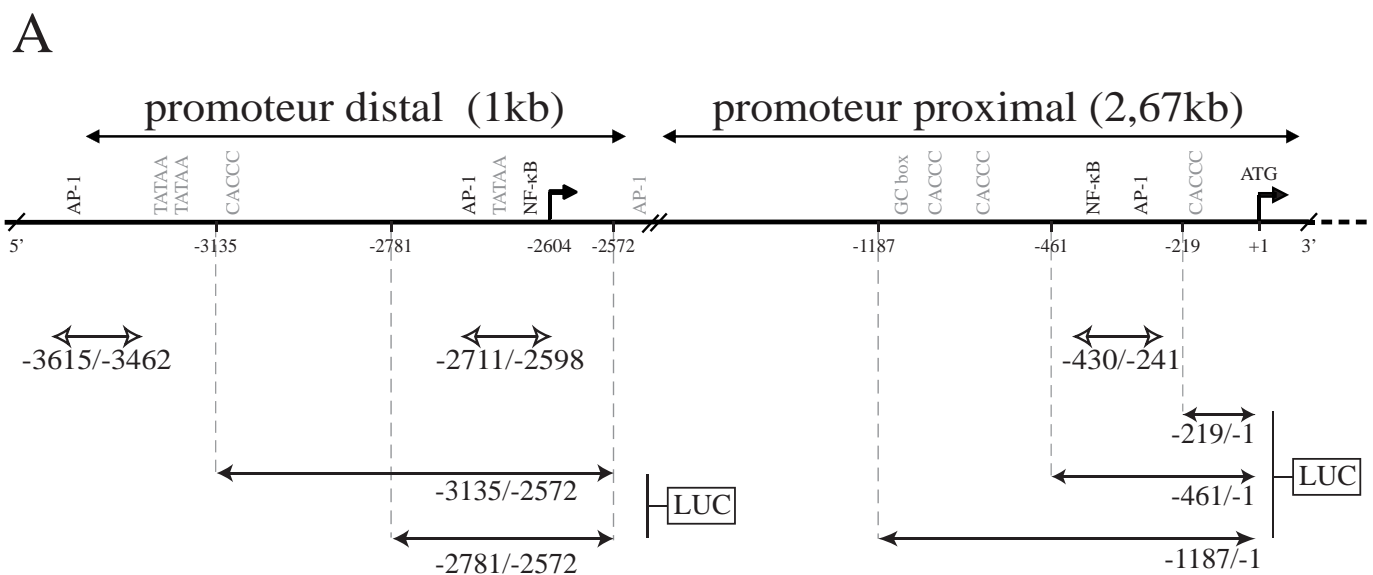


Figure 30 : **Activation des promoteurs de MUC4 par K-ras muté.** (A) Représentation schématique des promoteurs de MUC4 et des constructions luciférases. (B) Activité luciférase relative des promoteurs de MUC4 dans la lignée tumorale CAPAN-2 transfectée par le mutant K-rasG12V. (C) Activité luciférase relative des promoteurs de MUC4 dans la lignée non-tumorale HPNE, transfectée stablement avec le mutant K-rasG12D.

Ces résultats suggèrent que l'activité des promoteurs proximal et distal de MUC4 est régulée positivement par K-ras muté mais que cette régulation est dépendante du type cellulaire.

B. Recrutement des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB

B.1 Les facteurs AP-1 et NF-κB sont activés par K-ras

Les facteurs de transcription AP-1 (complexe composé majoritairement de c-fos et c-jun dans sa forme active) et NF-κB sont des cibles recrutées en aval de l'activation des voies de signalisation p42/44 MAPK, JNK et NF-κB respectivement, décrites dans la littérature. Leur implication dans la régulation de l'expression de la mucine MUC4 par l'oncogène K-ras a donc été évaluée.

L'expression de c-fos a été étudiée par immunohistochimie dans le tissu pancréatique de souris Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} et de souris contrôles. Une forte expression nucléaire de c-fos a été détectée dans les cellules des PanINs (100%) formées dans le tissu des souris Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} dès 3 mois et se maintient dans les souris d'âges plus avancés alors qu'aucun marquage n'est détectable dans le tissu sain environnant ni dans le tissu exocrine des souris contrôles (Figure 31 A et B). Aucun marquage spécifique de c-jun n'a pu être obtenu avec les anticorps testés.

Ces résultats suggèrent que, comme NF-κB, AP-1 est exprimé dès les stades précoces PanINs formés suite à l'expression du K-ras muté et que cette activation est maintenue au cours du temps.

Pour confirmer que le mutant K-ras est responsable de l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB, des co-transfections de vecteurs codant le mutant activé K-ras^{G12V} ou son contrôle ont été réalisées avec des vecteurs codant le gène rapporteur de la luciférase sous contrôle d'éléments de réponse AP-1 ou κB. L'analyse de l'activité luciférase relative des vecteurs rapporteurs indique que dans les lignées tumorales pancréatiques BxPC3 (Figure 31 C) et CAPAN-2, K-ras^{G12V} (Figure 31 D) active significativement les facteurs de transcription AP-1 et NF-κB ($p < 0,001$ dans les cellules BxPC3 et $p < 0,01$ dans les cellules CAPAN-2).

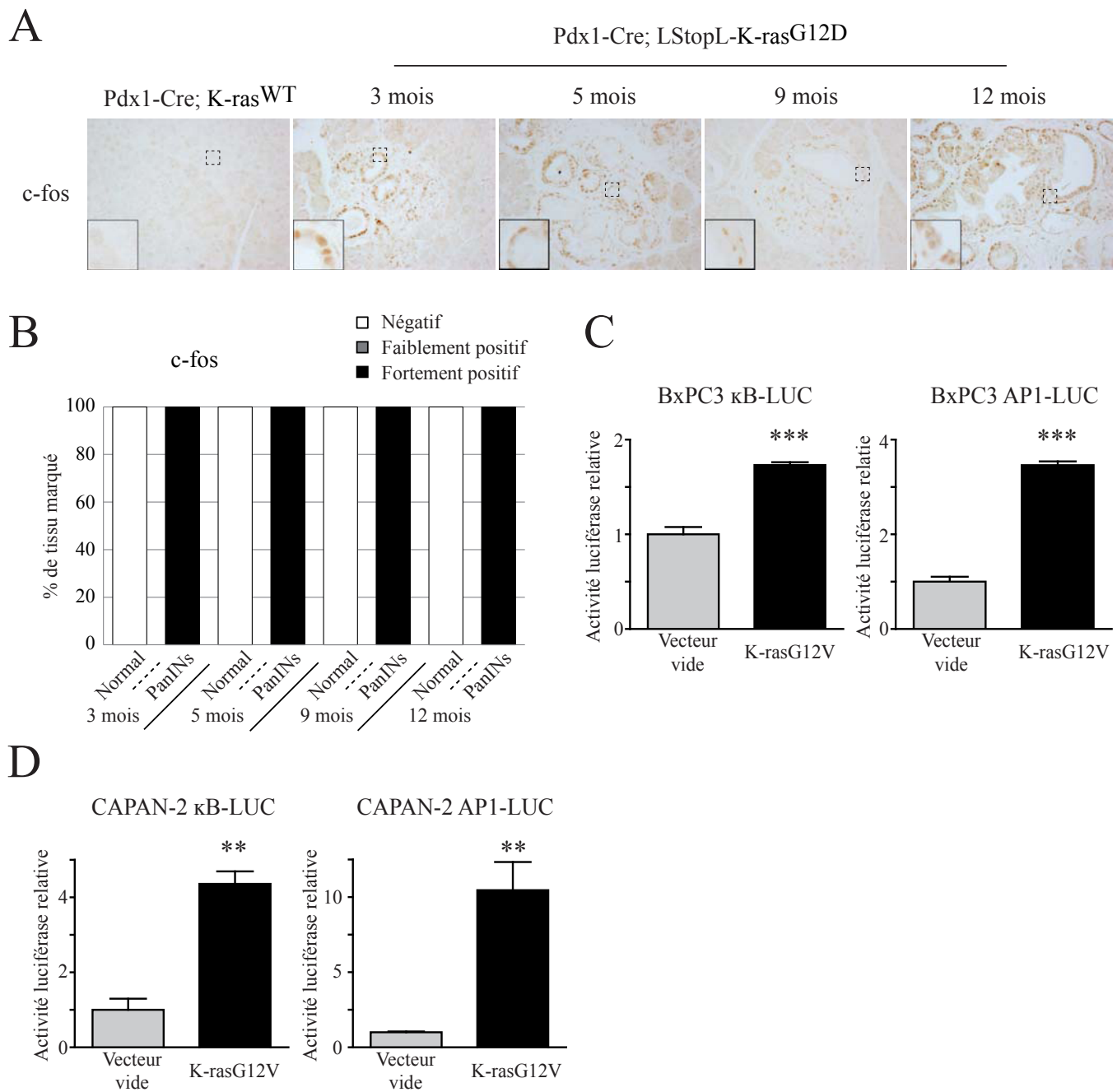


Figure 31 : **Recrutement des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB induit par K-ras muté.** (A) Expression de c-fos analysée par immunohistochimie dans le tissu pancréatique des souris Pdx1-Cre;LStopL-K-rasG12D et des souris contrôles (x200). (B) Quantification du marquage immunohistochimique de c-fos. Activité luciférase relative des vecteurs AP-1-LUC et NF-κB-LUC dans les lignées BxPC3 (C) et CAPAN-2 (D) co-transfectées avec le mutant K-rasG12V.

Ces résultats suggèrent que K-ras muté est capable d'induire l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB dès les stades précoces de la cancérogenèse pancréatique.

B.2 les facteurs AP-1 et NF-κB se fixent sur les promoteurs de MUC4

Pour confirmer l'implication des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB dans la régulation transcriptionnelle de la mucine *MUC4*, nous avons évalué leur fixation sur les promoteurs proximal et distal de *MUC4*. Des immunoprécipitations de chromatine avec les protéines c-fos, c-jun et p65 NF-κB ont été réalisées dans la lignée tumorale CAPAN-2 au niveau des promoteurs proximal et distal de *MUC4* (Figure 30 A). La fixation directe des facteurs de transcription AP-1 (c-fos et c-jun) et NF-κB est observée au niveau de la région proximale -430/-241 contenant des sites de fixation potentiels pour ces facteurs. Au niveau des régions -2711/-2598 et -3615/-3462 du promoteur distal de *MUC4*, la fixation directe du facteur de transcription AP-1 est également observée (Figure 32 A). Ce résultat a été confirmé au niveau des régions -430/-241 et -2711/-2598 dans la lignée BxPC3 (Figure 32 A).

Ces résultats suggèrent que les facteurs de transcription AP-1 et NF-κB peuvent se fixer directement sur les promoteurs de *MUC4*.

Pour confirmer la fixation de ces facteurs de transcription en réponse à la signalisation induite par le mutant K-ras^{G12V}, des immunoprécipitations de chromatine ont été réalisées dans la lignée CAPAN-2 cultivée dans un milieu sans sérum (pour dépriver en facteurs de croissance pouvant activer le K-ras^{WT} et les voies de signalisation) après transfection d'un vecteur codant le mutant K-ras^{G12V} ou d'un vecteur contrôle. Au niveau de la région -430/-241 du promoteur proximal de *MUC4*, la fixation de c-fos, c-jun et p65 NF-κB est observé dans les cellules transfectées par le mutant constitutivement actif alors qu'aucune fixation n'est observée dans les cellules contrôles (Figure 32 B).

Cet enrichissement de fixation des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB sur les promoteurs de *MUC4* a été quantifié par analyse qPCR au niveau des régions du promoteur distal -3587/-3476, -3400/-3274 et -3045/-2943 et au niveau des régions proximales -427/-304 et -196/-105 contenant des sites de fixation potentiels pour ces facteurs (Perrais, M. *et al.*, 2001). Un enrichissement de la fixation de c-fos et p65 NF-κB est observé en réponse à l'activité du K-ras^{G12V} dans la région proximale -196/-105 alors qu'aucun enrichissement n'est mesuré dans la région -427/-304. Au niveau des régions du promoteur distal -3587/-

Figure 32 manuscrit Romain VASSEUR

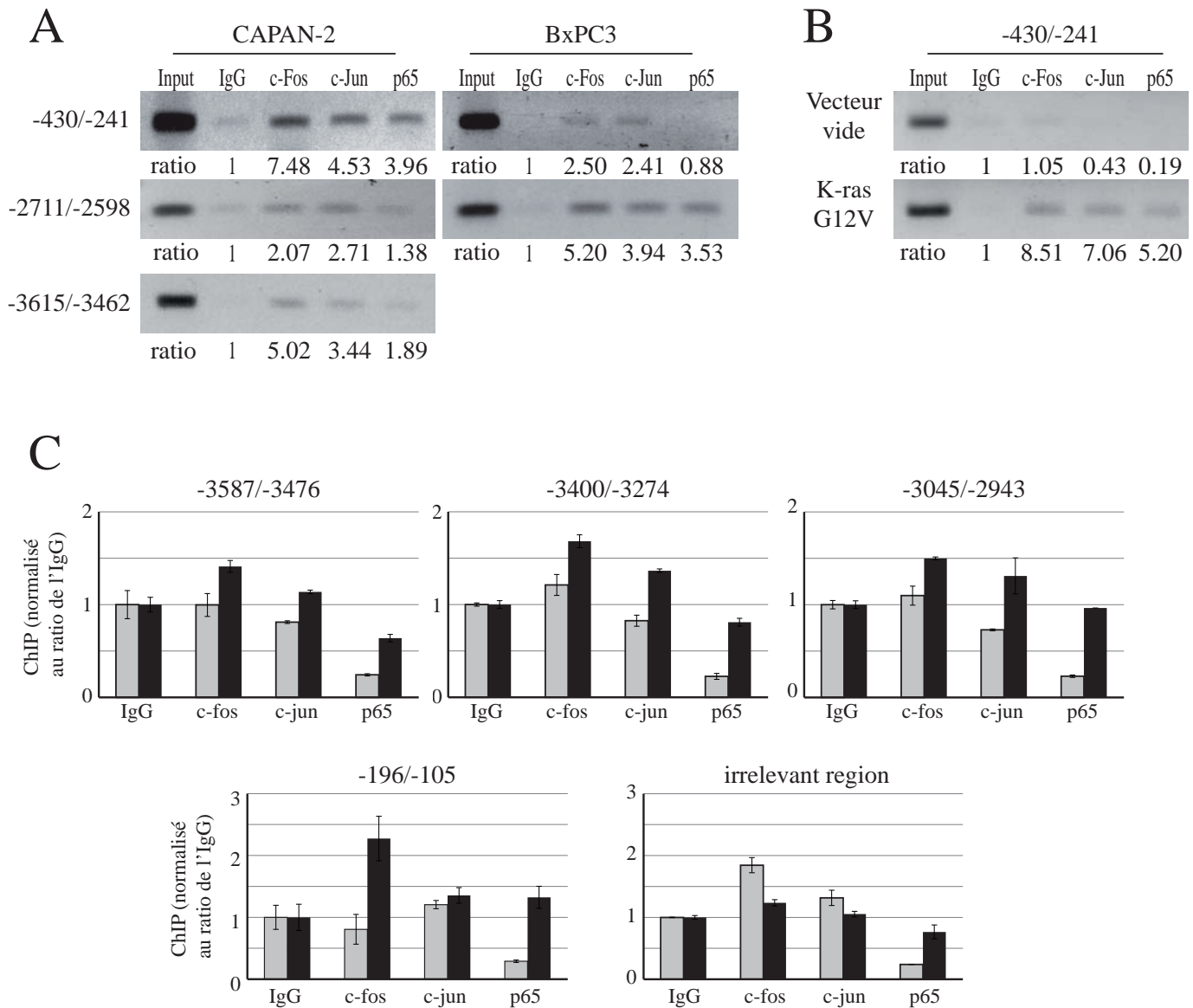


Figure 32 : **Fixation des facteurs de transcription c-fos, c-jun et NF- κ B sur les promoteurs de MUC4.** (A) Analyse de la fixation des facteurs c-fos, c-jun et NF- κ B sur la région proximale -430/-241 et les régions distales -2711/-2598 et -3615/-3462 des promoteurs de MUC4 par immunoprécipitation de chromatine (ChIP) dans les lignées CAPAN-2 et BxPC3. (B) Analyse de leur fixation après transfection par le mutant K-rasG12V dans la lignée CAPAN-2 déprivée en sérum. (C) Quantification de l'enrichissement par qPCR dans différentes régions proximales et distales des promoteurs de MUC4. L'enrichissement est normalisé par rapport à l'INPUT et exprimé en tant que ratio de l'IgG. L'amplification d'une région irrelevante localisée dans l'intron 6 et l'exon 7 du gène de MUC4 a été utilisée comme contrôle négatif.

3476, -3400/-3274 et -3045/-2943, un enrichissement de fixation de c-fos et c-jun est observé mais pas de p65 NF- κ B (Figure 32 C). Aucun enrichissement de fixation n'est mesuré au niveau d'une région irrelevante au niveau des introns 6 et 7 du gène de *MUC4* (Figure 32 C).

Ensembles, ces résultats démontrent la fixation directe au niveau des promoteurs proximal et distal de *MUC4* par les facteurs de transcription AP-1 (composé de c-fos et c-jun) et NF- κ B en réponse à l'activité du mutant K-ras^{G12V} au cours de la cancérogenèse pancréatique.

IV. Implication de la voie RalB dans la régulation de MUC4

A. Surexpression *in vivo* des Ral GTPases

Ces dernières années, l'importance de la voie des Ral GTPases a émergée dans les capacités de transformation des cellules humaines par l'oncogène K-ras (Seguin, L. *et al.*, 2014; Shao, H. and Andres, D. A., 2000). En particulier, son importance a également été démontrée dans les propriétés des cellules tumorales pancréatiques (Lim, K. *et al.*, 2006). Nous avons donc émis l'hypothèse que la voie des Ral GTPases soit également impliquée dans l'expression de MUC4.

A.1 RalB est surexprimée dans les tumeurs humaines

L'expression des RalA et RalB GTPases a été évaluée *in silico* par l'analyse de deux bases de données génomiques issues d'étude comparative entre des échantillons d'adénocarcinomes pancréatiques humains et le tissu pancréatique non-tumoral adjacent (NCBI *Gene Expression Omnibus*). Cette analyse révèle que les RalA et RalB GTPases sont significativement surexprimées dans les tumeurs pancréatiques par rapport aux tissus sains adjacents (GEO RalA, GSE 16515, $p < 0,0001$ et GSE 28735, $p < 0,0001$; GEO RalB, GSE 16515, $p = 0,0003$ et GSE 28735, $p < 0,0001$) (Figure 33 A).

A.2 Expression des Ral GTPases dans les PanINs

Pour déterminer si la surexpression des Ral GTPases est précoce au cours de la cancérogenèse pancréatique, leur expression a été évaluée par immunohistochimie dans le tissu pancréatique des souris du modèle de cancérogenèse pancréatique et des souris contrôles correspondantes. Une forte expression cytoplasmique des Ral GTPases a été détectée dans les cellules des lésions PanINs (100%) formées dans les souris Pdx1-Cre ;LStopL-K-ras^{G12D} dès

Figure 33 manuscrit Romain VASSEUR

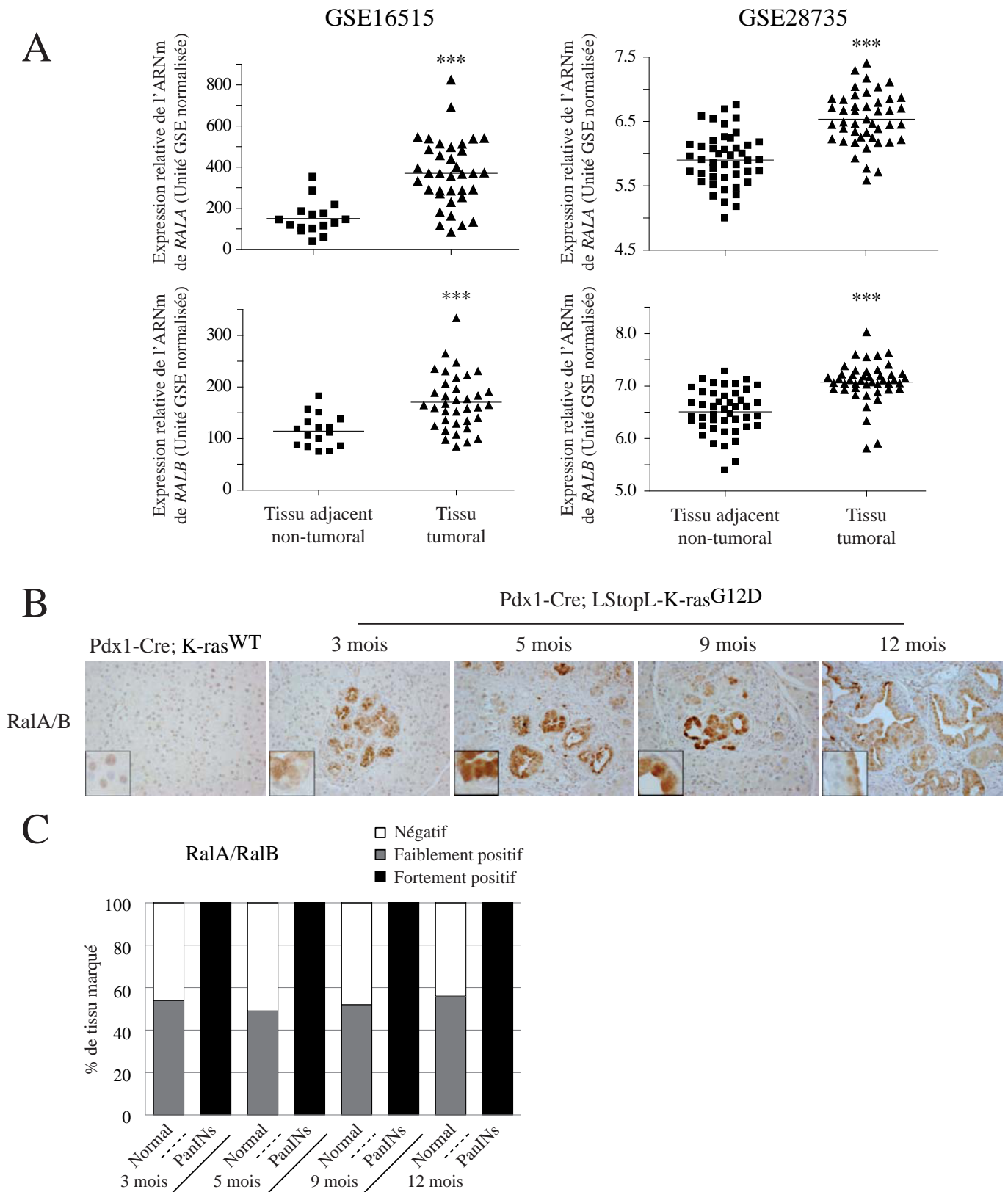


Figure 33 : **Expression des RalGTPases dans le pancréas pré-néoplasique et tumoral.** (A) Expression relative de RalA (en haut) et RalB (en bas) dans les tumeurs comparées au tissu non-tumoral adjacent issu de bases des données génomiques NCBI Gene Expression Omnibus GSE 16515 and GSE 28735. Analyse statistique par *t*-test (***p*<0.001). (B) Expression des RalGTPases analysée par immunohistochimie dans le tissu pancréatique des souris Pdx1-Cre;LStopL-K-ras^{G12D} et des souris contrôles (x200). (C) Quantification du marquage immunohistochimie des RalGTPases.

l'âge de 3 mois et se maintient dans les souris plus âgées alors que seul un faible marquage nucléaire ponctuel est détecté dans le tissu exocrine environnant ou dans le tissu exocrine des souris contrôles Pdx1-Cre ;K-ras^{WT} quel que soit leurs âges (49-56% selon l'âge) (Figure 33 B et C).

Ces résultats suggèrent que les Ral GTPases sont surexprimées dans les étapes précoces de la cancérogenèse pancréatique et que cette surexpression perdure dans le temps.

B. Implication de la RalB dans l'expression de la mucine MUC4

Pour étudier l'implication des Ral GTPases dans la régulation de l'expression de MUC4, l'inhibition par ARN interférent de l'expression de RalA et de RalB a été réalisée dans les lignées tumorales pancréatiques CAPAN-2 (Figure 34 B). L'analyse par Western Blot révèle que l'expression de la mucine MUC4 diminue suite à l'inhibition de RalB, mais n'est pas altérée suite à l'inhibition de la RalA GTPases dans la lignée CAPAN-2 (K-ras^{G12V}) (Figure 34 A). Toutefois, l'analyse de l'expression de MUC4 par qPCR révèle que l'inhibition de la RalA, de la RalB ou des deux conjointement n'affecte pas de façon significative l'expression de l'ARN messager de MUC4 (Figure 34 C).

Ces résultats suggèrent que la RalB GTPase est impliquée dans l'expression de MUC4 par K-ras et que cette régulation serait post-transcriptionnelle.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux montrent que l'oncogène K-ras régule l'expression de la mucine MUC4 au cours de la cancérogenèse pancréatique. Cette régulation fait intervenir au niveau transcriptionnel l'activation et le recrutement sur les promoteurs de *MUC4* des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB *via* l'activation précoce des voies p42/44 MAPK et NF-κB et au niveau post-transcriptionnel l'activation de la voie RalB.

Figure 34 manuscrit Romain VASSEUR

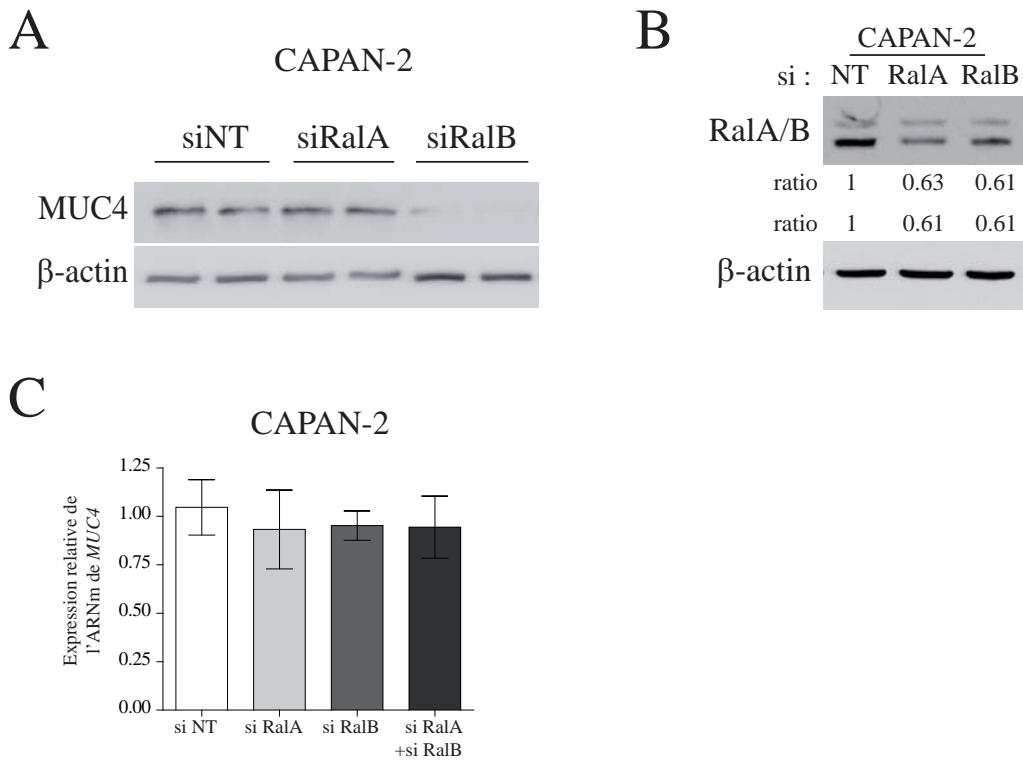


Figure 34 : **Implication de RalB dans l'expression de MUC4.** (A) Expression de la mucine MUC4 par Western blot dans la lignée tumorale CAPAN-2 après inhibition par ARN interférents de l'expression de RalaA et RalB. (B) Expression des Ral GTPases après inhibition par ARN interférent. (C) Analyse par qRT-PCR de l'expression de MUC4 après l'inhibition de RalaA et RalB.

L'ensemble de ces données ont permis la publication d'un article originale dans le journal *BBA - Gene and Regulatory Mechanisms* sous le titre de : **“The mucin MUC4 is a transcriptional and post-transcriptional target of K-ras oncogene in pancreatic cancer. Implication of MAPK/AP-1, NF-κB and RalB signalling pathways”**. Vasseur R., Skrypek N., Duchêne B., Renaud F., Martínez-Maqueda D., Vincent A., Porchet N., Van Seuning I., Jonckheere N. DOI : 10.1016/j.bbagr.2015.10.014. (Voir annexe 1).

PARTIE 2:
**ROLE DU COMPLEXE MUC4-ERBB2 DANS LA
CANCEROGENESE PANCREATIQUE**

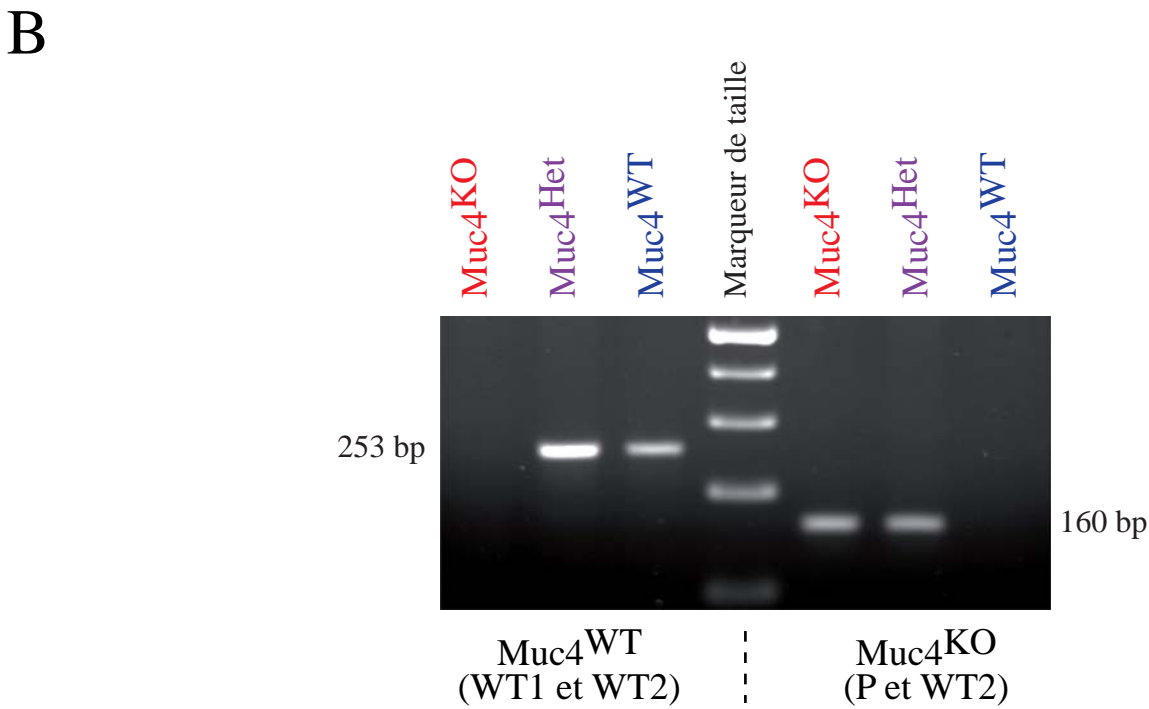
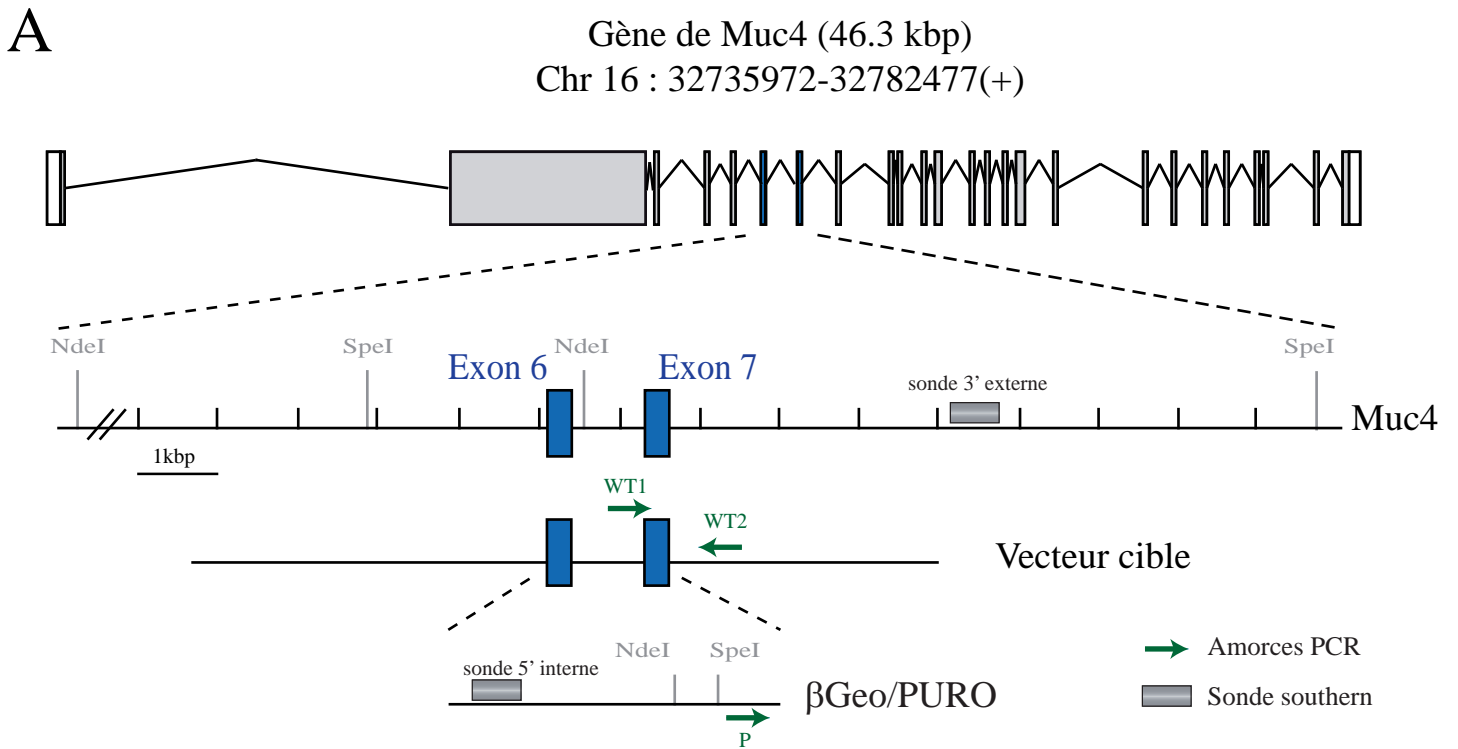


Figure 35 : **Modèle murin Muc4 déficient.** (A) Représentation schématique du remplacement par une cassette β Geo des exons 6 et 7 du gène murin de Muc4 par recombinaison homologue. (B) Détection de l'allèle non-recombiné (WT) et de l'allèle recombinée permettant d'en déduire le génotype. WT: wild-type, Het : hétérozygote, KO : knock-out.

I. Le modèle murin $Muc4^{KO}$

A. Mise en place du modèle $Muc4^{KO}$

Afin d'analyser l'implication de la mucine MUC4 *in vivo*, le modèle murin transgénique $Muc4$ déficient a été établi sur notre demande par la société américaine *Texas Institute Genomic Medicine* (TIGM, Houston, Etats-Unis). Le gène de $Muc4$ se compose de 25 exons répartis sur une séquence génomique d'environ 50 kbp (variable selon la taille du VNTR) (Desseyne, J.-L. *et al.*, 2008; Escande, F. *et al.*, 2002). Pour établir ce modèle, les exons 6 et 7 du gène de $Muc4$ ont été remplacés par une cassette β Geo (séquence contenant le gène de la β -galactosidase et un gène de résistance à la puromycine), par recombinaison homologue (Figure 35 A). Cette recombinaison entraîne l'interruption du gène de $Muc4$ et la perte de son expression. Le modèle est ensuite croisé et maintenu dans un fond génétique C57Bl/6.

Les souris (C57Bl/6) hétérozygotes, contenant la recombinaison ($Muc4^{\beta Geo}/Muc4^{WT}$), ont ensuite été croisées afin de générer des souris $Muc4^{WT}$ ($Muc4^{WT}/Muc4^{WT}$), $Muc4$ hétérozygotes ($Muc4^{Het} = Muc4^{\beta Geo}/Muc4^{WT}$) et $Muc4^{KO}$ ($Muc4^{\beta Geo}/Muc4^{\beta Geo}$). L'ensemble des souris est suivi pour s'assurer de leur état de santé. Leur génotype a été déterminé par PCR au moment du sevrage à partir d'ADN génomique isolé d'un petit fragment de la queue. Les amorces WT1 et WT2 permettent d'amplifier l'allèle $Muc4^{WT}$ en produisant un amplicon de 253 bp (détectable chez les souris $Muc4^{WT}$ et $Muc4^{Het}$). Les amorces P et WT2 permettent d'amplifier l'allèle contenant la cassette recombinée $Muc4^{\beta Geo}$ en produisant un amplicon de 160 bp (détectable chez les souris $Muc4^{Het}$ et $Muc4^{KO}$) (Figure 35 B).

B. Caractérisation du modèle $Muc4^{KO}$

Nous avons entrepris la caractérisation phénotypique de ce modèle $Muc4^{KO}$. Macroscopiquement, les souris $Muc4^{KO}$ adultes sont identiques aux souris $Muc4^{WT}$. Elles ne présentent aucune altération morphologique extérieure ou des organes internes, ni d'altérations significatives de taille et de poids moyen ($p = 0,258$) (Figure 36 A et B). De plus, le suivi journalier pendant les 60 premiers jours de vie n'a pas mis en évidence de différence de croissance significative entre les souris $Muc4^{WT}$, $Muc4^{Het}$ et $Muc4^{KO}$ (Figure 36 C).

Pour valider ce modèle, l'expression de $Muc4$ a été évaluée au niveau protéique par immunohistochimie (IHC) et au niveau ARN messager dans les tissus des souris $Muc4^{WT}$ et des souris $Muc4^{KO}$ (Figure 37 A et B). Comme attendu (Buisine, M.-P. *et al.*, 2000a;

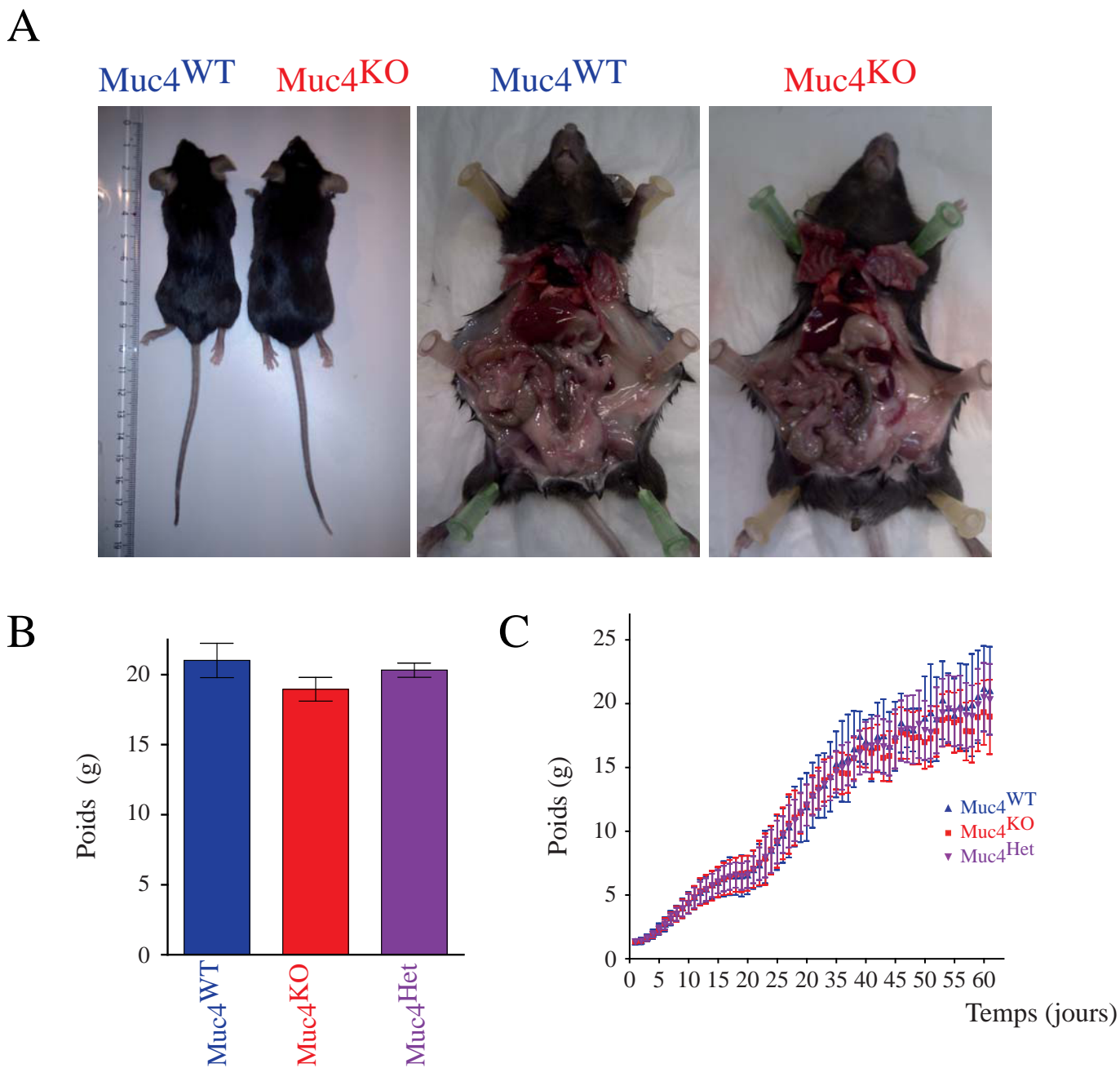


Figure 36 : **Caractérisation phénotypique du modèle Muc4 déficient.** (A) Photographie illustrant le phénotype et l'anatomie des souris Muc4^{WT} et Muc4^{KO}. (B) Poids des souris Muc4^{WT}, Muc4^{Het} et Muc4^{KO} à l'âge adulte (2 mois). (C) Courbe de poids des souris en fonction du génotype au cours des 60 premiers jours de vie. Analyse de $n \geq 7$ Muc4^{WT}, $n \geq 30$ Muc4^{Het} et $n \geq 10$ Muc4^{KO}.

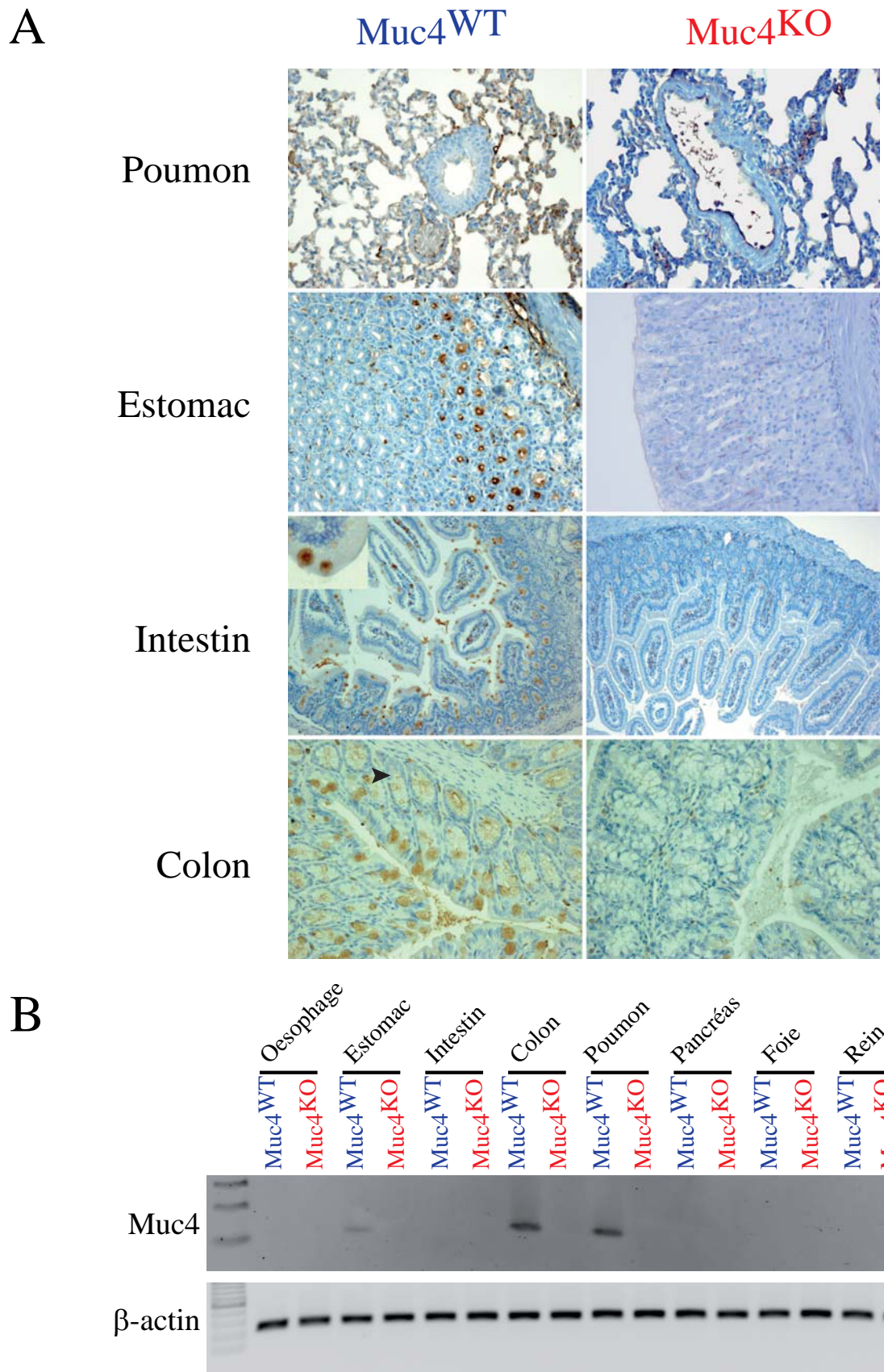


Figure 37 : Analyse de la délétion de la mucine Muc4 dans le modèle Muc4KO. (A) Analyse par immunohistochimie de l'expression de Muc4 dans le poumon, l'estomac, l'intestin et le colon des souris Muc4KO et Muc4WT (x200). (B) Analyse par RT-PCR de l'expression de Muc4 dans différents tissu.

Figure 38 manuscrit Romain VASSEUR

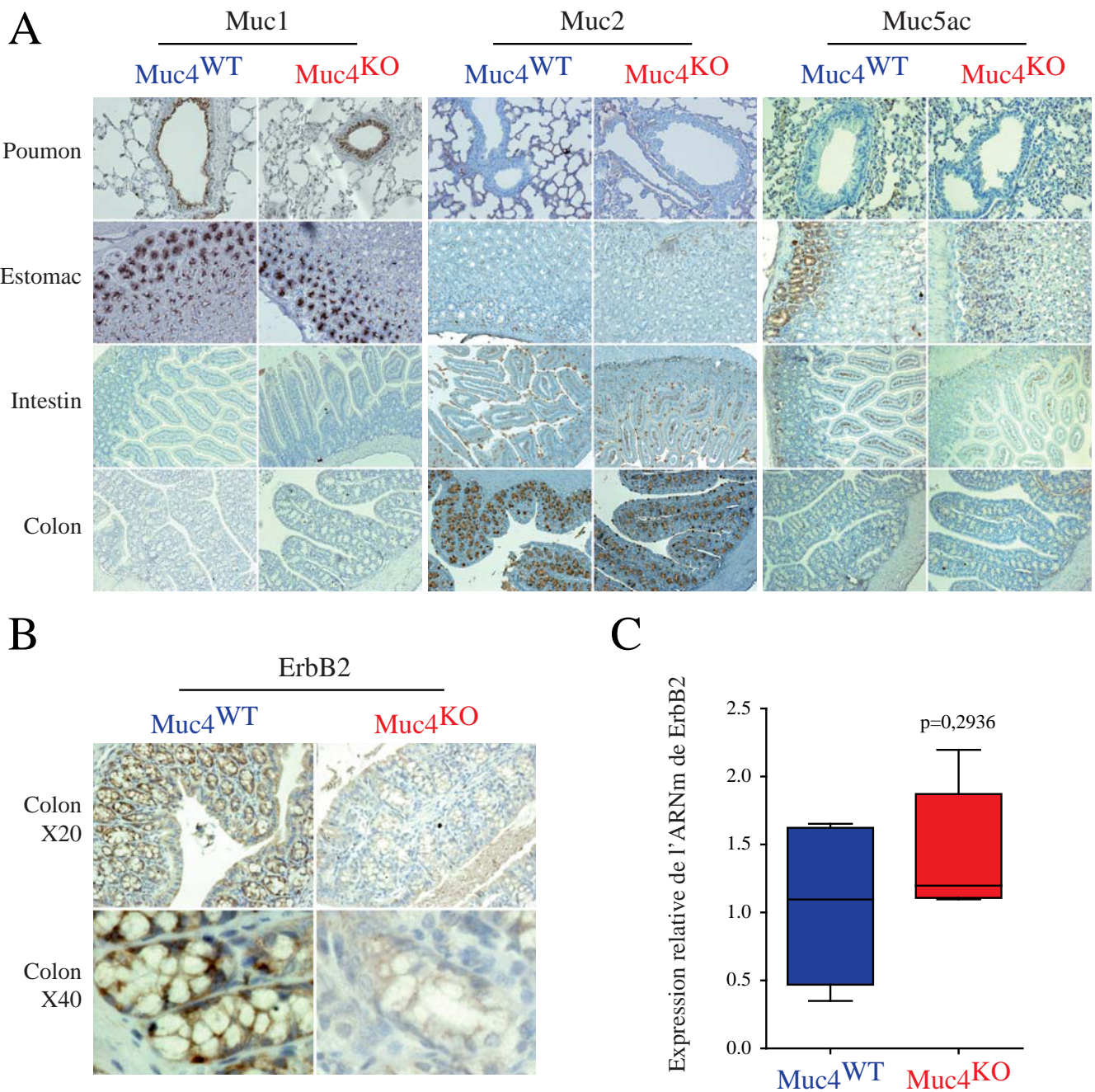


Figure 38 : **Expression des mucines Muc1, Muc2 et Muc5ac et du récepteur ErbB2 dans le modèle Muc4KO.** (A) Analyse par immunohistochimie (IHC) de l'expression des mucines Muc1, Muc2 et Muc5ac dans le poumon, l'estomac, l'intestin et le colon des souris Muc4KO et Muc4WT (x200). Analyse par IHC (B) et par PCR (C) de l'expression du récepteur ErbB2 dans le tissu colique des souris Muc4KO et Muc4WT (6 souris/groupe).

Jonckheere, N. and Van Seuning, I., 2010), l'expression de Muc4 dans les souris Muc4^{WT} a été détectée dans les alvéoles pulmonaires mais pas dans les bronchioles. Dans l'estomac, son expression est retrouvée principalement dans les glandes à proximité du muscle lisse dans la partie basse (corps et antra) mais est absente dans la partie supérieure (fundus). Dans l'intestin, la mucine Muc4 est exprimée au pôle apical des cellules des cryptes ainsi que par les cellules caliciformes ; enfin, dans le colon, une forte expression apicale et cytoplasmique de Muc4 est également détectée dans les cellules des cryptes,

L'analyse par RT-PCR confirme que dans le modèle Muc4^{KO}, l'inactivation de Muc4 entraîne bien la perte de l'expression de son ARN messager dans les poumons, l'estomac, l'intestin et le colon (Figure 37 B).

Chez les souris du modèle Muc4^{KO}, l'analyse histologique de ces différents tissus exprimant la mucine Muc4 n'a révélé aucune anomalie détectable dans leur structure et leur organisation (chez l'adulte ou l'embryon à e18.5). De même, le pancréas de ces souris se développe et se forme normalement. Aucune altération n'a été mise en évidence dans l'organisation des cellules endocrines (îlots de Langerhans) et des cellules exocrines (acinis et canaux) du tissu pancréatique. Une potentielle compensation par l'altération de l'expression d'autres mucines dans le modèle MUC4^{KO} a été envisagée. Toutefois, dans les différents tissus testés de ce modèle, la perte de Muc4 n'a pas entraîné d'altération de l'expression des principales mucines Muc1, Muc2 et Muc5ac (Figure 38 A)

Précédemment, nos travaux ont mis en évidence que la perte de MUC4 *in vitro* induit une forte diminution de l'expression de son partenaire membranaire ErbB2 (Jonckheere, N. *et al.*, 2012). L'expression du récepteur ErbB2 a donc été évaluée par immunohistochimie et RT-qPCR dans les tissus du modèle murin Muc4^{KO} et des souris contrôles Muc4^{WT}. L'expression du récepteur ErbB2 dans les tissus des souris Muc4^{WT} n'est détectée que dans le colon qui présente une forte expression membranaire à la surface des cellules des cryptes (Figure 38 B). Dans le colon des souris Muc4^{KO}, l'expression du récepteur ErbB2 détectée par immunohistochimie est fortement diminuée alors qu'au niveau de l'expression de son ARNm aucune différence significative n'est détectée (Figure 38 C).

Ces résultats suggèrent que la perte d'expression de la mucine Muc4 entraîne la perte de l'expression de son partenaire ErbB2 par un mécanisme post-transcriptionnel.

Figure 39 manuscrit Romain VASSEUR

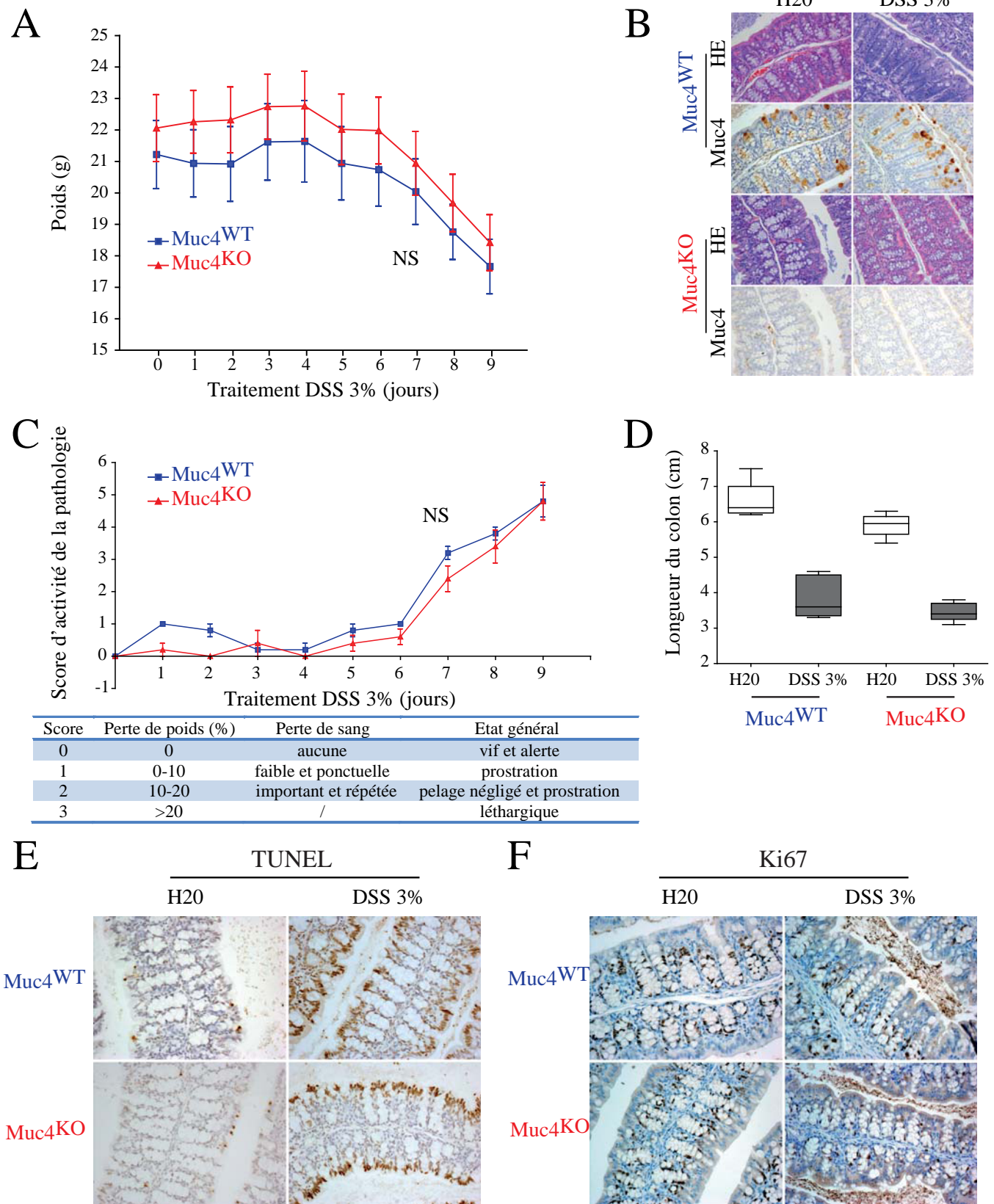


Figure 39 : Réponse du modèle *Muc4KO* à une colite inflammatoire induite par le DSS. (A) Evolution du poids des souris *Muc4KO* et *Muc4WT* soumis au DSS 3% (p/v) (6 souris/génotype/groupe). (B) Analyse de l'expression de *Muc4* par IHC dans le tissu colique après traitement au DSS 3% (p/v) (x200). (C) Evolution du score de pathologie induite par le DSS selon le génotype. (D) Mesure de la longueur du colon. (E) Détection des cellules apoptotiques dans le colon par test TUNEL. (F) Analyse par IHC du Ki67 dans le colon des souris après traitement au DSS.

Ensemble, ces résultats préliminaires suggèrent que le modèle murin Muc4 déficient est viable et ne présente pas de phénotype majeur en absence de pathologie induite.

C. Réponse du modèle au stress et à l'inflammation

Le potentiel rôle protecteur de cette mucine dans les pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin a été évalué comme cela a été le cas pour d'autres mucines telles que Muc1, Muc2 et Muc13 (Petersson, J. *et al.*, 2011; Sheng, Y. H. *et al.*, 2011; Van der Sluis, M. *et al.*, 2006). Une colite inflammatoire est induite chez les souris du modèle Muc4^{KO} et les souris contrôles Muc4^{WT} par ajout dans l'eau de boisson de sulfate de dextran (DSS) 3% (p/v) sur une période de 9 jours. La vitesse d'apparition de la colite, la perte de poids engendrée par la colite, le saignement produit par l'endommagement de l'épithélium et l'état général des souris (prostration, toilette, déplacement) ont été évalués afin d'établir un score de la pathologie. Une diminution du poids des souris à partir du 5^{ème} jour de traitement au DSS est observée dans les deux groupes de souris, sans toutefois observer de différence induite par la perte de la mucine Muc4 (Figure 39 A et B). Le traitement induit également une augmentation du score de la pathologie et une diminution de la longueur du colon, sans différence significative entre les souris Muc4^{WT} et les souris Muc4^{KO} (Figure 39 C et D).

Ces résultats suggèrent que la mucine Muc4 n'est pas impliquée dans la protection des épithéliums contre les colites inflammatoires.

Afin de déterminer si la perte de la mucine Muc4 sensibilise les cellules à l'apoptose, celle-ci a été évaluée dans le tissu colique par un test TUNEL. Sans traitement, seul un faible nombre de cellules apoptotiques est détecté dans les cryptes de l'épithélium colique des souris sans différence significative entre les souris Muc4^{WT} et des souris Muc4^{KO} (Figure 39 E).

De même, l'impact de la perte de la mucine Muc4 sur la prolifération des cellules épithéliales intestinales et coliques a été étudié. Le marquage immunohistochimique du Ki67 des tissus intestinaux et coliques ne révèle aucune différence significative entre les souris Muc4^{WT} et Muc4^{KO}. Suite au traitement avec le DSS, aucune variation n'est observée dans les souris Muc4^{WT}. A l'inverse, une diminution du marquage Ki67 est observée dans les souris Muc4^{KO} soumis à un traitement au DSS par rapport aux souris contrôles (21,1 % contre 39,3 % pour les Muc4^{WT}) (Figure 39 F).

Ces résultats suggèrent que la perte de la mucine Muc4 n'altère pas l'apoptose ni la prolifération des cellules épithéliales chez des souris saines. Toutefois, en cas de colite

Figure 40 manuscrit Romain VASSEUR

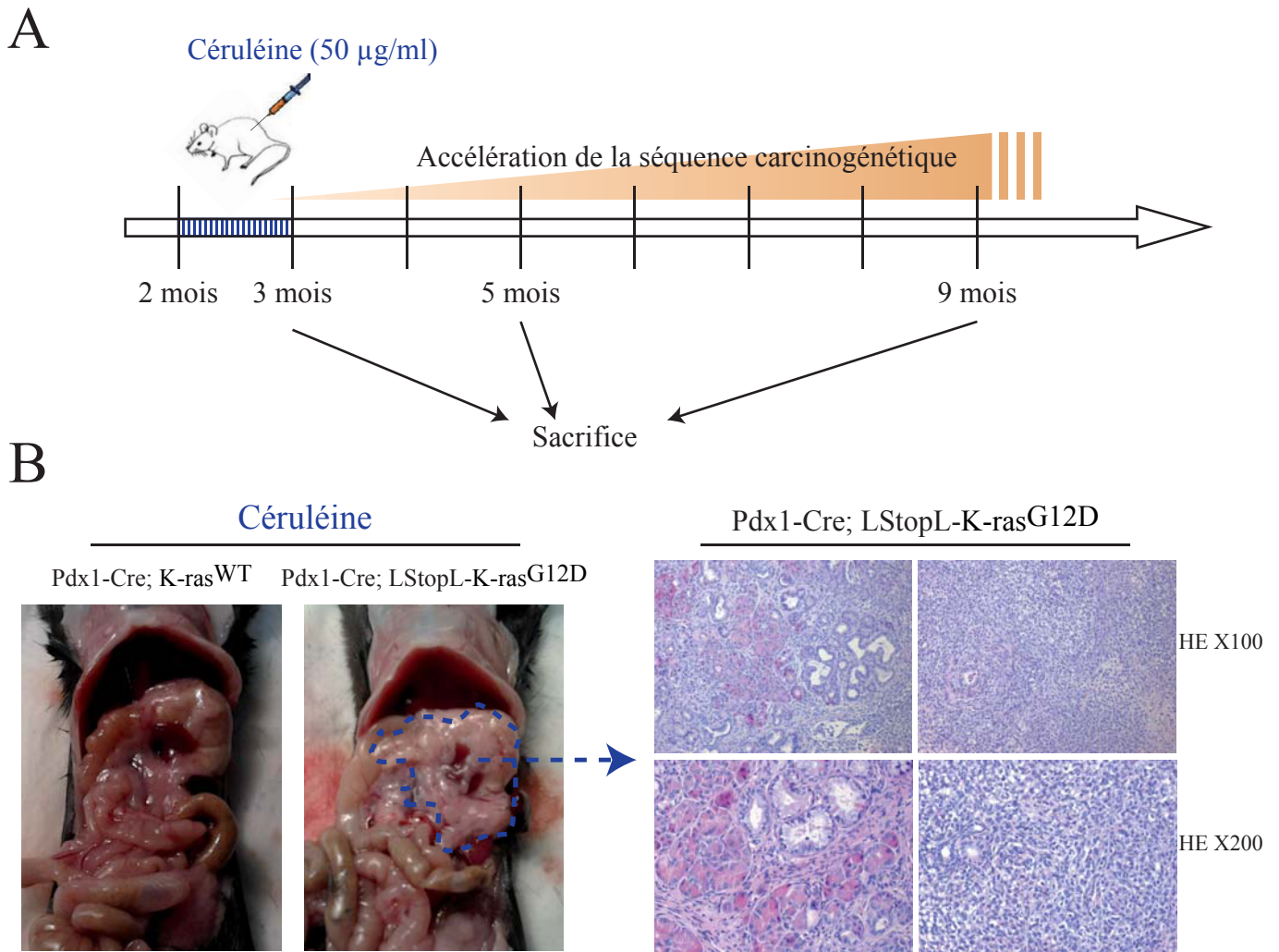


Figure 40 : **Traitement à la Céroléine dans le modèle de cancérogenèse pancréatique.** (A) Représentation schématique du traitement à la Céroléine (5 injections / semaine) chez les souris Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} (3 souris/groupe/période avant sacrifice). (B) Observations macroscopiques et histologiques (coloration HE) du tissu pancréatique des souris injectées à la Céroléine.

inflammatoire, la perte de la mucine Muc4 réduit la prolifération des cellules épithéliales.

II. Traitement à la Céruléine et à la Deltarasine

A. Inflammation pancréatique

Au cours de nos travaux, nous avons souhaité mettre en place l'analyse *in vivo* des capacités métastatiques des cellules tumorales pancréatiques, en présence ou en absence de la mucine MUC4. Toutefois, le modèle murin de cancérogenèse pancréatique Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D}, disponible au laboratoire, développe en majorité les stades précurseurs n'évoluant que très rarement vers un stade métastatique (Hingorani, S. R. *et al.*, 2003).

Afin d'induire la formation de métastase, une stratégie permettant l'accélération de la séquence carcinogénétique chez ce modèle murin a été développée selon le modèle établi par Guerra (Guerra, C. *et al.*, 2007). Pour induire cette évolution, l'induction d'une pancréatite chronique est réalisée dans le modèle Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} et les souris contrôles. En effet, des injections intra-péritonéales répétées de **Céruléine**, un analogue de la cholécystokinine, permettent de reproduire une pancréatite chronique conduisant, dans le contexte des souris Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D}, à la formation de 100 % de tumeurs métastatiques à l'âge de 8 mois (Guerra, C. *et al.*, 2007; Gukovskaya, A. S. *et al.*, 2002) (Figure 40 A).

Pour ce protocole, nous avons réalisé des injections intra-péritonéales à raison de 5 injections par semaine de 0,1 ml de solution saline contenant 50 µg/ml de Céruléine. Les injections ont été réalisées pendant 1 mois à partir de l'âge de 2 mois. Les souris ont ensuite été sacrifiées à 3, 5 et 9 mois. Morphologiquement, les souris Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} injectées présentent un pancréas légèrement hypertrophié et granuleux avec des régions de PanINs caractéristiques du modèle et des régions sans structure identifiable (Figure 40 B).

Ces résultats préliminaires suggèrent que l'induction d'une pancréatite chronique permet bien d'accélérer l'apparition et le développement des PanINs.

B. Traitement à la Deltarasine

Les stratégies de ciblage de l'oncogène K-ras sont un enjeu majeur de la recherche contre le cancer et en particulier contre celui du pancréas. Bien que non utilisable en clinique

Figure 41 manuscrit Romain VASSEUR

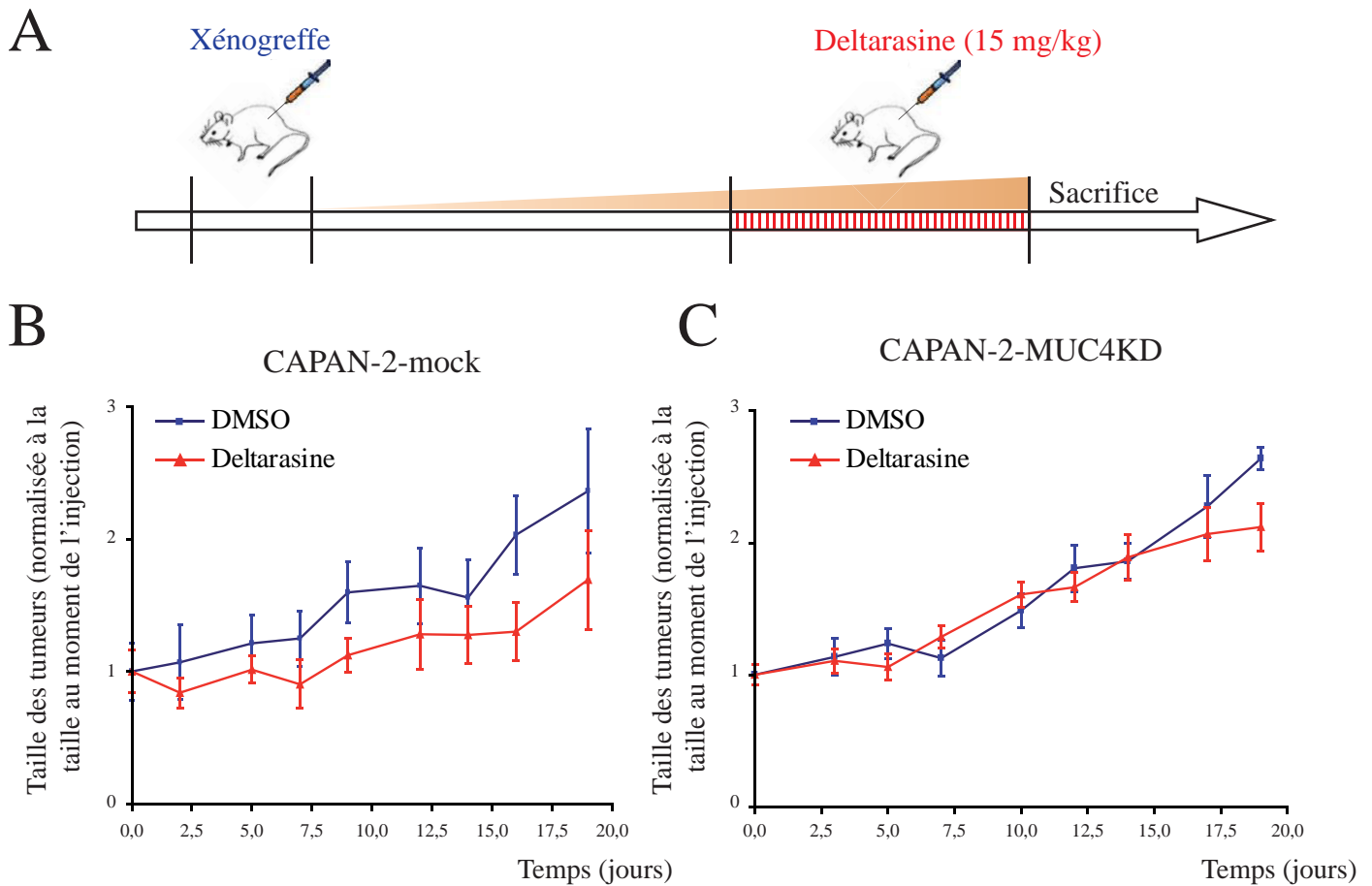


Figure 41 : *Impact de l'invalidation de la mucine MUC4 dans la réponse à la Deltarasine.* (A) Représentation schématique du traitement à la Deltarasine chez des souris SCID xéno greffées avec des cellules CAPAN-2 MUC4KD ou leur contrôles CAPAN-2 mock. (B) Evolution de la taille relative des xéno greffes contrôles (mock) après traitement à la Deltarasine. (C) Evolution de la taille relative des xéno greffes MUC4 invalidées (MUC4KD) après traitement à la Deltarasine

actuellement, la plus prometteuse de ces stratégies disponibles est la Deltarasine, un inhibiteur de la PDE6 δ , qui permet l'inhibition de l'adressage membranaire de l'oncogène K-ras (Spiegel, J. *et al.*, 2014; Zimmermann, G. *et al.*, 2013).

Nous avons évalué l'impact de la perte de MUC4 sur la réponse à ce traitement à la Deltarasine. Pour cela, une première mise au point de ce traitement a été réalisée. Des xénogreffes de cellules tumorales pancréatiques humaines CAPAN-2 dont l'expression de la mucine MUC4 est invalidée par *short-hairpin RNA (shRNA)* (CAPAN-2-MUC4KD) ou leur contrôle (CAPAN-2-mock) ont été réalisées dans le flanc de souris SCID (2×10^6 cellules/souris). Comme attendu, les souris xénogreffées CAPAN-2-MUC4KD développent des tumeurs avec une latence plus importante que celles xénogreffées CAPAN-2-mock (Jonckheere, N. *et al.*, 2012). A taille de tumeur équivalente (500 mm^3), un premier traitement par injections intra-péritonéales de 0,1 ml d'une solution saline contenant 15 mg/kg de Deltarasine a été réalisé pendant 3 semaines avec 3 injections par semaine (Figure 41 A). Au terme de ce traitement, les souris ont été sacrifiées, les tumeurs ont été récupérées et analysées (6souris/groupe).

L'analyse de la taille des tumeurs révèle que le traitement à la Deltarasine réduit la croissance des xénogreffes CAPAN-2-mock (Figure 41 B). A l'inverse, le traitement ne semble pas diminuer la croissance des xénogreffes CAPAN-2-MUC4KD (Figure 41 C). Toutefois, au cours de cette expérience, nous avons constaté, dans les deux groupes, une forte toxicité du traitement qui a provoqué une perte de poids importante (15-20 %), des douleurs abdominales sévères et ce qui ressemble à une fibrose tissulaire de toute la cavité péritonéale.

Ces résultats suggèrent que la mucine MUC4 pourrait être impliquée dans la sensibilité des cellules tumorales aux traitements ciblant l'oncogène K-ras. Toutefois, d'autres études complémentaires sont nécessaires pour pallier à la forte toxicité de ces traitements.

III. Croisement des modèles transgéniques

Pour étudier le rôle de la mucine Muc4 *in vivo* dans la cancérogénèse pancréatique, le modèle murin Muc4^{KO} est en cours de croisement avec le modèle de cancérogénèse pancréatique. Ce croisement est réalisé en trois étapes sur 2 générations (Figure 42) :

Figure 42 manuscrit Romain VASSEUR

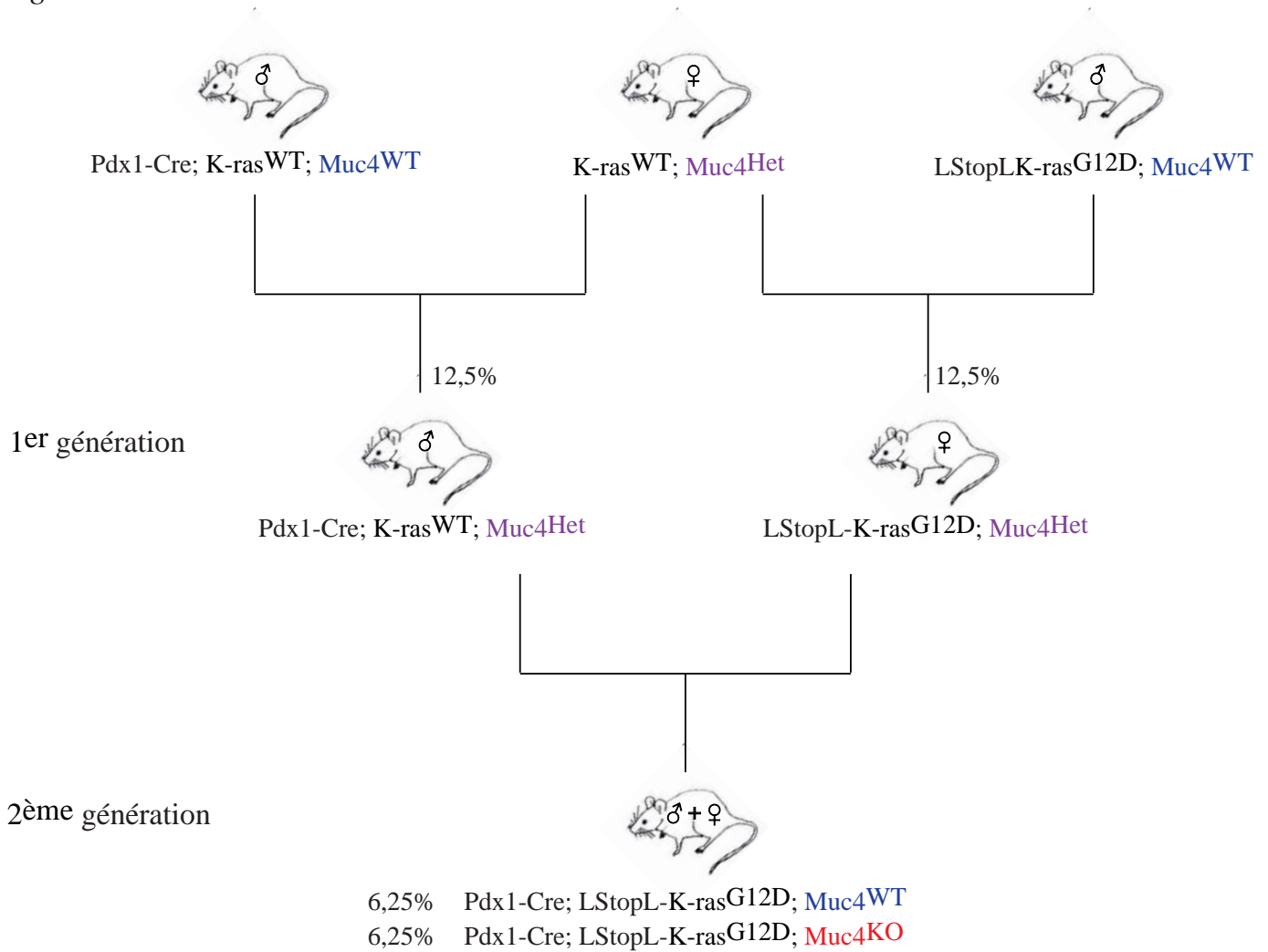


Figure 42 : Croisement des modèles transgéniques. (A) Représentation schématique des croisements permettant de générer le modèle triple transgénique $Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} ; Muc4^{KO}$. Pour chaque croisement, la proportion (en %) de souris du génotype d'intérêt conservé est indiquée.

Un premier croisement est réalisé entre des souris males Pdx1-Cre et des souris femelles Muc4^{Het}. A l'issue de ce croisement, seules les souris males Pdx1-Cre ; Muc4^{Het} sont conservées ce qui ne représente que 12,5 % des souris issues du croisement.

En parallèle, un second croisement est réalisé entre des souris males LStopL-K-ras^{G12D} et des souris femelles Muc4^{Het}. A l'issue de ce croisement, seules les souris femelles LStopL-K-ras^{G12D} ; Muc4^{Het} sont conservées ce qui ne représente que 12,5 % des souris issues du croisement.

Enfin les souris males Pdx1-Cre ; Muc4^{Het} issues du premier croisement sont croisées avec les femelles LStopL-K-ras^{G12D} ; Muc4^{Het} issues du second croisement. Les souris, mâles et femelles confondues, de génotypes Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} ; Muc4^{KO} (représentant 6,25 % des souris générées au cours de ce troisième croisement) et Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} ; Muc4^{WT} (représentant 6,25 % des souris générées) sont conservées pour analyse.

Ce modèle permettra de décrypter le rôle *in vivo* de la mucine Muc4 dans les étapes précoces de la cancérogenèse pancréatique. En raison des rôles de cette mucine mis en évidence *in vitro* dans les propriétés biologiques des cellules tumorales pancréatiques, nous envisageons un ralentissement de la progression et de l'évolution des stades PanINs vers l'adénocarcinome comme observé pour la mucine Muc1 (Besmer, D. M. *et al.*, 2011). De plus, l'implication de la mucine Muc4 sur les capacités métastatiques des tumeurs pancréatiques sera également étudiée. Pour cela, nous réaliserons un traitement à la Céruléine qui permettra d'accélérer la progression des stades néoplasiques et induire la formation de tumeurs métastatiques dans le modèle de cancérogenèse pancréatique déficient pour la mucine Muc4.

IV. Rôle d'ErbB2 dans la chimiorésistance

En parallèle de mes travaux sur la régulation de la mucine MUC4, nous avons étudié l'implication du récepteur oncogénique ErbB2, partenaire membranaire de la mucine MUC4, dans les propriétés de chimiorésistances des cellules tumorales pancréatiques à la Gemcitabine et aux drogues du protocole FOLFIRINOX (Jonckheere, N. *et al.*, 2012; Skrypek, N. *et al.*, 2015).

A. Implication dans la chimiorésistance à la Gemcitabine

Des cellules tumorales pancréatiques CAPAN-2 invalidées par *shRNA* pour le récepteur oncogénique ErbB2 (CAPAN-2-ErbB2KD) et leur contrôle *non-targeting* (CAPAN-2-NT) ont été traitées à la Gemcitabine. Une augmentation de la sensibilité des cellules tumorales pancréatiques traitées à la Gemcitabine est induite suite à l'inhibition stable de l'expression du récepteur ErbB2 par *shRNA* (IC50 ErbB2KD = 11 ±0,8 nM contre IC50 NT = 23.8 ±1,9 nM). Des travaux complémentaires nous ont permis de mettre en évidence que la chimiosensibilité accrue à la Gemcitabine implique la surexpression des *Equilibrative/Concentrative Nucleoside Transporters 1* et *3* (hCNT1 et hCNT3) suite à l'invalidation du récepteur ErbB2. Ces résultats, démontrent donc l'implication du récepteur ErbB2 dans la chimiorésistance à la Gemcitabine.

B. Implication dans la chimiosensibilité au SN-38

De la même manière, la chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques invalidées pour ErbB2 a été évaluée suite aux traitements aux drogues du protocole FOLFIRINOX : 5-FU, SN-38 (métabolite actif de l'irinotecan) et oxaliplatine.

Une augmentation modérée de la chimiorésistance au SN-38 (IC50 ErbB2-KD 1,46 ±0,05 nM contre NT 1,08 ±0,09 nM) est induite par l'invalidation du récepteur ErbB2 alors que la sensibilité au 5-FU (IC50 ErbB2KD = 2,82 ±0,6 µM contre IC50 NT = 2,96 ±0,6 µM) ou à l'oxaliplatine (IC50 ErbB2KD = 2,14 ±0,3 µM contre IC50 NT = 2,4 ±0,3 µM) n'est pas altérée. Des travaux complémentaires ont mis en évidence la surexpression des transporteurs MRP1 (25 fois), MRP2 (68 fois) et ABCG2 (7 fois) dans les cellules invalidées pour le récepteur ErbB2 (Skrypek, N. *et al.*, 2015). Enfin, leur implication dans la chimiorésistance au SN-38 été confirmée par leur invalidation (siARN) qui potentialise l'effet du SN-38 dans les cellules tumorales pancréatiques invalidées pour ErbB2.

C. Etudes in vivo de la chimiosensibilité

Pour poursuivre ces travaux, la confirmation *in vivo* du rôle de l'oncogène ErbB2 sur les capacités de chimiorésistance à la Gemcitabine et de chimiosensibilité au SN-38 a été entreprise. Les cellules tumorales pancréatiques CAPAN-2-ErbB2KD et CAPAN-2-NT ont été xénotreffées (2×10^6 cellules/souris) en sous-cutané dans des souris *Scid* (*Severe combined immunodeficiency*) (6 souris/ groupe). Une fois que les tumeurs se sont formées (tailles

Figure 43 manuscrit Romain VASSEUR

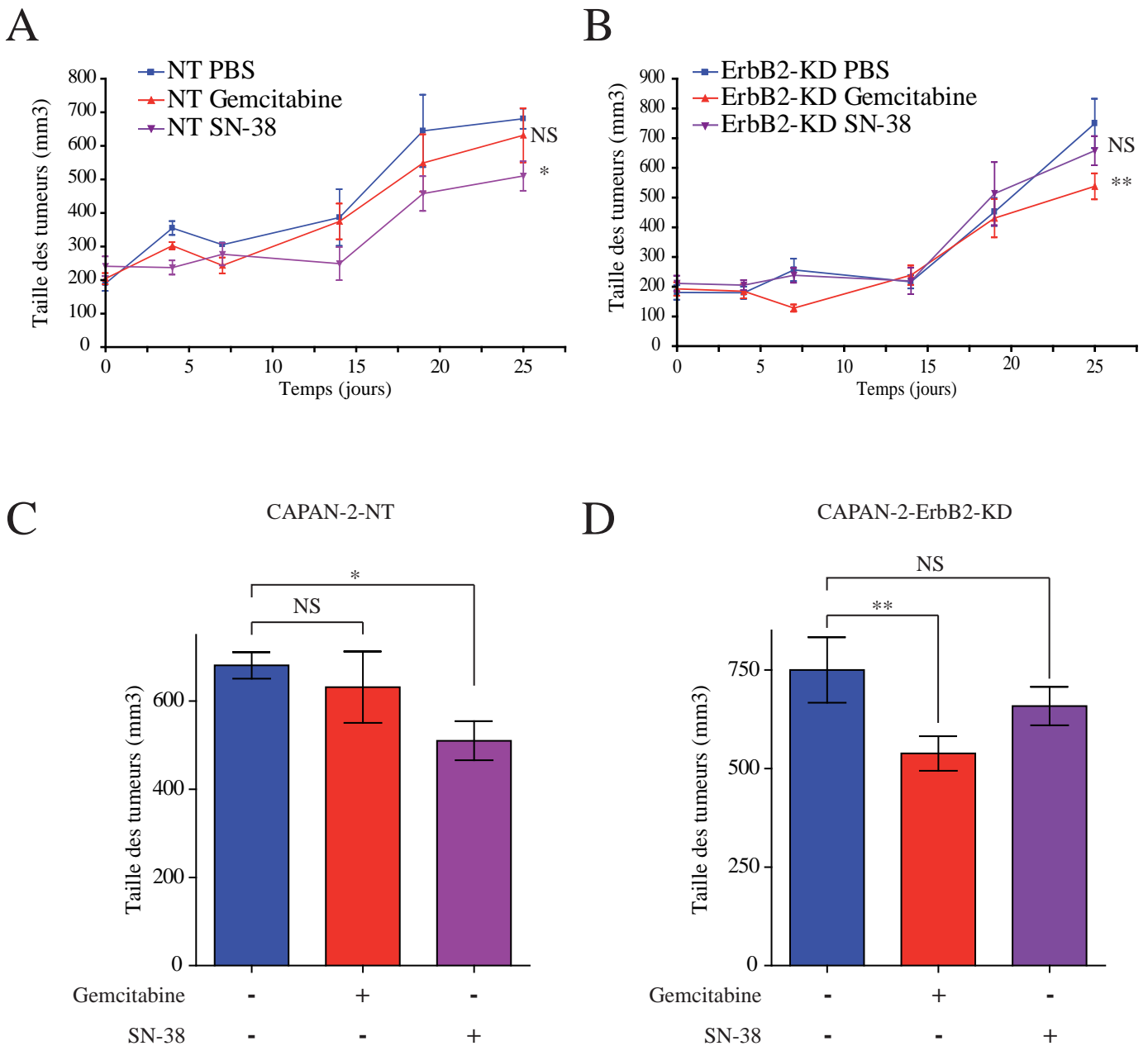


Figure 43 : La perte du récepteur ErbB2 modifie *in vivo* la chimiosensibilité à la Gemcitabine et au SN-38. (A et B) Evolution au cours du temps de la taille des xénogreffes de cellules CAPAN-2 invalidées pour le récepteur ErbB2 (ErbB2KD) ou non (NT) après traitement à la Gemcitabine (15 mg/kg), au SN-38 (40 mg/kg) ou au D-PBS. (D et E) Tailles moyennes au moment du sacrifice des tumeurs CAPAN-2 NT et ErbB2 traitées à la Gemcitabine, au SN-38 ou au D-PBS.

moyennes 200 mm³), deux injections intra-péritonéales par semaine de 0,2 ml d'une solution de D-PBS contenant 15 mg/kg de Gemcitabine, ou 40 mg/kg de SN-38 ont été réalisées.

L'évolution de la taille des tumeurs des souris xénotransplantées avec les CAPAN-2-NT montre un ralentissement significatif ($p < 0,01$) de la croissance des tumeurs suite au traitement au SN-38 par rapport à celle traitées au D-PBS alors que le traitement à la Gemcitabine n'a pas d'effet (Figure 43 A et C). A l'inverse, les tumeurs des souris xénotransplantées avec les CAPAN-2-ErbB2KD traitées au SN-38 ne présente pas de diminution de croissance comparées à celles traitées au D-PBS (Figure 43 B et D). Toutefois, une diminution significative ($p < 0,01$) des croissances des tumeurs est observée chez les souris xénotransplantées avec les CAPAN-2-ErbB2KD traitées à la Gemcitabine (Figure 43 B et D).

Ces résultats confirment *in vivo* la chimiosensibilité accrue à la Gemcitabine et la diminution de chimiosensibilité au SN-38 observées *in vitro* suite à l'inactivation du récepteur ErbB2 dans les cellules tumorales pancréatiques.

La surexpression du transporteur membranaire hCNT1, associée à la chimiorésistance à la Gemcitabine (Skrypek, N. *et al.*, 2013), est détectée dans les tumeurs formées à partir des CAPAN-2-ErbB2KD comparées à celles formées à partir des CAPAN-2-NT. De même, nous avons observé par immunohistochimie la surexpression de la pompe d'efflux ATP-dépendante MRP2 dans les tumeurs formées à partir des CAPAN-2-ErbB2KD. L'expression de hCNT1 et de MRP2 n'est pas altérée par les traitements chimiothérapeutiques dans les tumeurs.

Ensemble, ces résultats démontrent que, *in vivo*, la perte du récepteur ErbB2 sensibilise les cellules tumorales pancréatiques à la Gemcitabine *via* la surexpression de hCNT1 mais augmente leur résistance au SN-38 *via* la surexpression de MRP2.

L'ensemble de ces données ont permis la publication d'un article original en 2015 dans le journal *Oncotarget* 6(13):10853-10867 sous le titre de : **“The oncogenic receptor ErbB2 modulates gemcitabine and irinotecan/SN-38 chemoresistance of human pancreatic cancer cells *via* hCNT1 transporter and multidrug-resistance associated protein MRP-2”** Skrypek N., Vasseur R., Vincent A., Duchêne B., Van Seuning I., et Jonckheere N., (Voir annexe 2).

DISCUSSION

I. Etude de la régulation de la mucine MUC4 par K-ras dans le cancer du pancréas

Dans les travaux développés dans ce manuscrit, la néo-expression de la mucine transmembranaire MUC4 a été mise en évidence, *in vivo*, au cours des étapes précoces de la cancérogenèse pancréatique dans les lésions pré-tumorales PanINs induites par le mutant K-ras^{G12V}. La régulation, *in vitro*, de la mucine MUC4 par l'oncogène K-ras a également été mise en évidence. Cette régulation fait intervenir au niveau transcriptionnel les facteurs de transcription AP-1 et NF-κB activés par l'intermédiaire des voies de signalisation p42/44 MAPK et NF-κB, et au niveau post-transcriptionnel, la RalB GTPase.

A. Détection de la néo expression de Muc4 dans les lésions pré-tumorales

Le modèle de souris transgéniques Pdx1-Cre;LStopL-K-ras^{G12D} est un modèle de cancérogenèse pancréatique bien caractérisé dans la littérature pour reproduire les lésions histologiques pré-tumorales (PanINs) développées durant les étapes précoces de la carcinogenèse (Hingorani, S. R. *et al.*, 2003). En utilisant ce modèle de cancérogenèse, *in vivo*, induit par l'oncogène K-ras, nous avons confirmé la néo-expression de la mucine Muc4 dans les cellules des lésions pré-tumorales Panions dès leur apparition. Ces résultats concordent avec la néo-expression de la mucine MUC4, détectée chez l'homme dans les lésions PanINs formées au cours de la cancérogenèse pancréatique (Swartz, M. J. *et al.*, 2002).

L'expression de la mucine transmembranaire MUC4 est également dérégulée dans de nombreux cancers épithéliaux tels que les cancers de l'œsophage, des glandes salivaires et du poumon (Arul, G. S. *et al.*, 2000; Buisine, M.-P. *et al.*, 2000a; Handra-Luca, A. *et al.*, 2005; Llinares, K. *et al.*, 2004). En particulier, dans le cancer du pancréas, la mucine MUC4 est néo-exprimée dès les stades précoces et participe aux propriétés des cellules tumorales pancréatiques (Jonckheere, N. *et al.*, 2012; Skrypek, N. *et al.*, 2013; Swartz, M. J. *et al.*, 2002). La mucine MUC4 est donc un biomarqueur précoce potentiel ainsi qu'une cible thérapeutique potentielle contre cette pathologie (Horn, A. *et al.*, 2013). Le décryptage des mécanismes impliqués dans la régulation de cette mucine peut être utile pour permettre dans

le futur le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, ciblant cette mucine dans les étapes précoces de la cancérogenèse pancréatique mais également pour cibler d'autres cancers dans lesquelles la mucine MUC4 est dérégulée (Arul, G. S. *et al.*, 2000; Buisine, M.-P. *et al.*, 2000a; Handra-Luca, A. *et al.*, 2005; Jonckheere, N. *et al.*, 2013; Llinares, K. *et al.*, 2004; Swartz, M. J. *et al.*, 2002).

B. Importance de l'oncogène K-ras

K-ras est un oncogène majeur, fréquemment dérégulé dans les cancers humains (COSMIC database <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>). Les altérations génétiques de K-ras sont associées à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers et en particulier dans celui du pancréas (Shin, S. *et al.*, 2013) pour lequel les mutations de K-ras sont pratiquement systématiques (Urban, T. *et al.*, 1993). L'oncogène K-ras est capable d'activer un grand nombre de voies de signalisation dont les principales sont la voie p42/44 MAPK, la voie JNK, la voie PI3K/AKT et la voie des RalGTPases (Malumbres, M. and Barbacid, M., 2003). Dans un contexte tumoral, K-ras est impliquée dans de nombreuses propriétés des cellules cancéreuses (Pylayeva-Gupta, Y. *et al.*, 2011). En particulier, K-ras, comme la mucine MUC4, est impliquée dans la chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques (Réjiba, S. *et al.*, 2007; Skrypek, N. *et al.*, 2013).

En tant que cible de K-ras, la mucine MUC4 pourrait être responsable de la chimiorésistance induite par K-ras. Enfin, les mutants K-ras sont stabilisés par la galectine-3 à la membrane ce qui augmente son activation et potentialise ses capacités de transformation, particulièrement dans les cellules tumorales pancréatiques (Elad-Sfadia, G. *et al.*, 2004; Song, S. *et al.*, 2012). Or, la galectine-3 est impliquée dans la régulation des interactions entre mucines et membres de la famille EGFR. En particulier dans le pancréas, la galectine-3 interagit et régule le complexe MUC1-EGFR (Merlin, J. *et al.*, 2011). L'existence d'un complexe entre une mucine et un membre de la famille EGFR a également été démontré pour la mucine MUC4 et le récepteur ErbB2 (Jonckheere, N. *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir un lien entre l'activité de l'oncogène K-ras, l'interaction de la galectine-3 et le complexe MUC4-erbB2.

C. Implication des voies de signalisation

C.1 La voie p42/44 MAPK

Au sein des travaux développés dans ce manuscrit, nous avons mis en évidence le recrutement et l'activation de la voie p42/44 MAPK par le K-ras muté et son implication dans l'augmentation de l'expression de MUC4.

La voie p42/44 MAPK est une voie de signalisation complexe associée dans la littérature aux propriétés biologiques des cellules tumorales telles que la prolifération et la migration (Drosten, M. *et al.*, 2010). Plus particulièrement dans le cancer du pancréas, la voie p42/44 MAPK est nécessaire à l'initiation et à la maintenance des tumeurs (Collins, M. A. *et al.*, 2012a; Hofmann, I. *et al.*, 2012). Elle est également impliquée dans la migration et l'invasion et les capacités métastatiques des cellules tumorales pancréatiques, notamment par la régulation de métalloprotéases (Botta, G. P. *et al.*, 2012; Collins, M. A. *et al.*, 2012b). La mucine MUC4 est également impliquée dans les capacités de migration et d'invasion des cellules tumorales pancréatiques (Jonckheere, N. *et al.*, 2012). Ces données suggèrent que les capacités de migration et d'invasion induites par l'activation de la voie p42/44 MAPK en aval de la signalisation de l'oncogène K-ras pourraient également dépendre de l'expression de MUC4.

C.2 La voie JNK

La voie JNK est une voie de réponse aux stress, fréquemment dérégulée dans les cancers et décrite pour soutenir l'activité oncogénique induite par Ras dans les cellules tumorales (Sabapathy, K., 2011; Wagner, E. F. and Nebreda, A. R., 2009). Les mutations de l'oncogène K-ras sont considérées comme un événement initiateur de la cancérogenèse pancréatique. Cependant, ces mutations seules ne sont pas suffisantes pour induire les stades plus avancés. D'autres mutations et altérations génétiques sont nécessaires (Ryan, D. P. *et al.*, 2014).

Nous avons mis en évidence *in vivo* l'activation de la voie JNK dans les PanINs et *in vitro* une activation constitutive de la voie dans les cellules tumorales pancréatiques mutées K-ras. L'activation de la voie JNK pourrait donc être nécessaire pour soutenir l'activité oncogénique de K-ras et permettre la progression des PanINs.

Des travaux antérieurs effectués au laboratoire ont mis en évidence une augmentation d'activation des voies p42/44 MAPK et JNK suite à l'interaction entre la mucine MUC4 et le

récepteur oncogénique ErbB2 (Jonckheere, N. *et al.*, 2012). L'ensemble de ces données suggèrent que la mucine MUC4 pourrait participer à l'amplification de la signalisation K-ras nécessaire à la progression tumorale.

L'activation de la voie JNK en aval de l'activité de l'oncogène K-ras a également été impliquée au maintien d'un pool de cellules présentant des caractéristiques cellules souches au sein des populations de cellules tumorales pancréatiques (Okada, M. *et al.*, 2014). Cependant, des travaux ont mis en évidence l'expression de la mucine MUC4 au sein d'une sous population tumorale (CD133+ et CD133+/CXCR4+) présente au sein des tumeurs pancréatiques et présentant des caractéristiques souches, ainsi que le rôle de MUC4 dans la chimiorésistance (Mimeault, M. *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que la mucine MUC4 en aval de la voie JNK pourrait participer à l'entretien et la protection d'un pool de cellules souches tumorales au sein des tumeurs pancréatiques.

C.3 La voie du NF- κ B

Nous avons montré dans nos travaux l'implication de la voie NF- κ B dans la régulation de la mucine MUC4 par l'oncogène K-ras. La voie NF- κ B est une voie de signalisation essentielle pour les capacités de transformation de l'oncogène K-ras, notamment par l'activation de la voie PI3K-AKT-IKK (Finco, T. S. *et al.*, 1997; Liptay, S. *et al.*, 2003).

L'activation de la voie NF- κ B est fréquemment dérégulée dans les cancers où elle participe aux propriétés de survie, d'angiogenèse et de chimiorésistance. Notamment dans le cancer du pancréas, la voie du NF- κ B est constitutivement activée (Holcomb, B. *et al.*, 2008; Sclabas, G. M. *et al.*, 2003). Dans un contexte tumoral, l'activation constitutive du NF- κ B participe au développement des adénocarcinomes pancréatiques en renforçant graduellement la signalisation K-ras par un mécanisme de rétrocontrôle positif (Daniluk, J. *et al.*, 2012; Ling, J. *et al.*, 2012). Swartz et ses collaborateurs ont mis en évidence une augmentation graduelle de l'expression de MUC4 dans la progression des lésions PanINs à l'adénocarcinome (Swartz, M. J. *et al.*, 2002). Ces données renforcent l'hypothèse d'un lien entre l'augmentation progressive de la signalisation oncogénique de K-ras et celle de la mucine MUC4 dans la progression vers l'adénocarcinome pancréatique.

D. Régulation transcriptionnelle de la mucine MUC4

Dans nos travaux, nous avons mis en évidence le recrutement par la signalisation K-ras de c-fos, c-jun et de la sous-unité p65 du NF- κ B, ainsi que leur fixation sur les promoteurs de *MUC4*.

C-fos, l'effecteur majeur de la voie p42/44 MAPK, et c-jun, l'effecteur majeur de la voie JNK, sont les composants majoritaires du facteur de transcription AP-1 (González, J. M. *et al.*, 2008; Shaulian, E., 2010). L'activation par l'oncogène K-ras de ces facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B est fréquemment observée dans les cancers, en particulier dans les cancers mutés K-ras. De nombreuses connections entre ces deux facteurs de transcription majeurs sont décrites dans la littérature et supportent l'hypothèse d'une coopération des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B dans la régulation de la mucine MUC4 par K-ras (Fujioka, S. *et al.*, 2004).

Des travaux antérieurs ont également mis en évidence une coopération entre c-jun et le facteur de transcription PEA3 au niveau des promoteurs de MUC4 supportant l'importance de c-jun dans la régulation de la mucine MUC4 (Fauquette, V. *et al.*, 2005). Néanmoins, l'impact de la signalisation K-ras sur l'expression et l'activité du facteur de transcription PEA3 n'est pas encore été décrite. De plus, la voie p42/44 MAPK module également un large panel d'autres facteurs de transcription, en particulier Smad4, E2F1 et STAT1 dont l'implication dans la régulation transcriptionnelle de la mucine MUC4 ont été décrit (Jonckheere, N. *et al.*, 2004; Kunigal, S. *et al.*, 2012; Yoon, S. and Seger, R., 2006). Cependant, l'implication de ces facteurs en aval de la signalisation de l'oncogène K-ras reste à étudier dans la régulation de la mucine MUC4.

E. Implication de la voie des RalGTPases

Dans les travaux développés dans ce manuscrit, nous avons mis en évidence la surexpression des RalGTPases à la fois dans les adénocarcinomes pancréatiques humains par l'analyse de deux bases de données génomiques issues d'étude comparative et dans les PanINs, dès les stades précoces, en utilisant le modèle de cancérogenèse murin Pdx1-Cre;LStopL-K-ras^{G12D}. Une forte diminution de l'expression protéique de la mucine MUC4 est observée suite à l'inhibition de la GTPase RalB dans la lignée mutée K-ras CAPAN-2 mais pas dans la lignée non mutée BxPC3. Aucune variation au niveau de l'ARNm n'est

détectée. Ces résultats suggèrent un rôle de la GTPase RalB dans la régulation de la mucine MUC4 par K-ras à un niveau post-transcriptionnel.

La voie des RalGTPases est impliquée dans la régulation de l'endocytose et l'exocytose, le trafic cellulaire, la cytokinèse et la réponse immunitaire. Dans un contexte pathologique tumorale, les Ral GTPases participent également à la prolifération cellulaire (Henry, D. O. *et al.*, 2000). Dans le cancer du pancréas, cette voie de signalisation joue un rôle majeur dans la capacité de transformation de l'oncogène K-ras ainsi que dans les propriétés de croissances sans ancrage, de survie et de résistance à la radiothérapie des cellules tumorales (Kidd, A. R. *et al.*, 2011; Lim, K. *et al.*, 2005; Lim, K. *et al.*, 2006). Les protéines RalA et RalB, membres de la superfamille des protéines Ras, sont activées par des Ral-GEFs (*Ral guanine-nucleotide-exchange factors*) capables de se fixer directement au Ras-GTP (Feig, L. A. *et al.*, 1996). La voie Ral est donc directement activée par K-ras (Malumbres, M. and Barbacid, M., 2003). L'implication de la mucine MUC4 dans les propriétés biologiques induites par la voie Ral n'a toutefois pas encore été décrite. De plus, décrypter le mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de la mucine MUC4 par la voie Ral permettrait de développer de nouvelles stratégies contre cette mucine.

Enfin, la voie des RalGTPases est impliquée dans la régulation du récepteur ErbB2 par l'intermédiaire d'un facteur dépendant de la confluence. (Bodemann, B. O. and White, M. A., 2008; Frankel, P. *et al.*, 2005). La perte du récepteur ErbB2 entraîne une diminution de l'expression de MUC4 ce qui suggèrent que la voie des RalGTPases pourrait réguler la mucine MUC4 par un mécanisme indirect impliquant son partenaire le récepteur ErbB2.

F. Conclusion

Dans ces travaux, nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme cellulaire reliant l'oncogène K-ras, l'acteur majeur de l'initiation de la cancérogénèse pancréatique, à l'onco-mucine MUC4, acteur important des cellules tumorales pancréatiques. Ce mécanisme fait intervenir au niveau transcriptionnel le recrutement sur les promoteurs de *MUC4* des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B *via* l'activation des voies de signalisation p42/44 MAPK, JNK et NF- κ B et au niveau post-transcriptionnel, la GTPase RalB dont le rôle reste à décrypter. L'oncogène K-ras restant actuellement impossible à cibler en clinique, le décryptage de la régulation de la mucine MUC4 en tant que cible de K-ras pourrait dans le futur, conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les cancers épithéliaux K-ras mutés et en particulier contre le cancer du pancréas.

II. Partie 2 : Rôle du complexe MUC4-ErbB2 dans la cancérogenèse pancréatique

A. Réponse du modèle *Muc4*^{KO}

Dans les travaux développés dans ce manuscrit, nous avons établi et caractérisé le modèle murin *Muc4* déficient. En absence de pathologie induite, les souris *Muc4*^{KO} de notre modèle ne présentent pas de phénotype morphologique ou histologique majeur, ce qui est cohérent avec le modèle similaire établis récemment dans la littérature par l'équipe du Docteur Batra (Das, S. *et al.*, 2015). Dans notre modèle, la perte de la mucine *Muc4* ne modifie pas l'expression des mucines *Muc1*, *Muc2* et *Muc5ac*, ni la réponse suite à l'induction d'une colite inflammatoire. A l'inverse, dans le modèle récent du Docteur Batra, son équipe observe que l'inactivation *Muc4* induit une augmentation de la mucine *Muc2* sécrétée dans le colon, ainsi qu'une résistance à la colite inflammatoire par le DSS. De plus, dans ces travaux, la perte de *Muc4* est associée à l'augmentation de cancers colorectaux induits par colite inflammatoire (Das, S. *et al.*, 2015). La différence de réponse entre nos modèles pourrait s'expliquer par la surexpression de la mucine *Muc2* observée par qPCR dans le modèle du Dr Batra, que nous n'observons pas. En effet, la mucine sécrétée *Muc2* est associée à la protection et l'homéostasie du tissu colique. La délétion de cette mucine participe à la sensibilité du tissu colique aux colites inflammatoires ainsi qu'à l'augmentation de cancer colorectaux (Van der Sluis, M. *et al.*, 2006).

B. Traitement Deltarasine

Le ciblage thérapeutique de l'oncogène K-ras, bien que toujours non utilisable en clinique à ce jour, reste un enjeu majeur de la recherche thérapeutique, en particulier dans le cancer du pancréas. La Deltarasine est la stratégie montrant *in vitro* et sur xénogreffes les résultats les plus prometteurs. Nos travaux préliminaires suggèrent qu'*in vivo*, la perte de la mucine MUC4 diminue la sensibilité à la Deltarasine. La mucine MUC4 est impliquée dans les propriétés de chimiorésistance et chimiosensibilité des cellules tumorales. En particulier, la perte de MUC4 dans les cellules tumorales pancréatiques entraîne une augmentation de l'expression des canaux de détoxifications MRP3 et MRP4 (Jonckheere, N. *et al.*, 2012). L'augmentation de l'expression de ces canaux de détoxification suite à la perte de MUC4 pourrait expliquer la diminution de l'efficacité du traitement à la Deltarasine.

C. Rôle d'erbB2 dans la chimiorésistance

La résistance aux drogues de chimiothérapie est un problème majeur de recherche, en particulier dans le cancer du pancréas.

Au cours de nos travaux, nous avons mis en évidence *in vitro* que l'inhibition du récepteur ErbB2 sensibilise les cellules tumorales pancréatiques à la Gemcitabine. Nous avons également montré que l'expression du transporteur hCNT1 est augmentée suite à la perte d'ErbB2 et augmente la sensibilité des cellules tumorales à la Gemcitabine. Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré l'interaction de la mucine MUC4 avec le récepteur oncogénique ErbB2 (Jonckheere, N. *et al.*, 2012). De plus, il a été mis en évidence que la perte de la mucine MUC4 sensibilise également à la Gemcitabine et augmente l'expression du transporteur hCNT1 (Skrypek, N. *et al.*, 2013). L'ensemble de ces résultats renforce l'importance du complexe MUC4-ErbB2 dans les propriétés de chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques et renforcent l'intérêt de développer une stratégie ciblant ce complexe.

Nous avons également mis en évidence que la perte du récepteur ErbB2 augmente la résistance des cellules tumorales pancréatiques au SN-38. Le SN-38, métabolite actif de l'Irinotécan, est un inhibiteur de topoisomérase de type I dont les effets les plus importants s'observent sur les cellules en réplication (Pommier, Y., 2006). La perte du récepteur ErbB2 induit une diminution de la prolifération des cellules tumorales pancréatiques. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la chimiorésistance au SN-38 des cellules invalidées pour le récepteur ErbB2 pourrait être due à la réduction du nombre de cellules en réplication. Nous avons mis en évidence que l'inactivation du récepteur ErbB2 induit également la surexpression de MRP1, MRP2 et ABCG2, des transporteurs de la famille des transporteurs ABC fréquemment impliqués dans la chimiorésistance tumorales et en particulier dans la résistance au SN-38 (Candeil, L. *et al.*, 2004; Szakács, G. *et al.*, 2006).

D. Conclusion

Dans les travaux développés dans ce manuscrit, nous avons mis en place le modèle murin Muc4 déficient qui nous permettra de poursuivre *in vivo* l'étude du rôle de la mucine MUC4 dans le développement du cancer du pancréas et à des stades plus avancés, son rôle dans les propriétés métastatiques. Nous avons également mis en évidence l'implication du récepteur ErbB2, partenaire de la mucine MUC4, dans les propriétés de chimiorésistance des cellules

tumorales pancréatiques. Le récepteur ErbB2 est impliqué dans la résistance à la Gemcitabine, traitement de référence pour le cancer du pancréas, *via* la régulation des transporteurs hCNT1 et hCNT3 ainsi que dans la sensibilité au SN-38, métabolite actif dans le traitement FOLFIRINOX, *via* la régulation des canaux de détoxification MRP1, MRP2 et ABCG2. La détection de l'expression du récepteur ErbB2 pourrait donc servir de marqueur afin d'adapter et d'optimiser les traitements de chimiothérapies dans le cancer du pancréas. Enfin, nos travaux préliminaires suggèrent que la mucine MUC4 pourrait être impliquée dans la sensibilité aux traitements ciblant l'oncogène K-ras. Ces données renforcent l'importance du complexe MUC4-ErbB2 en tant que marqueur pronostique et cible thérapeutique potentielle contre le cancer du pancréas.

CONCLUSION

Avec les travaux développés dans ce manuscrit, nous avons mis en évidence que la mucine Muc4 est néoexprimée *in vivo* dès les stades précoces formés par l'expression du K-ras muté. Nous avons montré *in vitro* que K-ras active l'expression de la mucine MUC4 par un mécanisme transcriptionnel et post-transcriptionnel. Au niveau transcriptionnel, K-ras induit le recrutement et la fixation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B sur les promoteurs de MUC4 via l'activation des voies de signalisation MAPK et NF- κ B. Au niveau post-transcriptionnel, K-ras module l'expression de la mucine MUC4 par un mécanisme qui implique la RalB GTPase.

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons également mis en place le modèle murin Muc4 déficient et entrepris sa caractérisation. Le modèle murin Muc4^{KO} ne présente pas de phénotype morphologique et histologique majeur en absence de pathologie induite. Aucune modification de l'expression des mucines Muc1, Muc2 et Muc5ac n'a été détectée en compensation de l'inactivation de la mucine Muc4. En cas de colite inflammatoire induite par un traitement au DSS, l'inactivation de la mucine Muc4 ne modifie pas la réponse à la colite mais altère la prolifération de cellules coliques après traitement suggérant un rôle de la mucine Muc4 dans la réparation du tissu colique suite à une agression. La mise en place du croisement de ce modèle Muc4 déficient avec le modèle de cancérogenèse pancréatique Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} a débutée.

Enfin, la caractérisation du rôle de la mucine MUC4 et de son partenaire membranaire le récepteur ErbB2 dans les propriétés de chimiorésistance des cellules tumorales pancréatiques a été poursuivie. Une étude préliminaire suggère que l'inactivation de la mucine MUC4 *in vivo*, altère la chimiosensibilité aux traitements ciblant l'oncogène K-ras. Nous avons également mis en évidence que la perte du récepteur ErbB2 sensibilise les cellules tumorales pancréatiques à la Gemcitabine *via* la surexpression du transporteur hCNT1 mais à l'inverse augmente leur résistance au SN-38 *via* la surexpression de canal de détoxification MRP2.

PERSPECTIVES

Les travaux développés dans ce manuscrit nous permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherches. Nous avons mis en évidence le rôle de l'oncogène K-ras dans la régulation transcriptionnel de la mucine MUC4. Nous avons également mise en évidence l'existence d'un mécanisme post-transcriptionnelle impliquant la RalB GTPase. Toutefois ce mécanisme reste à élucider. La voie Ral étant impliquée dans la régulation des processus d'endocytose, d'exocytose et de trafic intracellulaire. La localisation, l'adressage et la demi-vie de la protéine MUC4 seront étudiées après invalidation de la RalB. De plus, la voie du TGF- β est également impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle de la mucine Muc4 (Soto, P. *et al.*, 2003). L'interaction entre la voie Ral et la voie du TGF- β pourra être étudié. Enfin, la mucine MUC4 est régulée par des mécanismes épigénétiques. Ces mécanismes impliquent des micro ARNs (miRs), la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones. Cependant, l'impact de K-ras sur l'expression de ces miRs et sur des enzymes de régulation épigénétique impliquées dans la régulation de la mucine MUC4 n'a pas encore été étudié.

Suite à la mise en place du modèle murin Muc4 déficient et de caractérisation, nous avons débuté la mise en place le croisement de ce modèle avec celui de cancérogenèse pancréatique. Ce modèle nous permettra d'étudier *in vivo* l'impact de l'invalidation de la mucine Muc4 sur les étapes précoces du développement de la cancérogenèse pancréatique. La viabilité des souris est en cours d'évaluation et des courbes de survies seront établies (Kaplan-Meyer). La structure anatomique et histologique du tissu pancréatique et des tissus exprimant physiologiquement Muc4 sera évaluée avec l'expertise des anatomopathologistes spécialistes de la sphère digestive avec lesquels nous travaillons. Pour caractériser ce modèle, l'expression de marqueurs de différenciation (Muc4, Muc1, EGFR, Pdx-1, E-cadhérine, ErbB2, CK7, CK19) de prolifération et d'apoptose (Ki67, p21, cycline D1, Smad4, p16INK4a, Caspase-3 clivée, p15, Rb) et de chimiorésistance (Cox2, CXCR4) sera évaluée par immunohistochimie. Enfin, un traitement à la Céruléine reproduisant une pancréatite chronique induit une accélération de la séquence conduisant à la formation de tumeurs pancréatiques métastatiques. De la même façon, des injections de Céruléine dans le modèle de cancérogenèse pancréatique Muc4 déficient nous permettront d'accélérer la progression tumorale et d'étudier *in vivo* le rôle de la mucine Muc4 dans les processus invasifs et métastatiques.

Enfin, nous avons mis en évidence le rôle de l'oncogène ErbB2, partenaire membranaire de la mucine MUC4, dans les propriétés de chimiosensibilité aux drogues utilisées dans le traitement du cancer du pancréas. Ces données nous permettront d'évaluer l'utilisation en tant que marqueur pronostique de la mucine MUC4 et du récepteur ErbB2 dans la réponse et l'adaptation aux traitements de chimiothérapies. Enfin, le développement de stratégies thérapeutiques ciblant le complexe MUC4/ErbB2 sera établi. En particulier, l'utilisation de peptides ou composés chimiques permettant le blocage de l'interaction entre la mucine MUC4 et son partenaire ErbB2 sont étudiés. Enfin, l'évaluation du ciblage *in vivo* de l'expression de la mucine Muc4 par son invalidation dans le tissu pancréatique *via* une technique d'injection hydrodynamique sera évaluée (Tsuchiya, M. *et al.*, 2007).

APPENDICE TECHNIQUE

APPENDICE TECHNIQUE

I. Expérimentation animale

A. Lignées murines transgéniques

La lignée transgénique murine Pdx1-Cre (en C57Bl/6) a été obtenue du *Mouse Models of Human Cancer Consortium* (MMHCC, USA). La lignée transgénique LStopL-K-ras^{G12D} (en C57Bl/6) a été obtenue du Dr D. Tuveson (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA). La lignée Muc4^{het} (en C57Bl/6) a été établie sur notre demande par la société américaine *Texas Institute Genomic Medicine* (TIGM, Houston, Etats-Unis). L'ensemble est maintenu à l'état hétérozygote par croisement avec un fond génétique C57Bl/6 au sein de l'animalerie High-Tech de l'université de Lille. Ces lignées transgéniques sont ensuite croisées entre elles pour produire les souris Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} du modèle de cancérogenèse pancréatique et les souris Muc4^{KO}. Les animaux sont sexés, génotypés par PCR et séparés à la puberté. Leur poids et leur état de santé sont surveillés quotidiennement. Enfin, les animaux sont sacrifiés à 3, 5, 9 et 12 mois par dislocation cervicale puis disséqués en accord avec les recommandations du comité d'éthique local (Comité Ethique Expérimentation Animale Nord Pas-de-Calais, #AF042008 and #00422.01).

C. Xénogreffes de cellules tumorales

Les xénogreffes ont été réalisées à partir de cellules tumorales en culture CAPAN-2 mock et CAPAN-2 MUC4KD dans des souris *SCID* (*Severe combined immunodeficiency*). Les cellules tumorales sont décollées avec de la trypsine et lavées par du tampon phosphate Dulbecco 1X (D-PBS). Puis, une fraction aliquote est comptée sur lame de Mallassez. Le reste des cellules est isolé par centrifugation 5 min à 300 x g puis repris dans du milieu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) à la concentration de 2×10^6 cellules pour 100 μ l de milieu. La solution de cellules est ensuite mélangée sur glace à 50 % (v/v) avec du Matrigel (*Matrigel[®] Matrix High Concentration*, 354262, Corning) et est maintenue dans la glace jusqu'à injection. Les xénogreffes ont été réalisées à partir de 200 μ l de la solution précédente (2×10^6 de cellules par souris) dans le flanc des animaux à l'aide de seringues de 1 ml et d'aiguilles de 21G. Les souris sont surveillées jusqu'au développement de masses

tumorales palpables qui sont par la suite mesurées à l'aide d'un pied à coulisse 3 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation.

B. Traitements et injections chez les souris

C.1 Injections de Céruléine

Les injections de Céruléine permettant l'accélération de la cancérogenèse pancréatique ont été réalisées en intra-péritonéales sur des souris Pdx1-Cre ; LStopL-K-ras^{G12D} âgées de 2 mois. Des injections de 0,1 ml de solution saline contenant 50 µg/ml de Céruléine (Caerulein, C9026 Sigma-Aldrich) ont été réalisées 5 fois par semaine. Le poids et l'état de santé des souris ont ensuite été suivis jusqu'au sacrifice.

C.2 Traitement au Sulfate de dextran

Pour induire une colite inflammatoire, un traitement au sulfate de dextran (DSS) a été réalisé sur des souris Muc4^{KO} et des souris contrôles. Ce traitement a été réalisé par ajout de DSS (*TdB Consultancy*, DB001) 3% (p/v) dilué dans l'eau de boisson sur une période de 9 jours. Pendant le traitement, la vitesse d'apparition et la perte de poids engendrée par la colite ont été évalués ainsi que le saignement produit par l'endommagement de l'épithélium et l'état général des souris (prostration, toilette, déplacement) afin d'établir un score de la pathologie. Au terme du traitement, les souris ont été sacrifiées et disséquées pour analyse.

C.3 Traitement à la Deltarasine

Le traitement à la Deltarasine a été réalisé sur des souris SCID xénotransgéniques. Le traitement à la deltarasine a été réalisé par injections intra-péritonéales d'une solution saline tamponnée contenant 15 mg/kg de Deltarasine (*MedChem Express*, HY-15747). Les injections ont été réalisées sur une période de 3 semaines à raison de 3 injections par semaine pendant lesquelles le poids et l'état de santé des animaux ont été suivis.

II. Culture cellulaire

A. Lignées cellulaires humaines

A.1 La lignée BxPC-3

La lignée cellulaire BxPC-3 (ATCC[®], CRL-1687TM) a été isolée à partir de la tumeur primaire d'un adénocarcinome non métastatique du corps du pancréas chez une patiente

caucasienne de 61 ans (Tan, M. H. *et al.*, 1986). Ces cellules possèdent une morphologie épithéliale polarisée et poussent en monocouche de façon adhérente et cohésive. Génétiquement, la lignée BxPC-3 présente un gène *KRAS* non muté, une mutation de *TP53* ainsi qu'une délétion des gènes *CDKN2A/p16* et *SMAD4/DPC4* (Deer, E. *et al.*, 2010).

A.2 La lignée CAPAN-2

La lignée cellulaire CAPAN-2 (ATCC[®], HTB-80[™]) a été isolée à partir de la tumeur primaire d'un adénocarcinome métastatique de la tête du pancréas chez un patient caucasien de 56 ans (Kyriazis, A. A. *et al.*, 1986). Ces cellules possèdent une morphologie épithéliale polygonale et poussent en monocouche de façon adhérente. Génétiquement, la lignée CAPAN-2 présente une mutation du gène de *KRAS* (G12V), une altération des gènes *TP53* et *CDKN2A/p16* mais pas de mutation *SMAD4/DPC4* (Deer, E. *et al.*, 2010).

A.3 La lignée CAPAN-1

La lignée cellulaire CAPAN-1 (ATCC[®], HTB79[™]) a été isolée à partir d'une métastase hépatique chez un patient caucasien de 40 ans atteint d'un cancer du pancréas (Kyriazis, A. P. *et al.*, 1982). Ces cellules possèdent une morphologie prismatique et poussent en monocouche adhérente. Génétiquement, la lignée CAPAN-1 présente une hypo-triploïdie avec une mutation du gène de *KRAS* (G12V), une altération des gènes *TP53* et *SMAD4/DPC4* et une délétion homozygote du gène *CDKN2A/p16* (Deer, E. *et al.*, 2010).

A.4 Les lignées hTERT-HPNE E6/E7 et hTERT-HPNE E6/E7 K-RASG12D

La lignée cellulaire HPNE (*Human Pancreatic Nestin Expressing cell*) a été obtenue à partir de l'isolation de cellules canalaire pancréatique saine issues d'un patient caucasien de 52 ans (Lee, K. M. *et al.*, 2003). Une immortalisation des cellules a été réalisée par expression de la télomérase humaine hTERT. La lignée dérivée hTERT-HPNE-E6/E7 (ATCC[®], CRL 4036[™]) (HPNE) a été obtenue par transfection stable des protéines E6 et E7 du papillomavirus humain de type 16 dans la lignée hTERT-HPNE. La lignée dérivée hTERT-HPNE-E6/E7-K-ras^{G12D} (HPNE-K-ras) (ATCC[®], CRL 4038[™]) a été obtenue par transfection stable d'un mutant K-ras^{G12D} dans la lignée hTERT-HPNE-E6/E7. Ces cellules possèdent une morphologie épithéliale étoilée poussant en monocouche adhérente. Génétiquement, ces lignées ne présentent aucune mutation des gènes *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A/p16* ou *SMAD4/DPC4*. Ces lignées établies par le Dr. M. Ouellette (Nebraska) ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration *via* le Dr P. Cordelier (Inserm U1037, Toulouse).

A.5 La lignée HPDE

La lignée cellulaire HPDE (*Human Pancreatic Duct Epithelial cell*) a été établie à partir d'un fragment de tissu pancréatique sain provenant d'une patiente caucasienne de 51 ans (Furukawa, T. *et al.*, 1996). Une immortalisation des cellules a été réalisée par expression des protéines E6 et E7 du papillomavirus humain de type 16. Ces cellules possèdent une morphologie épithéliale cuboïde et poussent en monocouche adhérente et cohésive. Génétiquement, la lignée HPDE ne présente aucune altération des gènes *KRAS TP53*, *CDKN2A/p16* et *SMAD4/DPC4*. Cette lignée a été établie et obtenue dans le cadre d'une collaboration *via* le Dr M.S. Tsao (UHN, Toronto, Canada).

B. Conditions de culture

Les lignées cellulaires humaines CAPAN-1, CAPAN-2 et BxPC-3 sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) complété par 10 % (v/v) (CAPAN-2 et BxPC-3) ou 15 % (v/v) (CAPAN-1) de sérum de veau fœtal (SVF), 100 unité/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 2 mM de L-glutamine (Invitrogen, Life Technologies) et pour la lignée cellulaire BxPC-3 2 mM de sodium pyruvate (Invitrogen, Life Technologies).

Les lignées cellulaires HPNE et HPNE-Kras sont cultivées dans du milieu composé par 1/3 de milieu *M-3 Base medium* (INCELL) et 2/3 de milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco, Life Technologies) complété par 5 % (v/v) de SVF, 100 unité/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen, Life Technologies) et 1 ng/ml d'EGF recombinant (Gibco, Life Technologies).

La lignée cellulaire HPDE est cultivée dans du milieu keratinocyte (Gibco, Life Technologies) complété par 50 µg/ml d'extrait pituitaire bovin, 5 ng/ml d'EGF recombinant (Gibco, Life Technologies) et 100 unité/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen, Life Technologies).

Les cellules sont repiquées une fois par semaine, en travaillant dans des conditions stériles sous un PSM (*Poste de sécurité microbiologique*) de type II. Après élimination du milieu de culture par aspiration et rinçage du tapis cellulaire avec du tampon phosphate Dulbecco 1X (D-PBS), les cellules sont décollées par l'action de 0,05 % (v/v) de trypsine et 0,5 mM d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 37 °C durant 10 min sauf pour les cellules HPDE où 2 min suffisent. L'action de la trypsine est ensuite stoppée par ajout de 5 ml de

milieu de culture complet correspondant ou pour la lignée HPDE, 5 ml de milieu complétement à 1/5 (v/v) par une solution d'inhibiteurs de trypsine (DTI, Gibco, Lifes Technologies). La suspension cellulaire est alors isolée par centrifugation 5 min à 300 x g, puis reprise par 5 ml de milieu complétement. Une fraction aliquote est utilisée pour un comptage manuel en lame de Malassez.

L'ensemble des lignées est maintenu en phase de prolifération exponentielle à raison de 4×10^5 cellules par flasque de culture de 75 cm² (T75) et $1,5 \times 10^5$ cellules par flasque de culture de 25 cm² (T25), dans un incubateur à 37 °C avec une atmosphère saturée en eau à 5 % de CO₂.

C. Cryoconservation et décongélation des lignées

C.1 Cryoconservation

Après un faible nombre de passage, l'ensemble des lignées cellulaires est amplifié puis cryoconservé. Les tapis cellulaires sont rincés avec une solution de D-PBS 1X puis décollés selon le même protocole que pour un passage hebdomadaire. Après centrifugation, le culot cellulaire est repris par 7,5 ml de milieu complet dans lequel 10 %(v/v) de SVF et 10 %(v/v) de glycérol sont ajoutés. Le mélange est réparti dans 5 Cryotubes™Vials 2 ml à raison de 1,5 ml par tube (entre 1 et 5 millions de cellules par tube). Les tubes sont ensuite placés dans un container contenant un bain d'isopropanol et placés 24 h à -80 °C pour permettre une descente de température lente, avant d'être stockés dans la vapeur d'azote dans un container Cryo200 (Thermo Scientific).

C.2 Décongélation

Les cryotubes sont ouverts brièvement sous un PSM de type II afin d'éviter les projections d'air et d'azote dues au changement brutal de température. Puis, les tubes sont décongelés par mouvements lents dans un bain marie à 37 °C. La suspension cellulaire est reprise par 5 ml de milieu à 37 °C puis est homogénéisée lentement avant une centrifugation de 4 min à 250 x g. Le culot cellulaire est repris par 1 ml de milieu complet à 37 °C, homogénéisé puisensemencé en T25 à raison 1/3 dans l'une et 2/3 dans l'autre. Le milieu est changé 24 h après la décongélation pour éliminer les cellules n'ayant pas survécu à la décongélation.

D. Détection de mycoplasmes

La présence de mycoplasme est testée à l'aide du kit *MycoAlert*TM (Lonza). Une fraction de 1 ml de surnageant de culture ayant été en contact au moins 24 h avec les cellules est récupérée puis centrifugée 2 min à 200 x g pour éliminer les débris et cellules mortes (le surnageant peut être congelé à -20 °C et conservé jusqu'à 1 mois avant le test). Une fraction aliquote de 100 µl de ce surnageant est déposée dans un puit d'une plaque 96 puits opaque et incubé 5 min à température ambiante avec 100 µl de réactif *MycoAlert*TM *Reagent*. Une première lecture de luminescence de 1 s est réalisée (*Reading A*) avant d'ajouter 100 µl de réactif *MycoAlert*TM *substrate* au mélange et de laisser incubé 10 min à température ambiante. Une seconde lecture de luminescence de 1 s est ensuite réalisée (*Reading B*) puis le ratio *Reading B/Reading A* est calculé :

Ratio < 0,9	Les cellules ne sont pas contaminées par les mycoplasmes
0,9 < Ratio < 1,2	Les cellules sont placées en quarantaine Un second test est effectué 24 h plus tard
Ratio > 1,2	Les cellules sont contaminées par un mycoplasme

Pour les cellules contaminées, un traitement avec la PlasmocynTM (InvivoGen) à 25 µg/ml diluée dans le milieu de culture (solution traitement stock à 25 mg/ml) est réalisé pendant 3 semaines avec un renouvellement du traitement 2 fois par semaine. Les cellules sont ensuite maintenues en traitement prophylactique à 5 µg/ml (solution prophylactique stock à 2,5 mg/ml) jusqu'au prochain contrôle.

E. Transfection transitoire

E.1 Transfection de plasmides via le kit EffecteneTM

Le kit EffecteneTM (Qiagen) est basé sur l'incorporation de vésicules lipidiques par les cellules eucaryotes. Les transfusions transitoires d'ADN plasmidique sont réalisées à raison de 0,25 à 0,5 µg de vecteur d'expression et/ou de 1 µg de vecteur rapporteur. Le protocole consiste à transférer l'ADN en le mélangeant avec l'*Enhancer* pour permettre sa compaction dans un tampon salin (tampon EC) et d'incuber ce mélange 5 min à température ambiante. L'ADN compacté est ensuite incubé 10 min avec l'*Effectene*TM (mélange de lipides cationiques) pour permettre la formation de complexes. Les complexes obtenus

ADN/*Enhancer*/*Effectene*TM sont alors repris par du milieu de culture complet et répartis sur les cellules au goutte à goutte.

La transfection s'effectue à 50-60 % de confluence et chaque condition est réalisée en triple. Les cellules sontensemencées à 4×10^5 cellules par puit en plaque 6 puits, 24 h avant transfection. Pour chaque réaction, le mélange réactionnel suivant est préparé :

ADN plasmidique + tampon EC	100 μ l
<i>Enhancer</i>	3,2 μ l
<i>Effectene</i> TM	5 μ l

A chaque étape, les réactifs sont bien homogénéisés par pipetage. Les cellules sont lavées avec D-PBS 1X avant d'être mises en contact avec 1,6 ml de milieu complet. Les complexes ADN/*Enhancer*/*Effectene*TM sont repris par 0,6 ml de milieu complet pour être répartis au goutte à goutte sur le tapis cellulaire.

E.2 Transfection d'ARN interférent via le kit *DharmaFECT*TM

Les ARN interférents (*Dharmacon*[®], *GE-Healthcare*, *Bio-sciences*) sont repris dans une dilution du tampon *siRNA buffer 5X* (composition 1X : 20 mM KCl, 6 mM HEPES et 0,2 mM MgCl₂, pH 7,5 ; *Dharmacon*[®], *GE-Healthcare*, *Bio-sciences*) diluée dans de l'eau stérile *RNase free*. Une fraction de 5 nmol d'ARN interférents est reprise par 250 μ l de tampon *siRNA buffer 1X*. La solution mère (20 μ M) est conservée à -20 °C. Une dilution à 5 μ M (dilution $\frac{1}{4}$) dans du *siRNA buffer 1X* est préparée avant utilisation.

La transfection s'effectue à 50-60 % de confluence et chaque condition est réalisée en triple, les cellules étantensemencées à 4×10^5 cellules par puit en plaque 6 puits, 24 h avant transfection. Pour chaque réaction de transfection, le mélange réactionnel est préparé selon le protocole ci-dessous :

Tube T1		Tube T2	
SiARN (5 μ M)	10 μ l	<i>DharmaFECT</i> [®]	4 μ l
Milieu sans SVF ni antibiotique	190 μ l	Milieu sans SVF ni antibiotique	196 μ l

Il existe quatre réactifs Dharmafect différents. La mise au point du plus adapté à chaque lignée a préalablement été déterminé au laboratoire (le 2 pour les CAPAN-1, le 4 pour les BxPC3 et les CAPAN-2). Le mélange est incubé 5 min à température ambiante puis les tubes T1 et T2 sont mélangés, homogénéisés et incubés 20 min à température ambiante. Le tapis cellulaire est rincé avec du D-PBS 1X. Le mélange T1/T2 est alors repris par 1,6 ml de milieu avec SVF sans antibiotique et réparti au goutte à goutte sur le tapis cellulaire.

III. Biologie moléculaire

A. Extraction des ARN totaux

Les extractions d'ARN sont réalisées en utilisant le kit d'extraction *NucleoSpin[®] RNA II* (Machery-Nagel) suivant les recommandations du fabricant.

Le tapis cellulaire est rincé avec du D-PBS 1X puis lysé par 350 µl de tampon RA1 contenant 1 % (v/v) de β-Mercapto-éthanol. Le lysat est transféré dans un tube 1,5 ml et peut être stocké à -80 °C jusqu'à utilisation. Ce lysat est ensuite filtré et clarifié à travers la colonne *NucleoSpin[®] Filter* par une centrifugation de 1 min à 11000 x g.

Une précipitation des acides nucléiques du lysat est ensuite réalisée par ajout de 350 µl d'éthanol 70 % (v/v). Après homogénéisation de la suspension jusqu'à disparition du précipité trouble, les acides nucléiques sont chargés sur la colonne *NucleoSpin[®] RNA II column* par une centrifugation de 1 min à 11000 x g. Une étape de lavage pour éliminer les sels de la membrane est réalisée par centrifugation en présence de 350 µl de *Membrane Desalting Buffer*, centrifugé 1 min à 11000 x g. Un mélange réactionnel de DNase est ensuite préparé par le mélange de 90 µl de tampon *Reaction Buffer for rDNase* et 10 µl de solution rDNase reconstituée dans de l'eau distillé. Une incubation avec 95 µl du mélange réactionnel de DNase est réalisé pendant 15 min à température ambiante pour digérer l'ADN génomique.

Des lavages des colonnes sont réalisés par ajout de (i) 200 µl de solution *Buffer RA2* centrifugés 1 min à 11000 x g, (ii) 600 µl de solution *Buffer RA3* centrifugés 1 min à 11000 x g et (iii) 250 µl de solution *Buffer RA3*, centrifugés 2 min à 11000 x g. Une étape de centrifugation à vide supplémentaire peut être ajoutée pour réduire les traces d'éthanol et améliorer la qualité de l'extrait.

Les ARN purifiés et lavés sont ensuite élués de la colonne avec 60 µl d'eau *RNase-free* et centrifugés 1 min à 11000 x g. Les préparations sont dosées au spectrophotomètre NanoDrop 1000. La quantité de l'ARN est évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm (A_{260nm}) (1 unité de DO = 40 µg/ml pour l'ARN). La qualité de l'extraction est évaluée par mesure de l'absorbance à 280 nm (rapport A_{260nm}/A_{280nm}), spécifique des protéines et à 230 nm (rapport A_{260nm}/A_{230nm}) reflétant des contaminations par des sels présents dans les tampons du kit ou des traces de phénols. Les rapports A_{260nm}/A_{230nm} et A_{260nm}/A_{280nm} doivent être compris entre 1,8 et 2 pour une qualité optimale. Les échantillons sont conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

B. Rétro-transcription des ARNs en ADNc

La rétro-transcription s'effectue à partir de 1 µg d'ARN totaux dilués un volume de 14 µl (QSP eau *RNase-free*) en utilisant le kit M-MLV-RT. Pour rétro-transcrire les ARN messagers (ARNm), 1 µl d'oligonucléotides polydésoxythymidine (oligo(dT)15 ; Promega) est hybridé à la queue polyadénylée des ARNm par une incubation de 5 min à 70 °C au bain marie.

Un mélange réactionnel de 25 µl par condition est réalisé selon le protocole suivant :

Eau stérile <i>nuclease-free</i>	16,5 µl
dNTP (20 mM ; Eurogentec)	2,5 µl
Tampon M-MLV RT 5X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl ₂ 3 mM, DTT 10 mM, Promega)	5 µl
M-MLV Rétro-transcriptase (200 U, Promega)	1 µl
Total	25 µl

Ce mélange réactionnel est alors ajouté aux échantillons et incubé 1 h à 42 °C pour permettre la réaction de rétro-transcription. La rétro-transcriptase est ensuite inhibée par une incubation de 5 min à 94 °C. Après une centrifugation brève, l'ADNc obtenu est dilué par ajout de 60 µl d'eau stérile. Les échantillons sont ensuite conservés à -80 °C jusqu'à utilisation.

C. Extraction d'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique (ADNg) est réalisée à partir d'un petit fragment de l'extrémité de queue (0,5 cm) de nos différents modèles murins au moment du sevrage (entre 21 et 27 jours) en utilisant le kit : *Genomic DNA from tissue-Nucleospin Tissue* (Macherey-Nagel).

Le tissu est vortexé en présence de 180 µl de tampon T1 et 25 µl de protéinase K (20 mg/ml), puis incubé à 56 °C durant la nuit. Afin de retirer les résidus d'os et de poils, la prédigestion est centrifugée à 11000 x g pendant 5 min puis 200 µl de surnageant sont récupérés dans un tube 1,5 ml. La digestion est réalisée à 70 °C par ajout dans ce surnageant de 200 µl de tampon B3 pendant 10 min, sous agitation pour bien homogénéiser et faciliter la réaction.

Les acides nucléiques sont précipités par ajout au lysat de 210 µl d'éthanol puis chargé sur la colonne *NucleoSpin Tissue* et centrifugé 1 min à 11000 x g. La membrane de la colonne est ensuite lavée par 500 µl de tampon BW, centrifugée 1 min à 11000 x g et par 600 µl de tampon B5, centrifugée 1 min à 11000 x g. Une étape de centrifugation à vide supplémentaire peut être ajoutée pour réduire les traces d'éthanol et améliorer la qualité de l'extrait.

Après 1 min d'incubation en présence de 100 µl de tampon d'élution BE préchauffé à 70 °C, l'ADNg est élué par centrifugation 1 min à 11000 x g. L'ADNg est conservé à 4 °C jusqu'au génotypage puis stocké à -20 °C.

D. Polymerase chain reaction

D.1 PCR semi-quantitative

La PCR (*polymerase chain reaction*) semi-quantitative s'effectue à partir de 2,5 µl d'ADNc (RT-PCR) ou 5 µl d'ADNg (génotypage). La réaction est réalisée avec des amorces permettant l'amplification spécifique d'un gène ou d'une région génomique d'intérêt. Pour une bonne amplification, les amorces doivent respecter au mieux les critères suivants : (i) une taille comprise entre 19 et 25 paires de base (bp) ; (ii) un pourcentage de G/C proche de 50 % (acceptable de 40 à 60 %) ; (iii) une température d'hybridation ($T^{\circ}m$) idéalement entre 55 et 65 °C et équivalente entre l'amorce sens et l'anti-sens (écart de 2 °C maximum) et (iv) une taille d'amplicon comprise entre 100 et 700 bp. L'absence de formation d'homodimères, d'hétérodimères et de structures secondaires stables pouvant altérer l'amplification est

vérifiée (utilisation du logiciel *OligoAnalyser 3.1* disponible en ligne sur le site : <http://eu.idtdna.com/analyze/Applications/OligoAnalyzer/>).

Pour chaque gène cible à amplifier, un mélange de réactif de 25 µl est préparé sur glace (4 °C) :

Eau sterile <i>nuclease-free</i>	16,5 µl (ou 15µl)
dNTP (20 mM, Eurogentec)	0,5 µl
Tampon enzyme 10X (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl ₂ 15mM, Roche Diagnostic)	2,5 µl
Amorce sens (5 µM)	1 µl
Amorce anti-sens (5 µM)	1 µl
Taq DNA Polymérase (1 U/µl, Roche Diagnostic)	1 µl
ADNc (ou ADNg)	2,5 µl (ou 5 µl)

La réaction est effectuée sur un *MJMini Personal Thermal Cycler* (Biorad) suivant un programme comprenant :

1 cycle dénaturation	N (25 à 40) cycles			1 cycle extension	arrêt
	dénaturation	hybridation	extension		
94°C	94°C	T ^m (°C)	72°C	72°C	8°C
12 min	45 s	1 min	1 min	10 min	∞

Une fois l'amplification effectuée, les amplicons peuvent être conservés à 4 °C jusqu'à la migration.

Pour détecter l'amplification des gènes cibles, un aliquot de 10 µl des produits de PCR et 3 µl de tampon de charge (250 µl de Tris-HCl, pH 7,6 à 10 mM ; 25 mg de poudre de orange G (C₁₆H₁₀N₂Na₂O₇S₂, PM=452,37 g/mol), 3 ml d'EDTA, pH 8 ; 15 % (p/v) de Ficoll 400 ; QSP 25 ml avec de l'eau stérile) sont déposés en gel d'agarose 1,5 % (p/v) contenant 1/15000 (v/v) de Bromure d'éthidium. 5 µl de marqueur de masse moléculaire (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, 0,5 µg/ml). Les échantillons sont déposés dans un puits et séparés pendant 1 h à

voltage constant (100 V) dans un tampon Borate 1X (Borate 5X : 108 g de Tris ; 55 g d'acide Borique ; 40 ml de Na₂-EDTA, pH 8 ; QSP à 2 l avec de l'H₂O stérile) puis visualisés sur une plaque UV avec l'appareillage GelDoc™ XR+ (BioRad). L'intensité des bandes des gènes cibles est alors intégrée et normalisée (semi-quantification) en utilisant le logiciel Image Quant TL 8.1 (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France).

D.2 PCR quantitative

La réaction de qPCR (PCR quantitative) fonctionne selon le même principe que celui de la PCR semi-quantitative avec l'ajout d'un intercalant fluorescent spécifique de l'ADN double brin, ce qui permet une quantification à chaque cycle de la quantité d'ADN amplifié. Pour chaque cible, le nombre de cycle seuil Ct (*Cycle threshold*), à partir duquel la quantité d'amplicon suffisante pour être détectée, est mesurée. Cette valeur de Ct est directement dépendante de la quantité initiale de cible à amplifier présente dans l'échantillon (plus le Ct est faible plus la quantité initiale est importante). Cette mesure est normalisée par le Ct d'un gène de référence dont l'expression ne varie pas. Les plus fréquemment choisis sont la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ou la sous-unité 60S de la protéine ribosomale large, P0 (RPLP0).

Le choix des amorces est soumis aux mêmes règles que celle de la PCR semi-quantitative avec des tailles d'amplicons plus courtes (de 50 à 150 bp) et une température d'hybridation de 58 à 60 °C. Pour chaque couple d'amorces, une dilution d'ADNc doit être déterminée afin que le Ct obtenu soit optimal (entre 25 et 35). L'efficacité d'amplification doit être déterminée traduisant la quantité d'ADN amplifiée à chaque cycle. Pour déterminer la dilution idéale et l'efficacité d'amplification, une gamme d'ADNc diluée en cascade est réalisée pour chaque couple d'amorces afin d'obtenir une courbe standard d'amplification.

L'amplification est réalisée en plaque 96 puits à fond transparent (96-Well WHT/CLR, HSP9601, Bio-Rad) dans laquelle le mélange réactionnel suivant est réalisé :

Eau RNase/DNase free	6 µl
SsoFast™ EvaGreen® SuperMix 5X (Bio-Rad)	10 µl
Amorces sens (5 µM)	1 µl
Amorces anti-sens (5 µM)	1 µl
ADNc dilué (de 1/10 à 1/1000 selon la cible)	2 µl

Pour chaque échantillon et chaque cible, l'amplification est réalisée en triple. La réaction d'amplification est réalisée selon le programme suivant : (i) un cycle d'activation de l'enzyme de 30 s à 95 °C; 45 cycles comprenant (ii) une étape pour permettre la dénaturation de l'ADN double brin de 4 s à 95 °C et (iii) une étape pour permettre l'hybridation et l'amplification de 4 s à la température d'hybridation. Une courbe de dissociation est réalisée en fin de programme afin de vérifier la spécificité de l'amplification (perte de fluorescence par dénaturation de l'ADN double brin à une température spécifique pour chaque amplicon). Un incrément de température de 0,5 °C toutes les 2 s allant de 55 °C à 95 °C est réalisé avec mesure de la fluorescence émise permettant de réaliser cette courbe de dissociation.

L'analyse des résultats est réalisée grâce au logiciel CFX Manager™ (Bio-Rad) dans lequel le plan de plaque, le type d'échantillon, de fluorescence et le nombre de réplicats doit être renseigné. Le logiciel calcule par puit le Ct. Les variations d'expression entre échantillons ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) sont ensuite déterminées après normalisation par le gène de référence ($\Delta Ct = Ct \text{ gène cible} - Ct \text{ gène de référence}$) et comparaison ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon à tester} - \Delta Ct \text{ échantillon contrôle}$).

Tableau 1 : Amorces nucléotidiques utilisées

Cibles	Sens	Séquences (5'→3')	Utilisation	T ^m (°C)	Taille (bp)
Fabpi (Contrôle)	sens	CAATGGTAGGCTCACTCTGGGA GATGATA	génotypage	60	300
	anti-sens	AACACACACTGGCAGGACTGGC TAGC			
Cre	sens	CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG	génotypage	55	400
	anti-sens	CAGGGTGTTATAAGCAATCCC			
K-ras ^{WT}	sens	GTCGACAAGCTCATGCGGGTG	génotypage	65	500
	anti-sens	CCTTTACAAGCGCACGCAGACT GTAGA			
LStopL- K-ras ^{G12D}	sens	AGCTAGCCACCATGGCTTGAGT AAGTCTGCA	génotypage	68	550
	anti-sens	CCTTTACAAGCGCACGCAGACT GTAGA			
MUC4 promoteur proximal (-430/-241)	sens	CTTTCTTCCCCATTCTTCCC	ChIP	59	189
	anti-sens	GCTCTGCTTCTCATCAGCCT			
MUC4 promoteur distal (-2711/-2598)	sens	CCCAGTTCTCCAGGATCTCA	ChIP	59	113
	anti-sens	CAGCCAGGATACAGGAGGAG			

MUC4 promoteur distal (-3615/-3462)	sens	TCAAATTCCAGCTTTGGGAC	ChIP	60	153
	anti-sens	GCTGCCCTACCTCTCAAGTG			
MUC4	sens	GCCCAAGCTACAGTGTGACTCA	qPCR	58	81
	anti-sens	ATGGTGCCGTTGTAATTTGTTGT			
GAPDH	sens	CTCAACTTTAACTGGAAAGAAT GTC	qPCR	58	70
	anti-sens	TCCTTTTCACCAGCAAGCT			
K-ras	WT sens	AACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG	qPCR	60	113
	G12V sens	AACTTGTGGTAGTTGGAGCTGT			
	anti-sens	CTTCCTGTAGGAATCCTCTATTG			

IV. Bactériologie

A. Transformation bactérienne et sélection clonale

La transformation s'effectue par choc thermique de bactéries compétentes *Escherichia coli* JM109 (Promega). Après décongélation sur glace, 50 µl d'une solution bactérienne sont mélangés avec 3 µl de solution du plasmide purifié. Le mélange est incubé 10 min sur glace. Le choc thermique est réalisé par un passage de 45 s au bain-marie à 42 °C puis un retour sur la glace de 2 min.

Les bactéries transformées sont reprises par 1 ml de milieu de culture *Lysogeny Broth* (LB) sans antibiotique et incubées 1 h à 37 °C pour permettre leur prolifération. Puis, 200 µl de la solution bactérienne sont étalés sur boîte de Pétri contenant du milieu LB-agar avec l'antibiotique de sélection (Ampicilline à 50 µg/ml, LB-Amp50) et incubés sur la nuit à 37 °C. Le lendemain, un clone est sélectionné et amplifié dans un flacon contenant 7 ml de milieu de culture LB-Amp50 (le reste de la boîte de Pétri est conservé à 4 °C). Une fraction aliquote de 1 ml de cette culture sera mélangée avec 1 ml de glycérol stérile pour être conservée à -80 °C.

B. Préparation plasmidique

L'extraction et la purification d'ADN plasmidique s'effectuent en utilisant le kit *NucleoBond[®] Xtra Maxi Plus EF* (Macherey-Nagel).

La souche bactérienne contenant le plasmide d'intérêt est amplifiée dans 250 ml de milieu de culture LB-Amp50 une nuit à 37 °C sous agitation. Le lendemain, les bactéries sont récupérées par une centrifugation à 6000 x g de 15 min à 4 °C. Le culot bactérien, maintenu

sur glace, est resuspendu dans 12 ml de tampon *RES-EF* contenant 100 µg/ml de RNase A. La suspension bactérienne est ensuite lysée par 12 ml de tampon *LYS-EF*, incubée 5 min à température ambiante. La lyse est stoppée sur glace par ajout de 12 ml de tampon *NEU-EF*, incubée 5 min laissant apparaître un précipité. Le lysat est ensuite chargé sur une colonne *NucleoBond® Xtra* qui a préalablement été équilibrée par 35 ml de tampon *EQU-EF*. Un premier lavage par 10 ml de *FIL-EF* est réalisé avant de retirer le filtre contenant les débris bactériens. La membrane des colonnes est ensuite rincée par 90 ml d'*ENDO-EF* pour supprimer les endotoxines présentes, puis par 45 ml de tampon *WASH-EF*.

L'ADN est élué par 15 ml de tampon *ELU-EF* et précipité par l'ajout de 10,5 ml d'isopropanol en vortexant le mélange 2 min à température ambiante. Pour être concentré, l'éluât est filtré à travers le *NucleoBond® Finalizer* pour piéger l'ADN. Ce filtre est rincé par 5 ml d'éthanol 70 % (v/v) *endotoxin-free* puis asséché pour retirer l'éthanol présent en y passant de l'air (7-10 fois). Le filtre est ensuite transféré sur une seringue de 1 ml pour éluer l'ADN par 0,5 à 1 ml de *TE-EF* (l'éluât peut être utilisé pour une seconde élution afin d'optimiser la récupération). La solution d'ADN plasmidique obtenue est ensuite dosée au spectrophotomètre NanoDrop 1000 (mesuré à 260 nm, 1 unité de DO = 50 µg/ml pour l'ADN) (Thermo Scientific) et stockée à 4°C jusqu'à utilisation.

Une fraction de la solution d'ADN plasmidique purifiée est séquencée par la société GATC Biotech pour vérifier la conservation de la séquence initiale.

V. Biochimie

A. Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totales est réalisée à partir de cellules ensemencées en T75 ou en plaque 6 puits selon les besoins. Le tapis cellulaire est rincé par du D-PBS 1X pour retirer les cellules mortes et les débris puis lysé sur glace par 500 µl (par T75) ou 100 µl (par puit) de RIPA (150 mM NaCl, 1,0 % IGEPAL® CA-630, 0,5 % deoxycholate de sodium, 0,1 % SDS, 50 mM Tris, pH 8,0, R0278, Sigma-Aldrich) contenant des inhibiteurs de protéases (Complete ultra tablets, Mini, EASYpack, 05892970001, Roche).

Les cellules lysées sont grattées sur glace et transférées dans un tube 1,5 ml. Le lysat est centrifugé 10 min à 4 °C à 16000 x g puis le surnageant ne contenant pas les débris cellulaires

est récupéré. La quantité de protéines est évaluée par dosage à l'acide bicinchoninique (BCA) puis conservée à -80 °C avant utilisation.

B. Dosage protéique : BCA

La quantité de protéines est évaluée par dosage colorimétrique en utilisant l'acide bicinchoninique (BCA). La réaction utilise la réduction des ions cuivriques ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$) par les liaisons peptidiques en milieu alcalin. Cette réaction entraîne la formation d'un précipité violet dont l'absorbance maximale est à 562 nm qui est mesurée au spectrophotomètre.

La réaction est réalisée en utilisant le kit *BCA Protein Assay* (Pierce) en plaque 96 puits à fond transparent. Une gamme étalon à partir de sérum albumine bovine (BSA) à 2 mg/ml est réalisée suivant les dépôts suivant :

Puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BSA (2 mg/ml)	0 µl (0 µg)	0,5 µl (1 µg)	1 µl (2 µg)	2 µl (4 µg)	4 µl (8 µg)	8 µl (16 µg)						

A la suite de la gamme, 2 µl d'extraits à doser sont déposés par puit en double. L'ensemble des puits est complété par 200 µl de réactif BCA (1 volume de réactif B pour 50 volume de réactive A, selon les recommandations du fabricant) et incubé 1 h à 37 °C. L'absorbance est ensuite mesurée à 562 nm par un lecteur de microplaque Model 680 (Bio-Rad). La quantité de protéines des extraits est déterminée par comparaison avec la gamme étalon.

C. Extraction et dosage luciférase

Le dosage luciférase consiste à mesurer la lumière émise par la *Firefly Luciferase*. Cette enzyme émet de la lumière en catalysant l'oxydation de son substrat, la luciférine, en oxiluciférine en présence d'ATP-Mg²⁺. La réaction s'effectue à partir de cellulesensemencées en plaques 6 puits et transfectées par 1 µg de vecteur rapporteur codant la luciférase sous contrôle d'un fragment de promoteur.

Le tapis cellulaire est rincé par 1 ml de D-PBS 1X pour retirer les cellules mortes. Les cellules sont lysées par une incubation de 15 min avec 110 µl de *Reporter Lysis Buffer IX* (RLB5X, E397A, Promega®) puis grattées pour être récupérées et transférées sur glace dans un tube 1,5 ml. Pour compléter la lyse, les tubes sont vortexés 15 s puis centrifugés 2 min à 4°C à 16000 x g pour éliminer les débris. Le surnageant est isolé dans un tube et peut être conservé à -80 °C jusqu'au dosage.

Le dosage est effectué dans une plaque 96 puits blanche opaque à partir de 20 µl de lysat. La luminescence est mesurée pendant 10 s après ajout de 100 µl de luciférine (*Luciferase Assay Reagent*, E1483, Promega®) en utilisant le lecteur de plaque *Mithras Micro plate Reader LB 940* (Berthold Technologies, France) géré par le logiciel MitroWin2000 sur le plateau technique de l'Université Lille 2 (responsable : Anne-Sophie Drucbert).

Pour chaque extrait, l'absorbance mesurée est normalisée par : (i) la quantité de protéine (déterminée par dosage BCA) ; (ii) la soustraction du bruit de fond mesuré par transfection d'un vecteur rapporteur contrôle codant la luciférase mais sans élément promoteur activateur ; et (iii) par normalisation avec la capacité maximale de production de luciférase de nos cellules, mesurée par transfection d'un vecteur contrôle codant la luciférase sous contrôle du promoteur SV40.

D. Western Blot

Les Western Blot sont réalisés avec 2 types de gels : ceux de polyacrylamide pour les protéines de bas poids moléculaires (entre 10 et 200 kDa) et ceux d'agarose pour la détection de MUC4 (environ 900 kDa).

Les gels de polyacrylamide utilisés pour les protéines de bas poids moléculaires sont des gels commerciaux pré-coulés : NuPAGE® Bis-Tris 4-12%, 1,5 mm d'épaisseur à 10 puits (NP0335BOX, Novex™, Lifes Technologies™), pour la séparation des protéines de 10 à 100 kDa et des gels NuPAGE® Tris-Acetate 3-8 %, 1,5 mm d'épaisseur à 10 puits (EA0378BOX, Novex™, Lifes Technologies™) pour la séparation des protéines de 100 à 200 kDa.

Pour l'étude de MUC4, des gels sont coulés à 2 % (p/v) d'agarose (UltraPur™ Agarose, 16500-500, Invitrogene™), solubilisé dans un tampon Tris-HCl 3M, 0,4 % SDS (v/v), pH 8,8 chauffé aux micro-ondes (volume 250 ml). Le gel est coulé dans une cuve horizontale de 15 x 20 cm à l'extrémité duquel est ajouté un peigne 10 puits. Puis, le gel est laissé à température ambiante pour refroidir et permettre la prise en masse du gel.

Pour les deux types de gels, l'électrophorèse est réalisée à partir d'échantillons dénaturés 5 min à 100 °C, chargés par du bleu de charge (composition du bleu de charge 4X : Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, 0,07752 % (v/v) SDS, 40 % (v/v) glycérol, 20 % (v/v) β-Mercapto-éthanol, 10 % (v/v) bleu de bromophenol, volume finale 20 ml).

Pour les gels polyacrylamide Bis-Tris 4-12 %, une migration de 50 min à voltage constant (200 V) est réalisée dans du tampon NuPAGE[®] MOPS *running buffer* (NP0001, Novex[™], Lifes Technologies[™]) alors que pour les gels polyacrylamide Tris-Acetate 3-8 %, une migration de 1 h à voltage constant (150 V) est réalisée dans du tampon NuPAGE[®] Tris-Acetate SDS *running buffer* (LA0041, Novex[™], Lifes Technologies[™]). Enfin, pour les gels d'agarose MUC4, celle-ci est réalisée pendant 5 à 7 h à voltage constant (100 V) dans du tampon de migration préalablement refroidi (composition : Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,05 % (v/v), volume 2 litre).

Pour les gels de polyacrylamide (Bis-tris et Tris-acetate) un transfert en phase liquide est réalisé à voltage constant (100 V) pendant 1 h sur membrane de nitrocellulose (0,2 µm, Life Technologies[™]). Le gel est placé au contact de la membrane au centre d'une cassette et est maintenu par du papier Whatman et des éponges (orienter la cassette pour avoir le gel du côté de la borne négative et la membrane du côté de la borne positive). Le transfert est réalisé dans une grande cuve Biorad dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, pH 8,3, glycine 192 mM, méthanol 10 % (v/v) et SDS 0,005 % (v/v)) refroidie par un pain de glace à changer après de 30 min pour assurer un bon refroidissement.

Pour les gels d'agarose, un transfert passif est réalisé pendant une nuit sur membrane de nitrocellulose (0,2 µm, Amershan, *GE-Healthcare, Bio-sciences*). Le transfert est réalisé au-dessus d'un pont en papier Whatman dont les bords baignent dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, pH 8,3, glycine 192 mM, méthanol 20 % (v/v) et SDS 0,005 % (v/v)). Le gel, placé retourné au-dessus de ce pont, est recouvert par la membrane au-dessus duquel est placé une pile de papier Watman sec (pour permettre la montée par capillarité du tampon de transfert). Le tout est recouvert par un poids permettant d'éliminer les bulles d'air.

Après le transfert, les membranes sont incubées 2 h à température ambiante dans une solution de lait non-écrémé 10 % (p/v) Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, NaCl 150 mM, Tween[®] 20 0,05 % (v/v) (TBS-T) pour saturer tous les sites aspécifiques et rincées par trois lavages de 5 min avec du TBS-T pour éliminer le surplus de lait.

L'incubation avec l'anticorps primaire (sauf MUC4) est réalisée sur la nuit à 4 °C sous agitation légère. Compte tenu de la taille importante des membranes MUC4, l'incubation avec l'anticorps primaire anti-MUC4 est réalisée en sachets scellés hermétiquement, 2 h à température ambiante sous agitation légère. L'ensemble des incubations avec anticorps

primaire est réalisé en présence de lait non-écrémé 5 % (p/v) TBS-T pour favoriser la spécificité du marquage et limité le bruit de fond.

Un lavage des membranes de 3x5 min est réalisé pour éliminer l'excès d'anticorps primaire avant d'incuber à température ambiante avec l'anticorps secondaire dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire. Les anticorps secondaires sont couplés à la peroxydase de Raifort (HRP) pour permettre l'amplification et la révélation du marquage. La membrane est ensuite lavée 3x5 min au TBS-T.

Les membranes sont incubées 5 min à l'obscurité avec le réactif de chimioluminescence (ECL RevelBIOT® Plus, OZYB0001-5000, Ozyme). La lecture de la luminescence est réalisée grâce au lecteur de film LAS 4000 (Fujifilm) en réalisant des acquisitions à différents temps pour optimiser le signal.

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisé en Western Blot

Cibles	Taille (kDa)	Référence de l'anticorps	Dilution	Espèces
MUC4	900	8G7 (Santa Cruz)	1/200	souris
Ras	21	3965 (Cell Signaling)	1/500	lapin
RalA/B	23/28	sc-28574 (Santa Cruz)	1/200	lapin
p42/44 MAPK	42/44	9102 (Cell Signaling)	1/500	lapin
phospho p42/44 MAPK	42/44	9101 (Cell Signaling)	1/500	lapin
p38 MAPK	38	9212 (Cell Signaling)	1/500	lapin
phospho p38 MAPK	38	9215 (Cell Signaling)	1/500	lapin
p65 NF-kB	65	3987 (Cell Signaling)	1/500	lapin
phospho p65 NF-kB	65	3033 (Cell Signaling)	1/200	lapin
JNK	46/54	9258 (Cell Signaling)	1/500	lapin

phospho JNK	46/54	9251 (Cell Signaling)	1/500	lapin
β -actine	45	A5441 (Sigma-Aldrich)	1/5000	souris

E. Immunoprécipitations de chromatine

Les immunoprécipitations de chromatine (ChIP) sont réalisées à partir de cellules mises en culture en boîtes de Pétri (100 x 20 mm) ou en plaques 6 puits regroupées pour obtenir suffisamment de matériel. Pour réaliser un ChIP, un minimum de 3×10^6 cellules sont nécessaires (*Input*, IgG contrôle, anticorps d'intérêt) avec 10^6 cellules supplémentaires par condition. Un ChIP se réalise en plusieurs étapes : (i) la fixation des cellules pour figer les liaisons ADN-protéines, (ii) la lyse et la fragmentation de la chromatine pour obtenir des petits fragments d'ADN, (iii) l'immunoprécipitation de la protéine d'intérêt et (iv) la purification de l'ADN fixé à la protéine immunoprécipitée.

E.1 Fixation des cellules

La fixation des cellules est réalisée par incubation sous sorbonne, pendant 10 min avec une solution de formaldéhyde 0,1 % (v/v) directement ajoutée dans le milieu de culture. Si trop de débris et cellules mortes sont présents, il est possible de réaliser un lavage au D-PBS 1X avant la fixation et de réaliser celle-ci directement dans le D-PBS. La fixation est stoppée par une incubation de 5 min avec du D-PBS 1X contenant 0,125 M de Glycine (Invitrogen™)

Le tapis cellulaire est ensuite rincé par 5 ml de D-PBS froid puis 2 ml de D-PBS 1X contenant des inhibiteurs de protéases (0,2 mM d'EDTA, 0,5 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), 10 μ g/ml d'Aprotinine et 10 μ g/ml de Leupeptine) et placé sur glace. Enfin, les cellules sont récupérées en grattant le tapis cellulaire (deux fois pour en récupérer un maximum) dans 3 ml puis 2 ml de D-PBS 1X avec inhibiteurs à l'aide de grattoirs refroidis et collectées dans un tube refroidi. La suspension est centrifugée 5 min à 4 °C à 685 x g. Le culot contenant les cellules est récupéré et conservé à -20 °C.

E.2 Lyse et fragmentation de la chromatine

Le culot cellulaire fixé est remis en suspension dans 100 μ l de tampon de lyse pour 10^6 cellules et incubé 10 min sur glace. La suspension est ensuite transférée dans un tube 15 ml pour permettre la fragmentation de la chromatine par sonication en utilisant le Bioruptor (Diagenode). Le programme de sonication consiste à soumettre la suspension à 10 cycles

comprenant 30 s d'impulsion à haute puissance et 30 s de repos (un système de refroidissement relié au Bioruptor permet d'éviter l'échauffement dû à la sonication). Une centrifugation à 10000 x g pendant 10 min à 4 °C permet de se débarrasser des débris et ne conserver que le surnageant contenant la chromatine fragmentée.

E.3 Immunoprécipitation

Une fraction aliquote de 50 µl du surnageant correspondant à l'*Input* est isolée et stockée à -20 °C. Le volume restant de surnageant est séparé en fractions de 100 µl auxquelles sont ajoutées un volume égal contenant 3 µg d'anticorps cible ou la même quantité d'un IgG contrôle (qui doit être fait chez la même espèce que l'anticorps cible). Le mélange anticorps/échantillon est incubé sous rotation à 4 °C sur la nuit pour permettre la formation de complexes anticorps/protéines d'intérêt. Un mélange composé au $\frac{3}{4}$ de billes magnétiques couplées à de la protéine A (Dynabeads[®] Protein A, 100.02D, Invitrogen[™]) et à $\frac{1}{4}$ de billes magnétiques couplées à de la protéine G (Dynabeads[®] Protein G, 100.03D, Invitrogen[™]) repris dans une solution de blocage (5 mg/ml de BSA dans du D-PBS 1X) est préparé pour 10 réactions : 50 µl de billes couplées à la protéine G et 150 µl de billes couplées à la protéine A sont repris dans 1 ml de solution de blocage. Les billes sont isolées grâce à un champ magnétique, rincées 3 fois par 1 ml de solution de blocage puis incubées dans la solution de blocage sur la nuit sous rotation.

L'immunoprécipitation est réalisée en présence de 100 µl du mélange de billes magnétiques incubé 3 h (au minimum) à 4 °C sous rotation avec les complexes anticorps/échantillons. Les billes sont ensuite isolées par champs magnétiques et rincées : 5 fois par 500 µl de *Low Salt Buffer* (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, SDS 0,1 % (v/v) et Triton X-100 1 % (v/v)), 1 fois par 500 µl de *High Salt Buffer* (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 500 mM, EDTA 2 mM, SDS 0,1 % (v/v) et Triton X-100 1 % (v/v)) et par 1 ml de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8 et EDTA 1mM).

Les billes magnétiques sont isolées par un champ magnétique puis centrifugées 3 min à 960 x g pour retirer le TE. Les complexes sont ensuite éluées par 210 µl de tampon d'éluion (Tris-HCl 50 mM, pH 8, EDTA 10 mM et SDS 1 % (v/v)) par et agitation incubation à 65 °C. Pour retirer les billes, l'éluât est centrifugé 1 min à 16000 x g et 200 µl sont transférés dans un nouveau tube.

La fraction *Input* est récupérée et complétée par 200 µl d'eau stérile pour l'étape de réversion qui suit qui consiste à séparer les complexes immuns de ce qui a été immunoprécipité par une incubation à 65 °C sur la nuit en présence de 0,2 M de NaCl.

E.4 Purification des fragments d'ADN

Pour purifier les fragments d'ADN immunoprécipités, une digestion enzymatique des protéines est réalisée. Les échantillons sont dilués dans 200 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8 et EDTA 1mM), puis la digestion est réalisée par une incubation 1 h à 37 °C après ajout de 5 µl de protéinase K (solution mère à 5 mg/ml).

Les fragments d'ADN sont ensuite purifiés en utilisant le kit *Nucleospin[®] PCR clean-up and Gel extraction* (Macherey-Nagel). Les conditions de purification sont ajustées par ajout de 5 volumes (soit 2040 µl) de tampons NTB pour éliminer les traces de SDS présent dans les échantillons. L'ensemble est chargé sur la colonne *NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Column* en plusieurs fois par centrifugations successives de 30 s à 11000 x g. La membrane est rincée 2 fois par 700 µl de tampon NT3 et centrifugé 30 s à 11000 x g. Les traces d'éthanol contenues dans le tampon sont ensuite éliminées par une centrifugation à vide de la colonne 1 min à 11000 x g. Les fragments d'ADN sont élués par 30 µl de tampon NE après incubation 1 min à température ambiante puis récupéré par centrifugation 1 min à 11000 x g.

Pour estimer la quantité d'ADN immunoprécipité, un dosage au spectrophotomètre NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) est réalisé (mesure à 260 nm, avec 1 unité de DO = 50 µg/ml pour l'ADN). Pour détecter la présence ou non d'ADN, témoin de la fixation de la protéine sur la chromatine au moment de la fixation, une PCR semi-quantitative est réalisée à partir de 3 µl de chromatine immunoprécipité selon le protocole suivant :

Tampon enzyme 10X (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 500 mM, Roche)	3 μ l
MgCl ₂ (25 mM, Roche)	3 μ l
dNTP (20 mM, Eurogentec)	2,4 μ l
amorces sens (5 μ M)	1 μ l
amorces anti-sens (5 μ M)	1 μ l
Taq DNA Polymérase Gold (5 U/ μ l, Roche)	0,3 μ l
H ₂ O stérile <i>nucléase-free</i>	16,3 μ l
Chromatine	3 μ l

La réaction est effectuée sur un *MJMini Personal Thermal Cycler* (Bio-Rad) suivant un programme comprenant :

1 cycle	n cycles		1 cycle	arrêt
dénaturation	dénaturation / hybridation / extension		extension	
94 °C	94 °C	T°m	72 °C	8 °C
12 min	45 s	1 min	1 min	∞

Une fois l'amplification effectuée, les amplicons peuvent être conservés à 4°C jusqu'à la migration en gel BET (voir paragraphe PCR semi-quantitatif).

Pour l'analyse des résultats, l'*Input* est le témoin positif. L'intensité des bandes obtenues est quantifiée puis normalisée à l'intensité des bandes obtenues pour la condition IgG contrôle, reflétant le bruit de fond aspécifique (de façon optimale aucune bande n'apparaît).

Pour confirmer les résultats obtenus, des qPCR ciblant des régions génomiques ont également été réalisées à partir des échantillons de ChIP (voir paragraphe PCR quantitative).

F. Immunohistochimie

Les études immunohistochimiques ont été réalisées sur des tissus provenant des souris de nos différents modèles transgéniques. Après sacrifice de l'animal, le tissu pancréatique est

disséqué puis immédiatement immergé dans du formaldéhyde 4 % (v/v) pendant 24 h. Le tissu fixé est ensuite transféré dans de l'éthanol à 70 % (v/v) et conservé à 4 °C jusqu'à son inclusion en paraffine.

L'inclusion en paraffine des tissus fixés est réalisée par le service d'histologie de la Faculté de l'Université de Lille 2, (MH Gevaert et R Siminsky, Université de Lille 2, Pôle Recherche). Les blocs de paraffine sont récupérés et des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées. Ces coupes sont étalées sur des lames SuperFrost® Plus (Menzel-Glaser) prétraitées pour être chargées positivement facilitant l'adhésion du tissu.

La première étape du marquage immunohistochimique consiste à déparaffiner et réhydrater les tissus par bains successifs de 5 min dans deux bains de xylène, suivis de deux bains d'éthanol absolu, d'un bain d'éthanol à 95 % (v/v) et d'un bain d'eau. Un démasquage des sites antigéniques peut être nécessaire pour obtenir un bon marquage. Celui-ci est réalisé par un traitement thermique selon deux méthodes (les deux sont testées lors de la mise au point) : les lames sont chauffées 20 min à 700 W aux micro-ondes dans du tampon citrate 1X, pH 6 (*Dako Real™ Target Retrieval Solution*) ; ou 1 min 30 s à la cocotte-minute dans du tampon citrate 1X, pH 6 en ébullition (*Dako Real™ Target Retrieval Solution*). Les lames sont incubées 30 min pour leur permettre de refroidir avant de progressivement remplacer le tampon par de l'eau du robinet.

Le marquage est réalisé grâce à une peroxydase. Une étape d'inactivation des peroxydases endogènes est donc réalisée par une incubation de 30 min dans une solution d'H₂O₂ 3 % (v/v) diluée dans du D-PBS 1X. Le tissu est rincé par deux bains successifs de 5 min dans du D-PBS 1X et placé dans un portoir porte-lames (Coverslip).

Une étape de perméabilisation et/ou de saturation des sites non spécifiques est ensuite effectuée selon le marquage. Pour réaliser la perméabilisation et la saturation simultanément, les lames sont incubées 30 min dans un tampon Teng-T 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, gélatine 0,25 % (p/v), Tween® 20 0,01 % (v/v)). Si seule la saturation est nécessaire, une incubation dans une solution de BSA 3 % (p/v) est réalisée. Les lames sont ensuite rincées au D-PBS 1X.

L'incubation avec l'anticorps primaire est réalisée par une incubation sur la nuit à 4 °C. Les anticorps sont dilués dans la solution D-PBS, BSA 1 % (p/v), Triton® X100 0,1 % (v/v). Afin de retirer le surplus d'anticorps primaire non fixé, les lames sont rincées 3x5 min avec

du D-PBS 1X. Les lames sont ensuite incubées 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire biotinylé dirigé contre le l'anticorps primaire et dilué dans du D-PBS 1X. Puis, l'excès d'anticorps est éliminé par 4 lavages de 5 min avec du D-PBS 1X. Une incubation pendant 1 h avec de la biotine couplée à la peroxydase de raifort (HRP, *Horseradish peroxidase*) permet la formation de complexes avidine/biotine-peroxydase HRP (Vectastain®, Elite ABC kit, Vector Laboratory) est réalisée pour amplifier le signal et l'excès est éliminé par 6 lavages de 5 min au D-PBS1X.

La révélation est réalisée par une incubation avec le 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich), substrat de la peroxydase HRP entraînant la formation d'un précipité marron. La réaction est arrêtée par une incubation pendant au moins 5 min un bain d'eau. Pour éviter les faux positifs et le bruit de fond, la révélation ne doit pas dépasser les 20 min et doit se faire à l'abri de la lumière. Pour un même anticorps, le temps d'incubation avec la DAB sera le même pour toutes les lames afin de pouvoir les comparer entre elles.

Selon le marquage, une contre-coloration peut être effectuée pour permettre de visualiser les structures du tissu et d'améliorer le contraste. La contre-coloration est obtenue par un marquage à l'hématoxyline non diluée (Sigma-Aldrich) en trempant la lame pendant 1 min dans la solution. La lame est rincée abondamment sous l'eau courante puis, incubée 2 s dans une solution saturée de carbonate de lithium avant d'être rincée à l'eau.

Avant de réaliser le montage des lames, il est nécessaire de déshydrater les tissus. Pour cela, les lames sont immergées pendant 5 min dans un bain d'éthanol à 95 % (v/v), suivi de deux bains d'éthanol absolu et de deux bains de xylène. Enfin, Les lames sont recouvertes par une lamelle de verre fixée avec un produit de montage Pertex (Mounting medium for light microscopy, Histolab) et conservées à température ambiante.

Tableau 3 : Listing des anticorps d'immunohistochimie et conditions d'utilisation.

Cible	Anticorps primaires	Dilution	Anticorps secondaires	Dilution	Spécificité
Muc4	Muc4 1G8 (souris) sc33654 Santa Cruz	1/200	Kit MOM biotinylated anti-IgG reagent, PK2200 Vector		Kit MOM, Contre coloration
Muc1	Muc1 ab5 MH1 (hamster arménien) HM-1630-P1 Labvision Neomarker	1/200	anti-hamster arménien biotinylé, 127-065-160 Jackson	1/1000	1 min 30 à 100°C, Pas de saturation/perméabilisation, Contre-coloration

p38	p38 MAPK (lapin) 9212 Cell Signaling	1/50		1 min 30 à 100°C, Teng-T, Sans contre-coloration
phospho p38	phospho p38 MAPK (lapin) 4631S Cell Signaling	1/50		1 min 30 à 100°C, PBS- BSA 3%, Sans contre- coloration
JNK	JNK (lapin) 9258 Cell Signaling	1/100		
phospho JNK	phospho JNK (lapin) 9251S Cell Signaling	1/50		
p42/44 MAPK	p42/44 MAPK (lapin) 9102 Cell Signaling	1/500	anti-lapin biotinylé, BA-1000 Vector	1/2000
phospho p42/44 MAPK	phospho p42/44 MAPK (lapin) 4377S Cell Signaling	1/100		1 min 30 à 100 °C, Teng-T, Sans contre-coloration
p65 NF-kB	p65 NF-kB (H296) (lapin) sc7151X Santa Cruz	1/500		
Phospho p65 NF-kB	phospho-p65 NF-kB (lapin) sc33020 Santa Cruz	1/100		

VI. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 4.0 (*GraphPad softwares Inc.*, USA). Les différences entre les données ont été évaluées par un test de Student ou par un test ANOVA. La comparaison est établie par un test post-hoc Tukey avec une significativité pour des valeurs p: * p < 0,05, ** p < 0,01 et *** p < 0,001.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Adjei, A. A. (2001) *Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy*. Journal of the National Cancer Institute 1062–1074.
- Aguirre, A. J.; Bardeesy, N.; Sinha, M.; Lopez, L.; Tuveson, D. A. *et al.* (2003) *Activated Kras and Ink4a / Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma*. Genes & development 3112–3126.
- Ahmadian, M. R.; Zor, T.; Vogt, D.; Kabsch, W.; Selinger, Z. *et al.* (1999) *Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 7065–7070.
- Al-Batran, S.-E.; Geissler, M.; Seufferlein, T. and Oettle, H. (2014) *Nab-paclitaxel for metastatic pancreatic cancer: clinical outcomes and potential mechanisms of action..* Oncology research and treatment 128–34.
- Almoguera, C.; Shibata, D.; Forrester, K.; Martin, J.; Arnheim, N. *et al.* (1988) *Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K- ras genes*. Cell 549–554.
- Andrianifahanana, M.; Agrawal, A.; Singh, A. P.; Moniaux, N.; Van Seuningen, I. *et al.* (2005) *Synergistic induction of the MUC4 mucin gene by interferon- γ and retinoic acid in human pancreatic tumour cells involves a reprogramming of signalling pathways*. Oncogene 6143–6154.
- Andrianifahanana, M.; Moniaux, N.; Schmied, B. M.; Ringel, J.; Friess, H. *et al.* (2001) *Mucin (MUC) Gene Expression in Human Pancreatic Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis : A Potential Role of MUC4 as a Tumor*. Clinical Cancer Research 4033–4040.
- Ansari, D.; Urey, C.; Gundewar, C.; Bauden, M. P. and Andersson, R. (2013) *Comparison of MUC4 expression in primary pancreatic cancer and paired lymph node metastases*. Scandinavian journal of gastroenterology 1183–1187.
- Arul, G. S.; Moorghen, M.; Myerscough, N.; Alderson, D. A.; Spicer, R. D. *et al.* (2000) *Mucin gene expression in Barrett's oesophagus: an in situ hybridisation and immunohistochemical study*. Gut 753–61.
- Bafna, S.; Kaur, S.; Momi, N. and Batra, S. K. (2009) *Pancreatic cancer cells resistance to gemcitabine: the role of MUC4 mucin*. British journal of cancer 1155–1161.
- Baines, A. T.; Xu, D. and Der, C. J. (2011) *Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues*. Future medicinal chemistry 1787–1808.
- Bandyopadhyay, S.; Chiang, C.; Srivastava, J.; Gersten, M.; White, S. *et al.* (2011) *A Human MAP Kinase Interactome*. Nature Methods 801–805.

- Bardeesy, N. and Depinho, R. A. (2002) *Pancreatic cancer biology and genetics*. Nature Reviews Cancer 897–909.
- Behera, S. K.; Praharaj, A. B.; Dehury, B. and Negi, S. (2015) *Exploring the role and diversity of mucins in health and disease with special insight into non-communicable diseases*. Glycoconjugate Journal DOI 10.1007/s10719-015-9606-6.
- Bennett, E. P.; Mandel, U.; Clausen, H.; Gerken, T. A.; Fritz, T. A. *et al.* (2012) *Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family*. Glycobiology 736–756.
- Bergo, M. O.; Leung, G. K.; Ambroziak, P.; Otto, J. C.; Casey, P. J. *et al.* (2000) *Targeted inactivation of the isoprenyleysteine carboxyl methyltransferase gene causes mislocalization of K-Ras in mammalian cells*. Journal of Biological Chemistry 17605–17610.
- Bergo, M. O.; Lieu, H. D.; Gavino, B. J.; Ambroziak, P.; Otto, J. C. *et al.* (2004) *On the physiological importance of endoproteolysis of CAAX proteins. Heart-specific Rce1 knockout mice develop a lethal cardiomyopathy*. Journal of Biological Chemistry 4729–4736.
- Berman, J. J.; Albores-Saavedra, J.; Bostwick, D.; DeLellis, R.; Eble, J. *et al.* (2006) *Precancer: A conceptual working definition. Results of a Consensus Conference*. Cancer Detection and Prevention 387–394.
- Besmer, D. M.; Curry, J. M.; Roy, L. D. L. D.; Tinder, T. L.; Sahraei, M. *et al.* (2011) *Pancreatic ductal adenocarcinoma mice lacking mucin 1 have a profound defect in tumor growth and metastasis*. Cancer Research 4432–4442.
- Bhanot, U. and Möller, P. (2009) *Mechanisms of parenchymal injury and signaling pathways in ectatic ducts of chronic pancreatitis: implications for pancreatic carcinogenesis*. Laboratory investigation 489–497.
- Biankin, A. V.; Waddell, N.; Kassahn, K. S.; Gingras, M.; Muthuswamy, L. B. *et al.* (2012) *Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes*. Nature 399–405.
- Birchenough, G. M. H.; Johansson, M. E. V; Gustafsson, J. K.; Bergström, J. H. and Hansson, G. C. (2015) *New developments in goblet cell mucus secretion and function*. Mucosal Immunology 1–8.
- Bodemann, B. O. and White, M. A. (2008) *Ral GTPases and cancer: linchpin support of the tumorigenic platform*. Nature reviews Cancer 133–140.
- Bogoyevitch, M. A. and Kobe, B. (2006) *Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 1061–1095.
- Bos, J. L. (1989) *Ras oncogenes in human cancer: a review*. Cancer research 4682–4689.
- Bos, J. L.; Rehmann, H. and Wittinghofer, A. (2007) *GEFs and GAPs : Critical Elements in the Control of Small G Proteins*. Cell 865–877.

Botta, G. P.; Reginato, M. J.; Reichert, M.; Rustgi, A. K. and Lelkes, P. I. (2012) *Constitutive K-RasG12D activation of ERK2 specifically regulates 3D invasion of human pancreatic cancer cells via MMP-1*. *Molecular Cancer Research* 183–196.

Brunelli, R.; Papi, M.; Arcovito, G.; Bompiani, A.; Castagnola, M. *et al.* (2007) *Globular structure of human ovulatory cervical mucus*. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 3872–3876.

Bryant, K. L.; Mancias, J. D.; Kimmelman, A. C. and Der, C. J. (2014) *KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation*. *Trends in biochemical sciences* 91–100.

Brychtova, V.; Hermanová, M. and Karasek, P. (2014) *Mucin 4 Expression Mirrors Tumor Cell Differentiation in Pancreatic Adenocarcinomas, But Aberrant Anterior Gradient 2 Expression Predicts Worse Patient Outcome*. *Pancreas* 75–81.

Buisine, M.-P.; Devisme, L.; Copin, M.; Durand-Reville, M.; Gosselin, B. *et al.* (1999) *Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract*. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 209–218.

Buisine, M.-P.; Devisme, L.; Degand, P.; Dieu, M.-C. C.; Gosselin, B. *et al.* (2000a) *Developmental mucin gene expression in the gastroduodenal tract and accessory digestive glands. II. Duodenum and liver, gallbladder, and pancreas*. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1667–1676.

Buisine, M.-P.; Devisme, L.; Maunoury, V.; Deschodt, E.; Gosselin, B. *et al.* (2000b) *Developmental mucin gene expression in the gastroduodenal tract and accessory digestive glands. I. Stomach: A Relationship to Gastric Carcinoma*. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1657–1665.

Campbell, P. M.; Singh, A.; Williams, F. J.; Frantz, K.; Ülkü, A. S. *et al.* (2006) *Genetic and pharmacologic dissection of Ras effector utilization in oncogenesis*. *Methods in Enzymology* 195–217.

Campbell, P. J.; Yachida, S.; Mudie, L. J.; Stephens, P. J.; Pleasance, E. D. *et al.* (2010) *The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer*. *Nature* 1109–1113.

Cancer Research UK. (2014) *Cancer Survival*. <http://www.cancerresearchuk.org/>.

Candeil, L.; Gourdiér, I.; Peyron, D.; Vezzio, N.; Copois, V. *et al.* (2004) *ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases*. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 848–854.

Capon, D. J.; Seeburg, P. H.; McGrath, J. P.; Hayflick, J. S.; Edman, U. *et al.* (1983) *Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations*. *Nature* 507–513.

Carraway, K. L.; Ramsauer, V. P.; Haq, B. and Carraway, C. A. C. (2003) *Cell signaling through membrane mucins*. *Bioessays* 66–71.

- Cascone, I.; Selimoglu, R.; Ozdemir, C.; Nery, E. Del; Yeaman, C. *et al.* (2008) *Distinct roles of RalA and RalB in the progression of cytokinesis are supported by distinct RalGEFs*. The EMBO journal 2375–2387.
- Castellano, E. and Santos, E. (2011) *Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different*. Genes & cancer 216–231.
- Chapnick, D. A.; Warner, L.; Bernet, J.; Rao, T. and Liu, X. (2011) *Partners in crime: the TGF β and MAPK pathways in cancer progression*. Cell & Bioscience 42.
- Chaturvedi, M. M.; Sung, B.; Yadav, V. R.; Kannapan, R. and Aggarwal, B. B. (2011) *NF- κ B addiction and its role in cancer: “one size does not fit all”*. Oncogene 1615–1630.
- Chaturvedi, P.; Singh, A. P. and Batra, S. K. (2008a) *Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin*. The FASEB Journal 966–81.
- Chaturvedi, P.; Singh, A. P.; Chakraborty, S.; Chauhan, S. C.; Bafna, S. *et al.* (2008b) *MUC4 mucin interacts with and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells*. Cancer research 2065–70.
- Chaturvedi, P.; Singh, A. P.; Moniaux, N.; Senapati, S.; Chakraborty, S. *et al.* (2007) *MUC4 mucin potentiates pancreatic tumor cell proliferation, survival, and invasive properties and interferes with its interaction to extracellular matrix proteins*. Molecular Cancer Research 309–320.
- Chen, G.; Oh, S.; Monia, B. P. and Stacey, D. W. (1996) *Antisense oligonucleotides demonstrate a dominant role of c-Ki-RAS proteins in regulating the proliferation of diploid human fibroblasts*. Journal of Biological Chemistry 28259–28265.
- Del Chiaro, M.; Segersvärd, R.; Löhr, M. and Verbeke, C. (2014) *Early detection and prevention of pancreatic cancer: Is it really possible today?*. World journal of gastroenterology : WJG 12118–12131.
- Chong, H.; Vikis, H. and Guan, K. (2003) *Mechanisms of regulating the Raf kinase family*. Cellular signalling 463–469.
- Choti, M. A.; Dixon, E. and Tyler, D. (2009) *Pretreatment assessment of resectable and borderline resectable pancreatic cancer: expert consensus statement*. Annals of surgical oncology 1734–1735.
- Ciccarelli, F. D.; Doerks, T. and Bork, P. (2002) *AMOP, a protein module alternatively spliced in cancer cells*. Trends in Biochemical Sciences 113–115.
- Collins, M. A.; Bednar, F.; Zhang, Y.; Brisset, J.-C.; Galbán, S. *et al.* (2012a) *Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice*. The Journal of clinical investigation 639–653.
- Collins, M. A.; Brisset, J.-C.; Zhang, Y.; Bednar, F.; Pierre, J. *et al.* (2012b) *Metastatic pancreatic cancer is dependent on oncogenic Kras in mice*. PloS one e49707.

- Conroy, T.; Desseigne, F.; Ychou, M.; Bouché, O.; Guimbaud, R. *et al.* (2011) *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. The New England journal of medicine 1817–1825.
- Corrales, R. M.; Calonge, M.; Herreras, J. M.; Saez, V.; Mayo, A. *et al.* (2003) *Levels of mucin gene expression in normal human conjunctival epithelium in vivo*. Current Eye Research 323–328.
- Court, H.; Amoyel, M.; Hackman, M.; Lee, K. E.; Xu, R. *et al.* (2013) *Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase deficiency exacerbates KRAS-driven pancreatic neoplasia via Notch suppression*. Journal of Clinical Investigation 123:4681–4694.
- Cox, A. D. and Der, C. J. (2010) *Ras history*. Small GTPases 2–27.
- Cox, A. D.; Der, C. J. and Philips, M. R. (2015) *Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery?*. Clinical Cancer Research 18:1819–1827.
- Cox, A. D.; Fesik, S. W.; Kimmelman, A. C.; Luo, J. and Der, C. J. (2014) *Drugging the undruggable RAS: Mission Possible?*. Nature reviews. Drug discovery 13:828–851.
- Cuadrado, A. and Nebreda, A. R. (2010) *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. The Biochemical Journal 423:403–417.
- Cuenda, A. and Rousseau, S. (2007) *p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases*. Biochimica et Biophysica Acta 1573:1358–1375.
- Van Cutsem, E.; van de Velde, H.; Karasek, P.; Oettle, H.; Vervenne, W. L. *et al.* (2004) *Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 22:1430–1438.
- Van Dam, T. J. P.; Bos, J. L. and Snel, B. (2011) *Evolution of the Ras-like small GTPases and their regulators*. Small GTPases 4–16.
- Daniluk, J.; Liu, Y.; Deng, D.; Chu, J.; Huang, H. *et al.* (2012) *An NF- κ B pathway-mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice*. The Journal of clinical investigation 122:1519–1528.
- Das, S.; Rachagani, S.; Sheinin, Y.; Smith, L. M.; Gurumurthy, C. B. *et al.* (2015) *Mice deficient in Muc4 are resistant to experimental colitis and colitis-associated colorectal cancer*. Oncogene 34:1–10.
- Deer, E.; González-Hernández, J. and Coursen, J. (2010) *Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines*. Pancreas 39:425–435.
- Dekker, J.; Rossen, J. W. A.; Büller, H. A. and Einerhand, A. W. C. (2002) *The MUC family: An obituary*. Trends in Biochemical Sciences 27:126–131.

- Desseyn, J.-L.; Clavereau, I. and Laine, A. (2002) *Cloning, chromosomal localization and characterization of the murine mucin gene orthologous to human MUC4*. European Journal of Biochemistry 3150–3159.
- Desseyn, J.-L.; Tetaert, D. and Gouyer, V. (2008) *Architecture of the large membrane-bound mucins*. Gene 215–222.
- Distler, M.; Aust, D.; Weitz, J.; Pilarsky, C. and Grützmann, R. (2014) *Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN*. BioMed Research International 1–11.
- Downward, J. (2003) *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. Nature Reviews Cancer 11–22.
- Drosten, M.; Dhawahir, A.; Sum, E. Y.; Urosevic, J.; Lecuga, C. G. *et al.* (2010) *Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival*. The EMBO journal 1091–1104.
- Dudeja, V. and Allen, P. J. (2015) *Premalignant Cystic Neoplasms of the Pancreas*. Seminars in Oncology 70–85.
- Eferl, R. and Wagner, E. F. (2003) *AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis*. Nature Reviews Cancer 859–868.
- Elad-Sfadia, G.; Haklai, R.; Balan, E. and Kloog, Y. (2004) *Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity*. Journal of Biological Chemistry 34922–34930.
- End, D. W.; Smets, G.; Todd, A. V; Applegate, T. L.; Fuery, C. J. *et al.* (2001) *Characterization of the Antitumor Effects of the Selective Farnesyl Protein Transferase Inhibitor R115777 in Vivo and in Vitro*. Cancer research 131–137.
- Endo, H.; Watanabe, T.; Sugioka, Y.; Niioka, M.; Inagaki, Y. *et al.* (2009) *Activation of two distinct MAPK pathways governs constitutive expression of matrix metalloproteinase-1 in human pancreatic cancer cell lines*. International journal of oncology 1237–1245.
- Erkan, M.; Hausmann, S.; Michalski, C. W.; Fingerle, A. A.; Dobritz, M. *et al.* (2012) *The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications*. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 454–467.
- Escande, F.; Lemaitre, L.; Moniaux, N.; Batra, S. K.; Aubert, J. *et al.* (2002) *Genomic organization of MUC4 mucin gene: Towards the characterization of splice variants*. European Journal of Biochemistry 3637–3644.
- Evans, D. B.; Pisters, P. W. T. and Abbruzzese, J. L. (2002) *Pancreatic Cancer* Springer.
- Fauquette, V.; Aubert, S.; Groux-Degroote, S.; Hénon, B.; Porchet, N. *et al.* (2007) *Transcription factor AP-2 α represses both the mucin MUC4 expression and pancreatic cancer cell proliferation*. Carcinogenesis 2305–2312.

- Fauquette, V.; Perrais, M.; Cerulis, S.; Jonckheere, N.; Ducourouble, M. *et al.* (2005) *The antagonistic regulation of human MUC4 and ErbB-2 genes by the Ets protein PEA3 in pancreatic cancer cells: implications for the proliferation/differentiation balance in the cells.* The Biochemical Journal 35–45.
- Feig, L. A. (1999) *Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases.* Nature cell biology 25–27.
- Feig, L. A.; Urano, T. and Cantor, S. (1996) *Evidence for a Ras/Ral signaling cascade.* Trends in biochemical sciences 438–441.
- Ferlay, J.; Steliarova-Foucher, E.; Lortet-Tieulent, J.; Rosso, S.; Coebergh, J. W. W. *et al.* (2013) *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012.* European journal of cancer (Oxford, England : 1990) 1374–403.
- Fernández-del Castillo, C. and Adsay, N. V. (2010) *Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas.* Gastroenterology 708–713.e2.
- Finco, T. S.; Westwick, J. K.; Norris, J. L.; Beg, A. A.; Der, C. J. *et al.* (1997) *Oncogenic Ha-Ras-induced Signaling Activates NF-kappa B Transcriptional Activity , Which Is Required for Cellular Transformation.* The Journal of biological chemistry 24113–24116.
- Finegan, K. G.; Perez-madrugal, D.; Hitchin, J. R.; Davies, C.; Jordan, A. M. *et al.* (2015) *ERK5 is a critical mediator of inflammation-driven cancer.* Cancer research 742–753.
- Frankel, P.; Aronheim, A.; Kavanagh, E.; Balda, M. S.; Matter, K. *et al.* (2005) *RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity.* The EMBO journal 54–62.
- Fujioka, S.; Niu, J.; Schmidt, C.; Sclabas, G. M.; Peng, B. *et al.* (2004) *NF-kappa B and AP-1 Connection : Mechanism of NF-kappa B-Dependent Regulation of AP-1 Activity.* Molecular and cellular biology 7806–7819.
- Furukawa, T. (2015) *Impacts of Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Pancreatic Cancer.* Frontiers in Oncology 1–5.
- Furukawa, T.; Duguid, W. P.; Rosenberg, L.; Viallet, J.; Galloway, D. A. *et al.* (1996) *Long-Term Culture and Immortalization of Epithelial Cells from Normal Adult Human Pancreatic Ducts Transfected by E6E7 Gene of Human Papilloma Virus 16.* American journal of pathology 1763–1770.
- Garrington, T. and Johnson, G. (1999) *Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways.* Current opinion in cell biology 211–218.
- Gentry, L. R.; Martin, T. D.; Reiner, D. j and Der, C. J. (2014) *Ral small GTPase signaling and oncogenesis: More than just 15minutes of fame.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 2976–2988.

- Gipson, I. K.; Ho, S. B.; Spurr-Michaud, S. J.; Tisdale, a S.; Zhan, Q. *et al.* (1997) *Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia*. *Biology of reproduction* 999–1011.
- Glavey, S. V; Huynh, D.; Reagan, M. R.; Manier, S.; Moschetta, M. *et al.* (2015) *The cancer glycome: Carbohydrates as mediators of metastasis..* *Blood reviews*.
- Golan, T.; Khvalevsky, E. Z.; Hubert, A.; Gabai, R. M.; Hen, N. *et al.* (2015) *RNAi therapy targeting KRAS in combination with chemotherapy for locally advanced pancreatic cancer patients*. *Oncotarget* 24560–24570.
- Goldstein, D.; El-Maraghi, R. H.; Hammel, P.; Heinemann, V.; Kunzmann, V. *et al.* (2015) *nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer: Long-Term Survival From a Phase III Trial*. *Journal of the National Cancer Institute* dju413.
- González, J. M.; Navarro-puche, A.; Casar, B.; Crespo, P. and Andrés, V. (2008) *Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope*. *Journal of cell biology* 653–666.
- Gross, M. S.; Guyonnet-Duperat, V.; Porchet, N.; Bernheim, A.; Aubert, J. *et al.* (1992) *Mucin 4 (MUC4) gene: regional assignment (3q29) and RFLP analysis*. *Annales de génétique* 21–6.
- Guerra, C.; Mijimolle, N. and Dhawahir, A. (2003) *Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context*. *Cancer cell* 111–120.
- Guerra, C.; Schuhmacher, A. J.; Cañamero, M.; Grippo, P. J.; Verdaguer, L. *et al.* (2007) *Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice*. *Cancer cell* 291–302.
- Guerrero, S.; Casanova, I.; Farré, L.; Mazo, A.; Capella, G. *et al.* (2000) *K- ras Codon 12 Mutation Induces Higher Level of Resistance to Apoptosis and Predisposition to Anchorage-independent Growth Than Codon 13 Mutation or Proto-Oncogene Overexpression*. *Cancer research* 6750–6756.
- Gukovskaya, A. S.; Gukovsky, I.; Jung, Y.; Mouria, M. and Pandol, S. J. (2002) *Cholecystokinin Induces Caspase Activation and Mitochondrial Dysfunction in Pancreatic Acinar Cells. Roles in cell injury processes of pancreatitis*. *Journal of Biological Chemistry* 22595–22604.
- Hamad, N. M.; Elconin, J. H.; Karnoub, A. E.; Bai, W.; Rich, J. N. *et al.* (2002) *Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells*. *Genes & development* 2045–2057.
- Handra-Luca, A.; Lamas, G.; Bertrand, J.-C. and Fouret, P. (2005) *MUC1, MUC2, MUC4, and MUC5AC expression in salivary gland mucoepidermoid carcinoma: diagnostic and prognostic implications*. *The American journal of surgical pathology* 881–889.

- Handra-Luca, A.; Lesty, C.; Hammel, P.; Sauvanet, A.; Rebours, V. *et al.* (2012) *Biological and prognostic relevance of mitogen-activated protein kinases in pancreatic adenocarcinoma*. *Pancreas* 416–421.
- Hansson, G. C. (2012) *Role of mucus layers in gut infection and inflammation*. *Current Opinion in Microbiology* 57–62.
- Harvey, J. J. (1964) *An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumors in Mice*. *Nature* 1212–1213.
- Hattrup, C. L. and Gendler, S. J. (2008) *Structure and function of the cell surface (tethered) mucins*. *The Annual Review of Physiology* 431–457.
- Henry, D. O.; Moskalenko, S. A.; Kaur, K. J.; Fu, M.; Pestell, R. G. *et al.* (2000) *Ral GTPases contribute to regulation of cyclin D1 through activation of NF- κ B*. *Molecular and cellular biology* 8084–8092.
- Hermanová, M.; Lukáš, Z.; Nenutil, R.; Brázdil, J.; Kroupová, I. *et al.* (2004) *Amplification and overexpression of HER-2/neu in invasive ductal carcinomas of the pancreas and pancreatic intraepithelial neoplasms and the relationship to the expression of p21WAF1/CIP1*. *Neoplasma* 77–83.
- Herrmann, C. (2003) *Ras-effector interactions: After one decade*. *Current Opinion in Structural Biology* 122–129.
- Herrmann, C. and Nassar, N. (1997) *Ras and its effectors*. *progress in biophysics and molecular biology* 1–41.
- Hezel, A. F.; Kimmelman, A. C.; Stanger, B. Z.; Bardeesy, N. and Depinho, R. A. (2006) *Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Genes & development* 1218–1249.
- Higashi, M.; Yokoyama, S.; Yamamoto, T.; Goto, Y.; Kitazono, I. *et al.* (2015) *Mucin Expression in Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration Specimens Is a Useful Prognostic Factor in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *pancreas*.
- Hijikata, M.; Matsushita, I.; Tanaka, G.; Tsuchiya, T.; Ito, H. *et al.* (2011) *Molecular cloning of two novel mucin-like genes in the disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis*. *Human Genetics* 117–128.
- Hingorani, S. R.; Petricoin, E. f; Maitra, A.; Rajapakse, V.; King, C. *et al.* (2003) *Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse*. *Cancer cell* 437–450.
- Hofmann, I.; Weiss, A.; Elain, G.; Schwaederle, M.; Sterker, D. *et al.* (2012) *K-RAS mutant pancreatic tumors show higher sensitivity to MEK than to PI3K inhibition in vivo*. *PLoS one* e44146.

Holcomb, B.; Yip-Schneider, M. T. and Schmidt, C. M. (2008) *The Role of Nuclear Factor κ B in Pancreatic Cancer and the Clinical Applications of Targeted Therapy*. *Pancreas* 225–235.

Hollingsworth, M. A. and Swanson, B. J. (2004) *Mucins in cancer: protection and control of the cell surface*. *Nature Reviews Cancer* 45–60.

Horn, A.; Chakraborty, S.; Dey, P.; Haridas, D.; Soucek, J. *et al.* (2013) *Immunocytochemistry for MUC4 and MUC16 is a useful adjunct in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma on fine-needle aspiration cytology*. *Archives of pathology & Laboratory Medicine* 546–551.

Hruban, R. H.; Adsay, N. V.; Albores-Saavedra, J.; Compton, C.; Garrett, E. S. *et al.* (2001) *Pancreatic intraepithelial neoplasia a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions*. *the american journal of surgical pathology* 579–586.

Hruban, R. H.; Goggins, M.; Parsons, J. and Kern, S. E. (2000) *Progression Model for Pancreatic Cancer*. *Clinical cancer research* 2969–2972.

Hruban, R. H.; Maitra, A.; Kern, S. E. and Goggins, M. (2007) *Precursors to Pancreatic Cancer*. *Gastroenterology* 1–26.

Hui, L.; Bakiri, L.; Stepniak, E. and Wagner, E. F. (2007) *p38 α* . *Cell Cycle* 2429–2433.

Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E. *et al.* (2011) *Global cancer statistics*. *CA: a cancer journal for clinicians* 69–90.

Ji, B.; Tsou, L.; Wang, H.; Gaiser, S.; Chang, D. Z. *et al.* (2010) *Ras Activity Levels Control the Development of Pancreatic Diseases*. *Gastroenterology* 1072–1082.

Joerger, M. (2014) *Metabolism of the taxanes including nab-paclitaxel*. *expert opinion on drug metabolism and toxicology* 1–12.

Johansson, M. E. V; Larsson, J. M. H. and Hansson, G. C. (2011) *The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 4659–4665.

Johnson, G. L. and Lapadat, R. (2002) *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. *Science* 1911–1912.

Jonckheere, N.; Perrais, M.; Mariette, C.; Batra, S. K.; Aubert, J. *et al.* (2004) *A role for human MUC4 mucin gene, the ErbB2 ligand, as a target of TGF- β in pancreatic carcinogenesis*. *Oncogene* 5729–5738.

Jonckheere, N. and Van Seuningen, I. (2008) *The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies*. *Critical reviews in oncogenesis* 177–196.

- Jonckheere, N. and Van Seuning, I. (2010) *The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers*. *Biochimie* 1–11.
- Jonckheere, N.; Skrypek, N.; Frénois, F. and Van Seuning, I. (2013) *Membrane-bound mucin modular domains: from structure to function*. *Biochimie* 1077–1086.
- Jonckheere, N.; Skrypek, N.; Merlin, J.; Dessein, A. F.; Dumont, P. *et al.* (2012) *The mucin MUC4 and its membrane partner ErbB2 regulate biological properties of human capan-2 pancreatic cancer cells via different signalling pathways*. *PLoS one* e32232.
- Jonckheere, N.; Skrypek, N. and Van Seuning, I. (2010) *Mucins and pancreatic cancer*. *Cancers* 1794–1812.
- Jonckheere, N.; Vincent, A.; Perrais, M.; Ducourouble, M.; Korteland-van Male, A. *et al.* (2007) *The human mucin MUC4 is transcriptionally regulated by caudal-related homeobox, hepatocyte nuclear factors, forkhead box A, and GATA endodermal transcription*. *Journal of Biological Chemistry* 22638–22650.
- Jones, S.; Zhang, X.; Parsons, W. D.; Lin, J. C.; Leary, R. J. *et al.* (2008) *Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses*. *Science* 1801–1806.
- Joyce, D.; Albanese, C.; Steer, J.; Fu, M.; Bouzahzah, B. *et al.* (2001) *NF- κ B and cell-cycle regulation: The cyclin connection*. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 73–90.
- Kanda, M.; Matthaei, H.; Wu, J.; Hong, S.-M.; Yu, J. *et al.* (2013) *Presence of Somatic Mutations in Most Early-Stage Pancreatic Intraepithelial Neoplasia*. *Gastroenterology* 730–733.
- Kang, R. and Tang, D. (2012) *Autophagy in pancreatic cancer pathogenesis and treatment*. *American journal of cancer research* 383–396.
- Khvalevsky, E. Z.; Gabai, R.; Rachmut, I. H.; Horwitz, E.; Brunshwing, Z. *et al.* (2013) *Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 20723–20728.
- Kidd, A. R.; Snider, J. L.; Martin, T. D.; Groboski, Sarah F.; Der, C. J. *et al.* (2011) *The Ras-related small GTPases RalA and RalB regulate cellular survival after ionizing radiation*. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 205–212.
- Kim, M.; Lee, E.; Kim, H.-R. C. and Moon, A. (2003) *p38 Kinase Is a Key Signaling Molecule for H-Ras-induced Cell Motility and Invasive Phenotype in Human Breast Epithelial Cells*. *Cancer research* 5454–5461.
- Kim, S. K. and MacDonald, R. J. (2002) *Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis*. *Current Opinion in Genetics and Development* 540–547.
- Kirsten, W. H. and Mayer, L. A. (1967) *Morphologic Responses to a Murine Erythroblastosis Virus*. *Journal of the National Cancer Institute* 311–335.

- Komatsu, M.; Carraway, C. A. C.; Fregien, N. L. and Carraway, K. L. (1997) *Reversible Disruption of Cell-Matrix and Cell-Cell Interactions by Overexpression of Sialomucin Complex*. Journal of Biological Chemistry 33245–33254.
- Kopp, J. L.; von Figura, G.; Mayes, E.; Liu, F.-F.; Dubois, C. L. *et al.* (2012) *Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Cancer cell 737–50.
- Korc, M. (2014) *p38 MAPK in Pancreatic Cancer: Finding a Protective Needle in the Haystack*. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research 5866–5868.
- Kunigal, S.; Ponnusamy, M. P.; Momi, N.; Batra, S. K. and Chellappan, S. P. (2012) *Nicotine, IFN- γ and retinoic acid mediated induction of MUC4 in pancreatic cancer requires E2F1 and STAT-1 transcription factors and utilize different signaling cascades*. Molecular cancer 1–13.
- Kyriazis, A. A.; Kyriazis, A. P.; Sternberg, C. N.; Sloane, N. H. and Loveless, J. D. (1986) *Morphological, Biological, Biochemical, and Karyotypic Characteristics of Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Capan-2 in Tissue Culture and the Nude Mouse*. Cancer research 5810–5815.
- Kyriazis, A. P.; Kyriazis, A. A.; Scarpelli, D. G.; Fogh, J.; Rao, M. S. *et al.* (1982) *Human pancreatic adenocarcinoma line Capan-1 in tissue culture and the nude mouse: morphologic, biologic, and biochemical characteristics*. The American journal of pathology 250–260.
- Lahdaoui, F.; Delpu, Y.; Vincent, A.; Renaud, F.; Messenger, M. *et al.* (2014) *miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer*. Oncogene 780–788.
- Laheru, D. A.; Shah, P.; Rajeshkumar, N.; McAllister, F.; Taylor, G. *et al.* (2013) *Integrated preclinical and clinical development of S-trans, trans-farnesylthiosalicylic acid (FTS, Salirasib) in pancreatic cancer*. Investigational new drugs 2391–2399.
- Lakshmanan, I.; Seshacharyulu, P.; Haridas, D.; Rachagani, S.; Gupta, S. *et al.* (2015) *Novel HER3 / MUC4 oncogenic signaling aggravates the tumorigenic phenotypes of pancreatic cancer cells*. Oncotarget 21085–21099.
- Lang, T.; Hansson, G. C. and Samuelsson, T. (2007) *Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 16209–16214.
- Lee, K. M.; Nguyen, C.; Ulrich, A. B.; Pour, P. M. and Ouellette, M. M. (2003) *Immortalization with telomerase of the Nestin-positive cells of the human pancreas*. Biochemical and biophysical research communications 1038–1044.
- Levy, P. (2006) *Maladies du Pancréas: savoir utile!* MEDI-TEXT. 1–155.
- Lidell, M. E. and Hansson, G. C. (2006) *Cleavage in the GDPH sequence of the C-terminal cysteine-rich part of the human MUC5AC mucin*. Biochemical Journal 121–129.

- Lim, K.; Baines, A. T.; Fiordalisi, J. J.; Shipitsin, M.; Feig, L. A. *et al.* (2005) *Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells.* *Cancer cell* 533–545.
- Lim, K.; O’Hayer, K.; Adam, S. J.; Kendall, S. D.; Campbell, P. M. *et al.* (2006) *Divergent Roles for RalA and RalB in Malignant Growth of Human Pancreatic Carcinoma Cells.* *Current Biology* 2385–2394.
- Lim, S. M.; Westover, K. D.; Ficarro, S. B.; Harrison, R. A.; Choi, hwan geun *et al.* (2014) *Therapeutic Targeting of Oncogenic K-Ras by a Covalent Catalytic Site Inhibitor.* *Angewandte Chemie International Edition in English* 199–204.
- Ling, J.; Kang, Y.; Zhao, R.; Xia, Q.; Lee, D.-F. *et al.* (2012) *KrasG12D-induced IKK2/β/NF-κB activation by IL-1α and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma.* *Cancer cell* 105–120.
- Liptay, S.; Weber, C. K.; Ludwig, L.; Wagner, M.; Adler, G. *et al.* (2003) *Mitogenic and antiapoptotic role of constitutive NF-kappaB/Rel activity in pancreatic cancer.* *International journal of cancer. Journal international du cancer* 735–746.
- Lito, P.; Rosen, N. and Solit, D. B. (2013) *Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors.* *Nature medicine* 1401–1409.
- Liu, B.; Lague, J. R.; Nunes, D. P.; Toselli, P.; Oppenheim, F. G. *et al.* (2002) *Expression of membrane-associated mucins MUC1 and MUC4 in major human salivary glands.* *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 811–820.
- Liu, F.; Gore, A. J.; Wilson, J. L. and Korc, M. (2014) *DUSP1 Is a Novel Target for Enhancing Pancreatic Cancer Cell Sensitivity to Gemcitabine.* *PloS one* e84982.
- Llinares, K.; Escande, F.; Aubert, S.; Buisine, M.-P.; De Bolos, C. *et al.* (2004) *Diagnostic value of MUC4 immunostaining in distinguishing epithelial mesothelioma and lung adenocarcinoma.* *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 150–157.
- Löhr, M.; Klöppel, G.; Maisonneuve, P.; Lowenfels, A. B. and Lüttges, J. (2005) *Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis.* *Neoplasia* 17–23.
- Lomako, W. M.; Lomako, J.; Soto, P.; Carraway, C. A. C. and Carraway, K. L. (2010) *TGFβ Regulation of Membrane Mucin Muc4 via Proteasome Degradation.* *Journal of Cellular Biochemistry* 797–802.
- LoRusso, P. M.; Adjei, A. A.; Varterasian, M.; Gadgeel, S.; Reid, J. *et al.* (2005) *Phase I and pharmacodynamic study of the oral MEK inhibitor CI-1040 in patients with advanced malignancies.* *Journal of Clinical Oncology* 5281–5293.
- De Luca, A.; Maiello, M. R.; D’Alessio, A.; Pergameno, M. and Normanno, N. (2012) *The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches.* *Expert Opinion on therapeutic targets* S17–S27.

- Macao, B.; Johansson, D. G. A.; Hansson, G. C. and Hård, T. (2006) *Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin*. Nature structural & molecular biology 71–76.
- Mackey, J. R.; Mani, R. S.; Selner, M.; Mowles, D.; Young, J. D. *et al.* (1998) *Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines*. Cancer Research 4349–4357.
- Maddipati, R. and Stanger, B. Z. (2015) *Pancreatic Cancer Metastases Harbor Evidence of Polyclonality*. Cancer Discovery.
- Maire, F.; Micard, S.; Hammel, P.; Voitot, H.; Lévy, P. *et al.* (2002) *Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: value of the detection of KRAS2 mutations in circulating DNA*. British journal of cancer 551–554.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2003) *RAS oncogenes: the first 30 years*. Nature Reviews Cancer 7–13.
- Martin, T. D. and Der, C. J. (2012) *Differential involvement of RalA and RalB in colorectal cancer*. Small GTPases 126–130.
- McGrath, J. P.; Capon, D. J.; Smith, D. H.; Chen, E. Y.; Seeburg, P. H. *et al.* (1983) *Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene*. Nature 501–506.
- McWilliams, R.; Highsmith, W.; Rabe, K.; De Andrade, M.; Tordsen, L. *et al.* (2005) *Cystic fibrosis transmembrane regulator gene carrier status is a risk factor for young onset pancreatic adenocarcinoma*. Gut 1661–1662.
- Mercurio, F. and Manning, A. (1999) *Multiple signals converging on NF- κ B*. Current opinion in cell biology 226–232.
- Merlin, J.; Stechly, L.; de Beaucé, S.; Monté, D.; Leteurtre, E. *et al.* (2011) *Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells*. Oncogene 2514–2525.
- Milde-Langosch, K. (2005) *The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis*. European journal of cancer 2449–2461.
- Mimeault, M.; Johansson, S. L.; Senapati, S.; Momi, N.; Chakraborty, S. *et al.* (2010) *MUC4 down-regulation reverses chemoresistance of pancreatic cancer stem/progenitor cells and their progenies*. Cancer letters 69–84.
- Mitin, N.; Rossman, K. L. and Der, C. J. (2005) *Signaling interplay in Ras superfamily function*. Current Biology R563–R674.
- Momi, N.; Ponnusamy, M. P.; Kaur, S.; Rachagani, S.; Kunigal, S. *et al.* (2013) *Nicotine/cigarette smoke promotes metastasis of pancreatic cancer through α 7nAChR-mediated MUC4 upregulation*. Oncogene 1384–1395.

Moniaux, N.; Andrianifahanana, M.; Brand, R. E. and Batra, S. K. (2004) *Multiple roles of mucins in pancreatic cancer, a lethal and challenging malignancy*. British journal of cancer 1633–1638.

Moniaux, N.; Escande, F.; Porchet, N.; Aubert, J. and Batra, S. K. (2001) *Structural organization and classification of the human mucin genes*. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library D1192–D1206.

Neel, N.; Martin, T. D.; Stratford, J.; Zand, T. p; Reiner, D. j *et al.* (2011) *The RalGEF-Ral Effector Signaling Network The Road Less Traveled for Anti-Ras Drug Discovery*. Genes & cancer 275–287.

Neuzillet, C.; Hammel, P.; Tijeras-Raballand, A.; Couvelard, A. and Raymond, E. (2013) *Targeting the Ras–ERK pathway in pancreatic adenocarcinoma*. Cancer Metastasis Reviews 147–162.

Nguyen, V. C.; Aubert, J.; Gross, M. S.; Porchet, N.; Degand, P. *et al.* (1990) *Assignment of human tracheobronchial mucin gene (s) to 11p15 and a tracheobronchial mucin-related sequence to chromosome 13*. Human Genetics 167–172.

Nollet, S.; Moniaux, N.; Maury, J.; Petitprez, D.; Degand, P. *et al.* (1998) *Human mucin gene MUC4: organization of its 5'-region and polymorphism of its central tandem repeat array*. The Biochemical journal 739–748.

O'Reilly, E. M. (2009) *Pancreatic adenocarcinoma: new strategies for success*. Gastrointestinal cancer research S11–S15.

Okada, M.; Shibuya, K.; Sato, A.; Seino, S.; Suzuki, S. *et al.* (2014) *Targeting the K-Ras - JNK axis eliminates cancer stem-like cells and prevents pancreatic tumor formation*. Oncotarget 5100–5112.

Okazaki, M.; Kishida, S.; Hinoi, T.; Hasegawa, T.; Tamada, M. *et al.* (1997) *Synergistic activation of c-fos promoter activity by Raf and Ral GDP dissociation stimulator*. Oncogene 515–521.

Ostrem, J. M.; Peters, U.; Sos, M. L.; Wells, J. A. and Shokat, K. M. (2013) *K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions*. Nature 548–551.

Owens, D. M. and Keyse, S. M. (2007) *Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases*. Oncogene 3203–3213.

Parry, S.; Silverman, H. S.; McDermott, K.; Willis, A.; Hollingsworth, M. A. *et al.* (2001) *Identification of MUC1 Proteolytic Cleavage Sites in Vivo*. Biochemical and Biophysical Research Communications 715–720.

Pasca di Magliano, M. and Logsdon, C. D. (2014) *Roles for KRAS in Pancreatic Tumor Development and Progression*. Gastroenterology 1220–1229.

Paulson, A. S.; Tran Cao, H. S.; Tempero, M. A. and Lowy, A. M. (2013) *Therapeutic advances in pancreatic cancer*. Gastroenterology 1316–1326.

- Pells, S.; Divjak, M.; Romanowski, P.; Impey, H.; Hawkins, N. J. *et al.* (1997) *Developmentally-regulated expression of murine K-ras isoforms*. *Oncogene* 1781–1786.
- Perrais, M.; Pigny, P.; Ducourouble, M.; Petiprez, D.; Porchet, N. *et al.* (2001) *Characterization of Human Mucin Gene MUC4 Promoter importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells*. *Journal of Biological Chemistry* 30923–30933.
- Peschard, P.; McCarthy, A.; Leblanc-Dominguez, V.; Yeo, M.; Guichard, S. *et al.* (2012) *Genetic deletion of RALA and RALB small GTPases reveals redundant functions in development and tumorigenesis*. *Current biology* 2063–2068.
- Peterson, S. N.; Trabalzini, L.; Brtva, T. R.; Fischer, T.; Altschuler, D. L. *et al.* (1996) *Identification of a Novel RalGDS-related Protein as a Candidate Effector for Ras and Rap1*. *The Journal of biological chemistry* 29903–29908.
- Petersson, J.; Schreiber, O.; Hansson, G. C.; Gendler, S. J.; Velcich, A. *et al.* (2011) *Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis*. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* G327–G333.
- Pinho, S. S. and Reis, C. A. (2015) *Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications*. *Nature Reviews Cancer* 540–555.
- Pino, V.; Ramsauer, V. P.; Salas, P.; Carraway, C. A. C. and Carraway, K. L. (2006) *Membrane Mucin Muc4 Induces Density-dependent Changes in ERK Activation in Mammary Epithelial and Tumor Cells: ROLE IN REVERSAL OF CONTACT INHIBITION*. *Journal of Biological Chemistry* 29411–29420.
- Pommier, Y. (2006) *Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond*. *Nature reviews. Cancer* 789–802.
- Porchet, N.; Dufosse, J.; Audie, J. P.; Duperat, V. G.; Perini, J. M. *et al.* (1991) *Structural features of the core proteins of human airway mucins ascertained by cDNA cloning*. *The American review of respiratory disease* S15–S18.
- Prabhu, L.; Mundade, R.; Korc, M.; Loehrer, P. J. and Lu, T. (2014) *Critical role of NF- κ B in pancreatic cancer*. *Oncotarget* 10969–10975.
- Price-Schiavi, S. A.; Andrechek, E.; Idris, N.; Li, P.; Rong, M. *et al.* (2005) *Expression, location, and interactions of ErbB2 and its intramembrane ligand Muc4 (sialomucin complex) in rat mammary gland during pregnancy*. *Journal of Cellular Physiology* 44–53.
- Pylayeva-Gupta, Y.; Grabocka, E. and Bar-sagi, D. (2011) *RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web*. *Nature Reviews Cancer* 761–774.
- Rachagani, S.; Senapati, S.; Chakraborty, S.; Ponnusamy, M. P.; Kumar, S. *et al.* (2011) *Activated KrasG12D is associated with invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through inhibition of E-cadherin*. *British journal of cancer* 1038–48.

- Rachagani, S.; Torres, M. P.; Kumar, S.; Haridas, D.; Baines, M. *et al.* (2012) *Mucin (Muc) expression during pancreatic cancer progression in spontaneous mouse model: potential implications for diagnosis and therapy.* Journal of Hematology & Oncology.
- Radhakrishnan, P.; Mohr, A. M.; Grandgenett, P. M.; Steele, M. M.; Batra, S. K. *et al.* (2013) *MicroRNA-200c Modulates the Expression of MUC4 and MUC16 by Directly Targeting Their Coding Sequences in Human Pancreatic Cancer.* PLoS ONE e73356.
- Ramos, J. W. (2008) *The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells.* The international journal of biochemistry & cell biology 2707–2719.
- Rangarajan, A.; Hong, S. J.; Gifford, A. and Weinberg, R. A. (2004) *Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation.* Cancer Cell 171–183.
- Réjiba, S.; Wack, S.; Aprahamian, M. and Hajri, A. (2007) *K-ras oncogene silencing strategy reduces tumor growth and enhances gemcitabine chemotherapy efficacy for pancreatic cancer treatment.* Cancer science 1128–1136.
- Remmers, N.; Anderson, J. M.; Linde, E. M.; DiMaio, D. J.; Lazenby, A. J. *et al.* (2013) *Aberrant expression of mucin core proteins and o-linked glycans associated with progression of pancreatic cancer.* Clinical cancer research 1981–1993.
- Repasky, G. A.; Chenette, E. J. and Der, C. J. (2004) *Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis?.* Trends in cell biology 639–647.
- Robbe-Masselot, C.; Maes, E.; Rousset, M.; Michalski, J.-C. and Capon, C. (2009) *Glycosylation of human fetal mucins: a similar repertoire of O-glycans along the intestinal tract.* Glycoconjugate Journal 397–413.
- Roskoski Jr, R. (2012) *ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation.* Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society 105–143.
- Roskoski, R. (2012) *MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation.* Biochemical and biophysical research communications 5–10.
- De Ruyter, N. D.; Wolthuis, R. M. F.; Van Dam, H.; Burgering, B. M. T. and Bos, J. L. (2000) *Ras-dependent regulation of c-Jun phosphorylation is mediated by the Ral guanine nucleotide exchange factor-Ral pathway.* Molecular and Cellular Biology 8480–8488.
- Ruvoën-Clouet, N.; Mas, E.; Marionneau, S.; Guillon, P.; Lombardo, D. *et al.* (2006) *Bile-salt-stimulated lipase and mucins from milk of “secretor” mothers inhibit the binding of Norwalk virus capsids to their carbohydrate ligands.* Biochemical Journal 627–634.
- Ryan, D. P.; Hong, T. S. and Bardeesy, N. (2014) *Pancreatic Adenocarcinoma.* The New England journal of medicine 1039–1049.
- Saad, I. I.; Saha, S. B. and Thomas, G. (2014) *The RAS subfamily Evolution - tracing evolution for its utmost exploitation.* Bioinformatics 29329–8.

- Sabapathy, K. (2011) *Role of the JNK pathway in human diseases*. Progress in molecular biology and translational science 145–169.
- Schmitz, M. L.; Mattioli, I.; Buss, H. and Kracht, M. (2004) *NF- κ B: A multifaceted transcription factor regulated at several levels*. ChemBioChem 1348–1358.
- Schubbert, S.; Shannon, K. and Bollag, G. (2007) *Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer*. Nature Reviews Cancer 295–308.
- Sclabas, G. M.; Fujioka, S.; Schmidt, C.; Evans, D. B. and Chiao, P. J. (2003) *NF- κ B in pancreatic cancer*. International journal of gastrointestinal cancer 15–26.
- Seguin, L.; Kato, S.; Franovic, A.; Camargo, M. F.; Lesperance, J. et al. (2014) *A β 3 integrin-KRAS-RalB complex drives tumor stemness and resistance to EGFR inhibition*. Nature cell biology 457–468.
- Senapati, S.; Gnanapragassam, V. S.; Moniaux, N.; Momi, N. and Batra, S. K. (2012) *Role of MUC4-NIDO domain in the MUC4-mediated metastasis of pancreatic cancer cells*. Oncogene 3346–3356.
- Shao, H. and Andres, D. A. (2000) *A novel RalGEF-like protein, RGL3, as a candidate effector for rit and Ras*. Journal of Biological Chemistry 26914–26924.
- Shaulian, E. (2010) *AP-1—The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise?*. Cellular signalling 894–899.
- Shaulian, E. and Karin, M. (2001) *AP-1 in cell proliferation and survival*. Oncogene 2390–2400.
- Shen, L.; Kim, S.-H. and Chen, C. Y. (2012) *Sensitization of human pancreatic cancer cells harboring mutated K-ras to apoptosis*. PloS one e40435.
- Sheng, Y. H.; Lourie, R.; Linden, S. K.; Jeffery, P. L.; Roche, D. et al. (2011) *The MUC13 cell-surface mucin protects against intestinal inflammation by inhibiting epithelial cell apoptosis*. Gut 1661–1670.
- Sheng, Z.; Wu, K.; Carraway, K. L. and Fregien, N. (1992) *Molecular cloning of the transmembrane component of the 13762 mammary adenocarcinoma sialomucin complex: A new member of the epidermal growth factor superfamily*. Journal of Biological Chemistry 16341–16346.
- Sherblom, A. P.; Buck, R. L. and Carraway, K. L. (1980) *Purification of the Major Sialoglycoproteins of 13762 MAT-B1 and MAT-C1 Rat Ascites Mammary Adenocarcinoma Cells by Density Gradient Centrifugation in Cesium Chloride and Guanidine Hydrochloride*. The Journal of biological chemistry 783–790.
- Shields, J. M.; Pruitt, K.; McFall, A.; Shaub, A. and Der, C. J. (2000) *Understanding Ras: 'it ain't over'til it's over'*. Trends in cell biology 147–154.

- Shimizu, K.; Goldfarb, M.; Suard, Y.; Perucho, M.; Li, Y. *et al.* (1983) *Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2112–2116.
- Shin, S.; Kim, S.; Hong, S. and Kim, Y. (2013) *Genetic alterations of K-ras, p53, c-erbB-2, and DPC4 in pancreatic ductal adenocarcinoma and their correlation with patient survival*. Pancreas 216–222.
- Shin, S. young; Choi, C.; Lee, H. G.; Lim, Y. and Lee, Y. H. (2012) *Transcriptional regulation of the interleukin-11 gene by oncogenic Ras*. Carcinogenesis.
- Shipitsin, M. and Feig, L. A. (2004) *RalA but Not RalB Enhances Polarized Delivery of Membrane Proteins to the Basolateral Surface of Epithelial Cells*. molecular and cellular biology 5746–5756.
- Shirakawa, R. and Horiuchi, H. (2015) *Ral GTPases: crucial mediators of exocytosis and tumourigenesis*. Journal of Biochemistry 285–299.
- Singh, A. P.; Chauhan, S. C.; Andrianifahanana, M.; Moniaux, N.; Meza, J. L. *et al.* (2007) *MUC4 expression is regulated by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pancreatic adenocarcinoma cells via transcriptional and post-translational*. Oncogene 30–41.
- Singh, A. P.; Moniaux, N.; Chauhan, S. C.; Meza, J. L. and Batra, S. K. (2004) *Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis*. Cancer research 622–630.
- Singh, A.; Greninger, P. and Rhodes, D. (2009) *A gene expression signature associated with “K-Ras addiction” reveals regulators of EMT and tumor cell survival*. Cancer cell 489–500.
- Singh, P. K. and Hollingsworth, M. A. (2006) *Cell surface-associated mucins in signal transduction*. Trends in cell biology 467–476.
- Skrypek, N.; Duchêne, B.; Hebbar, M.; Leteurtre, E.; Van Seuningen, I. *et al.* (2013) *The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the Concentrative Nucleoside Transporter family*. Oncogene 1714–1723.
- Skrypek, N.; Vasseur, R.; Vincent, A.; Duchêne, B.; Van Seuningen, I. *et al.* (2015) *The oncogenic receptor ErbB2 modulates gemcitabine and irinotecan / SN-38 chemoresistance of human pancreatic cancer cells via hCNT1 transporter and multidrug-resistance associated protein MRP-2*. Oncotarget 10853–10867.
- Van der Sluis, M.; De Koning, B. A. E.; De Bruijn, A. C. J. M.; Velcich, A.; Meijerink, J. P. P. *et al.* (2006) *Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection*. Gastroenterology 117–129.
- Song, S.; Ji, B.; Ramachandran, V. and Wang, H. (2012) *Overexpressed galectin-3 in pancreatic cancer induces cell proliferation and invasion by binding Ras and activating Ras signaling*. PloS one.

Soto, P.; Price-Schiavi, S. A. and Carraway, K. L. (2003) *SMAD2 and SMAD7 involvement in the post-translational regulation of Muc4 via the transforming growth factor- β and interferon- γ pathways in rat mammary epithelial*. *Journal of Biological Chemistry* 20338–20344.

Spiegel, J.; Cromm, P. M.; Zimmermann, G.; Grossmann, T. N. and Waldmann, H. (2014) *Small-molecule modulation of Ras signaling*. *Nature chemical biology* 613–622.

Srivastava, S. K.; Bhardwaj, A.; Singh, S.; Arora, S.; Wang, B. *et al.* (2011) *MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells*. *Carcinogenesis* 1832–1839.

Stephen, A. G.; Esposito, D.; Bagni, R. K. and McCormick, F. (2014) *Dragging ras back in the ring*. *Cancer cell* 272–281.

Swartz, M. J.; Batra, S. K.; Varshney, G. C.; Hollingsworth, M. A.; Yeo, C. J. *et al.* (2002) *MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia*. *American journal of clinical pathology* 791–796.

Szakács, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C. and Gottesman, M. M. (2006) *Targeting multidrug resistance in cancer*. *Nature Reviews Drug Discovery* 219–234.

Tamanoi, F. and Lu, J. (2013) *Recent Progress in Developing Small Molecule Inhibitors Designed to Interfere with Ras Membrane Association: Toward Inhibiting K-Ras and N-Ras Functions*. *Enzymes* 181–200.

Tan, M. H.; Nowak, N. Jean; Loo, R.; Ochi, H.; Sandberg, A. A. *et al.* (1986) *Characterization of a new primary human pancreatic tumor line*. *Cancer Investigation* 15–23.

Tang, J.; Qi, X.; Mercola, D.; Han, J. and Chen, G. (2005) *Essential Role of p38 in K-Ras Transformation Independent of Phosphorylation*. *The Journal of biological chemistry* 23910–23917.

Taniuchi, K.; Furuhata, M.; Hanazaki, K.; Iwasaki, S.; Tanaka, K. *et al.* (2015) *Peroxiredoxin 1 Promotes Pancreatic Cancer Cell Invasion by Modulating p38 MAPK Activity*. *Pancreas* 331–340.

Tanoue, T. and Nishida, E. (2003) *Molecular recognitions in the MAP kinase cascades*. *Cellular signalling* 455–462.

Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J. *et al.* (2015) *Global cancer statistics, 2012*. *CA: a cancer journal for clinicians* 87–108.

Tsai, F. D.; Lopes, M. S.; Zhou, M.; Court, H.; Ponce, O. *et al.* (2015) *K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 779–784.

Tsuchiya, M.; Yoshida, T.; Taniguchi, S.; Yasuda, K.; Maeda, A. *et al.* (2007) *In vivo suppression of mafA mRNA with siRNA and analysis of the resulting alteration of the gene*

expression profile in mouse pancreas by the microarray method. Biochemical and biophysical research communications 129–135.

Tuveson, D. A.; Shaw, A. T.; Willis, N. A.; Silver, D. P.; Jackson, E. L. *et al.* (2004) *Endogenous oncogenic K-rasG12D stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects.* Cancer Cell 375–387.

Urban, T.; Ricci, S.; Grange, J. D.; Lacave, R.; Boudghene, F. *et al.* (1993) *Detection of c-Ki-ras mutation by PCR/RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinomas.* Journal of the National Cancer Institute 2008–2012.

Vasconcelos-dos-Santos, A.; Oliveira, I. A.; Lucena, M. C.; Mantuano, N. R.; Whelan, S. A. *et al.* (2015) *Biosynthetic Machinery Involved in Aberrant Glycosylation: Promising Targets for Developing of Drugs Against Cancer.* Frontiers in Oncology 1–23.

Viatour, P.; Merville, M. P.; Bours, V. and Chariot, A. (2005) *Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: Implications in cancer and inflammation.* Trends in Biochemical Sciences 43–52.

Vigil, D.; Martin, T. D.; Williams, F. J.; Yeh, J. J.; Campbell, S. L. *et al.* (2010) *Aberrant Overexpression of the Rgl2 Ral Small GTPase-specific Guanine Nucleotide Exchange Factor Promotes Pancreatic Cancer Growth through Ral-dependent and Ral-independent Mechanisms.* Journal of Biological Chemistry 34729–34740.

Vincent, A.; Ducourouble, M. and Van Seuning, I. (2008) *gene MUC4 in epithelial cancer cell lines involves both DNA methylation and histone modifications mediated by DNA methyltransferases and histone deacetylases.* The FASEB Journal 3035–3045.

Vincent, A.; Herman, J. M.; Schulick, R.; Hruban, R. H. and Goggins, M. (2004) *Pancreatic cancer.* The Lancet 607–620.

Vincent, A.; Perrais, M.; Desseyn, J.-L.; Aubert, J.; Pigny, P. *et al.* (2007) *Epigenetic regulation (DNA methylation, histone modifications) of the 11p15 mucin genes (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) in epithelial cancer cells.* Oncogene 6566–6576.

Waddell, N.; Pajic, M.; Patch, A.; Chang, D. K.; Kassahn, K. S. *et al.* (2015) *Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer.* Nature 495–501.

De Waele, E.; Wauters, E.; Ling, Z. and Bouwens, L. (2014) *Conversion of Human Pancreatic Acinar Cells Toward a Ductal-Mesenchymal Phenotype and the Role of Transforming Growth Factor beta and Activin Signaling.* Pancreas 1083–1092.

Wagner, E. F. and Nebreda, A. R. (2009) *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development.* Nature Reviews Cancer 537–549.

Wang, G.; Lipert, R. J.; Jain, M.; Kaur, S.; Chakraborty, S. *et al.* (2011) *Detection of the potential pancreatic cancer marker MUC4 in serum using surface-enhanced Raman scattering.* Analytical Chemistry 2554–2561.

- Wang, L.; Zhi, X.; Zhu, Y.; Zhang, Q.; Wang, W. *et al.* (2015) *MUC4-promoted neural invasion is mediated by the axon guidance factor netrin-1 in PDAC*. *Oncotarget* DOI: 10.18632/oncotarget.5668.
- Wang, P.; Zhu, C.; Ma, M.; Chen, G.; Song, M. *et al.* (2015) *Micro-RNA-155 is induced by K-Ras oncogenic signal and promotes ROS stress in pancreatic cancer*. *Oncotarget*.
- Weis, L. and Reinberg, D. (1997) *Accurate positioning of RNA polymerase II on a natural TATA-less promoter is independent of TATA-binding-protein-associated factors and initiator-binding proteins*. *Molecular and cellular biology* 2973–2984.
- Wennerberg, K.; Rossman, K. L. and Der, C. J. (2005) *The Ras superfamily at a glance*. *Journal of cell science* 843–846.
- Weston, C. R. and Davis, R. J. (2007) *The JNK signal transduction pathway*. *Current Opinion in Cell Biology* 142–149.
- White, M. A.; Vale, T.; Camonis, J. H.; Schaefer, E. and Wigler, M. H. (1996) *A role for the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator in mediating Ras-induced transformation*. *Journal of Biological Chemistry* 16439–16442.
- Wierup, N.; Sundler, F. and Heller, S. R. (2013) *The islet ghrelin cell*. *Journal of Molecular Endocrinology* R35–R49.
- Yachida, S.; Jones, S.; Bozic, I.; Antal, T.; Leary, R. J. *et al.* (2010) *Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer*. *Nature* 1114–1117.
- Yamada, N.; Nishida, Y.; Tsutsumida, H.; Goto, M.; Nomoto, M. *et al.* (2009) *Promoter CpG methylation in cancer cells contributes to the regulation of MUC4*. *British journal of cancer* 344–351.
- Yamamoto, Y. and Gaynor, R. B. (2004) *I κ B kinases: Key regulators of the NF- κ B pathway*. *Trends in Biochemical Sciences* 72–79.
- Yeh, J. J. and Der, C. J. (2007) *Targeting signal transduction in pancreatic cancer treatment*. *expert opinion on therapeutic targets* 673–694.
- Yoon, S. and Seger, R. (2006) *The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions*. *Growth factors* 21–44.
- Zhang, J.; Perez, A.; Yasin, M.; Soto, P.; Rong, M. *et al.* (2005) *Presence of MUC4 in human milk and at the luminal surfaces of blood vessels*. *Journal of Cellular Physiology* 166–177.
- Zhang, J.; Zhu, Y.; Zhang, X.; Liang, W.; Xie, K. *et al.* (2013) *Transcriptional regulation of human MUC4 gene: identification of a novel inhibitory element and its nuclear binding protein*. *Molecular biology reports* 4913–4920.
- Zhao, S.; Wang, Y.; Cao, L.; Ouellette, M. M. and Freeman, J. W. (2011) *Expression of oncogenic K-ras and loss of Smad4 cooperate to induce the expression of EGFR and to*

promote invasion of immortalized human pancreas ductal cells. International journal of cancer 2076–2087.

Zheng, C.; Jiao, X.; Jiang, Y. and Sun, S. (2013) *ERK1/2 activity contributes to gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells.* The Journal of international medical research 300–306.

Zhu, L.; Lee, P.; Yu, D.; Tao, S. and Chen, Y. (2011) *Cloning and Characterization of Human MUC19 Gene.* American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 348–358.

Zimmermann, G.; Papke, B.; Ismail, S.; Vartak, N.; Chandra, A. *et al.* (2013) *Small molecule inhibition of the KRAS-PDE δ interaction impairs oncogenic KRAS signalling.* Nature 638–642.

ANNEXES
