

Thesis, COLLÉGIALITÉ

Auteur : Laverdeur, Emilie

Promoteur(s) : Peulen, Olivier

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2023-2024

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/20515>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

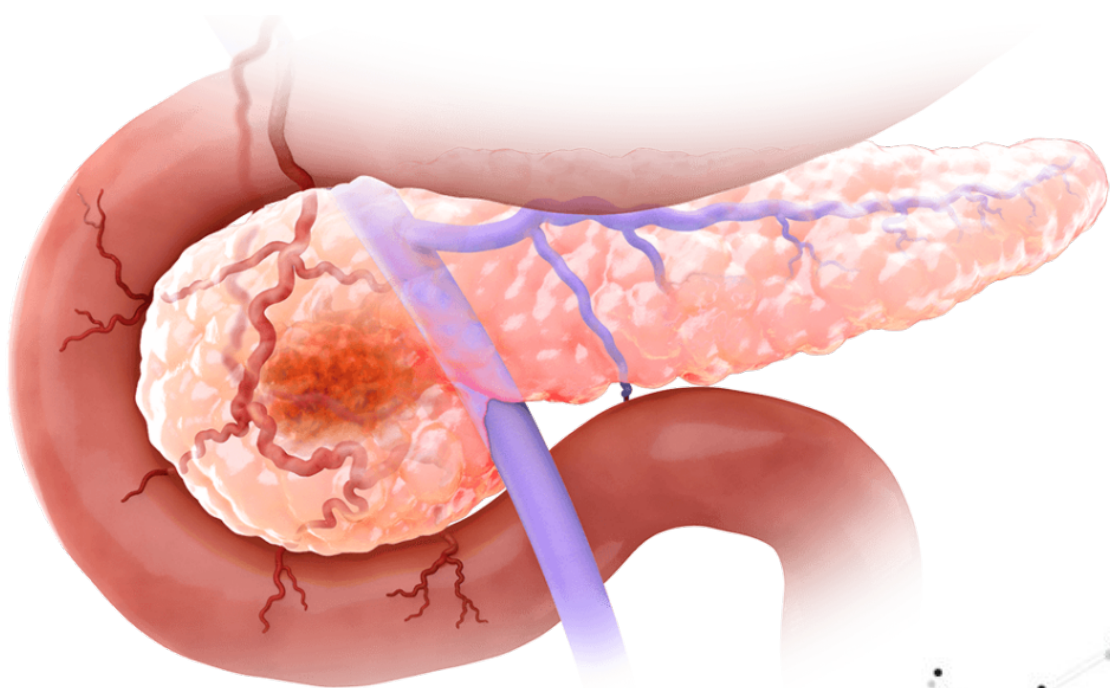
Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Myoferline à l'interface du dialogue entre les cellules stromales et cancéreuses des tumeurs pancréatiques

MEMOIRE DE MASTER EN SCIENCES BIOMEDICALES
EMILIE LAVERDEUR

2023-2024

Promoteur : Professeur Olivier Peulen



Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur **Olivier Peulen** et le Professeur **Akeila Bellahcène** de m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon mémoire au sein du Laboratoire de Recherche sur les Métastases. Je les remercie également pour leur disponibilité et le temps qu'ils ont investi pour suivre ce travail.

Ensuite, je tiens tout particulièrement à remercier **Raphaël Peiffer** pour le temps qu'il m'a consacré et son enthousiasme. Je remercie également **Charlotte Gullo** et **Yasmine Boumahd** pour leurs bons conseils et la relecture de ce travail. C'est grâce à vous que j'ai pu acquérir de nouvelles compétences techniques et intellectuelles.

Je tiens également à remercier **Ferman Agirman** et **Naima Maloujahmoum** pour avoir pris le temps de répondre à mes questions et pour leur sympathie. Ce fut un réel plaisir de travailler à leurs côtés. Je tiens également à remercier l'équipe du Professeur Akeila Bellahcène, **Fanny Lardinois** et **Victoria Mohring**, pour leurs bons conseils et leur convivialité au quotidien.

Je voulais adresser mes remerciements à tous les **Professeurs du Département des Sciences Biomédicales et Précliniques** de m'avoir enseigné les connaissances théoriques et l'esprit scientifique nécessaires pour un chercheur.

Enfin, je remercie **mes parents** et **mon compagnon** qui m'ont soutenu tout au long de mes études. J'en suis très reconnaissante.

Ce fut pour moi 5 mois passionnants, très enrichissants et c'est avec plaisir que j'ai rédigé ce travail et j'espère que vous prendrez autant de plaisir à la lecture que j'en ai pris à l'écriture.

Abréviations

Ac	Anticorps
ADM	<i>Acinar to ductal metaplasia</i>
apCAFs	<i>Antigen-presenting cancer-associated fibroblasts</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAFs	<i>Cancer-associated fibroblasts</i>
CM	<i>Conditioned medium</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
EMT	<i>Epithelial to mesenchymal transition</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FerA	Ferlin A
5-FU	5-Fluorouracil
HSC70	<i>Heat shock cognate 70kDa</i>
HIF-1α	<i>Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha</i>
PSC	<i>Pancreatic stellate cell</i>
iCAFs	<i>Inflammatory cancer-associated fibroblasts</i>
IL	Interleukine
MET	<i>Mesenchymal to epithelial transition</i>
MYOF	Myoferline
myCAFs	<i>Myofibroblastic cancer-associated fibroblasts</i>
PanINs	<i>Pancreatic intraepithelial neoplasia</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>

qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
VEGF-A	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFR-2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>

Résumé

L'adénocarcinome canalaire pancréatique constitue la troisième cause de mortalité attribuée au cancer aux Etats-Unis, principalement en raison d'un diagnostic tardif associé à une dissémination précoce de métastases. Depuis plusieurs décennies, les recherches se sont focalisées sur les fibroblastes associés au cancer (CAFs) qui représentent le composant cellulaire prédominant dans le stroma pancréatique. Les CAFs interagissent avec les cellules cancéreuses afin de promouvoir la progression tumorale. La myoferline, une protéine impliquée dans divers processus physiologiques liés à la membrane plasmique, a été identifiée comme étant surexprimée dans le PDAC. Il a ensuite été démontré que la myoferline jouait un rôle dans l'agressivité des cellules cancéreuses pancréatiques en favorisant la sécrétion du VEGF-A et en régulant positivement le métabolisme mitochondrial. De plus, il a été établi que la myoferline est un composant des exosomes dérivés des cellules cancéreuses. Dans cette étude, nous avons investigué le rôle de la myoferline dans le dialogue qui s'établit entre les cellules stromales et les cellules cancéreuses des tumeurs pancréatiques.

Dans un premier temps, notre objectif résidait dans la détermination de l'influence des CAFs sur la prolifération et la migration des cellules cancéreuses. Nous n'avons pas constaté un avantage prolifératif mais nous avons mis en évidence une stimulation de la migration topotaxique et chimiotaxique des cellules cancéreuses pancréatiques. Cependant, la déplétion en myoferline des CAFs n'a pas impacté la migration des cellules cancéreuses.

Curieusement, nous avons révélé que la déplétion en myoferline altérait la sécrétion de cytokines par les CAFs. La production de RANTES (CCL5) notamment, une chémokine régulée par la voie de signalisation de NF- κ B et impliquée dans la chémoattraction et l'activation de cellules immunitaires, s'est avérée significativement accrue par les CAFs dépourvus de myoferline. Cette observation nous a permis de formuler l'hypothèse selon laquelle la myoferline pourrait jouer un rôle dans la régulation immunitaire. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons évalué l'impact des CAFs sur la migration des cellules immunitaires Jurkat. Nous avons également mis en évidence que la déplétion en myoferline des CAFs activait potentiellement la voie non canonique de NF- κ B dans ces cellules.

En conclusion, ce travail a révélé un nouvel acteur sécrété sous la dépendance de la myoferline, à savoir RANTES. Ce facteur produit par les CAFs est susceptible d'accroître l'infiltration des cellules immunitaires dans les tumeurs pancréatiques.

Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma constitutes the third leading cause of cancer-related death in the USA, due to late diagnosis associated with early metastatic spreading. For several decades, research has focused on cancer-associated fibroblasts (CAFs), the predominant cellular component of pancreatic stroma. CAFs interact with cancer cells to promote tumor progression. Myoferlin, a protein involved in various physiological processes related to the plasma membrane, has been identified as being overexpressed in PDAC. It has subsequently been demonstrated that myoferlin plays a role in the aggressiveness of pancreatic cancer cells by promoting the secretion of VEGF-A and increasing mitochondrial metabolism. Additionally, it has been established that myoferlin is a component of exosomes derived from cancer cells. In this study, we investigated the role of myoferlin in the crosstalk between stromal and cancer cells in pancreatic tumors.

Initially, our aim was to determine the influence of CAFs on cancer cell proliferation and migration. We did not find a proliferative advantage, but we did demonstrate stimulation of topotaxic and chemotaxic migration of pancreatic cancer cells when exposed to CAFs. However, myoferlin depletion in CAFs had no impact on cancer cell migration.

Curiously, we revealed that myoferlin depletion altered cytokine secretion by CAFs. In particular, the production of RANTES (CCL5), a chemokine regulated by the NF- κ B signaling pathway and involved in chemoattraction and immune cell activation, was found to be overproduced by myoferlin-depleted CAFs. This observation led us to formulate the hypothesis that myoferlin potentially plays a role in immune regulation. To test our hypothesis, we assessed the impact of CAFs on Jurkat immune cell migration. We also demonstrated that myoferlin depletion from CAFs potentially activated the non-canonical NF- κ B pathway in these cells.

In conclusion, this study has unveiled a new myoferlin-dependent secreted factor, namely RANTES. This factor produced by CAFs, is potentially able to enhance the infiltration of immune cells into pancreatic tumors.

Table des matières

1.	Introduction.....	1
1.1.	Le pancréas.....	1
1.2.	L'adénocarcinome canalaire pancréatique	2
1.2.1.	Épidémiologie	3
1.2.2.	Diagnostic du PDAC.....	3
1.2.3.	Facteurs de risque du PDAC	4
1.2.4.	Traitements du PDAC	4
1.2.5.	Caractéristiques du PDAC	6
1.3.	Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs).....	9
1.3.1.	Origine des CAFs.....	9
1.3.2.	Sous-types de CAFs dans le PDAC	9
1.4.	Dialogue entre les CAFs et les cellules cancéreuses pancréatiques.....	10
1.4.1.	Le dialogue bidirectionnel entre les cellules cancéreuses et les CAFs favorise la progression tumorale.....	11
1.4.2.	Effet des CAFs sur le métabolisme des cellules cancéreuses	11
1.5.	La myoferline	12
1.5.1.	Structure de la myoferline	13
1.5.2.	Rôles physiologiques de la myoferline	14
1.5.3.	Rôles de la myoferline dans les cellules cancéreuses pancréatiques	14
2.	Hypothèses, objectifs et stratégie.....	17
3.	Matériels et méthodes	18
3.1.	Lignées cellulaires.....	18
3.2.	Préparation du milieu conditionné	19
3.3.	Analyse de la prolifération cellulaire	19
3.3.1.	Milieu conditionné	19
3.3.2.	Coculture directe	20

3.4.	Analyse de la migration cellulaire.....	20
3.4.1.	Topotaxie.....	20
3.4.2.	Chimiotaxie.....	20
3.5.	Formation de sphéroïdes.....	21
3.6.	Cytokine Array.....	21
3.7.	Immunofluorescence indirecte de cellules adhérentes avec fixation au paraformaldéhyde.....	22
3.8.	Extraction et dosage protéique.....	22
3.9.	Western-blot.....	23
3.9.1.	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	23
3.9.2.	Électrotransfert sur une membrane de PVDF.....	23
3.9.3.	Blocage des sites de liaison non spécifique.....	23
3.9.4.	Immunodétection et révélation.....	24
3.10.	RT-qPCR.....	24
3.10.1.	Extraction des ARN totaux.....	24
3.10.2.	Transcription inverse.....	25
3.10.3.	PCR quantitative.....	25
3.11.	Analyses statistiques.....	25
4.	Résultats.....	26
4.1.	Caractérisation moléculaire des cellules cancéreuses pancréatiques.....	26
4.2.	Les CAFs n'influencent pas la prolifération des cellules cancéreuses.....	26
4.2.1.	Culture de cellules cancéreuses en présence d'un milieu conditionné par les CAFs.....	26
4.2.2.	Coculture directe des cellules cancéreuses et des CAFs.....	27
4.2.3.	Mise en place d'un modèle 3D de culture de cellules cancéreuses pour évaluer l'effet de milieu conditionné.....	27
4.3.	Les CAFs stimulent la migration des cellules cancéreuses.....	28
4.3.1.	Analyse de la topotaxie.....	28

4.3.2.	Analyse de la chimiotaxie	29
4.4.	La déplétion en myoferline des CAFs n'impacte pas la migration des cellules cancéreuses	29
4.4.1.	Évaluation de la topotaxie sous milieu conditionné par les CAFs déplétés en myoferline	30
4.4.2.	Évaluation de la chimiotaxie en présence de milieu conditionné par les CAFs déplétés en myoferline	30
4.4.3.	Évaluation de la chimiotaxie en coculture	30
4.5.	La déplétion en myoferline altère la sécrétion de cytokines par des CAFs	31
4.6.	La déplétion en myoferline réduit l'attraction des lymphocytes CD4 ⁺ par les CAF	32
4.6.1.	Évaluation de la chimiotaxie des lymphocytes CD4 ⁺ en présence de milieu conditionné par les CAFs déplétés en myoferline	32
4.6.2.	Évaluation de la chimiotaxie des lymphocytes CD4 ⁺ en coculture avec les CAFs déplétés en myoferline	32
4.7.	La déplétion en myoferline des CAFs active la voie non-canonique de NFκB	33
5.	Discussion et perspectives	35
6.	Bibliographie	41

1. Introduction

1.1. Le pancréas

Le pancréas est un organe rétro-péritonéal qui s'implante entre le duodénum et la rate, positionné à l'arrière de l'estomac. Il peut être divisé anatomiquement en quatre parties : la tête, le cou (ou isthme), le corps et la queue (Figure 1A et 1B). La tête prend appui sur les segments descendants et horizontaux du duodénum, avec lequel elle se relie au niveau de l'ampoule de Vater. Le cou, quant à lui, s'étend latéralement à partir de la tête pour rejoindre le corps pancréatique. Les parties constitutives du corps et de la queue du pancréas s'étendent sur la ligne médiane du corps jusqu'à proximité de la rate. Enveloppé d'une fine capsule fibreuse, le pancréas segmente son parenchyme en lobes et lobules [1].

Le pancréas est une glande amphicrine, ce qui signifie qu'il a des fonctions à la fois endocrines et exocrines (Figure 1C). La partie exocrine du parenchyme représente 96 % du volume total du pancréas et se compose d'acini et de canaux. Les acini, amas de cellules acinaires adoptant une morphologie pyramidale, sécrètent le suc pancréatique dans le duodénum via le canal de Wirsung et le canal accessoire. Le suc pancréatique, constitué essentiellement d'eau, d'électrolytes et d'enzymes digestives tels que le trypsinogène, l'amylase et la lipase, assure la digestion enzymatique de macromolécules en nutriments absorbables par l'intestin. Certaines de ces enzymes sont sécrétées sous formes de zymogènes qui sont activées dans le duodénum. Par ailleurs, les cellules canalaire produisent des ions bicarbonates (HCO_3^-) participant à la neutralisation du pH acide du chyme provenant de l'estomac [2].

Le parenchyme endocrinien représente 4% du volume total du pancréas. Il se compose des îlots de Langerhans dont le rôle est de sécréter des hormones peptidiques nécessaires, entre autres, au stockage ou à la mobilisation des glucides, des acides aminés ou des triglycérides. Quatre types de cellules sécrétrices de facteurs endocrines ont été identifiées [2]:

- Cellules α , sécrétrices de glucagon.
- Cellules β , sécrétrices d'insuline.
- Cellules δ , sécrétrices de somatostatine.
- Cellules PP, sécrétrices du polypeptide pancréatique.

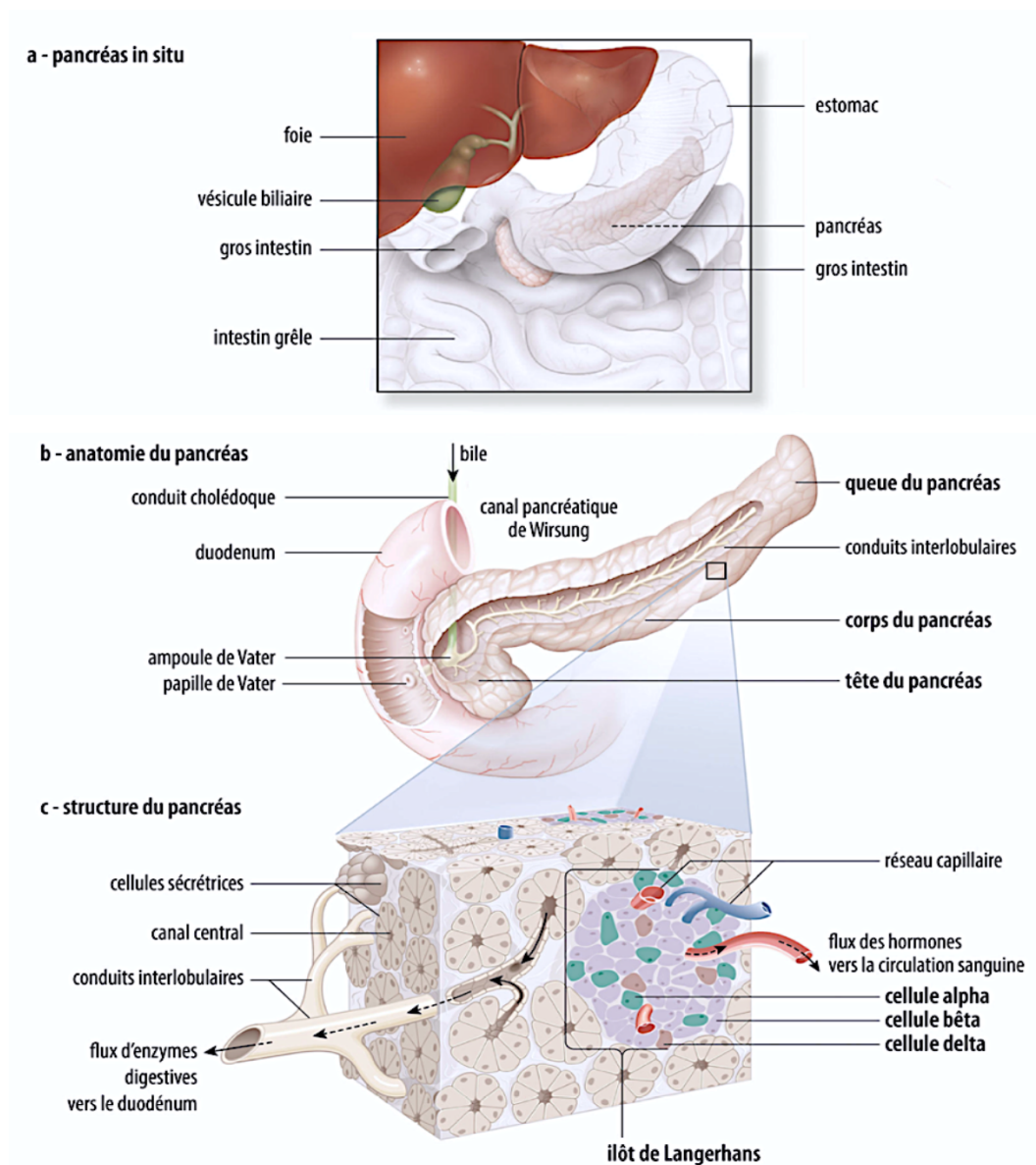


Figure 1 : Représentations anatomique et histologique du pancréas humain. A) Position du pancréas in situ. **B)** Le pancréas est divisé en quatre parties anatomiquement distinctes : la tête, le cou, le corps et la queue. **C)** Histologie du pancréas : le tissu exocrine est formé d'acini et d'un système canalaire tandis que le tissu endocrine est organisé en îlots de Langerhans constitués de quatre types cellulaires (α , β , δ et PP) [3].

1.2. L'adénocarcinome canalaire pancréatique

Le cancer du pancréas le plus courant est l'adénocarcinome canalaire (PDAC), qui représente plus de 90% de toutes les tumeurs malignes du pancréas. Il est associé à un mauvais pronostic et à un faible taux de survie qui reste relativement inchangé depuis plusieurs années. En effet, le taux global de survie à 5 ans est de 5 à 10%. Son mauvais pronostic est principalement dû à un diagnostic tardif et à la faible efficacité des traitements actuels [4].

1.2.1. Épidémiologie

Le cancer du pancréas est le douzième cancer le plus fréquent et représente la septième cause de décès liée au cancer à l'échelle mondiale. Du fait de sa prévalence croissante, il est prévu qu'il devienne la deuxième cause de décès dans les prochaines années [5]. Les données de l'Observation Mondiale du Cancer (GLOBOCAN 2020) ont été analysées afin d'évaluer la situation épidémiologique mondiale [6]. Chaque cancer est analysé en fonction de son incidence et de sa mortalité. L'incidence désigne le nombre de nouveaux cas survenant au cours d'une période d'un an et dans une région géographique définie, rapporté à une population de 100 000 individus. Tandis que la mortalité correspond au nombre de décès survenant dans une période d'un an dans une région précise pour 100 000 individus. En 2020, l'incidence mondiale du cancer du pancréas était de 4,95/100 000 tandis que la mortalité s'élevait à 4,66/100 000. Le nombre estimé de nouveaux cas dans le monde devrait augmenter de 29.2% (657 584 cas) entre 2020 et 2030 et de 61.7% (843772 cas) entre 2020 et 2040 (Figure 2A). Parallèlement, le nombre de décès devrait augmenter de 30.1% (620 818 décès) entre 2020 et 2030 et de 64.2% entre 2020 et 2040 (801 333 décès) (Figure 2B) [7].

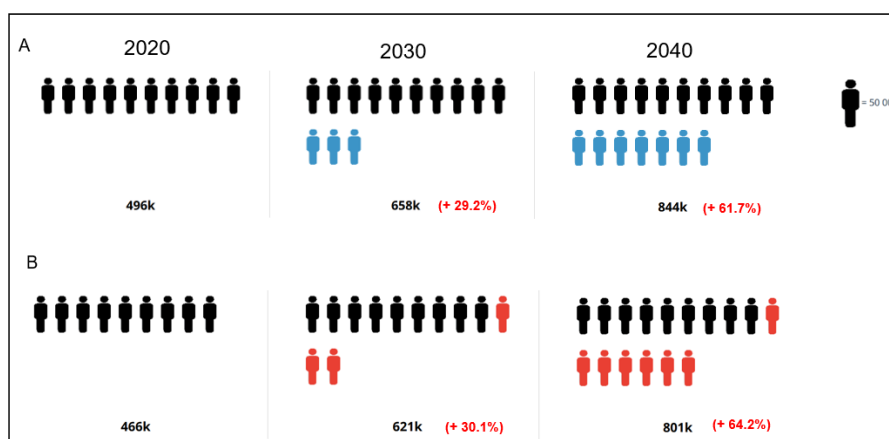


Figure 2 : Prédictions mondiales du PDAC par le GLOBOCAN en 2024. Estimations du nombre de nouveaux cas de PDAC (A) et du nombre de décès (B) dans le monde en 2030 et en 2040 pour les deux sexes, de 0 à 85 ans (Adapté du GLOBOCAN 2024) [7].

1.2.2. Diagnostic du PDAC

L'échographie transabdominale est la première méthode de diagnostic du PDAC, bien qu'elle n'exclue pas de petites tumeurs pancréatiques. Une tomodensitométrie et une imagerie par résonance magnétique (IRM) doivent être réalisés chez les patients suspectés de PDAC afin d'évaluer la progression de la maladie. Cependant, lorsque les résultats ne sont pas clairs, une échographie endoscopique ou une endoscopie gastro-intestinale, bien qu'invasive, est recommandée [8].

Une augmentation du taux sérique de l'antigène CA-19-9 est le marqueur le plus utilisé dans le diagnostic du PDAC (taux sérique : >100 U/mL). Il peut être utilisé dans l'évaluation de l'efficacité de traitement mais ne semble pas être utile au diagnostic précoce de la maladie, dû à la présence de faux positifs à la suite d'une obstruction biliaire ou cirrhose [8].

1.2.3. Facteurs de risque du PDAC

Les facteurs de risque du PDAC peuvent être classés en deux catégories principales. La première catégorie regroupe des caractéristiques individuelles et la seconde concerne le mode de vie et l'environnement [9].

Les facteurs de risque associés aux caractéristiques individuelles comprennent l'âge, le sexe et les antécédents familiaux. En effet, le cancer du pancréas survient généralement chez les personnes âgées, avec un âge médian de 70 ans au moment du diagnostic. De plus, les hommes sont généralement plus souvent atteints que les femmes avec une incidence globale de 5,7/100 000 contrairement à 4,1/100 000 chez les femmes en 2020. Enfin, 5 à 10% des patients ont des antécédents familiaux de cancer de pancréas [9].

Les facteurs de risque liés au mode de vie et à l'environnement incluent le tabagisme, la consommation d'alcool, l'obésité et la pancréatite chronique. Une étude de cohorte a permis la mise évidence d'une augmentation du risque du cancer du pancréas de 37% chez les fumeurs par rapports aux non-fumeurs. Selon une autre étude réalisée par Jayasekara et ses collègues, la consommation d'alcool était négativement corrélée à la durée de survie après le diagnostic du cancer du pancréas et a montré une augmentation de risque de décès de 9% [10]. Une méta-analyse a montré que l'obésité (IMC supérieur à 30kg/m²) peut augmenter le risque de cancer de pancréas de 35%. Enfin, en raison d'une inflammation chronique, les patients atteints d'une pancréatite chronique présentent un risque plus élevé de développer un cancer du pancréas [11]. Néanmoins, ce risque est plus faible en comparaison des facteurs de risque cités ci-dessus étant donné que moins de 1% des patients qui présentent un PDAC ont des antécédents de pancréatite chronique [12].

1.2.4. Traitements du PDAC

En fonction du stade d'extension de la maladie au moment du diagnostic, le cancer du pancréas est divisé en sous-groupes : tumeur résécable, tumeur limite résécable, tumeur localement avancée ou tumeur métastasée. Lorsque les tumeurs sont limites résécables, le risque de récurrence précoce après la chirurgie est significatif. Quant aux tumeurs localement avancées, elles se caractérisent par une infiltration locale vers le système vasculaire.

La seule approche potentiellement curative disponible pour le traitement du cancer pancréatique consiste en une résection chirurgicale suivie d'une chimiothérapie adjuvante. Un traitement adjuvant est administré après le traitement principal dans le but de prévenir la réapparition de la maladie et/ou la formation de métastases. Cependant, seul 10 à 15 % de patients atteints de PDAC sont éligibles à une résection au moment du diagnostic tandis que 80 à 90% des patients sont considérés comme non résécables car ils présentent des stades localement avancés, ou des métastases à distance. Chez les patients atteints d'un PDAC limite résécable ou localement avancé, une chimiothérapie systémique néo-adjuvante est administrée en première intention. Le traitement néo-adjuvant précède le traitement principal dans le but d'améliorer le contrôle local de la tumeur. Cela englobe les analogues nucléosidiques notamment la gemcitabine seule ou en combinaison avec la capécitabine, le 5-fluorouracile (5-FU) en monothérapie ou en combinaison FOLFIRINOX. La gemcitabine est un antimétabolite qui, après phosphorylation, s'incorpore dans l'ADN en synthèse et bloque cette dernière. La capécitabine, également un antimétabolite, contient une fraction cytotoxique, le 5-FU, qui une fois métabolisé génère deux métabolites actifs, F-dUMP et le F-UTP, inhibant respectivement la synthèse de l'ADN et de l'ARN [13] (consulté le 25/3/24). Le FOLFIRINOX est une chimiothérapie combinée composée de quatre composés différents :

- la leucovorin, un dérivé de l'acide folique, qui inhibe la synthèse des purines et pyrimidines [14] (consulté le 5/1/24).
- l'oxaliplatine, un complexe organoplatine, qui bloque la réplication et la transcription de l'ADN [15] (consulté le 5/1/24).
- l'irinotecan, un dérivé semi-synthétique de la camptothécine, qui inhibe l'activité de la topoisomérase I. Cette inhibition entraîne des cassures de l'ADN déclenchant l'apoptose [16] (consulté le 5/1/24).
- le 5-fluorouracile (5-FU), un analogue de pyrimidine, dont les métabolites actifs (F-UMP et F-dUMP) inhibent l'activité de la thymidylate synthase nécessaire à la synthèse de thymidine et donc d'ADN [17] (consulté le 5/1/24).

La radiothérapie néo-adjuvante peut également être envisagée dans le but d'améliorer le contrôle local de la tumeur chez les patients atteints de PDAC localement avancé et limite résécable [18], [19]. En ce qui concerne les PDAC métastatiques, la thérapie standard consiste en l'utilisation du FOLFIRINOX ou la gemcitabine en monothérapie avec une intention simplement palliative [20]. Bien que le FOLFIRINOX améliore considérablement la survie médiane des patients par rapport à la gemcitabine seule ou combinée au nab-paclitaxel [21], ce

schéma thérapeutique est accompagné d'une toxicité accrue. C'est pourquoi, il est réservé aux patients atteints d'un cancer du pancréas métastatique présentant un état général satisfaisant [22].

1.2.5. Caractéristiques du PDAC

1.2.5.1. Plasticité et hétérogénéité tumorale

Le pancréas contient des cellules exocrines (cellules acinaires), épithéliales (cellules canalaire) et endocrines (cellules α , β , δ et PP). Lors de situations de stress, d'inflammation ou de dommages tissulaires, les cellules acinaires subissent une transdifférenciation appelée « Acinar to Ductal Metaplasia » (ADM), au cours de laquelle elles adoptent un phénotype plus semblable à celui des cellules épithéliales [23]. Au cours de l'ADM, les cellules acinaires sont plus susceptibles d'acquérir des mutations et peuvent être à l'origine de lésions préneoplasiques appelées « Pancreatic Intraepithelial Neoplasia » (PanIN) (Figure 3) [24]. Ces lésions sont classées en différents stades en fonction de leurs caractéristiques histologiques :

- PanIN-1A : lésion de bas grade ressemblant au tissu d'origine.
- PanIN-1B : lésion de bas grade avec des atypies cytologiques et architecturales minimales (la lésion acquiert une architecture papillaire).
- PanIN-2 : lésion présentant des atypies cytologiques et architecturales légères à modérées tel qu'un polymorphisme nucléaire.
- PanIN-3 : lésion de haut grade avec des atypies cytologiques et architecturales sévères sans invasion à travers la membrane basale.

Ces transformations sont induites par des mutations génétiques progressives de plusieurs proto-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs [25]. Les mutations les plus fréquentes du PDAC concernent les gènes :

- *KRAS*, un proto-oncogène codant pour une petite GTPase mutée dans plus de 90% des tumeurs du pancréas.
- *TP53*, un gène suppresseur de tumeurs codant pour la protéine p53 et muté dans 80% des tumeurs du pancréas.
- *CDKN2A*, un gène suppresseur de tumeurs codant pour l'inhibiteur de la kinase dépendant de la cycline et muté dans 60% des cas.
- *SMAD4*, un gène suppresseur de tumeurs codant une protéine participant à la régulation de l'expression de gènes en réponse au « Transforming growth factor beta » (TGF β). Ce gène est muté dans 40% des cas de cancer du pancréas.

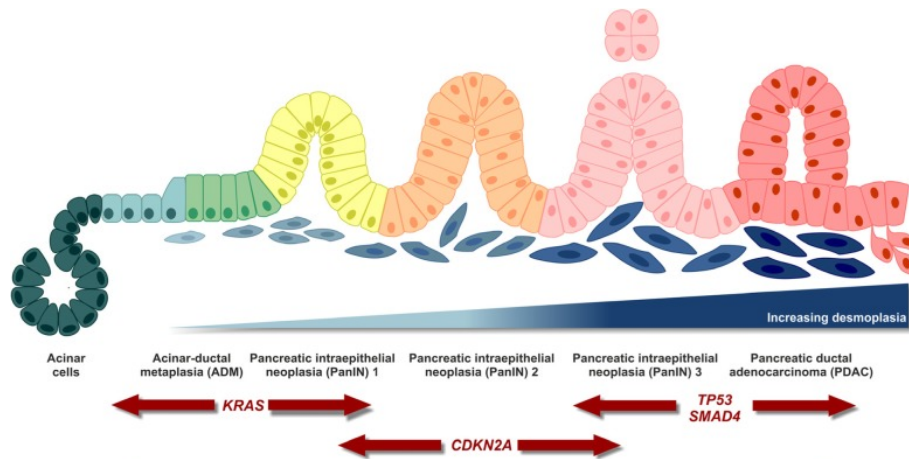


Figure 3 : Carcinogénèse du PDAC. Le PDAC survient à travers plusieurs étapes allant des lésions précurseurs (ADM) à la progression de lésions dysplasiques de bas grades à haut grades avec l’acquisition d’atypies cytologiques et d’aberrations génétiques (la mutation dans le gène KRAS étant la plus précoce) [26].

Néanmoins, la cellule d’origine du PDAC reste débattue. Les PanINs sont les lésions les plus fréquemment observées (80 à 85%) et se développent à partir d’une cellule acinaire tandis que 10% à 15% des cas de PDAC sont attribués à des « Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms » (IPMNs) qui proviendraient d’une cellule ductale [27].

1.2.5.2. Microenvironnement desmoplasique, hypoxique et immunosuppresseur

Une caractéristique du microenvironnement du PDAC est la présence d’un stroma desmoplasique, représentant jusqu’à 90% du volume tumoral. Ce stroma est composé de divers éléments cellulaires, notamment les « *Pancreatic Stellate Cells* » (PSC), les « *Cancer-Associated Fibroblasts* » (CAFs), des cellules immunitaires, des cellules endothéliales ainsi que des composants acellulaires tels que le collagène fibrillaire (majoritairement collagène 1), les glycoprotéines (fibronectine), les protéoglycanes (lumican, versican), des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines et des vésicules extracellulaires (Figure 4) [28]. La réaction desmoplasique ou fibrose tumorale, se manifeste par une formation excessive de tissus fibreux dans le stroma de la tumeur, principalement attribuable à l’activité des myofibroblastes.

La contribution de la desmoplasie associée au microenvironnement tumoral dans la progression du PDAC reste controversée. D’une part, la densité de l’ECM dans le PDAC entrave physiquement le système vasculaire, limitant ainsi l’administration d’agents thérapeutiques par voie intraveineuse et l’infiltration des cellules immunitaires [29]. D’autre part, des données suggèrent que l’absence de dépôt d’ECM pourrait favoriser la dissémination des cellules cancéreuses du site primaire de la tumeur vers des sites distants, comme observé dans des modèles murins où une augmentation du nombre de vaisseaux sanguins a été observée [30].

Une autre caractéristique du microenvironnement associé au PDAC est l'hypoxie. Cette condition résulte principalement de la présence du stroma desmoplasique, de la prolifération élevée des cellules cancéreuses qui entraîne une demande accrue d'oxygène, ainsi que d'une mauvaise vascularisation qui compromet l'apport en oxygène. En réponse à l'hypoxie, l'« Hypoxia Inducible Factor 1 subunit alpha » (HIF-1 α) subit une translocation vers le noyau et, en collaboration avec des coactivateurs, induit la transcription de gènes qui confèrent aux cellules cancéreuses une résistance aux thérapies et un phénotype plus agressif [31].

Ces deux caractéristiques s'accompagnent d'une accumulation de cellules myéloïdes tels que des macrophages qui ont adopté un état immunosuppresseur soutenant la progression du PDAC. Bien que très intéressant, nous ne nous attarderons pas sur le microenvironnement immunosuppresseur du PDAC dans le cadre de ce mémoire [26].

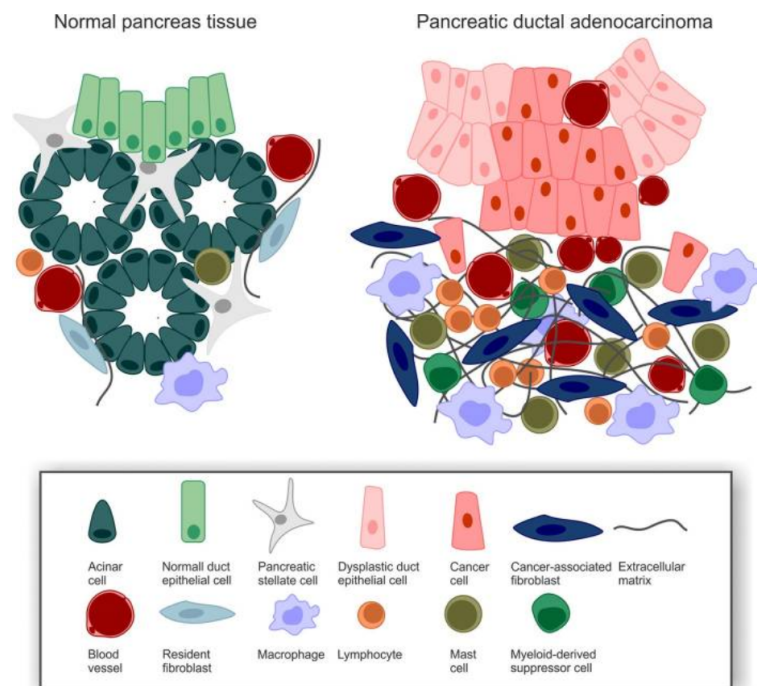


Figure 4 : Microenvironnement desmoplasique du PDAC caractérisé par la présence de CAFs, d'ECM abondante, de cellules myéloïdes suppressives et d'un réseau vasculaire désorganisé [26].

1.2.5.3. Formation de métastases

Une autre caractéristique du PDAC est la formation précoce de métastases. Au moment du diagnostic de la maladie, plus de 50% de patients atteints de PDAC présentent déjà des métastases, majoritairement situées au niveau du foie, des poumons et de la cavité péritonéale. Cette tendance s'explique principalement par des symptômes non spécifiques et par l'absence de marqueurs cliniques précoces disponibles.

1.2.5.4. Résistance thérapeutique

La dernière caractéristique du PDAC est l'acquisition d'une résistance aux traitements. Comme mentionné précédemment, les modalités thérapeutiques de première ligne impliquent l'utilisation de la gemcitabine et du FOLFIRINOX. Toutefois, la chimiorésistance intrinsèque ou acquise limite l'efficacité de ces traitements. Une augmentation de l'expression de la thymidylate synthase (TS) et de la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD), qui catabolise le 5-FU, contribue à la résistance au traitement par FOLFIRINOX [32]. Par ailleurs, des données récentes indiquent que les CAFs limitent l'efficacité du traitement à la gemcitabine en métabolisant ce dernier en dFdCTP, un métabolite qui ne peut pas traverser les membranes cellulaires, réduisant ainsi la concentration efficace du composé actif dans les cellules tumorales [33].

1.3. Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs)

1.3.1. Origine des CAFs

Les CAFs constituent une population hautement hétérogène, provenant généralement de trois sources principales : les fibroblastes résidents, les PSCs et les cellules souches mésenchymateuses. Les fibroblastes résidents sont des cellules mésenchymateuses qui interviennent dans le processus de la cicatrisation des blessures et sont activées de manière transitoire. Les PSCs, quant à elles, sont caractérisées par la présence de nombreuses gouttelettes lipidiques ayant la capacité de stocker de la vitamine A. Enfin, les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules progénitrices multipotentes adultes qui ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en divers types cellulaires [34]. Dans le contexte du PDAC, ces trois types cellulaires sont stimulés par des facteurs paracrines, tel que TGF- β 1 ou des interleukines, et adoptent un phénotype activé [35].

1.3.2. Sous-types de CAFs dans le PDAC

De nos jours, plusieurs sous-types de CAFs ont été identifiés tels que les « *Myofibroblastic Cancer-Associated Fibroblasts* » (myCAF), les « *Inflammatory Cancer-Associated Fibroblasts* » (iCAF) et les « *Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts* » (apCAF) [36].

Lors de la cicatrisation d'une plaie, les fibroblastes résidents se transforment en myofibroblastes, caractérisés par l'expression d'« alpha smooth muscle actin » (α -SMA), grâce à la signalisation du TGF- β . Cette transition vise à favoriser la synthèse des constituants de l'ECM et de la membrane basale [37]. Une fois ce processus terminé, les myofibroblastes

entrent en apoptose et disparaissent. Cependant, une activation continue des fibroblastes peut induire des modifications épigénétiques conduisant à une production accrue d'ECM menant à une desmoplasie [38]. Les myCAFs constituent le sous-type de CAFs le plus prédominant dans le stroma (50%) du PDAC [28].

En ce qui concerne les iCAFs, ils se distinguent par leurs fonctions immuno-régulatrices et inflammatoires. En effet, les iCAFs expriment des ligands immunosuppresseurs tels que le CXCL-12 et l'interleukine-6 (IL-6). Le ligand CXCL12 entrave le recrutement des lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral. De plus, une étude a démontré que CXCL12 favorise la prolifération et la dissémination tumorale en agissant sur les cellules tumorales par l'intermédiaire de l'IL-6 [28].

Les apCAFs, bien qu'ils représentent une fraction minoritaire parmi les sous-populations des CAFs, contribueraient à la suppression immunitaire dans le PDAC. Ils ont la capacité de présenter des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ en exprimant le complexe majeur d'histocompatibilité-II (MHC-II) à leur surface, mais ils ne possèdent pas les molécules co-stimulatrices (CD80, CD86 et CD40) nécessaires à la prolifération des lymphocytes T. Par conséquent, le MHC-II pourrait agir comme des récepteurs leurres pour désactiver les lymphocytes T [39]. Cependant, l'existence des apCAF chez l'humain reste débattue [40].

Une autre sous-population de CAFs, les CAFs Meflin⁺, semblent inhiber le remodelage structurel de l'ECM, et sont ainsi associés à un pronostic plus favorable chez les patients atteints de PDAC [41].

Les sous-types de CAFs présentent une plasticité importante et peuvent s'interconvertir l'un en l'autre, permettant un remodelage et une adaptation constante du stroma tumoral aux agents thérapeutiques [42].

1.4. Dialogue entre les CAFs et les cellules cancéreuses pancréatiques

En 2008, Vonlaufen et ses collègues ont rapporté, pour la première fois, une accélération de la croissance tumorale pancréatique et l'apparition de métastases après l'injection orthotopique de cellules cancéreuses pancréatiques en présence de PSC dans une souris *nude* athymique (BALB/c), comparativement à l'injection de cellules cancéreuses seules. Leur étude a également mis en évidence l'existence d'une interaction réciproque entre les cellules cancéreuses et les CAFs [43].

1.4.1. Le dialogue bidirectionnel entre les cellules cancéreuses et les CAFs favorise la progression tumorale

Une étude a révélé l'existence d'un réseau de signalisation réciproque entre les cellules cancéreuses et les CAFs. Plus précisément, les cellules tumorales mutées dans le gène *KRAS* communiquent avec les PSC via la signalisation Sonic Hedgehog (SHH). Sous cette influence, les PSC activés augmentent la sécrétion d'éléments de l'ECM, d'« Insulin-Like Growth Factor 1 » (IGF1) et de « Growth Arrest specific 6 » (GAS6), lesquels régulent la prolifération des cellules cancéreuses, les protègent de l'apoptose et renforcent leur capacité mitochondriale via un axe IGF1R/AXL-AKT [44].

Une autre étude a mis en évidence que les cellules cancéreuses mutées dans le gène *TP53*, caractérisées par une activité persistante de STAT3 et de la voie de signalisation NF- κ B, peuvent éduquer les CAFs à établir un environnement pro-métastatique et chimiorésistant. En effet, les cellules cancéreuses mutantes *TP53* sécrètent de manière accrue le facteur de nécrose tumorale TNF- α , stimulant la production de perlecan par les CAFs. Le perlecan est un protéoglycan de l'ECM qui favorise un environnement propice à l'invasion et aux métastases [45].

1.4.2. Effet des CAFs sur le métabolisme des cellules cancéreuses

Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses adaptent leur métabolisme pour soutenir leur taux de prolifération élevé. L'effet Warburg décrit un changement métabolique dans la production d'énergie cellulaire, passant de la phosphorylation oxydative mitochondriale à une augmentation de la glycolyse, même en présence d'une quantité suffisante d'oxygène. Cependant, récemment, le phénomène « Reverse Warburg Effect » a émergé, dans lequel les cellules tumorales et les CAFs deviennent métaboliquement interdépendants (Figure 5).

Les CAFs peuvent moduler le métabolisme des cellules cancéreuses via l'échange de métabolites. En effet, les CAFs présentent une activité glycolytique et une sécrétion de lactate élevée, via le transporteur de lactate MCT4, qui favorise la progression tumorale [46]. De plus, l'autophagie réalisée par les CAFs fournit un acide aminé non essentiel, l'alanine, qui s'avère être une source alternative de carbone pour répondre aux besoins métaboliques des cellules cancéreuses. L'utilisation de cette nouvelle source d'énergie diminue la dépendance des cellules cancéreuses à l'égard du glucose limité dans le microenvironnement tumoral [47]. Les CAFs peuvent également stimuler le métabolisme des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA) en sécrétant des alpha-cétoacides à chaîne ramifiée, tel que l'acide α -ketoisovalérique, alimentant le cycle de Krebs [48]. Enfin, les CAFs peuvent échanger des métabolites dérivés de lipides

telle que la lysophosphatidylcholine (LPC) qui sera métabolisée en acide lysophosphatidique favorisant la prolifération et la migration via l'activation de la protéine kinase B (PKB) dans les cellules cancéreuses pancréatiques [49].

Les CAFs peuvent également reprogrammer le métabolisme des cellules cancéreuses via des exosomes. Ces derniers sont des vésicules extracellulaires, dont la taille varie de 50 à 150 nm de diamètre, qui assurent la communication intercellulaire. Les exosomes transportent divers constituants tels que des acides aminés, des lipides ou des intermédiaires du cycle de Krebs. Une fois les exosomes délivrés aux cellules cancéreuses, le contenu de ceux-ci (miARN) entrave la respiration mitochondriale et favorise la prolifération via une glycolyse accrue [50]. En outre, les exosomes dérivés des CAFs peuvent contribuer à la résistance des cellules cancéreuses pancréatiques à la chimiothérapie, en particulier à la gemcitabine, en apportant un facteur induisant la chimiorésistance (miRNA-106b) [51].

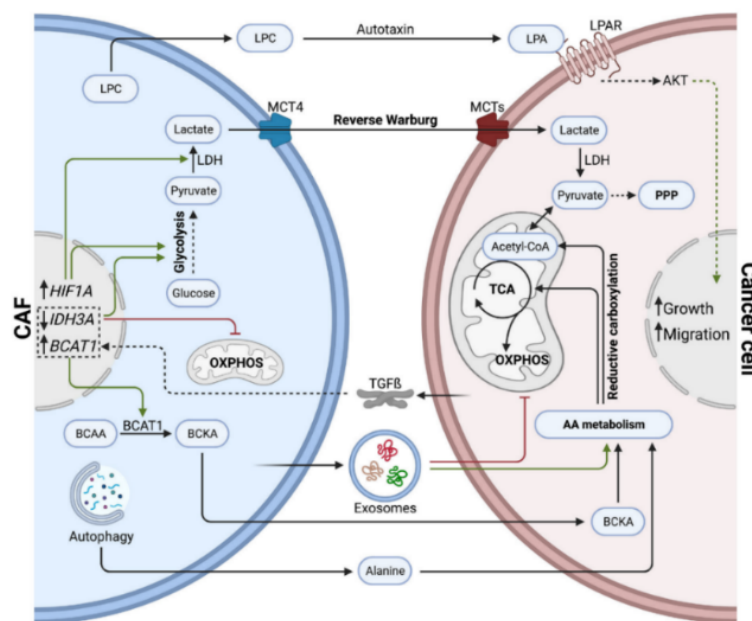


Figure 5 : Effets des CAFs sur la prolifération et la migration des cellules cancéreuses via l'échange de métabolites dans le PDAC. Les CAFs influencent la croissance et la migration des cellules cancéreuses en sécrétant du lactate, des acides aminés (alanine), des lipides (alpha-cétoacide à chaîne ramifiée) et des exosomes [28].

1.5. La myoferline

La myoferline est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des ferlines qui sont des protéines impliquées dans la fusion des membranes. Chez l'humain, la première ferline découverte a été la dysferline, impliquée dans la réparation de la membrane plasmique des cellules musculaires squelettiques. Après peu de temps, le gène de la myoferline (*MYOF*) a été découvert grâce à un grand pourcentage de similarité avec celui de la dysferline (69% de

similitude entre les séquences de nucléotides de la myoferline et de la dysferline). Alors que les mutations du gène de la dysferline provoquent la myopathie de Miyoshi et la dystrophie musculaire de type 2B, les mutations du gène de la myoferline ne semblent pas être directement associées à une maladie génétique. Cependant, le knock-out du gène *Myof* chez la souris induit une diminution de la régénération musculaire et un phénotype dystrophique [51].

Le gène *MYOF* se situe sur le chromosome 10q23.33 et est composé de 54 exons codant pour 9 variants d'épissage dont 4 qui ne sont pas traduits en protéines. Parmi les isoformes de la *MYOF*, les isoformes 1 (230kDa) et 5 (175kDa) sont prédominantes dans le cancer du pancréas. Dans un contexte physiologique, la myoferline est fortement exprimée dans les myoblastes, les cellules endothéliales, les muscles cardiaques et squelettiques, le tissu pulmonaire, tandis qu'elle est faiblement exprimée dans les reins, le placenta et le cerveau [52].

1.5.1. Structure de la myoferline

La myoferline comprend sept domaines de type C2 (C2A, C2B, C2C, C2D, C2E, C2F et C2G), un domaine Ferline A (FerA) positionné au centre, un domaine DYSF et un domaine transmembranaire carboxy-terminal (Figure 6A). De manière générale, les domaines C2 interagissent avec des phospholipides membranaires de façon dépendante du Ca^{2+} . Plus précisément, le domaine C2A se lie aux bicouches de phospholipides chargés négativement ayant une fraction élevée en phosphatidylsérine. Le domaine C2B se lie directement au domaine EHD2 associé au transport endocytaire tels que l'internalisation et le recyclage des récepteurs de surface cellulaire. Le domaine FerA lie les phospholipides chargés négativement de manière indépendante du calcium. Enfin, le domaine DysF peut se lier à la cavéoline-3 qui est une protéine de la membrane plasmique des cavéoles trouvée dans la plupart des types cellulaires [53].

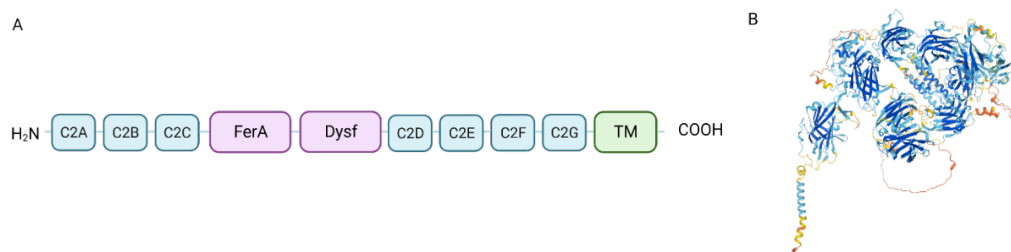


Figure 6 : Structure de la myoferline. A) La myoferline contient plusieurs domaines : sept domaines C2, un domaine FerA, un domaine DYSF ainsi qu'un domaine transmembranaire C-terminal. B) Structure tridimensionnelle de la myoferline (produite par alphaFold) [54].

1.5.2. Rôles physiologiques de la myoferline

La myoferline a été initialement décrite dans la croissance et la régénération musculaire. Elle est exprimée dans les myoblastes en cours de fusion qui sont des cellules souches à l'origine de la formation des syncytia des muscles squelettiques. Elle permet la fusion des myoblastes en myotubes ainsi que la fusion de myoblastes avec un myotube préexistant et ce grâce au domaine C2B qui lie EHD2 [55], [56]. La myoferline participe également au recyclage du récepteur à l'IGF1 qui est une protéine importante dans la régulation de la croissance musculaire. C'est pourquoi, lorsque nous retirons le gène de la myoferline, nous obtenons un phénotype dystrophique dans une souris KO *Myof* [57].

La myoferline est également exprimée à la membrane plasmique des cellules endothéliales. Elle joue un rôle important dans la prolifération, la migration et la libération d'oxyde nitrique des cellules endothéliales médiées par le « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEFG). Plus précisément, elle participe à la régénération de la membrane après un dommage physique en dirigeant les vésicules contenant le « Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 » (VEGFR-2) vers la membrane plasmique pour favoriser son expression à la surface et l'empêcher d'être dégradé par le protéasome. Elle est également impliquée dans le processus d'endocytose des cellules endothéliales en formant un complexe avec la dynamine-2 et la cavéoline-1 [58]. Ainsi, lorsque la myoferline est déplétée, le VEGFR-2 est dégradé et les cellules endothéliales prolifèrent et migrent moins [59].

Enfin, la myoferline est abondante dans les pré-adipocytes et y joue un rôle dans la différenciation en adipocytes matures [60].

1.5.3. Rôles de la myoferline dans les cellules cancéreuses pancréatiques

Comme mentionné précédemment, la myoferline est impliquée dans plusieurs processus associés à la membrane plasmique tels que la fusion, la réparation membranaire, le trafic vésiculaire, le recyclage des récepteurs membranaires, l'endocytose et l'exocytose. Étant donné que ces processus liés à la membrane sont essentiels pour la progression, l'adaptation et la survie des cellules cancéreuses, la myoferline semble être importante pour le caractère malin de celles-ci.

En 2011, grâce à une analyse de l'expression génique différentielle, la myoferline a été identifiée parmi les protéines surexprimées dans le PDAC [61]. Une autre étude a révélé une corrélation entre le niveau d'expression de la myoferline et le grade histologique de 154 patients atteints de PDAC suggérant une implication de la myoferline dans l'agressivité et le pronostic

du PDAC. Par ailleurs, il a été démontré que les patients ayant une expression de la myoferline dans le tissu tumoral avaient une survie globale significativement inférieure à ceux présentant une tumeur myoferline négative [62].

Depuis la mise en évidence de la myoferline comme potentiel biomarqueur en 2011, le Laboratoire de Recherche sur les Métastases a su identifier le rôle pro-tumoral de la myoferline dans différents types de cancer et via différents mécanismes que je vais décrire ci-dessous.

Une étude réalisée sur des cellules cancéreuses BxPC-3, montre l'importance de la myoferline dans l'angiogenèse. En effet, la myoferline est importante dans la sécrétion du VEGFA, ainsi que dans la régulation des récepteurs pro-angiogéniques tels que Tie-2 et VEGFR-2 [63]. La myoferline joue donc un rôle clé dans la croissance et la vascularisation des tumeurs pancréatiques. Par conséquent, il a été démontré que la déplétion de la myoferline dans des tissus murins pancréatiques entraînait une atténuation de l'angiogenèse [64].

En plus de jouer un rôle dans la prolifération et l'angiogenèse, la myoferline est un composant des exosomes dérivés des cellules cancéreuses de différentes origines et participant à la progression du cancer. La déplétion de la myoferline dans les exosomes cause une diminution de la taille des exosomes, une modification de la teneur en protéines dans ceux-ci et une modification de leur capacité de fusion avec des cellules cibles telles que des cellules endothéliales [65].

De plus, la myoferline est nécessaire dans la reprogrammation métabolique énergétique, une caractéristique du cancer du pancréas. En effet, la présence de la myoferline soutient une activité de phosphorylation oxydative élevée dans les cellules du PDAC, contribuant ainsi à accroître la flexibilité énergétique indispensable à la progression du PDAC. Lorsqu'elle est déplétée, une fission mitochondriale apparaît avec une diminution de la prolifération cellulaire et de la production d'ATP, ainsi qu'une altération de l'autophagie [66]. Rademaker et ses collègues ont utilisé un modèle de métastases hépatiques de PDAC chez des souris immunodéficientes et ont sélectionné successivement des cellules PANC-1 *in vivo* qui métastasent dans le foie. Grâce à ce modèle, ils ont démontré que l'abondance et l'expression de la myoferline augmentaient dans les clones hautement métastatiques et diminuaient dans les clones faiblement métastatiques. De plus, la déplétion de la myoferline réduisait la capacité migratoire des cellules tout en réduisant l'activité de la phosphorylation oxydative [67].

La surexpression de la myoferline ne se limite pas seulement au cancer du pancréas. La myoferline est également surexprimée dans les cellules cancéreuses mammaires triples négatives dans lesquelles elle régule le métabolisme lipidique et augmente le potentiel métastatique [68]. Il a également été rapporté que l'expression de la myoferline est corrélée avec la survie des patients atteint d'un cancer du côlon [69].

En conséquence, la myoferline pourrait présenter une cible thérapeutique potentielle pour le PDAC. À l'heure actuelle, plusieurs molécules visant sa fonction ont été développées. Parmi celles-ci, on retrouve le WJ460 qui vise le domaine C2D de la myoferline présentant une activité anti-métastatique prometteuse [70]. Notre équipe a récemment mis en évidence que le ciblage pharmacologique de la myoferline par le WJ460 déclenchait une mort régulée particulière, la ferroptose, dans 4 lignées pancréatiques cancéreuses différentes, sans avoir d'effet sur une lignée normale pancréatique [71]. De plus, le composé 6y, liant également la myoferline, inhibe l'apparition de métastases du cancer du pancréas en inversant la transition mésenchymateuse épithéliale *in vitro* et *in vivo* [72].

2. Hypothèses, objectifs et stratégie

L'équipe MAC « *Mitochondrial Adaptation in Cancer* », dirigée par le Professeur Olivier Peulen au sein du Laboratoire de Recherche sur les Métastases, s'intéresse depuis 2014 à la myoferline en tant que protéine surexprimée dans le cancer du pancréas. L'hypothèse suivie dans le cadre de ce mémoire suggère que la présence de la myoferline au sein des CAFs pourrait influencer la sécrétion de facteurs favorisant la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses pancréatiques. L'objectif de ce travail consiste à confirmer ou infirmer ce potentiel rôle de la myoferline des CAFs dans le dialogue entre les cellules stromales et cancéreuses au sein des tumeurs pancréatiques. Afin de répondre à cet objectif, une lignée de cellules stellaires pancréatiques humaines (hPSC127) déplétées en myoferline à l'aide de deux shRNA spécifiques (shMYOF#1, shMYOF#2) sera utilisée. Un shRNA irrelevante sera utilisé en tant que contrôle. L'analyse de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses sera réalisée en mettant en œuvre plusieurs modèles de coculture entre les CAFs et les cellules cancéreuses.

3. Matériels et méthodes

3.1. Lignées cellulaires

Plusieurs lignées cellulaires sont utilisées dans le cadre de ce mémoire. Les cellules CAPAN-1, CFPAC-1 et SU86.86 sont des lignées de cellules cancéreuses humaines obtenues à partir de métastases hépatiques du pancréas. Elles ont été collectées respectivement chez un homme de 40 ans, un homme de 26 ans et une femme de 57 ans atteints d'un adénocarcinome pancréatique. Ces cellules sont mutées pour les gènes *TP53* et *KRAS*. Les cellules CAPAN-1 (CVCL_0237) et SU86.86 (CVCL_3881) ont été mises à notre disposition par le Professeur Marc Bracke (Université de Gand). Les cellules CFPAC-1 (CVCL_1119) ont été achetées à la « American Type Culture Collection ». Les cellules hPSC127 proviennent d'un patient atteint de PDAC et ont été immortalisées par l'expression de l'oncogène grand T du virus SV40. Ces cellules ont été générées et fournies généreusement par le Professeur Atsushi Masamune (Tohoku University, Japan). Préalablement à ce mémoire, les cellules hPSC127 ont été transduites grâce à des vecteurs lentiviraux pour produire des shRNA irrélevants (shNT : shRNA ciblant la luciférase) ou spécifiquement dirigés contre les transcrits de la myoferline. Enfin, les cellules Jurkat E6-1 (CB2657) sont des lymphoblastes T qui proviennent du sang périphérique d'un homme de 14 ans atteint d'une leucémie aigüe à cellules T et ont été achetées à la « European Collection of Authenticated Cell Cultures » (ECACC) [73].

Les cellules CAPAN-1 ont été maintenues dans un milieu « Dulbecco's Modified Eagle Medium » (DMEM) (L0101, Biowest) supplémenté avec 4,5 g/L de glucose, 10% de sérum fœtal bovin (FBS) décomplémenté, 4 mM de L-glutamine et 1 mM de sodium pyruvate tandis que les cellules CFPAC-1 ont été cultivées dans du milieu « Iscove's Modified Dubecco's Medium » (IMDM) (12-722, BioWhittaker®) supplémenté avec 10% de FBS. Les cellules SU86.86 ont été maintenues dans un milieu DMEM (L0101, Biowest) supplémenté avec 4,5 g/L de glucose, 3 mM de glutamine et 10% de FBS. Les cellules hPSC127 ont été cultivées dans du milieu DMEM-F12 (L0093, Biowest) supplémenté en FBS (10%) et en L-glutamine (1 mM). Enfin, les cellules Jurkat ont été maintenues dans du milieu « Roswell Park Memorial Insitute Medium » (RPMI) 1640 (L0501, Biowest) supplémenté avec 2 mM de glutamine et 10% de FBS.

Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de culture de 175 cm², 75 cm² et 25 cm² (431080, 430720U, 430168, Corning), dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre (353004, Corning), dans des plaques 24 puits (353047, Corning) ou dans des plaques 96 puits Nunclon™ Delta Surface (167008, ThermoScientific) à 37°C dans un incubateur humidifié à 5% de CO₂. Lorsque les cellules atteignent une confluence de 80 à 90%, elles sont détachées à la trypsine/EDTA puis comptées à l'aide d'un compteur de cellules (Casy Innovatis) et sontensemencées à une densité inférieure. Au-delà de dix passages, les cellules n'ont plus été utilisées. Une surveillance d'une éventuelle contamination des cellules par des mycoplasmes est effectuée mensuellement. Une authentification des lignées est également réalisée par la firme Eurofins.

3.2. Préparation du milieu conditionné

Un milieu conditionné (CM) est un milieu qui est enrichi en facteurs libérés par des cellules en culture. Le milieu conditionné par les hSPC127 a été préparé en ensemençant 600 000 cellules dans une boîte de Petri de 60 mm de diamètre en présence de 6 mL de milieu DMEM-F12 appauvri en FBS (0,5%, L0093, Biowest). Après 48h, le milieu est récolté et centrifugé durant 5 minutes à 200g. Le surnageant, débarrassé des débris cellulaires, constitue le milieu conditionné. Nous avons choisi d'utiliser un milieu appauvri en FBS dans le but d'évaluer si le milieu conditionné conférerait un avantage aux cellules cancéreuses sans interférence de facteurs potentiellement apportés par le FBS.

3.3. Analyse de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été évaluée grâce aux IncuCytes SX3 et SX5 (Sartorius, Ann Arbor, MI, USA) disponibles à la plateforme GIGA Cell-Imaging (Université de Liège). Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'impact des hPSC127 sur la prolifération des cellules cancéreuses par mesure de la confluence.

3.3.1. Milieu conditionné

Les cellules CAPAN-1, CFPAC-1 et SU86.86 ont été ensemençées à raison de 6400 cellules par puits dans une plaque 96 puits. Après adhésion des cellules, les puits sont rincés avec un tampon phosphate salin (PBS) (MS0220B1001, Biowest) afin d'éliminer le milieu de culture. Les cellules sont ensuite mises en présence du milieu conditionné (150 µL/puits). La prolifération des cellules est suivie en contraste de phase pendant 48h, à raison de deux images par puits toutes les 4h.

3.3.2. Coculture directe

Les cellules cancéreuses (1200 cellules) et les hPSC127 (4800 cellules) ont étéensemencées ensemble dans les puits d'une plaque 96 puits en présence de 150µL de milieu DMEM-F12 appauvri en FBS (0.5%). Les cellules cancéreuses ont préalablement été marquées pendant 30 minutes au Cytopainter green (ab138891, Abcam) à raison de 1 µL par 0.5 mL de suspension cellulaire (1200 cellules). Les hPSC127 ont été transduites pour exprimer une version nucléaire de la protéine fluorescente mKate.

3.4. Analyse de la migration cellulaire

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'impact des hPSC127 sur la migration des cellules cancéreuses.

3.4.1. Topotaxie

La migration topotaxique a été analysée en deux dimension (*scratch assay*) à l'aide de l'IncuCyte SX3 de la plateforme d'imagerie cellulaire du GIGA. Les cellules ont étéensemencées à raison de 30 000 cellules par puits dans une plaque 96 puits ImageLock (BA-04855, Sartorius). Les « *scratches* » sont réalisés 24h après l'ensemencement, une fois que le tapis cellulaire a atteint la confluence, grâce à un outil spécifique (96-well Woundmaker tool, Sartorius). Les puits sont rincés au PBS afin de se débarrasser des débris cellulaires et du milieu de culture. Les cellules sont ensuite mises en présence du CM (150 µL/puits). La migration des cellules est évaluée en temps réel pendant 48h à raison de deux images par puits toutes les 4h.

3.4.2. Chimiotaxie

La chambre de Boyden est une chambre de migration dans laquelle les cellules cancéreuses sontensemencées dans un insert (compartiment supérieur) et traversent une membrane poreuse grâce à un gradient chimique (chimiotaxie). Le compartiment supérieur est séparé du compartiment inférieur par une membrane dont les pores ont un diamètre de 8 µm (662 638, Greiner bio-one). Les faces intérieures des membranes sont *coatées* par une solution de gélatine de porc (0,01%, G1890, Sigma) dans de l'acide acétique (0,01%) afin d'éviter un détachement des cellules après migration.

Les cellules cancéreuses (40 000 SU86.86 ou 160 000 CAPAN-1, CFPAC-1) ou les lymphoblastes (200 000 Jurkat E6-1) sontensemencés dans du milieu DMEM-F12 appauvri en FBS (0,5%) et supplémenté en Pénicilline-Streptomycine (0,1%, Pen Strep 15070-063, gibco) et BSA (0,1%). Les compartiments inférieurs contiennent soit 600 µL de milieu conditionné, soit 40 000 cellules hPSC127 dans 600 µL de milieu DMEM-F12 appauvri en FBS (0,5%). La

boîte de culture est placée dans un incubateur durant 48h. Les cellules présentes sur la membrane sont fixées au méthanol (20846.361, VWR) ou à la paraformaldéhyde (4%, 11699408, VWR), puis colorées au cristal violet (F04663, Medion Diagnostics) et rincées dans de l'eau (10 min). Les cellules non migrantes, qui se trouvent à la surface supérieure de l'insert, sont retirées à l'aide d'un coton-tige. Après séchage, les inserts sont photographiés puis analysés à l'aide du logiciel Fiji.

3.5. Formation de sphéroïdes

Les cellules CAPAN-1, CFPAC-1 et SU 86.86 sont ensemencées dans une plaque 96 puits (17492596, Thermo Scientific Nunc Sphera) à raison de 2500 cellules par puits. La plaque est centrifugée durant 5 minutes à 1000g et placée dans l'incubateur à 5% de CO₂ durant 3 jours. Les sphéroïdes sont ensuite maintenus dans du milieu DMEM-F12 0.5% en FBS.

3.6. Cytokine Array

Le cytokine array est une technique qui permet de simultanément mettre en évidence plusieurs cytokines présentes dans un échantillon. Le principe repose sur une membrane préalablement adsorbée par des anticorps (Ac) spécifiques des cytokines recherchées. Le kit sélectionné dans ce travail est le « Human Cytokine Antibody Array » (ab133998, Abcam) permettant l'analyse de 80 cytokines humaines (Annexe 1).

Le cytokine array a été utilisé, en suivant le protocole du fournisseur, pour analyser du milieu conditionné par des hPSC127 déplétés en myoferline. Dans un premier temps, les sites de liaison non spécifiques de la membrane ont été bloqués durant 30 minutes grâce à une solution fournie par le fabricant. La membrane est ensuite incubée durant 24h à 4°C avec 1 ml de milieu conditionné plus concentré que celui utilisé précédemment. En effet, le milieu conditionné par les hSPC127 a été préparé en ensemencant 600 000 cellules dans une boîte de Petri de 60 mm de diamètre en présence de 3 mL de milieu DMEM-F12 appauvri en FBS. Après lavage avec des solutions fournies par le fabricant, la membrane est incubée pendant 2h à RT avec 1 ml d'une solution d'anticytokines conjugués à la biotine. Après lavage, 2 ml de streptavidine conjuguée à la horseradish peroxidase (HRP) sont mis en présence de la membrane durant 2h à RT. Après lavage, la détection est réalisée par chemiluminescence. Plusieurs expositions de la membrane sont effectuées afin d'obtenir un signal non saturé. La quantification des signaux est réalisée par une analyse densitométrique à l'aide du logiciel Fiji.

3.7. Immunofluorescence indirecte de cellules adhérentes avec fixation au paraformaldéhyde

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage utilisant des Ac primaires dirigés contre la protéine d'intérêt et des Ac secondaires couplés à un fluorochrome. La fluorescence est révélée par microscopie confocale à fluorescence (Leica Stellaris 8).

Les cellules hPSC127 sont ensemencées sur des lamelles couvre-objet stériles dans une boîte de culture 24 puits à raison de 40 000 cellules par puits dans 1 ml de milieu DMEM-F12. Après 48h, les cellules sont lavées au PBS et fixées à la paraformaldéhyde 4% durant 20 minutes à température ambiante (RT). Ensuite, les cellules sont perméabilisées à l'aide d'une solution de perméabilisation (PBS-Triton 1%) durant 5 minutes à RT. Afin d'éliminer les réactions aspécifiques, les lamelles couvre-objet sont incubées avec une solution de blocage (PBS-BSA 1%) durant 30 minutes à RT. Dans une chambre humide et fermée, les cellules présentes sur les lamelles couvre-objet sont mises en contact avec l'Ac primaire (Annexe 2) dilué 100x dans du PBS-BSA 1%. Après incubation d'une nuit à +4°C, les lamelles couvre-objets sont lavées 3x au PBS-1% BSA et placées avec l'Ac secondaire fluorescent (Alexa Fluor 488) dilué 1000x dans du PBS-BSA 1% avec une solution Hoechst (1/50) durant 45 minutes. Une lamelle couvre-objet est utilisée en tant que contrôle négatif. Celle-ci sera mise en contact avec 30µL de PBS-BSA 1% lors de l'incubation avec l'Ac primaire et avec 30µL d'Ac secondaire. Enfin, les lames couvre-objets sont placées sur une lame en verre avec un milieu de montage à fluorescence (S3023, Dako).

3.8. Extraction et dosage protéique

Les protéines sont extraites d'une monocouche cellulaire avec un *cell scrapper* à l'aide d'une solution de lyse constituée de SDS (1%), d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (80 µM d'aprotinine, 2 mM de leupeptine, 1,5 mM pepstatine A, 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle) et de plusieurs inhibiteurs de phosphatases (100 mM NaF, 100 mM Na₃VO₄). Le lysat a été collecté dans des tubes Eppendorf et soniqué durant 5 secondes (puissance : 2 Watt, Vibra Cell) afin de fragmenter l'ADN génomique.

Après extraction, la concentration en protéines est déterminée à l'aide d'un kit Pierce BCA Protein Assay (23227, Thermo Scientific). Afin de quantifier les protéines, une courbe standard d'albumine de sérum bovin (BSA) et de SDS (1%) a été préparée. Les échantillons (1 µL) sont dilués dans du SDS (1%) afin d'obtenir un volume final de 25 µL. Le réactif de dosage est préparé en mélangeant une solution A (23228, Thermo Scientific), qui contient du carbonate de

sodium, du bicarbonate de sodium, de l'acide bicinchoninique, du tartrate de sodium et de l'hydroxyde de sodium, et une solution B (1859078, Thermo Scientific) contenant du sulfate de cuivre. Un volume de 200 μL de ce réactif est ajouté aux standards (25 μL) et aux échantillons (25 μL). Les mélanges sont placés dans un incubateur à 60°C durant 45 minutes. L'absorbance des standards et des échantillons est mesurée par un spectrophotomètre (FilterMax F5, Molecular Device) à la longueur d'onde de 562 nm.

3.9. Western-blot

Le western-blot est une technique de biologie moléculaire qui permet de détecter et de quantifier des protéines spécifiques dans un échantillon en plusieurs étapes.

3.9.1. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les échantillons de protéines sont dilués à concentrations égales dans un tampon de chargement (60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 25% glycérol, 14,4 mM 2-mercaptoéthanol, 1% bleu de bromophénol) puis dénaturés à la chaleur (99°C) durant 5 minutes. Les échantillons et un marqueur de poids moléculaire (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) sont chargés sur un gel de polyacrylamide immergé dans du tampon d'électrophorèse (250 mM Tris-base, 1,92 M Glycine, 1% SDS). Le gel de polyacrylamide est formé d'un gel de concentration (3.5 % Acrylamide) et d'un gel de séparation (10 % Acrylamide). La séparation des protéines est effectuée sous une différence de potentiel de 120 V durant 90 minutes.

3.9.2. Électrotransfert sur une membrane de PVDF

Après séparation électrophorétique, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène fluorure (PVDF) (03010040001, Roche) durant 90 minutes à 100 V dans un tampon de transfert (5 mM Tris, pH 8,3, 192 mM glycine, 20% méthanol) afin de rendre les protéines accessibles aux Ac. Les membranes de PVDF sont préalablement plongées durant 1 minute dans du méthanol pour activation.

3.9.3. Blocage des sites de liaison non spécifique

Afin de minimiser l'absorption aspécifique des Ac, les membranes de PVDF sont saturées avec du lait dégraissé en poudre (A0830, PanReac AppliChem) en solution dans du tampon Tris-Buffered-Saline-Tween (TBS-t, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween) durant 60 minutes à température ambiante et sous agitation constante.

3.9.4. Immunodétection et révélation

L'immunodétection se réalise en deux étapes. Premièrement, les membranes sont mises en contact avec les Ac primaires (Annexe 3) dilués dans du TBS-t supplémenté avec 5% de BSA (A3294, Sigma Aldrich) ou de lait (5%) durant 1 nuit à 4°C et sous agitation. Après 3 lavages successifs durant 10 minutes à l'aide de TBS-t, les membranes sont incubées avec des Ac secondaires dilués dans du TBS-t supplémenté avec 5% BSA ou de lait (5%) durant 60 minutes à température ambiante et sous agitation.

La révélation est réalisée à l'aide d'un kit Pierce™ ECL Western (32106, Thermo Scientific). Les membranes sont incubées avec une solution de révélation contenant du luminol et du peroxyde d'hydrogène durant 1 minute puis révélées en chambre noire à l'aide de films autoradiographiques (47410 19289, Fuji Medical X-ray, Fujifilm). La normalisation du signal est réalisée grâce à la protéine 70 kDa Heat Shock Cognate (HSC70). Plusieurs expositions de la membrane sont effectuées afin d'obtenir un signal non saturé pour chaque cible. La quantification des signaux est réalisée par une analyse densitométrique à l'aide du logiciel ImageJ.

3.10. RT-qPCR

La réaction de polymérisation en chaîne quantitative après transcription inverse (RT-qPCR) est une technique qui permet de quantifier en temps réel l'abondance relative d'ADN complémentaire (ADNc) généré par transcription inverse d'ARN.

3.10.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARNs de cellules est réalisée à l'aide d'un kit NucleoSpin® RNA Plus (740984.250, Macherey-Nagel). Les cellules sont lysées avec 350 µL de tampon qui contient du chlorure de 1-dodecylpyridinium (2,5-5%) et du thiocyanate de guanidine (30-45%). Le lysat est placé sur une colonne contenant une membrane de silice et centrifugé durant 30 secondes à 11 000g. Ensuite, le filtrat est mélangé avec une solution de liaison (*Binding Solution*) et placé sur une deuxième colonne, suivi par une centrifugation à travers une membrane de silice durant 15 secondes à 11 000g. Après 3 lavages successifs avec des tampon de lavages, l'ARN est élué grâce à de l'eau sans RNases par deux centrifugations successives durant 20 secondes à 11 000g dans un volume final de 40 µL. La concentration en ARN est mesurée grâce au rapport spectrophotométrique 260nm/280nm (Nanodrop ND-1000).

3.10.2. Transcription inverse

La transcription inverse est réalisée grâce à un kit de synthèse d'ADNc (BR0400401, BiotechRabbit). Celui-ci est constitué d'un réactif contenant des hexamères aléatoires, des inhibiteurs de RNase, un tampon, un mix de dNTP et la transcriptase inverse II. Un volume de 17 μL de ce mélange est ajouté à 100 ng d'ARN/ μL . La solution est placée dans un thermocycler (Aeris) qui permet l'hybridation des amorces (5 min à 25°C), l'élongation de l'ADNc (60 min à 42°C) et la dénaturation de l'ARN polymérase (5 min à 70°C).

3.10.3. PCR quantitative

La qPCR est réalisée dans une plaque 96 puits (A36930, Thermo Fisher Scientific). Dans chaque puits, on mélange 12,5 ng d'ADNc aux amorces sens et anti-sens (0,1 nM), dans le réactif Low ROX SYBR 2X (UF-LSMT-B0701, Takyon Eurogentec) contenant du MgCl_2 (2,5 mM), des dNTPs, le SybrGreen, la Taq polymérase et une référence passive (Rox) destinée à normaliser l'émission de fluorescence par le SybrGreen. Ensuite, la plaque est centrifugée durant 5 minutes à 200g et placée dans une machine qPCR QuantStudio 3 (Applied Biosystem, Thermo Scientific). La première étape est une dénaturation de l'ADNc durant 10 minutes à 95°C suivie de 40 cycles constitués d'une dénaturation de 15 secondes à 95°C et d'une élongation de 1 minute à 60°C.

La quantification relative de l'expression du gène d'intérêt est normalisée par rapport à un gène de référence (ARN 18S) et une condition expérimentale de référence par la méthode du $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Cycle Threshold). (Annexe 4).

3.11. Analyses statistiques

Toutes les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.3.0 et présentées sous forme de moyennes \pm SEM. L'intervalle de confiance était fixé à 95%. Lorsque la moyenne de plus de deux échantillons indépendants a été comparée, le test ANOVA-1 suivi de comparaisons multiples de Dunnett ou le test de Kruskal-Wallis suivi de comparaisons multiples de Dunn a été effectué. Un test Anova-2 suivi de comparaisons multiples de Tukey a été réalisé lorsque 2 variables étaient utilisées.

4. Résultats

4.1. Caractérisation moléculaire des cellules cancéreuses pancréatiques

Afin d'avoir un aperçu du caractère épithélio-mésenchymateux des cellules cancéreuses que nous allons utiliser, nous y avons évalué l'abondance de la vimentine, de l'E-cadhérine, de Snail et de Slug. L'abondance de la myoferline a également été évaluée. Des CAFs ont été utilisés en tant que contrôle mésenchymateux, exprimant la vimentine mais pas d'E-cadhérine.

L'abondance de l'E-cadhérine est équivalente dans les trois lignées cellulaires cancéreuses tandis que la vimentine est présente uniquement dans les cellules CFPAC-1. La protéine Snail est peu abondante dans les cellules cancéreuses tandis que Slug est présente dans les CFPAC-1 et dans une moindre mesure dans les cellules SU86.86. Les CAPAN-1 et SU86.86 ont donc clairement un phénotype épithélial, alors que les CFPAC-1 ont un phénotype épithélio-mésenchymateux mixte. En ce qui concerne la myoferline, elle est présente dans les CAFs et toutes les cellules cancéreuses. Cependant, l'abondance de la myoferline est plus élevée dans les cellules CFPAC-1 (Figure 7).

4.2. Les CAFs n'influencent pas la prolifération des cellules cancéreuses

Afin de déterminer si les CAFs ont une influence sur la prolifération des cellules cancéreuses dans notre modèle *in vitro*, nous avons réalisé une culture des cellules cancéreuses en présence d'un milieu conditionné par les CAFs (48h) ainsi qu'une coculture directe des cellules cancéreuses et des CAFs.

4.2.1. Culture de cellules cancéreuses en présence d'un milieu conditionné par les CAFs

Le milieu conditionné (CM) est un milieu qui est appauvri en nutriments consommés par les cellules qui l'ont conditionné mais enrichi par les facteurs sécrétés par celles-ci. Par conséquent, en guise de contrôle et pour tenir compte de l'effet dû à l'appauvrissement en nutriments, nous avons utilisé du milieu conditionné par les cellules cancéreuses respectives (CAPAN-1, CFPAC-1 ou SU86.86). Du milieu frais (DMEM-F12, 0.5% FBS) non conditionné par des cellules a été utilisé en tant que contrôle. La confluence des cellules cancéreuses a été évaluée durant 48h.

L'évolution de la confluence des cellules CAPAN-1 est identique dans les trois conditions de culture, c'est-à-dire en présence de milieu frais, de milieu conditionné par les cellules cancéreuses, ou de milieu conditionné par les CAFs (Figures 8A, B). En revanche, l'évolution de la confluence des cellules CFPAC-1 est significativement différente ($p < 0.0001$) lorsque

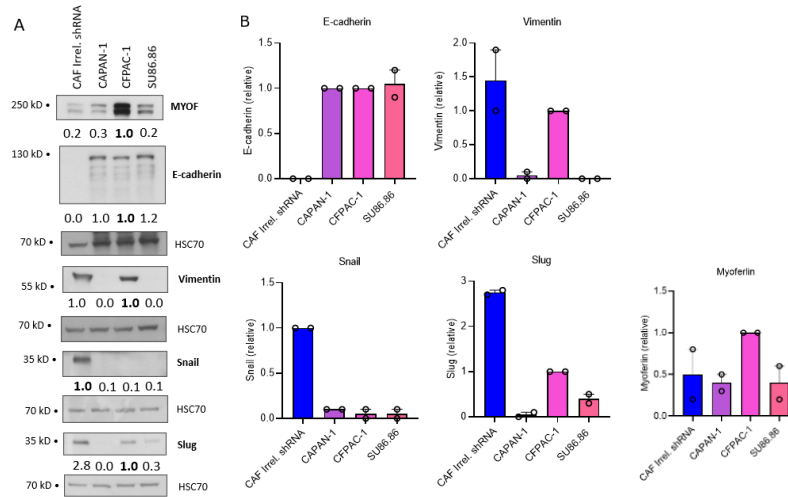


Figure 7 : Caractérisation moléculaire des cellules cancéreuses CAPAN-1, CFPAC-1 et SU86.86. (A) Western-blot représentatif de la myoferline (230 kDa), de l'E-cadhérine (120 kDa), de la vimentine (58 kDa), de Snail (29 kDa) et de Slug (29 kDa). Le chargement a été normalisé grâce à la protéine HSC70. (B) Quantification densitométrique relative des western-blots. Les graphiques représentent l'abondance relative des protéines dans chaque lignée cellulaire. Tous les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM, n=2.

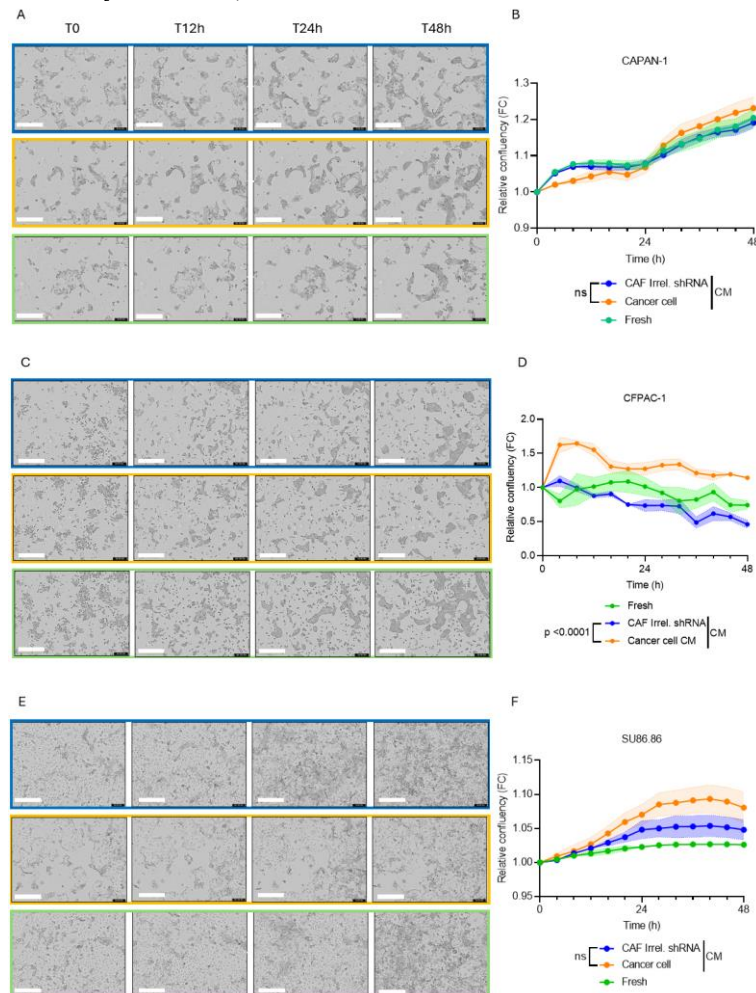


Figure 8 : Le milieu conditionné par les CAFs n'influence pas la prolifération des cellules cancéreuses pancréatiques (A et B) CAPAN-1, (C et D) CFPAC-1, (E et F) SU86.86. Les images sont présentées à T0, T12h, T24h et T48h. Échelle= 400 μ m. Tous les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm l'intervalle de confiance à 95%, n=4. Un test statistique Anova-2 suivi de comparaisons multiples de Tukey ont été effectués. Fresh : milieu DMEM-F12 + 0.5% FBS, CM : Milieu conditionné.

celles-ci sont cultivées en présence d'un milieu conditionné par elles-mêmes (Figure 8C, D) comparé au conditionnement par les CAFs. Cependant, on peut légitimement se poser la question de la pertinence biologique de cette observation en raison du faible écart entre les conditions expérimentales. Enfin, l'évolution de la confluence des cellules SU86.86 est plus rapide lorsqu'elles sont en contact avec un milieu conditionné par les CAFs. Néanmoins, cette différence n'est pas statistiquement significative (Figure 8E, F). Le milieu conditionné par les CAFs ne contient donc pas de facteurs favorisant la prolifération des cellules cancéreuses dans notre modèle.

4.2.2. Coculture directe des cellules cancéreuses et des CAFs

En conséquence, ne voyant pas une différence probante et significative lors de la mise en contact du milieu conditionné par des CAFs avec les cellules cancéreuses, nous avons entrepris une co-culture directe. Cette dernière est un modèle plus adéquat et tient compte du dialogue réciproque entre les cellules cancéreuses et les CAFs. Nous avons donc évalué la prolifération des cellules cancéreuses cultivées en présence de CAFs. Étant donné que les CAFs représentent environ 70 à 80% du volume tumoral [74], nous avons choisi de cultiver 1200 cellules cancéreuses en présence de 4800 CAFs (ratio 1/4). Du milieu frais DMEM-F12 (0.5% FBS) a été utilisé en tant que contrôle négatif (absence de CAFs). La confluence relative de chaque type cellulaire est mesurée par fluorescence grâce à l'incorporation préalable du « Cytospainter » vert par les cellules cancéreuses et par l'expression de la protéine fluorescente rouge mKate dans les CAFs.

La confluence relative des trois lignées de cellules cancéreuses décroît au cours du temps en présence (courbe bleue) ou en absence de CAFs (courbe verte). À l'inverse, la confluence des CAFs (courbe rouge) s'accroît au cours du temps dans les trois conditions expérimentales (Figure 9). Il n'y a donc pas d'avantage prolifératif des cellules cancéreuses par l'intermédiaire d'un dialogue réciproque entre les CAFs et les cellules cancéreuses. La prolifération des CAFs semble prendre le dessus sur celle des cellules cancéreuses dans notre modèle de coculture.

4.2.3. Mise en place d'un modèle 3D de culture de cellules cancéreuses pour évaluer l'effet de milieu conditionné

Finalement, dans la perspective de tester l'effet du milieu conditionné sur la prolifération des cellules cancéreuses dans un modèle à trois dimensions, nous avons essayé de mettre au point une culture de ces cellules sous la forme de sphéroïdes. Malheureusement, le protocole suivi, précédemment utilisé dans notre laboratoire avec d'autres lignées de cellules cancéreuses du pancréas (HPAF-II), ne nous a pas permis d'obtenir des sphéroïdes avec nos lignées cancéreuses

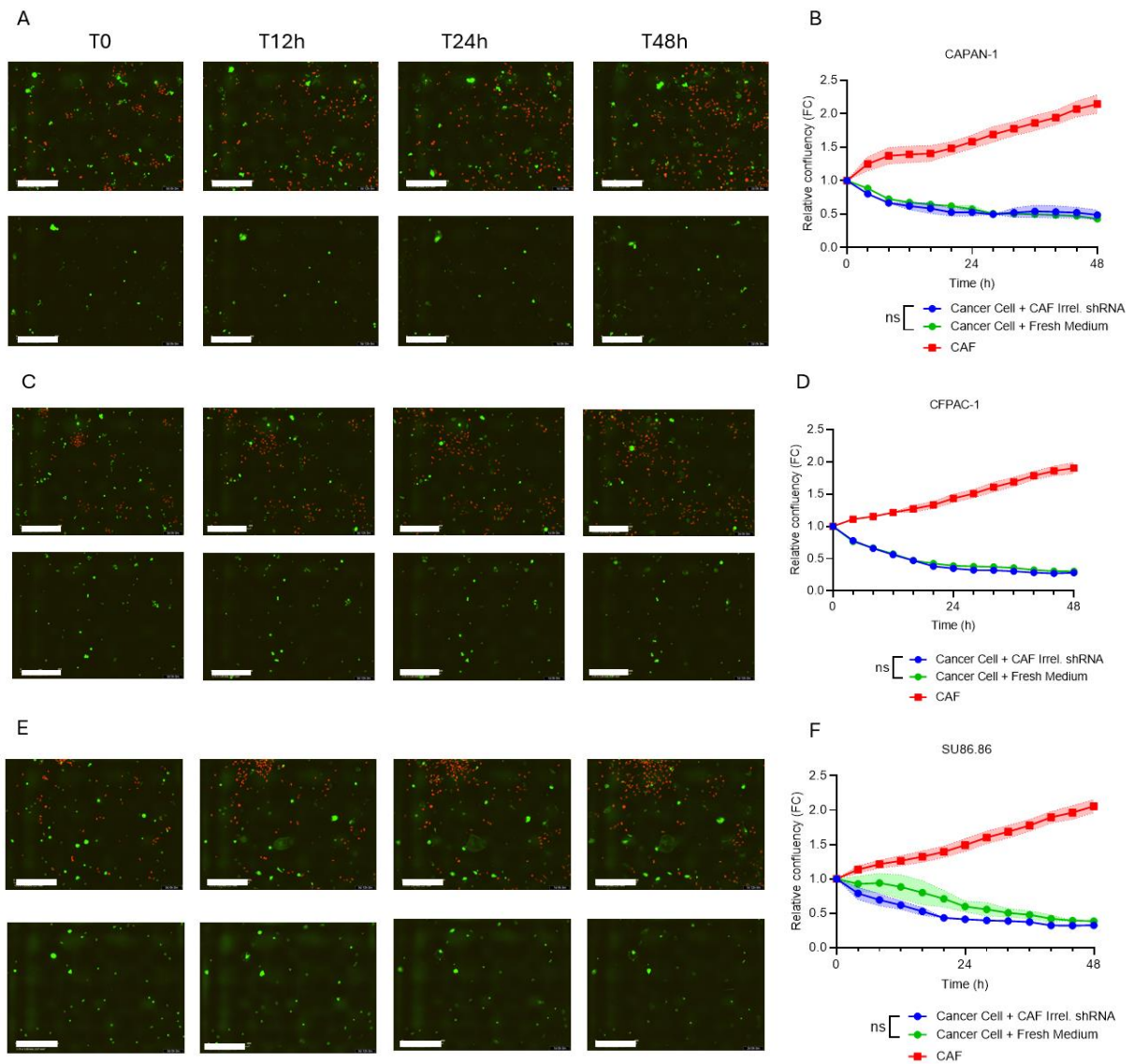


Figure 9 : Les CAFs n’influencent pas la prolifération des cellules cancéreuses pancréatiques. (A et B) CAPAN-1, (C et D) CFPAC-1, (E et F) SU86.86. Les cellules vertes correspondent aux cellules cancéreuses tandis que les CAFs sont rouges. Les images sont présentées à T0, T12h, T24h et T48h. Échelle : 400µm. Tous les résultats sont présentés sous la forme d’une moyenne \pm l’intervalle de confiance à 95%, n=4. Un test statistique Anova-2 suivi de comparaisons multiples de Tukey ont été effectués. Fresh : milieu DMEM-F12 + 0.5% FBS, CM : Milieu conditionné.

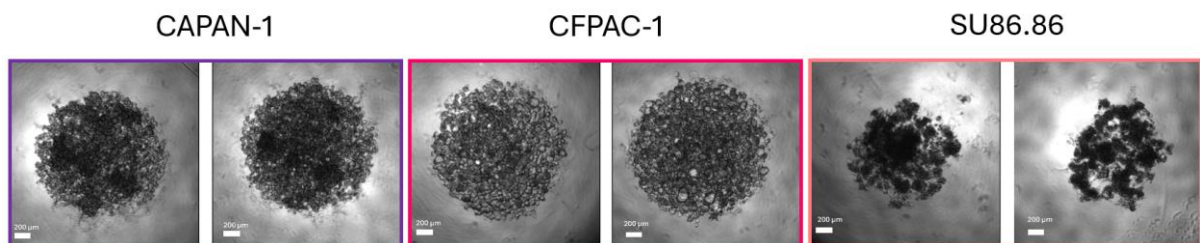


Figure 10 : Modèles 3D des cellules CAPAN-1, CFPAC-1 et SU86.86 après 3 (gauche) ou 10 (droite) jours de culture. Les images ont été prises au microscope Celena S. Échelle : 200µm.

d'intérêt. En effet, les cellules se rassemblent effectivement au fond du puit de culture mais n'adhèrent pas les unes aux autres pour former une structure régulière et homogène. Les cellules forment plutôt un agrégat inconsistant de cellules qui dégénère en quelques jours (Figure 10).

4.3. Les CAFs stimulent la migration des cellules cancéreuses

De manière à comprendre la propension des cellules cancéreuses à caractère épithélial, à acquérir un caractère migratoire sous influence du microenvironnement tumoral, nous avons pris l'initiative de mettre en contact celles-ci avec du milieu conditionné par les CAFs.

Nous avons analysé la capacité migratoire des cellules cancéreuses pancréatiques en présence de milieu frais, de milieu conditionné par les CAFs ou de milieu conditionné par les cellules cancéreuses. Les capacités migratoires des cellules cancéreuses ont été évaluées en deux dimensions (topotaxie en Scratch Assay) et en trois dimensions (chimiotaxie en Chambre de Boyden).

4.3.1. Analyse de la topotaxie

La capacité migratoire des cellules a été estimée par la mesure de la confluence cellulaire dans la région de migration qui est exprimée par rapport au temps 0 de l'analyse (relative wound healing).

Après 48h de migration, la confluence des cellules CAPAN-1 dans la région de migration reste basse même si le logiciel d'analyse indique des valeurs égales à 68%, 31% et 45% en présence, respectivement, de milieu frais, de milieu conditionné par les cellules cancéreuses, et par des CAFs. L'analyse statistique des données suggère une différence statistiquement significative ($p=0.004$) qui ne se traduit pas dans les images capturées par l'Incucyte (Figure 11A, B). En outre, ces cellules semblent subir une contraction de la marge de migration plutôt qu'un réel déplacement des cellules vers l'espace laissé libre.

En ce qui concerne les cellules CFPAC-1 cultivées dans du milieu frais, 8h suffisent pour combler complètement l'espace de migration. Lorsque les cellules sont dans du milieu conditionné par les cellules cancéreuses, leur migration est significativement moins efficace puisqu'une confluence de 25% est atteinte après 8h de migration. De façon importante, la culture des cellules cancéreuses dans du milieu conditionné par les CAFs restaure une migration similaire à celle observée dans du milieu frais (Figure 11C, D).

L'analyse de la migration des cellules SU86.86 indique une cinétique comparable à celle observée pour les cellules CFPAC-1 en présence d'un milieu frais. En effet, 12h de culture

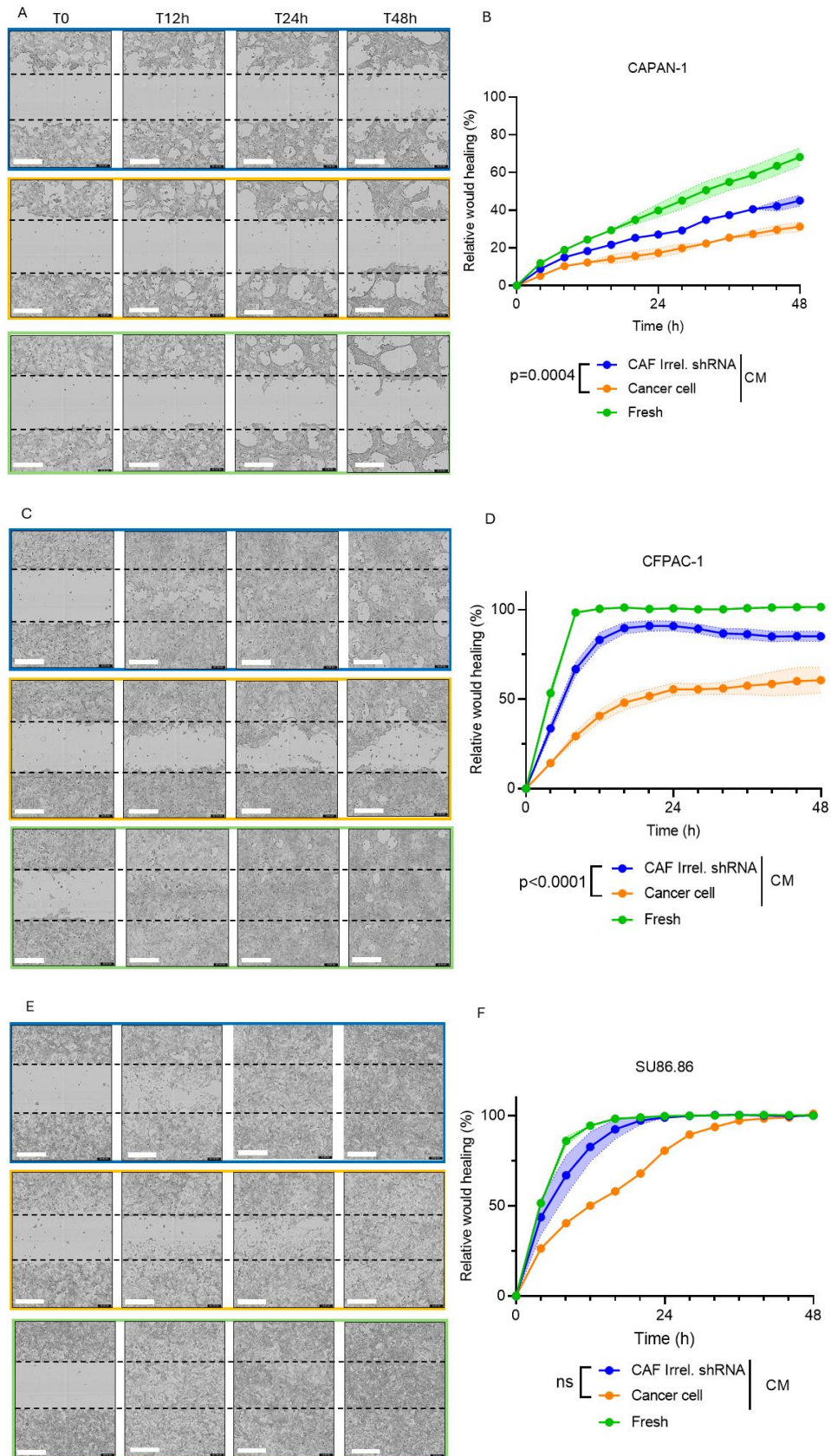


Figure 11 : Les CAFs stimulent la topotaxie des cellules cancéreuses pancréatiques. (A et B) CAPAN-1, (C et D) CFPAC-1, (E et F) SU86.86 Les images sont présentées à T0, T12h, T24h et T48h. Échelle : 400 μ m. Tous les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm l'intervalle de confiance à 95%, n=6. Un test statistique Anova-2 suivi de comparaisons multiples de Tukey ont été effectués. Fresh : milieu DMEM-F12 + 0.5% FBS, CM : Milieu conditionné.

permettent la fermeture complète de la zone de migration. Lorsque les cellules sont cultivées dans du milieu conditionné par les cellules cancéreuses la migration est significativement moins rapide puisqu'une confluence de 50% est atteinte après 12h de migration. Encore une fois, le milieu conditionné par les CAFs accroît la migration des cellules cancéreuses, sans pour autant atteindre un niveau statistiquement significatif (Figure 11E, F).

4.3.2. Analyse de la chimiotaxie

La chimiotaxie est une autre forme de migration, ne dépendant pas de l'espace libre à proximité de la cellule mais de son attraction par un gradient de concentration en molécules attractives [75]. Dans un premier temps, nous avons vérifié la capacité migratoire des cellules cancéreuses pancréatiques dans ce contexte migratoire, en présence de leur milieu respectif dans un système de chambre de Boyden.

Les cellules CAPAN-1 migrent le moins, en accord avec nos résultats de topotaxie (Figure 11). Les cellules les plus migrantes sont les SU86.86 tandis que les cellules CFPAC-1 ont un phénotype intermédiaire (Figure 12).

En raison d'une confluence trop élevée sur l'insert de migration, nous avons fait le choix de réduire le nombre de cellules SU86.86 (40 000 cellules) lors de l'ensemencement.

Dans un second temps, nous avons testé la chimiotaxie de ces cellules face à des milieux conditionnés par les CAFs. Le milieu DMEM-F12 0.5% FBS a servi de contrôle négatif.

Il apparaît que les milieux conditionnés par les CAFs n'influencent pas la migration des cellules CAPAN-1. Cependant, la chimiotaxie des cellules CFPAC-1 et SU86.86 est stimulée par le milieu conditionné. En effet, le milieu conditionné par les CAFs semble attirer plus fortement les CFPAC-1 que le milieu conditionné par les cellules cancéreuses respectives. Dans le cas des cellules SU86.86 l'observation inverse est réalisée (Figure 13).

Dans leur ensemble, ces résultats démontrent donc que les CAFs produisent des facteurs solubles qui favorisent la migration (topotaxie) des cellules cancéreuses.

4.4. La déplétion en myoferline des CAFs n'impacte pas la migration des cellules cancéreuses

Encouragé par ces résultats exploratoires présentés ci-dessus, nous avons souhaité tester notre hypothèse de travail proposant que la myoferline des CAFs participait au dialogue entre les cellules stromales et cancéreuses. Puisqu'une différence significative a été observée dans la

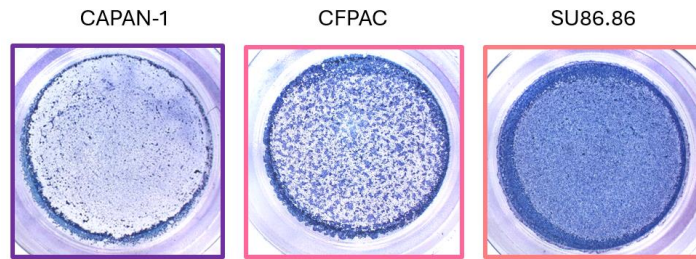


Figure 12 : Migration des cellules cancéreuses dans leurs milieux respectifs. 160 000 cellules ont étéensemencées. Après 48h de migration, les cellules ont été fixées au méthanol et colorées au cristal violet. n=1.

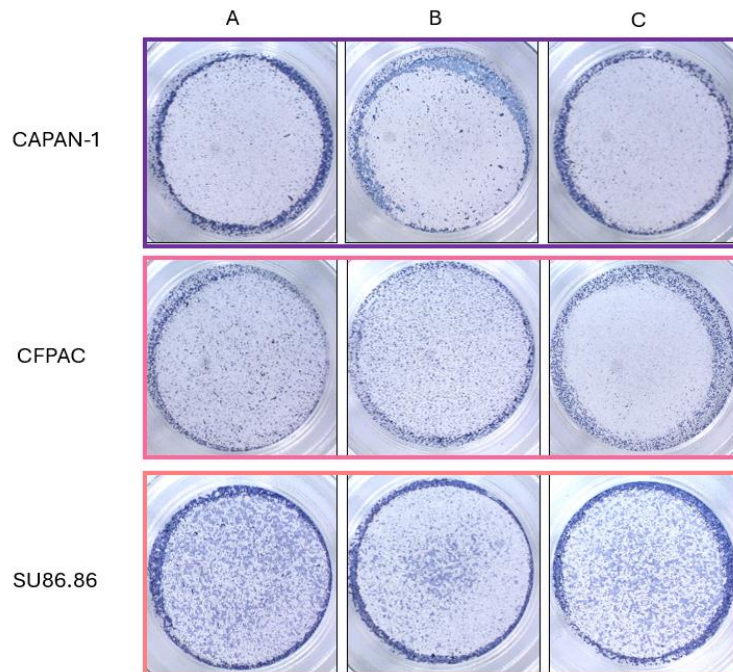


Figure 13 : Les CAFs stimulent la chimiotaxie des cellules cancéreuses pancréatiques. (A) Milieu DMEM-F12 + 0.5% FBS, (B) CM des CAFs Irrel. shRNA, (C) CM des cellules cancéreuses. n=1.

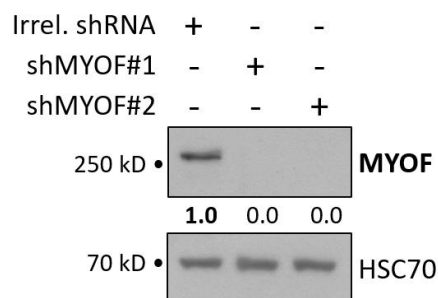


Figure 14 : Western-blot de la myoferline dans les CAFs Irrel. shRNA et shMYOF#1 et #2. Le chargement a été normalisé grâce à la protéine HSC70.

migration des cellules cancéreuses lorsqu'elles étaient cultivées dans du milieu conditionné par des CAFs, nous avons émis l'hypothèse que la myoferline serait impliquée dans ce dialogue, favorisant la migration des cellules cancéreuses. Nous avons donc analysé la migration des cellules cancéreuses CAPAN-1, CFPAC-1 et SU86.86 en présence de milieu conditionné par des CAFs déplétés en myoferline. La déplétion en myoferline a été validée par western-blot (Figure 14).

4.4.1. Évaluation de la topotaxie sous milieu conditionné par les CAFs déplétés en myoferline

Nos analyses indiquent qu'il n'y a pas de différences significatives de la migration topotaxique des cellules cancéreuses CAPAN-1 lorsqu'elles ont mises en présence de milieu conditionné par des CAFs déplétés en myoferline (Figure 15A, B). Cependant, une fois encore, la migration de ces cellules est très faible. Concernant les cellules CFPAC-1, une réduction significative ($p=0.0324$) de leur migration est observée en présence du milieu conditionné par les CAFs déplétés en myoferline. Cependant, cette différence significative n'est observée qu'avec le milieu conditionné par les CAFs shMYOF#2 (Figure 15C, D). Dans le cas des cellules SU86.86, leur migration est la plus élevée quelles que soient les conditions expérimentales considérées (Figure 15E, F).

4.4.2. Évaluation de la chimiotaxie en présence de milieu conditionné par les CAFs déplétés en myoferline

Une différence statistiquement significative ($p=0.0214$) est observée entre la surface occupée par les cellules CAPAN-1 attirées par le milieu conditionné par des CAFs contrôles (Irrel. shRNA) et le milieu conditionné par des CAFs shMYOF#1. Cependant, cette réduction n'est pas considérée comme biologiquement pertinente en raison de la très faible proportion de cellules migrantes (Figure 16A, B). La migration des cellules CFPAC-1 (Figure 16C, D) et SU86.86 (Figure 16E, F) n'est pas impactée par la présence du milieu conditionné par des CAFs déplétés ou non en myoferline.

4.4.3. Évaluation de la chimiotaxie en coculture

Afin de tester si un rôle potentiel de la myoferline dans la sécrétion de facteurs pro-chimiotaxiques est dépendant d'une éducation des CAFs par les cellules cancéreuses, nous avons décidé de mettre au point un système de coculture en chambre de Boyden entre les CAFs (compartiment inférieur) et les cellules cancéreuses (compartiment supérieur). Aucune différence significative de la migration chimiotaxique des cellules CAPAN-1 (Figure 17A, B)

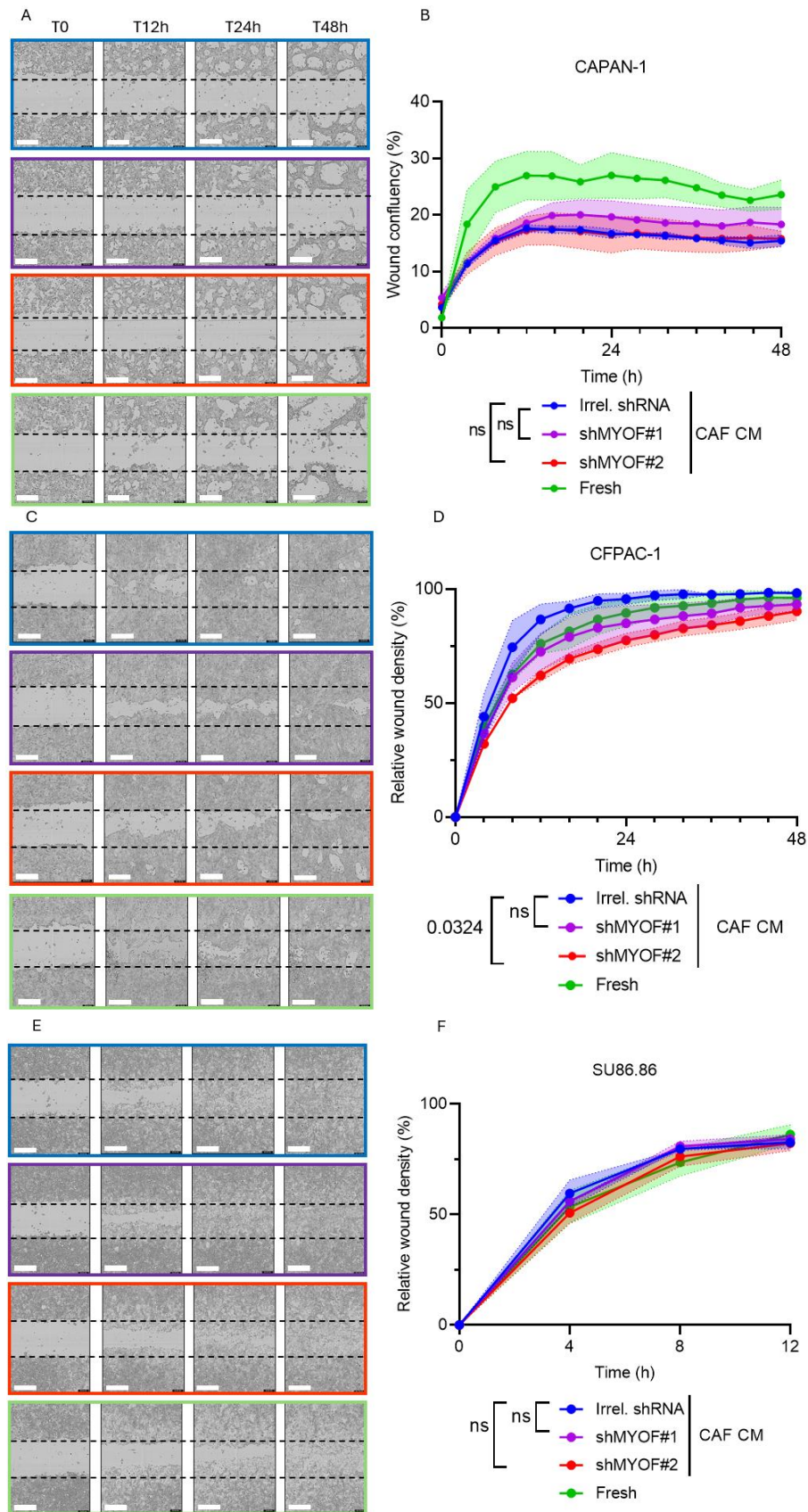


Figure 15 : La déplétion de la myoferline dans les CAFs n'impacte pas la migration topotaxique des cellules cancéreuses pancréatiques. (A et B) CAPAN-1, (C et D) CFPAC-1, (E et F) SU86.86. Les images sont présentées à T0, T12h, T24h et T48h. Échelle : 400µm. Tous les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm l'intervalle de confiance à 95%, n=4. Un test statistique Anova-2 suivi de comparaisons multiples de Tukey ont été effectués. Fresh : milieu DMEM-F12 + 0.5% FBS, CM : Milieu conditionné.

et CFPAC-1 (Figure 17C, D) n'est observée lorsque des CAFs déplétés en myoferline sont cultivés dans le compartiment inférieur de la chambre de Boyden. En revanche, les cellules SU86.86 présentent une réduction statistiquement significative de leur migration en présence de CAFs déplétés en myoferline (CAF shMYOF#1 : $p < 0.0001$, CAF shMYOF#2 : $p = 0.0256$) (Figure 17E, F).

Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent donc que la déplétion de la myoferline des CAFs n'interfère pas avec la production des facteurs solubles qui favorisent la migration chimiotaxique des cellules cancéreuses.

4.5. La déplétion en myoferline altère la sécrétion de cytokines par des CAFs

Suite à l'absence d'un effet cohérent de la déplétion de la myoferline dans les CAFs sur la prolifération et migration des cellules cancéreuses, nous avons décidé de réévaluer notre hypothèse de départ. Utilisant une approche non-biaisée, nous avons déterminé si les CAFs déplétés en myoferline produisaient les mêmes facteurs solubles que leurs homologues exprimant la myoferline. À cette fin, nous avons utilisé un *cytokine array* permettant de mettre en évidence un panel de 80 cytokines.

Préalablement, une RT-qPCR et un western-blot ont été réalisés afin de valider la déplétion en myoferline dans les CAFs shMYOF (Figure 18A, B).

Comme on peut l'apercevoir sur les membranes du *cytokine array* (cercle rouge), une cytokine particulière est présente dans le milieu conditionné par les CAFs déplétés en myoferline et absente du milieu conditionné par des CAFs contrôles (Figure 18C). Il s'agit de la cytokine RANTES (chemokine Regulated upon Activation, Normal T-Expressed, and presumably Secreted) ou CCL5. Son abondance est accrue d'un facteur 6 ($\text{Log}_2(\text{FC}) = 2.59$) et 13 ($\text{Log}_2(\text{FC}) = 3.77$) dans les milieux conditionnés respectivement par les CAFs déplétés en myoferline par les shRNA #1 et #2. En plus de CCL5, d'autres cytokines voient leur abondance accrue par la déplétion en myoferline. Il s'agit de l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-13, l'IL-15, l'eotaxin-3 et l'ostéopontine dans le cas des CAFs shMYOF#1 et de ENA-78, l'ostéopontine, l'oncostatine M, FGF-4 et l'IL-13 dans le cas des CAFs shMYOF#2 (Figure 19).

Afin de vérifier si la déplétion en myoferline influence la production des cytokines au niveau sécrétoire ou transcriptionnel, nous avons analysé l'expression des gènes codant pour les cytokines dont l'abondance variait à la suite de la déplétion en myoferline dans des CAFs. Nous

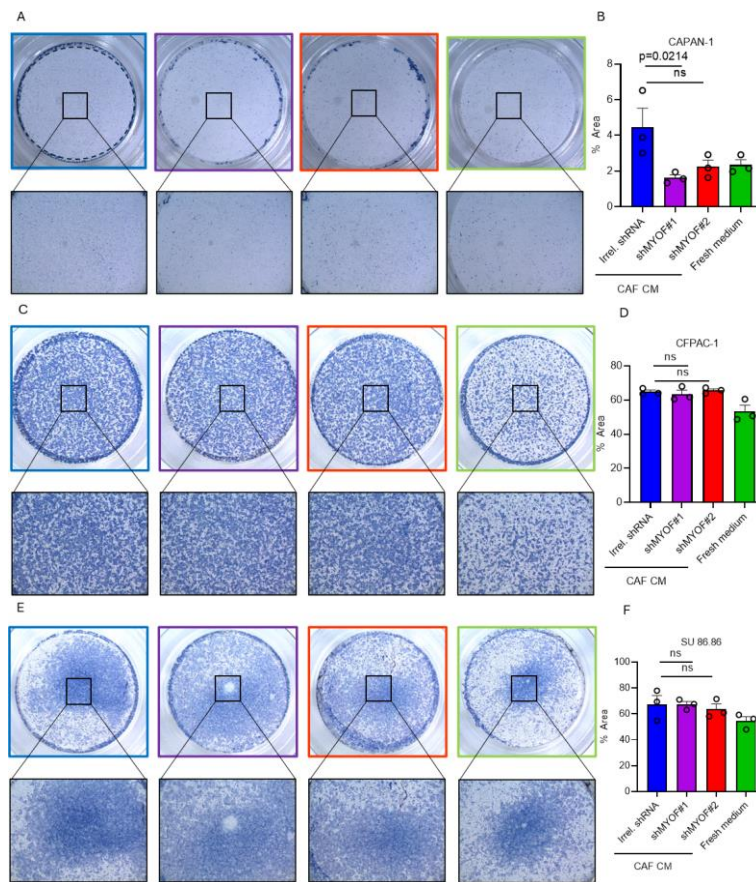


Figure 16 : Le milieu conditionné par des CAFs déplétés en myoferline n'impacte pas la migration chimiotaxique des cellules cancéreuses pancréatiques. (A et B) CAPAN-1, (C et D) CFPAC-1, (E et F) SU86.86. Les images ont été prises après 48h de migration. Les graphiques représentent le pourcentage de l'aire des inserts occupées par les cellules cancéreuses dans chaque condition. Tous les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM, n=3. Un test statistique Anova-1 suivi de comparaisons multiples de Dunnett ont été effectués. Fresh : milieu DMEM-F12 + 0.5% FBS, CM : Milieu conditionné.

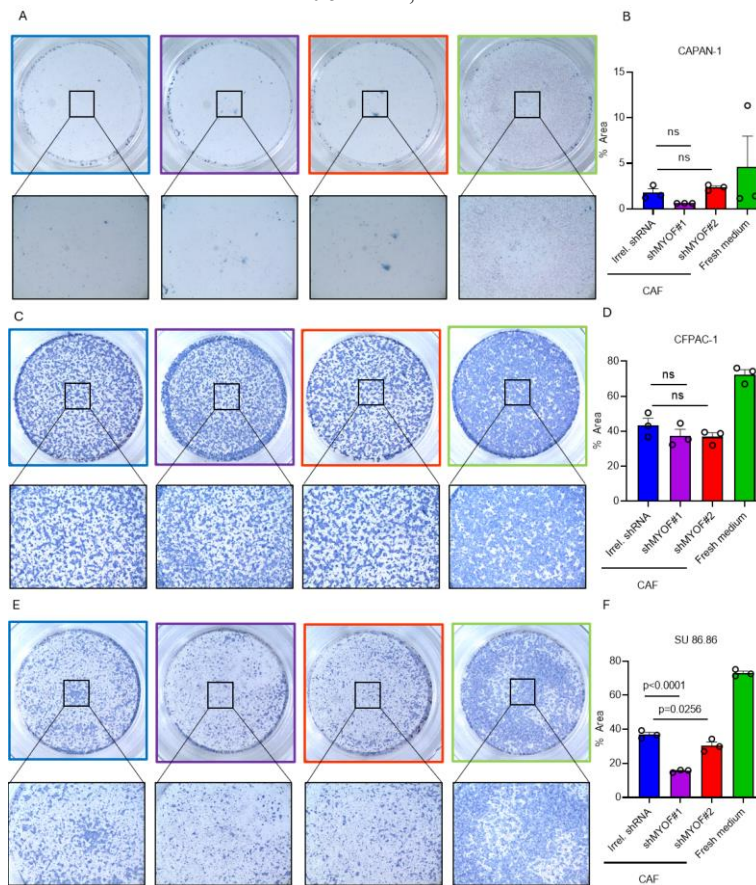


Figure 17 : La déplétion de la myoferline dans les CAFs impacte peu la migration chimiotaxique des cellules cancéreuses pancréatiques. (A et B) CAPAN-1, (C et D) CFPAC-1, (E et F) SU86.86. Les images ont été prises après 48h de migration. Les graphiques représentent le pourcentage de l'aire des inserts occupée par les cellules cancéreuses dans chaque condition. Tous les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM, n=3. Un test statistique Anova-1 suivi de comparaisons multiples de Dunnett ont été effectués. Fresh : milieu DMEM-F12 + 0.5% FBS, CM : Milieu conditionné.

avons analysé les gènes codant pour l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-10, l'IL-13, l'IL-15 et RANTES (CCL5).

L'abondance relative de l'ARN des gènes *IL1B*, *IL6*, *IL10* et *IL15* n'est pas significativement modulée par la déplétion en myoferline ou d'une façon inconsistante entre les shRNA pour les gènes *IL1A*, *IL13* et *CCL11*. En revanche, la déplétion en myoferline augmente l'expression du gène *CCL5* (RANTES) d'une façon significative pour les CAFs shMYOF#2 ($p=0.0148$) (Figure 20).

4.6. La déplétion en myoferline réduit l'attraction des lymphocytes CD4⁺ par les CAFs

Suite à la sécrétion accrue de CCL5 sous déplétion en myoferline dans les CAFs, nous allons nous concentrer sur CCL5 dans la suite de ce travail. CCL5 est décrit comme étant un agent chimiotaxique et d'activation de cellules immunitaires tels que les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes CD4⁺ ou les monocytes [76]. Nous avons donc analysé la migration chimiotaxique de lymphocytes humains CD4⁺ Jurkat en présence du milieu conditionné par des CAFs ou en coculture de CAFs dans le compartiment inférieur de la chambre de Boyden.

4.6.1. Évaluation de la chimiotaxie des lymphocytes CD4⁺ en présence de milieu conditionné par les CAFs déplétés en myoferline

Une différence significative ($p=0.0027$) du nombre de lymphocytes CD4⁺ migrantes est observée lorsque celles-ci sont mises en présence de milieu conditionné par des CAFs Irrel. shRNA ou par des CAFs shMYOF#2 (Figure 21). Le milieu conditionné des CAFs influencent donc la migration chimiotaxique des lymphocytes CD4⁺ d'une façon significative pour les CAFs shMYOF#2.

4.6.2. Évaluation de la chimiotaxie des lymphocytes CD4⁺ en coculture avec les CAFs déplétés en myoferline

En coculture directe entre les CAFs et les lymphocytes CD4⁺, ces résultats sont renforcés. En effet, une diminution significative (shMYOF#1 : $p=0.0142$, shMYOF#2 : $p=0.0008$) du nombre de lymphocytes CD4⁺ migrantes est observée lorsque celles-ci sont en présence de CAFs déplétés en myoferline dans le compartiment inférieur de la chambre de Boyden (Figure 22). La déplétion en myoferline dans les CAFs impacte donc la sécrétion de facteurs influençant la migration des lymphocytes CD4⁺. Cependant, l'identité de ces facteurs reste à investiguer.

4.7. La déplétion en myoferline des CAFs active la voie non-canonique de NFκB

Suite à la sécrétion accrue de CCL5 par les CAFs déplétés en myoferline, nous avons décidé d'éclairer un mécanisme intracellulaire responsable de cette observation. L'expression de CCL5 dans les CAFs est régulée par la voie « Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells » (NF-κB) [77]. Nous avons donc voulu déterminer si cette voie de signalisation était affectée par la déplétion en myoferline dans les CAFs. Pour ce faire, nous avons analysé l'abondance de p65, d'IκB-α et de sa forme phosphorylée (Figure 23B : voie canonique), de p100, et de p52 (Figure 23C : voie non-canonique).

L'abondance de la protéine p65 reste inchangée dans les CAFs après déplétion de la myoferline. L'abondance de la forme non phosphorylée de IκB-α est équivalente dans les CAFs Irrel. shRNA et les CAFs shMYOF#1. Néanmoins, elle est plus élevée dans les CAFs shMYOF#2. Concernant la forme phosphorylée de IκB-α, celle-ci est plus abondante dans les CAFs déplétés en myoferline. Le ratio de la forme phosphorylée sur la forme non phosphorylée de IκB-α est accru dans les CAFs shMYOF#1 par rapport au CAFs Irrel. shRNA. Néanmoins, ce ratio est équivalent entre les CAFs Irrel. shRNA et les CAFs shMYOF#2 (Figure 23B). Ces résultats indiquent donc que la voie canonique du NF-κB n'est pas altérée par la déplétion de la myoferline dans les CAFs.

Concernant la voie non-canonique du NF-κB, l'abondance de la protéine p100 est identique dans les CAFs Irrel. shRNA et les CAFs shMYOF#1 mais moins abondante dans les CAFs shMYOF#2. Notons encore que, l'abondance de la forme clivée p52 est augmentée dans les CAFs déplétés en myoferline. Le ratio p52/p100 est donc plus élevé dans les CAFs dépourvus de myoferline (Figure 23C), suggérant une activation de la voie non-canonique de NF-κB sous déplétion de la myoferline dans les CAFs. Cette dernière pourrait expliquer l'induction transcriptionnelle de CCL5.

Nous avons également réalisé une immunofluorescence des protéines p52/p100 afin de déterminer si ces facteurs de transcription subissaient une translocation nucléaire, nécessaire pour l'expression de CCL5. Un contrôle négatif (absence de l'Ac primaire) a été utilisé afin de déterminer les signaux non spécifiques.

Comme on peut l'apercevoir sur les images obtenues par immunofluorescence (Figure 24A), les protéines p52/p100 sont localisées dans le cytoplasme et dans une moindre mesure dans le

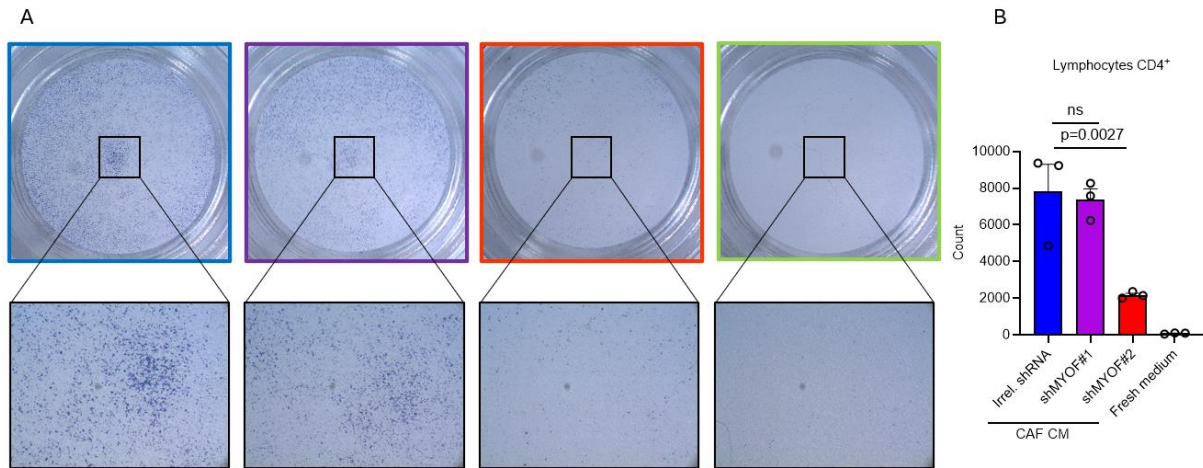


Figure 21 : La déplétion de la myoferline dans les CAFs impacte la migration chimiotaxique des lymphocytes CD4⁺. Le graphique représente le nombre de lymphocytes CD4⁺ (cellules Jurkat) qui ont migré en réponse au milieu conditionné par les CAFs. Tous les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM, n=3. Un test statistique Anova-1 suivi de comparaisons multiples de Dunnett ont été effectués. Fresh medium : milieu DMEM-F12 + 0.5% FBS.

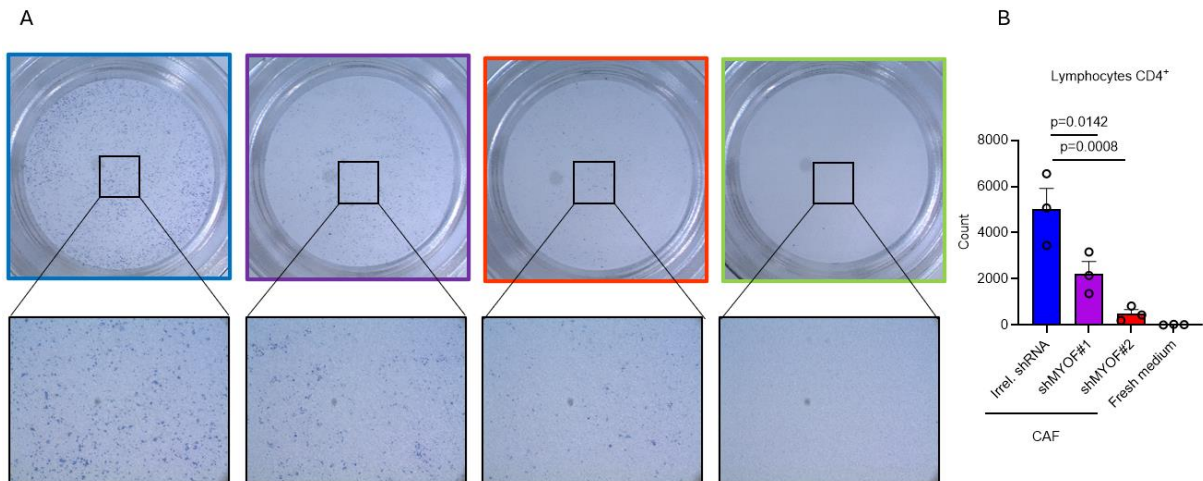


Figure 22 : La déplétion de la myoferline dans les CAFs impacte la migration chimiotaxique des lymphocytes CD4⁺. Le graphique représente le nombre de lymphocytes CD4⁺ (cellules Jurkat) qui ont migré en réponse au milieu conditionné. Tous les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM, n=3. Un test statistique Anova-1 suivi de comparaisons multiples de Dunnett ont été effectués. Fresh medium : milieu DMEM-F12 + 0.5% FBS.

noyau des CAFs. Le rapport de fluorescence noyau/cytoplasme est plus élevé dans les CAFs shMYOF#2. Cependant, cette différence n'est pas significative. Malgré l'augmentation du clivage de p100 en p52 sous déplétion de la myoferline dans les CAFs, nous n'avons pas pu associer cette activation de la voie non-canonique NF- κ B à une translocation nucléaire de p52.

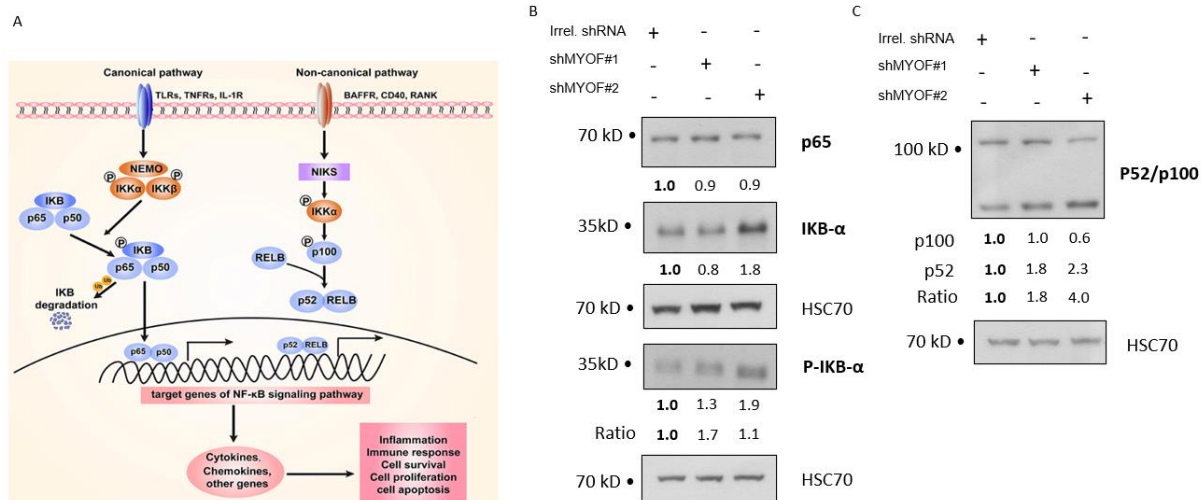


Figure 23 : La déplétion de la myoferline des CAFs active la voie non-canonique de NFκB. (A) . (A) Représentation de la voie de signalisation canonique et non canonique de NF-κB [78]. (B) Western-blot de p65 (65 kDa), IκB-α (39 kDa) et P- IκB-α (40 kDa). (C) Western-blot de p52/p100 (120 kDa et 52 kDa). Le chargement a été normalisé grâce à la protéine HSC70.

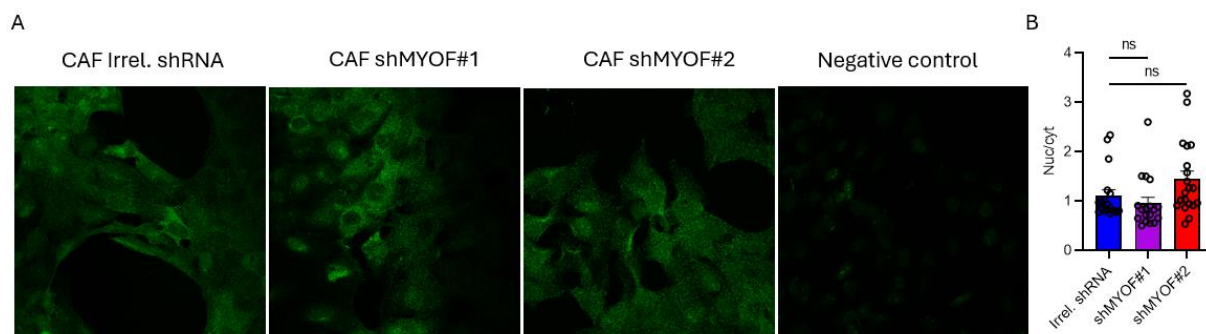


Figure 24 : (A) Immunofluorescence des protéines p52/p100 au sein des CAFs. Le graphique représente le rapport de fluorescence du nucléole sur le cytosol. Tous les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM, n=18. Un test statistique Kruskal-Wallis suivi de comparaisons multiples de Dunn ont été effectués. Un contrôle négatif (absence d'anticorps primaire) a été réalisé.

5. Discussion et perspectives

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) demeure un des cancers les plus mortels, fréquemment diagnostiqué à un stade avancé et présentant une incidence en constante augmentation. L'agressivité et la résistance thérapeutique de cette pathologie nous incitent à explorer de nouvelles approches thérapeutiques ainsi que de nouvelles techniques de diagnostic. Aux cours des dernières années, les recherches se sont de plus en plus focalisées sur les CAFs, le constituant cellulaire prédominant dans le stroma du PDAC. La myoferline, une protéine impliquée dans divers processus physiologiques liés à la membrane plasmique, a été identifiée comme étant une protéine surexprimée dans le PDAC. L'hypothèse avancée dans ce mémoire postule que la présence de la myoferline au sein des CAFs favorise la production de facteurs encourageant le comportement agressif des cellules cancéreuses pancréatiques. L'objectif de cette étude était d'explorer le rôle de la myoferline dans les interactions entre les cellules stromales et cancéreuses au sein des tumeurs pancréatiques.

Dans cette étude, nous avons choisis trois lignées de cellules cancéreuses pancréatiques métastatiques en raison de leurs propriétés migratoires supposées : les cellules CAPAN-1, CFPAC-1 et SU86.86. Ces trois lignées de cellules cancéreuses étaient principalement caractérisées par la présence du marqueur épithélial (E-cadhérine), tandis que les facteurs de transcriptions Slug et Snail, qui répriment la transcription de l'E-cadhérine, étaient peu abondants. L'abondance en myoferline semble corrélée au caractère épithélio-mésenchymateux puisque les cellules CFPAC-1 sont les plus mésenchymateuses et possèdent le plus de myoferline.

Ces lignées cellulaires possèdent un temps de doublement relativement long (CAPAN-1 : 60 à 80h, CFPAC-1 : 30 à 45h et SU86.86 : 48 à 77h) (https://www.cellosaurus.org/CVCL_0237; consulté le 25/5/24). Il est possible que cette caractéristique ait contribué à notre incapacité à observer un avantage prolifératif des cellules cancéreuses en présence de milieu conditionné par les CAFs ou en coculture directe.

En revanche, nous avons démontré une stimulation de la migration topotaxique et chimiotaxique des cellules CFPAC-1 par le milieu conditionné par les CAFs. Si l'on considère que l'épuisement en nutriments des milieux conditionnés par les cellules cancéreuses ou par les CAFs est comparable, les résultats relatifs à la migration suggèrent que le milieu conditionné par les CAFs contient un élément promoteur de la migration des cellules cancéreuses. Cependant, nous n'avons pas pu établir que la déplétion en myoferline modulait l'avantage

conféré par le milieu conditionné. La déplétion de la myoferline au sein des CAFs n'a donc pas d'impact sur la migration des cellules cancéreuses. Cependant, au lieu de prendre des cellules migratoires, il serait intéressant de prendre des cellules réputées pour leur faible capacité migratoire, telles que les HPAF-II, afin de voir si une attraction des cellules cancéreuses par du milieu conditionné des CAFs serait perdue sous déplétion de la myoferline.

Les résultats obtenus pour la prolifération et la migration sont assez robustes car nous avons analysé trois lignées de cellules cancéreuses pancréatiques, deux différents modèles (le milieu conditionné et la coculture) et différentes techniques (Scratch Assay, chambre de Boyden).

De manière intéressante, nous avons observé que la déplétion de la myoferline au sein des CAFs influençait positivement la sécrétion de certaines cytokines. Cette observation est *a priori* paradoxale compte tenu de la fonction physiologique de la myoferline dans la fusion membranaire, importante pour la sécrétion cellulaire. Parmi les cytokines dont l'abondance est accrue dans le milieu conditionné, seule RANTES (CCL5) voit l'expression de son gène accrue significativement. Cet effet transcriptionnel est probablement l'explication de l'accroissement de la concentration de cette molécule dans le milieu conditionné. Nous pourrions valider la présence de CCL5 dans le milieu conditionné par les CAFs déplétés en myoferline par une technique quantitative telle qu'un ELISA.

Ensuite, nous avons constaté que les CAFs favorisent la migration des lymphocytes CD4⁺ (Jurkat). La déplétion de la myoferline dans les CAFs réduit le nombre de cellules migratoires. Là encore, les résultats obtenus semblent contradictoires avec notre observation précédente. En effet, RANTES, dont la concentration est accrue dans le milieu conditionné après une déplétion en myoferline, est impliquée dans la chémoattraction des cellules immunitaires [79]. Une des perspectives serait de vérifier si ces lymphocytes CD4⁺ expriment le récepteur de CCL5.

Le rôle de CCL5 dans le PDAC reste controversé. D'une part, il a été rapporté que CCL5 favorise la migration et le caractère invasif des cellules cancéreuses pancréatiques. De plus, CCL5 est considéré comme un marqueur de mauvais pronostic dans divers types de cancers tels que les cancers du rein, de la prostate et du poumon [80]. D'autre part, des recherches ont révélé une corrélation négative entre la concentration de CCL5 et la progression des cellules cancéreuses mammaires [81]. En effet, CCL5 médie un afflux de lymphocytes T CD4⁺ dans le microenvironnement tumoral pancréatique [82]. De plus, CCL5 semble améliorer la réponse à l'immunothérapie soutenant l'hypothèse que l'infiltration immunitaire par CCL5 est

probablement anti-tumoral. En effet, l'expression de CCL5 est plus élevée chez les patients qui répondent à l'anti-PD1 ($p=0.01$) (Figure 26). Cette étude a été menée sur le cancer de l'estomac. Cependant, la myoferline y est exprimée de manière similaire au cancer du pancréas [83].

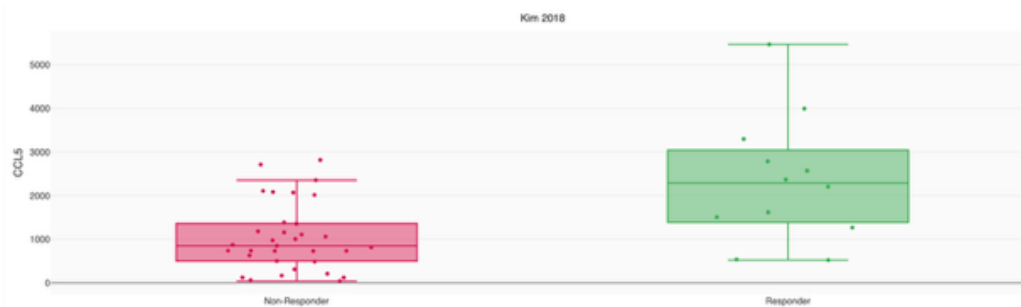


Figure 26 : L'expression de CCL5 est plus élevée chez les patients qui répondent à l'anti-PD1. L'expression de CCL5 a été évaluée chez les répondeurs (33 patients) et non répondeurs (12 patients) à l'anti-PD1 grâce à l'outil en ligne CRI iAtlas (<https://isb-cgc.shinyapps.io/iAtlas/>). Un test statistique t-test indépendant a été utilisé. $n=45$.

Pour finir, étant donné que l'expression de RANTES est régulée par la voie de signalisation NF- κ B, nous avons investigué si cette voie était activée dans les CAFs déplétés en myoferline. Pour rappel, l'activation de ce facteur de transcription peut s'effectuer de deux manières : de manière canonique et non-canonique. La voie canonique fait intervenir le complexe IKK (IKK α , IKK β et NEMO) qui, une fois activé, phosphoryle I κ B- α (inhibiteur de NF κ B). Ainsi, les dimères p50 et p65 peuvent subir une translocation vers le noyau. La voie non-canonique implique le complexe IKK α qui phosphoryle p100 entraînant son clivage pour produire p52. Une fois que p52 et RelB sont localisés dans le noyau, l'expression des cytokines peut avoir lieu. Nous avons observé une potentiel activation de la voie non-canonique dans les CAFs déplétées en myoferline par l'intermédiaire d'une augmentation du ratio p52/p100. Cependant, dans une expérience préliminaire d'Immunofluorescence, nous n'avons pas pu confirmer si cette activation est accompagnée d'une translocation nucléaire de p52 nécessaire à l'expression de RANTES. Des expériences supplémentaires doivent être réalisées afin de confirmer une activation de la voie non-canonique de NF- κ B comme la phosphorylation de IKK α par Western-blot, l'investigation de la translocation de p52 par fractionnement cellulaire et la quantification de la transcription de gènes cibles tels que les chimiokines CXCL1 et les cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 ou encore IL-8 [78]. En plus, nous aurions pu étudier la voie non canonique sous stimulation exogène, en utilisant des ligands tels que RANK-L. Une expérience de validation doit également être réalisée pour lier la production de CCL5 à l'activation de la voie de signalisation NF- κ B. Nous pourrions éteindre l'expression des gènes codant p52/p100 par l'intermédiaire de siRNA afin de voir une perte d'induction de CCL5 sous shMYOF. De plus,

nous pourrions évaluer l'effet biologique de CCL5, à savoir l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs.

En ce qui concerne les limites de nos modèles, il convient de noter que les modèles utilisant du milieu conditionné par des CAFs excluent toutes interactions directes entre les cellules. Une perspective intéressante serait de développer des sphéroïdes hétérotopiques constitués à la fois de cellules cancéreuses et de CAFs. Ce modèle permet de mettre en évidence la prolifération et la migration des cellules cancéreuses. À cet égard, notre laboratoire dispose d'un modèle de sphéroïdes constitué des cellules HPAF-II.

Dans l'objectif de se rapprocher d'une situation clinique, la myoferline pourrait être ciblée pharmacologiquement et non génétiquement. Nous pourrions traiter des sphéroïdes hétérotopiques avec le WJ460 (282T17255, Tebubio), un inhibiteur pharmacologique de la myoferline. Dans cette perspective, notre équipe est actuellement en train d'évaluer l'intérêt d'une combinaison entre le WJ460 et la radiothérapie. Nous pourrions également utiliser des organoïdes composés de cellules souches pancréatiques cultivées dans du matrigel, afin de mieux reproduire l'environnement extracellulaire en présence de CAFs. Une autre limite de notre étude réside dans l'utilisation de lignées cellulaires cancéreuses qui ne reflètent pas pleinement l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale observée chez les patients. De plus, le rôle des cellules stellaires (hPSC) pancréatiques dans l'établissement de la population des CAFs reste controversé. Bien qu'elles aient longtemps été considérées comme étant la seule source de CAFs, une étude récente de traçage, ciblant une protéine de liaison aux acides gras (Fatty Acid Binding Protein 4 - FABP4), a révélé qu'ils ne contribuaient que d'une façon mineure au pool de CAFs (1 à 10 %) [84].

En termes de perspectives, il serait intéressant d'investiguer le mécanisme de CCL5 (NF- κ B) et son effet biologique (réponse immunitaire) puisque nous avons mis en évidence une augmentation importante de l'expression mais également de l'abondance dans le milieu conditionné par des CAFs déplétés en myoferline. De plus, le rôle de CCL5 n'a jamais été exploré au sein de notre laboratoire.

Les données du « The Cancer Genome Atlas » (TCGA), dans lesquelles 146 patients atteints de PDAC ont été ségrégués en trois groupes selon leur expression de *CCL5* au sein de la tumeur (basse, intermédiaire et élevée), nous ont permis d'évaluer la signature immunitaire pour chaque patient. Les patients qui présentent une forte expression de *CCL5* (high *CCL5* expression) ont

le score immunitaire le plus élevé, c'est-à-dire une infiltration immunitaire plus importante dans la biopsie. De plus, les patients avec un score immunitaire intermédiaire expriment *CCL5* de manière significativement plus importante par rapport à ceux avec un score immunitaire plus bas. L'expression de *CCL5* est donc proportionnelle au score immunitaire des patients atteints de PDAC (Figure 25A). Cependant, quels types de cellules immunitaires infiltrent la tumeur ? Une étude réalisée par Mgrditchian et ses collègues démontre une corrélation positive entre l'expression de *CCL5* et un des marqueurs des cellules *Natural Killer* (NK) (NKp46) chez les patients atteints de mélanome [79]. En effet, d'après les données du TCGA, les patients atteints de PDAC qui expriment fortement *CCL5* ont une expression plus élevée de marqueurs cellulaires des NK (*NCR1* et *NCR3*) (Figure 25B). Nous pourrions réaliser un phénotypage immunitaire par FACS sur des tumeurs murines afin de valider une infiltration des cellules NK. Nous pourrions également valider une infiltration des cellules NK ou d'autres cellules préalablement révélées par FACS en marquant le granzyme B (marqueur des cellules NK) sur une coupe immunohistochimique de modèles murins traités au WJ460 ou d'une souris *Myof^{KO}* ou de patients atteints de PDAC afin de mettre en évidence une éventuelle corrélation négative entre l'abondance de la myoferline dans le stroma et le granzyme B. Nous pourrions confirmer l'hypothèse selon laquelle *CCL5* attire les cellules NK dans la tumeur pancréatique en utilisant un inhibiteur du récepteur *CCL5*, le maraviroc.

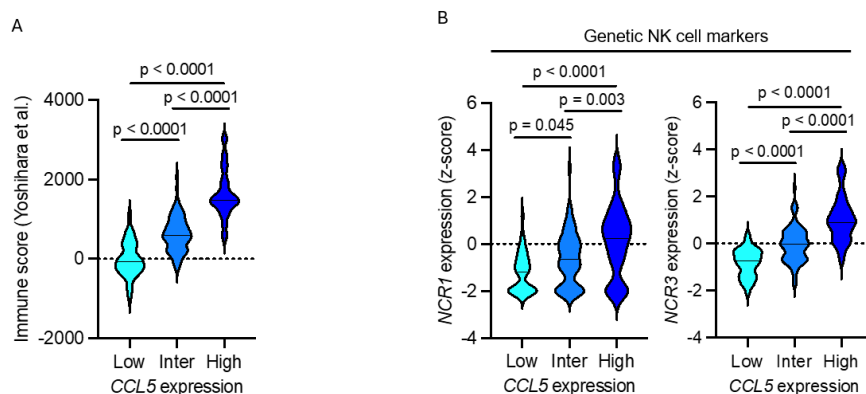


Figure 27 : Données exploratoires du The Cancer Genome Atlas (TCGA) illustrant l'implication de *CCL5* dans l'infiltration des cellules immunitaires. A) Score immunitaire des patients ségrégués en trois groupes selon l'expression de *CCL5*. Les patients qui expriment le plus *CCL5* ont le score immunitaire le plus élevé. De plus, les patients qui présentent une expression intermédiaire de *CCL5* ont un score immunitaire plus haut que les patients qui expriment le moins *CCL5*. **B)** Marqueurs cellulaires des cellules NK : *NCR1* et *NCR3*. Les patients qui présentent l'expression de *CCL5* la plus élevée expriment de manière plus importante *NCR1* et *NCR3* en comparaison des patients qui expriment moins de *CCL5*.

Pour finir, il serait intéressant de dresser un profil plus complet de la composition des milieux conditionnés par les CAFs déplétés en myoferline. Outre leur composition en cytokines/chimiokines, leur contenu en métabolites ou en exosomes pourrait être évalué.

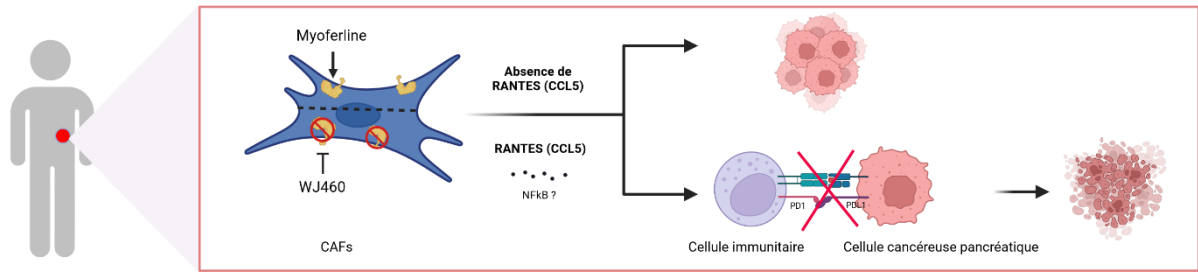


Figure 28 : Perspectives basées sur les résultats obtenus durant ce mémoire.

En conclusion, cette étude a révélé un nouveau médiateur, RANTES (CCL5), dont la sécrétion par les CAFs est potentiellement sous la dépendance de la myoferline. Ce facteur est impliqué dans l'infiltration des cellules immunitaires au sein des tumeurs pancréatiques. Les résultats obtenus au cours de ce mémoire apportent ainsi de nouvelles connaissances sur les interactions entre les CAFs et les cellules cancéreuses, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles perspectives quant au potentiel immunorégulateur de la myoferline.

6. Bibliographie

- [1] J. Dolensšek *et al.*, “Pancreas Physiology,” *Challenges in Pancreatic Pathology*, Apr. 2017, doi: 10.5772/65895.
- [2] P. S. Leung, “Physiology of the pancreas,” *Adv Exp Med Biol*, vol. 690, pp. 13–27, 2010, doi: 10.1007/978-90-481-9060-7_2/FIGURES/4.
- [3] “PANCRÉAS - Encyclopædia Universalis.” Accessed: Dec. 26, 2023. [Online]. Available: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/pancreas/>
- [4] J. Kleeff *et al.*, “Pancreatic cancer,” *Nat Rev Dis Primers*, vol. 2, Apr. 2016, doi: 10.1038/NRDP.2016.22.
- [5] R. L. Siegel, K. D. Miller, H. E. Fuchs, and A. Jemal, “Cancer Statistics, 2021,” *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 1, pp. 7–33, Jan. 2021, doi: 10.3322/CAAC.21654.
- [6] J. Huang *et al.*, “Worldwide Burden of, Risk Factors for, and Trends in Pancreatic Cancer,” *Gastroenterology*, vol. 160, no. 3, pp. 744–754, Feb. 2021, doi: 10.1053/J.GASTRO.2020.10.007.
- [7] “Cancer Tomorrow.” Accessed: Dec. 29, 2023. [Online]. Available: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?cancers=13&single_unit=50000
- [8] K. Winter *et al.*, “Diagnostic and therapeutic recommendations in pancreatic ductal adenocarcinoma. Recommendations of the Working Group of the Polish Pancreatic Club,” *Prz Gastroenterol*, vol. 14, no. 1, p. 1, 2019, doi: 10.5114/PG.2019.83422.
- [9] O. Partyka *et al.*, “Overview of Pancreatic Cancer Epidemiology in Europe and Recommendations for Screening in High-Risk Populations,” *Cancers 2023, Vol. 15, Page 3634*, vol. 15, no. 14, p. 3634, Jul. 2023, doi: 10.3390/CANCERS15143634.
- [10] H. Jayasekara *et al.*, “Lifetime alcohol intake and pancreatic cancer incidence and survival: findings from the Melbourne Collaborative Cohort Study,” *Cancer Causes Control*, vol. 30, no. 4, pp. 323–331, Apr. 2019, doi: 10.1007/S10552-019-01146-6.
- [11] P. Vanek, O. Urban, V. Zoundjiekpon, and P. Falt, “Current Screening Strategies for Pancreatic Cancer,” *Biomedicines 2022, Vol. 10, Page 2056*, vol. 10, no. 9, p. 2056, Aug. 2022, doi: 10.3390/BIOMEDICINES10092056.

- [12] F. U. Weiss, F. Laemmerhirt, and M. M. Lerch, “Etiology and Risk Factors of Acute and Chronic Pancreatitis,” *Visc Med*, vol. 35, no. 2, p. 73, Apr. 2019, doi: 10.1159/000499138.
- [13] “NCI Thesaurus.” Accessed: Apr. 22, 2024. [Online]. Available: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&version=24.02d&ns=ncit&code=C1794&key=n1208799955&b=1&n=null%20https://www.google.be
- [14] “NCI Thesaurus.” Accessed: Jan. 05, 2024. [Online]. Available: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&version=23.11d&ns=ncit&code=C71631&key=n1375018174&b=1&n=null
- [15] “NCI Thesaurus.” Accessed: Jan. 05, 2024. [Online]. Available: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&version=23.11d&ns=ncit&code=C1181&key=2024594550&b=1&n=null
- [16] “NCI Thesaurus.” Accessed: Jan. 05, 2024. [Online]. Available: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&version=23.11d&ns=ncit&code=C62040&key=1422025483&b=1&n=null
- [17] “NCI Thesaurus.” Accessed: Jan. 05, 2024. [Online]. Available: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&version=23.11d&ns=ncit&code=C505&key=1704135692&b=1&n=null
- [18] F. Roeder, “Neoadjuvant radiotherapeutic strategies in pancreatic cancer,” *World J Gastrointest Oncol*, vol. 8, no. 2, pp. 186–197, 2016, doi: 10.4251/WJGO.V8.I2.186.
- [19] E. Versteijne *et al.*, “Neoadjuvant Chemoradiotherapy Versus Upfront Surgery for Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Long-Term Results of the Dutch Randomized PREOPANC Trial,” *J Clin Oncol*, vol. 40, pp. 1220–1230, 2022, doi: 10.1200/JCO.21.
- [20] I. Garajová, M. Peroni, F. Gelsomino, and F. Leonardi, “A Simple Overview of Pancreatic Cancer Treatment for Clinical Oncologists,” *Curr Oncol*, vol. 30, no. 11, pp. 9587–9601, Oct. 2023, doi: 10.3390/CURRONCOL30110694.

- [21] D. D. Von Hoff *et al.*, “Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine,” *N Engl J Med*, vol. 369, no. 18, pp. 1691–1703, Oct. 2013, doi: 10.1056/NEJMOA1304369.
- [22] T. Conroy *et al.*, “FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer,” *N Engl J Med*, vol. 364, no. 19, pp. 1817–1825, May 2011, doi: 10.1056/NEJMOA1011923.
- [23] J. L. Kopp *et al.*, “Identification of Sox9-Dependent Acinar-to-Ductal Reprogramming as the Principal Mechanism for Initiation of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma,” *Cancer Cell*, vol. 22, no. 6, pp. 737–750, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.10.025.
- [24] E. Hessmann *et al.*, “Microenvironmental determinants of pancreatic cancer,” *Physiol Rev*, vol. 100, no. 4, pp. 1707–1751, Oct. 2020, doi: 10.1152/PHYSREV.00042.2019/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0042029550009.JPEG.
- [25] M. Kanda *et al.*, “Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia,” *Gastroenterology*, vol. 142, no. 4, pp. 730-733.e9, Apr. 2012, doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.042.
- [26] M. Orth *et al.*, “Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches,” *Radiat Oncol*, vol. 14, no. 1, Aug. 2019, doi: 10.1186/S13014-019-1345-6.
- [27] C. J. Halbrook, C. A. Lyssiotis, M. Pasca di Magliano, and A. Maitra, “Pancreatic cancer: Advances and challenges,” *Cell*, vol. 186, no. 8, pp. 1729–1754, Apr. 2023, doi: 10.1016/J.CELL.2023.02.014.
- [28] R. Peiffer *et al.*, “Cancer-Associated Fibroblast Diversity Shapes Tumor Metabolism in Pancreatic Cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.3390/CANCERS15010061.
- [29] P. P. Provenzano, C. Cuevas, A. E. Chang, V. K. Goel, D. D. Von Hoff, and S. R. Hingorani, “Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma,” *Cancer Cell*, vol. 21, no. 3, pp. 418–429, Mar. 2012, doi: 10.1016/J.CCR.2012.01.007.

- [30] A. D. Rhim *et al.*, “Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma,” *Cancer Cell*, vol. 25, no. 6, pp. 735–747, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.021.
- [31] C. Feig, A. Gopinathan, A. Neesse, D. S. Chan, N. Cook, and D. A. Tuveson, “The pancreas cancer microenvironment,” *Clin Cancer Res*, vol. 18, no. 16, pp. 4266–4276, Aug. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3114.
- [32] N. Kurata *et al.*, “Predicting the chemosensitivity of pancreatic cancer cells by quantifying the expression levels of genes associated with the metabolism of gemcitabine and 5-fluorouracil,” *Int J Oncol*, vol. 39, no. 2, pp. 473–482, Aug. 2011, doi: 10.3892/IJO.2011.1058.
- [33] E. Hessmann *et al.*, “Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer,” *Gut*, vol. 67, no. 3, pp. 497–507, Mar. 2018, doi: 10.1136/GUTJNL-2016-311954.
- [34] P. Manoukian, M. Bijlsma, and H. van Laarhoven, “The Cellular Origins of Cancer-Associated Fibroblasts and Their Opposing Contributions to Pancreatic Cancer Growth,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, p. 743907, Sep. 2021, doi: 10.3389/FCELL.2021.743907/BIBTEX.
- [35] G. Biffi *et al.*, “Il1-induced Jak/STAT signaling is antagonized by TGF β to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma,” *Cancer Discov*, vol. 9, no. 2, pp. 282–301, Feb. 2019, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0710/42870/AM/IL-1-INDUCED-JAK-STAT-SIGNALING-IS-ANTAGONIZED-BY.
- [36] D. Öhlund *et al.*, “Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer,” *J Exp Med*, vol. 214, no. 3, pp. 579–596, Mar. 2017, doi: 10.1084/JEM.20162024.
- [37] A. Desmoulière, A. Geinoz, F. Gabbiani, and G. Gabbiani, “Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts,” *Journal of Cell Biology*, vol. 122, no. 1, pp. 103–111, Jul. 1993, doi: 10.1083/JCB.122.1.103.
- [38] T. A. Wynn, “Cellular and molecular mechanisms of fibrosis,” *J Pathol*, vol. 214, no. 2, pp. 199–210, Jan. 2008, doi: 10.1002/PATH.2277.

- [39] E. Elyada *et al.*, “Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts,” *Cancer Discov*, vol. 9, no. 8, pp. 1102–1123, Aug. 2019, doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0094/333377/AM/CROSS-SPECIES-SINGLE-CELL-ANALYSIS-OF-PANCREATIC.
- [40] G. Werba *et al.*, “Single-cell RNA sequencing reveals the effects of chemotherapy on human pancreatic adenocarcinoma and its tumor microenvironment,” *Nature Communications* 2023 14:1, vol. 14, no. 1, pp. 1–16, Feb. 2023, doi: 10.1038/s41467-023-36296-4.
- [41] Y. Mizutani *et al.*, “Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit Pancreatic Carcinogenesis,” *Cancer Res*, vol. 79, no. 20, pp. 5367–5381, Oct. 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0454.
- [42] C. Falcomatà, S. Bärthel, G. Schneider, R. Rad, M. Schmidt-Supprian, and D. Saur, “Context-Specific Determinants of the Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Pancreatic Cancer,” *Cancer Discov*, vol. 13, no. 2, p. 278, Feb. 2023, doi: 10.1158/2159-8290.CD-22-0876.
- [43] A. Vonlaufen *et al.*, “Pancreatic Stellate Cells: Partners in Crime with Pancreatic Cancer Cells,” *Cancer Res*, vol. 68, no. 7, pp. 2085–2093, Apr. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2477.
- [44] C. J. Tape *et al.*, “Oncogenic KRAS Regulates Tumor Cell Signaling via Stromal Reciprocation,” *Cell*, vol. 165, no. 4, pp. 910–920, May 2016, doi: 10.1016/J.CELL.2016.03.029.
- [45] C. Vennin *et al.*, “CAF hierarchy driven by pancreatic cancer cell p53-status creates a pro-metastatic and chemoresistant environment via perlecan,” *Nature Communications* 2019 10:1, vol. 10, no. 1, pp. 1–22, Aug. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10968-6.
- [46] E. S. Knudsen, U. Balaji, E. Freinkman, P. McCue, and A. K. Witkiewicz, “Unique metabolic features of pancreatic cancer stroma: relevance to the tumor compartment, prognosis, and invasive potential,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 48, p. 78396, Nov. 2016, doi: 10.18632/ONCOTARGET.11893.

- [47] C. M. Sousa *et al.*, “Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion,” *Nature* 2016 536:7617, vol. 536, no. 7617, pp. 479–483, Aug. 2016, doi: 10.1038/nature19084.
- [48] Z. Zhu *et al.*, “Tumour-reprogrammed stromal BCAT1 fuels branched-chain ketoacid dependency in stromal-rich PDAC tumours,” *Nature Metabolism* 2020 2:8, vol. 2, no. 8, pp. 775–792, Jul. 2020, doi: 10.1038/s42255-020-0226-5.
- [49] F. R. Auciello *et al.*, “A stromal lysolipid–autotaxin signaling axis promotes pancreatic tumor progression,” *Cancer Discov*, vol. 9, no. 5, pp. 617–627, May 2019, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1212/42845/AM/A-STROMAL-LYSOLIPID-AUTOTAXIN-SIGNALING-AXIS.
- [50] H. Zhao *et al.*, “Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism,” *Elife*, vol. 5, no. FEBRUARY2016, Feb. 2016, doi: 10.7554/ELIFE.10250.
- [51] K. R. Doherty *et al.*, “Normal myoblast fusion requires myoferlin,” *Development*, vol. 132, no. 24, p. 5565, Dec. 2005, doi: 10.1242/DEV.02155.
- [52] F. M. Harsini *et al.*, “Structural Basis for the Distinct Membrane Binding Activity of the Homologous C2A Domains of Myoferlin and Dysferlin,” *J Mol Biol*, vol. 431, no. 11, pp. 2112–2126, May 2019, doi: 10.1016/J.JMB.2019.04.006.
- [53] Y. Dong *et al.*, “Myoferlin, a Membrane Protein with Emerging Oncogenic Roles,” *Biomed Res Int*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/7365913.
- [54] G. E. Rhizobium, “Complete Genome Sequence of the Sesbania Symbiont and Rice,” *Nucleic Acids Res*, vol. 1, no. 1256879, pp. 13–14, 2013, doi: 10.1093/NAR/GKAB1061/6430488.
- [55] K. R. Doherty *et al.*, “Normal myoblast fusion requires myoferlin,” *Development*, vol. 132, no. 24, p. 5565, Dec. 2005, doi: 10.1242/DEV.02155.
- [56] K. R. Doherty *et al.*, “The Endocytic Recycling Protein EHD2 Interacts with Myoferlin to Regulate Myoblast Fusion,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 29, pp. 20252–20260, Jul. 2008, doi: 10.1074/JBC.M802306200.

- [57] A. R. Demonbreun *et al.*, “Myoferlin is required for insulin-like growth factor response and muscle growth,” *FASEB J*, vol. 24, no. 4, pp. 1284–1295, Apr. 2010, doi: 10.1096/FJ.09-136309.
- [58] P. N. Bernatchez, A. Sharma, P. Kodaman, and W. C. Sessa, “Myoferlin is critical for endocytosis in endothelial cells,” *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 297, no. 3, Sep. 2009, doi: 10.1152/AJPCELL.00498.2008.
- [59] P. N. Bernatchez *et al.*, “Myoferlin regulates vascular endothelial growth factor receptor-2 stability and function,” *J Biol Chem*, vol. 282, no. 42, pp. 30745–30753, Oct. 2007, doi: 10.1074/JBC.M704798200.
- [60] Y. Nozato *et al.*, “Novel properties of myoferlin in glucose metabolism via pathways involving modulation of adipose functions,” *The FASEB Journal*, vol. 34, no. 2, pp. 2792–2811, Feb. 2020, doi: 10.1096/FJ.201901539RR.
- [61] A. Turtoi *et al.*, “Identification of novel accessible proteins bearing diagnostic and therapeutic potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma,” *J Proteome Res*, vol. 10, no. 9, pp. 4302–4313, Sep. 2011, doi: 10.1021/PR200527Z.
- [62] W. S. Wang *et al.*, “iTRAQ-based quantitative proteomics reveals myoferlin as a novel prognostic predictor in pancreatic adenocarcinoma,” *J Proteomics*, vol. 91, pp. 453–465, Oct. 2013, doi: 10.1016/J.JPROT.2013.06.032.
- [63] K. Fahmy *et al.*, “Myoferlin plays a key role in VEGFA secretion and impacts tumor-associated angiogenesis in human pancreas cancer,” *Int J Cancer*, vol. 138, no. 3, pp. 652–663, Feb. 2016, doi: 10.1002/IJC.29820.
- [64] C. Yu, A. Sharma, A. Trane, S. UtoKaparch, C. Leung, and P. Bernatchez, “Myoferlin gene silencing decreases Tie-2 expression in vitro and angiogenesis in vivo,” *Vascul Pharmacol*, vol. 55, no. 1–3, pp. 26–33, Jul. 2011, doi: 10.1016/J.VPH.2011.04.001.
- [65] A. Blomme *et al.*, “Myoferlin is a novel exosomal protein and functional regulator of cancer-derived exosomes,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 50, pp. 83669–83683, Nov. 2016, doi: 10.18632/ONCOTARGET.13276.

- [66] G. Rademaker *et al.*, “Myoferlin controls mitochondrial structure and activity in pancreatic ductal adenocarcinoma, and affects tumor aggressiveness,” *Oncogene* 2018 37:32, vol. 37, no. 32, pp. 4398–4412, May 2018, doi: 10.1038/s41388-018-0287-z.
- [67] G. Rademaker *et al.*, “Myoferlin Contributes to the Metastatic Phenotype of Pancreatic Cancer Cells by Enhancing Their Migratory Capacity through the Control of Oxidative Phosphorylation,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 6, Jun. 2019, doi: 10.3390/CANCERS11060853.
- [68] A. Blomme *et al.*, “Myoferlin regulates cellular lipid metabolism and promotes metastases in triple-negative breast cancer,” *Oncogene*, vol. 36, no. 15, pp. 2116–2130, Apr. 2017, doi: 10.1038/ONC.2016.369.
- [69] G. Rademaker *et al.*, “Human colon cancer cells highly express myoferlin to maintain a fit mitochondrial network and escape p53-driven apoptosis,” *Oncogenesis* 2019 8:3, vol. 8, no. 3, pp. 1–13, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41389-019-0130-6.
- [70] H. Gu, Y. Peng, and Y. Chen, “An Emerging Therapeutic Approach by Targeting Myoferlin (MYOF) for Malignant Tumors,” *Curr Top Med Chem*, vol. 20, no. 17, pp. 1509–1515, Jun. 2020, doi: 10.2174/1568026620666200618123436.
- [71] G. Rademaker *et al.*, “Myoferlin targeting triggers mitophagy and primes ferroptosis in pancreatic cancer cells,” *Redox Biol*, vol. 53, p. 102324, Jul. 2022, doi: 10.1016/J.REDOX.2022.102324.
- [72] Y. Li *et al.*, “Modification and Biological Evaluation of a Series of 1,5-Diaryl-1,2,4-triazole Compounds as Novel Agents against Pancreatic Cancer Metastasis through Targeting Myoferlin,” *J Med Chem*, vol. 62, no. 10, pp. 4949–4966, May 2019, doi: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.9B00059.
- [73] E. L. Deer *et al.*, “Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines,” *Pancreas*, vol. 39, no. 4, p. 425, 2010, doi: 10.1097/MPA.0B013E3181C15963.
- [74] D. Von Ahrens, T. D. Bhagat, D. Nagrath, A. Maitra, and A. Verma, “The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer,” *Journal of Hematology and Oncology*, vol. 10, no. 1. BioMed Central Ltd., Mar. 28, 2017. doi: 10.1186/s13045-017-0448-5.

- [75] “CHIMIOTAXIE : Définition de CHIMIOTAXIE.” Accessed: Jun. 05, 2024. [Online]. Available: <https://www.cnrtl.fr/definition/chimiotaxie//0>
- [76] N. Lapteva and X. F. Huang, “CCL5 as an adjuvant for cancer immunotherapy,” *Expert Opin Biol Ther*, vol. 10, no. 5, pp. 725–733, May 2010, doi: 10.1517/14712591003657128.
- [77] J. Liu, X. Guan, and X. Ma, “Interferon regulatory factor 1 is an essential and direct transcriptional activator for interferon γ -induced RANTES/CC15 expression in macrophages,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 26, pp. 24347–24355, Jul. 2005, doi: 10.1074/jbc.M500973200.
- [78] C. Peng, Y. Ouyang, N. Lu, and N. Li, “The NF- κ B Signaling Pathway, the Microbiota, and Gastrointestinal Tumorigenesis: Recent Advances,” *Front Immunol*, vol. 11, p. 544407, Jun. 2020, doi: 10.3389/FIMMU.2020.01387/BIBTEX.
- [79] T. Mgrditchian *et al.*, “Targeting autophagy inhibits melanoma growth by enhancing NK cells infiltration in a CCL5-dependent manner,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 114, no. 44, pp. E9271–E9279, Oct. 2017, doi: 10.1073/PNAS.1703921114/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [80] S. K. Singh, M. K. Mishra, I. E. A. Eltoum, S. Bae, J. W. Lillard, and R. Singh, “CCR5/CCL5 axis interaction promotes migratory and invasiveness of pancreatic cancer cells,” *Scientific Reports 2018 8:1*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-19643-0.
- [81] S. Mañes *et al.*, “CCR5 Expression Influences the Progression of Human Breast Cancer in a p53-dependent Manner,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 198, no. 9, pp. 1381–1389, Nov. 2003, doi: 10.1084/JEM.20030580.
- [82] A. P. Huffman, J. H. Lin, S. I. Kim, K. T. Byrne, and R. H. Vonderheide, “CCL5 mediates CD40-driven CD4⁺ T cell tumor infiltration and immunity,” *JCI Insight*, vol. 5, no. 10, May 2020, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.137263.
- [83] S. T. Kim *et al.*, “Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer,” *Nature Medicine 2018 24:9*, vol. 24, no. 9, pp. 1449–1458, Jul. 2018, doi: 10.1038/s41591-018-0101-z.

- [84] E. J. Helms *et al.*, “Mesenchymal Lineage Heterogeneity Underlies Nonredundant Functions of Pancreatic Cancer–Associated Fibroblasts,” *Cancer Discov*, vol. 12, no. 2, pp. 484–501, Feb. 2022, doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-0601/673865/AM/MESENCHYMAL-LINEAGE-HETEROGENEITY-UNDERLIES-NON.

Annexes

Membrane du cytokine Array

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CFS	GRO	GRO- α
2	I-309	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
3	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN- γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCFS	MDC	MIG	MIP-1b
4	MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1	TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-1	Angio-genin
5	Oncostatine M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF-BB	Leptin	BDNF	BLC	Ck β 8-1	Eotaxin	Eotaxin-2	Eotaxin-3
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7	FGF-8	Flt-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10	LIF	LIGHT	MCP-4	MIF	MIP-3 α	NAP-2	NT-3
8	NT-4	Osteopontin	Osteoprotegerin	PARC	PIGF	TGF- β 2	TGF- β 3	TIMP-1	TIMP-2	Pos	Pos

Anticorps utilisés lors de l'immunofluorescence indirecte

Anticorps primaires					
Antigène cible	Origine	Type	Dilution	Fournisseur	N° Cat
NF- κ B P65	Lapin	Monoclonal	1/1000 5% BSA	Cell signaling	8242
P52/p100	Lapin	Polyclonal	1/1000 5% BSA	Cell signaling	4882

Anticorps secondaire					
Antigène cible	Origine	Type	Dilution	Fournisseur	N° Cat
Lapin	Ane	Polyclonal	1/1000 PBS-1%BSA	Fisher scientific	A21206

Anticorps utilisés lors du western-blot

Anticorps primaires					
Antigène cible	Origine	Type	Dilution	Fournisseur	N° Cat
Myoferline	Lapin	Polyclonal	1/1000 5% BSA	Sigma Aldrich	HPA014245
Vimentine	Souris	Monoclonal	1/2000 5% BSA	Sigma Life Sciences	V6389
E-cadhérine	Souris	Monoclonal	1/10 000 5% BSA	BD Transduction Laboratories	610181
Snail	Mouton	Polyclonal	1/1000 5% BSA	R&D Systems	O95863
Slug	Lapin	Monoclonal	1/1000 5% BSA	Cell signaling	9585s
B-Actin	Souris	Monoclonal	1/10 000 5% BSA	Sigma	P60709
NF- κ B P65	Lapin	Monoclonal	1/1000 5% BSA	Cell signaling	8242
P52/p100	Lapin	Polyclonal	1/1000 5% BSA	Cell signaling	4882
I κ B- α	Lapin	Monoclonal	1/1000 5% BSA	Cell signaling	4812
P-I κ B- α	Lapin	Monoclonal	1/1000 5% BSA	Cell signaling	2859
HSC70	Souris	Monoclonal	1/5000 5% BSA	Santa Cruz Biotechnology	sc-7298

Anticorps secondaires					
Antigène cible	Origine	Type	Dilution	Fournisseur	N° Cat
IgG de souris	Lapin	Polyclonal	1/3000 5% Lait	DAKO	P0260
IgG de lapin	Chèvre	Polyclonal	1/3000 5% Lait	Cell Signaling biotechnology	7074S
IgG de mouton	Cochon	Polyclonal	1/3000 5% Lait	Biosource international	ACI3404

Amorces utilisées lors de la RT-qPCR

Cible	Séquences	Source
Myoferline (<i>MYOF</i>)	Fw: 5'-TTC-TCA-TCT-TCG-GGA-ACT-GG-3' Rv: 5'-CGT-TGG-AAC-AAA-GCC-TAC-CT-3'	Integrated DNA Technologies
Vimentine	Fw: 5'-GCG-TGA-CGT-ACG-TCA-GCA-ATA-TGA-3' Rv: 5'-GTT-CCA-GGG-ACT-CAT-TGG-TTC-CTT-3'	Thermo Scientific
E-cadhérine	Fw: 5'-GAC-ACA-TTT-ATG-GAA-CAG-AAA-ATA-ACA-3' Rv: 5'-AGT-GGA-AAT-GGC-ACC-AGT-TGT-3'	Thermo Scientific
RANTES (CCL5)	Fw: 5'-CCT-GCT-GCT-TTG-CCT-ACA-TTGC-3' Rv: 5'-ACA-CAC-TTG-GCG-GTT-CTT-TCG-G-3'	Eurogentec
IL-1 α	Fw: 5'-TGT-ATG-TGA-CTG-CCC-AAG-ATG-AAG-3' Rv: 5'-AGA-GGA-GGT-TGG-TCT-CAC-TAC-C-3'	Eurogentec
IL-1 β	Fw: 5'-CCA-CAG-ACC-TTC-CAG-GAG-AAT-G-3' Rv: 5'-GTG-CAG-TTC-AGT-GAT-CGT-ACA-GG-3'	Eurogentec
IL-6	Fw: 5'-AGA-CAG-CCA-CTC-ACC-TCT-TCA-G-3' Rv: 5'-TTC-TGC-CAG-TGC-CTC-TTT-CGT-G-3'	Eurogentec
IL-10	Fw: 5'-TCT-CCG-AGA-TGC-CTT-CAG-CAG-A-3' Rv: 5'-TCA-GAC-AAG-GCT-TGG-CAA-CCC-A-3'	Eurogentec
IL-13	Fw: 5'-ACG-GTC-ATT-GCT-CTC-ACT-TGC-C-3' Rv: 5'-CTG-TCA-GGT-TGA-TGC-TCC-ATA-CC-3'	Eurogentec
IL-15	Fw: 5'-AAC-AGA-AGC-CAA-CTG-GGT-GAA-TG-3' Rv: 5'-CTC-CAA-GAG-AAA-GCA-CTT-CAT-TGC-3'	Eurogentec
Eotaxin (CCL26)	Fw: 5'-GGG-AGT-GAC-ATA-TCC-AAG-ACC-TG-3' Rv: 5'-CAG-ACT-TTC-TTG-CCT-CTT-TTG-GTA-3'	Eurogentec
18S	Fw: 5'-CTT-CCA-CAG-GAG-GCC-TAC-AC-3' Rv: 5'-CGC-AAA-ATA-TGC-TGG-AAC-TTT-3'	Eurogentec