

## THÈSE

### DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

**Ecole doctorale des Sciences de la vie et de la santé**

**Mention : Sciences, Technologie, Santé**

**Option : Génétique**

**Présentée et soutenue publiquement**

Le 18/10/2012

Par Marie LAFITTE

Née le 04/04/1984 à Dax (40)

---

## **Adénocarcinome canalaire pancréatique**

Mécanisme moléculaire et approche thérapeutique

---

*Sous la direction du professeur François MOREAU-GAUDRY et sous l'encadrement du docteur Sandrine DABERNAT au sein du laboratoire des biothérapies des maladies génétiques et cancer INSERM U1035 à Bordeaux.*

### **Membres du Jury**

**Mme Sophie JAVERZAT**  
**M. Amor HAJRI**  
**M. Nelson DUSETTI**  
**M. François MOREAU-GAUDRY**

Professeur, Bordeaux 1  
Chercheur, Strasbourg  
Chercheur, Marseille  
PU-PH, Bordeaux 2

Présidente  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse

# Table des matières

|                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Table des matières</b> .....                                                        | <b>2</b>  |
| <b>Liste des abréviations</b> .....                                                    | <b>6</b>  |
| <b>Liste des tableaux et figures</b> .....                                             | <b>9</b>  |
| <b>PREAMBULE</b> .....                                                                 | <b>10</b> |
| <b>INTRODUCTION</b> .....                                                              | <b>12</b> |
| <b>1ère PARTIE</b> .....                                                               | <b>13</b> |
| <b>Le cancer du pancréas</b> .....                                                     | <b>13</b> |
| <b>I. Le pancréas normal.</b> .....                                                    | <b>14</b> |
| I.1. Anatomie et histologie. ....                                                      | 14        |
| I.2. Le pancréas exocrine.....                                                         | 15        |
| <b>II. Les cancers du pancréas.</b> .....                                              | <b>17</b> |
| II.1. Généralités. ....                                                                | 17        |
| II.2. Origine de l'adénocarcinome canalaire pancréatique.....                          | 19        |
| II.3. Diagnostic de l'adénocarcinome canalaire pancréatique.....                       | 21        |
| II.4. Les traitements de l'adénocarcinome canalaire pancréatique. ....                 | 22        |
| II.4.1. La chirurgie. ....                                                             | 22        |
| II.4.2. La radiothérapie. ....                                                         | 23        |
| II.4.3. Les principales chimiothérapies.....                                           | 23        |
| II.4.4. Essais cliniques en cours.....                                                 | 26        |
| II.5. Les thérapies ciblées du PDAC. ....                                              | 28        |
| II.5.1. Les oncogènes impliqués dans la tumorigenèse pancréatique. ....                | 29        |
| II.5.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la tumorigenèse pancréatique. |           |
| .....                                                                                  | 32        |
| II.5.3. Les autres altérations. ....                                                   | 34        |
| <b>I. Choix du gène.</b> .....                                                         | <b>37</b> |
| I.1. Gènes de correction.....                                                          | 38        |
| I.1.1. L'approche antisens.....                                                        | 38        |
| I.1.2. La réintroduction des gènes suppresseurs de tumeur.....                         | 39        |
| I.2. MicroARNs.....                                                                    | 40        |

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I.3. Gènes du système immunitaire. ....                                    | 42        |
| I.4. Gènes suicide. ....                                                   | 43        |
| <i>I.4.1. Généralités.</i> .....                                           | 43        |
| <i>I.4.2. L'effet « bystander ».</i> .....                                 | 44        |
| <i>I.4.3. Les différents systèmes.</i> .....                               | 44        |
| I.4.3.1. Thymidine kinase du virus simplex de l'herpès/Ganciclovir. ....   | 44        |
| I.4.3.2. Cytosine Déaminase/5-Fluorocytosine. ....                         | 46        |
| I.4.3.3. Purine Nucléoside Phosphorylase/6-Méthylpurine désoxyribose. .... | 48        |
| I.4.3.4. Cytochrome P450/Cyclophosphamide.....                             | 49        |
| I.5. Gènes de l'apoptose. ....                                             | 49        |
| <b>II. Choix du vecteur. ....</b>                                          | <b>50</b> |
| II.1. Les vecteurs viraux. ....                                            | 50        |
| II.2. Méthodes physiques et vecteurs non-viraux.....                       | 53        |
| <i>II.2.1. L'ADN nu.</i> .....                                             | 53        |
| <i>II.2.2. Les polymères cationiques.</i> .....                            | 54        |
| <i>II.2.3. Les liposomes cationiques.</i> .....                            | 55        |
| <i>II.2.5. Les vecteurs cellulaires.</i> .....                             | 55        |
| <b>III. Les virus oncolytiques. ....</b>                                   | <b>56</b> |
| III.1. Principe.....                                                       | 56        |
| III.2. Utilisations pour la thérapie du cancer du pancréas. ....           | 58        |
| <b>IV. Le ciblage cellulaire du cancer du pancréas.....</b>                | <b>61</b> |
| IV.1. Ciblage lors de l'entrée du virus dans la cellule. ....              | 61        |
| IV.2. Le ciblage transcriptionnel.....                                     | 63        |
| <b>3ème PARTIE.....</b>                                                    | <b>65</b> |
| <b>Le FGFR3.....</b>                                                       | <b>65</b> |
| <b>I. Généralités.....</b>                                                 | <b>66</b> |
| I.1. Isoformes protéiques et spécificités des FGFRs. ....                  | 67        |
| I.2. Activation des récepteurs FGFRs. ....                                 | 68        |
| I.3. Signalisation cellulaire des FGFRs.....                               | 69        |
| <i>I.3.1. Voies de signalisation cellulaire.</i> .....                     | 69        |
| <i>I.3.2. Régulation des voies de signalisation.</i> .....                 | 71        |
| I.3.2.1. Régulation activatrice. ....                                      | 71        |
| I.3.2.2. Inhibition des voies de signalisation. ....                       | 72        |
| I.4. Les FGFRs dans les cancers. ....                                      | 73        |

|                                                                                                                  |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.4.1. <i>Le FGFR1</i> .....                                                                                     | 73         |
| 1.4.2. <i>Le FGFR2</i> .....                                                                                     | 74         |
| 1.4.3. <i>Le FGFR4</i> .....                                                                                     | 75         |
| 1.4.4. <i>Le FGFR5 ou FGFR1</i> .....                                                                            | 76         |
| <b>II. Le FGFR3</b> .....                                                                                        | <b>77</b>  |
| II.1. Le gène et la protéine FGFR3.....                                                                          | 77         |
| II.2. Fonctions biologiques du FGFR3.....                                                                        | 78         |
| II.3. Implications pathologiques du FGFR3.....                                                                   | 79         |
| <b>RESULTATS</b> .....                                                                                           | <b>84</b>  |
| <b>Article 1 : In vivo gene transfer targeting in pancreatic adenocarcinoma with cell surface antigens</b> ..... | <b>85</b>  |
| <b>I. Introduction</b> .....                                                                                     | <b>86</b>  |
| <b>II. Article 1</b> .....                                                                                       | <b>87</b>  |
| <b>Figure 1</b> .....                                                                                            | <b>108</b> |
| <b>Figure 2</b> .....                                                                                            | <b>109</b> |
| <b>Figure 3</b> .....                                                                                            | <b>110</b> |
| <b>Figure 4</b> .....                                                                                            | <b>111</b> |
| <b>Figure 5</b> .....                                                                                            | <b>112</b> |
| <b>Figure 6</b> .....                                                                                            | <b>113</b> |
| <b>Figure 7</b> .....                                                                                            | <b>114</b> |
| <b>III. Résultats supplémentaires</b> .....                                                                      | <b>115</b> |
| III.1. Utilisation du marqueur de surface PAR-2. ....                                                            | 115        |
| III.2. Administration des vecteurs de ciblage par voie systémique.....                                           | 116        |
| III.3. Spécificité du système de ciblage <i>in vivo</i> .....                                                    | 118        |
| III.4. Recherche de transgènes cytotoxiques à transférer dans les cellules tumorales pancréatiques.....          | 120        |
| <b>Article 2 : FGFR3 in pancreatic cancers: friend or foe?</b> .....                                             | <b>123</b> |
| .....                                                                                                            | <b>123</b> |
| <b>I. Introduction</b> .....                                                                                     | <b>124</b> |
| <b>II. Article 2</b> .....                                                                                       | <b>126</b> |
| <b>III. Résultats supplémentaires</b> .....                                                                      | <b>154</b> |
| III.1. Etude de la surexpression du FGFR3 dans les cellules PANC-1.....                                          | 154        |
| <i>III.1.1. Caractéristiques de la lignée cellulaire PANC-1</i> .....                                            | <i>154</i> |

|                                                                                                                       |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| III.1.2. Les isoformes IIIb et IIIc du FGFR3 activent la prolifération cellulaire des PANC-1 de façon tardive. ....   | 154        |
| III.1.3. Aucune sénescence cellulaire n'a été détectée dans les cellules PANC-1. ....                                 | 155        |
| III.1.4. La surexpression du FGFR3 dans les PANC-1 emprunte des voies de signalisation différentes des MIAPaCa2. .... | 156        |
| III.2. Index mitotiques et apoptotiques de cellules de type épithélial et de type mésenchymateux. ....                | 157        |
| III.3. Expression des récepteurs FGFRs et des ligands FGFs dans les lignées d'adénocarcinomes pancréatiques. ....     | 159        |
| III.4. Injection intra-tumorale du FGFR3 dans les lignées d'adénocarcinome pancréatique. ....                         | 161        |
| III.5. Perte du FGFR3 au cours de la tumorigenèse pancréatique. ....                                                  | 163        |
| <b>DISCUSSION</b> .....                                                                                               | <b>165</b> |
| <b>ET PERSPECTIVES</b> .....                                                                                          | <b>165</b> |
| <b>I. Le ciblage des cellules tumorales pancréatiques.</b> .....                                                      | <b>166</b> |
| <b>II. Implication du FGFR3 dans la tumorigenèse pancréatique.</b> .....                                              | <b>171</b> |
| <b>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b> .....                                                                 | <b>177</b> |
| <b>REFERENCES</b> .....                                                                                               | <b>178</b> |

# Liste des abréviations

|               |                                                          |
|---------------|----------------------------------------------------------|
| <b>5-FU</b>   | 5-FluoroUracile                                          |
| <b>AAV</b>    | Adeno-Associated Virus                                   |
| <b>ADN</b>    | Acide DésoxyriboNucléique                                |
| <b>ARN</b>    | Acide RiboNucléique                                      |
| <b>BRAF</b>   | v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1           |
| <b>BRCA</b>   | BReast CAncer susceptibility protein 2                   |
| <b>CAR</b>    | Coxsackie and Adenovirus Receptor                        |
| <b>CCK</b>    | CholéCystoKinine porcine                                 |
| <b>CDK</b>    | Cyclin-Dependent Kinase                                  |
| <b>CEA</b>    | CarcinoEmbryonic Antigen                                 |
| <b>Cm</b>     | Centimètre                                               |
| <b>CMV</b>    | CytoMégaloVirus                                          |
| <b>COX-2</b>  | Cyclooxygénase-2                                         |
| <b>CPA</b>    | CycloPhosphAmide                                         |
| <b>CYP2B1</b> | Cytochrome P450 famille 2, sous-famille B, polypeptide 1 |
| <b>DAG</b>    | DiAcylGlycérol                                           |
| <b>DC</b>     | Cellule Dendritique                                      |
| <b>DNMT</b>   | DNA Méthyl Transférase                                   |
| <b>DPC</b>    | Deleted in Pancreatic Carcinoma                          |
| <b>DR</b>     | Death Receptor                                           |
| <b>eCD</b>    | Cytosine Désaminase d' <i>E-coli</i>                     |
| <b>EGFR</b>   | Epidermal Growth Factor Receptor                         |
| <b>ePNP</b>   | E. coli Purine Nucleoside Phosphorylase                  |
| <b>FADD</b>   | Fas-Associated protein with Death Domain                 |
| <b>FAMMM</b>  | Familial Atypical Multiple Mole Melanoma                 |
| <b>FDA</b>    | Food and Drug Administration                             |
| <b>FGF</b>    | Fibroblast Growth Factor                                 |
| <b>FGFR</b>   | Fibroblast Growth Factor Receptor                        |
| <b>FLRT3</b>  | Fibronectin Leucine-rich Repeat Transmembrane protein 3  |
| <b>FRET</b>   | Fluorescence Resonance Energy Transfer                   |
| <b>g</b>      | Gramme                                                   |

|               |                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------|
| <b>GAB1</b>   | GRB2-associated-binding protein 1                     |
| <b>GCV</b>    | Ganciclovir                                           |
| <b>GM-CSF</b> | Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor      |
| <b>GRB2</b>   | Growth factor Receptor-Bound protein 2                |
| <b>GY</b>     | Gray                                                  |
| <b>HEK</b>    | Human Embryonic Kidney                                |
| <b>HER</b>    | Human Epidermal growth factor Receptor                |
| <b>HGF/SF</b> | Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor               |
| <b>HSPG</b>   | Heparan Sulfate ProteoGlycan                          |
| <b>Hsv-TK</b> | Thymidine kinase de l'Herpès simplex virus            |
| <b>hTERT</b>  | human TElomerase Reverse Transcriptase                |
| <b>HVR5</b>   | Hexon hyperVariable Region 5                          |
| <b>IAP</b>    | Inhibitors of Apoptosis Protein                       |
| <b>IFN</b>    | Interféron                                            |
| <b>IGF</b>    | Insulin Growth Factor                                 |
| <b>IL</b>     | Interleukine                                          |
| <b>IPMN</b>   | Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm               |
| <b>JAK</b>    | JAnus kinase                                          |
| <b>KRAS</b>   | Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog            |
| <b>LADD</b>   | Lacrymo-Auriculo-Dento-Digital                        |
| <b>MAPK</b>   | Mitogen-Activated Protein Kinase                      |
| <b>MCN</b>    | Mucinous Cystic Neoplasm                              |
| <b>MePdR</b>  | 6-MethylPurine 2'-deoxyRiboside                       |
| <b>MiRNA</b>  | Micro acide ribonucléique                             |
| <b>MK</b>     | Heparin-binding growth/differentiation factor MidKine |
| <b>MKP3</b>   | MAPK phosphatase 3                                    |
| <b>MMP</b>    | Matrix MetalloProteinase                              |
| <b>MMSET</b>  | Multiple Myeloma SET domain                           |
| <b>MSC</b>    | Mesenchymal Stem Cell                                 |
| <b>MSLN</b>   | Mésothéline                                           |
| <b>MUC</b>    | Mucine                                                |
| <b>MVM</b>    | Minute Virus of Mice                                  |
| <b>PAM</b>    | Protein Associated with Myc                           |
| <b>PanIn</b>  | Pancreatic Intraepithelial Neoplasia                  |

|                               |                                                                         |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>PDAC</b>                   | Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma                                        |
| <b>PDGFR</b>                  | Platelet-Derived Growth Factor Receptor                                 |
| <b>PEI</b>                    | Polyéthylénimine                                                        |
| <b>PER1</b>                   | PERIOD 1                                                                |
| <b>PI3K</b>                   | PhosphoInositide 3-Kinase                                               |
| <b>PIP2</b>                   | PhosphatidylInositol 4,5-bisPhosphate                                   |
| <b>PIP3</b>                   | PhosphatidylInositol (3,4,5)-trisPhosphate                              |
| <b>PLC<math>\gamma</math></b> | Phosphoinositide-specific PhosphoLipase C gamma                         |
| <b>PP</b>                     | Polypeptide Pancréatique                                                |
| <b>PSTI</b>                   | Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor                                  |
| <b>PTB</b>                    | PhosphoTyrosine Binding domain                                          |
| <b>PTS</b>                    | Promoteur Tumeur-Spécifique                                             |
| <b>PV</b>                     | Parvovirus                                                              |
| <b>RGD</b>                    | Arginine Glycine Acide Aspartique                                       |
| <b>RTK</b>                    | Récepteur à activité Tyrosine Kinase                                    |
| <b>SADDAN</b>                 | Severe Achondroplasia with Developmental Delay and Acanthosis Nigricans |
| <b>SCID</b>                   | Severe Combined ImmunoDeficiency                                        |
| <b>SH2</b>                    | Src Homology 2                                                          |
| <b>SMAD4</b>                  | Small body size, Mothers Against Decapentaplegic homolog 4              |
| <b>SNP</b>                    | Single Nucleotide Polymorphism                                          |
| <b>SOS</b>                    | Son Of Sevenless                                                        |
| <b>SPRY</b>                   | Sprouty                                                                 |
| <b>STAT</b>                   | Signal Transducer and Activator of Transcription                        |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | Transforming Growth Factor beta                                         |
| <b>TP</b>                     | Thymidine Phosphorylase                                                 |
| <b>TRAIL</b>                  | TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand                                   |
| <b>TSP</b>                    | Thrombospondin 1                                                        |
| <b>VEGF</b>                   | Vascular Endothelial Growth Factor                                      |
| <b>VO</b>                     | Virus Oncolytiques                                                      |
| <b>XIAP</b>                   | X-linked inhibitor of apoptosis protein                                 |
| <b>YSA</b>                    | Tyrosine Sérine Alanine                                                 |

# Liste des tableaux et figures

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Anatomie du pancréas.....                                                                                | 14 |
| Figure 2 : Composition d'un acinus. ....                                                                            | 16 |
| Figure 3 : Activation et régulation des enzymes pancréatiques. ....                                                 | 16 |
| Tableau 1 : Les différents types de cancers pancréatiques endocrines. ....                                          | 18 |
| Tableau 2 : Les différents types de cancers pancréatiques exocrines. ....                                           | 18 |
| Figure 4 : Les différentes lésions pancréatiques conduisant au PDAC.....                                            | 20 |
| Tableau 3 : Essais cliniques français en cours pour des chimiothérapies combinées du cancer du pancréas (NIH). .... | 27 |
| Figure 5 : Modèle de progression génétique de l'adénocarcinome pancréatique .....                                   | 28 |
| Figure 6 : Approches thérapeutiques utilisées dans la thérapie génique du cancer du pancréas. ....                  | 37 |
| Tableau 4 : Les principaux miARNs dérégulés dans le PDAC.....                                                       | 41 |
| Figure 7 : Mécanisme d'action du système hsv-TK/GCV. ....                                                           | 45 |
| Figure 8 : L'effet bystander du système hsv-TK/GCV. ....                                                            | 46 |
| Figure 9 : Mécanisme d'action du système eCD/5-FC .....                                                             | 47 |
| Figure 10 : Spécificités et actions des virus oncolytiques.....                                                     | 57 |
| Figure 11 : Rôle des protéines E1A et E1B de l'adénovirus.....                                                      | 59 |
| Figure 12 : Les différentes familles de récepteurs à activité tyrosine kinase.....                                  | 66 |
| Figure 13 : Composition des isoformes protéiques IIIb et IIIc des FGFR1 à 3 .....                                   | 67 |
| Figure 14 : Voies de signalisation activées par les FGFs et leurs régulations .....                                 | 70 |
| Figure 15 : Spécificité de fixation des FGFs aux isoformes FGFR3. ....                                              | 78 |
| Figure 16 : Mécanismes conduisant à une voie de signalisation FGF aberrante .....                                   | 80 |
| Figure 17 : Mutations activatrices du FGFR3 conduisant à des nanismes.....                                          | 81 |

# **PREAMBULE**

Les cancers du pancréas constituent une cause majeure de mortalité dans les sociétés occidentales. Parmi les cancers pancréatiques, les adénocarcinomes canaux sont de loin les plus problématiques car le diagnostic est difficile à établir par manque de signes cliniques précoces et spécifiques. Les traitements sont limités et le pronostic est très défavorable.

Des traitements combinés et ciblés sont actuellement développés pour améliorer les traitements de référence utilisés pour le cancer du pancréas tels que la radiothérapie ou la chimiothérapie employant la gemcitabine. Le ciblage de gènes impliqués dans la progression tumorale du cancer du pancréas est une voie de choix pour l'amélioration de ces traitements. Le transfert de gène à visée thérapeutique dans les cellules tumorales pourrait être un outil innovant en développant de nouveaux vecteurs à fort potentiel de transfert de gène. De plus, le transfert de transgènes susceptibles d'avoir un fort pouvoir toxique spécifiquement dans les cellules tumorales ouvre des perspectives prometteuses tant sur le plan de la thérapie génique, que sur la découverte de nouvelles associations moléculaires synergiques anti-tumorales.

En deuxième lieu, la mise en évidence de nouvelles cibles moléculaires dont la dérégulation participe au développement et à l'agressivité des tumeurs pancréatiques pourraient être ciblées pour moduler favorablement les thérapeutiques en cours. De plus, ces nouvelles cibles moléculaires pourraient également servir de facteur de détection précoce ou de marqueurs pronostiques de l'adénocarcinome pancréatique.

Cette thèse s'articule autour de ces deux approches. Nous avons développé une stratégie de ciblage cellulaire à l'aide de vecteurs lentiviraux spécifiques des cellules tumorales pancréatiques permettant le transfert efficace de gènes cytotoxiques au sein même de la tumeur. En parallèle, l'implication du récepteur FGFR3 dans les mécanismes moléculaires de l'adénocarcinome pancréatique a été évaluée pour la première fois.

L'introduction de ce manuscrit est composée de trois parties. La première traitera du cancer du pancréas avec l'identification des cibles moléculaires dérégulées dans le processus de cancérogenèse pancréatique et les traitements thérapeutiques actuellement en cours. La deuxième partie traitera de la thérapie génique du cancer du pancréas, une approche thérapeutique mise en place ces 10 dernières années pour améliorer les traitements classiques du cancer du pancréas. Cette dernière partie permettra de replacer notre approche thérapeutique de ciblage cellulaire au centre des thérapies géniques développées pour le cancer du pancréas. Enfin, la troisième partie de l'introduction développera les récepteurs à activité tyrosine kinase FGFRs et leur implication dans les cancers, plus particulièrement le FGFR3.

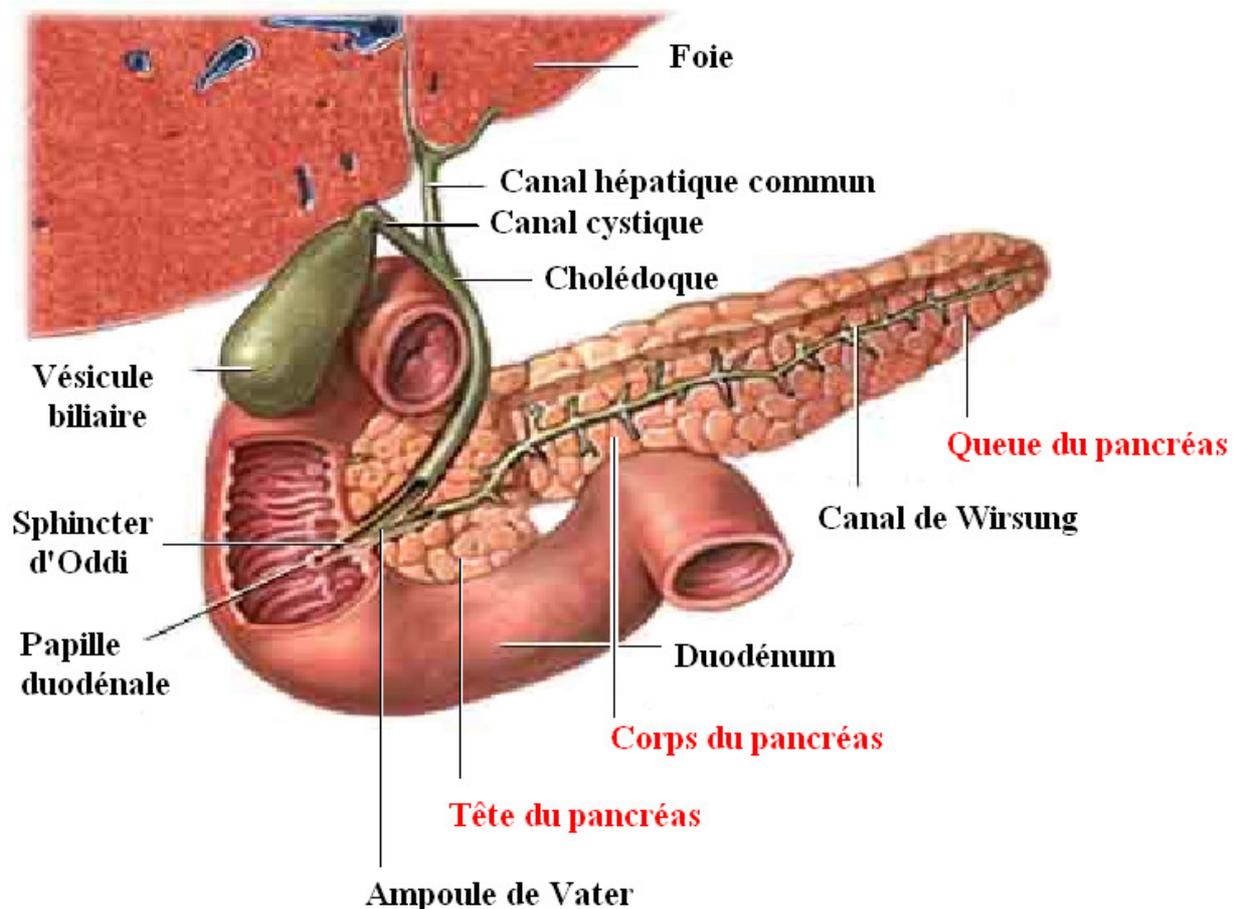
# **INTRODUCTION**

**1ère PARTIE**  
**Le cancer du pancréas**

# I. Le pancréas normal.

## I.1. Anatomie et histologie.

Le pancréas est un organe abdominal profond situé en arrière de l'estomac. Chez l'Homme il mesure environ 15cm de long pour une masse allant de 70 à 100g. Il est composé de trois parties distinctes : la tête qui s'insère dans le cadre du duodénum, le corps et la queue qui se prolongent jusqu'au bord de la rate (*Figure 1*).



*Figure 1 : Anatomie du pancréas.*

Le pancréas est une glande amphicrine dont le tissu exocrine contribue à la fonction digestive libérant le suc pancréatique riche en pro-enzymes alors que le tissu endocrine sécrète dans la circulation systémique des hormones nécessaires aux métabolismes cellulaires et notamment celui des glucides.

Les cellules de la portion exocrine sont regroupées en amas pour former des acini. Les enzymes digestives et les ions bicarbonates que ces cellules synthétisent sont sécrétés dans la lumière des acini.

Les cellules de la portion endocrine du pancréas forment des îlots de Langerhans qui sécrètent les hormones indispensables au maintien de la glycémie.

Le canal de Wirsung est le canal exocrine principal du pancréas et conduit les sucs pancréatiques jusqu'au duodénum. D'un point de vue anatomique, le duodénum et le pancréas sont indissociables de part leur vascularisation, l'ensemble constitue un seul et même bloc que l'on appelle le bloc duodéno-pancréatique.

Le canal cholédoque, appelé plus simplement cholédoque, relie la vésicule biliaire au duodénum. Il débute à la jonction entre le canal cystique et le canal hépatique commun. Ce canal hépatique et le cholédoque constituent la voie biliaire principale.

Le canal de Wirsung et le cholédoque fusionnent pour former l'ampoule hépato-pancréatique aussi appelée ampoule de Vater. Ce canal commun aux sécrétions hépatiques et pancréatiques débouche dans le duodénum par la papille duodénale qui est généralement maintenue fermée par un sphincter, aussi appelé sphincter d'Oddi. Il régule le déversement des sucs pancréatiques et de la bile.

## I.2. Le pancréas exocrine.

La fonction du pancréas exocrine est la sécrétion d'enzymes responsables de la dégradation des aliments en éléments simples, participant activement au processus de digestion. Ces enzymes sont synthétisées par les cellules acinaires et sécrétées dans la lumière des acini. Elles sont ensuite déversées dans des canaux excréteurs dont le principal est le canal de Wirsung qui se jette dans le duodénum via l'ampoule de Vater et le sphincter d'Oddi.

L'acinus, unité fonctionnelle du pancréas exocrine, est constitué par des cellules acineuses, des cellules centro-acinaires, des cellules canalaire et des cellules stellaires. Il regroupe ces cellules en « grappe de raisin » centrée autour de son canalicule qui draine la sécrétion des hormones néo-synthétisées. Les cellules acineuses sont organisées entre elles d'une part grâce à des jonctions serrées participant à la formation des ductules pour l'écoulement des sécrétions exocrines et d'autre part grâce à des transporteurs qui permettent une communication interactive entre cellules voisines (*Figure 2*).

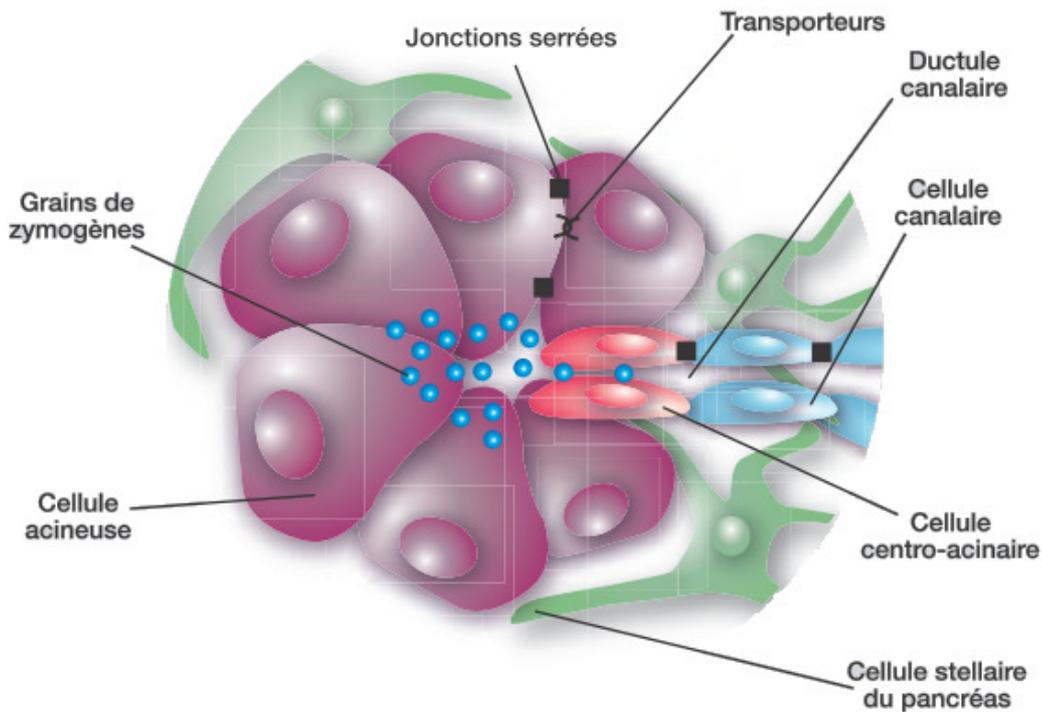


Figure 2 : Composition d'un acinus.

On appelle suc pancréatique le mélange des enzymes pancréatiques et d'une solution hydroélectrolytique produite principalement par les cellules canaliculaires. Cette solution est composée d'eau (98%) et d'une concentration importante d'ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$ . La sécrétion hydroélectrolytique est alcaline, elle a pour rôle de neutraliser l'acidité gastrique. Le  $\text{Ca}^{2+}$  joue également un rôle dans l'activation des enzymes pancréatiques.

Les cellules acinaires produisent la plupart des enzymes digestives sous forme de zymogènes évitant une autodigestion du pancréas. La plus abondante est le trypsinogène qui sera activée en trypsine dans le duodénum par hydrolyse grâce à une entérokinase sécrétée par la vésicule biliaire. La trypsine va activer à son tour les zymogènes de protéases, les autres enzymes étant sécrétées sous forme active. Associé à un inhibiteur pancréatique de sécrétion de trypsine (PSTI), ce système permet une régulation de la production de protéases actives dans la glande pancréatique (Figure 3).

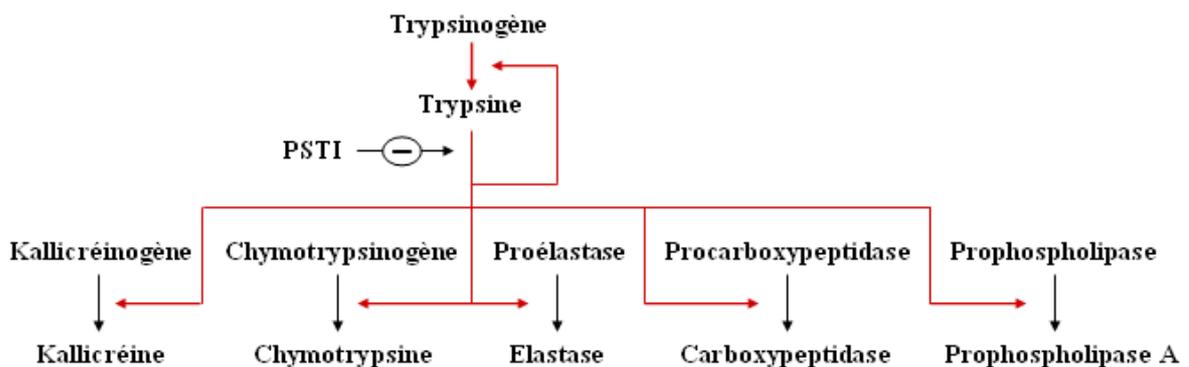


Figure 3 : Activation et régulation des enzymes pancréatiques.

Les enzymes pancréatiques permettent de dégrader tous les types de nutriments avec quatre grandes familles :

1. Les protéases (trypsine, chymotrypsine, élastase, kallikréine, carboxypeptidase).
2. Les enzymes glycolytiques (amylase, maltase).
3. Les enzymes lipolytiques (triglycérides lipase, carboxyl ester hydrolase, phospholipase A2).
4. Les nucléases (DNase, RNase).

On distingue trois phases de réponse sécrétoire pancréatique, la première étant la phase céphalique qui fait intervenir des récepteurs visuels, olfactifs et gustatifs. La deuxième phase est la phase gastrique où l'on observe une sécrétion modérée d'enzymes pancréatiques en réponse à la distension de l'estomac. Et enfin, la phase duodénale déclenchée lorsque les aliments arrivent dans le duodénum. La sécrétion des enzymes pancréatiques est très importante et stimulée par des hormones duodénales : la sécrétine et la cholécystokinine. Les hormones de la partie endocrine du pancréas joueraient un rôle inhibiteur sur la sécrétion d'enzymes pancréatiques tels que le glucagon, le peptide PP ou encore la somatostatine dont le rôle n'est pas encore bien défini (Morisset *et al.* 2008).

## **II. Les cancers du pancréas.**

### **II.1. Généralités.**

Il existe plusieurs types de cancer du pancréas, les tumeurs exocrines représentent environ 85% et les tumeurs endocrines environ 15% des cancers.

On distingue les tumeurs endocrines dites fonctionnelles avec des symptômes liés à la sécrétion hormonale tumorale comme les gastrinomes, les glucagonomes ou encore les insulinomes et les tumeurs non-fonctionnelles sans symptôme apparent (*Tableau 1*). Ces tumeurs sont cependant sécrétantes mais sans manifestation clinique évidente et représentent environ 30% des tumeurs endocrines (Asa *et al.* 2011). Puisqu'elles sont asymptomatiques, elles sont généralement diagnostiquées à un stade avancé, une fois que la tumeur a atteint une taille causant une compression ou une invasion des organes adjacents. Néanmoins, les tumeurs endocrines sont pour la plupart bénignes. Parmi les cancers endocrines, l'insulinome est le plus fréquent (60%) et le plus souvent bénin. La chirurgie est le plus souvent accessible aux patients, le cas échéant un traitement par voie orale est administré pour contrôler la glycémie.

|                                           | Types de cancer                                                     | Peptide sécrété                                         | Symptômes                                                                                   | Localisation des tumeurs                    | Potentiel tumorigène                   |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------|
| E<br>N<br>D<br>O<br>C<br>R<br>I<br>N<br>E | <b>Gastrinome</b>                                                   | Hypersécrétion de gastrine                              | Ulcères, douleurs abdominales, diarrhées, perte de poids, vomissements                      | Tête du pancréas, duodénum                  | Très souvent malignes                  |
|                                           | <b>Glucagonome</b>                                                  | Hypersécrétion de glucagon                              | Eruption cutanée, diabète, dépression, confusion                                            | Corps, queue du pancréas                    | Variable                               |
|                                           | <b>Insulinome</b>                                                   | Hypersécrétion d'insuline                               | Hypoglycémie, confusion, tremblements, céphalées                                            | Ensemble du pancréas                        | Généralement bénignes                  |
|                                           | <b>Néoplasie Endocrinienne Multiple (NEM) ou syndrome de Wermer</b> | Hypersécrétion d'un ou plusieurs peptides pancréatiques | Fatigue, faiblesse ou douleur musculaire, constipation, calculs rénaux, ostéoporose précoce | Ensemble du pancréas, Glandes parathyroïdes | Peuvent être malignes dans le pancréas |
|                                           | <b>Somatostatinoïde</b>                                             | Hypersécrétion de somatostatine                         | Diabète, douleurs abdominales, diarrhées, ballonnements, lithiase biliaire, perte de poids  | Ensemble du pancréas, ampoule de Vater      | Variable                               |
|                                           | <b>VIPome</b>                                                       | Hypersécrétion de VIP                                   | Diarrhée, perte de poids, hypokaliémie, vomissements, douleurs abdominales                  | Corps, queue du pancréas                    | Généralement malignes                  |
|                                           | <b>Tumeur endocrine non fonctionnelle</b>                           | Hypersécrétion d'un ou plusieurs peptides pancréatiques | Douleurs abdominales, altération de l'état général                                          | Ensemble du pancréas                        | Très souvent malignes et métastatiques |

Tableau 1 : Les différents types de cancers pancréatiques endocrines.

Parmi les cancers du pancréas exocrine, la plupart ont un potentiel tumorigène variable à part les cystadénocarcinomes mucineux ou séreux et l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) qui sont très souvent malins et agressifs. Le PDAC est le cancer exocrine le plus fréquent (80%) (Tableau 2).

|                                      | Types de cancer                                               | Symptômes                                                                              | Localisation des tumeurs                | Potentiel tumorigène                   |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| E<br>X<br>O<br>C<br>R<br>I<br>N<br>E | <b>Adénocarcinome canalaire</b>                               | Douleurs abdominales, ictère, anorexie, dépression, altération de l'état général       | Ensemble du pancréas                    | Très souvent malignes et métastatiques |
|                                      | <b>Cystadénocarcinome mucineux ou séreux</b>                  | Douleurs abdominales et dorsales, vomissements, diarrhées                              | Ensemble du pancréas                    | Très souvent malignes et métastatiques |
|                                      | <b>Tumeurs acinaires</b>                                      | Douleurs abdominales, jaunisse, perte de poids, anémie, diarrhées                      | Ensemble du pancréas                    | Variable                               |
|                                      | <b>Tumeurs pseudopapillaires et kystiques</b>                 | Douleurs abdominales et dorsales, perte de poids                                       | Ensemble du pancréas                    | Variable                               |
|                                      | <b>Tumeur intra-canalaire papillaire et mucineuse (TIPMP)</b> | Douleurs abdominales, nausées, vomissements, perte de poids, jaunisse                  | Principalement dans la tête du pancréas | Variable                               |
|                                      | <b>Carcinome épidermoïde</b>                                  | Douleurs abdominales et dorsales, fatigue, douleurs abdominales, nausées, vomissements | Ensemble du pancréas                    | Variable                               |
|                                      | <b>Pancréatoblastome</b>                                      | Douleurs abdominales, nausées, vomissements                                            | Principalement dans la tête du pancréas | Généralement bénignes                  |

Tableau 2: Les différents types de cancers pancréatiques exocrines.

Le PDAC représente la 4<sup>ème</sup> cause de décès par cancer dans les pays industrialisés avec une incidence annuelle estimée à plus de 10000 nouveaux cas en France en 2010 (Source :

Institut National du Cancer). Il survient le plus souvent entre 70 et 80 ans avec une incidence plus élevée chez l'homme que chez la femme.

Le pronostic du PDAC est très sombre et s'explique par un diagnostic tardif dû à une expression clinique asymptomatique de la maladie. L'unique traitement curatif est la chirurgie qui n'est possible que dans 20% des cas. La plupart des patients présentent un envahissement loco-régional ou même métastatique lors du diagnostic. Tous stades confondus, la survie à 5 ans est de 5%. En cas de chirurgie suivie de chimiothérapie, elle est de l'ordre de 20% à 5 ans (Koorstra *et al.* 2008).

Plusieurs facteurs de risque sont aujourd'hui évoqués dans la genèse de ce cancer, en particulier le tabagisme (risque multiplié de 2 à 3 fois). Le diabète de type II, l'alcool, l'obésité et le régime alimentaire riche en matière grasses sont également incriminés. Les personnes qui ont été atteintes de pancréatite chronique ont une forte disposition au développement du cancer du pancréas (risque multiplié de 15 fois) (Huggett *et al.* 2011).

Environ 10% des cas de cancer du pancréas sont héréditaires mais les gènes concernés n'ont pas encore été identifiés. Ils sont cependant associés à un certain nombre de syndromes et de maladies héréditaires connus comme le syndrome de Peutz-Jeghers (Su *et al.* 1999), le cancer du sein avec mutation du gène *BRCA2* (Lal *et al.* 2000), ou encore le mélanome familial avec mutation du gène *INK4A* (Vasen *et al.* 2000).

La chimiothérapie est souvent l'unique option des patients atteints d'un cancer du pancréas avancé. Le 5-Fluoro-uracile (5-FU) a longtemps été le traitement de référence alors qu'il ne montrait pas d'amélioration conséquente de la survie des patients. Depuis 1994, la gemcitabine, un analogue de la déoxycytidine a émergé et fait l'objet d'une multitude d'essais cliniques. Le bénéfice de son utilisation sur la survie des patients par rapport au 5-FU est seulement de quelques mois, mais son administration orale et sa tolérance ont simplifié le traitement de la maladie, rendant la gemcitabine le traitement de référence des cancers pancréatiques depuis une dizaine d'années (Burris *et al.* 1997).

## II.2. Origine de l'adénocarcinome canalaire pancréatique.

L'adénocarcinome canalaire pancréatique évolue le plus souvent à partir de lésions néoplasiques intra-épithéliales non invasives, aussi appelées PanINs en acquérant des altérations génétiques et épigénétiques au cours du temps (Hruban *et al.* 2001, Bardeesy *et al.* 2002). Les PDAC peuvent plus rarement évoluer à partir d'autres lésions, les néoplasmes intra-canaux papillaires et mucineux (IPMNs) et les cystadénomes mucineux (MCNs)

(Figure 4) (Hezel *et al.* 2006).

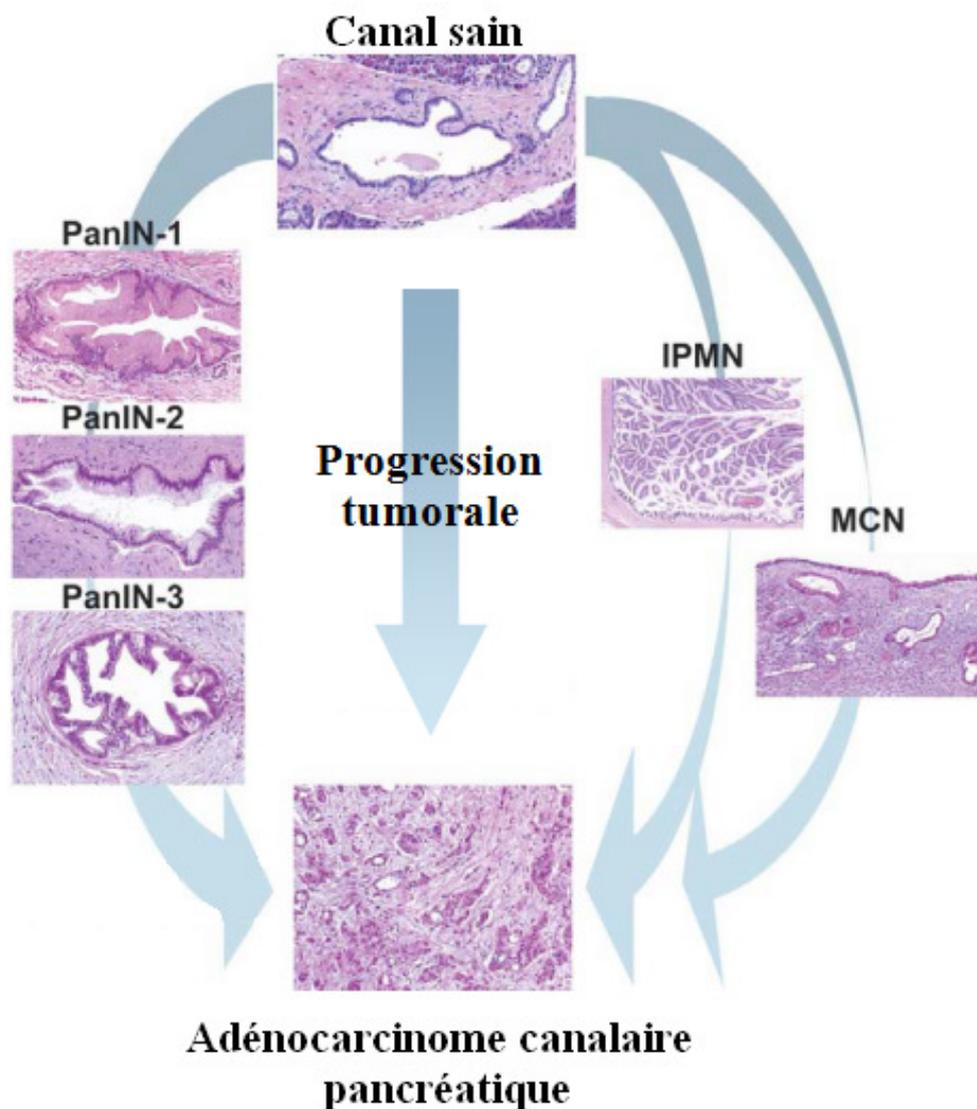


Figure 4 : Les différentes lésions pancréatiques conduisant au PDAC (Adapté de Hezel *et al.* 2006).

Les PanINs sont des lésions intra-épithéliales dysplasiques des petits canaux pancréatiques, non invasives, ne dépassant pas la membrane basale. Elles sont caractérisées par des anomalies cytologiques et architecturales qui permettent de les classer en 4 grades PanIN-1A, 1B, 2 et 3, ce dernier grade indiquant la lésion néoplasique invasive. Les PanINs sont des lésions de très petites tailles ce qui rend impossible leur détection par des techniques d'imagerie classique, leur découverte est souvent fortuite lors de la résection d'une tumeur.

Contrairement aux PanINs, les lésions IPMNs et MCNs sont des lésions macroscopiques facilement détectables par imagerie. De ce fait, lorsque des patients sont atteints de formes non-invasives de ces lésions, la chirurgie est possible et le pronostic est

souvent très bon jusqu'à régression complète de la maladie. (Haugk *et al.* 2010) (Delpu *et al.* 2011).

### II.3. Diagnostic de l'adénocarcinome canalaire pancréatique.

Généralement la douleur se manifeste lorsque le cancer est à un stade avancé. Les patients se présentent à l'hôpital avec des symptômes atypiques comme des douleurs abdominales ou une perte de poids.

Deux méthodes permettent de poser un diagnostic du cancer du pancréas, les techniques d'imagerie et les tests sanguins.

L'outil d'imagerie le plus important pour le diagnostic du cancer du pancréas est la tomographie assistée par ordinateur (CT) que l'on appelle aussi le scanner à rayons X. C'est une technique d'imagerie non-invasive qui permet d'obtenir des images 2D d'un organe. C'est l'examen de première intention lorsqu'on suspecte une tumeur pancréatique. Il existe d'autres examens d'imagerie comme les ultrasons abdominaux mais cette technique peu sensible ne détecte que très rarement les tumeurs mesurant moins de 3cm ce qui ne permet pas de diagnostic précoce de la maladie (Shrikhande *et al.* 2008). Les ultrasons endoscopiques deviennent une des méthodes les plus importantes ces dernières années puisqu'elle permet la détection d'un plus grand nombre de tumeurs par rapport au scanner à rayons X et particulièrement celles d'une taille inférieure à 3 cm (Maitra *et al.* 2003). Cette technique est également utilisée pour guider une aiguille fine jusqu'à la tumeur pancréatique pour réaliser une biopsie (Fine Needle Aspiration : FNA) chez des patients atteints de cancer pancréatique non résecable pour caractériser le type de tumeur afin de choisir un traitement adapté par la suite.

Il existe peu de marqueurs sanguins du cancer du pancréas. Les taux d'enzymes hépatiques peuvent être augmentés dans certains cas mais ce n'est pas spécifique au cancer du pancréas. L'antigène carbohydrate CA19-9 a été identifié pour la première fois chez des patients atteints de cancer du pancréas en 1981 (Koprowski *et al.* 1981). Dans des conditions physiologiques, l'antigène CA19-9 est retrouvé dans les cellules des voies biliaires et c'est la raison pour laquelle son taux est augmenté lorsque ces cellules sont affectées comme dans le cas du cancer du pancréas. Il est le biomarqueur du cancer pancréatique le plus utilisé pour le diagnostic des patients symptomatiques. Le taux de CA19-9 est toutefois augmenté dans de nombreuses autres affections comme les tumeurs biliaires, les carcinomes hépato-cellulaires ou encore les adénocarcinomes oesophagiens (Steinberg *et al.* 1990). Il est beaucoup utilisé comme marqueur pronostic pré et post-opératoire d'une tumeur pancréatique. Il a été montré

que le taux de CA19-9 augmentait avec le stade des tumeurs pancréatiques. La mesure de son taux permet aux médecins de déterminer, en association avec une technique d'imagerie, si la tumeur est résecable ou non (Kim *et al.* 2009). En post-opératoire, Il a été montré que les patients ayant un taux normal de CA19-9 post-opératoire avait une médiane de survie plus importante que lorsque son taux était élevé (Ballehaninna et Chamberlain 2012).

Une fois que le diagnostic est posé, les patients sont pris en charge par un ensemble pluridisciplinaire de médecins qui décide du traitement approprié selon des critères bien définis comprenant entre autre la taille de la tumeur, la résectabilité, l'envahissement artériel ou encore la présence de métastases.

## II.4. Les traitements de l'adénocarcinome canalaire pancréatique.

### II.4.1. La chirurgie.

Le but de la chirurgie est de réussir une résection R0 correspondant à la résection totale de la tumeur. Pour atteindre cet objectif, il existe plusieurs types de chirurgie dont la duodéno-pancréatectomie céphalique (ou Whipple) qui reste la référence pour les tumeurs de la tête du pancréas. Elle associe une résection duodéno-pancréatique et une cholécystectomie. Ces patients ont une survie médiane de 11 à 20 mois contre 6 à 11 mois pour une résection partielle et 2 à 6 mois lorsque des métastases sont déjà présentes (Alexakis *et al.* 2004).

En pratique une large proportion des patients environ 40% est classée en résection R1 correspondant à une résection macroscopique cependant des cellules tumorales sont toujours présentes.

La résection R2 correspond à une résection incomplète, la tumeur est toujours visible en imagerie. Les patients ayant une tumeur du corps ou de la queue du pancréas subissent généralement une résection massive comprenant le pancréas ainsi que la rate et ses ganglions lymphatiques hilaires. Une lymphadénectomie plus étendue et radicale a été testée lors de chirurgies pancréatiques mais le taux de morbidité s'est révélé plus important sans pour autant augmenter le taux de survie des patients (Farnell *et al.* 2005). La mortalité des patients est plus élevée à cause de complications post-opératoires plutôt que pendant l'opération elle-même (Buchler *et al.* 2003). La majorité des patients opérés rechute dans les 2 ans après résection avec atteinte du péritoine, du rétropéritoine, du foie ou d'autres sites extra-abdominaux. La survie d'une chirurgie radicale seule à 5 ans n'est que de 10% en raison de ce

taux élevé de rechute, c'est pourquoi la chirurgie est généralement accompagnée de traitements adjuvants comme la radiothérapie ou la chimiothérapie (Alexakis *et al.* 2004).

#### *II.4.2. La radiothérapie.*

La radiothérapie consiste à utiliser soit des rayons de haute énergie comme des rayons X ou des électrons émis par des accélérateurs linéaires à particules, soit des rayonnements gamma délivrés par des sources radioactives. L'action de ces rayons s'exerce à la fois sur les cellules tumorales et sur les cellules saines voisines, en altérant l'ADN et l'ARN.

Le type de cellules tumorales visées ainsi que son accessibilité définissent la dose de radiation à utiliser. Pour le cancer du pancréas, la dose est de l'ordre de 45 à 60 Gy pendant environ 6 semaines (1,8 à 2 Gy/jour) accompagnée généralement d'une chimiothérapie à faible dose utilisée comme radio-sensibilisants, comme par exemple la capécitabine ou le 5-FluoroUracile (5-FU). Ces doses de radiations sont très élevées et peuvent toucher les organes voisins, de ce fait ce type de traitement n'est généralement administré qu'aux patients ayant un cancer très avancé (Vincent *et al.* 2011). La radiothérapie permet de diminuer les douleurs abdominales dont souffrent beaucoup de patients mais reste rarement plus efficace que l'injection de médicaments antalgiques (Burris *et al.* 1997). Ce traitement est également utilisé en per-opératoire pour augmenter les doses de radiation qui cibleront plus précisément la tumeur, évitant la cytotoxicité des organes voisins.

La radiothérapie est également utilisée en traitement néoadjuvant en association avec une chimiothérapie dans des cas de tumeurs résécables, ce qui augmente sensiblement le taux de résection R0 (Evans *et al.* 2008, Pingpank *et al.* 2001). Dans la littérature, les études randomisées montrent généralement un effet moindre de la radiothérapie seule en comparaison à la chimioradiothérapie pour le traitement des tumeurs pancréatiques. Depuis quelques années un consensus général veut que la radiothérapie soit administrée en association avec une chimiothérapie (Brunner *et al.* 2010).

#### *II.4.3. Les principales chimiothérapies.*

La mono-chimiothérapie a fait l'objet de nombreuses études chez des patients présentant une tumeur non résécable ou métastatique mais l'adénocarcinome du pancréas présente une chimiorésistance marquée et peu de drogues évaluées ces dernières années ont donné un taux de réponse supérieure à 15% tant en mono-chimiothérapie qu'en association.

**5-FluoroUracile et ses dérivés** L'inhibiteur de la thymidylate synthase, le 5-FluoroUracile (5-FU), était la seule drogue avec laquelle le taux de réponse excédait les 20% avant 1995. Le 5-FU a été testé en association avec d'autres agents chimiothérapeutiques comme la doxorubicine ou encore la mitomycine mais aucun des essais randomisés n'a montré un bénéfice de survie supérieur au traitement 5-FU seul (Cullinan *et al.* 1985). Un essai clinique de phase III a été mis en place avec 207 patients inclus pour comparer les effets d'un traitement 5-FU seul par rapport à l'association 5-FU/Cisplatine. Cet essai a mis en évidence un bénéfice de l'association en termes de réponse et de progression tumorales mais pas en termes de survie globale du fait d'une cytotoxicité cellulaire plus importante (Ducreux *et al.* 2002, Strimpakos *et al.* 2008).

En 1998 une prodrogue du 5-FU, la capécitabine, qui appartient à la famille des carbamates de fluoropyrimidines a été générée. Celle-ci est convertie en 5-FU par la réaction séquentielle de trois enzymes. La dernière enzyme, la thymidine phosphorylase (TP) est surexprimée dans les tumeurs par rapport aux tissus sains ce qui donne à la capécitabine un effet plus ciblé et spécifique des cellules tumorales que le 5-FU seul (Miwa *et al.* 1998). En 2002 un essai clinique de phase II a permis de mettre en évidence un bénéfice du traitement à la capécitabine par rapport au 5-FU chez des patients atteints de cancer du pancréas avancé ou métastatique suggérant qu'elle serait un meilleur traitement que le 5-FU (Cartwright *et al.* 2002).

Deux récents essais cliniques ont été menés en association avec un traitement à la gemcitabine. L'un d'eux a montré un bénéfice relatif avec une médiane de survie allant de 6 mois avec un traitement à la gemcitabine seule à 7,4 mois en association avec la capécitabine et un taux de survie à 1 an progressant de 19 à 26%. Le deuxième essai n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes (Herrmann *et al.* 2007, Cunningham *et al.* 2009). Malgré ces statistiques peu encourageantes, il semblerait dans ces deux essais que l'association de la capécitabine au traitement de gemcitabine pourrait être particulièrement avantageuse pour les patients avec un bon état général.

S-1 est un autre dérivé basé sur la biomodulation du 5-FU qui contient du tefagur, du gimeracil et de l'oxonate de potassium (Shirasaka *et al.* 1996). Deux essais cliniques ont montré que ce traitement était bien toléré par les patients et avait une activité anti-tumorale marquée (Ueno *et al.* 2005, Morizane *et al.* 2009). Un récent et important essai clinique, incluant 834 patients, mené sur le traitement de cette molécule en association ou non avec la gemcitabine a montré un bénéfice sur la progression tumorale et la qualité de vie des patients

mais la survie globale restait inchangée, suggérant que ce traitement serait une option pour certains patients et seulement dans certains cas (American Society of Clinical Oncology annual meeting 2011).

**Gemcitabine** La gemcitabine est un analogue de la désoxycytidine. En 1996, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé son utilisation en première intention chez des patients atteints de cancer du pancréas avancé. Cette décision tenait compte d'un essai clinique randomisé de phase III qui comparait le traitement des patients avec du 5-FU ou bien avec de la gemcitabine. Un bénéfice incontestable a été mis en évidence avec une médiane de survie de 5.7 mois pour 4.2 mois pour le 5-FU, un taux de survie à 1 an de 18% contre 2% et enfin une réponse clinique de 22.2% contre 4,8% pour le 5-FU (Burriss *et al.* 1997). Pour des patients ayant subi une résection R0 ou R1 d'une tumeur pancréatique, l'administration postopératoire de gemcitabine augmentait le taux de survie à 5 ans de 9% à 21% dans un essai clinique de phase III datant de 2007 (Oettle *et al.* 2007). De nombreux essais cliniques ont été menés afin de déterminer si l'association de la gemcitabine avec le 5-FU pouvait entraîner un effet synergique mais les résultats ont été très décevants (Cascinu *et al.* 1999, Hidalgo *et al.* 1999, Matano *et al.* 2000, Berlin *et al.* 2000).

L'association gemcitabine/cisplatine a également été explorée avec des résultats controversés, un essai clinique montrant un réel effet bénéfique sur la survie des patients alors qu'un second essai ne montrait pas de différence significative. Malgré ces résultats discordants cette association est généralement considérée comme traitement optimal chez les patients atteints de cancer du pancréas avancé ou métastatique (Colucci *et al.* 2002, Heinemann *et al.* 2006).

En 2002, une équipe française a mené un essai clinique multicentrique de phase II en utilisant un traitement associant la gemcitabine à l'oxaliplatine (Louvet *et al.* 2002). Ce traitement prescrit à 30 patients ayant un cancer du pancréas avancé et 34 ayant un cancer métastatique a été très bien toléré, le taux de réponse ainsi que la survie médiane était encourageants et cette équipe a donc mené un essai clinique de phase III pour comparer cette association au traitement gemcitabine seul en 2005 (Louvet *et al.* 2005). L'association a montré de meilleurs résultats que le traitement gemcitabine seul avec un taux de réponse de 26,8% contre 17,3%, une médiane de survie de 5,8 mois contre 3,7 mois et le bénéfice clinique de 38,2% contre 26,9%. Ce traitement a également été prescrit à des patients ayant eu une rechute après traitement à la gemcitabine et plus de la moitié des patients a eu un réel

bénéfice clinique (Demols *et al.* 2006). Ce traitement est généralement utilisé chez des patients résistants au traitement à la gemcitabine seul.

**Folfirinox** Le Folfirinox est une nouvelle combinaison agressive de quatre agents, l'oxaliplatine, l'irinotecan, le 5-FU et la leucovorine. Les trois premiers composants sont d'anciennes drogues mais cette combinaison semble être prometteuse pour une nouvelle thérapie du cancer du pancréas. La leucovorine est un acide folinique utilisé comme traitement adjuvant. En effet, il a été montré que la leucovorine potentialisait l'effet du 5-FU en inhibant la thymidylate synthase (Wolmark *et al.* 1993). Un essai clinique français de phase II datant de 2005 montrait un taux de réponse de 26% avec une médiane de survie de 10,2 mois (Conroy *et al.* 2005). L'essai clinique de phase III qui en a découlé donnait des résultats similaires au précédent essai avec une médiane de survie de 11,1 mois contre 6,8 mois pour le groupe au traitement gemcitabine seul. La réponse des patients a également été supérieure au groupe gemcitabine, 31,6% contre 9,4%. Avec l'efficacité de ce traitement viennent également des problèmes de cytotoxicité entraînant des neutropénies sévères malgré le traitement avec des facteurs stimulant la formation de granulocytes (Conroy *et al.* 2011, Conroy *et al.* 2011 bis). Ces effets secondaires ont généralement restreint ce traitement aux patients atteints de cancer du pancréas métastatique avec un bon état général.

Pour essayer de limiter les effets secondaires, des versions simplifiées de combinaisons ont été testées en essais cliniques de phase II comme le Folfox (acide folinique, 5-FU, oxaliplatine) ou encore le Folfiri (acide folinique, 5-FU, oxaliplatine). La toxicité secondaire de ces combinaisons partielles est acceptable mais l'effet curatif est réellement moindre que pour le Folfirinox (Yoo *et al.* 2009).

#### *II.4.4. Essais cliniques en cours.*

En France 12 essais cliniques testant des associations de traitements comprenant des chimiothérapies sont actuellement en cours. Dix de ces essais cliniques impliquent la gemcitabine qui reste le traitement de référence du cancer pancréatique (*Tableau 3*).

|    | Phase clinique | Traitements combinés                                                             |
|----|----------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | III            | Gemcitabine/Sorafenib                                                            |
| 2  | III            | Gemcitabine/Capecitabine/Radiation/Erlotinib                                     |
| 3  | III            | Gemcitabine/Capecitabine/Dalteparine                                             |
| 4  | III            | Gemcitabine/AMG479                                                               |
| 5  | III            | 5-FU/Leucovorine/MM-398                                                          |
| 6  | III            | Gemcitabine/Folfirinox                                                           |
| 7  | II             | Gemcitabine/Trastuzumab/Erlotinib                                                |
| 8  | II             | Gemcitabine/Dasatinib                                                            |
| 9  | I/II           | Gemcitabine/LY2157299                                                            |
| 10 | I              | Gemcitabine/Capecitabine/Erlotinib                                               |
| 11 | I              | GSK1120212/Docetaxel/Erlotinib/Pemetrexed/Carboplatine/Cisplatine/Nab-Paclitaxel |
| 12 | -              | Gemcitabine hydrochloride                                                        |

Tableau 3 : Essais cliniques français en cours pour des chimiothérapies combinées du cancer du pancréas (NIH).

Il est à noter que beaucoup de ces essais cliniques emploient toujours le 5-FU ou sa prodrogue la capécitabine.

Le Daltéparine utilisée dans l'essai clinique 3 est une héparine de bas poids moléculaire. Trois études ont montré une augmentation modeste de la survie de patients atteints d'un cancer lors d'adjonction de daltéparine au traitement conventionnel de chimiothérapie et/ou de radiothérapie. Il semble que ce bénéfice soit lié à un effet inhibiteur sur la progression tumorale (Kakkar *et al.* 2004) (Altinbas *et al.* 2004) (Lee *et al.* 2005).

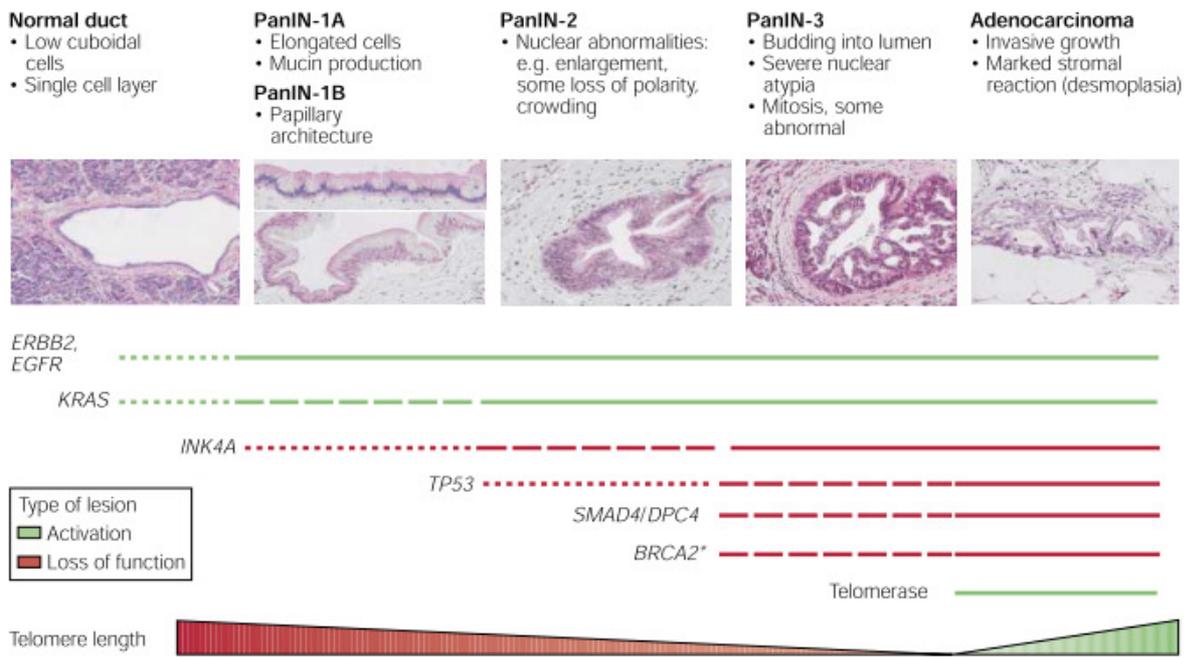
L'essai clinique 5 utilise le MM-398 qui est une nanosphère contenant de l'irinotécan, une prodrogue dont le métabolite inhibe la topoisomérase I et qui est un composé de la chimiothérapie combinée Folfirinox.

L'essai clinique 11, quant à lui, implique un grand nombre d'agents toxiques comme le docétaxel et le pemetrexed qui sont analogues. Ils empêchent la dépolymérisation des microtubules ce qui entraîne le blocage des cellules en mitose conduisant à la mort cellulaire. De plus, l'utilisation combinée de carboplatine ou de cisplatine potentialiserait l'effet du pemetrexed (Azzoli *et al.* 2007). Il a également été montré que l'administration de paclitaxel via des nanoparticules (nab-paclitaxel) potentialisait l'activité de la gemcitabine dans des modèles murins de tumeurs pancréatiques (Frese *et al.* 2012).

Malgré les efforts pour trouver de nouvelles combinaisons d'agents efficaces pour le cancer du pancréas, l'effet bénéfique sur la survie des patients se compte le plus souvent en nombre de mois. De nouvelles thérapies ciblées émergent pour potentialiser l'effet des chimiothérapies telles que les molécules inhibitrices et l'immunothérapie à l'aide d'anticorps monoclonaux. On retrouve leur utilisation dans les essais cliniques en cours en France (Tableau 3).

## II.5. Les thérapies ciblées du PDAC.

L'étude des gènes impliqués dans la progression tumorale est une voie de choix pour identifier les cibles potentielles d'une thérapie. Ainsi, ces recherches ont permis la mise en place d'un modèle de progression tumorale de l'adénocarcinome canalaire pancréatique en fonction des altérations génétiques successives apparaissant dans les tumeurs et suivant les 4 grades différents de PanINs (*Figure 5*).



*Figure 5 : Modèle de progression génétique de l'adénocarcinome pancréatique (Bardeesy et al. 2002).*

Après les premières altérations génétiques survenues comme les mutations activatrices de l'oncogène *KRAS* ou la surexpression des récepteurs EGFR et ERBB2, les lésions montrent une atypie architecturale et cytologique minimales. L'inactivation du gène suppresseur de tumeur *INK4A* survient plus tard lors des stades PanIN-1A et -1B, suivi de la perte du gène suppresseur de tumeur *TP53*. La perte de *SMAD4/DPC4* et de *BRCA2* surviennent lors des derniers stades de PanIN-2 et -3, lésions présentant de nombreuses anomalies nucléaires architecturales. D'autres altérations génétiques et épigénétiques surviennent en parallèle telles que le raccourcissement des télomères ou la dérégulation de certains miRNAs.

Pour chacun des oncogènes impliqués dans la progression tumorale, des thérapies ciblées comme l'utilisation de molécules inhibitrices ou d'anticorps monoclonaux ont été testées.

### *II.5.1. Les oncogènes impliqués dans la tumorigenèse pancréatique.*

**EGFR** L'EGFR appartient à une large famille de récepteurs de surface qui comprend 4 isotypes différents EGFR/ERBB1, HER2/ERBB2, HER3/ERBB3 et HER4/ERBB4. Les ligands de ces récepteurs incluent l'EGF, le TGF- $\alpha$ , le facteur de croissance heparin-binding EGF-like et les neurégulines. Les EGFRs se dimérisent après fixation de leur ligand et induisent l'activation de la voie de signalisation MAPKinase/Ras et la voie de la phospholipase C. Les voies de signalisation impliquant l'EGFR sont essentielles pour les tissus et les organes en développement, la régulation de la migration, de l'adhésion et de la prolifération cellulaires.

L'utilisation d'un inhibiteur d'EGFR, le Géfitinib, diminuait la prolifération et la tumorigenèse *in vitro* (Li *et al.* 2004) et inhibait également la croissance de tumeurs pancréatiques orthotopiques en combinaison avec un traitement à la gemcitabine. Cette inhibition était due à une diminution de la vascularisation par l'inhibition de facteurs pro-angiogéniques résultant en une apoptose endothéliale. Cette activité anti-néoplasique des inhibiteurs des EGFRs a été approuvée pour le traitement des patients atteints de PDAC (Bruns *et al.* 2000).

Une étude datant de 2007 a montré que l'utilisation d'Erlotinib, molécule inhibitrice de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, apportait un gain de survie pour des patients traités en association avec la gemcitabine par rapport à un groupe de patients traités en monothérapie à la gemcitabine (Senderowicz *et al.* 2007).

Un anticorps monoclonal chimérique humain-murins dirigé contre un épitope localisé dans la partie extracellulaire de l'EGFR a été généré, le Cetuximab. Une étude préclinique a montré que le Cetuximab pouvait diminuer la phosphorylation d'EGFR ainsi que la prolifération cellulaire et bloquer la fixation de la protéine adaptatrice GRB2 à l'EGFR après activation par le ligand EGF (Huang *et al.* 2003). En 2004, un essai clinique de phase II a été mené pour tester l'effet d'une thérapie combinatoire entre la gemcitabine et le Cetuximab (Xiong *et al.* 2004). Les résultats ont montré une médiane de survie de 7.1 mois.

En 2010, Philip *et al.* réalise une étude clinique de phase III comparant les traitements gemcitabine/Cetuximab contre gemcitabine ou Cetuximab seule mais les résultats sont très

décevants tant en médiane de survie qu'en progression tumorale. De plus la thérapie combinée entraînerait plus d'effets secondaires (16%) qu'en monothérapie (11%) (Philip *et al.* 2010). D'autres anticorps monoclonaux ont été générés pour essayer de potentialiser leur action neutralisante (Philip *et al.* 2008). L'utilisation du Cetuximab a été autorisée en Europe et aux USA.

Le Panitumumab est un anticorps IgG entier qui bloque la fixation de l'EGF et du TGF- $\alpha$  au récepteur EGFR. Une seule étude a été décrite sur un panel de tumeurs solides et son effet bénéfique n'a été démontré que pour les tumeurs colorectales et non les tumeurs pancréatiques (Weiner *et al.* 2008).

Le Matuzumab (EMD 72000) est un IgG1 humanisé contre l'EGFR. Dans un essai clinique de phase I, le Matuzumab a été proposé à des patients atteints de cancers pancréatiques pendant 8 semaines suivi d'un traitement à la gemcitabine. Le taux de réponse était de 66,7% (Graeven *et al.* 2006).

Le Nimotuzumab est également un anticorps humanisé dirigé contre l'EGFR. Une étude clinique de phase II vient tout juste d'être publiée sur l'utilisation de cet anticorps chez des patients atteints de PDAC avancés. Il a été montré une bonne tolérance du traitement, une médiane de survie de 4,5 mois et un taux de progression tumorale de 10,3% (Strumberg *et al.* 2012). Un essai clinique de phase III a été amorcé par cette même équipe allemande en 2012.

Malgré un nombre certains de thérapies ciblées de l'EGFR dans le cancer du pancréas, les résultats montrent rarement un réel bénéfice en termes de survie des patients et restent très décevants.

**ERBB2/HER2** Cet isotype de la famille des EGFRs a été retrouvé surexprimé dans de nombreux cancers dont le cancer pancréatique. En 2006 une étude a montré 42% de tumeurs HER2 positives et 16% d'amplification du gène HER2 dans des micro-arrays de tissus pancréatiques (Tsiambas *et al.* 2006). Un fragment mAb humanisé dirigé contre la protéine HER2 a été généré, on l'appelle Trastuzumab ou Herceptin. Dans une étude préclinique son utilisation a montré une inhibition significative de la prolifération des cellules tumorales pancréatiques ainsi que l'inhibition de la croissance tumorale *in vivo* dans des xénogreffes de souris. Des effets additifs ont été observés avec l'utilisation combinée de 5-FU (Saeki *et al.* 2007). Une étude a également montré que l'utilisation simultanée de Trastuzumab et de Matuzumab entraîne une inhibition des deux récepteurs EGFR et HER2 induisant une réduction significative de la taille des tumeurs xénogreffées, une régression plus importante

qu'avec l'utilisation de l'un et l'autre anticorps monoclonal seul et enfin une survie plus importante chez les souris inoculées avec les cellules pancréatiques BxPC-3 et MIAPaCa2 (Larbouret *et al.* 2007). Une étude clinique de phase II testant le traitement combiné trastuzumab/capécitabine chez des patients avec métastases surexprimant HER2 n'a pas montré d'effet bénéfique sur la progression tumorale ni sur la survie des patients (Harder *et al.* 2012).

Le Pertuzumab, un autre anticorps dirigé contre HER2, est un fragment mAb recombinant humanisé, il bloque la dimérisation du récepteur et donc la voie de signalisation qui découle de son activation (Franklin *et al.* 2004). En 2005, le Pertuzumab a été administré à des patients ayant des tumeurs solides incluant deux patients avec un cancer du pancréas avancé. Un des deux patients a montré une stabilité de la maladie pendant une durée de 15,3 mois (Agus *et al.* 2005). D'autres études avec un échantillon plus important de patients atteints de cancer du pancréas sont encore attendues pour confirmer cet effet.

**KRAS** Les protéines de la famille Ras sont des protéines G cytoplasmiques possédant une activité GTPasique. Les mutations du gène *KRAS* dans les cancers pancréatiques surviennent essentiellement au niveau du codon 12, et affectent son activité GTPasique entraînant un état GTP lié constitutivement actif. Cette activation de KRas entraîne une multitude d'effets cellulaires tels que l'induction de la prolifération, de la survie et de l'invasion cellulaires notamment via l'activation de plusieurs voies de signalisation comme celles des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) et de la Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Koorstra *et al.* 2008).

L'activation de l'oncogène *KRAS* est la mutation la plus fréquemment détectée dans les cancers pancréatiques (90 à 95% des cas). Ces mutations activatrices sont également retrouvées respectivement dans environ 30%, 40% et 90% des lésions pré-cancéreuses PanIN-1A, 1B et PanIN-2/3 (Haugk *et al.* 2010). Des mutations du gène *KRAS* ont également été retrouvées dans des lésions canalaire au sein de pancréas normaux (19-38%) ainsi que dans des cas de pancréatite chronique (26%) (Lüttges *et al.* 1999, 2000). Une récente étude montre qu'un fort niveau d'expression de *KRAS* sauvage est suffisant pour induire une inflammation rappelant celle d'une pancréatite chronique et entraîne à terme des lésions PanINs. Cette étude montre également que la perte du suppresseur de tumeur *TP53* combiné à la surexpression de KRas permet la progression des lésions vers un PDAC (Ji *et al.* 2009).

Une modification post-traductionnelle des protéines Ras consiste en la prénylation de leur partie C-terminale par l'enzyme farnésyl protéine transférase qui est une cible

thérapeutique majeure. Plusieurs inhibiteurs de cette enzyme ont été générés et testés sur des cellules tumorales pancréatiques. Ces inhibiteurs ont montré une activité anti-tumorale lors d'essais cliniques de phase I mais ont été très décevants par la suite, comme le Tipifarnib testé en essai clinique de phase III en 2004 et qui n'a montré aucun bénéfice en traitement associé à la gemcitabine par rapport à une monothérapie (Van Cutsem *et al.* 2004). L'inhibiteur R115777 testé également en essai clinique de phase II en 2005 n'a montré aucune efficacité de traitement (Macdonald *et al.* 2005). L'avenir de ces inhibiteurs dans le traitement du cancer pancréatique est fortement remis en cause car les essais cliniques ont tous été décevants (Xiong *et al.* 2004).

D'autres protéines en aval de l'activation de KRas sont également des cibles thérapeutiques comme Raf-1 dont l'inhibiteur est le sorafenib qui est inactif dans les PDAC avancés.

### *II.5.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la tumorigenèse pancréatique.*

***INK4A*** Le gène suppresseur de tumeurs *INK4A* est un des gènes les plus fréquemment inactivés dans les cancers pancréatiques. La perte de fonction du gène est retrouvée dans approximativement 90% des cas de cancer avec 40% par délétion homozygote, 40% par mutation d'un allèle et perte du second et enfin 10 à 15% par extinction de l'expression du gène par hyperméthylation du promoteur (Lacobuzio-Donahue *et al.* 2011, Schutte *et al.* 1997). La protéine encodée par ce gène appartient à la famille des inhibiteurs des Cyclin-Dependent- Kinases (CDKs) dont la fonction est d'inhiber la progression du cycle cellulaire au point de contrôle G1/S. Ce point de contrôle est assuré par les protéines CDK4 et CDK6 dont le rôle est d'inhiber par phosphorylation la protéine du rétinoblastome pRb pour contrôler la progression des cellules en phase G1 et ensuite leur entrée en phase S, phase de synthèse de l'ADN. La perte de p16-INK4a entraîne une hyper-phosphorylation de pRb résultant en une progression non-contrôlée des cellules dans le cycle. Il existe des mutations héréditaires du gène *INK4A* et plus particulièrement une délétion de 19 paires de bases appelée délétion de Leiden responsable du syndrome FAMMM (*Familial Atypical Multiple Mole Melanoma*) associé à un risque élevé de développement de cancer pancréatique (Vasen *et al.* 2000).

**TP53** La mutation du gène *TP53* est la plus commune des altérations génétiques dans les cancers humains. La protéine p53 joue un rôle central dans la réponse cellulaire à un stress cytotoxique en régulant le point de contrôle G1/S du cycle cellulaire, en participant au maintien de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et enfin en induisant l'apoptose des cellules (Raycroft *et al.* 1990). Lorsque p53 se lie à l'ADN, la production de la protéine p21 est stimulée. Cette protéine régule négativement la formation du complexe CDK-Cycline nécessaire à la progression du cycle cellulaire. Ce mécanisme permet de laisser du temps à la cellule pour réparer les éventuelles altérations génétiques de l'ADN et, de ce fait, d'éviter de les répliquer (Harada *et al.* 1997). La perte de fonction de p53 durant la carcinogenèse conduit donc à une croissance inappropriée des cellules, une augmentation de la survie cellulaire et une instabilité génétique (Goh *et al.* 2011). Plus de 50% des PDACs présentent des mutations du gène *TP53*. Elles apparaissent dans les stades tardifs de PanINs (PanIN-2/3) ayant déjà acquis des caractéristiques dysplasiques ce qui suggère un rôle de p53 dans la progression des tumeurs malignes (Maitra *et al.* 2003).

**SMAD4** C'est l'un des gènes suppresseurs de tumeurs les plus inactivés dans les PDACs. On retrouve une perte d'hétérozygotie du gène dans approximativement 90% des cancers et la perte complète de fonction de la protéine Smad4 dans environ 50% des cas. (Hong *et al.* 2011) L'inactivation survient par délétion homozygote ~30% ou la perte d'un allèle couplé à une mutation du second allèle ~25% (Hahn *et al.* 1996). Le facteur de transcription Smad4 est un important acteur de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) qui intervient dans de nombreux processus cellulaires dont l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que la mort cellulaire par apoptose (Massague *et al.* 2000). La perte de fonction de Smad4 entraîne une hyper-prolifération cellulaire contribuant à la progression tumorale. De plus, comme *TP53*, la perte de *SMAD4* survient dans les stades avancés de PanINs suggérant son rôle dans la progression tumorale (Wilentz *et al.* 2000). En 2007, il a été montré que l'inactivation de *SMAD4* accélérât la progression de tumeurs *KRAS* muté dans des modèles de souris transgéniques *pdx1-Cre ; Kras<sup>G12D/+</sup> ; Smad4<sup>lox/lox</sup>* (Kojima *et al.* 2007).

**BRCA2** Les mutations héréditaires de *BRCA2* sont souvent associées aux cancers familiaux des ovaires et du sein mais augmentent significativement le risque de développer un cancer pancréatique. Une étude réalisée en 2002 estime qu'environ 17% des PDACs se produiraient sur un terrain familial de mutation de ce gène. Cependant, la pénétrance du

PDAC avec une mutation héréditaire de *BRCA2* est relativement lente et similaire à celle du PDAC de forme sporadique (Murphy *et al.* 2002). *BRCA2* intervient dans le maintien de la stabilité génétique en régulant le processus de réparation des cassures double brin de l'ADN. De ce fait, la perte de fonction de *BRCA2* entraîne une accumulation d'aberrations chromosomiques favorisant la progression tumorale pancréatique (Venkitaraman *et al.* 2002). De plus, comme *TP53* et *SMAD4*, la perte de *BRCA2* est retrouvée dans les lésions PanINs les plus avancées suggérant une fois de plus un rôle dans la progression tumorale (Goggins *et al.* 2000).

Ces gènes suppresseurs de tumeurs sont perdus pendant la carcinogenèse pancréatique, le seul moyen de les cibler est de restaurer leur expression via la thérapie génique (Cf Introduction 2<sup>ème</sup> partie).

### *II.5.3. Les autres altérations.*

Les altérations génétiques décrites dans les cancers pancréatiques et plus généralement dans les cancers, résultent de mécanismes cellulaires impliquant entre autres, des modifications de la stabilité des chromosomes ou des modifications épigénétiques comme des méthylations aberrantes de l'ADN.

**Raccourcissement des télomères** La dynamique des télomères joue un rôle central dans l'instabilité chromosomique observée dans de nombreux cancers, surtout les cancers épithéliaux dont fait partie le PDAC (Maser et de Pinho *et al.* 2002). La fonction principale des télomères est de préserver les séquences d'ADN terminales des chromosomes et éviter des fusions aberrantes entre chromosomes grâce à l'enzyme télomérase. Les télomères sont constitués de quelques centaines de séquences répétées (TTAGGG)<sub>n</sub> qui sont progressivement perdues à chaque division cellulaire. Le raccourcissement des télomères est un évènement précoce dans le développement de néoplasies pancréatiques (Van Heek *et al.* 2002). Il a été montré chez la souris, comme chez l'homme, que la baisse d'activité de la télomérase et le raccourcissement transitoire des chromosomes conduisaient à des réarrangements chromosomiques majeurs par des cycles de cassures/fusion/pont menant, à terme, à l'initiation du cancer durant les néoplasies précoces (Artandi *et al.* 2000). Des cellules manifestant un tel degré d'instabilité sont rapidement éliminées via l'activation de p53. Cependant, ces réarrangements chromosomiques persistent dans les cellules avec mutation du gène *TP53* qui

vont accumuler de plus en plus d'aberrations génétiques (Meeker *et al.* 2004). Le dysfonctionnement des télomères et la perte de p53 s'associent pour promouvoir le développement de carcinomes dans de nombreux tissus (Koorstra *et al.* 2008).

**Méthylation de l'ADN** La majeure partie des méthylations de l'ADN survient dans les îlots CpG. Ils sont fréquemment localisés près des sites de transcription des gènes. Les enzymes responsables du maintien des groupements méthyles sur l'ADN sont les DNA méthyltransférases (Dnmt) dont la Dnmt1 qui est surexprimée dans approximativement 80% des cancers pancréatiques (Li *et al.* 2011). Plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs présentent une hyperméthylation de leur promoteur entraînant une perte de fonction. Le gène le plus touché dans le cancer du pancréas est le gène *INK4A*. Les autres gènes généralement mutés dans les PDACs, *TP53* et *SMAD4*, n'ont pas montré d'extinction épigénétique (Schutte *et al.* 1997). Un phénomène de perte de méthylation, ou hypométhylation est également commun dans les PDACs. L'hypométhylation survient dans la région 5' d'un gène et est associée à la surexpression de la protéine codée par ce gène. Une des protéines le plus fréquemment surexprimée par ce phénomène est la protéine S100-A4 qui joue un rôle important dans l'invasion tumorale en induisant des métastases (Sato *et al.* 2003). Ces phénomènes épigénétiques concourent à la progression des tumeurs pancréatiques.

Malheureusement, ce qu'il ressort de ces traitements à l'aide de molécules inhibitrices ou d'anticorps monoclonaux c'est une vraie discordance entre leurs effets prometteurs *in vitro* et *in vivo* et les résultats obtenus en essais cliniques. La détection trop tardive du cancer du pancréas est un vrai problème pour le traitement utilisant des molécules inhibitrices ou des anticorps monoclonaux. En effet, lorsqu'il est diagnostiqué, de multiples protéines sont déjà mutées et l'utilisation d'une monothérapie de molécules inhibitrices ou d'anticorps associée à la gemcitabine ne semble pas suffisante face à toutes ces cibles moléculaires altérées. En 2008, le génome de 24 tumeurs pancréatiques a été étudié et un nombre minimal de 30 altérations génétiques par tumeur a été découvert montrant la difficulté d'une monothérapie efficace de l'adénocarcinome pancréatique (Jones *et al.* 2008).

Devant ce problème de traitements conventionnels inefficaces, une voie de recherche s'est développée depuis la fin des années 1990, la thérapie génique, qui a également été utilisée dans le traitement de l'adénocarcinome canalaire pancréatique.

## **2<sup>ème</sup> PARTIE**

### **La thérapie génique du cancer du pancréas**

La thérapie génique est une technique qui repose sur deux éléments essentiels pour induire une réponse antitumorale satisfaisante. Le premier élément est le choix d'un gène à introduire dans les cellules tumorales qui ait un effet anti-tumoral significatif et le deuxième est le système de transfert de ce gène qui comprend les effets combinés d'un vecteur de délivrance adéquat et d'une technique de délivrance adaptée telle que les voies intrapéritonéale, intraveineuse ou intratumorale.

## I. Choix du gène.

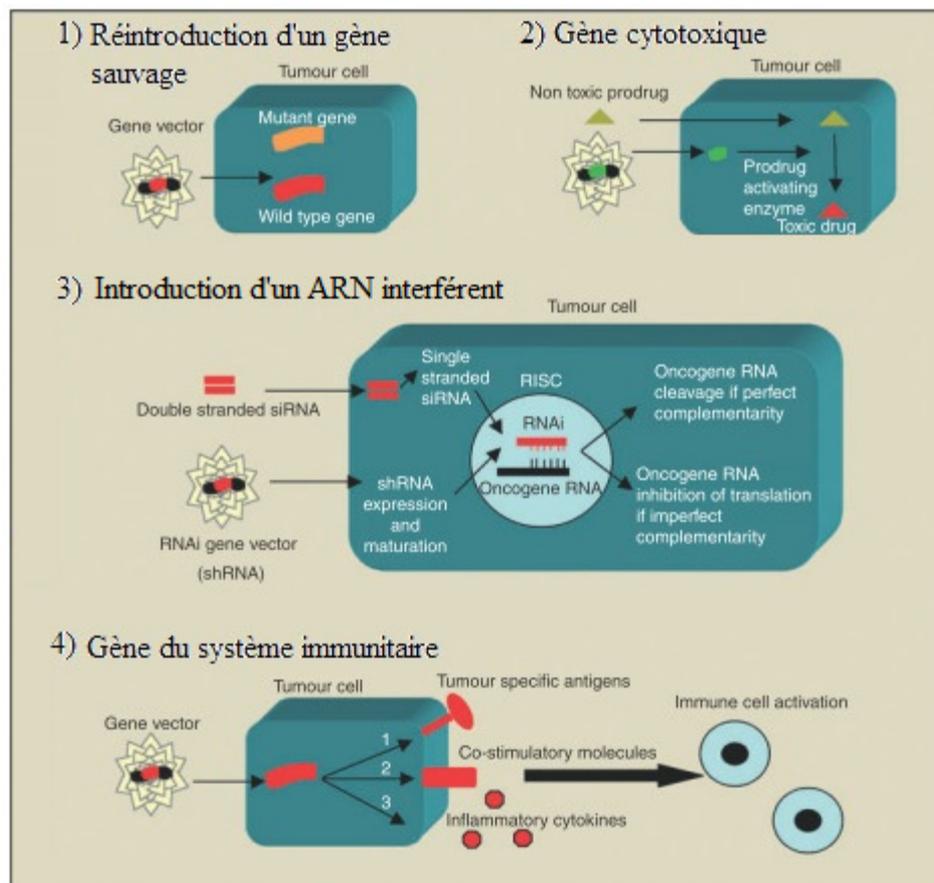


Figure 6 : Approches thérapeutiques utilisées dans la thérapie génique du cancer du pancréas (adapté de Touchefeu et al. 2010).

La première étape pour une thérapie génique efficace est le choix du gène à introduire dans les cellules tumorales. Un très grand nombre de gènes a été testé pour une thérapie génique du cancer du pancréas. La réintroduction de gènes capable d'induire la mort des cellules tumorales et l'introduction de gènes qui puissent moduler des facteurs cellulaires intrinsèques pour éliminer les cellules tumorales sont les approches les plus communes (Figure 6). Les cellules cancéreuses sont altérées par de multiples mutations génétiques

pouvant toucher des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs (Jones *et al.* 2008), c'est pourquoi des techniques d'ARN interférence ou de restauration de gènes sauvages ont également été testés dans le cancer du pancréas. Enfin, l'administration d'un gène du système immunitaire en thérapie génique permet d'activer une réponse immunitaire anti-tumorale.

## I.1. Gènes de correction.

### *I.1.1. L'approche antisens.*

L'inhibition de l'expression d'oncogène via l'utilisation de siRNA a été testée dans le cancer du pancréas. L'approche la plus commune est de cibler des gènes mutés dans le cancer du pancréas. Les stratégies impliquant l'inhibition par siRNA du gène *KRAS* muté dans 90% des cancers du pancréas a montré une réponse anti-tumorale significative *in vitro* comme dans des modèles de xéno greffes sous-cutanées et orthotopiques de souris immunodéprimées.

Une réduction drastique de la capacité tumorigène d'une lignée cellulaire tumorale pancréatique *in vitro* comme *in vivo* a été observée grâce à des ARNs interférents dirigés contre *KRAS*. Cette étude a également montré que KRas était nécessaire au maintien du phénotype PDAC (Brummelkamp *et al.* 2002). En 2005, une équipe américaine a montré que l'utilisation de ce siRNA interférait avec le phénotype agressif des cellules tumorales pancréatiques en modifiant leurs propriétés angiogéniques, migratoires et métastatiques (Fleming *et al.* 2005). En 2007, il a également été montré sur des tumeurs orthotopiques que l'utilisation d'un siRNA anti-*KRAS* potentialisait l'action de la gemcitabine puisque 43% de réduction de tumeur a été observé pour le traitement à la gemcitabine seule contre 68% pour l'association avec le siRNA anti-*KRAS* (Réjiba *et al.* 2007). La mutation du gène *KRAS* étant très fréquente dans les cancers du pancréas, le ciblage des différentes signalisations activées par la protéine KRas mutante a également été exploré. La voie de signalisation PI3-Kinase/AKT est connue pour jouer un rôle important dans le maintien du phénotype néoplasique des cellules tumorales pancréatiques ayant une mutation du gène *KRAS*. Le transfert d'un dominant négatif du mutant Ras a montré une inhibition des voies de signalisation en aval, une forte induction de l'apoptose *in vitro* et une diminution significative du volume tumoral *in vivo* (Stoll *et al.* 2005).

D'autres siRNA ont été testés dans le cancer du pancréas. En 2005, la dérégulation négative du gène anti-apoptotique *BCL2* par siRNA a déclenché des effets anti-prolifératifs et

pro-apoptotiques dans les cellules tumorales mais pas dans les cellules normales pancréatiques (Ocker *et al.* 2005).

Une autre technique antisens développée ces dernières années est l'approche ODN pour OligoDésoxyNucléotides. De la même façon que les siRNAs, les ODNs antisens (AS-ODN) sont des nucléotides de 15 à 20 bases qui entraînent la dégradation des ARN messagers de cibles d'intérêt. Ils sont protégés de la dégradation par les DNases grâce à une modification phosphorothioate terminale. Ces ODNs antisens ont été utilisés pour la thérapie du cancer du pancréas. En effet, des AS-ODNs dirigés contre la survivine induit l'apoptose dans les cellules tumorales pancréatiques PANC-1 ainsi qu'un ralentissement de leur prolifération (Dai *et al.* 2004). Des AS-ODNs dirigés contre la cyclooxygénase-2 a significativement inhibé l'angiogénèse des cellules tumorales pancréatiques PC3 (Wang *et al.* 2003).

### *1.1.2. La réintroduction des gènes suppresseurs de tumeur.*

La restauration de gènes suppresseurs de tumeur altérés dans le cancer du pancréas tels que *INK4A*, *TP53* ou *SMAD4* a été testée et a montré une réponse anti-tumorale significative *in vitro* et dans des modèles de souris.

La transduction de cellules tumorales pancréatiques par un adénovirus contenant un vecteur surexprimant la protéine p16-INK4a a montré une forte inhibition de la croissance cellulaire *in vitro* par induction de sénescence mais également d'apoptose. Les résultats *in vivo* ont montré un ralentissement significatif de la croissance tumorale même dans des cellules contenant toujours une protéine p16-INK4a sauvage suggérant un réel potentiel pour une thérapie même pour des tumeurs du pancréas n'ayant pas le gène *INK4A* altéré. Les résultats *in vivo* ont tout de même montré que la restauration seule de p16-INK4a n'était pas suffisante pour induire ces effets antitumoraux puisque d'autres altérations en aval pouvaient réduire ces effets (Calbo *et al.* 2001).

En 1999, la restauration de la protéine p53 a également été testée *in vitro* dans des cellules tumorales pancréatiques ayant des statuts p53 différents. La réintroduction de p53 a entraîné une inhibition de la prolifération cellulaire due à un blocage du cycle cellulaire en phase G1. Cette inhibition a été de moindre importance dans les cellules ayant toujours un p53 sauvage suggérant que contrairement à la protéine p16-INK4a le génotype tumoral semble important pour l'efficacité d'une thérapie de restauration p53 (Cascallo *et al.* 1999). La protéine p53 active est sous forme de tétramère. En conséquence, même si p53 sauvage est introduit dans les cellules tumorales, la présence de la protéine p53 mutée entraîne un effet de

dominant-négatif et limite l'efficacité d'une thérapie de restauration du gène suppresseur de tumeurs p53 (Chène 2001).

Dans une étude réalisée en 2002, la restauration du gène suppresseur de tumeur *SMAD4* a montré une inhibition de la prolifération *in vitro* et de la progression tumorale *in vivo* d'une lignée de cellules tumorales pancréatiques. Cet effet était dû à un blocage du cycle cellulaire. Dans cette même étude, une autre lignée cellulaire ne montrait aucun effet particulier de cette restauration de *SMAD4* (Peng *et al.* 2002). Dans une autre étude datant de 2002, une inhibition de la prolifération cellulaire *in vitro* et de la progression tumorale *in vivo* ont également été retrouvées avec une inhibition du processus d'angiogenèse via l'inhibition d'expression du facteur angiogénique VEGF et l'augmentation de l'expression de l'inhibiteur d'angiogenèse thrombospondine-1 (TSP-1) (Schwarte-Waldhoff *et al.* 2000).

Malgré les résultats prometteurs de ces thérapies restauratrices de gènes suppresseurs de tumeur, il ressort de ces études que l'état d'altération génétique des cellules tumorales pancréatiques est un frein pour obtenir une réponse antitumorale satisfaisante.

## I.2. MicroARNs.

**MiARNs** Les microARNs (miARNs) sont une famille de petits ARNs de 18 à 24 nucléotides qui régulent la transcription d'ARNs messagers cibles (Hwang *et al.* 2006). Plus de 1100 miARNs ont été décrits dans le génome humain et beaucoup sont impliqués dans la régulation de processus cellulaires importants comme la différenciation, la prolifération et l'apoptose cellulaires (Maitra *et al.* 2008). Les miARNs peuvent agir en tant que suppresseurs de tumeurs, régulateur d'oncogènes ou oncomiARNs suivant les gènes qu'ils régulent (Iorio *et al.* 2009). Leur particularité est qu'un unique miARN peut contrôler une multitude de gènes impliqués dans de nombreuses voies de signalisation et peuvent donc être des cibles de choix pour une thérapie antitumorale. Une expression aberrante de miARNs a été décrite dans plusieurs cancers y compris le cancer du pancréas (*Tableau 4*).

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cette expression incluant des altérations génétiques comme des amplifications ou des délétions, et les altérations épigénétiques comme la méthylation de l'ADN ou la modification de la chromatine (Han *et al.* 2007, Wang *et al.* 2011, Sayed *et al.* 2011).

Les études concernant les miARNs dans le cancer du pancréas sont très récentes mais plusieurs études rapportent déjà un potentiel thérapeutique certain. Le miR-21 a été retrouvé surexprimé dans le cancer du pancréas comme dans plusieurs autres types tumoraux et a été

associé à un mauvais pronostic, de plus il est en partie responsable de la résistance des cellules au traitement de gemcitabine (Giovannetti *et al.* 2010). D'ailleurs deux autres études ont montré que l'utilisation de siRNA anti-miR-21 augmentait la sensibilité des cellules à la gemcitabine et potentialisait son effet anti-tumoral via l'induction d'apoptose (Ali *et al.* 2010, Du Rieu *et al.* 2010).

| MicroARN   | Fonction                    | Expression dans le PDAC | Effet cellulaire rapporté                    | Références                                                                            |
|------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| miR-10     | Oncogène                    | Surexpression           | Augmentation de l'invasion et des métastases | Bloomston <i>et al.</i> 2006, Zhang <i>et al.</i> 2009, Weiss <i>et al.</i> 2009      |
| miR-21     |                             |                         | Inhibition de l'apoptose                     | Bloomston <i>et al.</i> 2007, Szafranska <i>et al.</i> 2007, Croce <i>et al.</i> 2009 |
| miR-27a    |                             |                         | Augmentation de la croissance                | Ma <i>et al.</i> 2010                                                                 |
| miR-155    |                             |                         | Perte d'expression de p53INP1                | Lee <i>et al.</i> 2007, Gironella <i>et al.</i> 2007, Li <i>et al.</i> 2010           |
| miR-196a   |                             |                         | Rôle dans le développement                   | Bloomston <i>et al.</i> 2007                                                          |
| miR-200a/b |                             |                         | Augmentation de l'invasion et des métastases | Li <i>et al.</i> 2010                                                                 |
| miR-217    | Gène suppresseur de tumeurs | Sousexpression          | Inhibition de la croissance                  | Zhao <i>et al.</i> 2010                                                               |
| miR-96     |                             |                         | Augmentation de l'apoptose                   | Yu <i>et al.</i> 2010                                                                 |
| miR-20a    |                             |                         | Inhibition de la migration                   | Yan <i>et al.</i> 2010                                                                |
| miR-150    |                             |                         | Inhibition de la croissance et de l'invasion | Srivastava <i>et al.</i> 2011                                                         |
| miR-126    |                             |                         | Inhibition de la migration et de l'invasion  | Frampton <i>et al.</i> 2012, Hamada <i>et al.</i> 2012                                |
| miR-34     |                             |                         | Augmentation de l'apoptose                   | Ji <i>et al.</i> 2010                                                                 |

Tableau 4 : Les principaux miARNs dérégulés dans le PDAC (Adapté de Wang *et al.* 2011).

D'autres miARNs sont surexprimés dans le cancer du pancréas, les miARNs miR-10 et miR-155. Le miR-10 confère des propriétés anti-métastatiques dans des modèles de tumeurs pancréatiques et mammaires via la suppression du facteur de transduction HOXB1 (Weiss *et al.* 2009). Le miR-155, quant à lui, a été associé à des tumeurs de mauvais pronostic et pourrait servir comme biomarqueur dans des tumeurs pancréatiques. Il entraîne la perte d'expression de la protéine TP53INP1 (*Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 1*) contribuant au développement des tumeurs pancréatiques (Gironella *et al.* 2007).

L'inhibition ou la surexpression du miR-31 a montré une inhibition de la migration et de l'invasion des cellules tumorales pancréatiques dépendante de la lignée cellulaire étudiée (Laurila *et al.* 2012).

Le miR-150 cible la mucine 4 qui est une protéine surexprimée dans de nombreux cancers dont le cancer du pancréas et qui est associée à un mauvais pronostic. Ce miARN aurait donc un rôle suppresseur de tumeur et une étude de 2011 a montré que sa surexpression inhibe la croissance, la clonogénicité, la migration et l'invasion des cellules tumorales pancréatiques (Srivastava *et al.* 2011).

Un autre miARN a été proposé comme suppresseur de tumeur dans le cancer du pancréas, le miR-126, dont l'expression est perdue dans le cancer du pancréas (Frampton *et al.* 2012). Sa principale cible est la protéine ADAM9 (*A Disintegrin And Metalloprotease*

*domain-containing protein 9*) qui est surexprimée dans le cancer du pancréas et qui joue un rôle dans l'établissement des propriétés malignes des tumeurs. La réintroduction du miR-126 dans les cellules tumorales pancréatiques entraîne l'inhibition de la migration et de l'invasion cellulaire. De plus, l'expression du marqueur épithélial E-Cadhérine est induite dans ces cellules empêchant la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales (Hamada *et al.* 2012).

Certains miARNs sont également retrouvés dérégulés dans les panINs, par exemple le miR-155 surexprimé dans les panINs 2 et le miR-21 dans les panINs 3 (Ryu *et al.* 2010, Wang *et al.* 2011).

Ces études menées sur les miARNs n'en sont qu'à leurs débuts mais il se détache un réel potentiel thérapeutique pour le cancer du pancréas.

### I.3. Gènes du système immunitaire.

Le transfert de gène dans les cellules tumorales a été étudié pour stimuler une réponse immunitaire également nommée immunothérapie ciblée. Le transfert de gènes codant pour des antigènes tumeur-spécifique, des molécules de co-stimulation ou des cytokines inflammatoires sont les principales molécules testées dans le cancer du pancréas. Le fait d'utiliser des cytokines en tant que traitement par administration systémique inhibe la progression tumorale mais peut également entraîner des effets secondaires cytotoxiques, ce qui justifie l'utilisation de la thérapie génique puisqu'elle peut se faire en injection intra-tumorale directe. Beaucoup de molécules du système immunitaire ont été testées dans le cancer du pancréas comme les interleukines IL-1, IL-2, le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*) ou encore le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) et qui ont toutes montré un effet antitumoral significatif et plus particulièrement l'IL-2 et les interférons (IFNs) (Koido *et al.* 2011).

Un vecteur codant pour l'interleukine 12 et une molécule de co-stimulation B7.1 a montré une rémission tumorale complète dans 80% des cas de souris xénotreffées avec des cellules tumorales pancréatiques. De plus, lorsque le même type cellulaire tumoral était réinjecté dans les souris précédemment guéries, elles ne développaient pas d'autres tumeurs suggérant qu'une immunité protectrice s'était mise en place chez ces souris (Pützer *et al.* 2002). Le transfert d'IL-12 grâce à un vecteur adénoviral a également été testé dans des xénotreffes de cellules tumorales pancréatiques chez des souris SCID en combinaison avec un deuxième adénovirus ne se répliquant que dans les cellules p53-déficientes. Ce traitement

a conduit à un fort effet inflammatoire avec une complète rémission des tumeurs (Motoi *et al.* 2000).

La modulation du système immunitaire par les interférons a également été étudiée. Une étude de 2005 a montré que l'utilisation d'IFN- $\gamma$  en combinaison avec un adénovirus contenant un promoteur tumeur-spécifique activait une forte immunité anti-tumorale conduisant à la complète régression des tumeurs pancréatiques primaires et des métastases (Sarkar *et al.* 2005). Une thérapie combinée utilisant l'IFN- $\alpha$  véhiculé par un poxvirus recombiné spécifiquement dirigé contre le CEA (*CarcinoEmbryonic Antigen*) a été testé dans le cancer du pancréas. Cette étude a montré une forte stimulation du système immunitaire entraînant une inhibition de la progression tumorale par induction de la cytotoxicité cellulaire via les lymphocytes CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et NK (*Natural Killer*) (Hance *et al.* 2009). L'hIFN- $\beta$  (*human IFN- $\beta$* ) a été transféré dans des cellules et des xénogreffes sous-cutanées de souris formées à partir de cellules tumorales pancréatiques via un lentivirus en 2010 et a montré également une rémission totale dans 50% des souris traitées (Ravet *et al.* 2010).

Toutes ces données suggèrent que le transfert de gènes du système immunitaire a de réels effets prometteurs pour une thérapie seule ou combinée du cancer du pancréas.

## I.4. Gènes suicide.

### I.4.1. Généralités.

La thérapie anti-cancéreuse véhiculant un gène suicide ou gène de sensibilité aux drogues aussi appelée *Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy* (GDEPT) est basée sur le transfert d'une enzyme capable de transformer une prodrogue en un métabolite toxique induisant la mort cellulaire. Ces systèmes ont un avantage certain par rapport à l'administration directe d'agent chimique. En effet la chimiothérapie classique est limitée par son incapacité à livrer suffisamment de drogue au niveau des cellules tumorales et l'atteinte collatérale des cellules saines du patient. En véhiculant ces gènes suicides au niveau de la tumeur via un vecteur, la toxicité serait alors beaucoup plus importante qu'en traitement classique au niveau de la cellule tumorale et serait moins toxique pour les cellules saines si la délivrance du gène thérapeutique se fait par un vecteur restreint à la transduction des cellules tumorales seules. De plus la thérapie GDEPT permet d'étendre leur effet anti-tumoral aux cellules voisines non-transduites, grâce à ce qu'on appelle l'effet « *bystander* ». Il existe plusieurs systèmes de gènes suicide combinant différentes enzymes et différentes prodrogues

plus ou moins efficaces mais seulement quelques unes de ces combinaisons ont été testées en essai clinique. Seuls les quatre principales associations utilisées dans le cancer du pancréas seront développés, les combinaisons Thymidine Kinase/Ganciclovir (hsv-TK/GCV), Cytosine Déaminase/5-Fluorocytosine (eCD/5-FC), Purine Nucléoside Phosphorylase/Méthylpurine désoxyribose (ePNP/MePdR) et Cytochrome P450 /Cyclophosphamide (CYP2B1/CPA).

#### *1.4.2. L'effet « bystander ».*

Le problème principal d'une thérapie génique anti-cancéreuse est la délivrance du gène thérapeutique à un nombre suffisant de cellules tumorales pour conduire à une régression tumorale. L'effet « *bystander* » ou effet de voisinage, dans le contexte d'une GDEPT, est un processus qui permet d'étendre l'effet cytotoxique des cellules transduites aux cellules voisines non-transduites. C'est un avantage très important dans une thérapie gène suicide puisqu'en transduisant un faible nombre de cellules tumorales avec le gène thérapeutique, l'éradication de la tumeur entière pourrait être possible. Deux effets « *bystander* » ont été décrits, l'un local et l'autre distant.

L'effet « *bystander* » local est dû au transfert des produits métabolites toxiques solubles par diffusion ou transfert actif via les jonctions communicantes ou via des vésicules apoptotiques (Freeman *et al.* 1993, Mesnil *et al.* 2000). Il a été montré que l'effet « *bystander* » de cellules avec des jonctions communicantes dysfonctionnelles traités par le système hsv-TK/GCV était sérieusement affecté (Grignet-Debrus *et al.* 2000). Pour contrer ce problème il est possible d'exprimer ou de surexprimer des connexines dans les cellules cibles (Jimenez *et al.* 2006).

L'effet « *bystander* » distant implique le système immunitaire via un processus inflammatoire systémique important. La mort des cellules tumorales ciblées peut stimuler la reconnaissance d'antigènes tumoraux conduisant à une inflammation locale et une mort des cellules non atteintes via le système immunitaire ce qui serait le facteur crucial d'une thérapie génique efficace *in vivo* (Kuriyama *et al.* 2004, Portsmouth *et al.* 2007).

#### *1.4.3. Les différents systèmes.*

##### **1.4.3.1. Thymidine kinase du virus simplex de l'herpès/Ganciclovir.**

Le ganciclovir (GCV, 2-amino-9-[1,3-dihydroxypropan-2-yloxymethyl]-3H-purin-6-one) est un analogue d'une 2'-deoxy-guanosine qui a été synthétisé pour la première fois en 1980 par la Syntex Research Corporation en tant qu'agent antiviral (Noble *et al.* 1998). Le GCV est phosphorylé par une enzyme, la hsv-thymidine kinase (hsv-TK), qui provient de l'Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) en un GCV monophosphate (GCV-MP) puis les enzymes intracellulaires complètent la conversion en ajoutant deux autres groupements phosphates pour obtenir la drogue GCV-TP (Elion *et al.* 1983) (Figure 7).

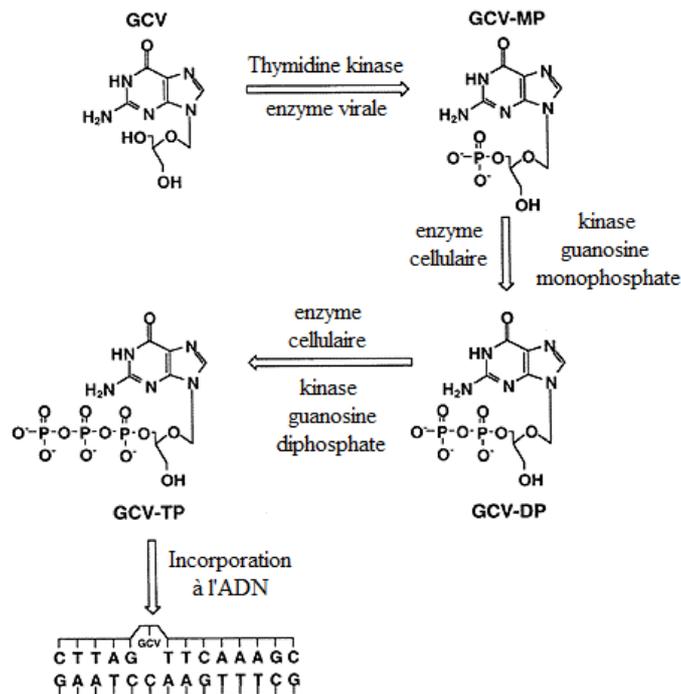


Figure 7 : Mécanisme d'action du système hsv-TK/GCV.

Même si les cellules humaines possèdent des thymidines kinases cytosoliques et mitochondriales, ces enzymes endogènes sont beaucoup moins actives comparé à celles du HSV-1. La drogue GCV-TP est structurellement similaire au dGTP et est incorporé dans l'ADN durant la réplication induisant l'inhibition de l'ADN polymérase et la formation de cassure double brins entraînant la mort cellulaire par apoptose (Fillat *et al.* 2003).

La combinaison hsv-TK/GCV a été testée dans le cancer du pancréas. Une étude de 2010 a montré que le système hsv-TK/GCV inhibait la prolifération cellulaire de plusieurs lignées tumorales pancréatiques avec une sensibilité plus ou moins importante qui était due aux protéines de checkpoint du cycle cellulaire. Il a été notamment mis en évidence que la protéine de checkpoint Chk1 participait à l'effet cytotoxique du système hsv-TK/GCV de

même que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de Chk1 entraînait une perte de sensibilité des cellules tumorales à cet effet cytotoxique (Abate-Daga *et al.* 2010).

La combinaison hsv-TK/GCV induisait un effet cytotoxique important dans différents modèles de tumeurs pancréatiques avec un fort effet bystander impliquant les jonctions communicantes (Figure 8). Tat8 est un peptide de 8 acides aminés du domaine basique de la protéine du Tat du VIH (Cascante *et al.* 2005). Une éradication complète des tumeurs a été observée dans près de 50% des souris en utilisant Tat8 comme domaine de transduction protéique (*Protein Transduction Domain* PTD) fusionné au gène *TK*. Une étude impliquant le transfert de la hsv-TK par des vecteurs adénoviraux et rétroviraux en combinaison a également montré un fort impact antitumoral *in vivo* (Carrio *et al.* 1999).

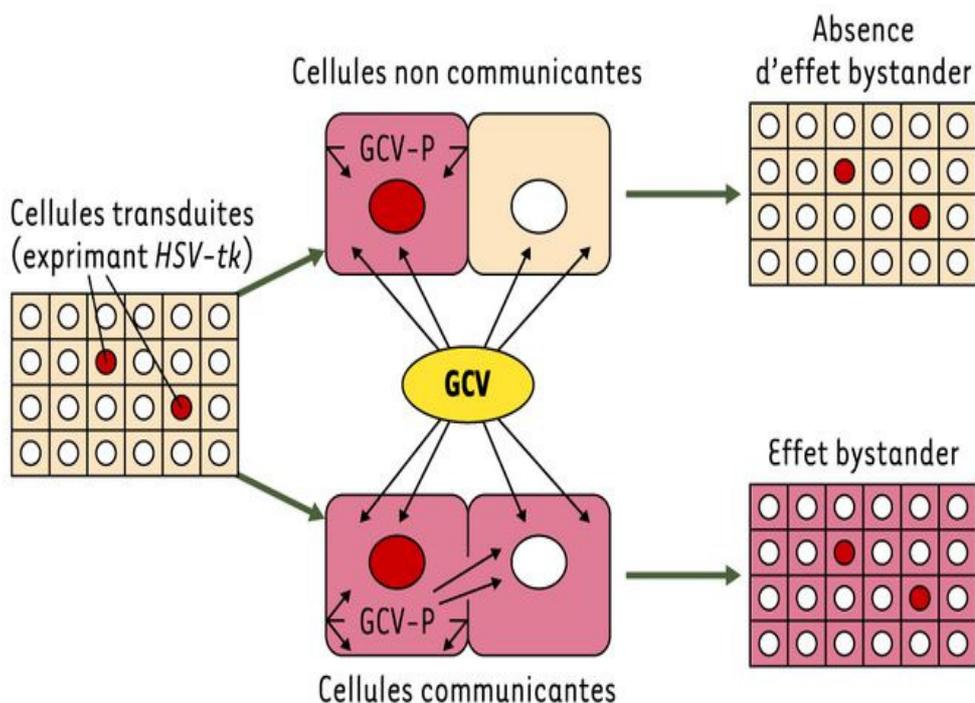


Figure 8 : L'effet bystander du système hsv-TK/GCV.

Grâce à toutes ces études, le système hsv-TK/GCV a montré qu'il était un outil de valeur dans la thérapie du cancer du pancréas, seul et d'autant plus en thérapie combinée.

#### I.4.3.2. Cytosine Déaminase/5-Fluorocytosine.

Le 5-Fluorouracile (5-FU) est un agent toujours utilisé dans le cancer pancréatique malgré les effets secondaires toxiques très importants observés comme une myélosuppression,

des dermatoses, des diarrhées ou encore des problèmes cardiaques. Pour contrer ces effets cytotoxiques, le système Cytosine Désaminase/5-Fluorocytosine (eCD/5-FC) a été imaginé. La eCD est une enzyme bactérienne et fongique qui catalyse la désamination de la cytosine en uracile et qui convertit donc le 5-FC non toxique en 5-FU (Springer *et al.* 1996). Une fois le 5-FU produit, les enzymes intracellulaires prennent le relai et produisent les métabolites actifs suivants, le 5-fluorodeoxyuridine-5'-monophosphate (5-FdUMP), 5-fluorodeoxyuridine-5'triphosphate (5-FdUTP) et le 5-fluorouridine-5'-triphosphate (5-FUTP) (Figure 9). Chacun des trois métabolites est toxique pour les cellules. Le 5-FUTP est incorporé à l'ADN causant des dommages mais également en inhibant le transport nucléaire des ARNr, ARNt et ARNm. Le 5-FdUMP inhibe de façon irréversible la thymidylate synthase responsable de la formation du nucléoside diphosphate dTDP qui est transformé en dTTP par la NDP-Kinase (*Nucléoside DiPhosphate-Kinase*). En conséquence, le 5-FdUTP sera préférentiellement incorporé à l'ADN plutôt que le dTTP, induisant des cassures de l'ADN, une inhibition de la réplication conduisant à la mort cellulaire par apoptose (Kurozumi *et al.* 2004). L'effet « *bystander* » de ce système n'implique pas les jonctions communicantes comme pour le hsv-TK/GCV mais une diffusion simple du 5-FU qui ne nécessite pas de contact entre les cellules transduites et non-transduites (Huber *et al.* 1994).

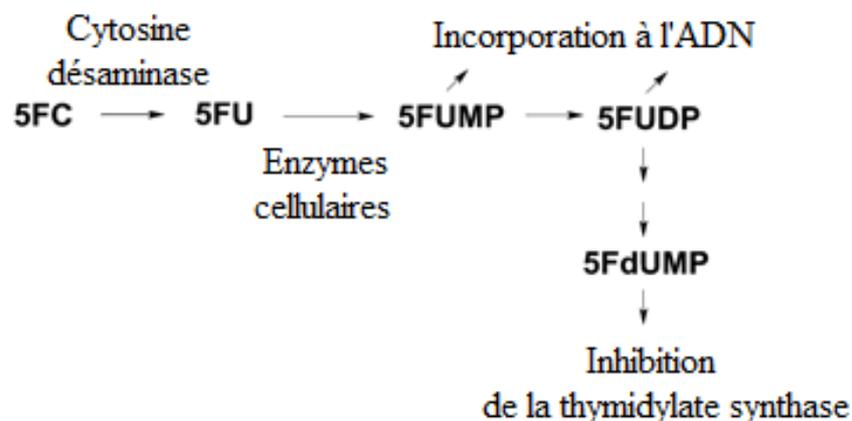


Figure 9 : Mécanisme d'action du système eCD/5-FC.

Le transfert du système eCD/5-FC par un adénovirus dans des cellules tumorales pancréatiques murines pan 02 a montré une forte inhibition de la prolifération *in vitro* et une inhibition de près de 70% de la progression tumorale *in vivo* (Evoy *et al.* 1997). En 2001, une équipe japonaise a réalisé une étude sur 3 différents groupes de tumeurs pancréatiques humaines BxPC-3 chez la souris nude, l'un contrôle, un autre ayant été transfecté une fois avec le système eCD/5-FC et le dernier ayant été transfecté deux fois. Le groupe qui a été

transfecté une fois a montré une réduction tumorale de 55% et celui qui a été transfecté deux fois près de 72% ce qui suggérait une efficacité du système eCD/5FC sur les cellules tumorales pancréatiques humaines et d'autant plus si le traitement était répété (Kanyama *et al.* 2001). Il est important de noter que la combinaison des deux systèmes hsv-TK/GCV et eCD/5-FC avait un effet synergique par rapport à l'utilisation d'un seul système dans des cellules tumorales prostatiques (Boucher *et al.* 2006). Cette association a également été testée dans les cellules tumorales pancréatiques. En effet, les gènes *TK* et *CD* ont été transférés via une approche non-virale consistant en une lipofection *in vivo* grâce à des liposomes BGTC/DOPE (Bis-Guanidinium-Tren-Cholesterol/DiOleoyl-sn-glycero-3-Phospho Ethanolamine) dans un modèle de carcinomatose pancréatique péritonéale formées à partir de cellules BxPC-3. Cette étude a montré une transduction efficace des cellules tumorales pancréatiques *in vivo* conduisant à un ralentissement de la progression tumorale ainsi qu'à l'augmentation de la survie des souris de plus de 20 jours (Hajri *et al.* 2004).

#### **I.4.3.3. Purine Nucléoside Phosphorylase/6-Méthylpurine désoxyribose.**

La Purine Nucléoside Phosphorylase est une enzyme bactérienne dont l'équivalent humain est directement impliqué dans la voie de récupération des purines. Le gène *DeoD* d'*Escherichia Coli* code pour l'ePNP qui convertit les analogues adénosines en des nucléosides très cytotoxiques. La prodrogue 6-méthylpurine désoxyribose (MePdR) est sélectivement convertie par l'ePNP en une toxine soluble la 6-méthylpurine (MeP) qui est un analogue de l'ATP et qui va inhiber de ce fait de nombreux processus impliqués dans la synthèse d'ARN et de protéines entraînant la mort cellulaire par apoptose (Parker *et al.* 1997). L'avantage de ce système est qu'il affecte les cellules tumorales qu'elles soient ou non en division, contrairement aux autres systèmes hsv-TK/GCV et eCD/5-FC. De plus, l'effet « *bystander* » de ce système ne nécessite aucun contact cellulaire puisque la toxine MeP est relarguée par les cellules tumorales transduites et captées par les cellules voisines par diffusion simple (Hughes *et al.* 1998).

Une seule étude datant de 2004 a testé ce système dans les cellules tumorales pancréatiques *in vitro* et *in vivo* et a également étudié l'effet « *bystander* » induit. L'utilisation de ce système a montré une forte inhibition de la prolifération de deux lignées différentes de cellules tumorales pancréatiques ainsi qu'une forte inhibition de la progression tumorale *in vivo* allant jusqu'à la régression complète des tumeurs. L'effet « *bystander* » induit semblait

plus important que celui induit par les autres systèmes de prodrogue puisque seulement 1% de transduction serait suffisant pour induire la mort des cellules tumorales en culture alors qu'il faudrait 5 à 10% de cellules transduites pour les autres systèmes (Deharvengt *et al.* 2004).

#### **I.4.3.4. Cytochrome P450/Cyclophosphamide.**

Le cyclophosphamide (CPA) est une pro-drogue largement utilisée comme traitement des cancers humains. Il est transformé en 4-hydroxyphosphamide par les enzymes de la famille des cytochromes P450 dans le foie puis devient de l'acroléine et une moutarde phosphoramidate cytotoxique. Ce métabolite se lie de façon covalente à l'ADN entraînant la mort cellulaire par apoptose (Davidoff *et al.* 1993). L'avantage de ce système repose sur une conversion prolongée de la prodrogue dans le foie et un fort effet « *bystander* ».

L'association cytochrome P450/cyclophosphamide est un traitement de choix pour une GDEPT et en particulier le cytochrome CYP2B1 qui est l'enzyme la plus active de la famille des cytochromes P450. Une étude *in vitro* a montré que ce cytochrome sensibilisait les cellules de plusieurs types tumoraux au CPA. De plus, ce système a montré un fort effet « *bystander* » qui, comme pour l'association ePNP/MePdR ne nécessite pas de contact intercellulaire (Wei *et al.* 1994). Ce système a été testé dans le cancer du pancréas en utilisant des microcapsules de sulfate de cellulose comme vecteur en injection intra-artérielle et s'est révélé relativement efficace. Une régression entre 25 et 50% des tumeurs a été observée pour 2 patients, plus de 50% de réduction tumorale pour deux autres patients et enfin une stabilité de la maladie pour le reste des patients (n=12). De plus, le temps médian de survie avait doublé et le taux de survie à 1 an avait augmenté de 11% à 36%. Aucun effet secondaire n'a été mis en évidence avec ce type de traitement (Löhr *et al.* 2001). Le système CYP2B1/CPA a également été testé en combinaison avec l'association hsv-TK/GCV dans des modèles de tumeurs pancréatiques en 2002. Les deux systèmes ont montré un effet cytotoxique dans les cellules tumorales pancréatiques seuls ou en association *in vitro*, toutefois les résultats n'ont pas montré de synergie *in vivo* (Carrio *et al.* 2002). Il a également été montré que l'activité antitumorale du système CYP2B1/CPA pouvait être augmentée par l'utilisation de vecteurs adénoviraux dirigés contre les FGFRs (Huch *et al.* 2006).

### **I.5. Gènes de l'apoptose.**

La plupart des cancers montre une résistance à l'apoptose ce qui participe à leur nature agressive, comme pour le cancer du pancréas. Réintroduire une signalisation cellulaire efficace pour induire l'apoptose offre une stratégie prometteuse pour une thérapie ciblée anticancéreuse. Plusieurs études impliquant la réintroduction d'un gène de l'apoptose dérégulé ou l'inhibition de gènes anti-apoptotiques dans le cancer du pancréas ont été menées et ont montrées des résultats encourageants.

Les inhibiteurs de la famille des IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein) ont pour rôle principal l'inhibition de protéines pro-apoptotiques telles que les caspases. L'inhibition des protéines c-IAP et XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*) a montré une augmentation de la sensibilité des cellules tumorales à des traitements médicamenteux tels que le cisplatine, la doxorubicine ou encore le paclitaxel qui sont des traitements de première intention dans plusieurs types tumoraux mais qui sont inefficaces contre le cancer du pancréas (Lopes *et al.* 2007, Vogler *et al.* 2007). Une nouvelle classe de facteur anti-apoptotique a émergé des études réalisées sur les gènes de l'horloge circadienne et leur influence sur la progression tumorale. Le gène *PERIOD1* (*PERI*) a été proposé comme facteur anti-apoptotique dans les cellules tumorales pancréatiques. En effet, il a été montré que le knock-down de *PERI* induisait l'apoptose en dérégulant la balance BAX/BCL2 soulevant un intérêt dans la thérapie génique ciblant *PERI* dans le cancer pancréatique (Sato *et al.* 2009). La surexpression des gènes pro-apoptotiques *BAX* et *TRAIL* a également montré des effets anti-tumoraux et une sensibilité accrue au traitement à la gemcitabine (Wack *et al.* 2008).

## II. Choix du vecteur.

Le choix du vecteur peut largement influencer sur l'efficacité de la thérapie génique. Il existe de multiples vecteurs pour véhiculer le gène thérapeutique aux cellules cibles, les trois principaux groupes étant les vecteurs viraux, non-viraux et cellulaires.

### II.1. Les vecteurs viraux.

Les virus ont développé des mécanismes extrêmement efficaces pour infecter les cellules, contrecarrer les défenses cellulaires, délivrer leur matériel génétique, utiliser la machinerie cellulaire pour l'expression de leur gènes et la fabrication des nouveaux virions. Les vecteurs viraux qu'ils soient à ARN ou à ADN ont été rendus non-répliquatif par génie génétique pour qu'ils deviennent seulement des véhicules efficaces incapable de se répliquer

autre part que dans des lignées cellulaires d'emballage utilisées pour leur production en laboratoire. La substitution du génome viral par un transgène d'intérêt rend le vecteur viral capable de délivrer un gène thérapeutique dans une cellule cible. Il existe plusieurs vecteurs viraux possédant leurs avantages et leurs inconvénients, les principaux utilisés dans le cancer du pancréas seront développés.

**Adénovirus** Plus de 51 sérotypes différents d'adénovirus ont été isolés jusqu'à présent. Le sérotype 5 (Ad5) est le plus utilisé en thérapie génique. Il présente une faible immunité chez l'humain causant des infections respiratoires aiguës bénignes. Les vecteurs adénoviraux présentent de nombreux avantages, ils sont produits à forts titres en laboratoires, ils sont non-intégratifs, ils peuvent transduire des cellules en division ou non et présentent une forte capacité de transduction *in vivo*. Ils présentent également certains inconvénients puisque lorsqu'il est administré par voie systémique il est le plus souvent retenu dans le foie et suscite des hépatotoxicités. De plus beaucoup de personnes possèdent une immunité contre les sérotypes communs du virus Ad2 et Ad5 et limitent donc le transfert de gène par cette méthode, le système immunitaire élimine assez vite les cellules transduites et donc l'expression du gène d'intérêt (Volpers *et al.* 2004). Néanmoins des stratégies sont en développement pour contrecarrer ce genre de limitations et plusieurs études précliniques employant l'adénovirus comme vecteur de gènes thérapeutiques ont montré plus ou moins d'efficacité dans des modèles de tumeurs pancréatiques. Une étude de 2012 a utilisé l'adénovirus pour transférer le gène *PUMA*, gène pro-apoptotique, dans les cellules tumorales pancréatiques avec une bonne efficacité de transduction et une induction massive d'apoptose *in vitro* comme *in vivo* (Wang *et al.* 2012). Le transfert combiné de plusieurs gènes cytotoxiques et/ou de plusieurs siRNA a été testé via des vecteurs adénoviraux Ad5. En effet, pour contrecarrer la résistance des cellules pancréatiques à la gemcitabine, 2 siRNAs dirigés contre des enzymes impliquées dans le processus de résistance ainsi qu'un gène codant pour une enzyme clé du métabolisme de la gemcitabine ont été transférés via un adénovirus dans des cellules tumorales pancréatiques *in vitro* et *in vivo* en combinaison avec un traitement à la gemcitabine. Une réduction significative de 82% du volume tumoral a été observée *in vivo* par rapport à des tumeurs n'ayant été traitées qu'à la gemcitabine démontrant l'efficacité de cette thérapie combinée (Réjiba *et al.* 2009).

Beaucoup de vecteurs adénoviraux ont été modifiés pour être spécifiquement répliquatifs dans des cellules cibles. En 2012, une étude montrait la faisabilité d'une thérapie anticancéreuse du pancréas à l'aide d'un adénovirus ne pouvant se répliquer que dans les

cellules possédant la cyclooxygénase Cox2 qui est surexprimée dans le cancer du pancréas. En effet, le vecteur adénoviral modifié possédait le gène E1, nécessaire à sa réplication, sous le contrôle du promoteur du gène *COX2* limitant sa réplication aux cellules exprimant cette enzyme (Armstrong *et al.* 2012). En 2011, il a été démontré que les thérapies géniques adénovirales étaient plus efficaces dans les cellules pancréatiques résistantes à la gemcitabine par rapport aux cellules sensibles ce qui pourrait être un avantage pour une thérapie combinée avec le traitement à la gemcitabine préconisé en première intention chez les patients atteints de cancer du pancréas (Yasui *et al.* 2011).

**Vecteurs rétroviraux/lentiviraux** Les oncorétrovirus sont des virus intégratifs qui offrent une transduction stable entraînant une expression à long terme du transgène d'intérêt, toutefois ils n'infectent que les cellules en division. Plus avantageux, les lentivirus possèdent la même capacité de transduction que les oncorétrovirus mais peuvent infecter les cellules en division ou non. Les vecteurs rétroviraux avaient été utilisés initialement pour rétablir l'expression de gènes fréquemment mutés dans le cancer du pancréas comme le gène *TP53* (Hwang *et al.* 1998) ou introduire des gènes suicides ou cytotoxiques comme le gène de la nitroréductase (Green *et al.* 1997), de la thymidine kinase (Howard *et al.* 2000), du cytochrome P450 (Carrio *et al.* 2002) ou de la cycline G1 mutée (Gordon *et al.* 2000). Dans tous les cas, une inhibition de la croissance tumorale a été observée avec, dans certains cas, une éradication totale des tumeurs. Ces dernières années c'est l'utilisation des vecteurs lentiviraux qui a été privilégiée par rapport aux vecteurs rétroviraux. Les vecteurs lentiviraux transduisent les cellules pancréatiques avec une haute efficacité (>90%) (Wanisch *et al.* 2009) et ont largement été utilisés pour transférer des shRNAs dans les cellules tumorales pancréatiques. Une étude de 2008 présente les effets antitumoraux du transfert d'ARN interférents anti-VEGF dans les cellules tumorales pancréatiques via un vecteur lentiviral (Wang *et al.* 2008). Des shRNAs anti-survivine et anti-XIAP ont été transférés via un vecteur lentiviral dans la lignée tumorale pancréatique SW1990 et a montré une inhibition de la prolifération cellulaire *in vitro* comme *in vivo* (Jiang *et al.* 2011). Le vecteur lentiviral a également été utilisé pour véhiculer un gène rapporteur fluorescent DsRed-2 et visualiser les cellules tumorales *in vivo* dans des souris nude à l'aide de technique de bioimagerie (Yu *et al.* 2012).

**Adeno-Associated Virus (AAV)** Les AAVs sont de petits virus non-pathogènes qui dépendent de l'adénovirus ou du virus de l'herpès. En effet, pour se répliquer, ils ont besoin

de la machinerie virale de ces derniers. Il existe de nombreux sérotypes d'AAVs qui présentent un tropisme cellulaire différent. Les vecteurs AAVs peuvent transduire les cellules en division ou non et montrent une expression stable du transgène d'intérêt même s'ils ne sont pas intégratifs. Les sérotypes 1, 2 et 5 en co-infection avec un adénovirus sauvage transduisent de façon efficace les cellules tumorales pancréatiques *in vitro* (Teschendorf *et al.* 2010). Une étude réalisée en 2004 a montré que le transfert du gène d'endostatine via un AAV-2 inhibe la croissance tumorale et les métastases dans un modèle orthotopique de tumeur du pancréas chez l'Hamster (Noro *et al.* 2004). En 2007, le même sérotype est utilisé sans gène d'intérêt dans un modèle de tumeur pancréatique formé à partir de cellules tumorales pancréatiques DSL6A. La transduction de ce virus a induit une forte réponse immunitaire, induisant des niveaux systémiques augmentés de monocytes, macrophages, lymphocytes NK, CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et induisant un ralentissement de la progression tumorale *in vivo* de 7 fois par rapport à des tumeurs n'ayant reçu qu'un vecteur vide (Eisold *et al.* 2007).

## II.2. Méthodes physiques et vecteurs non-viraux.

Un ADN nu peut être directement injecté au site de la tumeur via des méthodes physiques. Les vecteurs non-viraux sont sans danger et facile à produire en grande quantité en laboratoire. Ils peuvent véhiculer des gènes d'intérêt de grande taille mais sont relativement inefficaces pour une transfection des cellules *in vivo* (Atkinson *et al.* 2010). Néanmoins, plusieurs études ont montré un effet anti-tumoral dans les cellules tumorales pancréatiques. Il existe plusieurs systèmes de vecteurs non-viraux dont les principaux seront développés.

### II.2.1. L'ADN nu.

L'ADN nu peut être directement injecté au site de la tumeur mais l'efficacité de transfection est assez faible. Il peut également être administré par voie systémique bien qu'il soit rapidement éliminé par les nucléases présentes dans le sérum (Miyata *et al.* 2008). Des méthodes physiques ont été utilisées pour augmenter l'efficacité d'introduction de l'ADN nu comme l'électroporation ou les ultrasons qui augmentent la perméabilité des cellules (Niidome *et al.* 2002). L'utilisation de l'électroporation a été testée pour la transfection intratumorale du système gène suicide de la purine nucléoside phosphorylase associée à la fludaravine et a montré une inhibition de la progression tumorale de 50 à 70% associée à une augmentation de la survie dans des xénogreffes de souris immuno-déficientes (Deharvengt *et*

al. 2007). La cholecystokinine porcine (CCK) promeut la progression tumorale pancréatique. Dans une étude de 2006, l'administration intramusculaire par électroporation du gène codant pour la CCK porcine a induit la production d'anticorps anti-CCK conduisant à une réduction tumorale, une réduction métastatique et une augmentation de la survie dans des modèles de tumeurs orthotopiques chez le hamster (Lu *et al.* 2006). Les études utilisant l'ADN nu sont tout de même peu nombreuses et les autres méthodes de transfection sont largement préférées.

### II.2.2. Les polymères cationiques.

Les polymères sont des molécules organiques qui possèdent une très grande densité de charges cationiques permettant de transporter l'ADN via des liaisons ioniques. Le polyéthylèneimine ou PEI est un polyplexe linéaire ou ramifié très fréquemment utilisé pour le transfert d'ADN dans les cellules eucaryotes puisqu'il est un agent très efficace de transfection. Une étude de 2001 a montré pour la première fois que l'injection intrapéritonéale de PEI transfectait de façon efficace les cellules tumorales pancréatiques. De plus, le polymère était transfecté préférentiellement dans les cellules tumorales plutôt que les cellules saines par un mécanisme qui n'a pas encore été élucidé (Aoki *et al.* 2001). Jusqu'alors les injections intratumorales avaient été préférées dans d'autres types tumoraux plutôt que l'injection intrapéritonéale. En 2011, une équipe chinoise a montré que le transfert de siRNA dirigé contre le VEGF par un complexe modifié de PEI avec du polyéthylène glycol et un peptide signal était efficace que ce soit *in vitro* comme *in vivo* dans des cellules tumorales du sein qui pourrait être efficace dans les cellules tumorales pancréatiques (Lu *et al.* 2011). Une thérapie avec un siRNA anti-VEGF a d'ailleurs été testée dans les cellules tumorales pancréatiques BxPC-3 à l'aide d'un hybride entre un polymère cationique et des nanoparticules et qui a montré une réduction d'environ 65% de l'expression du VEGF *in vitro* comme *in vivo* induisant une réduction tumorale de 30% *in vivo* (Pittella *et al.* 2012).

Deux études ont montré que le transfert du gène codant pour le récepteur à la somatostatine SST2 via des polyplexes PEI induisait un important effet anti-tumoral *in vitro* comme *in vivo* dans des modèles de tumeurs pancréatiques (Vernejoul *et al.* 2002) (Carrere *et al.* 2005). Un essai clinique de phase I est actuellement en cours en France chez des patients atteints de cancer pancréatique. Il consiste en l'injection du gène SST2 transporté par des polymères PEI en combinaison avec un traitement chimiothérapeutique à la gemcitabine (Source : NIH).

### *II.2.3. Les liposomes cationiques.*

Les liposomes sont des doubles couches lipidiques qui miment une membrane biologique. Les liposomes cationiques sont un mélange d'un lipide positivement chargé et d'un lipide neutre comme le DOPE (DiOleoylPhosphatidylEthanolamine) ou le cholestérol, qui sont utilisés comme lipide de soutien pour faciliter la libération de l'ADN par le liposome ou l'endosome (Hirsch-Lerner *et al.* 2005). Lorsqu'un liposome cationique est mis en présence d'un ADN il se forme un complexe liposome/ADN dû à l'interaction électrostatique entre les charges positives du liposome et les charges négatives de l'ADN que l'on appelle le lipoplexe. Le lipoplexe protège l'ADN de la dégradation par les nucléases (Bartreau *et al.* 2008). Le lipoplexe est ensuite endocyté et peut libérer l'ADN dans les cellules. Les liposomes ont été utilisés pour délivrer des siRNAs ou des gènes candidats dans les tumeurs pancréatiques. En 2007, un siRNA dirigé contre le récepteur HER-2 a été transfecté efficacement dans les cellules tumorales pancréatiques via un immunoliposome et a engendré une sensibilité accrue des cellules au traitement à la gemcitabine (Pirollo *et al.* 2007). Des liposomes ont été modifiés pour porter à leur surface des ligands spécifiques des cellules tumorales endothéliales par une équipe américaine en 2010. Ces liposomes modifiés ont ensuite véhiculé un plasmide contenant le gène de la thrombospondine 1, une protéine anti-angiogénique, dans des cellules de différents types tumoraux dont des cellules tumorales pancréatiques. Il a été observé une réduction tumorale *in vivo* de plus de 90% par rapport à un groupe de tumeurs n'ayant reçu qu'un liposome contrôle suggérant une efficacité extrêmement importante de ce système de vecteur (Shi *et al.* 2010).

### *II.2.5. Les vecteurs cellulaires.*

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules présentatrices d'antigène très efficace qui activent le système immunitaire contre, entre autres, les antigènes associés aux tumeurs. Pour le traitement du cancer du pancréas, des DCs ont été génétiquement modifiées pour produire l'interleukine 18 qui a montré une augmentation de la production d'IL-18 et d'IFN- $\gamma$  dans les tumeurs pancréatiques suggérant l'activation du système immunitaire (Tang *et al.* 2002). Les fibroblastes ont également été modifiés pour produire l'IL-12 et leur injection intrapéritonéale a entraîné l'activation de l'immunité innée chez la souris et de ce fait une inhibition de la croissance tumorale de xénogreffes réalisées à partir de cellules tumorales pancréatiques capan-1 (Péron *et al.* 2007).

Plus récemment quelques études ont utilisé des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) comme vecteur cellulaire pour la thérapie du cancer du pancréas. Ces dernières ont l'avantage d'être multipotentes et d'être recrutées dans l'environnement tumoral pour participer à la formation du stroma tumoral (Hall *et al.* 2007). De plus il a été montré que les MSCs pouvaient être transduites de façon très efficace à l'aide d'un lentivirus ce qui fait de ces cellules des vecteurs cellulaires avec un fort potentiel thérapeutique (Kallifatidis *et al.* 2008). Des MSCs transduites avec un adénovirus contenant le gène de l'interféron- $\beta$  ont été transférées par voie intrapéritonéale dans des souris SCID xénotreffées avec des cellules tumorales pancréatiques PANC-1. Ce traitement a montré une activation du système immunitaire inné entraînant une réduction tumorale *in vivo* (Kidd *et al.* 2010). En 2010, Mohr *et al.* ont utilisé des MSCs véhiculant le gène *TRAIL* en combinaison avec une transduction des cellules tumorales pancréatiques à l'aide d'adénovirus contenant un shRNA dirigé contre la protéine XIAP. Cette combinaison a entraîné une réduction des tumeurs primaires obtenues à partir de cellules PANC1 et la disparition presque totale des métastases (Mohr *et al.* 2010).

Les vecteurs cellulaires ont montré une réelle efficacité en tant que véhicule dans la thérapie génique du cancer pancréatique. Leur utilisation étant récente, les études sont peu nombreuses et devront être poursuivies en essais cliniques dans les années à venir.

### **III. Les virus oncolytiques.**

Durant les 10 dernières années, beaucoup de virus oncolytiques ont été étudiés en tant que traitement contre le cancer du pancréas et certains sont maintenant en essais cliniques. L'efficacité des virus oncolytiques tels que les adénovirus, les virus de l'herpès et les réovirus a été intensivement étudiée dans le cancer du pancréas alors que de nouveaux virus tels que les poxvirus ou les parvovirus sont aux premiers stades d'étude.

#### **III.1. Principe.**

La virothérapie oncolytique utilise des virus oncolytiques (VO) répliquatifs très actifs en tant qu'agents anti-cancéreux (Vaha-Koskela *et al.* 2007). Un VO idéal possède trois caractéristiques importantes. Le VO doit avoir un tropisme spécifique des cellules tumorales et non des cellules normales, soit par l'entrée du virus dans la cellule grâce à une surexpression de récepteurs spécifiques soit après l'infection par la dérégulation de l'environnement intracellulaire des cellules cancéreuses. De plus, le VO doit d'une part causer

la mort des cellules tumorales par son infection que l'on appelle l'oncolyse, et d'autre part prévenir la progression tumorale en induisant une réponse immunitaire anti-tumorale. Enfin, son action doit pouvoir s'étendre au sein du microenvironnement de la tumeur mais aussi au sein des métastases. Les VO seront ensuite éliminés grâce à une réponse immunitaire anti-virale (Figure 10).

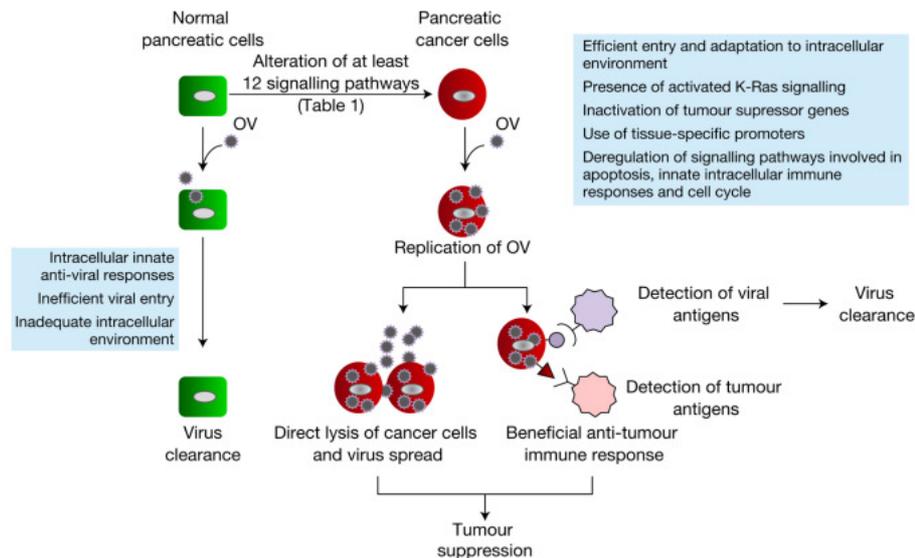


Figure 10 : Spécificités et actions des virus oncolytiques (Wennier et al. 2011).

Les VO peuvent être modifiés génétiquement pour les rendre plus efficaces, plus sécuritaires ou augmenter leur potentiel thérapeutique. Un VO idéal pour le cancer du pancréas doit être capable de se répliquer sélectivement dans l'environnement intracellulaire des cancers pancréatiques qui est généralement impliqué dans de nombreuses voies de signalisation aberrantes. Il doit idéalement pouvoir se répliquer quelque soit l'état de différenciation des cellules ou leur changement d'état tel que la transition épithélio-mésenchymateuse. Il doit pouvoir également s'étendre dans un environnement hypoxique et très dense comme celui des tumeurs pancréatiques. Enfin, il doit pouvoir être utilisé en combinaison avec les drogues généralement utilisées comme traitement du cancer du pancréas telle que la gemcitabine.

Il existe un large panel de virus oncolytiques utilisés dans le cancer du pancréas tels que les adénovirus ou encore les virus de l'herpès qui sont généralement spécifiques des cellules cancéreuses pancréatiques grâce à une cible dérégulée d'une voie de signalisation comme KRas ou encore des gènes suppresseurs de tumeur qui ont perdu leur fonction comme TP53 ou SMAD4. D'autres VO ont la particularité d'être spécifique des cellules tumorales

pancréatiques par l'expression d'un promoteur spécifique du tissu ou grâce à des techniques de ciblage via des récepteurs de surface. Les VOs dits de seconde ou de troisième génération ont été modifiés pour véhiculer un transgène avec un effet thérapeutique ou cytotoxique que l'on appelle des « virus oncolytiques armés ».

### III.2. Utilisations pour la thérapie du cancer du pancréas.

Plusieurs types de virus oncolytiques armés ou non ont été testés pour un éventuel traitement du cancer du pancréas, les principaux seront développés dans ce paragraphe.

*Adénovirus oncolytiques à réplication sélective* Pour une application anticancéreuse les adénovirus peuvent être modifiés en adénovirus oncolytiques à réplication sélective ou encore CRAds (Conditional Replicative Adenovirus) qui se répliquent dans les cellules cancéreuses et non dans les cellules normales.

L'ONYX-015 a été le premier CRAd utilisé en essai clinique pour le traitement du cancer pancréatique. Ce virus a été génétiquement modifié pour se répliquer dans les cellules qui ont une voie de signalisation p53 aberrante, l'une des altérations les plus fréquentes dans les cancers pancréatiques. En effet, la protéine codée par le gène *E1B* de l'adénovirus a pour rôle d'inhiber la protéine p53 cellulaire afin que le virus puisse se répliquer (*Figure 11*). Un adénovirus portant une mutation dans ce gène *E1B* ne peut donc se répliquer que dans les cellules ne possédant pas de p53 active, ce qui est le cas dans la majorité des cellules tumorales pancréatiques. De la même façon, un adénovirus portant une mutation du gène *E1A* ne peut se répliquer que dans les cellules déficientes en protéine pRb puisque le rôle de la protéine E1A est l'inhibition de la protéine pRb nécessaire à la progression du cycle de réplication de l'adénovirus (*Figure 11*).

Les essais cliniques utilisant l'ONYX-015 n'ont pas été concluants en association avec la gemcitabine et de ce fait d'autres virus oncolytiques ont été générés par la suite (Hecht *et al.* 2003). Très rapidement des études se sont multipliées sur la génération de CRAds armés plutôt que des adénovirus oncolytiques seuls.

C'est le cas de l'ONYX-411 que l'on a armé avec un siRNA dirigé spécifiquement contre le mutant *KRAS* (v12). Dans les cellules normales, l'initiateur de la progression dans le cycle cellulaire E2F est inhibé par la protéine pRb, alors que dans les cellules déficientes en protéine pRb, le niveau d'expression d'E2F est élevé ce qui active la réplication cellulaire.

L'ONYX-411 prend avantage de ce processus pour placer la transcription des gènes

viraux *E1A* et *E4* sous le contrôle du promoteur humain *E2F*. Ces deux gènes sont requis pour la réplication virale. L'injection de ce virus armé a montré une forte activité anti-tumorale dans des xénogreffes sous-cutanées formées à partir de cellules tumorales pancréatiques ainsi qu'au sein de métastases hépatiques (Zhang *et al.* 2006).

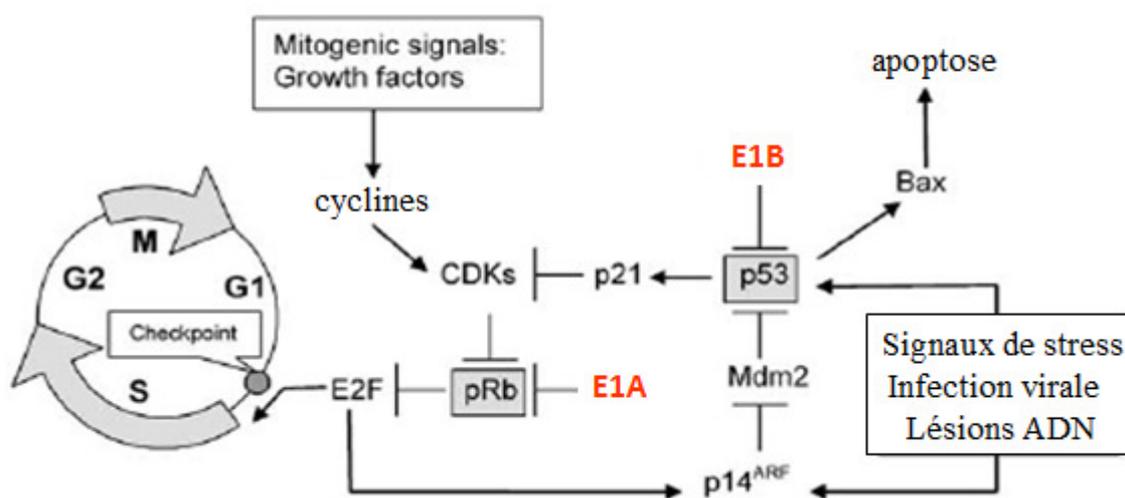


Figure 11 : Rôle des protéines *E1A* et *E1B* de l'adénovirus.

Un CRAAd utilisé en association avec l'expression d'un promoteur spécifique de la tumeur pancréatique a été testé dans une étude datant de 2012. Les auteurs ont utilisé le promoteur de l'antigène carcino-embryonnaire (CEA), un antigène qui est surexprimé dans les cellules tumorales pancréatiques et non dans les cellules normales. Le gène codant pour la protéine HSP70, protéine induisant une forte réponse immunitaire anti-tumorale, a été mis sous le contrôle de ce promoteur et a été testé sur des cellules tumorales pancréatiques *in vitro* et dans des xénogreffes de souris et de rats *in vivo* et a montré une réduction tumorale d'environ 50% (Xu *et al.* 2012).

**Les virus oncolytiques de l'herpès** Les herpes simplex virus HSV-1 et HSV-2 ont été génétiquement modifiés pour induire une réplication lytique sélective dans les cellules tumorales et non dans les cellules normales.

Une étude de 1999 a montré les effets d'un traitement avec ce type de virus oncolytique armé avec le gène de la thymidine kinase dans des souris nude infectées par des cellules tumorales pancréatiques. La survie des souris ayant reçu le virus suivi de l'injection de GCV était significativement plus importante dans 70% des cas, et dans 40% des cas pour le groupe de souris ayant reçu le virus seul (Kasuya *et al.* 1999).

Un virus HSV-1 a été modifié pour ne se répliquer que dans les cellules possédant un niveau élevé de ribonucléotide réductase, une enzyme surexprimée dans les cellules tumorales pancréatiques. Ce virus NV1023 a été utilisé sur 3 lignées tumorales pancréatiques différentes en combinaison avec une radiothérapie. Il a été montré une synergie entre les deux traitements avec une augmentation significative du nombre de cellules apoptotiques. Cette étude a été réalisée *in vitro* et en normoxie, pour confirmer un effet synergique potentiellement applicable dans la thérapie du cancer du pancréas, d'autres études *in vivo* et en hypoxie devront être réalisées (Dai *et al.* 2010).

Un HSV-2 a été modifié pour ne se répliquer que dans les cellules ayant une voie de signalisation Ras suractivée, ce qui est généralement le cas dans les cancers du pancréas qui présentent très fréquemment des mutations du gène *KRAS*. Les différentes façons d'injecter ce virus FusOn-H2 ont été testées dans plusieurs groupes de souris nude ayant reçu des injections de cellules tumorales pancréatiques par voie sous-cutanée ou orthotopique. L'effet anti-tumoral le plus important a été obtenu par voie intra-péritonéale où l'éradication totale des tumeurs orthotopiques a été observée dans 75% des animaux, de plus le traitement préviendrait la formation de métastases (Fu *et al.* 2006).

Ces études montrent un réel potentiel pour le traitement du cancer pancréatique par virothérapie sachant que de nombreuses combinaisons thérapeutiques sont encore à tester.

**Les parvovirus oncolytiques** Les parvovirus (PVs) sont de petits virus non-enveloppés à ADN simple brin. Les parvovirus oncolytiques les plus utilisés sont le H-1 PV qui est un parvovirus de rat et son homologue murin le MVM (*Minute Virus of Mice*). Ils sont très intéressants pour la thérapie du cancer du fait de leur capacité naturelle à ne se répliquer que dans les cellules cancéreuses. Cette propriété n'est pas complètement élucidée mais il a été suggéré que les PVs se répliqueraient dans un environnement avec des voies de signalisation Ras et SMAD4 dérégulées ou encore une voie de signalisation aberrante des IFNs (Wennier *et al.* 2011). Ce sont donc de bons candidats pour la thérapie du cancer du pancréas puisque ces voies y sont très souvent altérées.

Le virus oncolytique H-1 PV a été utilisé dans une étude datant de 2009 *in vitro* sur des cellules tumorales pancréatiques ainsi qu'*in vivo* dans des modèles de xénogreffes sous-cutanées et orthotopiques dans des souris nude ou dans des rats Lewis immunocompétents. Le traitement a permis de stopper la progression tumorale et d'augmenter la survie que ce soit des souris ou des rats immunocompétents, suggérant que le système immunitaire ne serait pas une barrière dans un traitement éventuel chez l'humain. Bien au contraire, cette étude a

également montré que le traitement avec le virus H-1 PV suivi d'un traitement à la gemcitabine augmenterait significativement l'effet anti-tumoral obtenu mais seulement dans les animaux immunocompétents suggérant que la réponse immunitaire est essentielle pour cet effet additif (Angelova *et al.* 2009).

Les PVs peuvent également être armés et véhiculer des gènes à effet cytotoxique ou induisant une réponse immunitaire. Les gènes de l'interleukine 2 (IL-2) et du MCP3 (*Monocyte Chemoattractant Protein 3*), une protéine qui interagit avec de nombreuses protéines du système immunitaire inné, ont été utilisés pour armer des H-1 PVs. Ils ont été étudiés dans des cellules tumorales pancréatiques *in vitro* et dans des modèles de xénogreffes sous-cutanées dans des souris nude (*Nu/Nu*). Il a été montré un fort effet anti-tumoral via le recrutement et l'activation de cellules du système immunitaire telles que les cellules NK (*Natural Killer*) ou les leucocytes (Dempe *et al.* 2012).

## **IV. Le ciblage cellulaire du cancer du pancréas.**

La spécificité et l'efficacité de transduction des cellules cibles constituent l'enjeu majeur pour le développement d'une thérapie génique du cancer du pancréas efficace et sécuritaire pour les patients. Beaucoup d'études ont été conduites pour transformer les vecteurs utilisés en thérapie génique classique en vecteurs ciblant spécifiquement les cellules tumorales pancréatiques. Plusieurs approches ont été testées dont les deux principales sont le ciblage des cellules cancéreuses lors de l'entrée du virus ou lors de l'expression spécifique dans les cellules cancéreuses du transgène véhiculé, appelé le ciblage transcriptionnel.

### **IV.1. Ciblage lors de l'entrée du virus dans la cellule.**

La stratégie de ciblage lors de l'entrée du virus repose sur la modification de son tropisme pour produire une infection spécifique des cellules tumorales pancréatiques. Le virus utilisé le plus fréquemment pour ce type de modification est l'adénovirus. Très peu d'autres virus ont été utilisés.

La première étape d'infection de l'adénovirus repose sur la fixation du récepteur CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor*) à la cellule qui conduit à un changement de conformation permettant d'exposer un motif RGD (Arginine Glycine Acide Aspartique). Ce motif va ensuite interagir avec de nombreuses intégrines cellulaires et initier l'entrée du virus dans la cellule par endocytose. Cette protéine CAR est très peu exprimée dans les cellules

tumorales pancréatiques ce qui a encouragé des études permettant de trouver des récepteurs exprimés de façon plus importante dans les cellules tumorales pancréatiques afin de modifier les vecteurs adénoviraux pour qu'ils ciblent ces nouveaux récepteurs (Kim *et al.* 2002).

En 2001 une équipe américaine a modifié l'adénovirus pour qu'il exprime directement le motif RGD à sa surface rendant l'entrée du virus indépendante du récepteur CAR. Cette modification a significativement augmenté le transfert de gène *in vitro* par rapport à un adénovirus sauvage. Cette même équipe a également construit un adénovirus exprimant l'EGF à sa surface, son récepteur EGFR étant surexprimé à la surface des cellules tumorales pancréatiques. Une fois de plus le transfert de gène et donc l'infection des cellules par cet adénovirus a été significativement plus importante qu'avec un adénovirus sauvage (Wesseling *et al.* 2001).

Sur le même principe, une équipe a fait exprimer un peptide YSA (Tyrosine Sérine Alanine) à la surface d'un adénovirus. Ce peptide interagit avec le récepteur de l'éphrine A2, surexprimé à la surface des cellules tumorales pancréatiques et confère donc un autre tropisme CAR-indépendant aux virus. Il a été montré que cette modification augmentait significativement l'efficacité de transduction des adénovirus *in vitro* et *ex vivo* sur des coupes provenant de résection de tumeurs pancréatiques humaines (Van Geer *et al.* 2010).

Le problème majeur de ces adénovirus modifiés est leur tropisme hépatique. En effet les adénovirus infectent le foie d'une façon CAR-indépendante et les adénovirus ciblés pourront toujours infecter les cellules hépatiques. Pour un adénovirus de ciblage efficace et sécuritaire, il faudra également modifier le tropisme hépatique du virus pour qu'ils ne ciblent que les cellules tumorales pancréatiques. Une étude a montré que ce tropisme hépatique impliquait une région hypervariable particulière de l'adénovirus appelée HVR5 et les auteurs ont montré que sa substitution limitait l'infection des cellules hépatiques (Vigant *et al.* 2008).

Le ciblage du cancer du pancréas a également été testé avec des rétrovirus, le REXIN-G étant le plus connu. Le REXIN-G est un vecteur rétroviral ciblé non répliquatif qui code pour un dominant négatif de la cycline humaine G1, protéine essentielle de contrôle du cycle cellulaire. L'infection des cellules tumorales entraîne un blocage du cycle et donc la mort cellulaire. A la surface du REXIN-G est exprimé un peptide dérivé du facteur de Von Willebrand qui a la propriété de guider le virus dans des tissus où le collagène est exposé, ce qui est le cas dans les lésions cancéreuses. Un essai clinique de phase I réalisé en 2009 a montré que l'utilisation du REXIN-G chez des patients atteints de cancer pancréatique métastatique résistant à la gemcitabine améliorait la médiane de survie des patients tout en

étant bien toléré par l'organisme. La FDA a autorisé aux USA l'administration de ce traitement en seconde intention (Chawla *et al.* 2010).

#### IV.2. Le ciblage transcriptionnel.

Le ciblage transcriptionnel repose sur l'utilisation de promoteur tumeur-spécifique (PTS) pour exprimer le transgène d'intérêt uniquement dans les cellules cancéreuses.

Un des PTS les plus utilisés pour un ciblage transcriptionnel est le promoteur de la télomérase *hTERT* (*human TElomerase Reverse Transcriptase*) absent dans la majorité des tissus normaux et surexprimée dans environ 80% des cellules tumorales telles que celles du cancer pancréatique (Shay and Bacchetti 1997 ; Suehara *et al.* 1997). En 2004 et 2005, une équipe américaine a utilisé un CRAd véhiculant le gène *TRAIL* sous le contrôle du promoteur de *hTERT* et exprimant le peptide RGD à sa surface pour un ciblage de l'entrée du virus. Cette combinaison a montré une forte inhibition de la croissance tumorale pancréatique *in vivo* avec un effet synergique en association avec un traitement à la gemcitabine. De plus, il a été montré qu'une injection systémique était possible sans toxicité hépatique et avec une bonne efficacité de transduction (Jacob *et al.* 2004 ; Jacob *et al.* 2005). Une combinaison entre des CRAds inductibles armés avec les gènes *BAX* ou *TRAIL* sous contrôle du promoteur *hTERT* a également été testée sur les cellules tumorales pancréatiques et *in vivo* dans des xénogreffes sous-cutanées et orthotopiques de souris nude. Un important effet anti-tumoral a été obtenu en association avec un traitement à la gemcitabine résultant en l'éradication totale des tumeurs dans 40% des animaux (Wack *et al.* 2008).

Les promoteurs du facteur midkine MK (*heparin-binding growth/differentiation factor midkine*) et de la cyclooxygénase-2 (*COX-2*) ont été testés dans le ciblage transcriptionnel du cancer du pancréas. Ces deux promoteurs sont surexprimés dans plusieurs types de cancers humains tels que le cancer pancréatique et offre donc un potentiel thérapeutique non négligeable (Wesseling *et al.* 2001). La transduction de cellules tumorales pancréatiques avec des CRAds armés du gène de la thymidine kinase sous le contrôle de l'un ou l'autre de ces promoteurs a montré une spécificité et une efficacité importante avec une réduction de l'hépatotoxicité par rapport à l'utilisation du promoteur du cytomégalovirus (CMV). De plus il a été montré un effet anti-tumoral *in vitro* après l'injection de GCV dans les cellules tumorales ayant reçu les CRAds sous promoteur de *COX-2* (Wesseling *et al.* 2001).

D'autres promoteurs comme ceux de la survivine ou encore du récepteur de la CCK de type A ont également été testés et ont tous deux montré une spécificité d'expression dans les cellules tumorales pancréatiques (Li *et al.* 2006 ; Yang *et al.* 2004).

Le ciblage thérapeutique montre un réel potentiel dans la thérapie du cancer du pancréas mais ces techniques ne sont utilisées que depuis une dizaine d'années et toutes les combinaisons thérapeutiques sont loin d'avoir été étudiées. Les études *in vivo* sont très peu nombreuses et le chemin est encore long pour lancer des essais cliniques et prendre du recul sur l'amélioration des traitements thérapeutiques grâce à ces techniques.

## **3ème PARTIE**

### **Le FGFR3**

# I. Généralités.

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) constituent une large famille de 58 récepteurs. Ils sont généralement activés par des ligands qui se fixent sur leur domaine extracellulaire entraînant la dimérisation du récepteur et l'activation de leur domaine à activité tyrosine kinase intracellulaire.

Beaucoup de caractéristiques sont partagées entre les différents RTKs, des motifs similaires de domaines extracellulaires, des homologies dans leur domaine à activité tyrosine kinase ou encore l'activation des mêmes cibles ou voies de signalisation. Cependant, les réponses cellulaires induites par l'activation des RTKs peuvent être très différentes et sont impliquées dans d'importants processus cellulaires comme la migration, la prolifération, la survie ou encore la différenciation cellulaires. La spécificité de cette réponse dépend du type cellulaire, de son état de différenciation ainsi que de son environnement (L'hôte *et al.* 2005).

Selon leur organisation structurale, les récepteurs RTKs se regroupent en plusieurs sous-familles. Vingt sous-familles de RTKs ont été décrites jusqu'à présent (*Figure 12*).

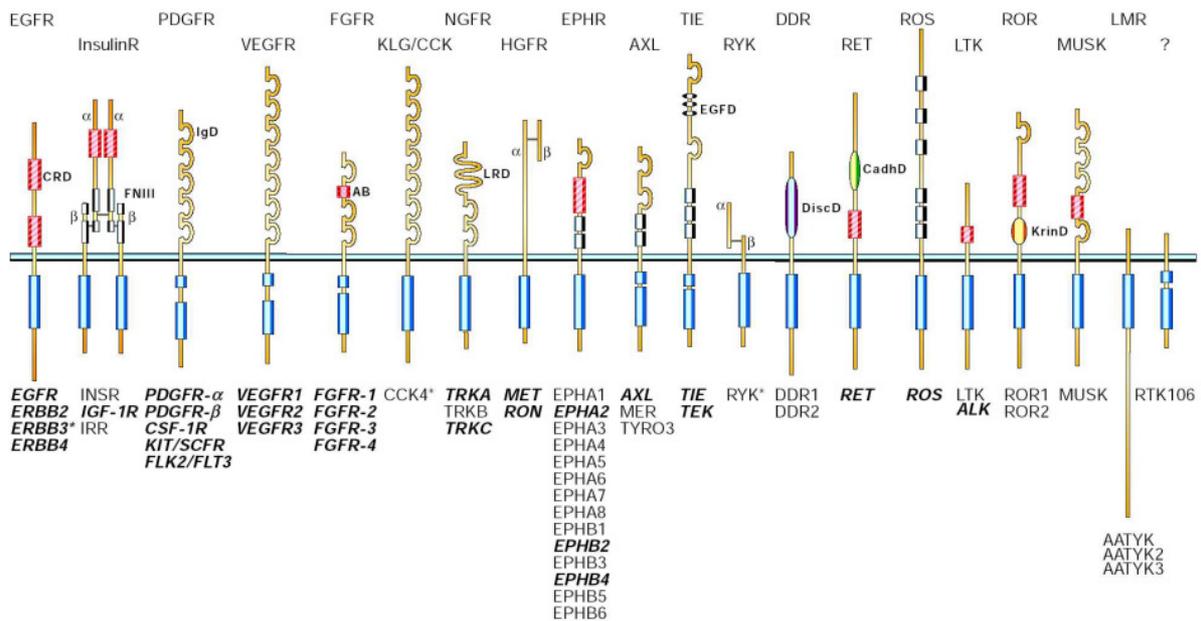


Figure 12 : Les différentes familles de récepteurs à activité tyrosine kinase (Blume-Jensen and Hunter 2001).

La famille des FGFRs est représentée par 5 récepteurs, FGFR1 à 5. Chaque récepteur comprend également plusieurs variants d'épissage rendant les voies de signalisation de cette

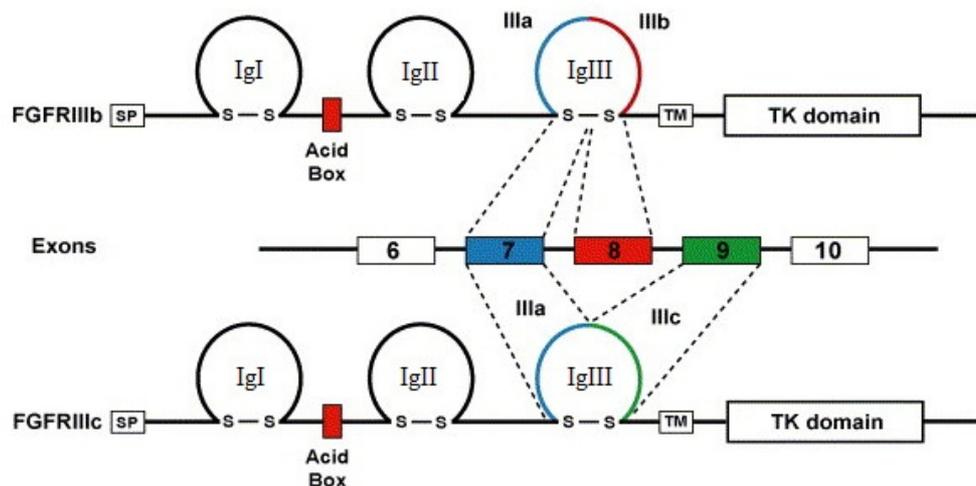
famille très complexes. Il existe 22 FGFs (*Fibroblasts Growth Factors*) humains différents dont 18 sont des ligands des FGFRs (Turner and Grose 2010).

Les voies de signalisation des FGF/FGFRs étant impliquées dans de multiples processus cellulaires, ces RTKs doivent être strictement régulés. Malgré tout, le signal cellulaire qu'ils transduisent est subverti dans de nombreux cancers en raison de mutations activatrices dans la majorité des cas (Wesche *et al.* 2011).

### I.1. Isoformes protéiques et spécificités des FGFRs.

Les récepteurs FGFRs sont des protéines essentiellement transmembranaires composées d'un domaine extracellulaire qui lie les ligands FGFs, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase qui transduit le signal à l'intérieur de la cellule.

La région N-terminale extracellulaire est composée de trois domaines immunoglobuline-like (Ig). Les domaines Ig-II et Ig-III constituent le domaine de fixation des ligands FGFs. Chez les récepteurs FGFR1 à 3, l'épissage alternatif de la partie C-terminale du domaine Ig-III entraîne la génération d'isoformes protéiques qui ont une spécificité de fixation aux FGFs différentes. La première moitié du domaine Ig-III est appelé IIIa et la seconde moitié soit IIIb soit IIIc en fonction de l'isoforme protéique (*Figure 13*).



*Figure 13 : Composition des isoformes protéiques IIIb et IIIc des FGFR1 à 3 (Eswarakumar et al. 2005).*

La région N-terminale comprend également une région riche en acides aspartiques et glutamiques aussi appelée boîte acide ou acid box située entre les domaines Ig-I et Ig-II. La

boîte acide semble cruciale pour la fonction du récepteur puisqu'il a été montré que sa délétion engendre une complète inhibition de la fixation du ligand sur son récepteur (Chaudhuri *et al.* 1993). D'autre part, le domaine Ig-I et la boîte acide sont, ensemble, à l'origine de l'activité d'auto-inhibition du récepteur (Olsen *et al.* 2004).

La région intracellulaire, séparée de la partie extracellulaire par un domaine transmembranaire, comprend un domaine catalytique composé de deux sous-domaines tyrosine kinase TK1 et TK2, interrompus par une courte séquence interkinase de 14 acides aminés. Cette région cytoplasmique comprend au moins 7 tyrosines qui sont des sites d'autophosphorylation (Mohammadi *et al.* 1996).

L'isoforme IIIb est la forme principalement épithéliale tandis que l'isoforme IIIc est principalement mésenchymateuse, elles fixent chacune des ligands spécifiques excepté le FGF1 qui se lie avec une forte affinité à tous les récepteurs FGFRs, il est de ce fait considéré comme ligand universel (Ornitz *et al.* 1996). Les ligands sont produits soit dans le tissu épithélial soit dans le tissu mésenchymateux et activent généralement le récepteur spécifique du tissu en vis-à-vis. En effet, il a été montré par exemple que les FGF7 et 10, produits dans le tissu mésenchymateux, se fixent exclusivement sur l'isoforme FGFR2-IIIb épithéliale et inversement que le FGF2 produit dans le tissu épithélial a une très forte affinité pour le FGFR2-IIIc mésenchymateux (Yeh *et al.* 2003).

Avec 18 ligands FGFs et 7 isoformes de FGFRs différents, il existe 126 complexes FGF/FGFR possibles et seulement un très faible nombre a été étudié.

## I.2. Activation des récepteurs FGFRs.

Les FGFRs sont présents à la surface cellulaire sous forme d'une seule chaîne polypeptidique et monomérique. La fixation du ligand FGF induit la dimérisation et, par la suite, l'activation du récepteur (Schlessinger *et al.* 1992). Les FGFs sont des ligands monomériques qui doivent eux-mêmes être préalablement dimérisés pour se lier aux récepteurs. Leur dimérisation est facilitée par leur interaction avec des glycoprotéines spécifiques: l'héparine ou les héparanes sulfate (Yayon *et al.* 1991, Spivak-Kroizman *et al.* 1994). Les héparanes sulfate sont un des constituants de la matrice extracellulaire, sous la forme de protéoglycanes (HSPG), et jouent un rôle majeur dans la localisation des FGFs au niveau de la matrice extracellulaire (Klagsbrun *et al.* 1991). La liaison spécifique du ligand se fait au niveau de la seconde et de la troisième boucle Ig ainsi qu'au niveau de la région intercalaire (Pellegrini *et al.* 2000, Johnson and Williams 1993).

Il existe deux étapes clés dans l'activation des récepteurs FGFRs : la mise en place de l'activité catalytique intrinsèque et la création de sites de fixation dans le domaine intracellulaire pour recruter les protéines en aval et conduire le signal cellulaire. La dimérisation du récepteur permet l'autophosphorylation des résidus tyrosines situés dans les domaines TK1 et TK2 intracellulaires. L'autophosphorylation des tyrosines peut être *cis*, dans ce cas la phosphorylation est effectuée par le récepteur lui-même ou *trans* auquel cas la phosphorylation s'effectue entre les récepteurs. Une fois que les tyrosines intracellulaires sont phosphorylées, elles fonctionnent comme des sites d'arrimage de protéines adaptatrices qui peuvent elle-même être phosphorylées par le récepteur FGFR (Mohammadi *et al.* 2005).

L'activité kinase est différente pour chaque FGFRs et, de ce fait, le niveau d'activation des voies de transduction en aval varie d'un FGFR à l'autre (Wang *et al.* 1994). FGFR4, par exemple, induit peu de réponses mitogéniques contrairement aux autres FGFRs. La différence entre les potentiels mitogéniques des FGFRs vient de leur domaine catalytique. En effet, une construction chimérique formée du domaine extracellulaire de FGFR4 fusionné au domaine kinase de FGFR1 est capable, comme le FGFR1, d'induire la prolifération des cellules hématopoïétiques en absence de cytokine ce qui n'est pas le cas avec un récepteur FGFR4 sauvage (Wang *et al.* 1994).

### I.3. Signalisation cellulaire des FGFRs.

#### I.3.1. Voies de signalisation cellulaire.

Quatre voies de signalisation clés sont activées par les FGFRs, la voie Ras/RAF/MAPKs, la voie PI3-K/AKT, la voie des JAK/STATs (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) et de la PLC $\gamma$  (phospholipase C $\gamma$ ) (*Figure 14*).

Suite à la phosphorylation des tyrosines intracellulaires, FRS2 $\alpha$  (*FGFR substrate 2 $\alpha$* ) qui est un adaptateur spécifique des FGFRs se fixe à la région juxtamembranaire des FGFRs grâce à son domaine liant les phosphotyrosines (PTB). Plusieurs sites de FRS2 $\alpha$  sont alors phosphorylés par le FGFR activé permettant le recrutement des protéines adaptatrices GRB2 (*Growth factor Receptor-bound 2*) et SOS (*Son Of Sevenless*) pour activer Ras puis RAF et enfin les MAPKs (*Mitogen-Activated Protein kinases*). Cette voie est impliquée dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaires, ainsi que de l'angiogenèse (Eswarakumar *et al.* 2005).

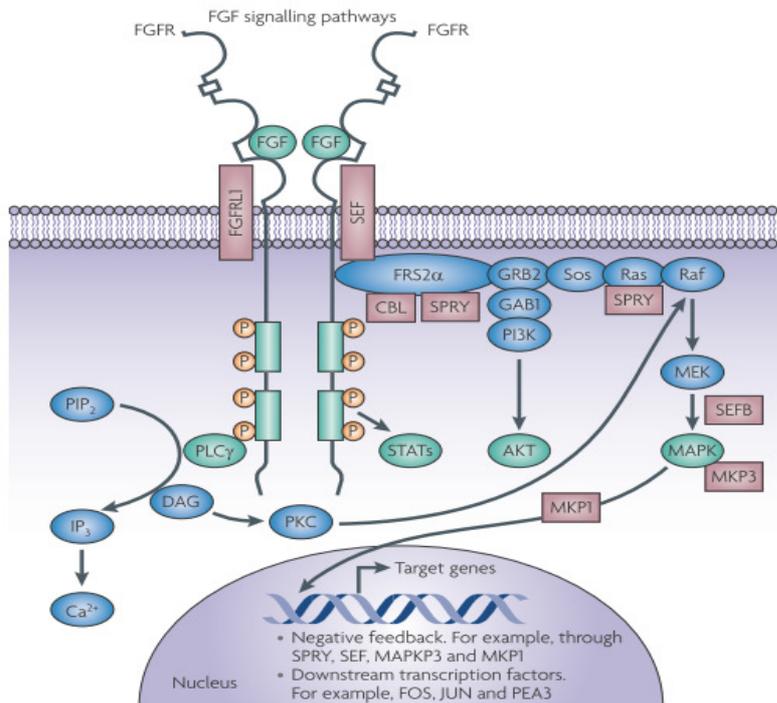


Figure 14 : Voies de signalisation activées par les FGFs et leurs régulations (Turner and Grose 2010).

La protéine GAB1 (*GRB2-Associated Binding protein 1*) peut également se fixer sur GRB2 pour recruter un complexe incluant la PI3-K et activer une voie anti-apoptotique AKT-dépendante (Altomare *et al.* 2005).

D'autre part, la PLCγ via son domaine SH2 (*Src Homology 2*) peut se fixer directement à un résidu phosphotyrosine de la partie C-terminale du récepteur FGFR. Une fois la PLCγ activée, elle hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>) et en diacylglycerol (DAG) ce qui active la protéine kinase C (PKC). Cette kinase vient renforcer l'activation de la voie des MAPKs en phosphorylant RAF et régule donc les mêmes processus cellulaires que la voie de signalisation MAPK principale (Mohammadi *et al.* 1991).

La voie des STATs est activée par les FGFRs dans plusieurs études mais le mécanisme d'action, direct ou indirect, n'est pas encore connu. Dans une étude sur la dysplasie thanatophorique de type II, le FGFR3 muté et activé constitutivement semble directement phosphoryler STAT1. En ce qui concerne le FGFR3 sauvage, il semble que l'activation de la voie des STATs soit indépendante de l'activité kinase du FGFR3 puisqu'on retrouve une activation de cette voie avec un mutant « *kinase dead* » du FGFR3. Le FGFR3

transmembranaire recruterait donc vraisemblablement STAT1 à la membrane pour qu'il puisse être activé par les kinases JAKs, premier effecteur de la voie des JAK/STATs (Krejci *et al.* 2008). Cette voie entraîne également l'activation de processus pro-prolifératifs. Cependant il a été montré que la voie des STATs et plus particulièrement la protéine STAT1 était activée lors de la régulation négative de la prolifération des chondrocytes qui est un des principaux rôles du FGFR3 (Sahni *et al.* 1999).

D'autres voies de signalisation sont activées par les FGFRs suivant le contexte cellulaire comprenant les voies des MAPKs p38 et JNK ainsi que la voie de la protéine kinase ribosomale S6 (Kang *et al.* 2009).

### *I.3.2. Régulation des voies de signalisation.*

#### **I.3.2.1. Régulation activatrice.**

Les voies de signalisation des FGFRs peuvent être régulées dès la fixation du ligand sur son récepteur ou via des protéines activatrices ou inhibitrices. Les ligands FGFs sont retenus dans la matrice extracellulaire via les HSPGs. Les HSPGs peuvent être clivés par protéolyse du core ou par clivage endoglycosidique via l'héparinase. Les ligands FGFs sont alors relâchés et peuvent diffuser jusqu'au récepteur. En d'autres termes, les HSPGs jouent un rôle dans la signalisation cellulaire des FGFRs en régulant la stabilité, le mouvement et la rétention des ligands FGFs à la surface cellulaire (Bishop *et al.* 2007). Dans un article paru en 2006 le rôle des HSPGs dans l'exportation transmembranaire des FGFs et plus particulièrement du FGF2 vers la surface cellulaire est mis en évidence (Zehe *et al.* 2006). Une étude récente a également montré la régulation du relâchement des FGFs via les HSPGs chez la souris (Shimokawa *et al.* 2011).

Le relâchement des ligands FGFs contenus dans la matrice extracellulaire est également commandé par la protéine de transport FGF-BP (*FGF-Binding Protein*). L'expression de cette protéine est également très contrôlée via plusieurs mécanismes tels que la fixation de protéines activatrices ou inhibitrices sur le promoteur de FGF-BP. De forts niveaux d'expression de cette protéine ont été retrouvés dans des cancers invasifs avec des niveaux élevés de microvaisseaux suggérant qu'elle a également un rôle pro-angiogénique (Abuharbeid *et al.* 2006).

Le rôle activateur de la protéine FLRT3 (*Fibronectin leucin rich transmembrane protein 3*) a été identifié pour la première fois chez le *xenopus laevis*. C'est une protéine qui

régule l'activation de la voie de signalisation des FGFRs entraînant l'activation de la voie des MAPKinases en aval. Elle a été retrouvée co-immunoprécipitée avec le FGFR3, et elle agirait directement sur le récepteur ou permettrait le recrutement d'autres protéines qui activeraient ensuite la voie des MAPKs via la signalisation des FGFRs (Böttcher *et al.* 2004). Une autre étude chez les mammifères a mis en évidence le même rôle activateur des protéines de la même famille FLRT1 et FLRT2 (Haines *et al.* 2006).

### **I.3.2.2. Inhibition des voies de signalisation.**

Les mécanismes d'inhibition et de rétrocontrôle négatif des voies de signalisation des FGFRs ne sont qu'en partie connus.

Une fois activé, les récepteurs FGFRs sont internalisés et dégradés ou recyclés selon un processus qui est partiellement contrôlé par l'ubiquitinylation médiée par la protéine Cbl (*Caenorhabditis elegans*) considérée comme une protéine à activité ubiquitine-ligase (Thien *et al.* 2001).

Les quatre FGFRs à activité tyrosine kinase sont différemment ubiquitinylés ce qui dicte l'efficacité de leur dégradation ou leur transport à la membrane via des endosomes de recyclage. En effet, le FGFR1 est très fortement ubiquitinylé et il est rapidement transporté vers des lysosomes pour y être dégradé. Contrairement au FGFR1, le FGFR4 est faiblement ubiquitinylé, il est alors préférentiellement recyclé à la surface cellulaire ce qui résulte en une activation prolongée de la voie de signalisation via le FGFR4 par rapport au FGFR1. Les FGFR2 et 3 présentent une ubiquitinylation intermédiaire similaire (Haugsten *et al.* 2005).

Les MAPKs ERK1 et ERK2 peuvent phosphoryler plusieurs résidus sérine et thréonine de la protéine FRS2 $\alpha$  ce qui empêche le recrutement de GRB2 entraînant un rétro-contrôle négatif des voies de signalisation PI3-K/AKT et MAPKs (Gotoh *et al.* 2008).

La voie signalisation des MAP-Kinases peut également être inhibée par l'induction de MAPK phosphatases comme la MAPK phosphatase 3 (MKP3), les membres de la famille SEF ou encore les protéines Sprouty (SPRY) qui modulent le signal du récepteur à différents endroits de la cascade de transduction. MKP3 déphosphoryle ERK1 et ERK2 (Zhao *et al.* 2001), les protéines SPRY, quant à elles, fonctionnent comme des compétiteurs négatifs en se liant à GRB2 et empêchant le recrutement de SOS ou bien en se liant directement à RAF et empêchant dans les deux cas de poursuivre la cascade d'activation de Ras/RAF/MAPKs (Casci *et al.* 1999).

De la même façon, SEF fonctionne à plusieurs niveaux et a une conformation transmembranaire qui interagit directement avec les récepteurs FGFRs. Il semble que cette forme transmembranaire et la forme cytoplasmique soient toutes deux capables d'inhiber la phosphorylation des ERKs (Tsang *et al.* 2004).

Enfin, la voie de signalisation en aval du FGFR3 peut également être régulée grâce à un mécanisme d'autoinhibition du récepteur impliquant son domaine IgI. En effet, il interagirait avec le fragment IgII-IgIII pour empêcher la fixation des ligands et des molécules d'héparan sulfates, inhibant de ce fait la voie de signalisation en aval (Olsen *et al.* 2004).

#### I.4. Les FGFRs dans les cancers.

Toutes les isoformes des FGFRs sont impliquées dans la régulation de processus cellulaires clés et malgré les mécanismes de régulation mis en place, on les retrouve impliquées dans de nombreuses maladies et en particulier le cancer.

##### *I.4.1. Le FGFR1.*

Trois maladies génétiques peuvent être attribuées à une mutation du gène *FGFR1* entraînant une activation constitutive du récepteur : le syndrome de Kallman, la dysplasie ostéoglyphonique et le syndrome de Pfeiffer (Dode *et al.* 2003, Muenke *et al.* 1994).

Une signalisation aberrante du FGFR1 est également retrouvée dans plusieurs tumeurs malignes. En effet, on retrouve des mutations de *FGFR1* entraînant un gain de fonction dans le glioblastome et également dans les cellules tumorales prostatiques (Rand *et al.* 2005, Giri *et al.* 1999).

Dans le syndrome myéloprolifératif, des translocations en 8p11 entraînent la production de protéines de fusion causant une dimérisation constitutionnelle du domaine kinase du FGFR1 (Cross *et al.* 2008).

Dans le cancer du pancréas, les deux isoformes du récepteur ont été étudiées. L'expression du FGFR1-IIIc dans des cellules pancréatiques canalaire entraîne une transformation cellulaire et la formation de tumeurs *in vivo* exhibant des caractéristiques morphologiques similaires à l'adénocarcinome pancréatique (Kornmann *et al.* 2002). Une autre étude a montré que l'inhibition de cette isoforme, en utilisant une approche de dominant-négatif, résulte en la réversion du phénotype malin des cellules tumorales pancréatiques (Wagner *et al.* 1998).

Plus récemment et de façon surprenante, il a été montré que l'isoforme FGFR1-IIIb inhibait la prolifération des cellules tumorales pancréatiques *in vitro* comme *in vivo* dans des modèles de xénogreffes sous-cutanées (Liu *et al.* 2007).

Ces données suggèrent une réelle dualité avec d'une part un rôle oncogénique et d'autre part un rôle de gène suppresseur de tumeur du FGFR1. Ces rôles opposés pourraient être en partie liés à l'isoforme du récepteur comme le suggère les études du FGFR1 dans le cancer pancréatique.

#### *1.4.2. Le FGFR2.*

Des mutations du domaine kinase du FGFR2 ont été identifiées chez des patients atteints de différents syndromes de craniosynostoses tels que le syndrome de Crouzon ou de Pfeiffer (Kan *et al.* 2002). Ces mutations entraînent l'activation constitutive du récepteur en empêchant une molécule auto-inhibitrice d'accéder au domaine kinase du récepteur (Chen *et al.* 2007). Beaucoup de ces mutations entraînant des déformations squelettiques sont également fréquemment retrouvées dans les cancers de l'endomètre (Pollock *et al.* 2007).

Les mutations du domaine extracellulaire du FGFR2 entraînent une dimérisation covalente du récepteur de façon ligand-indépendante ce qui active constitutivement le récepteur. On retrouve ce type d'altération dans le syndrome de Crouzon (Neilson *et al.* 1995). Il existe également des mutations du domaine extracellulaire qui entraînent un gain de fonction de façon ligand-dépendante. C'est le cas dans le syndrome de Pfeiffer ou celui d'Apert dans lesquels ces mutations permettent à l'isoforme FGFR2-IIIc de fixer les ligands spécifiques de l'isoforme FGFR2-IIIb contribuant à une signalisation cellulaire aberrante (Ibrahimi *et al.* 2004). Ces mutations causent également des maladies touchant la matière blanche du cerveau telles que l'agénésie callosale ou la ventriculomégalie (Raybaud *et al.* 2007).

Il a également été mis en évidence une association entre des SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) du FGFR2-IIIc et des mutations du gène *BRCA2* responsable de cancer du sein (Antoniou *et al.* 2008).

L'isoforme FGFR2-IIIb via l'interaction du ligand FGF10 induisait la migration et l'invasion des cellules tumorales pancréatiques sans pour autant activer la prolifération cellulaire suggérant un rôle oncogénique du récepteur (Nomura *et al.* 2008).

Comme le FGFR1, de nombreuses études ont mis en évidence un rôle suppresseur de tumeur du récepteur. Une équipe a par exemple montré que l'isoforme FGFR2-IIIb avait des

propriétés anti-tumorales dans le cancer de la vessie (Ricol *et al.* 1999). La perte d'expression du FGFR2-IIIb a également été observée dans les cancers de la vessie, de la prostate ou encore dans les adénocarcinomes salivaires (Turner and Grose 2010).

Ces études suggèrent que le FGFR2 a, comme le FGFR1, un rôle oncogénique et un rôle suppresseur de tumeur dépendant du contexte cellulaire.

#### *1.4.3. Le FGFR4.*

Le FGFR4 est le seul des FGFRs à activité tyrosine kinase à n'avoir qu'un variant d'épissage qui s'apparente au variant FGFR-IIIc des autres FGFRs.

Le FGFR4 est un potentiel marqueur pronostic dans de nombreux cancers. En effet, le SNP G388R du FGFR4 est associé à l'augmentation de l'agressivité ainsi qu'à l'augmentation du potentiel métastatique des cancers du sein, de la prostate, du poumon, de la peau, du foie, du côlon et des carcinomes à cellules squameuses de la tête et du cou (Bange *et al.* 2002, Spinola *et al.* 2005 et Spinola *et al.* 2005 bis, Streit *et al.* 2004, Yang *et al.* 2011). Cet allèle est relativement fréquent. On en retrouve au moins une copie dans près de la moitié de la population. Le mécanisme moléculaire par lequel ce SNP augmente la progression tumorale et les métastases n'est pas complètement élucidé mais il semblerait qu'il agisse via la même signalisation que le récepteur sauvage mais de façon plus soutenue en raison d'une déficience dans le processus de dégradation lysosomale des récepteurs activés (Wang *et al.* 2008). Il a également été montré que ce SNP augmentait la motilité et l'invasion cellulaires dans le cancer de la prostate (Wang *et al.* 2004).

Dans le cancer du sein on retrouve de forts taux d'expression du FGFR4 lorsque les cellules cancéreuses sont résistantes au traitement au tamoxifène (Meijer *et al.* 2008).

Une surexpression du récepteur FGFR4 a été mise en évidence dans les panINs de haut grade et dans les adénocarcinomes pancréatiques mais il a été montré *in vitro* que le FGFR4 pouvait être suppresseur de tumeur puisqu'il inhibait la migration et l'invasion cellulaires (Motoda *et al.* 2011).

Le rôle du FGFR4 dans le cancer du foie est controversé. Une équipe a publié d'une part une étude sur l'effet anti-tumoral du FGFR4 dans la carcinogénèse hépatique alors qu'une autre a montré que le FGFR4 activait la prolifération des cellules tumorales hépatiques et inhibait l'apoptose cellulaire concourant à la progression tumorale hépatique (Huang *et al.* 2009 ; Ho *et al.* 2009).

Comme les autres FGFRs, il semblerait que le FGFR4 soit, dans un contexte particulier, pro-tumoral et dans d'autres cas anti-tumoral.

#### *1.4.4. Le FGFR5 ou FGFR5L1.*

Le locus génique du *FGFR5* se trouve très proche du *FGFR3* en 4p16.3. Ce nouveau récepteur FGFR a été découvert en 2001 dans une étude montrant que ce récepteur possède la même structure extracellulaire que les FGFRs classiques avec une région de liaison aux ligands (Sleeman *et al.* 2001). Deux variants sont également décrits mais aucun domaine à tyrosine kinase n'a été retrouvé. Ces deux variants ne possèdent respectivement pas le domaine IgI pour l'un et le domaine IgI et la boîte acide pour le second, ils ne ressemblent donc en rien aux isoformes IIIb et IIIc des autres FGFRs.

Une étude de 2010 a montré que le FGFR5, chez le Xénope, pouvait se fixer aux héparanes sulfate ainsi qu'aux FGFs à plus ou moins forte affinité (Steinberg *et al.* 2010).

Le récepteur ne possédant pas de domaine kinase, son action se résume à celui d'un récepteur leurre qui lie les FGFs et les séquestre, empêchant l'induction d'un signal par liaison avec les récepteurs classiques. Ce genre de régulation est déjà décrit chez les récepteurs aux interleukines (Mantovani *et al.* 2001). Le FGFR5 forme principalement des homodimères, une analyse FRET n'ayant montré aucun hétérodimère avec les autres FGFRs. Il n'aurait donc pas de rôle de dominant négatif (Rieckmann *et al.* 2008).

Bien que l'on ne sache pas exactement comment il fonctionne, plusieurs rôles du FGFR5 ont été mis en évidence, d'une part il inhibe la croissance cellulaire et active la différenciation cellulaire, d'autre part il induit l'adhésion et la fusion cellulaire.

Son effet inhibiteur sur la croissance cellulaire a été démontré dans deux études différentes. Ces études ont été menées sur deux types cellulaires différents, les cellules d'ostéosarcome et les cellules rénales embryonnaires humaines HEK-293 dans lesquelles un effet pro-apoptotique a également été observé (Trueb *et al.* 2003, Steinberg *et al.* 2010).

Le FGFR5 induit l'adhésion cellulaire dans plusieurs types de cellules mammifères par l'intermédiaire de son domaine extracellulaire. Cette propriété est médiée par les HSPGs puisque l'ajout d'héparine ou encore une mutation du domaine de fixation aux HSPGs abolissent ce rôle du FGFR5 (Rieckmann *et al.* 2008).

Il a également été montré que la surexpression du FGFR5 induisait la formation de syncytia dans de nombreux types cellulaires tels que les HEK-293 ou encore les cellules cancéreuses du col de l'utérus HeLa, alors que ce processus cellulaire est strictement contrôlé

et limité à un petit nombre de cellules telles que les gamètes, les macrophages ou encore les myoblastes (Steinberg *et al.* 2010).

De plus, il a un rôle important dans le développement du rein puisqu'il a été montré chez des souris délétère du gène *FGFR5* une agénésie des deux reins mais également une craniosténose et l'absence de muscle diaphragmatique (Rieckmann *et al.* 2009, Baertschi *et al.* 2007).

L'expression du *FGFR5* a été explorée dans un panel de 241 tumeurs humaines et l'étude a mis en évidence une expression aberrante dans les tumeurs ovariennes (Schild *et al.* 2005).

Récemment il a été montré que le domaine intracellulaire de *FGFR5* interagissait avec le domaine C-terminal SPR (*Sprouty-related cysteine-rich domain*) de certains membres de la famille *Sprouty* que sont *Spred1*, *Spred2* et *Sprouty1*, protéines qui inhibent la voie de signalisation des MAPKs (Zhuang *et al.* 2011). Cette découverte ouvre peut-être une porte à la compréhension du mécanisme inhibiteur du récepteur *FGFR5* sur la prolifération cellulaire.

## II. Le *FGFR3*.

### II.1. Le gène et la protéine *FGFR3*.

Dans les années 90, la perte d'hétérozygotie du chromosome 4 a été identifiée dans plusieurs cancers comme le cancer de la vessie, du côlon, du foie, de la peau, de l'estomac ou encore du sein. Un certain nombre d'études a mis en évidence que la région 4p16.3 était probablement un locus contenant un/des gène(s) suppresseur(s) de tumeur. C'est une région riche en gènes qui a été précisément cartographiée assez tôt en raison de la proximité du gène responsable de la maladie de Huntington (Sibley *et al.* 2001).

Le gène *FGFR3* est situé dans ce locus et s'étend sur approximativement 16,5 kb. Il contient 19 exons. Il code pour trois transcrits différents générés par épissage alternatif:

- Le transcrit variant 1 qui ne possède pas d'exon 8 et qui code pour l'isoforme protéique *FGFR3-IIIc*, c'est le transcrit dominant.
- Le transcrit variant 2 qui ne possède ni les exons 8, 9 et 10 et qui code pour l'isoforme protéique *FGFR3-IIIa* soluble ou isoforme 2.
- Le transcrit variant 3 qui ne possède pas l'exon 9 et qui code pour l'isoforme protéique *FGFR3-IIIb*.

La spécificité des FGFs pour les différentes isoformes du FGFR3 a été explorée dans plusieurs études. Le FGFR3-IIIc est la forme capable de fixer le plus grand nombre de ligands FGFs spécifiques. Outre le FGF1, le FGF9 est également capable de se lier aux deux isoformes du récepteur mais avec une affinité moindre pour le récepteur IIIb. Les FGFs 7, 10 et 22 ne se fixent à aucun des récepteurs FGFR3. (Ornitz *et al.* 1996 ; Zhang *et al.* 2006) (Figure 15).

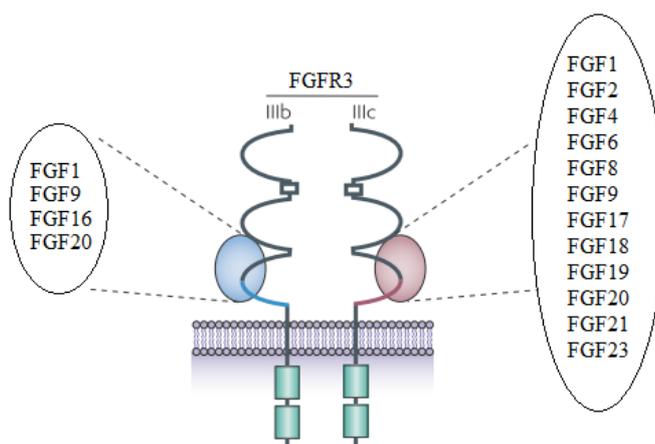


Figure 15 : Spécificité de fixation des FGFs aux isoformes FGFR3.

## II.2. Fonctions biologiques du FGFR3.

Le rôle physiologique le plus connu du FGFR3 est l'inhibition de la croissance des chondrocytes, cellules impliquées dans la formation des os. Des études ont mis en évidence une balance entre le rôle inhibiteur de la croissance des os et le rôle d'inducteur de la différenciation cellulaire du FGFR3 (Deng *et al.* 1996, Colvin *et al.* 1996).

Il a été montré plus tard que l'activité inhibitrice du FGFR3 implique l'activation de la protéine STAT1 et conduit à l'activation transcriptionnelle de p21, protéine régulatrice du cycle cellulaire (Sahni *et al.* 1999). Il a également été montré que cette activité inhibitrice de la croissance des chondrocytes était un rôle spécifique de l'isoforme IIIc du FGFR3 et non de l'isoforme IIIb (Eswarakumar *et al.* 2007).

Les fonctions biologiques du FGFR3 ont été le plus souvent découvertes grâce à la génération de souris dépourvues du gène *FGFR3*. Ces souris *fgfr3<sup>-/-</sup>* présentaient une dysplasie des os avec une longue colonne vertébrale et une hypercroissance des os longs, associées à une hyperprolifération des chondrocytes durant l'embryogenèse. Les mutations activatrices du récepteur sont, quant à elles, associées à des nanismes chez l'homme confirmant le rôle de régulateur négatif de la croissance des os (Colvin *et al.* 1996).

Les souris *fgfr3<sup>-/-</sup>* présentaient également des problèmes de surdité. Une étude a montré que le FGFR3 jouait un rôle dans le développement de l'oreille interne et notamment de la cochlée (Puligilla *et al.* 2007).

Des études ont montré que le FGFR3 régule négativement la croissance des cellules souches et des progéniteurs intestinaux et contrôle la morphogenèse des cryptes intestinales, en particulier la position des cellules de paneth (Arnaud-Dabernat *et al.* 2008 ; Vidrich *et al.* 2009).

En 2006, il a été montré que le FGFR3 avait un rôle dans la différenciation lymphatique et la régulation de la prolifération cellulaire durant le développement du système lymphatique. Ce rôle est spécifique de l'isoforme IIIc du récepteur (Shin *et al.* 2006).

Le FGFR3, en coopération avec le FGFR4, induit la formation des alvéoles durant le développement pulmonaire post-natal puisque des souris *fgfr3<sup>-/-</sup>fgfr4<sup>-/-</sup>* présentent des poumons normaux à la naissance mais l'alvéogenèse semble être bloquée (Weinstein *et al.* 1998).

Très récemment, il a été montré que le FGFR3 est impliqué dans le contrôle de l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches spermatogoniales (Von Kopylow *et al.* 2012).

Enfin, le FGFR3 est également un régulateur négatif de la croissance des cellules épithéliales pancréatiques. Il contrôle l'équilibre entre la croissance des cellules progénitrices pancréatiques et leur différenciation en cellules endocrines. Cette activité pourrait découler de la fixation du ligand FGF9 sur le récepteur puisqu'il a été montré que leur expression était concomitante pendant le développement du pancréas. De plus, dans un modèle de régénération pancréatique, une réexpression parallèle du FGFR3 et du FGF9 a été observée, suggérant un possible rôle de régulateur de la croissance des précurseurs cellulaires des îlots de Langerhans pour ce couple récepteur/ligand (Arnaud-Dabernat *et al.* 2007).

Toutes ces données réunies montrent que le FGFR3 a le plus souvent un rôle inhibiteur et qu'il est surtout impliqué dans l'organogenèse et le développement.

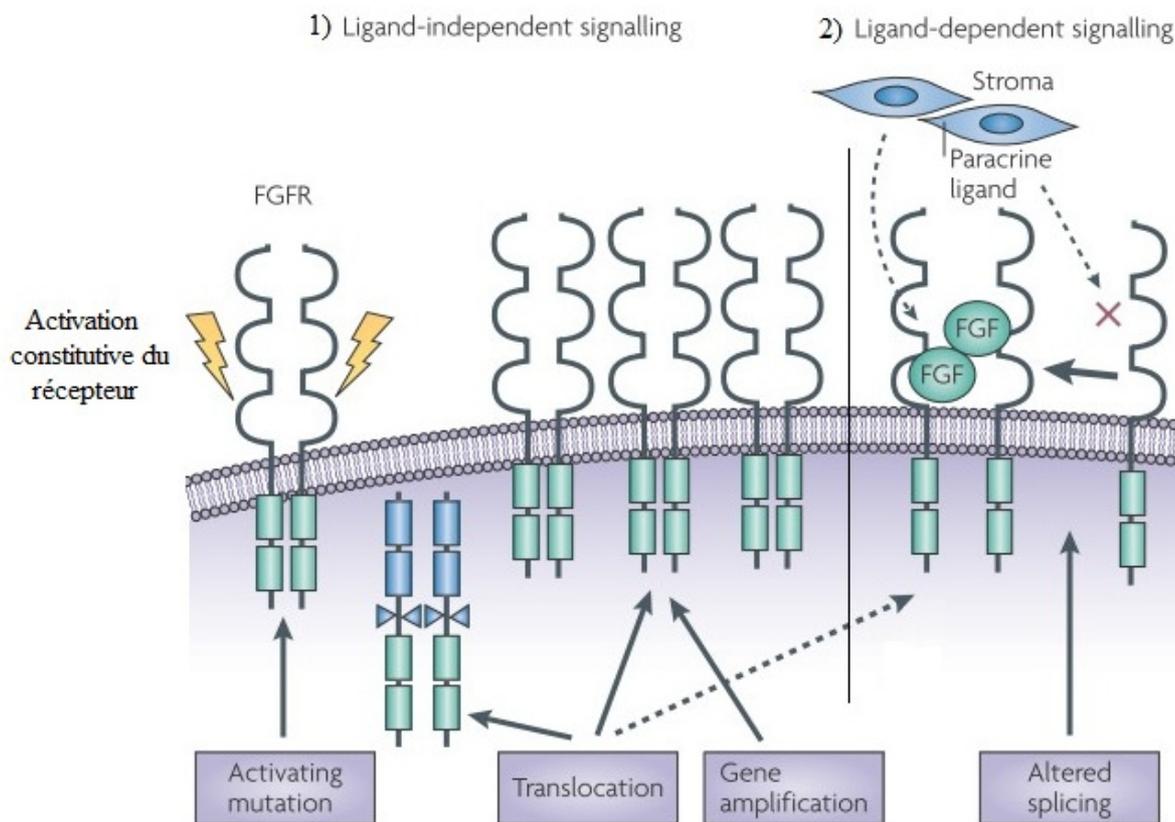
### II.3. Implications pathologiques du FGFR3.

L'implication du FGFR3 dans des conditions pathologiques découle le plus souvent d'une activation constitutive et anormale du récepteur. Les pathologies engendrées par cette activation sont en rapport étroit avec ses fonctions biologiques et entraînent généralement des

chondrodysplasies. Néanmoins, on retrouve des activations aberrantes des voies de signalisation activées par les récepteurs FGFRs dans de nombreux cancers qui découlent d'aberrations génétiques selon différents mécanismes incluant les mutations activatrices, les translocations, les amplifications géniques ou encore un épissage alternatif aberrant (*Figure 16*).

Ces aberrations génétiques peuvent être classées en deux principales catégories, celles qui entraînent une voie de signalisation FGF aberrante de façon ligand-indépendante et celles qui sont ligand-dépendantes.

Les aberrations génétiques les plus souvent retrouvées pour le FGFR3 sont les mutations activatrices qui sont responsables d'un grand nombre de maladies osseuses mais qui sont également retrouvées dans plusieurs cancers comme les cancers de la vessie, du col de l'utérus ou encore de la prostate (Turner and Grose 2010).



*Figure 16 : Mécanismes conduisant à une voie de signalisation FGF aberrante (Turner and Grose, 2010).*

Il existe deux classes de mutations activatrices, les mutations activant le récepteur de façon constitutive et donc de manière ligand-indépendante et les mutations activatrices qui

nécessitent toujours la présence de ligand. Les mécanismes conduisant à l'activation constitutive du FGFR3 peuvent provenir de trois évènements moléculaires différents. Les premiers impliquent la dimérisation constitutive du récepteur soit par la perte/gain d'un résidu cystéine ou via la déstabilisation d'un domaine Ig soit par la formation d'une liaison hydrogène intramembranaire causée par la substitution d'un résidu neutre en un résidu chargé (Mohammadi *et al.* 2005).

Les mutations transmembranaires du FGFR3 telle que Gly380Arg induisent des interactions non-covalentes entre les hélices transmembranaires des récepteurs et provoquent des achondroplasies qui est la forme génétique la plus commune de nanisme (Webster *et al.* 1997) (Figure 17).

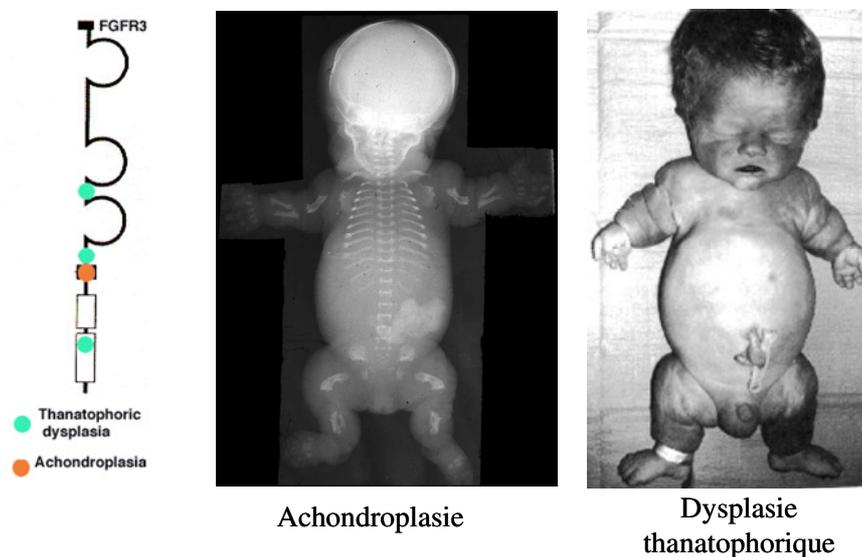


Figure 17 : Mutations activatrices du FGFR3 conduisant à des nanismes.

Les mutations du domaine kinase du FGFR3 augmentent l'activité catalytique indépendamment de la dimérisation du récepteur en empêchant une molécule auto-inhibitrice d'accéder au domaine kinase du récepteur. Les mutations germinales impliquant les trois codons Ile538, Asn540 et Lys650 du domaine kinase du FGFR3 conduisent respectivement à trois nanismes de sévérité différente, l'hypochondroplasie, la dysplasie thanatophorique de type II et le syndrome de l'achondroplasie sévère avec retard mental et achantosis nigricans (SADDAN) (Passos-Bueno *et al.* 1999, Tavormina *et al.* 1999). Les mutations du domaine kinase entraînant la perte de fonction du récepteur sont également retrouvées dans le syndrome lacrymo-auriculo-dento-digital (LADD) (Rohmann *et al.* 2006).

En ce qui concerne les cancers, les mutations activatrices du gène *FGFR3* ont été découvertes pour la première fois en 1999 dans les cancers de la vessie (30%) et du col de l'utérus (25%) (Cappellen *et al.* 1999). En 2006, il a été montré que ces mutations survenaient préférentiellement dans des cancers de la vessie non-invasifs et pourraient servir de marqueur de bon pronostic (Hernandez *et al.* 2006). Ces mutations activatrices ont également été retrouvées dans des tumeurs bénignes de la peau, les kératoses séborrhéiques (39%) et les naevi (33%) qui n'évoluent jamais en tumeurs malignes (Hernandez *et al.* 2007).

D'autres altérations conduisant à une voie de signalisation aberrante du FGFR3 ligand-indépendante ont été découvertes comme la translocation intergénique t(4;14) qui survient dans 15% des myélomes multiples et qui place le gène *FGFR3* sous le contrôle d'un promoteur fort conduisant à la surexpression de la protéine FGFR3 (Chesi *et al.* 1997). Le gène *MMSET* (*Multiple Myeloma SET domain*) est également transloqué dans les myélomes multiples et il a été montré qu'il contribuait au potentiel tumorigène des cellules tumorales (Lauring *et al.* 2008). Cette translocation pouvait entraîner une voie de signalisation du FGFR3 aberrante de façon ligand-dépendante via FGF4 (Otsuki *et al.* 1999).

La translocation intragénique t(4 ;12) a été identifiée dans le lymphome T périphérique qui résulte en la production d'une protéine de fusion comprenant les domaines TK du FGFR3 et le domaine HLH (Helix-Loop-Helix) du facteur de transcription ETV6 (*ETS Variant gene 6*). Cela conduit à la dimérisation et à l'activation constitutive du récepteur FGFR3 (Yagasaki *et al.* 2001).

Une amplification génique du *FGFR3* a été retrouvée dans le cancer de la vessie et également dans des carcinomes adénoïdes kystiques des glandes salivaires (28% des tumeurs) entraînant une voie de signalisation aberrante en aval du FGFR3 et de façon ligand-indépendante (Nord *et al.* 2010, Vékony *et al.* 2007).

Un autre mécanisme conduisant à une voie de signalisation FGFR3 aberrante a été mis en évidence, un épissage alternatif altéré. Quatre variants d'épissage aberrants du FGFR3 ont été découverts dans des lignées de cellules tumorales du côlon ainsi que dans des tumeurs humaines conduisant tous à une protéine tronquée. Dans cette étude de 2000, ces variants d'épissage étaient impliqués dans la transformation néoplasique dans les cancers colorectaux (Jang *et al.* 2000).

Des mutations ont également été découvertes dans le cancer du colon dont certaines sont des mutations inactivatrices dans 5% des cas. D'ailleurs une perte d'expression de la protéine FGFR3 a été trouvée dans les cellules tumorales et les tumeurs colorectales (Sonvilla

*et al.* 2010). De plus des épissages alternatifs aberrants inactivants ont fréquemment été retrouvés dans ces tumeurs colorectales (36%) sans détecter de transcrits sauvages du FGFR3 (Jang *et al.* 2000).

Le FGFR3 serait associé au phénotype tumoral des rhabdomyosarcomes. En effet les cellules tumorales FGFR3 positives sont plus tumorigènes que les cellules FGFR3 négatives dans ce cancer. De plus, la sous-population de cellules initiatrices de rhabdomysosarcomes (RICs) FGFR3-positives est capable de former des tumeurs *in vivo* chez des souris immunodéficientes (Hirotsu *et al.* 2009).

# **RESULTATS**

## **Article 1**

# ***In vivo* gene transfer targeting in pancreatic adenocarcinoma with cell surface antigens**

## I. Introduction.

Des essais cliniques de phase III ont testé l'efficacité de traitements adjuvants combinant entre autres la gemcitabine à l'Erlotinib, au cetuximab ou encore au bevacizumab. Bien qu'améliorant parfois significativement le confort de vie des patients, l'espérance de vie n'est améliorée que de façon très limitée. Une approche intéressante consiste à rendre les cellules tumorales plus sensibles à la chimiothérapie actuelle en modulant, par transfert de gène, l'expression de gènes dans les cellules tumorales de façon à induire leur apoptose. Une autre méthode consiste à générer des vecteurs de ciblage permettant de délivrer spécifiquement les traitements dans les cellules tumorales et donc potentialiser leur effet (Cf : Introduction 2<sup>ème</sup> partie).

Dans ce contexte, notre projet proposait d'évaluer l'intérêt de vecteurs lentiviraux modifiés pour cibler spécifiquement les cellules tumorales pancréatiques et véhiculant un transgène susceptible d'avoir un fort pouvoir toxique spécifiquement dans les cellules tumorales, le gène suicide de la thymidine kinase du virus de l'Herpès.

Ce volet de mon travail de thèse s'articulait autour de trois points :

- 1) Trouver des antigènes de surface spécifiques des cellules tumorales pancréatiques pour générer des vecteurs ciblés efficaces.
- 2) Injecter les vecteurs de ciblage *in vivo* dans des xénogreffes sous-cutanées et orthotopiques réalisées à partir de cellules tumorales pancréatiques.
- 3) Evaluer le potentiel de transfert du gène suicide de la hsv-TK *in vivo* via ces vecteurs ciblés.

La confirmation de la faisabilité de cette approche ciblée pourrait ouvrir de larges perspectives, tant sur le plan de la thérapie génique, que sur l'utilisation de protéines de surface testées comme voie d'entrée spécifique d'agents anticancéreux.

## II. Article 1.

### ***In vivo* gene transfer targeting in pancreatic adenocarcinoma with cell surface antigens**

Marie Lafitte<sup>1,2</sup>, Benoit Rousseau<sup>3</sup> PhD, Isabelle Moranvillier<sup>1,2</sup>, Miguel Taillepierre<sup>1,2</sup>, Evelyne Peuchant<sup>1,2</sup> PhD, Véronique Guyonnet-Dupérat<sup>2</sup> PhD, Aurélie Bedel<sup>1,2</sup> PharmD/PhD, Pierre Dubus<sup>2</sup> MD/PhD, Hubert de Verneuil<sup>1,2</sup> MD/PhD, François Moreau-Gaudry<sup>1,2</sup>□\* MD/PhD and Sandrine Dabernat<sup>1,2</sup>□ PhD

1 : INSERM U1035, Bordeaux, France

2 : Université Bordeaux Segalen, Bordeaux, France

3 : Animalerie A2, Université Victor Segalen, Bordeaux, France

4 : Vectorology platform, Université Bordeaux Segalen, Bordeaux, France

□ : These authors contributed equally to this work

Marie Lafitte: marie.lafitte@u-bordeaux2.fr

Benoit Rousseau: benoit.rousseau@u-bordeaux2.fr

Isabelle Moranvillier: moranvillierisabelle@yahoo.fr

Miguel Taillepierre : miguel.taillepierre@inserm.fr

Evelyne Peuchant : evelyne.peuchant@u-bordeaux2.fr

Véronique Guyonnet-Dupérat : veronique.guyonnet-duperat@inserm.fr

Pierre Dubus: pierre.dubus@u-bordeaux2.fr

Aurélie Bedel: aurelie.bedel@u-bordeaux2.fr

Hubert de Verneuil: hubert.de.verneuil@u-bordeaux2.fr

François Moreau-Gaudry: francois.moreau-gaudry@u-bordeaux2.fr

Sandrine Dabernat: sandrine.dabernat@u-bordeaux2.fr

\*Corresponding author:

Université Bordeaux Segalen

INSERM U1035

146, rue Léo Saignat

33076 Bordeaux Cedex

Email: [francois.moreau-gaudry@u-bordeaux2.fr](mailto:francois.moreau-gaudry@u-bordeaux2.fr)

Phone: +33(0) 5 57 57 13 78

Fax: +33(0) 5 57 57 13 74

## ABSTRACT

**Background:** Pancreatic ductal adenocarcinoma is a deadly malignancy resistant to current therapies. It is critical to test new strategies, including tumor-targeted delivery of therapeutic agents. This study tested the possibility to target the transfer of a suicide gene in tumor cells using an oncotropic lentiviral vector.

**Results:** Three cell surface markers were evaluated to target the transduction of cells by lentiviruses pseudotyped with a modified glycoprotein from Sindbis virus. Only Mucin-4 and the Claudin-18 proteins were found efficient for targeted lentivirus transductions *in vitro*. In subcutaneous xenografts of human pancreatic cancer cells models, Claudin-18 failed to achieve efficient gene transfer but Mucin-4 was found very potent. Human pancreatic tumor cells were modified to express a fluorescent protein detectable in live animals by bioimaging, to perform a direct non invasive and costless follow up of the tumor growth. Targeted gene transfer of a bicistronic transgene bearing a luciferase gene and the herpes simplex virus thymidine kinase gene into orthotopic grafts was carried out with Mucin-4 oncotropic lentiviruses. By contrast to the broad tropism VSV-G carrying lentivirus, this oncotropic lentivirus was found to transduce specifically tumor cells, sparing normal pancreatic cells *in vivo*. Transduced cells disappeared after ganciclovir treatment while the orthotopic tumor growth was slowed down.

**Conclusion:** This work considered for the first time three aspect of pancreatic adenocarcinoma targeted therapy. First, lentiviral transduction of human pancreatic tumor cells was possible when cells were grafted orthotopically. Second, we used a system targeting the tumor cells with cell surface antigens and sparing the normal cells. Finally, the TK/GCV anticancer system showed promising results *in vivo*. Importantly, the approach presented here appeared to be a safer, much more specific and an as efficient way to perform gene delivery in pancreatic tumors, in comparison with a broad tropism lentivirus. This study will be useful in future designing of targeted therapies for pancreatic cancer.

**Key words:** pancreatic adenocarcinoma, targeted therapy, surface marker

## BACKGROUND

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a highly malignant disease and is the fourth cause of death from cancer in the western world. Due to the lack of specific symptoms, the diagnosis is delayed and PDAC are commonly detected at advanced stages of the disease. Regardless of the treatment, the 5-year survival is less than 5% [1]. Surgical resection offers the best chances of survival at the time of the diagnosis, but is curative in only 13% of the cases and is possible for only 15% of the patients. Moreover, even resectable PDACs display a high rate of recurrence [1]. Systemic chemotherapy still relies on the pyrimidine analog gemcitabine because it has been the only drug producing symptoms improvement, raising the overall 1-year survival from 2% to around 18% of the patients. Extensive efforts have been made to identify adjuvant or neoadjuvant therapies capable of improving the poor prognosis of PDAC, based on the molecular targets involved in cancer progression. Unfortunately, phase III studies have shown limited or even no improvement in patient survival in combination with gemcitabine [1]. In fact, PDAC presents very complex genetic alterations profiles explaining the failure of single gene/pathway targeted adjuvant therapies. Indeed, the Pancreatic Cancer Genome project has analyzed 23,219 transcripts and identified an average of 63 somatic mutations per PDAC affecting 12 core signaling pathways and the overexpression of 500 different genes in 24 tumors [2].

Thus, it is now critical to test therapies targeting several pathways or therapies inducing specific tumor cell death [3]. In that aspect, cytoreductive therapy inducing direct cell death rather than corrective therapy aimed at repairing genetic defects involved in malignancy should be preferred for PDAC, because of the general resistance of tumor cells against therapeutic agents. In that regard, gene therapy remains an attractive option to transfer suicide genes [4-6]. Specific efficient expression of suicide genes in tumor cells is currently achieved by designing vectors containing tissue-specific promoters. Moreover, suicide genes are chosen to be able to induce bystander killing of cancer cells in the vicinity of gene-modified (transduced) cancer cells [5]. Disappointing results however, have been obtained in phase I/II trials with adenoviruses or retroviruses, but studies are still focusing on improving this treatment conditions [3]. Over the numerous means to perform *in vivo* gene delivery, increasing interest has been shown in lentiviral vectors because they can infect non-dividing cells and display high gene delivery efficiency. Previous studies have shown the feasibility of gene therapy in PDAC [7-9] with diverse efficiencies of gene transfer. Lentivectors are commonly packaged into viral envelopes exhibiting glycoproteins with a broad tropism, such

as Vesicular Stomatitis Virus-Glycoprotein (VSV-G). It is however important to restrain the infectious capacity of therapeutic vectors to the tumor cells only, limiting side effects on the neighboring normal cells. Cell-specific targeting has been developed using a modified envelope displaying the IgG binding-domain of protein A, which can bind the Fc domain of immunoglobulins. In consequence, virions can be associated with cell surface-directed antibodies to target the specific transduction of cancer cells [10-12]. This system has given good results with *in vivo* models to transduce prostate cancer bone metastasis [13], the therapeutic gene thymidine kinase in prostate cancer metastasis [14] and breast cancer cells [15].

To date, the possibility of specific gene transfer in PDAC tumor cells has not been evaluated, and this study was aimed to test the modified Sindbis virus glycoprotein to target PDAC cells *in vivo*. PDAC cell surface antigens have been selected according to published data. Recently, a list of biomarker candidates for PDAC has been obtained from a comprehensive literature survey [16]. Accordingly and as previously reported [17, 18], two markers appeared appropriate for the present study because of their localization at the cell surface and their specific overexpression in PDAC, namely the variant 2 of Claudin-18 (CLDN18) and the Mucin-4 protein (MUC4). The Prostate Stem Cell Antigen (PSCA) was also included because it was used by Pariente et al. to target prostate cancer cells with the same system [13] and has been proposed for immune therapy [19].

In this study, specific reporter gene transfer has been examined *in vitro* with antibodies directed against the cell surface markers described above. More importantly, *in vivo* targeting of pancreatic cancer cells has been tested in subcutaneous and orthotopic xenografts models and quantitatively compared to a broad tropism virus. Our models included the use of a grafted PDAC cell line modified to stably express the tdTomato reporter gene, which expression was directly monitored in live animals by fluorescence detection. Finally, the possibility of transferring the suicide gene thymidine kinase has been assessed in orthotopic xenografts, which growth was monitored by the detection of tdTomato.

## RESULTS

### Targeted transduction of pancreatic cell lines *in vitro*

To package the lentiviruses, we used a modified Sindbis virus glycoprotein. The E2 recognition ZZ domain of the Sindbis virus glycoprotein has been modified to contain the Fc-binding domain of the protein A [12]. The resulting mutant glycoprotein was called 2.2 [13, 14]. Thus, virions can be associated with cell surface-specific antibodies to target the transduction of tumor cells (Figure 1). They will be referred as oncotropic. Transductional targeting was performed using antibodies that recognize the PSCA (Prostate stem cell antigen), the MUC4 and the Claudin 18 variant 2 antigens (CLDN18), all chosen according to published data showing specific expression or overexpression of these proteins in pancreatic adenocarcinomas (see introduction section, Figure 1).

To test the capacity of pancreatic adenocarcinoma cell lines to be transduced, we performed lentiviral transductions with a VSV-G pseudotyped lentiviral vector carrying a transgene encoding the reporter gene green fluorescent protein (GFP). Multiplicities of infection ranging from 1 to 30 (MOI1 to MOI30, corresponding to 10ng of p24 to 300ng of p24 for  $5 \times 10^4$  cells, p24 being a viral capsid protein titrated as described in the methods section) were used and cells were analyzed by flow cytometry for GFP expression 4 days after the transductions. All the cell lines were transduced by the lentiviruses with various efficiencies (Figure 2A). The CAPAN1 cell line was, in our conditions, more resistant to transduction than the other cell lines tested, since the percentage of GFP-positive cells did not reach more than 40%, at the highest MOI used. Thus, we discarded this cell line for the subsequent experiments. PANC1 cells seemed moderately resistant to viral transduction.

The pancreatic cancer cell lines were then transduced with the oncotropic vectors (with 100ng of p24 for  $5 \times 10^4$  cells). They were also transduced with an oncotropic lentivirus associated to an anti-HLA antibody as a positive control or associated with isotype control antibodies (rabbit IgGs) as a negative control. Cell lines displayed efficient transduction with the positive control since at least 30% of the cells were transduced by the viruses associated with the anti-HLA antibody (30% for the PANC1 to 71% for the BXPC3, Figure 2B). Furthermore, the use of anti-PSCA antibody did not achieve transduction efficiencies above that of the negative control values in all the tested lines. Conversely, values with anti-MUC4 and anti-CLDN18 reached percentages of transduction at least 2 times above that of the negative control, the best results being for the anti-CLDN18 in the MIAPaCa2 cells and the anti-MUC4 in the CAPAN2 cells (5 times). We asked whether the differences in transduction efficiencies were

dependent on the levels of the target surface antigens. Western-blot analyses showed that the PANC1 cell line expressed the highest level of HLA proteins (Figure 2C), but was the least efficient in transduction (only 30%, Figure 2B) as already observed with VSV-G pseudotyped lentivectors (Figure 2A). On the other hand, the MIAPACA2 cells had a very good potential for transduction with the broad tropism virus (Figure 2A), but showed a weaker efficiency with the MUC4 oncotropic virus as compared with the BXPC3 and CAPAN2 cells. Western-blot analysis showed that the MIAPACA2 did express lower levels of MUC4. Therefore, the efficiency of transduction seems to depend on both the intrinsic ability of the cells to be transduced and the level of expression of the cell surface antigen targeting the oncotropic lentivirus.

Thus, the anti-CLDN18 and anti-MUC4 antibodies displayed sufficient transductions *in vitro* to be further evaluated in *in vivo* xenograft models with the CAPAN2 and the MIAPACA2 cells.

### **Targeted transduction of pancreatic cell lines *in vivo***

To assess the efficient transduction of the cells *in vivo*, the lentiviruses were designed to express the firefly luciferase, for which expression was detected in live animals by a bioimaging system. In order to test the oncotropic gene transfer in pancreatic tumor cells *in vivo*, CAPAN2 cells were xenografted subcutaneously in immune-compromised mice. Anti-MUC4 and anti-CLDN18 antibodies were conjugated to lentiviruses packaged into an envelope containing the modified 2.2 Sindbis virus glycoprotein and injected directly in the tumors. Control mice were injected with anti-HLA (positive control) or rabbit IgGs (negative control) conjugated viruses. Moreover, a group of tumor bearing mice was injected with broad tropism viruses packaged into the VSV-G-containing envelopes (positive control), since it was previously shown to cause efficient gene transfer in pancreatic adenocarcinoma [7-9]. Luciferase signals were evaluated according to the tumor mass, since all tumors were not equivalent within each group, and in all groups. As expected, two weeks after the virus injections, tumors injected with rabbit IgGs-conjugated viruses showed gene transfer less than 2% of VSV glycoprotein-containing viruses and the association with anti-HLA represented about 20% of the signal obtained for VSV-G-containing envelope (Figure 3A, B). Very interestingly, viruses conjugated with anti-MUC4 were as efficient as the broad tropism viruses (93% of the signal). Anti-CLDN18 was less efficient to target the CAPAN2 cells since only about 9% of the VSV-G signal was obtained (Figure 3). Gene transfer efficiency was further examined in resected tumors by detection of the luciferase protein by western-blot

(Figure 3C). We used a tumor extract derived from untransduced CAPAN2 cells as a negative control (CTNEG) and a positive control (CTPOS) obtained from a tumor derived from CAPAN2 cells transduced with a lentivirus bearing the bicistronic transgene Luciferase-IRES-ZsGreen. Before the grafts, cells were sorted and at least 80% expressed the reporter protein ZsGreen. Quantitatively, the levels of luciferase in the positive control were less than in the tumors transduced with the broad tropism virus (Figure 3C, CTPOS versus VSV-G). In the positive control however, the luciferase open reading frame (ORF) was behind the IRES, whereas in the “VSV-G” condition, the luciferase ORF is first, because different lentivectors were used. Thus, it was expected to obtain a lower expression level in the CTPOS. Comparatively, the efficiencies of transduction seemed very good with MUC4 oncotropic viruses, and a little less with the HLA and CLDN18 targeting lentiviruses. Overall, the western-blot confirmed the results obtained by direct luciferase activity detection in the tumors.

To further explore targeted gene transfer in PDAC, another cell line was tested. First, the MIAPACA2 cells were modified to stably express the fluorescent protein tdTomato for the direct follow up of tumor progression in live animals using the bioimaging system, and the quantification of tumor growth. In subcutaneous tumors (Figure 4), the anti-CLDN18 antibody failed to raise the signal above that of the isotype control. However, anti-MUC4 conjugated viruses were again almost as efficient as viruses packaged into the VSV-G-containing envelope (about 75% of the “VSV-G” signal). This result was confirmed by using two different anti-MUC4 antibodies.

Thus, in subcutaneous tumors, intra-tumoral injection of lentiviruses associated with the tumor cell surface antigen MUC4 seemed efficient enough to test the transfer of a suicide gene.

### **Targeted transduction of the herpes simplex virus thymidine kinase gene is toxic in pancreatic cell lines *in vitro* and *in vivo*, in the presence of ganciclovir.**

Since we produced MIAPACA2 cells stably expressing the tdTomato fluorescent protein, we first checked that these cells were sensitive to ganciclovir when expressing the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene. Cells were transduced with viruses packaged into broad tropism envelopes (from VSV-G), expressing either the GFP protein (CT) or a bicistronic gene encoding the firefly luciferase and the Herpes Simplex virus thymidine kinase (LUC-IRES-TK). Cells were treated with increasing concentrations of ganciclovir and cell viability

was examined 10 days after the treatment (Figure 5A). Expectedly, cells expressing the thymidine kinase died in the presence of ganciclovir in a dose-dependent manner.

TdTomato-MIAPACA2 cells were grafted in the pancreas of recipient mice. Tumor growth was monitored by fluorescence detection for 21 days (Figure 5B). MUC4-oncotropic viruses or control IgGs-conjugated viruses were then injected in the intra-pancreatic tumors. After about 2 weeks, luminescence signals were very high in the “MUC4” injected mice (Figure 5C), suggesting efficient gene transfer in the tumor cells ( $p=0.018$  with a 2-sided Mann Whitney test against control signal,  $n=4-5$ ). Mice were then treated with ganciclovir (GCV) daily, and the experiment was terminated by sacrificing the mice 2 weeks after the first injection of GCV. GCV injection induced a drop of luminescence signal in the “MUC4” mice as soon as 7 days after the beginning of the treatment (Figure 5C). The signal then remained low, and up to the level of that of the control mice. Concomitantly, when tumor growth went on to be about 50 times bigger than at the beginning in the control mice, tumor growth was slowed down in the “MUC4” mice and reached only about 24-fold of the initial fluorescence value (Figure 5B,  $p=0.06$  with a 2-sided Mann Whitney test against control signal,  $n=3$ , our initial group of 6 mice in each group having dropped by half because of surgery complications or tumor development). Mitosis and apoptotic figures were quantified on tumor sections. While the number of cells in M phase was not different between tumors, tumors that had received the oncotropic lentiviruses displayed higher numbers of apoptotic figures (Figure 6). Lentiviruses were injected intra-tumorally and there was still a possibility that they transduced the tumors just because they were provided locally at a high concentration. To test this hypothesis, we performed intra-pancreatic injections of the broad tropism virus and of the MUC4 oncotropic virus in tumor-free mice. After one week, the broad tropism virus transduction was highly detectable in the pancreas (Figure 7A) but also the virus had leaked to transduce other tissues such as the liver, the intestine and surprisingly the region of the testis (Figure 7B). Conversely, the MUC4 oncotropic virus did not achieve any detectable transduction in the pancreas or in any other site (Figure 7C). After two weeks, the broad tropism viral transductions were still detectable with higher signals in the pancreas (Figure 7E) and had been partly cleared from the liver, but remained and even increased in the gut and the testis. No new signal appeared in the MUC4 oncotropic virus-injected mice. Thus intra-tumoral injections of the MUC4 oncotropic virus appeared to be a very specific way to perform gene delivery in pancreatic tumors by contrast to a broad tropism virus, which transduced normal pancreatic cells and reached tissues distant from the tumor and the injection site.

## DISCUSSION

In this study, we tested for the first time the possibility to specifically deliver a therapeutic gene into pancreatic tumor cells using cell surface markers.

Gene transfer with lentiviruses is a very potent approach of gene therapy since viruses can transduce cells regardless of their stage in the cell cycle [20]. Previous studies have reported the possibility to use lentivectors for gene delivery to pancreatic cancer cells but were performed with broad tropism envelopes [7-9]. This approach might represent a risk of morbidity because of possible integrations of the viruses in normal cells (off target transductions). However, viral gene therapy still holds the promise of oncotargeting gene delivery sparing the normal cells, thanks to the modified Sindbis virus glycoprotein developed by Pariente et al. [13] and used here. This approach offers the possibility to specifically pseudotype the viral particles. We found that modified Sindbis virus glycoprotein-packaged lentiviruses could efficiently transduce the pancreatic cell lines *in vitro*. Three pancreatic cell surface antigens were tested for specific lentiviral gene transfer. The use of anti-PSCA yielded very poor gene transfer, regardless of the cell line. This result was disappointing since this protein was found highly expressed in pancreatic adenocarcinoma [21] and anti-PSCA drove efficient gene transfer in prostate tumors [13]. Interestingly however, CLDN18 and MUC4 achieved the best results in terms of efficiency and specificity *in vitro* and could be suitable for specific gene transfer in pancreatic tumor cells. To test this hypothesis, human tumor cells were grafted under the skin of immune-deficient mice. Therapeutic agent administration by intra-tumoral injections is possible in pancreatic tumors since it has been performed in clinical trials with endoscopic ultrasound injections [22]. Moreover, intra-tumoral injection of therapeutic oncotropic lentiviruses might be safer than intra-venous delivery to limit any systemic toxicity. Anti-MUC4-pseudotyped viruses carrying the firefly luciferase reporter gene, directly injected in the tumors yielded, luminescence signals in the tumors comparable to signals obtained with viruses packaged into the non-specific envelope containing the VSV glycoprotein, in two different cell lines. *In vivo*, MUC4 was a more potent antigen than CLDN18 and even more than HLA antigens in the CAPAN2 cells. Remarkably, luminescence appeared confined to the tumors since no signal was detected elsewhere in the mice, even when the detection mode was used with very low stringency. This observation was made previously when the gene transfer targeting system used here was tested by others [13-15]. Noteworthy, pancreatic injections of viruses in tumor-free mice led to very interesting observations. First, the broad tropism virus transduced very efficiently the

pancreas and leaked in other intra-abdominal sites, and even in the testis. By contrast the MUC4 oncotropic virus showed no detectable transduction at any site when injected in the pancreas, in the absence of tumors, even at the injection site. Taken together, this set of data suggests that the oncotropic lentiviral transductions appeared safer and more specific than VSV-G-driven transductions.

The results with CLDN18 oncotropic viruses were somewhat disappointing in the *in vivo* transductions, considering that the fact that similar results were obtained for CLDN18 and MUC4 oncotropic viruses *in vitro* (Figure 2B). We actually noticed strong signals one week after virus injections with anti-CLDN18 antibodies, but signals had partially disappeared in CAPAN2 and almost totally disappeared in MIAPACA2 cells at the time of sacrifice, after two weeks (not shown). One possible explanation would be that fixation of anti-CLDN18 might interfere with the biological function of claudin 18 in cancer cells, probably leading to cell death.

Herpes thymidine kinase (TK) in combination with the pro-drug ganciclovir remains one of the most potent systems for anticancer gene therapy approach and has given promising results in a very recent phase I clinical trial with an adenoviral system [6]. We evaluated the transfer of the TK gene by MUC4 oncotropic lentiviruses injected in orthotopically grafted human pancreatic tumor cells. Our experimental strategy was designed to do both the follow up of tumor growth (by fluorescence) and of the virus-infected tumor cells (by bioluminescence) in live animals. Importantly and as observed before, luminescence remained confined to the tumors when viruses were injected directly in the pancreas of the recipient mice. Moreover, GCV treatment resulted in luciferase signal loss and in slowing down of the tumor growth. It would be worth now to use this strategy to examine other PDAC-specific cell surface targets, and we feel that this study presents the proof of concept of oncotargeted molecular therapy of PDAC. There are many ways to improve the system. First, several targets (cell surface markers) could be used in concert as well as several rounds of virus injections could be performed to gain in efficiency. Second, once the markers have been validated, it is now possible to use vectors pseudotyped with engineered Sindbis virus glycoprotein bearing a covalent link with the antibodies. Indeed, fusion proteins could be produced [23] rendering the transduction very potent even in an immune-competent background. Another attractive option would be the use of the biotine/avidine combination developed more recently [24].

## CONCLUSION

Our study outlines for the first time three major concepts: (i) lentiviral transduction of human pancreatic tumor cells was possible when cells were grafted directly in the pancreas, (ii) this transduction was achieved with a system targeting the tumor cells with cell surface antigens, sparing the normal cells and (iii) detectable loss of reporter gene-expressing cells obtained by viral transduction was observed with the TK/GCV anticancer system. Moreover, the approach presented here appeared to be a safer, much more specific and an as efficient way to perform gene delivery in pancreatic tumors, in comparison with a broad tropism lentivirus. Importantly, we have developed an orthotopic graft model of human PDAC allowing the quantification of tumor growth and the co-localization of oncospecific targeting with direct, costless and non invasive procedures. Future improvement of this gene therapy approach includes the identification of other potent cell surface markers, the use of combinatory cell surface markers for specific gene transfer and the development of oncotropic envelopes stable in immune competent background.

## **METHODS**

### **Animals, pancreatic cell lines and antibodies**

The NOD/Shi-SCID IL2R<sup>null</sup> mice were produced and housed in the University Bordeaux Segalen animal facility, according to the rules and regulations governed and enforced by the Institutional Animal Care and Use Committee. The animal facility institutional agreement number is A33063916. Animals were included in protocols between 6 and 8 weeks old. Mice were monitored weekly for body weights and were also examined for aspect and behavior during the time-course of the experiments. No changes were noticed except otherwise indicated. The PDAC PANC1 and MIAPACA2 cell lines were purchased from the ATCC (American Type Culture Collection, Molsheim, France). CAPAN2 and BXPC3 were kindly provided by Joel Tardivel-Lacombe (INSERM U624, Marseille, France). The CAPAN2 and BXPC3 cells were maintained in RPMI (Invitrogen) with 10% Fetal Calf Serum (FCS, Invitrogen) and Penicillin/Streptomycin 1/100 (Invitrogen), the PANC1 and MIAPACA2 were cultured in DMEM with 10% FCS and Penicillin/Streptomycin 1/100.

The tdTomato-MIAPACA2 cell line was produced by transduction of the MIAPACA2 cells with a lentivirus carrying the tdTomato reporter gene (PGK-tdTomato, see below). Transduced cells were sorted by a BD FACS ARIA cell sorter (BD Biosciences, France).

The antibodies used in this study were purchased as follows: anti-HLA, anti-MUC4, rabbit IgGs (SIGMA ALDRICH, Lyon, France), anti-CLDN18 (GenWay, San Diego, CA-USA), anti-PSCA (Abcam, Paris, France), anti-PSCA (SIGMA ALDRICH, Lyon, France).

### **Vector construction, production and transduction of cells**

pPGK-tdTomato lentiviral plasmid was constructed by transferring the tdTomato gene from p-tdTomato (Clontech, Saint Germain en Laye, France) into pRRL-Sin-cPPT.PGK.WPRE lentiviral plasmid (gift from Dr. Trono, Lausanne, Switzerland). LUCIFERASE-IRES-TK lentivirus plasmid was obtained by replacing GFP from pLOXgfp-IresTK (Addgene Plasmid # 12243, Cambridge, MA-USA) with the firefly-Luciferase gene (Clontech). Cloning details can be provided upon request. A LUCIFERASE-IRES-ZsGreen lentivirus plasmid was obtained as follows: the fireflyLuciferase gene was cloned into the pIRES2-ZsGreen1 vector (Clontech, Saint Germain en Laye, France). All lentiviral vectors were produced by calcium phosphate mediated triple transient transfection of 293T cells with one of the vector transfer constructs, the packaging construct pCMVΔ8.91 (gift from Dr. Verma, La Jolla, CA-USA) and either VSV-G construct psPAX2 (gift from Dr. Trono) or 2.2 plasmid (a gift from Drs.

Chen and Morizono, coding for a modified Sindbis virus glycoprotein envelope, Los Angeles, CA-USA). The viruses produced were concentrated by ultracentrifugation (through a 10% sucrose cushion). The capsid protein p24 titrations were determined as already described [25].

### **Analysis of lentiviral transduction by flow cytometry**

FACS analyses were performed on a FACScalibur flow cytometer (BD biosciences, Le Pont de Claix, France) on trypsinized cells 3-5 days after transduction. Transductions were carried out on  $5 \cdot 10^4$  cells in 48-well plates. Virus mixes containing 100ng of p24 were prepared in 250 $\mu$ l of serum-free medium with antibodies at 0.5 $\mu$ g/ml. Percentages of GFP-positive cells were determined using CellQuest software (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) in comparison with non transduced cells, after counting of cells in the FL-1 channel.

### **Western-blot**

Protein extracts were prepared in RIPA buffer and processed for western blotting. Membranes were incubated with the targeting antibodies or a rabbit anti-luciferase antibody (AbCam, Paris, France). Rabbit anti-GAPDH antibody (Cell Signaling Technologies, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) was used to assess equal loading of the samples. Primary antibodies were detected with specific anti-rabbit- or anti-mouse-IgG-HRP (Cell Signaling Technologies). Proteins were visualized using the ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). Quantification by densitometry was performed with the ImageJ software.

### **Histology**

Tumors were fixed in 10% NBF, embedded in paraffin and processed by routine histology procedures. The proportion of mitosis/total cells or apoptosis/total cells was evaluated after Hematoxylin staining by direct counting on pictures taken at X40 magnification.

### ***In vitro* cell proliferation assay**

To test the effect of Herpes Simplex virus thymidine kinase on the tdTomato-MIAPACA2 cell viability in the presence of ganciclovir (GCV, SIGMA ALDRICH, Lyon, France), cells were first transduced with a lentivirus bearing the LUCIFERASE-IRES-TK transgene (see above). Cells were plated at  $3 \cdot 10^3$  cells per well in 96-well plates. The day after, increasing doses of GCV (0-100 $\mu$ M) were applied and cells were kept in culture for 10 days. Each point was done in quadruplet. The experiments were carried out 2 times. Cells were washed with

PBS and treated with MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) solution (Promega, Charbonnières, France) for 1.5h to determine cell viability by reading optical densities (OD) at 490nm. Results are expressed as cell viability:  $(OD_{\text{treated}}/OD_{\text{non treated}}) \times 100$ .

### **Bioluminescent imaging of pancreatic adenocarcinoma xenografts**

For subcutaneous xenografts, groups of 3-5 mice were anesthetized with isoflurane.  $8.10^5$  to  $10^6$  cells in 100 $\mu$ l medium were injected in the right flanks. When tumors reached about 100-150 mm<sup>3</sup>, diverse combinations of viruses (described in the result section) were injected in the tumors or directly in tumor-free pancreases in single injections. Briefly, 7 $\mu$ g p24 of lentivirus were mixed, when necessary, with 5 $\mu$ g of antibody and incubated 5 min at room temperature in 60 $\mu$ l serum free-medium. Tumors were monitored for luciferase expression on a weekly basis as follows. 150 mg/kg of D-Luciferin (Interchim, Montluçon, France) was injected intraperitoneally. After 10 min, mice were anesthetized by isoflurane and placed into a photon bioimager (BIOSPACE LAB, Paris, France) for about 20min to acquire luminescence images. Signals were quantified with the M3Vision software (BIOSPACE LAB).

For orthotopic xenografts, groups of 4-6 mice were anesthetized with isoflurane. Pancreases were exposed and  $8.10^5$  of tdTomato-MIAPACA2 cells in 40 $\mu$ l medium were injected directly in the pancreas. Tumor growth was monitored weekly with the bioimager using the fluorescence detection setting (Acquisition mode: FLI integration at 22 ms per frame, Excitation = 520 nm, Background = 480 nm, Emission = 570 nm, Filter cut off = 570 nm Illumination: 100 %). When signals were easily detectable (after 21 days), mice were anesthetized with isoflurane and injected with the lentiviruses. Ten  $\mu$ g p24 of lentiviruses were incubated 5 min at room temperature in 60 $\mu$ l serum free-medium with 5 $\mu$ g of antibody and injected intra-tumorally as described above. Luciferase expression and fluorescence signal were monitored weekly. Two weeks after virus injections, mice were treated daily with GCV (1mg/mouse).

### **Statistics**

MTS assay results and *in vitro* transduction results are expressed as mean  $\pm$  SD. Luminescence quantifications performed *in vivo* are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical tests were performed with Student's t tests or with a 2-sided Mann Whitney test for intra-pancreatic luciferase detections and tumor growth.

## **COMPETING INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

## **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

ML, MT and SD carried out *in vitro* assays. Western blotting was performed by IM. *In vivo* experiments were designed by FMG, PD, EP and SD and were carried out by ML, BR, IM and SD. VGD, ML, MT and FMG designed and produced the vectors. ML, BR, FMG and SD analyzed the results and produced the figures. EP, HV and AB participated in the discussion and interpretation of the study and manuscript preparation. SD and FMG wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Vincent Pitard from the SFR Transbiomed cell cytometry platform (Bordeaux, France). We are indebted to S.Y. Irvin and K. Morizono for providing the 2.2 plasmid. We are very grateful to J. Iovanna for his strong support and useful discussions. We also thank the staff from the Animalerie A2 of the Université Bordeaux Segalen for their technical support. This work was supported by grants from the Ligue contre le cancer (Comité Dordogne), the Institut National du Cancer (INCa), France and funding from the SFR Transbiomed (formerly IFR66).

## REFERENCES

1. Moss RA, Lee C: **Current and emerging therapies for the treatment of pancreatic cancer**. *Onco Targets Ther* 2010, **3**:111-127.
2. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A et al: **Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses**. *Science* 2008, **321**(5897):1801-1806.
3. Wong HH, Lemoine NR: **Novel therapies for pancreatic cancer: setbacks and progress**. *Future Oncol* 2010, **6**(7):1061-1064.
4. Bhattacharyya M, Lemoine NR: **Gene therapy developments for pancreatic cancer**. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006, **20**(2):285-298.
5. Bhaumik S: **Advances in imaging gene-directed enzyme prodrug therapy**. *Curr Pharm Biotechnol* 2011, **12**(4):497-507.
6. Dimou AT, Syrigos KN, Saif MW: **Novel agents in the management of pancreatic adenocarcinoma: phase I studies. Highlights from the "2011 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium"**. San Francisco, CA, USA. January 20-22, 2011. *JOP* 2011, **12**(2):114-116.
7. Hase R, Miyamoto M, Uehara H, Kadoya M, Ebihara Y, Murakami Y, Takahashi R, Mega S, Li L, Shichinohe T et al: **Pigment epithelium-derived factor gene therapy inhibits human pancreatic cancer in mice**. *Clin Cancer Res* 2005, **11**(24 Pt 1):8737-8744.
8. Saraga G, Mafficini A, Ghaneh P, Sorio C, Costello E: **Both HIV- and EIAV-based lentiviral vectors mediate gene delivery to pancreatic cancer cells and human pancreatic primary patient xenografts**. *Cancer Gene Ther* 2007, **14**(9):781-790.
9. Ravet E, Lulka H, Gross F, Casteilla L, Buscail L, Cordelier P: **Using lentiviral vectors for efficient pancreatic cancer gene therapy**. *Cancer Gene Ther* 2010, **17**(5):315-324.
10. Ohno K, Sawai K, Iijima Y, Levin B, Meruelo D: **Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A**. *Nat Biotechnol* 1997, **15**(8):763-767.
11. Iijima Y, Ohno K, Ikeda H, Sawai K, Levin B, Meruelo D: **Cell-specific targeting of a thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system using a recombinant Sindbis virus vector**. *Int J Cancer* 1999, **80**(1):110-118.

12. Morizono K, Bristol G, Xie YM, Kung SK, Chen IS: **Antibody-directed targeting of retroviral vectors via cell surface antigens.** J Virol 2001, **75**(17):8016-8020.
13. Pariente N, Morizono K, Virk MS, Petrigliano FA, Reiter RE, Lieberman JR, Chen IS: **A novel dual-targeted lentiviral vector leads to specific transduction of prostate cancer bone metastases *in vivo* after systemic administration.** Mol Ther 2007, **15**(11):1973-1981.
14. Zhang KX, Moussavi M, Kim C, Chow E, Chen IS, Fazli L, Jia W, Rennie PS: **Lentiviruses with trastuzumab bound to their envelopes can target and kill prostate cancer cells.** Cancer Gene Ther 2009, **16**(11):820-831.
15. Zhang KX, Kim C, Chow E, Chen IS, Jia W, Rennie PS: **Targeting trastuzumab-resistant breast cancer cells with a lentivirus engineered to bind antibodies that recognize HER-2.** Breast Cancer Res Treat 2011, **125**(1):89-97.
16. Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, Rani S, Ramabadran S, Gollapudi S, Balakrishnan L, Dwivedi SB, Telikicherla D, Selvan LD et al: **A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer.** PLoS Med 2009, **6**(4):e1000046.
17. Sahin U, Koslowski M, Dhaene K, Usener D, Brandenburg G, Seitz G, Huber C, Tureci O: **Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development.** Clin Cancer Res 2008, **14**(23):7624-7634.
18. Chaturvedi P, Singh AP, Moniaux N, Senapati S, Chakraborty S, Meza JL, Batra SK: **MUC4 mucin potentiates pancreatic tumor cell proliferation, survival, and invasive properties and interferes with its interaction to extracellular matrix proteins.** Mol Cancer Res 2007, **5**(4):309-320.
19. Wente MN, Jain A, Kono E, Berberat PO, Giese T, Reber HA, Friess H, Buchler MW, Reiter RE, Hines OJ: **Prostate stem cell antigen is a putative target for immunotherapy in pancreatic cancer.** Pancreas 2005, **31**(2):119-125.
20. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D: ***In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.** Science 1996, **272**(5259):263-267.
21. Argani P, Rosty C, Reiter RE, Wilentz RE, Murugesan SR, Leach SD, Ryu B, Skinner HG, Goggins M, Jaffee EM et al: **Discovery of new markers of cancer through serial analysis of gene expression: prostate stem cell antigen is overexpressed in pancreatic adenocarcinoma.** Cancer Res 2001, **61**(11):4320-4324.
22. Hecht JR, Bedford R, Abbruzzese JL, Lahoti S, Reid TR, Soetikno RM, Kirn DH, Freeman SM: **A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of**

- ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma.**  
Clin Cancer Res 2003, **9**(2):555-561.
23. Yang L, Bailey L, Baltimore D, Wang P: **Targeting lentiviral vectors to specific cell types *in vivo*.** Proc Natl Acad Sci U S A 2006, **103**(31):11479-11484.
24. Morizono K, Xie Y, Helguera G, Daniels TR, Lane TF, Penichet ML, Chen IS: **A versatile targeting system with lentiviral vectors bearing the biotin-adaptor peptide.** J Gene Med 2009, **11**(8):655-663.
25. Robert-Richard E, Richard E, Malik P, Ged C, de Verneuil H, Moreau-Gaudry F: **Murine retroviral but not human cellular promoters induce *in vivo* erythroid-specific deregulation that can be partially prevented by insulators.** Mol Ther 2007, **15**(1):173-182.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: Oncospecific transduction in human pancreatic tumor cells**

PDAC cell surface specific antigens were chosen according to previous reports. They were used to target lentiviral transductions of the Green Fluorescent Protein (GFP) reporter gene, using a Sindbis virus modified glycoprotein. The E2 recognition ZZ domain of glycoprotein has been modified to contain the Fc-binding domain of the protein A. The resulting mutant glycoprotein was called 2.2. Thus, virions can be associated with cell surface-specific antibodies to target the transduction of tumor cells (insert).

### **Figure 2: Targeted-transduction of human pancreatic cell lines by the specific pseudotyped GFP-expressing lentivirus**

A) PDAC cell lines were transduced with lentiviruses packaged into VSV-G-containing envelopes at increasing multiplicity of infection. MOI=10 corresponds to a p24=100ng. B) PDAC cell lines were transduced with 100 ng of p24 oncospecific lentiviruses packaged into the 2.2 Sindbis virus glycoprotein-containing envelopes bound to the antibodies mentioned on the x axis (0.5 $\mu$ g). The y axis corresponds to the % of transduced cells expressing the reporter gene GFP analysed by flow cytometry. Each condition has been tested at least in 3 independent experiments. C) Western-blot of PDAC cell lines protein extracts with the antibodies used for the targeted transduction. Anti-GAPDH was used as a loading control. After quantification of the western blots by densitometry, the levels of protein expression were calculated as a ratio of GAPDH levels and are shown in a bar graph as a ratio to levels observed in the BXPC3 cell line.

### **Figure 3: Anti-MUC4 antibodies bound to modified lentiviruses drive efficient gene transfer *in vivo* in CAPAN2 cells**

(A) CAPAN2 cells were grafted subcutaneously in the right flanks of immune-deficient recipient mice. When tumors reached about 100 mm<sup>3</sup>, lentiviruses carrying the luciferase reporter gene combined with anti-MUC4, anti-CLDN18 (PDAC targeting antibodies), anti-HLA (positive control for the targeted gene transfer), rabbit IgGs (ISO, negative control for the targeted gene transfer) or packaged into the broad tropism VSV-G-containing envelope (positive control) were directly injected in the tumors (n=3 in each group). Two weeks after virus injections luciferase signal was measured in anesthetized live animals with a photon imager apparatus. (B) Quantification of luminescence in photons/steradian/s (ph/sr/s) was

divided by tumor mass in mg, since tumor mass could be very different in individuals after resection, and is expressed as a percentage of VSV-G positive control. Red circles depict the zones used for quantification (same size for all the mice). The black arrow points the area measured for background signal determination. (C) Western-blot analysis of luciferase expression in the previous tumor extracts. The negative control (CTNEG) corresponds to a tumor extract of untransduced CAPAN2 cells. The positive control (CTPOS) was obtained from a tumor derived from CAPAN2 cells transduced with a lentivirus bearing the bicistronic transgene LUCIFERASE-IRES-ZsGREEN. Extracts obtained from tumors transduced by oncospecific lentiviruses are identified according to the target cell surface antigen. ISO: rabbit IgGs.

**Figure 4: Luciferase expression driven by MUC4-oncotropic virus co-localizes with fluorescence in tdTomato-MIAPACA2 tumors**

(A) MIAPACA2 cells were modified to express permanently the tdTomato reporter gene, detectable with the photon imager in subcutaneously grafted tumors (top panel). Lentiviruses carrying the luciferase reporter gene combined with anti-MUC4, anti-CLDN18 (PDAC targeting antibodies), rabbit IgGs (ISO, negative control for the targeted gene transfer) or packaged into the broad tropism VSV-G-containing envelope (positive control) were directly injected in the tumors (n=3 in each group). Two weeks after virus injections luciferase signal was measured in anesthetized live animals with a photon imager apparatus (bottom panel) and co-localizes only with fluorescent tumor cells. (B) Quantification of luminescence in ph/sr/s was divided by tumor fluorescence (ph/sr/s) and is expressed as a percentage of VSV-G positive control. Red circles depict the zones used for quantification (same size for all the mice).

**Figure 5: Targeted transduction of the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene is toxic *in vitro* and *in vivo*, in the presence of ganciclovir**

A) MIAPACA2 cells stably expressing the tdTomato fluorescent protein were transduced with viruses packaged into broad tropism envelopes, expressing either the GFP protein (CT, dark gray line) or a bicistronic gene encoding the firefly luciferase and the herpes simplex virus thymidine kinase (LUC-TK, light gray line). Cells were treated with increasing concentration of ganciclovir and cell death was examined 10 days after treatment. Cell viability was measured by MTS tests. \*\*\*:  $p < 0.001$  in Student's t test compared to control condition. B) TdTomato-MIAPACA2 cells were grafted in the pancreas of recipient mice.

After 21 days anti-MUC4-conjugated viruses (MUC4) or control IgGs-conjugated viruses (ISO) were injected in the intra-pancreatic tumors (n=6 animals in each group). After 36 days, ganciclovir was injected daily for two weeks (solid red lines). Left panels: fluorescence signal corresponding to grafted tumor cells the first day of GCV injection (Day 36) and one week after the beginning of GCV injections (Day 45). Right chart: Quantification of fluorescence signals expressed as a fold increase of fluorescence detected on day 1. C) Left panels: luminescence signals observed in mice the first day of GCV injection (Day 36) and one week after the beginning of GCV injections (Day 45). Right chart: Raw luminescence signals are reported as ph/sr/s from the day of virus injection (day 21) to the day of experiment termination (day 45). Note that mouse mortality due to either surgery complications or tumor development occurred. On day 21, when viruses were injected, we had lost 1 mouse in the MUC4 group and 2 mice in the ISO group. On day 45, we had only 3 mice in each group. □ p=0.06 with a 2-sided Mann Whitney test against control signal, n=3. \* p=0.018 with a 2-sided Mann Whitney test against control signal, n=4-5.

**Figure 6: Mitotic and apoptotic figures on sections from ISO and MUC4-oncotropic lentivector-injected tumors**

Sections from tumors injected with ISO-oncotropic control lentivector (a) or with MUC4-oncotropic lentivector (b) were stained with hematoxylin. Mitotic figures (M) and apoptotic figures (A) were counted in 2791 (ISO) or 1558 (MUC4) cells (n=3). \*\*: p=0.002 with Student t test. Original magnification X40.

**Figure 7: Oncotargeted transduction of lentiviruses is efficient only in pancreases bearing tumors**

Ten µg of p24 lentiviruses carrying the luciferase reporter gene packaged into the VSV-G-containing envelope (a lateral view, b ventral view) or anti-MUC4-conjugated lentiviruses (c lateral view) were directly injected in the pancreas of tumor free animals (n=3 animals in each group). Luciferase signal was visualized after one week. Luciferase signal intensity was quantified and is reported as mean of Ph/sr/s ± SEM (d). Increased luciferase signal is shown after 16 days in the same animals (e, f: VSV-G and g: MUC4), with signal quantification (h).

Figure 1

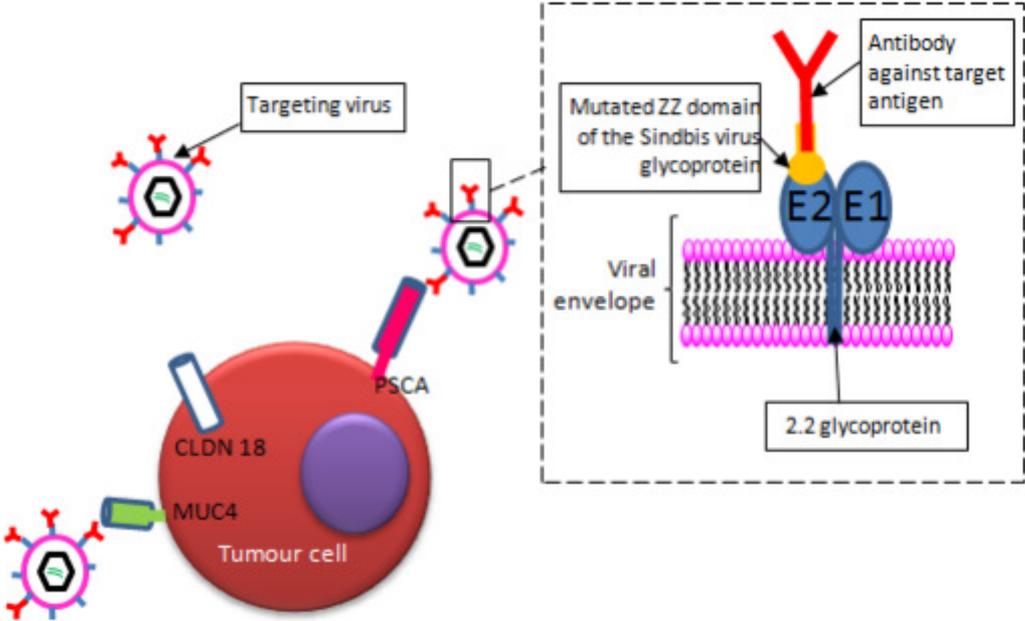
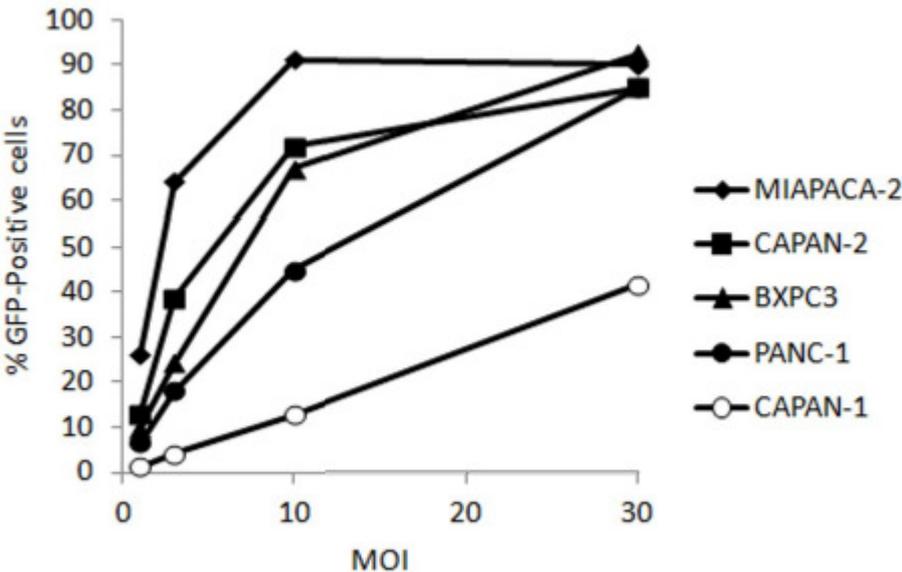
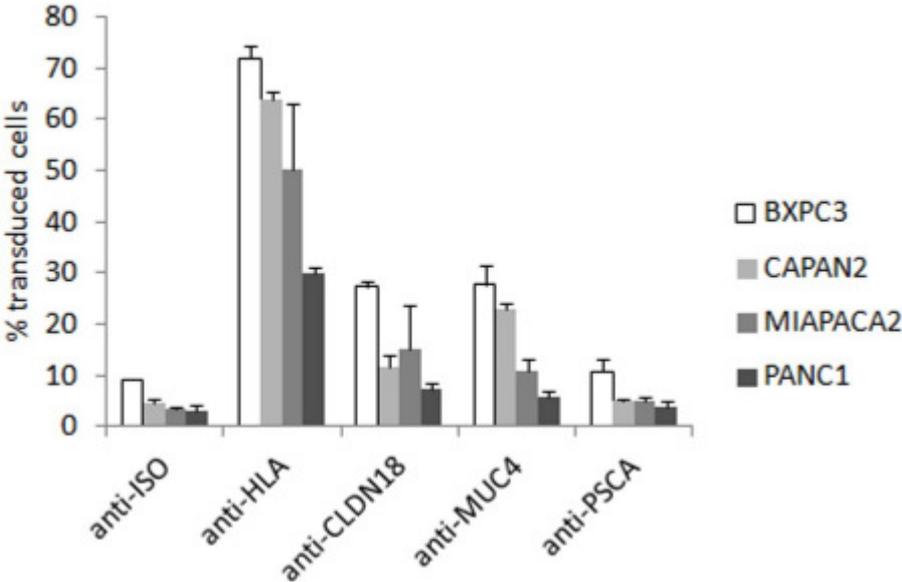


Figure 2

A



B



C

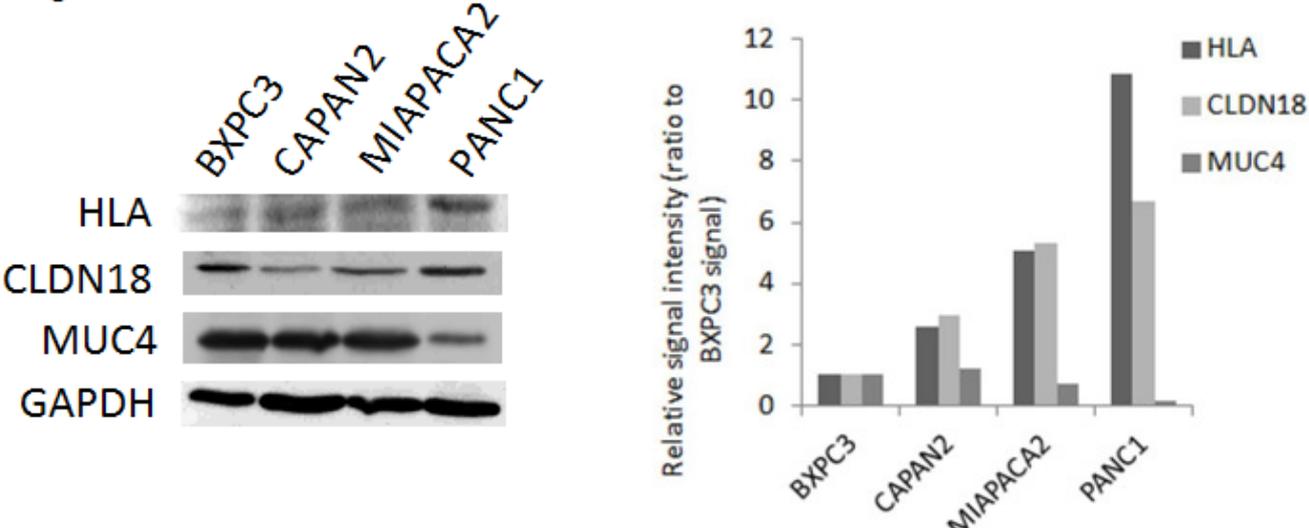


Figure 3

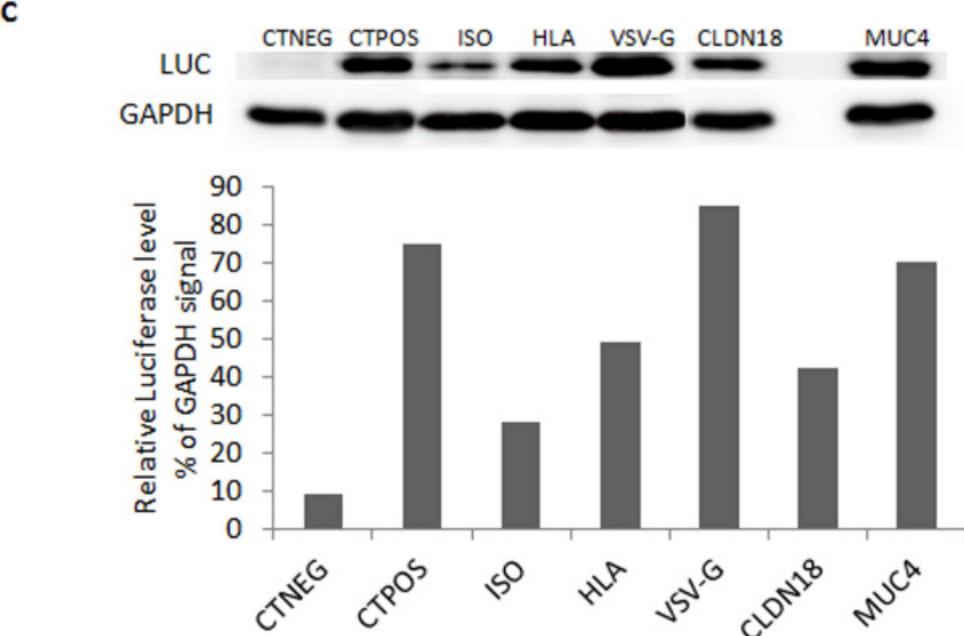
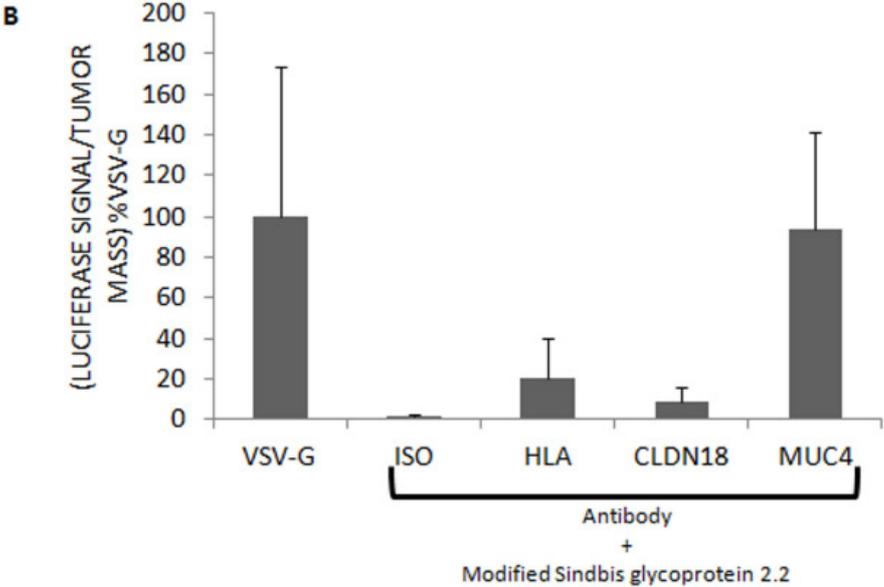
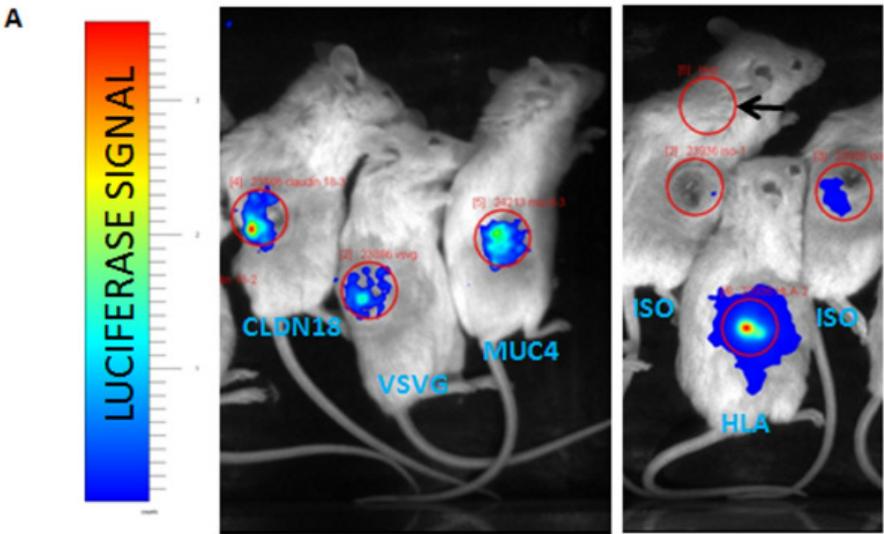


Figure 4

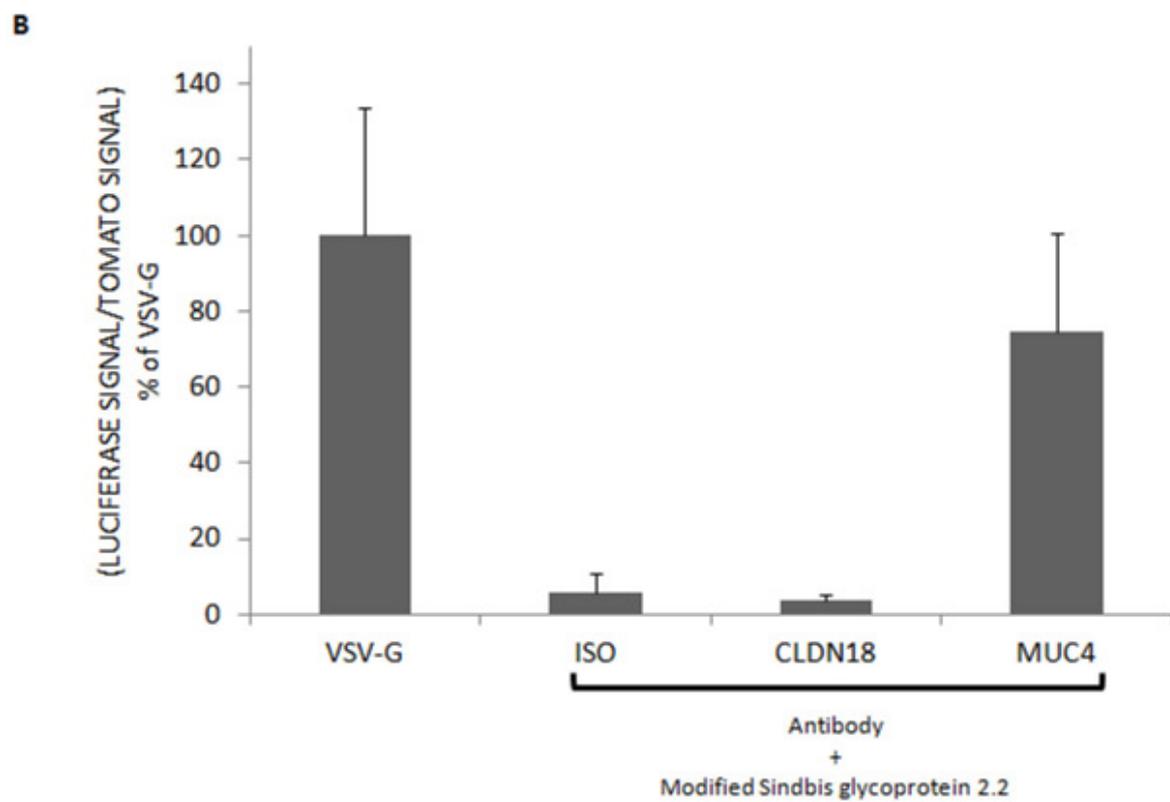
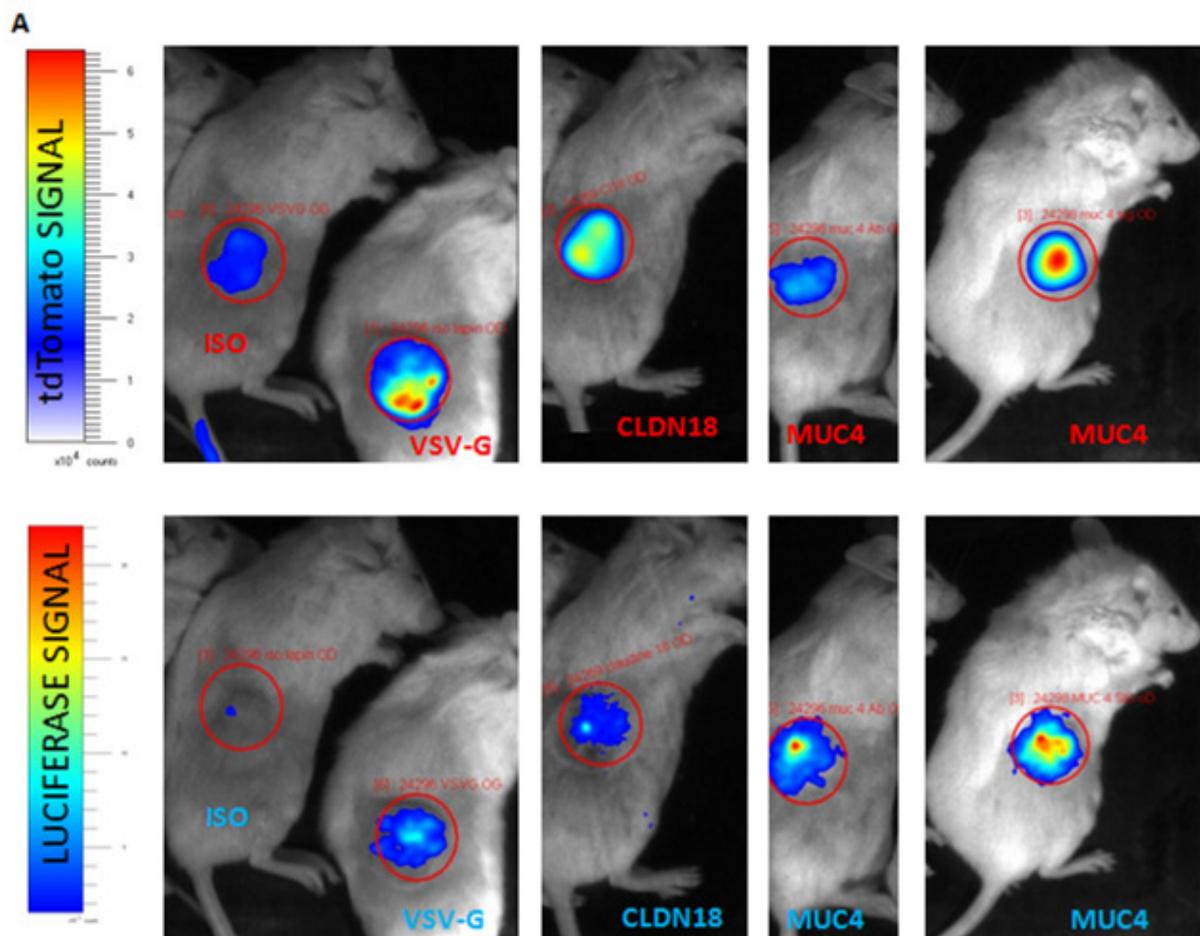


Figure 5

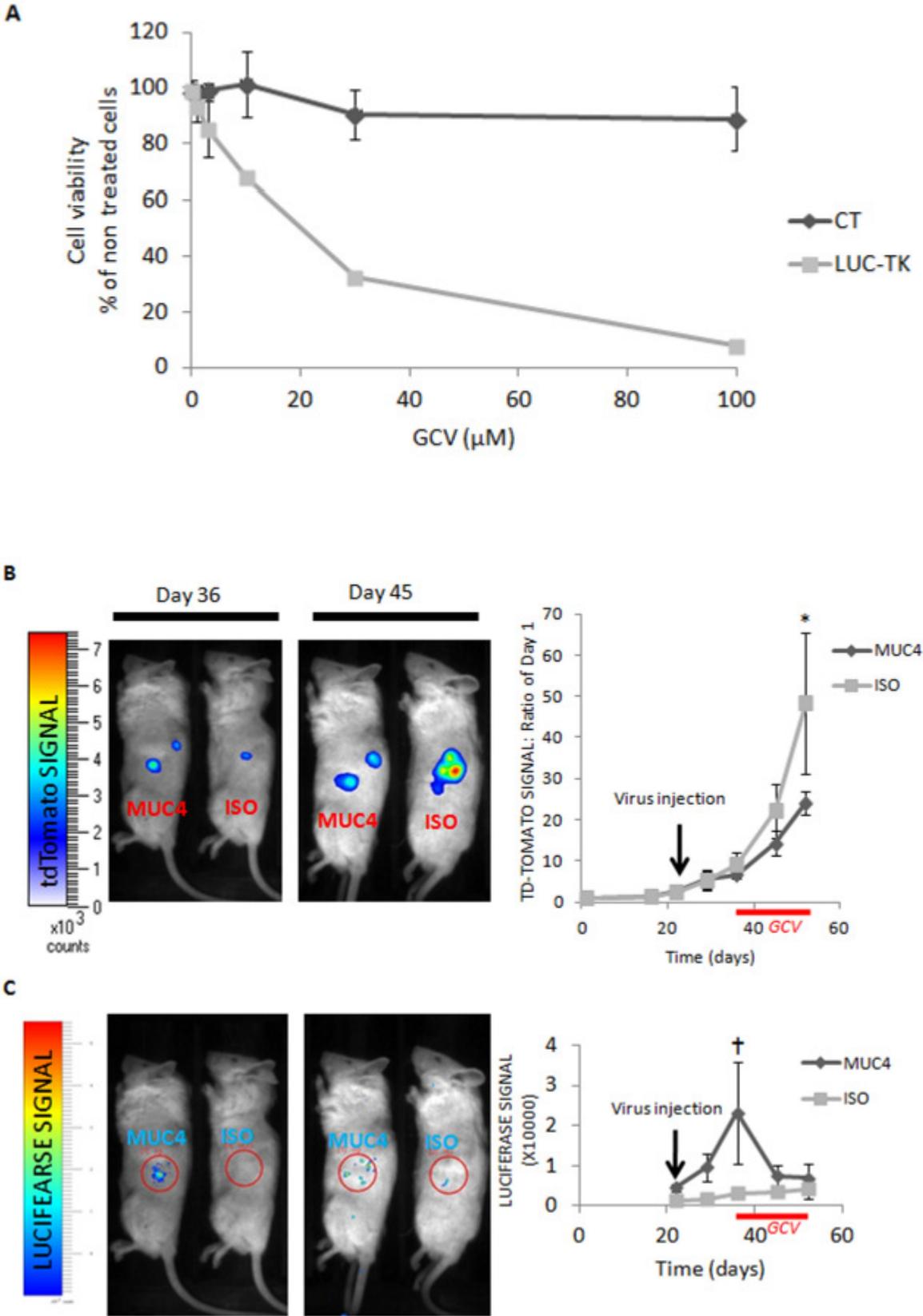


Figure 6

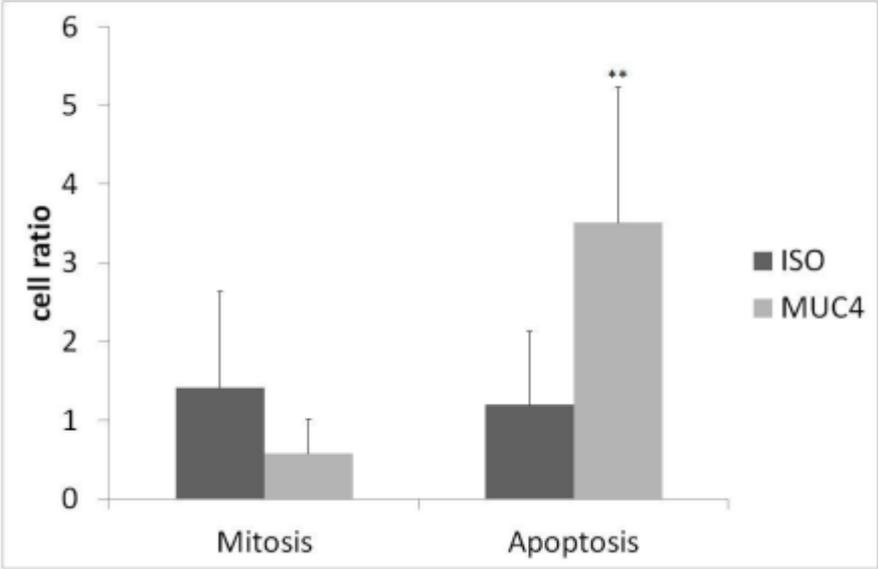
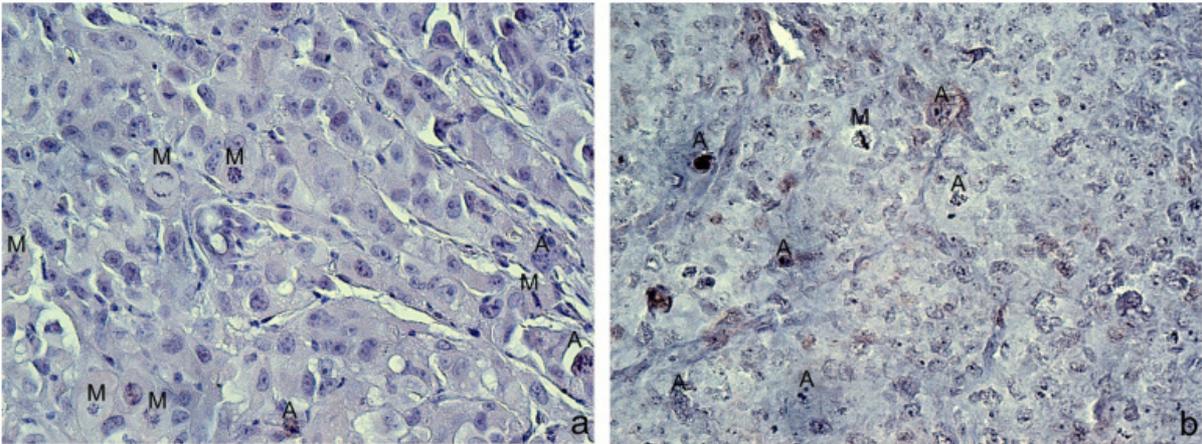
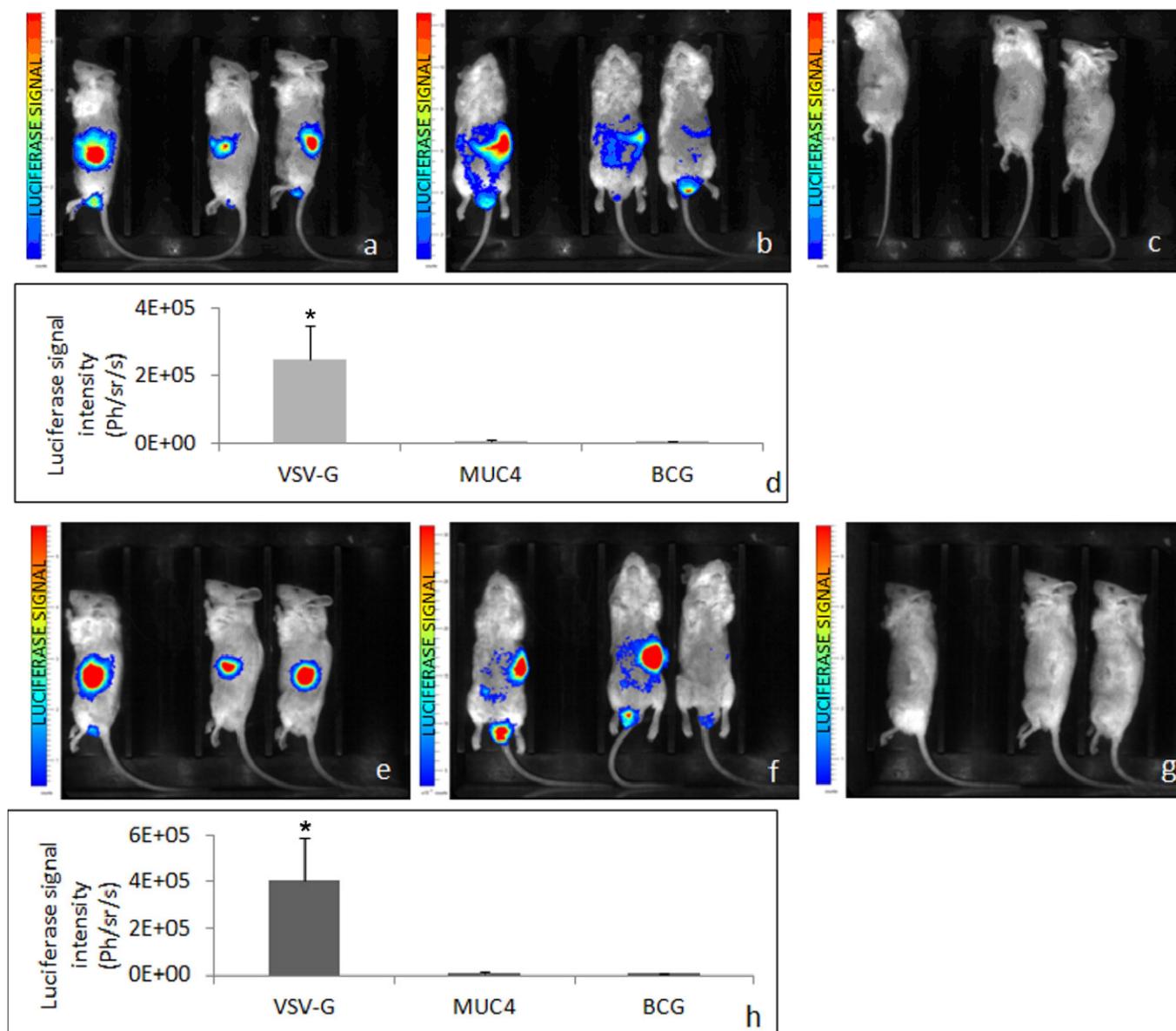


Figure 7



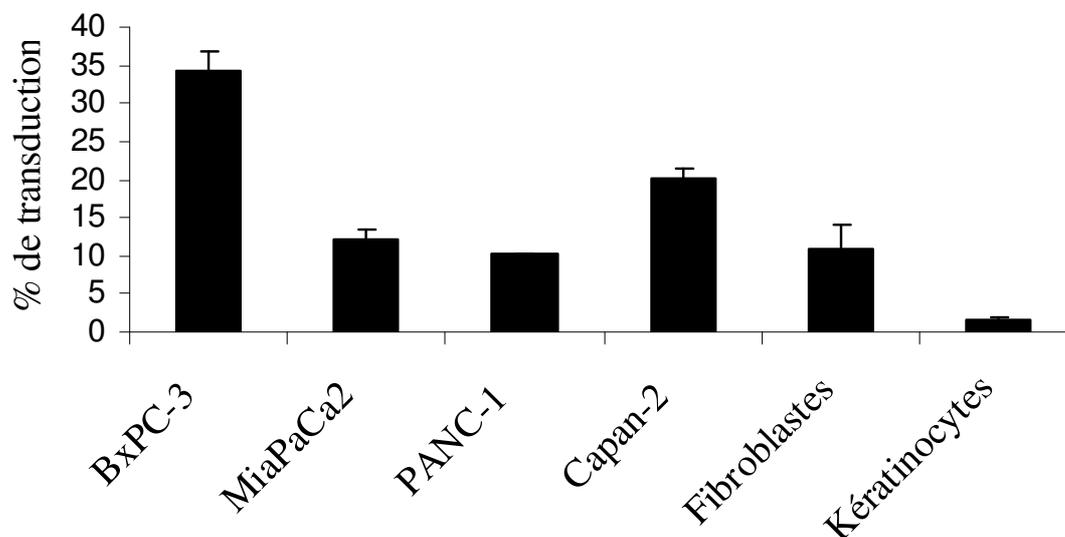
### III. Résultats supplémentaires.

#### III.1. Utilisation du marqueur de surface PAR-2.

Une étape cruciale de la mise en place de notre système de ciblage était la recherche de marqueur de surface spécifique de la cellule tumorale pancréatique. Nous avons également sélectionné l'antigène PAR-2 (*Proteinase-Activated Receptor 2*) qui est surexprimé dans des lignées d'adénocarcinome pancréatique (Ohta *et al.* 2003).

Dans un premier temps nous avons testé l'efficacité de transduction des vecteurs de ciblage en présence de l'anticorps anti-PAR-2 sur différentes lignées cellulaires d'adénocarcinome pancréatique ainsi que sur des cellules de culture primaire, les fibroblastes et les kératinocytes, qui nous servaient de contrôle de spécificité tumorale.

Les meilleurs résultats ont été obtenus pour les BxPC-3 et les Capan-2 avec respectivement 34,4% et 20,3% de transduction en présence de l'anticorps anti-PAR-2 (Figure 1).



**Figure 1 : Transduction ciblée *in vitro* en présence de l'anticorps anti-PAR-2.** Des lignées d'adénocarcinome pancréatique et des cultures primaires ont été transduites avec les vecteurs de ciblage *in vitro* en présence de l'anticorps anti-PAR-2.

Pour tester la spécificité de la transduction obtenue dans les lignées pancréatiques, des fibroblastes et des kératinocytes ont été transduits dans les mêmes conditions. Les fibroblastes ont été transduits à 10,9% par les vecteurs de ciblage en présence de l'anticorps anti-PAR-2, une efficacité de transduction qui est trois fois plus faible que pour les cellules BxPC-3 mais

aussi importante que la transduction obtenue dans certaines lignées pancréatiques comme les PANC-1 ou les MiaPaCa2.

Les résultats obtenus *in vitro* nous ont montré que la combinaison de l'anticorps anti-PAR-2 en présence des vecteurs de ciblage permettait un bon transfert de gène dans les cellules tumorales mais manquait par contre de spécificité. Nous avons donc considéré qu'il ne s'agissait pas d'un bon candidat pour la poursuite de notre étude *in vivo*.

### III.2. Administration des vecteurs de ciblage par voie systémique.

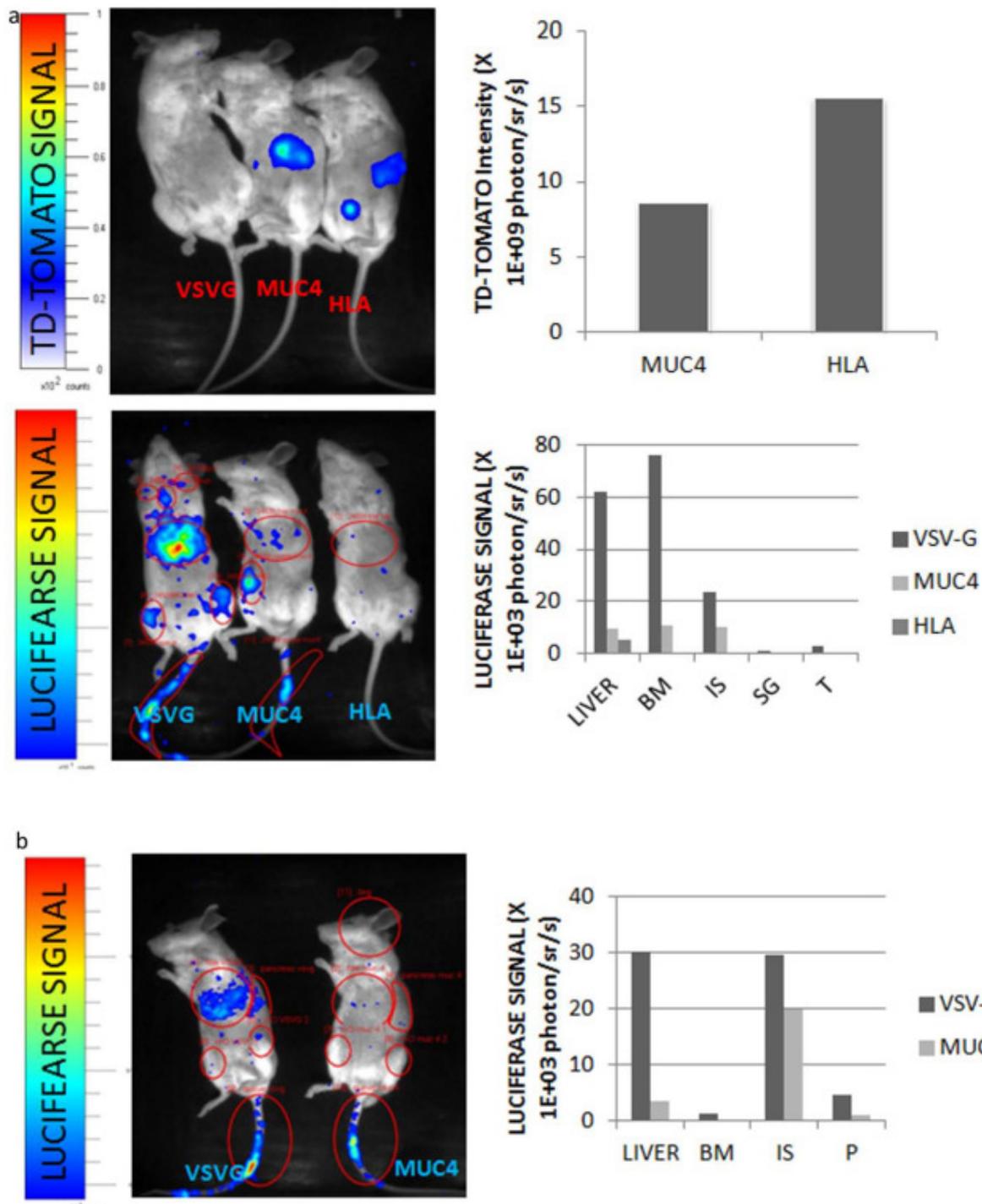
Une expérience supplémentaire a été réalisée pour évaluer le mode d'administration par voie systémique des vecteurs de ciblage.

Des cellules MIAPaCa2 exprimant la protéine fluorescente TdTomato ont été greffées dans des pancréas d'un groupe pilote de souris. Lorsque les tumeurs fluorescentes ont été détectées par bioimagerie (*Figure 2a, haut*), des lentivirus pseudotypés par le VSV-G ont été injectés par voie systémique comme contrôle positif ainsi que les lentivirus oncotropiques couplés aux anticorps HLA ou MUC4.

Dix jours après l'injection systémique, le signal luciférase démontrant la transduction virale a été fortement détecté dans le foie et la moelle osseuse des membres inférieurs des souris ayant reçu les lentivirus VSV-G et un signal plus faible a également été détecté dans la région du site d'injection, dans les glandes salivaires et le thymus (*Figure 2a, bas*). Des signaux luciférase très faibles ont été mis en évidence au site d'injection virale, dans le foie et dans la moelle osseuse des souris ayant reçu le virus oncotropique MUC4 (16%, 13% et 40% du signal obtenu pour le VSV-G respectivement). Aucun signal ectopique n'a été détecté dans les souris HLA, un résultat attendu puisque l'antigène HLA est un antigène humain et servait ici de témoin négatif. Après 21 jours, un signal luciférase a été détecté dans le pancréas des souris VSV-G et MUC4 mais très faible comparé aux signaux persistants détectés dans les sites aspécifiques comme le foie ou le site d'injection dans les souris VSV-G (*Figure 2b*).

Il est toutefois important de noter que cette expérience pilote n'impliquait qu'une seule souris par condition et n'a été réalisée qu'une seule fois.

Cette expérience pilote nous a montré que l'injection des lentivirus par voie systémique nécessitait une mise au point plus longue pour conduire à une transduction aussi efficace des tumeurs pancréatiques que la voie intra-tumorale. Cette dernière a donc été privilégiée pour le transfert de vecteurs viraux dans notre étude.



**Figure 2: Injection systémique des lentivirus oncotropiques dans des xéogreffes orthotopiques d'adénocarcinomes pancréatiques.** Des cellules MIAPaCa2-tdTomato ont été greffées dans des pancréas de souris. Lorsque les tumeurs fluorescentes ont été détectées, les différents types de virus ont été injectés par voie systémique dans la queue des souris. (a) 10 jours après l'injection virale, les tumeurs n'ont été détectées que dans les souris ayant reçu les virus couplés aux anticorps HLA et MUC4 (a, haut). Le signal luciférase a été fortement détecté dans les souris injectées avec les virus pseudotypés VSV-G (a, bas), surtout dans le

foie, la moelle osseuse et le site d'injection virale. Des signaux luciférase ont également été détectés dans les souris MUC4 mais faiblement. (b) 21 jours après l'injection virale, le signal dans le foie a partiellement disparu dans les souris VSV-G et un faible signal luciférase a été détecté dans les pancréas, démontrant une infection au site des tumeurs. BM: moelle osseuse, IS: site d'injection virale, SG: glandes salivaires, T: thymus, P: pancréas.

### III.3. Spécificité du système de ciblage *in vivo*.

Outre les lignées d'adénocarcinome pancréatique, nous avons testé le système de ciblage avec les anticorps anti-MUC4 et anti-CLDN18 *in vivo* dans des xénogreffes sous-cutanées de souris formées à partir d'une lignée cancéreuse du côlon, les cellules SW480, ainsi que dans xénogreffes de cellules BTC, des cellules bêta pancréatiques transformées de souris. Ces 2 lignées expriment les antigènes de surface MUC4 et CLDN18 rendant possible leur transduction avec le système de ciblage développé.

Les vecteurs de ciblage ont été injectés en présence d'un anticorps isotype lapin servant de contrôle négatif. Des vecteurs pseudotypés VSV-G possédant un tropisme large ont également été injectés pour servir de témoin positif de transduction.

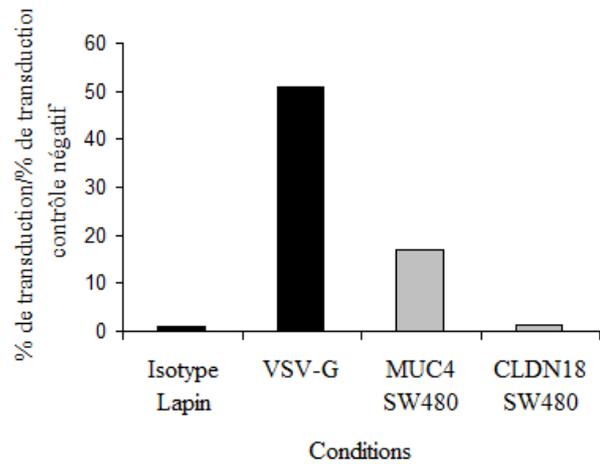
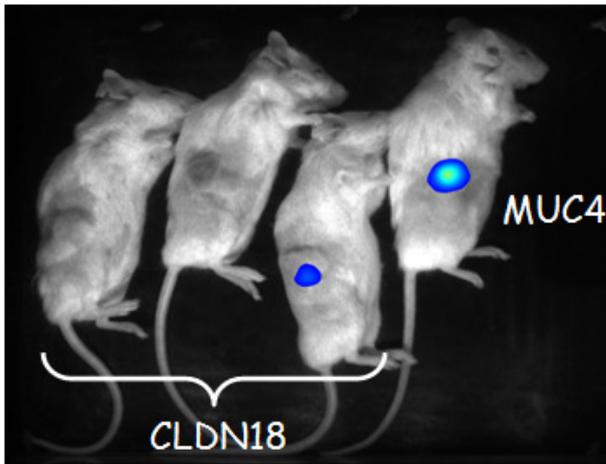
Des groupes de 3 souris ont été injectés avec les vecteurs de ciblage en présence des anticorps anti-MUC4 d'une part et anti-CLDN18 d'autre part. Les souris ont été prises en photo 15 jours après l'injection virale sous anesthésie et l'efficacité de transduction a été évaluée par mesure de la bioluminescence grâce à la présence de luciférase dans les vecteurs de ciblage (*Figure 3a et b*).

Pour les cellules cancéreuses du côlon SW480, la transduction obtenue avec l'anticorps CLDN18 était de l'ordre du bruit de fond (*Figure 3a droite*) alors que l'anticorps anti-MUC4 a permis une transduction efficace des cellules tumorales, de l'ordre de 10 fois le signal du bruit de fond. Le résultat obtenu peut-être expliqué puisqu'il a été montré que la protéine de surface MUC4 était exprimé dans plus de 25% des adénocarcinomes colorectaux ainsi que dans d'autres cancers (Shanmugam *et al.* 2010). Nous avons nous-même détecté l'antigène MUC4 par western-blot dans des cellules HUH7, cellules de carcinome hépatique (non montré). Le système de ciblage associé à l'anticorps anti-MUC4 montre donc un réel potentiel pour une thérapie anticancéreuse et de plus il pourrait cibler plusieurs autres cancers.

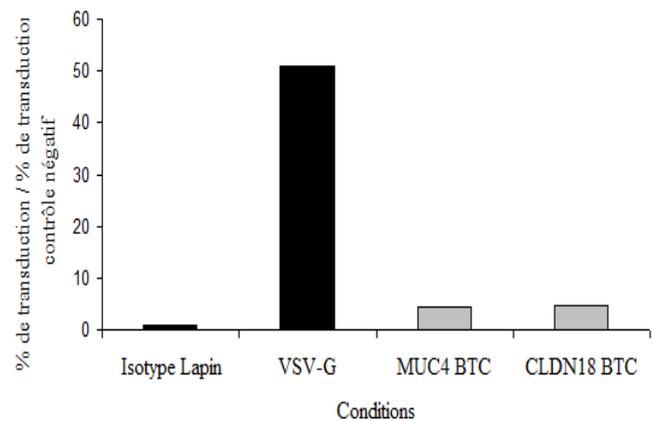
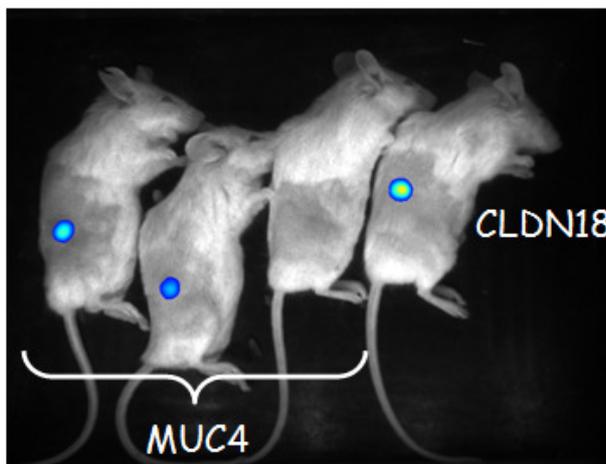
En ce qui concerne les cellules BTC, le pourcentage de transduction obtenu était faible, de l'ordre de 4 fois le bruit de fond, et il était le même que cela soit avec l'anticorps anti-MUC4 ou avec l'anticorps anti-CLDN18. Ceci suggère que la transduction obtenue était

bien moins efficace que dans les cellules tumorales pancréatiques et colorectales. Ces résultats confortent la spécificité du système de ciblage qui transduirait efficacement les cellules tumorales et très faiblement les cellules pancréatiques saines péri-tumorales dans l'éventualité d'une thérapie.

**a**



**b**

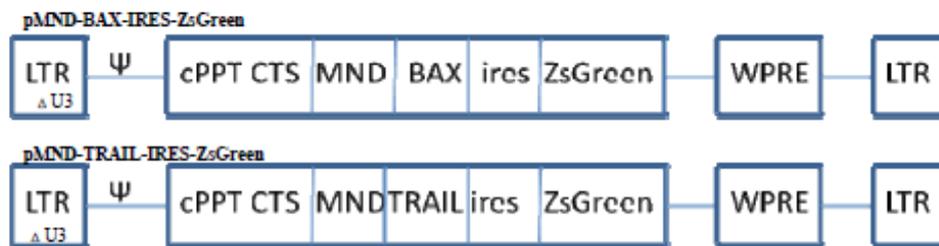


**Figure 3 : Efficacité de transduction *in vivo* du système de ciblage.** Des souris NOG ont été xéno greffées avec des cellules SW480 et des cellules BTC. Des vecteurs de ciblage ont été injectés dans les souris en présence d'anticorps contrôle et d'anticorps de ciblage spécifique MUC4 et CLDN18. Quinze jours après l'injection virale, une photo de bioluminescence manifestant la transduction des vecteurs a été réalisée pour les tumeurs SW480 (a, gauche) et BTC (b, droite). Les pourcentages de transduction évalués par bioluminescence ont été rapportés au pourcentage obtenu pour le contrôle négatif isotype lapin pour les souris SW480 (a, droite) et BTC (b, droite).

### III.4. Recherche de transgènes cytotoxiques à transférer dans les cellules tumorales pancréatiques.

Parallèlement à la mise au point du système de ciblage à l'aide d'antigène de surface, nous avons recherché des transgènes à transférer dans les cellules tumorales pancréatiques qui ait un effet cytotoxique important tel que le gène de la thymidine kinase publié dans l'article 1. Nous avons ainsi évalué le transfert des gènes pro-apoptotiques *BAX* et *TRAIL*.

Des constructions contenant l'un de ces gènes et le gène de la protéine fluorescente ZsGreen placée sous le contrôle d'un IRES ont été réalisées (Figure 4). Un vecteur contrôle ne contenant que la protéine ZsGreen a également été généré pour servir de contrôle négatif.



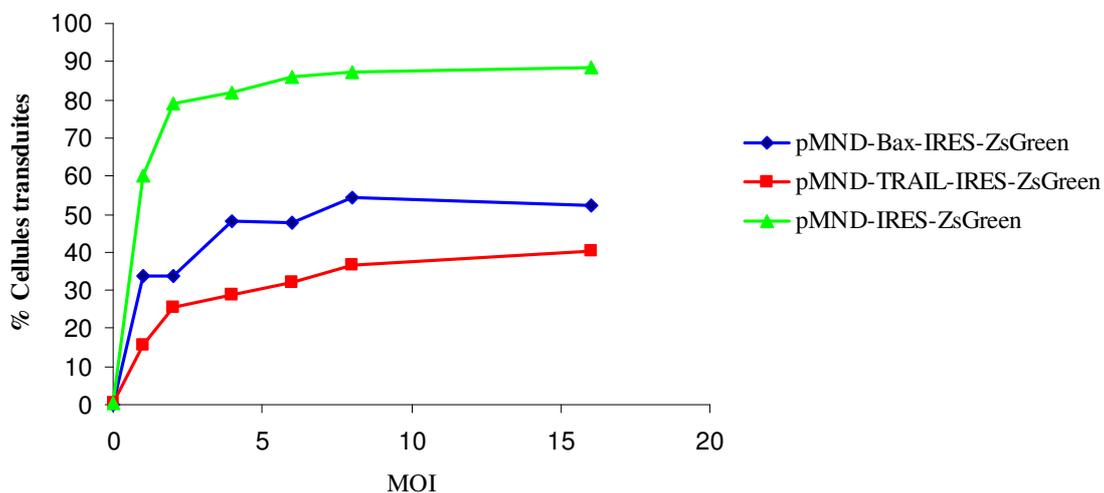
**Figure 4 : Constructions utilisées pour le transfert des gènes *BAX* et *TRAIL* dans les cellules tumorales pancréatiques.** MND : Promoteur dérivé d'un LTR rétroviral modifié, CMV : promoteur du cytomégalo virus, ZsGreen : ADNc de la protéine fluorescente ZsGreen Clontech® (Zoanthus sp. Green), IRES : *Internal Ribosome Entry Site from the encephalomyocarditis virus*, Ψ : signal d'encapsidation, WPRE : *whoodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*.

Les cellules MiaPaCa2 ont été transduites avec les vecteurs p-MND-ZsGreen (vecteur contrôle), pMND-BAX-IRES-ZsGreen ou pMND-TRAIL-IRES-ZsGreen à des MOI croissantes (MOI : *Multiplicity Of Infection*). Du fait de la présence de l'IRES, le pourcentage de cellules exprimant la protéine ZsGreen (cellules ZsGreen<sup>+</sup>) correspond également aux cellules exprimant le facteur pro-apoptotique BAX ou TRAIL. Nous avons ensuite suivi au cours du temps le pourcentage de décroissance des cellules ZsGreen<sup>+</sup> à une MOI donnée (MOI10 pour le contrôle et MOI8 pour les vecteurs pro-apoptotiques). En effet, comme seules les cellules ZsGreen<sup>+</sup> peuvent également surexprimer BAX ou TRAIL et si cette surexpression est toxique, alors le pourcentage de cellules ZsGreen<sup>+</sup> diminuera au cours du temps.

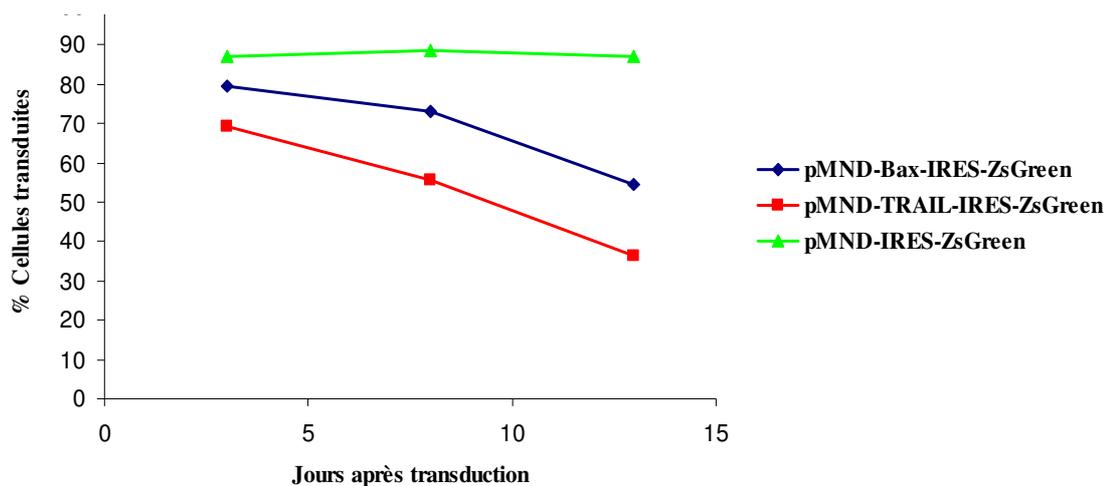
La *Figure 5a* montre que le pourcentage de cellules fluorescentes dans la population contrôle exprimant uniquement la ZsGreen reste stable au cours du temps, quelque soit la MOI. En revanche, le pourcentage de cellules exprimant la ZsGreen en association avec BAX ou TRAIL diminue au cours du temps, cette diminution étant d'autant plus marquée que la MOI est forte (*Figure 5b*).

La surexpression conjointe de BAX et TRAIL a été rapporté avoir un effet synergique sur l'apoptose induite dans les cellules tumorales pancréatiques (Wack *et al.* 2008). Une co-transduction des cellules MiaPaCa2 avec les particules virales portant les transgènes *BAX* et *TRAIL* a donc été réalisée. En parallèle, des cellules ont été transduites par le lentivirus contrôle ne transférant que la protéine ZsGreen. Au bout de 18 jours, un test de survie par le réactif MTT a été effectué. La *Figure 6* montre que BAX seul et TRAIL seul induisent une importante mort cellulaire (environ 80%) (*Figure 6*). L'utilisation combinée de *BAX* et *TRAIL* n'apporte pas, dans les conditions de l'expérience, d'effet synergique. Toutefois, le test de survie ayant été réalisé au bout de 18 jours, l'effet cytotoxique induit par BAX ou TRAIL avait peut-être atteint son maximum, empêchant l'observation d'un effet synergique. *BAX* et *TRAIL* sont des gènes pro-apoptotiques conduisant à un fort effet cytotoxique dans les cellules tumorales et pourront servir de gène à transférer grâce au système de ciblage mis au point avec l'anticorps anti-MUC4 dans l'éventualité d'une thérapie anti-cancéreuse.

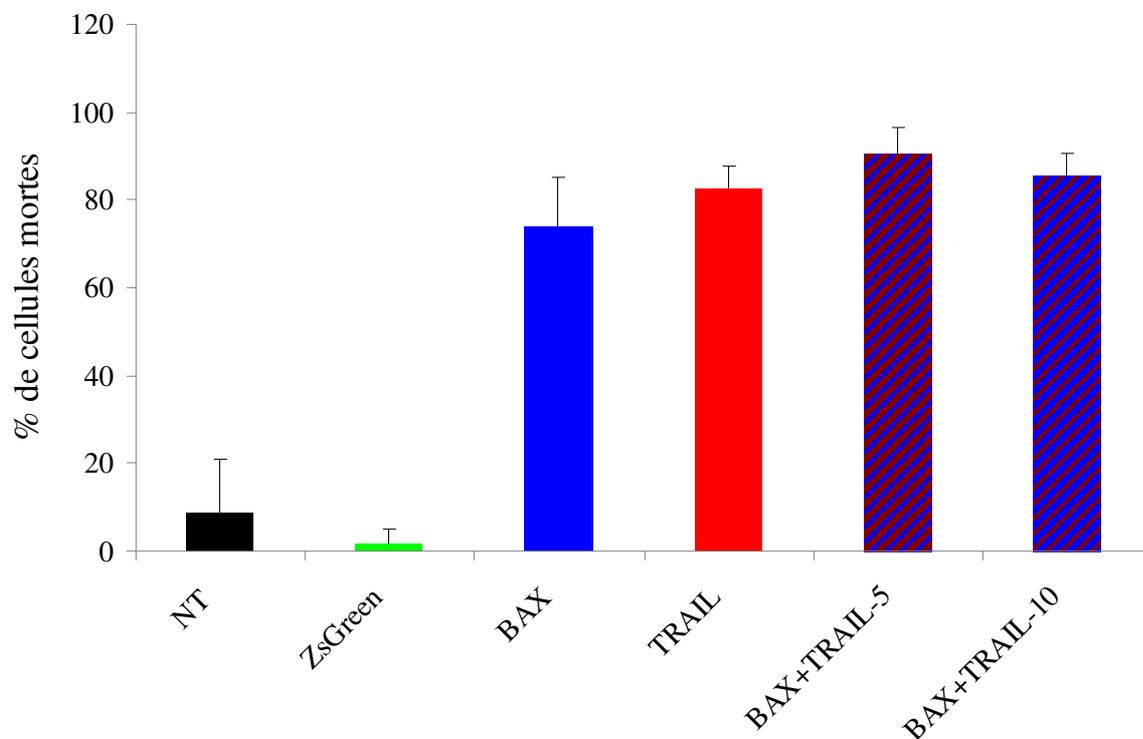
**a**



**b**



**Figure 5 : Mort cellulaire induite par BAX et TRAIL.** **a.** 50000 cellules MiaPaCa2 ont été transduites à des MOI croissantes (de 0 à 16) par les vecteurs pMND-BAX-IRES-ZsGreen, pMND-TRAIL-IRES-ZsGreen ou pMND-IRES-ZsGreen (contrôle négatif). Le pourcentage de cellules transduites est mesuré 13 jours après transduction par détection de la fluorescence de la protéine ZsGreen en cytométrie en flux. **b.** 50000 cellules MiaPaCa2 ont été transduites à MOI 8 par les vecteurs pMND-BAX-IRES-ZsGreen, pMND-TRAIL-IRES-ZsGreen ou pMND-IRES-ZsGreen (contrôle négatif MOI 10). Le pourcentage de cellules transduites est mesuré au cours du temps par détection de la fluorescence de la protéine ZsGreen en cytométrie en flux.



**Figure 6 : Effet simultané de BAX et TRAIL.** 50000 cellules MiaPaCa2 ont étéensemencées. Elles ont ensuite été transduites avec les vecteurs pMND-BAX-IRES-ZsGreen MOI10 (BAX) ou pMND-TRAIL-IRES-ZsGreen MOI10 (TRAIL) ou doublement transduites avec ces 2 vecteurs en simultané MOI 5+5 ou MOI 10+10 (BAX+TRAIL-5 et BAX+TRAIL-10 respectivement) ou avec le vecteur pMND-IRES-ZsGreen MOI 10 (GFP). Dix-huit jours de transduction après, un test de cytotoxicité a été effectué.

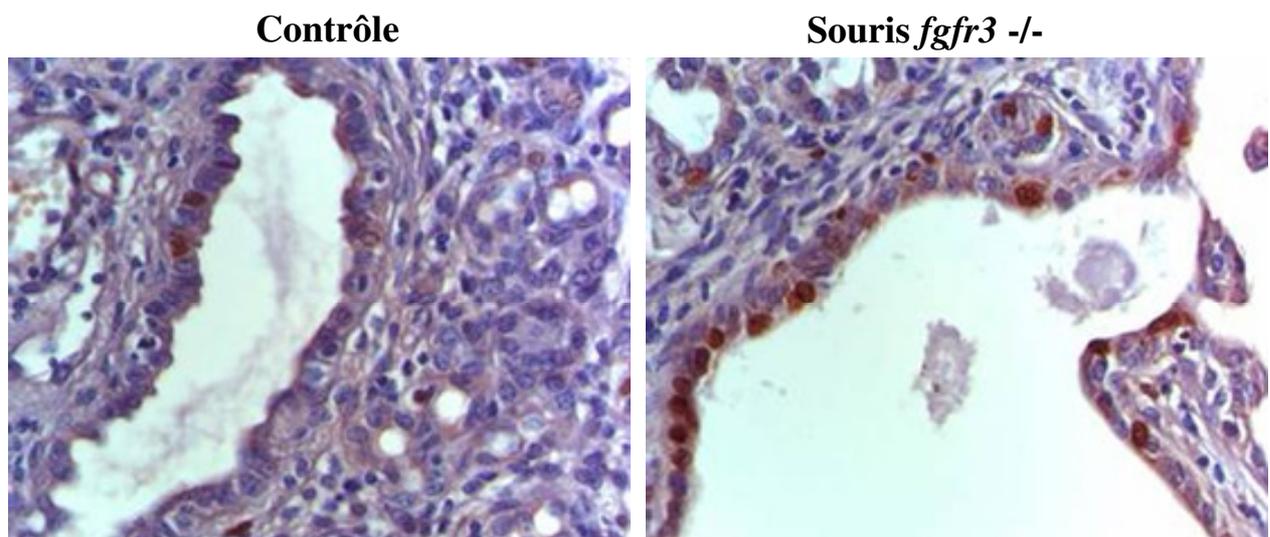
**Article 2**

**FGFR3 in pancreatic cancers:  
friend or foe?**

## I. Introduction.

Les récepteurs aux facteurs de croissance sont anormalement exprimés dans les lésions pancréatiques. Bien que les récepteurs aux FGFs aient été également identifiés dans les stades précoces et tardifs de la cancérogenèse pancréatique, des études précisant les mécanismes moléculaires empruntés et l'effet de leur modulation sur les tumeurs sont encore limités. L'expression de certains ligands et récepteurs de cette famille est dérégulée dans des lignées de cellules issues de cancers pancréatiques, ainsi que dans les cancers pancréatiques humains (Kornmann 1998). Par exemple, les ligands FGF1, FGF2 et FGF18 sont surexprimés et favorisent la croissance des cellules issues de carcinomes pancréatiques (Hu *et al.* 1999; Yamanaka *et al.* 1993). Cette surexpression des ligands est accompagnée d'une surexpression des récepteurs comme certains variants des FGFR1 et FGFR2 (Kornmann *et al.* 2002), ou de protéines facilitant la liaison des FGFs à leurs récepteurs comme la FGF binding protein-1 (FGF-BP1) (Tassi *et al.* 2006). Il est important de préciser que ces études ont toutes souligné un rôle pro-mitotique des FGFs et de leurs récepteurs dans l'ontogenèse et la tumorigenèse pancréatique.

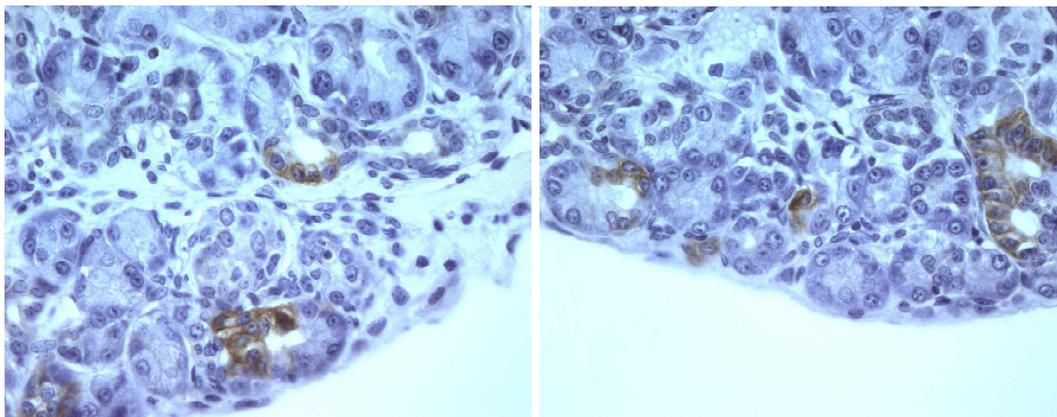
En 2007, l'impact de la signalisation du FGFR3 au cours du développement pancréatique normal a été analysé et il semble que dans des conditions physiologiques, il ait un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules épithéliales pancréatiques (Arnaud-Dabernat *et al.* 2007) (*Figure 1*).



**Figure 1 : Prolifération des cellules canalaire pancréatiques.** Un tissu pancréatique normal (contrôle) et un tissu extrait d'une souris *fgfr3*<sup>-/-</sup> ont été marqués au BrDU, montrant la prolifération cellulaire. Les cellules marquées d'une couleur marron sont en prolifération.

Le tissu pancréatique des souris *fgfr3*<sup>-/-</sup> montre une hyperprolifération des cellules canalaire pancréatiques démontrant l'effet inhibiteur du FGFR3 (Arnaud-Dabernat *et al.* 2007).

Il avait également été montré que l'expression de ce récepteur était allumée lors la régénération spontanée de l'épithélium pancréatique de souris surexprimant l'INF $\gamma$  dans les îlots de Langerhans (Arnaud-Dabernat *et al.* 2007), mais aussi lors de la régénération du tissu exocrine après une pancréatite induite par la céruléine (S. Arnaud-Dabernat et M. Kritzik, non publié) (Figure 2).



**Figure 2 : Expression du FGFR3 dans des tissus exocrines régénérés après une pancréatite induite avec la céruléine.** Le marquage du FGFR3 se manifeste par une couleur marron (S.Dabernat et M. Kritzik, non publié).

De plus, une autre étude du laboratoire a montré que l'expression forcée du FGFR3 dans des cellules bêta transformées de souris avait également un impact négatif sur leur croissance. Dans ce cadre nous avons émis l'hypothèse que le FGFR3 pourrait jouer un rôle inhibiteur dans la croissance des tumeurs d'adénocarcinomes pancréatiques. Nous avons donc construit notre projet de recherche autour de plusieurs points :

- 1) Etablir le profil d'expression des différentes isoformes du FGFR3 dans des lignées d'adénocarcinomes pancréatiques humains.
- 2) Analyser de quelle façon l'engagement du récepteur module la croissance et la survie cellulaires dans des lignées d'adénocarcinomes pancréatiques humains.
- 3) Tester *in vivo* si la modulation de l'activité des différentes isoformes du FGFR3 peut affecter la croissance des tumeurs pancréatiques humaines.
- 4) Analyser les différentes voies de signalisation impliquées dans la modulation du FGFR3 dans l'adénocarcinome pancréatique.
- 5) Etablir le profil d'expression du FGFR3 dans des échantillons de tumeurs pancréatiques humaines.

## II. Article 2.

### FGFR3 in pancreatic cancers: friend or foe?

Marie Lafitte<sup>1,2</sup>, Isabelle Moranvillier<sup>1,2</sup>, Stéphane Garcia<sup>3</sup>, Evelyne Peuchant<sup>1,2</sup>, Juan Iovanna<sup>3</sup>, Benoit Rousseau<sup>4</sup>, Pierre Dubus<sup>2</sup>, Véronique Guyonnet-Dupérat<sup>5</sup>, Geneviève Belleannée<sup>6</sup>, Medecin Montpellier<sup>7</sup>, Hubert de Verneuil<sup>1,2</sup>, François Moreau-Gaudry<sup>1,2,5</sup> and Sandrine Dabernat<sup>1,2\*</sup>

1 : INSERM U1035, Bordeaux, France

2 : Université Bordeaux Segalen, Bordeaux, France

3 : INSERM U624, Marseille, France

4 : Animalerie A2, Université Victor Segalen, Bordeaux, France

5 : Plate-forme de vectorologie, Université Victor Segalen, Bordeaux, France

6 : CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

7 : Tumorothèque de Montpellier, Montpellier, France

\*Corresponding author:

Université Bordeaux Segalen

INSERM U1035

146, rue Léo Saignat

33076 Bordeaux Cedex

Email: [sandrine.dabernat@u-bordeaux2.fr](mailto:sandrine.dabernat@u-bordeaux2.fr)

Phone: +33(0) 5 57 57 92 55

Fax: +33(0) 5 57 57 13 74

## ABSTRACT

**Introduction:** Activating mutations of FGFR3 have been evidenced in bladder, cervix tumors, and benign tumors of the skin. Transposition t(4:14) in multiple myelomas results in ectopic overexpression of FGFR3. We sought to determine whether FGFR3 could regulate pancreatic cancer properties. **Materials and methods:** FGFR3 forced expression was performed in several pancreatic cell lines. Colony formation, cell migration, cell proliferation and cell death were evaluated *in vitro*. FGFR3 forced expression impact was explored in xenografts. Cell signaling was dissected in tumors. RT-qPCR and Tissue Micro Arrays (TMA) were performed in human pancreatic tumors. **Results:** Surprisingly, FGFR3 had oncogene-specific properties in mesenchymal cells and negative impact on cell growth by inducing apoptosis and senescence in epithelial cells. These results were confirmed *in vivo* in xenografts overexpressing FGFR3. Distinct pathways were activated, STATs in epithelial and MAPKinases in mesenchymal cells, but they were identical for both splice variants. In human carcinoma tissues, levels of FGFR3 dropped in tumors as compared to normal tissue. **Conclusion:** Our results suggest that FGFR3 might be an oncogene in mesenchymal cells and a tumor suppressor in epithelial cells. In light of the present findings, diverse outcome of activating mutations in human tumors can be explained. This new hypothesis that FGFR3 can harbor both tumor suppressive and oncogenic properties should be considered in targeted therapies involving specific tyrosine kinase inhibitors, which, if used in the wrong cell context, might have adverse effects.

## INTRODUCTION

The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) belongs to a family of tyrosine kinase receptors consisting in 5 receptors, FGFR1 to 5 [1]. Activating somatic mutations of FGFR3 were first characterized in bladder cancer and cervix cancer (30% and 25%, respectively, [2]). Mutations occurred preferentially in non-muscle invasive disease (50-60%) and much less commonly in muscle-invasive, suggesting that these alterations could be linked to a favorable course of the disease in noninvasive papillary bladder cancer [3]. Seborrhic keratoses and epidermal nevi, which are benign tumors of the skin very rarely progressing into malignant disease, can also present activating mutations of FGFR3 (39% and 33%, respectively, reviewed in [4]). In multiple myelomas, 15% of the cases harbor a t(4:14) intergenic translocation, which brings FGFR3 gene under the control of the strong IGH promoter, inducing FGFR3 overexpression [5]. FGFR3 is supposed to contribute to the oncogenic effect of the translocation because forced expression of an activated mutant in different hematologic models was found transforming [6]. Of interest, mutations in colorectal tumors (only 5%) were possibly inactivating mutations [7]. Decreased expression of FGFR3 was found in colorectal cancer cell lines [8, 9] and tumors [9]. Moreover, aberrant FGFR3 splicing inactivating the protein occurred frequently in colorectal tumors (13 of 36, 36%) devoid of detectable WT FGFR3 transcripts. Thus, FGFR3 pathway appears to be affected in human tumors, the receptor being considered as an oncogene. By contrast, in normal tissues, FGFR3 seems to have negative impact on cell growth, the most striking example being its impact on bone development. In growth plates of developing long bones, FGFR3 (IIIc) negatively controls cell proliferation and induces chondrocyte apoptosis in late embryonic stages (reviewed in [10]). In the same way, mice lacking FGFR3 receptor showed extended bone length [11] and transgenic mice with active mutants are dwarfs [12].

FGF signaling was found active in pancreatic cell lines *in vitro* and FGF2 treatment had no effect on cell proliferation but increased colony formation [13], while FGF10 promoted cell migration and invasion with FGFR2-IIIb [14]. FGFR2-IIIc had similar effects [15]. FGFR1 splice variants seem to have opposite effects since FGFR1-IIIb inhibits while FGFR1-IIIc enhances pancreatic adenocarcinoma cell malignancy [16, 17]. In addition, FGFR4 through FGF19 stimulation contributes to tumor suppression by limiting cell migration and increasing cell attachment [18]. In normal pancreatic tissue, FGFR3-IIIb limits endocrine progenitor proliferation [19]. Very recently, one report published a missense mutation in FGFR3 gene in pancreatic endocrine tumors without describing the effects of this mutation [20].

To date, very little is known on FGFR3 actions in pancreatic tumors despite the role of the receptor in other tumor types and the implication of other FGF members in this deadly disease. In this report, we explored the actions of the two alternatively spliced IIIb and IIIc variants in modulating pancreatic cancer cell behavior.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals and pancreatic cell lines.**

The NOD/Shi-SCID IL2R<sup>□null</sup> mice were produced and housed at the University Bordeaux Segalen animal facility A2, according to the rules and regulations governed and enforced by the Institutional Animal Care and Use Committee. The animal facility institutional agreement number is A33063916. Animals included in protocols were between 6 and 8 weeks old.

The BXPC3 and CAPAN-2 cell lines were kindly provided by Joel Tardivel-Lacombe (INSERM U624, Marseille, France). The cells were maintained in RPMI (Invitrogen, Saint Aubin, France) with 10% Fetal Calf Serum (FCS, Invitrogen) with Penicillin/Streptomycin 1/100 (Invitrogen). MIAPACA2 and PANC1 cells were purchased from the ATCC (Teddington, United Kingdom) and maintained in DMEM (Invitrogen) with 10% FCS and 1/100 Penicillin/Streptomycin.

### **Tissue specimens.**

Tissue specimens of human pancreatic carcinoma and normal pancreas were obtained from patients undergoing surgery for pancreatic cancer after obtaining informed consent from all patients. RNAs were obtained from tumor collections of Bordeaux and Montpellier. A total of 43 tissue samples were used, including 33 from patients with pancreatic adenocarcinoma and 10 normal pancreatic associated tissues. Tissue arrays contained 6 normal pancreatic tissues, 88 pancreatic ductal adenocarcinomas, 30 intraductal papillary mucinous neoplasms and 25 pancreatic endocrine carcinomas. Tissue arrays were stained with anti-FGFR3 antibody using the Duolink® system (Eurogentec, Angers, France), according to the recommended protocol. Primary antibody detection was carried out by a very specific PCR system, which gave a punctuated brown signal where FGFR3 was present.

### **Vector construction, production and transduction of cells**

CMV promoter of the pIRES2-ZsGreen1 vector (Clontech, Saint Germain en Laye, France) was replaced by MND promoter in order to avoid methylation of CpG islands. Then this plasmid pMND-IRES2-ZsGreen1 was used as recipient vector of all the constructs. FGFR3-IIIb and FGFR3-IIIc genes were respectively provided by David Cappellen (Histologie et pathologie moléculaire des tumeurs, Bordeaux, France) and Pavel Krejci (Medical Genetics Institute, Los Angeles, California) and cloned upstream the IRES sequence. FGFR3 expression was concomitant with the ZsGreen reporter gene. FGFR3-IIIb and FGFR3-IIIc overexpressing cell lines were obtained by transduction of the lentiviral plasmids containing the different constructs reaching about 70% of efficiency. Control cells were produced by transduction of the empty pMND-IRES-ZsGreen vector. For xenografts, transduced cells were sorted by a BD FACS ARIA cell sorter (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

All lentiviral vectors were produced by calcium phosphate mediated triple transient transfection of 293T cells with one of the vector transfer constructs, the packaging construct pCMV8.91 (gift from Dr. Verma, La Jolla, CA-USA) and VSV-G construct psPAX2 (gift from Dr. Trono, Lausanne, Switzerland). The viruses were concentrated by ultracentrifugation. Virus titrations were determined by flow cytometry as % of ZsGreen<sup>+</sup> cells.

### **Isolation of RNA, cDNA synthesis, and quantitative real-time PCR Analysis**

Total RNA was isolated from subconfluent cultures or frozen pancreatic tumor tissue specimens using Trizol® according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Ten µg of RNA were treated by DNase (Ambion, Saint Aubin, France) and then absence of genomic DNA contamination was checked by PCR using the housekeeping gene RPLP0 (Ribosomal Protein Large P0) primers. cDNAs from 1µg of RNA/DNA free were synthesized with random hexamers using Reverse transcriptase cDNA synthesis kit (Roche Applied Science, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR assays were performed with the SYBR® Green Master Mix and carried out on a Stratagene MX-3005P system (Stratagene, Massy, France). All reactions were performed in a total volume of 25 µl and contained 2 µl of cDNA and 6.25 µM of each primer set. Each sample was analyzed in triplicate. Negative controls without reverse transcriptase were performed. Two stable housekeeping genes were used as internal gene expression references, the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene and the RPLP0 gene. Transcript

levels in the cells and tumors were evaluated by a quantitative method using internal gene reference for normalization.

Thermal cycling was performed at 95°C for 10 min followed by 40 cycles comprising each a denaturation step at 95°C for 30 s, and an annealing/extension step at 60°C for 45 s. Amplification of the appropriate product was verified by continuous monitoring fluorescence through the dissociation temperature of the PCR product at a temperature transition rate of 0.1°C/s to generate a melting curve. The primers used were : RPLP0-Forward 5'-tggagggtgtccgcaatgtt-3', RPLP0-Reverse 5'-cttcggaactggaaaagtc-3'; GAPDH-Forward 5'-gagtcacggatttggtcgt-3', GAPDH-Reverse 5'-gatctcgctcctggaagatg-3'; FGFR3-IIIb-Forward 5'-tcaagtctggatcagtgagagt-3', FGFR3-IIIb-Reverse 5'-cggggtgggcttcttct-3'; FGFR3-IIIc-Forward 5'-gagctagagttctctcctt-3', FGFR3-IIIc-Reverse 5'-ccacgcagatgatgagaaa-3'; Vimentine-Forward 5'-ccagtgcgtgaaatggaag-3', Vimentine-Reverse 5'-tcaaggtcatcgtgatgctg-3'; E-Cadherin-Forward 5'-gaccttaatggcttcctc-3', E-Cadherin-Reverse 5'-tctgtgcacacctggaattg-3'. Primers for the tested FGFs can be provided on demand. In each case, the primers were designed to bind two different exons, preventing errors in mRNA quantification due to genomic DNA contamination.

### **Protein extraction and western-blotting**

Protein extracts were prepared in RIPA buffer and processed for western blotting. Membranes were incubated with the following primary antibodies: FGFR3 (SIGMA-ALDRICH, Lyon, France), Phospho-p44/p42 MAPK (Erk1/2), p44/p42 MAPK, Phospho SAPK/JNK, SAPK/JNK, Phospho Akt, Akt, Caspase-3, Caspase-9, Phospho-STAT1, Phospho-STAT3, BAX, p21, p27, Phospho-P38, p38, ( all from Cell Signaling, Saint-Quentin en Yvelines, France). Anti-GAPDH antibody (Cell Signaling) was used to assess equal loading of the samples. Primary antibodies were detected with specific anti-rabbit or anti-mouse-IgG-HRP (Cell Signaling). Proteins were visualized using the ECL Plus detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France) following the manufacturer's instructions in a LAS-3000 image reader (Fujifilm, Tokyo, Japan). Quantification by densitometry was performed with the ImageJ software using GAPDH expression level for normalization.

### **Cell cycle analysis**

Non synchronized subconfluent cells were harvested and washed twice with PBS then fixed with 70% ethanol in water overnight at 4°C. Cells were washed twice with PBS and incubated

with a mix containing RNase (1mg/ml, SIGMA-ALDRICH) to avoid RNA contamination and PBS-Propidium iodide (0.5µg/ml, SIGMA-ALDRICH) for DNA staining for 15 min. The samples were examined by flow cytometry on a BD FACS CANTO II apparatus and the data were analyzed with BD FACSDiva software (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

### **SA-β-Galactosidase labeling**

Cells were washed with PBS twice and fixed for 4 min with 3% PFA then washed twice again with PBS. Cells were incubated in a 96 wells plate with a mix (1vol/20vol) of two solutions containing respectively X-Gal (20mg/ml X-Gal in dimethylformaldehyde) and 5mM ferricyanure, 5mM ferrocyanure, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 150mM NaCl, and 30mM Citric acid/phosphate pH=6 for 24 hours at 37°C (all from SIGMA-ALDRICH). Cells were washed with PBS and SA-β-gal activity was observed by detection of a blue stain with an inverted Nikon Microscope (Eclipse Ti Nikon, Champigny sur Marne, France). Pictures were taken with the NIS-Elements Nikon software. For SA-β-gal positive staining cell quantification, 1935, 2809 and 3159 cells were counted on twenty separate fields for CAPAN2 control, III-b and III-c respectively, 2345, 2718 and 2563 cells were counted on twenty separate fields for MIAPACA2 control, III-b and III-c respectively and the means of (100\*number of blue cells/number of total cells) were calculated corresponding to the percent of SA-β-gal positive cells.

### **Trypan blue viability assay**

Ten thousands cells were plated in 96-well plates in appropriate medium. Two days later, cells were harvested by trypsinization and stained with a trypan blue solution (0.04% w/v, Invitrogen), and counted on a Cellometer Auto T4 counter (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). Means of live cells numbers were calculated every 2 or 3 days until 9 days after seeding.

### **Colony formation assays and cell migration assay**

Two hundred cells were plated per well in 6-well plates with appropriated medium and incubated in a humidified incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 1 month. Colonies were fixed with acetic acid (Carlo Erba reagents, Val de reuil, France) and stained with 0.5% crystal violet (SIGMA-ALDRICH) in acetic acid for 15min. Plates were washed with water and colonies were counted by 3 persons. For migration assays, cells were harvested by

trypsinization, centrifuged and resuspended in serum free medium. 700µl of Medium with 10%FCS were added to 24-well plates. Culture inserts with membranes of diameter of 8µm (Millipore, Molsheim, France) were placed in the wells. Then cells were added to the culture inserts. The cells migrated from the top to the bottom of the culture insert membrane to reach the serum containing medium in the well. After 48h, the culture inserts were fixed in 4% PFA (SIGMA-ALDRICH) in PBS for 2min, washed twice in PBS, fixed in methanol for 20 min, washed twice in PBS and then stained with 0.5% crystal violet (SIGMA-ALDRICH) in acid acetic for 15min. After 2 washes in PBS, the cells still on the top of the membrane were removed with a swab and the cells on the bottom of the membrane were counted under a light microscope.

### **Xenografts of PDAC cell lines**

For subcutaneous xenografts, groups of at least 5 mice were anesthetized with isoflurane.  $8 \times 10^5$  cells in 100µl serum free medium were injected in the right flanks. When tumors were visible, measures with a calibrator were done 3 times a week. When tumors reached about 300 mm<sup>3</sup>, they were resected and weighed.

### **Statistical analysis**

*In vitro* results are expressed as mean  $\pm$  SD. Results *in vivo* are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical tests were performed with unpaired, bilateral Student's t tests.

## RESULTS

### FGFR3 expression in pancreatic carcinoma cell lines

Four pancreatic carcinoma cell lines were tested for FGFR3 expression by western-blot. BXPC3 cells expressed the highest levels of the receptor, and the MIAPACA2 cells the lowest (Figure 1A). The two other tested cell lines displayed similar intermediate FGFR3 protein levels. RT-qPCRs confirmed the western-blot data and further showed that FGFR3-IIIb isoform was the main form, except for the MIAPACA2 cells (Figure 1B).

Since FGFR-IIIb isoforms are preferentially expressed in cells of epithelial origin and FGFR-IIIc isoforms in mesenchymal cells [21], we looked whether FGFR3 splice variants expression was linked to the differentiation state of the cell lines. RT-qPCRs were performed to assess the levels of expression of E-cadherin and vimentin, markers of epithelial and mesenchymal cells, respectively (Figure 1C). According to the tested markers, the CAPAN2 and BXPC3 cells displayed epithelial characteristics (strong E-cadherin expression, almost no vimentin expression). The MIAPACA2 line was more mesenchymal-like (no E-cadherin expression and strong vimentin expression) and PANC1 cells displayed an intermediate phenotype since they still expressed E-cadherin but did express high levels of vimentin. In culture, these latter cells retained some characteristics of epithelial cells in terms of cell shape, like the CAPAN2 and BXPC3 cells, while the MIAPACA2 cells resembled fibroblasts (Figure 1D). Thus, our experimental cell models were distinguishable in three categories: the epithelial-like cells (BXPC3 and CAPAN2), the mesenchymal-like cells (MIAPACA2) and cells with intermediate phenotype (PANC1). In light of this data, it appeared that in epithelial-like pancreatic cells (BXPC3 and CAPAN2), the major splice variant was the FGFR3-IIIb (77% and 79%, respectively), while in the MIAPACA2 mesenchymal-like cells, it was the FGFR3-IIIc (87%). PANC1, the cell line with the intermediate phenotype retained higher FGFR3-IIIb splice variant expression (68%).

### Effects of FGFR3 on colony formation and cell migration

To test the impact of FGFR3 isoforms forced expression in pancreatic cells, complementary DNAs (cDNAs) were cloned in a lentivector designed to force the expression of either the IIIb or the IIIc splice variants of the receptor and to visualize and sort the transduced cells with the ZsGreen fluorescent protein reporter gene. A control lentivector did not contain any FGFR3 cDNAs. First, we evaluated the capacities of the cells to form clones in low density cultures.

Colony formation assays showed that forced expression of both FGFR3-IIIb and IIIc increased the number of colonies as compared to the control condition, except for the IIIb splice variant in the BXPC3 cells (Table 1). In CAPAN2 cells, the areas of the colonies were smaller with FGFR3 overexpression (Figure 2A). Clones overexpressing high levels of FGFR3 appeared much smaller than clones expressing lower levels as attested by ZsGreen protein fluorescence intensity (Figure 2A, arrows). By contrast, areas of FGFR3-MIAPACA2 colonies were significantly wider compared to control (Figure 2B).

Cell migration assays showed that FGFR3-IIIb or -IIIc overexpression significantly enhanced cell migration *in vitro* in the CAPAN2 cells and the MIAPACA2 cells (Figure 2C and 2D, respectively).

Thus, FGFR3 overexpression promoted colony formation and cell migration, regardless of the FGFR3 splice variant. However, FGFR3 impacted the size of the colonies differently in CAPAN2 and MIAPACA2 cells.

### **FGFR3 impacts pancreatic epithelial and mesenchymal cells differently**

Proliferation assays were carried out by direct cell counting of cells with epithelial or mesenchymal phenotypes. Forced expression of both FGFR3 splice variants in CAPAN2 cells reduced the cell proliferation (Figure 3A, top panel), while opposite effects were observed for MIAPACA2 cells (Figure 3B, top panel). Cell cycle analysis by flow cytometry showed modest effects. In CAPAN2 cells, forced expression of FGFR3 induced a slight but significant increase of cells in the G1 phase, while proportions of cells in S and G2/M decreased (Figure 3A, middle panel), suggesting accumulation of cells in G0/G1. MIAPACA2 cell percentages in G1 and G2/M phases were unchanged, while slightly more cells were seen in S phase (Figure 3B, middle panel), suggesting a mild increased proliferation rate. During cell cycle analysis, we observed a significant and important accumulation of cells in sub-G1 for CAPAN2 cells (3.7-fold for FGFR3-IIIb and 2.7-fold for FGFR3-IIIc), suggesting that FGFR3 induced apoptosis (Figure 3A, middle panel). For the MIAPACA2 cell line, cell proportions in sub-G1 were very low regardless of the condition, since it was never higher than 8% (Figure 3B, middle panel).

Although the previous data suggested that FGFR3 induced apoptosis in CAPAN2 cells, we could still see over time cells that appeared viable by light microscopy. Viable cells stopping proliferation, but not proceeding to apoptosis, could be cells undergoing senescence. To test

that FGFR3 signal led to senescence, we conducted acidic beta galactosidase staining, which has been associated with the senescent phenotype in numerous studies (reviewed in [22]). We observed a significant increase in the number of senescent cells in FGFR3-IIIb and -IIIc overexpressing cells compared with the control cells (Figure 3A, bottom panel) in CAPAN2 cells. MIAPACA2 cells displayed lower basal senescence (only about 8% while it was about 25% for CAPAN2 cells, in control cells), which was even lower in the presence of forced expression of either receptor splice variants (Figure 3B, bottom panel).

The different responses of the cell lines to FGFR3 signal could be related to distinct status in available FGFs. We performed all the *in vitro* experiments in complete media, without modulating the levels of FGFs. The reason was that all the PDAC cell lines expressed endogenous FGFs that could bind either splice variants of the receptor (Supplemental Figure 1). Indeed, RT-qPCR aimed to evaluate the relative levels of known ligands for FGFR3 in the parental cells showed that FGF4 and FGF23 were not detectable. CAPAN2 cells expressed FGF17 and FGF18, also present in the MIAPACA2 cells at similar levels. Interestingly however, distinct profiles were obtained for other FGFs. Strikingly, MIAPACA2 and PANC1 cells expressed very high levels of FGF2 mRNAs, which were not detectable in the epithelial-like cells. Moreover, the CAPAN2 cells expressed FGF9, which was also detected at a lower level in BXPC3s, but not the two other cell lines. Thus it seems that distinct autocrine loops are present in the PDAC cell lines for FGFR3. FGF2 was clearly associated with the MIAPACA2 and the PANC1 cells, but not the epithelial cells.

### **FGFR3 controlled subcutaneous tumor growth according to the cell line phenotype and engaged diverse intracellular signaling**

To further test whether the effects of FGFR3 seen *in vitro* were valid *in vivo*, transduced cells, sorted by flow cytometry were xenografted in immune-compromised mice and tumor progression was examined. Very interestingly, overexpression of both FGFR3-IIIb and -IIIc strongly promoted PANC1 (2-3-fold increase, Figure 4A) and even more the MIAPACA2 (13-17-fold increase, Figure 4A) but inhibited CAPAN2 and BXPC3 tumor growth (about 2-fold decrease, Figure 4A). Noticeably, establishment of single clones overexpressing FGFR3-IIIc in CAPAN2 cells showed that tumor growth inhibition was dependent on FGFR3-IIIc expression levels ( $R^2$  about 0.87, Supplemental Figure 2). Thus, FGFR3 behaved as a tumor suppressor in pancreatic cells with an epithelial phenotype and like an oncogene in mesenchymal-like cells.

We attempted to dissect which pathways were active in the protein extracts of tumors overexpressing FGFR3 with the strongest phenotypes (CAPAN2 and MIAPACA2 cells). In FGFR3-CAPAN2 cells activated MAP Kinases were unchanged (Figure 4B), but in MIAPACA2 cells both ERKs and P38 were over-activated (Figure 4B). JNKs were detectable only in CAPAN2 cells and were unchanged (not shown). Conversely, phosphorylations of STATs were found strongly increased by FGFR3 overexpression in CAPAN2 cells and were not detected in MIAPACA2 cells. Although AKT was present in all the tumor extracts, no changes were observed in activated AKT (not shown). The proteins P21 and P27, downstream effectors of FGFR3 in chondrocytes [10] were mildly increased in FGFR3-CAPAN2 tumors (Figure 4B), but not in the MIAPACA2 (not detectable). Since apoptosis was found up-regulated in FGFR3-CAPAN2 cells, we looked at apoptosis markers. BAX signal was stronger in FGFR3 conditions, while BCL2 remained unchanged (Figure 4B). Thus the balance of anti-apoptotic/pro-apoptotic proteins was moved towards apoptosis. This was further confirmed by observing increased levels of both cleaved caspase 9 and caspase 3 (Figure 4B). All the above cited proteins were evaluated in MIAPACA2 cells. Levels were similar in all the conditions (data not shown), except for BCL2 and BAX, found slightly increased in FGFR3-IIIb-MIAPACA2 (Figure 4B), but with a balance of anti-apoptotic/pro-apoptotic proteins unchanged.

Senescence often depends on P53 activation or stabilization. The CAPAN2 cells were the only cell line in our hands bearing wild type copies of P53. Total P53 was not changed in FGFR3 overexpressing cells. Phospho-serine 6, 9, 20 and 392 were detected but remained unchanged. Phospho-threonine 81, serine 37 and serine 46 were not detected (supplemental Figure 3). The same analysis was not carried out in the MIAPACA2 cells since they carry inactive mutants of P53.

Autophagy can promote both cell death and cell survival. We looked at LC3B protein conversion status and detected both LC3B-I and LC3B-II peptides indicating that autophagy is active in CAPAN2 cells. However, FGFR3 did not induce any change in LC3B-I cleavage as analyzed by measuring band intensity of LC3B-II/LC3B-I (Figure 4B). In MIAPACA2 cells, the basal levels of both LC3B forms were increased in the presence of FGFR3 overexpression, together with the rate of LC3B-I cleavage (Figure 4B, 1.4-fold increase). This suggests that FGFR3 promoted autophagy in the MIAPACA2 cells.

## **FGFR3 expression is downregulated in human pancreatic tumor tissues**

FGFR3 immune signal was found in normal pancreas sections in the pancreatic islets. It was co-localized with insulin-positive cells (Figure 5a-c) and FGFR3 was also present in non beta cells as evidenced by the FGFR3-only positive cells in islets (Figure 5c). Moreover, a weak signal was present in ductal cells (Figure 5a, b). Both splice variants appeared to be equally abundant (Table 2). We performed RT-qPCR on normal and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) samples. We found a significant decrease of FGFR3 expression in PDAC as compared to normal pancreas, regardless of the splice variant (Table 2). Thus, at the mRNA level, FGFR3 expression appeared decreased in pancreatic adenocarcinoma as compared to normal pancreas.

We examined patterns of total FGFR3 expression by immunohistochemistry in tissue microarrays carrying different pancreatic carcinomas. FGFR3 expression was scored according to the intensity of the staining found in the normal pancreas. Only 32% of the pancreatic endocrine carcinomas (PEC) showed intense FGFR3 staining (similar to FGFR3 staining in islets), 56% displayed weaker signals and 12% had lost FGFR3 immune-positivity (Figure 5, d-f). Similarly, more than 63% of the intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) were negative for FGFR3 and about 30% of the tested PDACs (Figure 5g and j, respectively). When the two latter tumor types appeared with weak FGFR3 staining, corresponding to the intensity of signal found in ducts and acinar cells, all the cells were equally stained (30% of the IPMNs and almost 49% of the PDACs, figure 5h and k, respectively). Of note, a low number of IPMNs (about 7%) and about 20% of PDACs displayed strong signal for FGFR3. However, in these cases, the staining was very heterogeneous with regions strongly expressing FGFR3, zones with weak staining and numerous negative cells (Figure 5i and l). Thus, about 70% of the PECs showed partial or total loss of FGFR3 signal. 63% of the IPMNs and 30% of the PDACs showed total loss of FGFR3 signal. When FGFR3 staining looked strong in these tumors, it was also highly heterogeneous.

## DISCUSSION

The work presented here explored for the first time the implications of FGFR3 in pancreatic cancers. The strength of our experimental design was to overexpress human FGFR3-IIIb and -IIIc splice variants in several pancreatic carcinoma cell lines with different states of differentiation. We found that both FGFR3-IIIb and IIIc behaved like oncogenes in cells with a mesenchymal phenotype and as tumor suppressors in cells with an epithelial phenotype.

### **FGFR3 mutations impact in various tumors can be revisited in light of the present study**

Early data were converging towards oncogenic properties of FGFR3, however with some puzzling observations. First, the receptor has a negative regulatory role during bone development (see below), and patients with FGFR3-induced skeletal disorders are not reported to have higher incidence of cancer, yet. In colorectal cancers, a group noticed frequent inactivation of the receptor or downregulation of the protein [8] opening the possibility that FGFR3 regulated negatively colorectal carcinomas. Moreover, frequent loss of heterozygosity of the chromosomal region carrying FGFR3 gene (the 4p16.3 locus) has been characterized, suggesting that this region carries a tumor suppressor gene [23]. In that context, it was puzzling to consider FGFR3 as an oncogene in this locus. Later on, critical data showed that there was a significant association of loss of FGFR3 and tumor stage in high grade urothelial bladder cancers [24]. Furthermore, FGFR3 mutations were associated with early, non invasive, low grade papillary tumors (75%) and never found in carcinoma in situ [25]. Consequently, it is more and more admitted that active mutants of FGFR3 are associated with low grade tumors in urothelial cancers and that possible LOH at FGFR3 locus might accompany the switch to higher grades (reviewed in [26]). Thus, in urothelial cancers, mutations in FGFR3 first identified as an oncogene, are now associated to good prognosis cancers. This latter possibility is further corroborated by observations made in seborrheic keratoses and epidermal nevi. They are benign tumors of the skin very rarely progressing into malignant disease, and they also present high rates of activating mutations of FGFR3 (39% and 33%, respectively (reviewed in [4]), suggesting a protective role of increased FGFR3 signal in these models, of epithelial origin. Our data support the fact that FGFR3 signal in epithelial context might actively participate to limit loss of proliferation control, and inhibit the switch to malignant disease. In pancreatic cancer, this hypothesis is in agreement with the loss of expression found in RNA and tissue samples of pancreatic cancers (the present work).

Our results in MIAPACA2 cells support the notion that in tumors originating from mesenchymal cells, FGFR3 is an oncogene. Indeed, in multiple myelomas, the chromosomal translocation t(4;14)(p16.3;q32) results in ectopic overexpression of FGFR3 [5]. FGFR3 was found later oncogenic in hematopoietic cells [6] and in 3T3 fibroblast, but not in the T24 epithelial cells [27]. In the same way, in other soft tissue tumors such as synovial carcinomas or rhabdomyosarcomas, FGFR3 was involved in the malignant phenotype [28, 29].

The present data also raise the possibility that FGFR3 has biphasic effects during multistage carcinogenesis, acting first as an oncogene. After additional mutations have occurred in the developing tumor, decoupling FGFR3 from its canonical pathway (RAS/MAP kinases), FGFR3 signal might be redirected to other intracellular factors, limiting tumor progression through oncogene-induced senescence via STATs activation, P21 and P27 induction and apoptosis enhancement. Then loss of FGFR3 would be beneficial to tumor progression (Figure 6). In the same way, epithelial to mesenchymal phenotype transition in the tumor would reveal FGFR3 as an oncogene.

It is troubling to notice the many common properties shared by FGFR2 and FGFR3. For example, in thyroid cancer cells, FGFR2 inhibited epithelial cell proliferation but promoted cell proliferation of mouse 3T3 cells [30]. Moreover, FGFR2 is now commonly admitted as a tumor suppressor in several carcinomas and its tumor protective role might arise from oncogene-induced senescence (reviewed in [1]). Similar roles can also be pointed out during normal development, since activating mutations of FGFR2 cause several skeletal disorders in humans (reviewed in [31]). Thus considering FGFR2 properties, it is reasonable to consider a tumor suppressive action of FGFR3.

### **Molecular mechanisms of FGFR3 signals in PDAC cells**

The most relevant finding of this study is the tumor suppressive properties of FGFR3 in pancreatic ductal adenocarcinoma epithelial cells. Our flow cytometry results suggest that cell cycle arrest and apoptosis were induced in CAPAN2 cells. Of interest, these properties have long been demonstrated in chondrocytes. In growth plates of developing long bones, FGFR3 (IIIc) negatively controls cell proliferation and induces chondrocyte apoptosis in late embryonic stages (reviewed in [10]) and noticeably, effects depend on STATs activation by the receptor. This, together with induction of senescence could account for the loss of cell numbers observed in proliferation assays. It has been shown recently that FGFR3-IIIc can

induce premature reversible senescence in chondrocytes [32]. Authors found, like us, that P53 was active in their cells but that FGFR3-induced senescence was independent of P53. In our hand, the main difference between the epithelial-like and the mesenchymal-like cell response to FGFR3 signal was the activation of STATs, which can elicit senescence response independent of P53 [33]. Since we found that in FGFR3 overexpressing cells, P21 was induced, it is possible that activated STATs directly activated P21 gene promoter, as earlier described [34].

FGFR3 oncogenic effect seemed to be conveyed by MAP kinases activation in the MIAPACA2 cells, even if several studies report that KRAS is mutated in that cell line, as in most PDAC cells. It means that an alternative pathway transmitted FGFR3 signal in those cells to over-activate MAP kinases. This activation but not that of STATs is similar to what was found in multiple myelomas [35]. The differences in percentages found in flow cytometry analyses could not explain the differences in cell counts. It is possible that the higher rate of autophagy contributes to cell growth promotion in these cells.

Taken together, these results suggest that the different impacts of FGFR3 overexpression clearly relate to different signaling pathways active and/or available in the considered cell.

Distinct autocrine loops were evidenced in PDAC cells. It is possible that opposite effects were FGF-dependent (FGF2 for the oncogenic effect and FGF9 for the tumor suppressive effect), the role of FGF2 being supported by previous studies ([13] for example) but more work is needed to test the dependency of FGFR3 to FGFs levels, in particular, strength of FGFR3 kinase activation should be related to the observed phenotype.

In conclusion, our results analyzed in the context of the observations made for FGFR3 in tumorigenesis could explain why in epithelial cancers FGFR3 activating mutations were associated with good prognosis tumors whereas in soft tissue cancers, FGFR3 promoted tumor progression. More importantly, this work might open a new debate on the use of FGFR3 inhibitors in anticancer therapy, according to the cancer type and to FGFR3 expression status. It is worthy extending this observation to non-selective targeting of FGFRs, which should be used even more cautiously, since in that context, variations of response of all FGFRs need to be considered.

## AKNOWLEDGEMENTS

The Ligue contre le cancer, INCA project, the tumorothèque of bordeaux, Jean-Max Pasquet, Alice Bibeyran, Pierre Costet, The plateforme of histologie, Aline Costet.

## REFERENCES

1. Turner N, Grose R: **Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer.** *Nat Rev Cancer* 2010, **10**(2):116-129.
2. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F: **Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas.** *Nat Genet* 1999, **23**(1):18-20.
3. Hernandez S, Lopez-Knowles E, Lloreta J, Kogevinas M, Amoros A, Tardon A, Carrato A, Serra C, Malats N, Real FX: **Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(22):3664-3671.
4. Hernandez S, Toll A, Baselga E, Ribe A, Azua-Romeo J, Pujol RM, Real FX: **Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in epidermal nevi and associated low grade bladder tumors.** *J Invest Dermatol* 2007, **127**(7):1664-1666.
5. Chesi M, Nardini E, Brents LA, Schrock E, Ried T, Kuehl WM, Bergsagel PL: **Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3.** *Nat Genet* 1997, **16**(3):260-264.
6. Li Z, Zhu YX, Plowright EE, Bergsagel PL, Chesi M, Patterson B, Hawley TS, Hawley RG, Stewart AK: **The myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 is transforming in hematopoietic cells.** *Blood* 2001, **97**(8):2413-2419.
7. Jang JH, Shin KH, Park JG: **Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers.** *Cancer Res* 2001, **61**(9):3541-3543.
8. Jang JH, Shin KH, Park YJ, Lee RJ, McKeehan WL, Park JG: **Novel transcripts of fibroblast growth factor receptor 3 reveal aberrant splicing and activation of cryptic splice sequences in colorectal cancer.** *Cancer Res* 2000, **60**(15):4049-4052.
9. Sonvilla G, Allerstorfer S, Heinzle C, Stattner S, Karner J, Klimpfinger M, Wrba F, Fischer H, Gauglhofer C, Spiegl-Kreinecker S *et al*: **Fibroblast growth factor receptor 3-IIIc mediates colorectal cancer growth and migration.** *Br J Cancer* 2010, **102**(7):1145-1156.
10. L'Hote CG, Knowles MA: **Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis.** *Exp Cell Res* 2005, **304**(2):417-431.
11. Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM: **Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3.** *Nat Genet* 1996, **12**(4):390-397.
12. Li C, Chen L, Iwata T, Kitagawa M, Fu XY, Deng CX: **A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors.** *Hum Mol Genet* 1999, **8**(1):35-44.
13. Leung HY, Gullick WJ, Lemoine NR: **Expression and functional activity of fibroblast growth factors and their receptors in human pancreatic cancer.** *Int J Cancer* 1994, **59**(5):667-675.

14. Nomura S, Yoshitomi H, Takano S, Shida T, Kobayashi S, Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Kato A *et al*: **FGF10/FGFR2 signal induces cell migration and invasion in pancreatic cancer**. *Br J Cancer* 2008, **99**(2):305-313.
15. Ishiwata T, Matsuda Y, Yamamoto T, Uchida E, Korc M, Naito Z: **Enhanced expression of fibroblast growth factor receptor 2 IIIc promotes human pancreatic cancer cell proliferation**. *Am J Pathol* 2012, **180**(5):1928-1941.
16. Liu Z, Neiss N, Zhou S, Henne-Bruns D, Korc M, Bachem M, Kornmann M: **Identification of a fibroblast growth factor receptor 1 splice variant that inhibits pancreatic cancer cell growth**. *Cancer Res* 2007, **67**(6):2712-2719.
17. Vickers SM, Huang ZQ, MacMillan-Crow L, Greendorfer JS, Thompson JA: **Ligand activation of alternatively spliced fibroblast growth factor receptor-1 modulates pancreatic adenocarcinoma cell malignancy**. *J Gastrointest Surg* 2002, **6**(4):546-553.
18. Motoda N, Matsuda Y, Onda M, Ishiwata T, Uchida E, Naito Z: **Overexpression of fibroblast growth factor receptor 4 in high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma**. *Int J Oncol* 2011, **38**(1):133-143.
19. Arnaud-Dabernat S, Kritzik M, Kayali AG, Zhang YQ, Liu G, Ungles C, Sarvetnick N: **FGFR3 is a negative regulator of the expansion of pancreatic epithelial cells**. *Diabetes* 2007, **56**(1):96-106.
20. Corbo V, Beghelli S, Bersani S, Antonello D, Talamini G, Brunelli M, Capelli P, Falconi M, Scarpa A: **Pancreatic endocrine tumours: mutational and immunohistochemical survey of protein kinases reveals alterations in targetable kinases in cancer cell lines and rare primaries**. *Ann Oncol* 2012, **23**(1):127-134.
21. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M: **Receptor specificity of the fibroblast growth factor family**. *J Biol Chem* 1996, **271**(25):15292-15297.
22. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS: **The essence of senescence**. *Genes Dev* 2010, **24**(22):2463-2479.
23. Sibley K, Cuthbert-Heavens D, Knowles MA: **Loss of heterozygosity at 4p16.3 and mutation of FGFR3 in transitional cell carcinoma**. *Oncogene* 2001, **20**(6):686-691.
24. Mhawech-Fauceglia P, Cheney RT, Fischer G, Beck A, Herrmann FR: **FGFR3 and p53 protein expressions in patients with pTa and pT1 urothelial bladder cancer**. *Eur J Surg Oncol* 2006, **32**(2):231-237.
25. Zieger K, Marcussen N, Borre M, Orntoft TF, Dyrskjot L: **Consistent genomic alterations in carcinoma in situ of the urinary bladder confirm the presence of two major pathways in bladder cancer development**. *Int J Cancer* 2009, **125**(9):2095-2103.
26. Knowles MA: **Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target**. *World J Urol* 2007, **25**(6):581-593.
27. Bernard-Pierrot I, Brams A, Dunois-Larde C, Caillaud A, Diez de Medina SG, Cappellen D, Graff G, Thiery JP, Chopin D, Ricol D *et al*: **Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b**. *Carcinogenesis* 2006, **27**(4):740-747.
28. Hirotsu M, Setoguchi T, Matsunoshita Y, Sasaki H, Nagao H, Gao H, Sugimura K, Komiya S: **Tumour formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells**. *Br J Cancer* 2009, **101**(12):2030-2037.
29. Ishibe T, Nakayama T, Okamoto T, Aoyama T, Nishijo K, Shibata KR, Shima Y, Nagayama S, Katagiri T, Nakamura Y *et al*: **Disruption of fibroblast growth factor signal pathway inhibits the growth of synovial sarcomas: potential application of signal inhibitors to molecular target therapy**. *Clin Cancer Res* 2005, **11**(7):2702-2712.

30. Guo M, Liu W, Serra S, Asa SL, Ezzat S: **FGFR2 isoforms support epithelial-stromal interactions in thyroid cancer progression.** *Cancer Res* 2012, **72**(8):2017-2027.
31. Katoh M: **FGFR2 abnormalities underlie a spectrum of bone, skin, and cancer pathologies.** *J Invest Dermatol* 2009, **129**(8):1861-1867.
32. Krejci P, Prochazkova J, Smutny J, Chlebova K, Lin P, Aklian A, Bryja V, Kozubik A, Wilcox WR: **FGFR3 signaling induces a reversible senescence phenotype in chondrocytes similar to oncogene-induced premature senescence.** *Bone* 2010, **47**(1):102-110.
33. Hubackova S, Novakova Z, Krejcikova K, Kosar M, Dobrovolna J, Duskova P, Hanzlikova H, Vancurova M, Barath P, Bartek J *et al*: **Regulation of the PML tumor suppressor in drug-induced senescence of human normal and cancer cells by JAK/STAT-mediated signaling.** *Cell Cycle* 2010, **9**(15):3085-3099.
34. Bellido T, O'Brien CA, Roberson PK, Manolagas SC: **Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells.** *J Biol Chem* 1998, **273**(33):21137-21144.
35. Ronchetti D, Greco A, Compasso S, Colombo G, Dell'Era P, Otsuki T, Lombardi L, Neri A: **Deregulated FGFR3 mutants in multiple myeloma cell lines with t(4;14): comparative analysis of Y373C, K650E and the novel G384D mutations.** *Oncogene* 2001, **20**(27):3553-3562.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1: Phenotypic properties of PDAC cell lines

**A)** FGFR3 expression in the PDAC cell lines was determined by western-blot. FGFR3 expression was the highest in BXPC3 cells and the lowest in MIAPACA2 cells. Membranes were reprobed for GAPDH to test equivalent loading. **B)** FGFR3 splice variants relative mRNA level were determined by RT-qPCR with specific primers and normalized with RPLP0 used as a mRNA expression internal reference. **C)** Epithelial E-cadherin and mesenchymal vimentin markers mRNA levels were determined by RT-qPCR. CAPAN2 and BXPC3 cells were epithelial, whereas the MIAPACA2 cell line was more mesenchymal. PANC1 cells displayed an intermediate phenotype. **D)** Light microscope pictures of the four tested cell lines (original magnification X40). PANC1 presented an epithelial phenotype despite the strong expression of vimentin.

### Figure 2: Colony formation and cell migration assays reveal FGFR3 as an oncogene

**A)** CAPAN2 cells were transduced with either control (a,d), FGFR3-IIIb (b,e) or FGFR3-IIIc ZsGreen lentivectors (c,f) and observed with a fluorescence microscope (original magnification X40, bright field, a,b,c, green fluorescence, d,e,f). Colonies with strong overexpression of either FGFR3-IIIb or -IIIc were smaller (arrows, b, c, e, f). Colony areas showed that overexpression of both FGFR3 splice variants led to smaller colonies in CAPAN2 cells (chart, IIIb  $p=0.04^*$ ; IIIc  $p=0.01^{**}$ ). **B)** FGFR3-IIIb (b) and -IIIc (c) overexpression increased colony number and size compared to control (a) in MIAPACA2 cells. MIAPACA colony area are larger for FGFR3-IIIb  $p=0.01^{**}$  and -IIIc  $p=0.0002^{***}$ .

Migration assays were performed in CAPAN2 and MIAPACA2 cells. Black arrows point at migrating cells. Overexpression of both splice variants promoted cell migration compared to control in CAPAN2 (**C**) and MIAPACA2 (**D**) cells. Count showed significant results (CAPAN2 IIIb/IIIc  $p<1.10^{-10}^{***}$ ; MIAPACA2 IIIb/IIIc  $p<1.10^{-5}^{***}$ ).

### Figure 3: FGFR3 impacts pancreatic epithelial and mesenchymal cells differently

Proliferation assays were carried out on transduced cells by direct cell counting of CAPAN2 cells (**A, upper panel**) or MIAPACA2 cells (**B, upper panel**). **Middle panels:** Cell cycle analysis in CAPAN2 cells (**A**) and MIAPACA2 cells (**B**). Note that the percentages of

G1/S/G2-M cells were obtained on gates centered on cells with normal size in SSC/FCS dot blot, with exclusion of doublets. Percentages of cells in Sub-G1 were obtained in the total cell population. **Lower panels:** SA $\beta$ -Galactosidase staining is associated with senescent cell phenotype. The staining was conducted on CAPAN2 (**a, b, c, lower panel**) and MIAPACA2 (**d, e, f, lower panel**) cells expressing either control, FGFR3-IIIb or -IIIc vectors. Senescent cells were counted in CAPAN2 cells (**A lower panel**, IIIb p=0.002\*\*; IIIc p=0.02\*) and in MIAPACA2 cells (**B lower panel**, IIIb p=0.0002\*\*\*; IIIc p<10<sup>-5</sup>\*\*\*).

**Figure 4: FGFR3 controlled subcutaneous tumor growth according to the cell line phenotype and engaged diverse intracellular pathways**

The four PDAC cell lines were transduced with either control, FGFR3-IIIb or -IIIc ZsGreen lentivectors and sorted by flow cytometry multiclonal FGFR3 overexpressing cells. **A)** Sorted cells were xenografted in immune-compromised mice and tumors were weighed after 3 to 12 weeks. Overexpression of both FGFR3-IIIb and -IIIc splice variant strongly promoted PANC1 (IIIb p=0.03\*, IIIc p=0.02\*) and even more the MIAPACA2 (IIIb p=0.02\*, IIIc p=0.01\*\*) but inhibited CAPAN2 (IIIb p=0.04\*, IIIc=0.04\*) and BXPC3 tumor growth (IIIb p=0.03\*, IIIc p=0.04\*). **B)** Proteins extracts of tumors from CAPAN2 and MIAPACA2, were analyzed by western-blot. See text for more details.

**Figure 5: FGFR3 expression in normal and tumor pancreatic tissues**

**(a, b)** FGFR3 signal was found in pancreatic islets of normal pancreas. **(c)** Co-localization of FGFR3 (green) and insulin (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). Pancreatic endocrine carcinoma (PEC) with no **(d)**, weak **(e)** and strong **(f)** FGFR3 expression. Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) with no **(g)**, weak **(h)** and strong **(i)** FGFR3 expression. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) with no **(j)**, weak **(k)** and strong **(l)** FGFR3 expression.

**Figure 6: FGFR3 actions in pancreatic cancers: a working model**

**Supplemental figure 1: FGF expression in pancreatic cancer cell lines**

RT-qPCRs were performed as indicated in the materials and methods section to measure the levels of expression of different FGFR3 ligands.

## Supplemental figure 2: FGFR3-IIIc tumor growth inhibition is dependent on FGFR3-IIIc expression levels

Single clones overexpressing FGFR3-IIIc in CAPAN2 cells were xenografted in immunocompromised mice. Tumors were resected and FGFR3-IIIc-overexpression level was determined by western-blot analysis of tumor-protein extracts for each clones. FGFR3-IIIc level expression of each clone was finally compared to the tumor mass. The regression was performed in Excel software.

## Supplemental figure 3: FGFR3-induced senescence is P53-independent in the CAPAN2 cells

P53 status was studied in the CAPAN2 cells. Total P53 was not changed in FGFR3 overexpressing cells. Phospho-serine 6, 9, 20 and 392 were detected but remained unchanged. Phospho-threonine 81, serine 37 and serine 46 were not detected (not shown).

**Table 1: Colony counting in clonogenicity assays**

| Cell line | CTRL    | FGFR3-IIIb  | FGFR3-IIIc |
|-----------|---------|-------------|------------|
| PANC1     | 1±0.05  | 1.28±0.04*  | 1.23±0.04* |
| MIAPACA2  | 1±0.004 | 1.52±0.18** | 1.28±0.17* |
| CAPAN2    | 1±0.13  | 1.38±0.06*  | 1.52±0.27* |
| BXPC3     | 1±0.18  | 0.97±0.10   | 1.37±0.04* |

Cells were transduced to obtain 70% of transduced cells as analyzed by flow cytometry. 500 cells were plated in 10mm dish in triplicates and allowed to grow until clones grew to sizes about 2mm (visible with naked eyes), except for CAPAN2, visible under a light microscope. Dishes were processed for violet crystal staining and blind counted by hand by three different persons. Results are reported as mean of ratios of clones counted for the control condition ±SD. \*:p<0.05 \*\*:p<0.01 as compared to control.

**Table 2: FGFR3 mRNA expression in normal pancreas and PDAC**

|            | Normal pancreas | PDAC       | p value |
|------------|-----------------|------------|---------|
| FGFR3-IIIb | 0.13±0.024      | 0.08±0.012 | 0.043   |
| FGFR3-IIIc | 0.17±0.024      | 0.07±0.015 | 0.005   |
| n          | 10              | 29         |         |

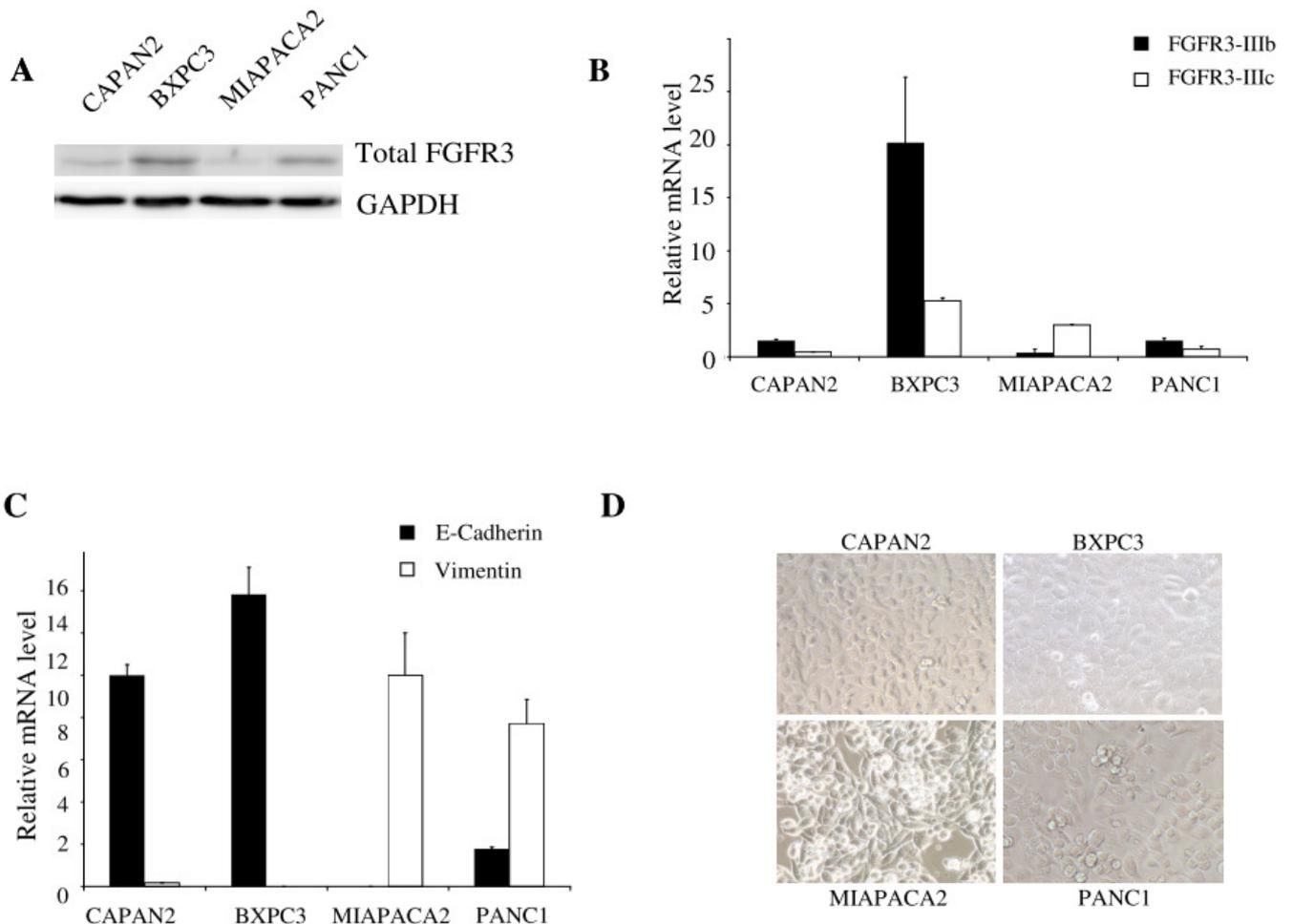
RT-qPCRs were performed according to the description in materials and methods. Unpaired bilateral Student's t tests were run to compare levels in normal pancreas compared to PDAC. The n numbers indicate the number of specimens in each group.

**Table 3: Scoring of FGFR3 expression in various pancreatic cancer lesions**

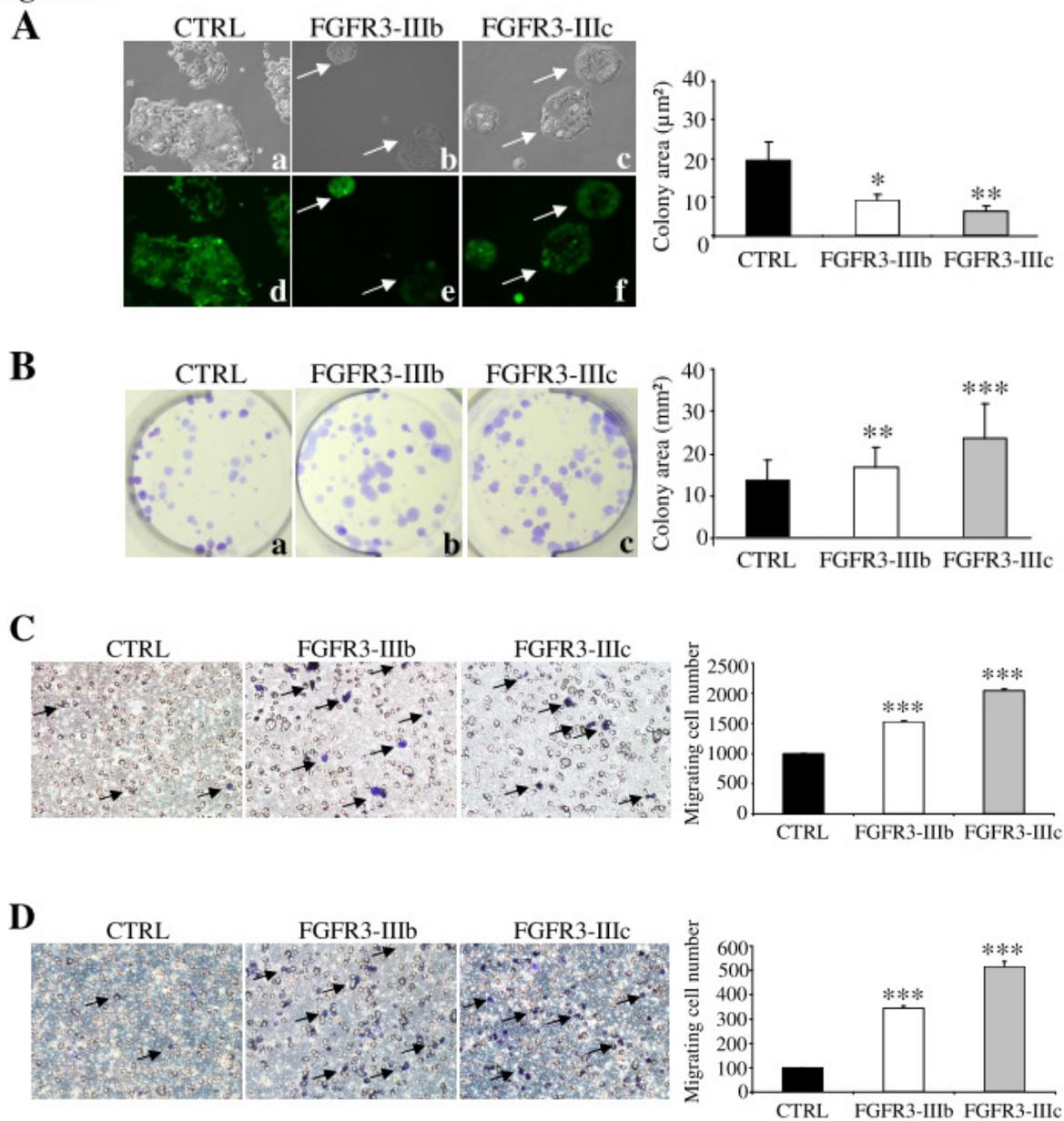
| Signal intensity              | PEC      | IPMN       | PDAC       |
|-------------------------------|----------|------------|------------|
| Negative                      | 12% (3)  | 63.3% (19) | 30.6% (27) |
| Weakly positive               | 56% (14) | 30% (9)    | 48.9% (43) |
| Strongly positive             | 32% (8)  | 6.7% (2)   | 20.5 (18)  |
| <b>Total number of tumors</b> | 25       | 30         | 88         |

Strong signals were as intense as signals obtained in normal pancreatic islets (Figure 5a, b). Weak signals were similar to what was observed in normal pancreatic exocrine tissue (ducts and acinar cells, Figure 5a, b).

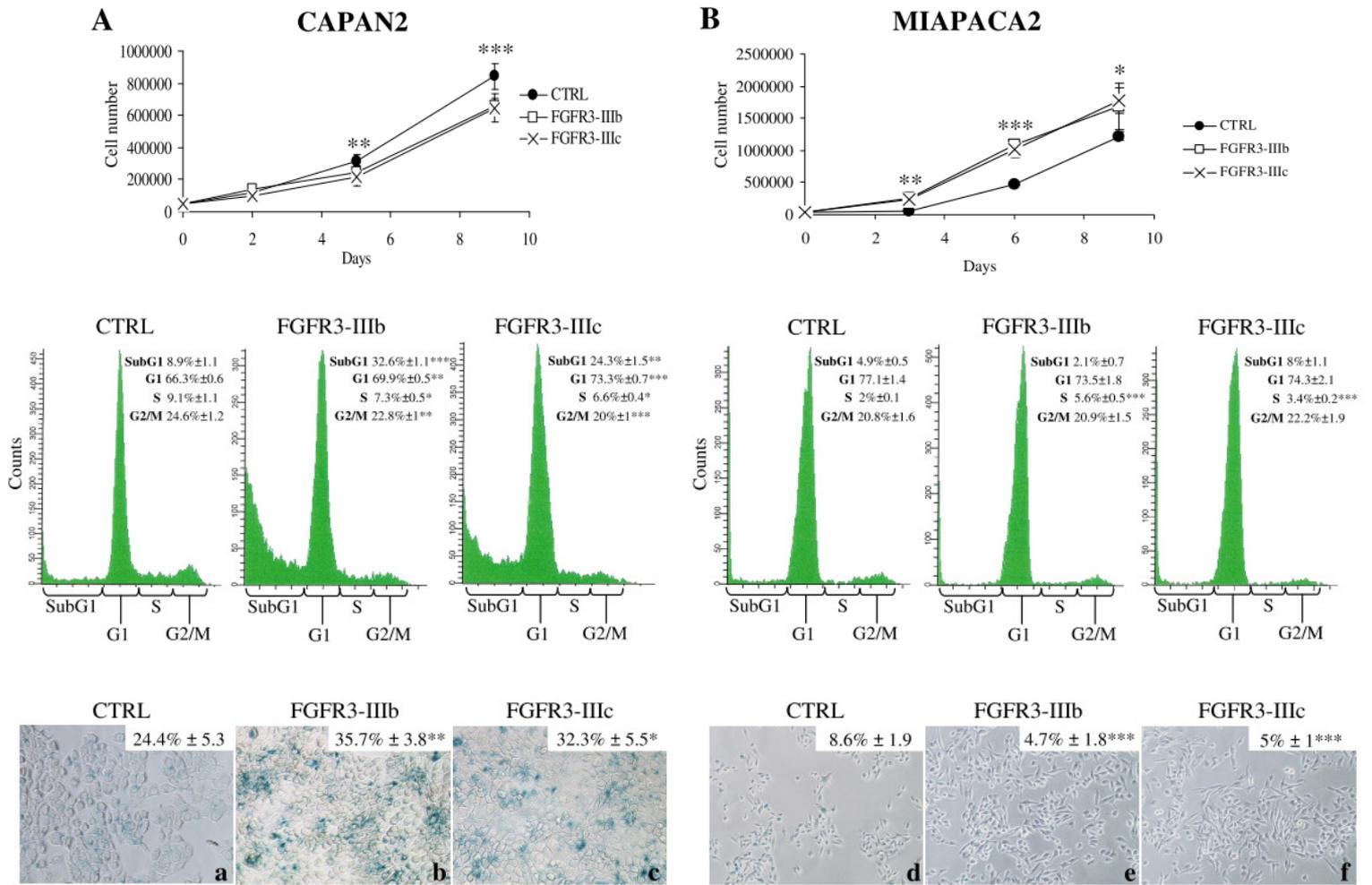
**Figure 1**



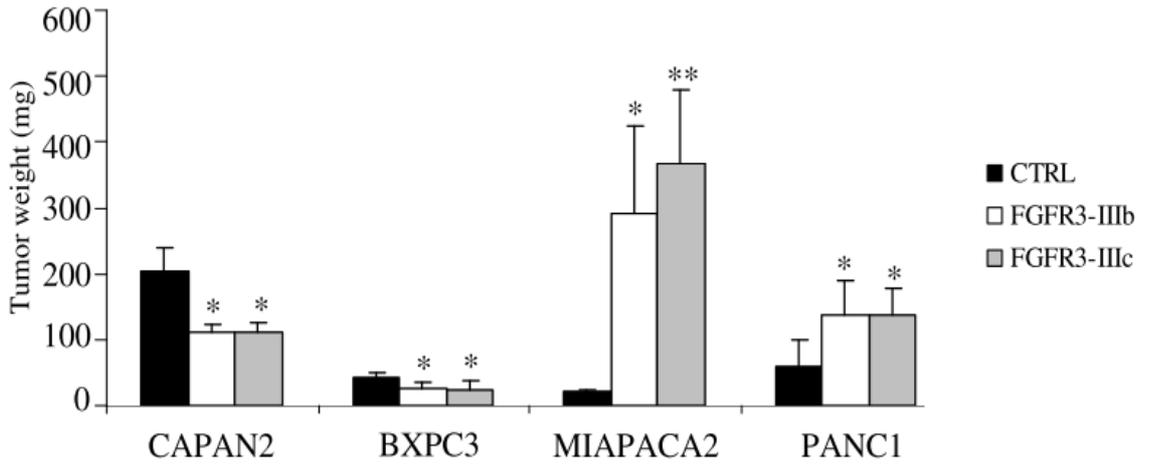
**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**  
**A**



**B**

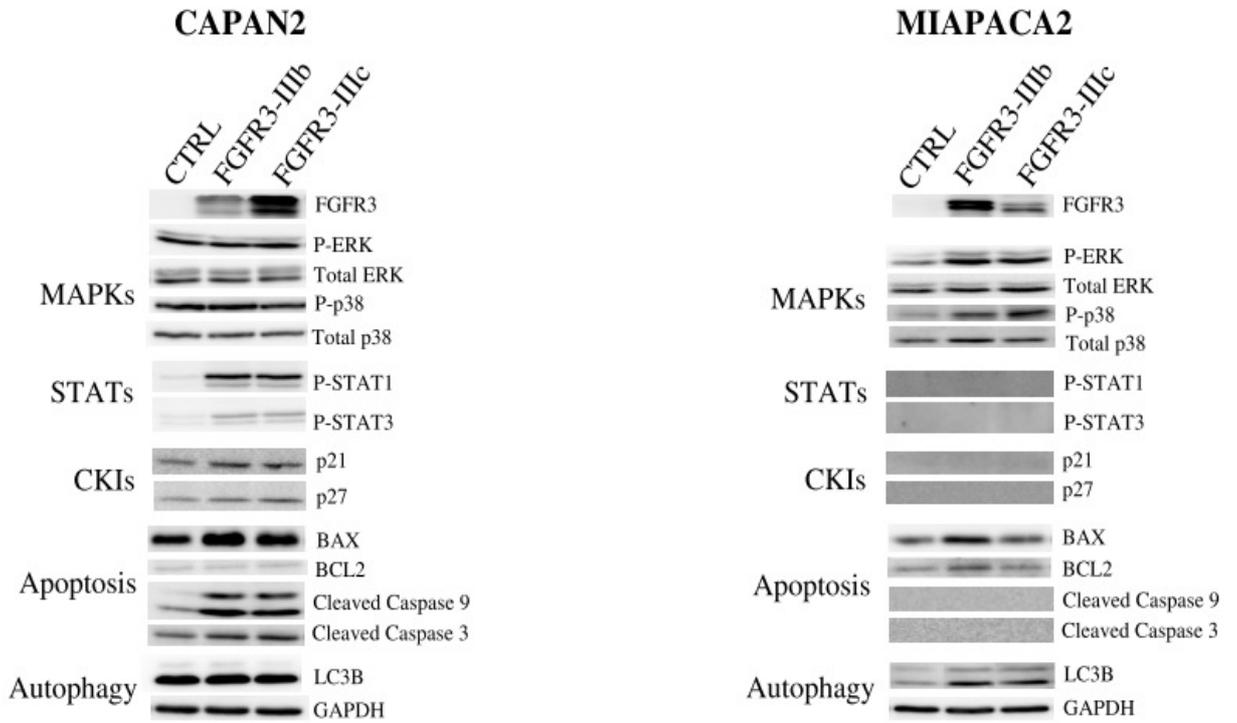


Figure 5

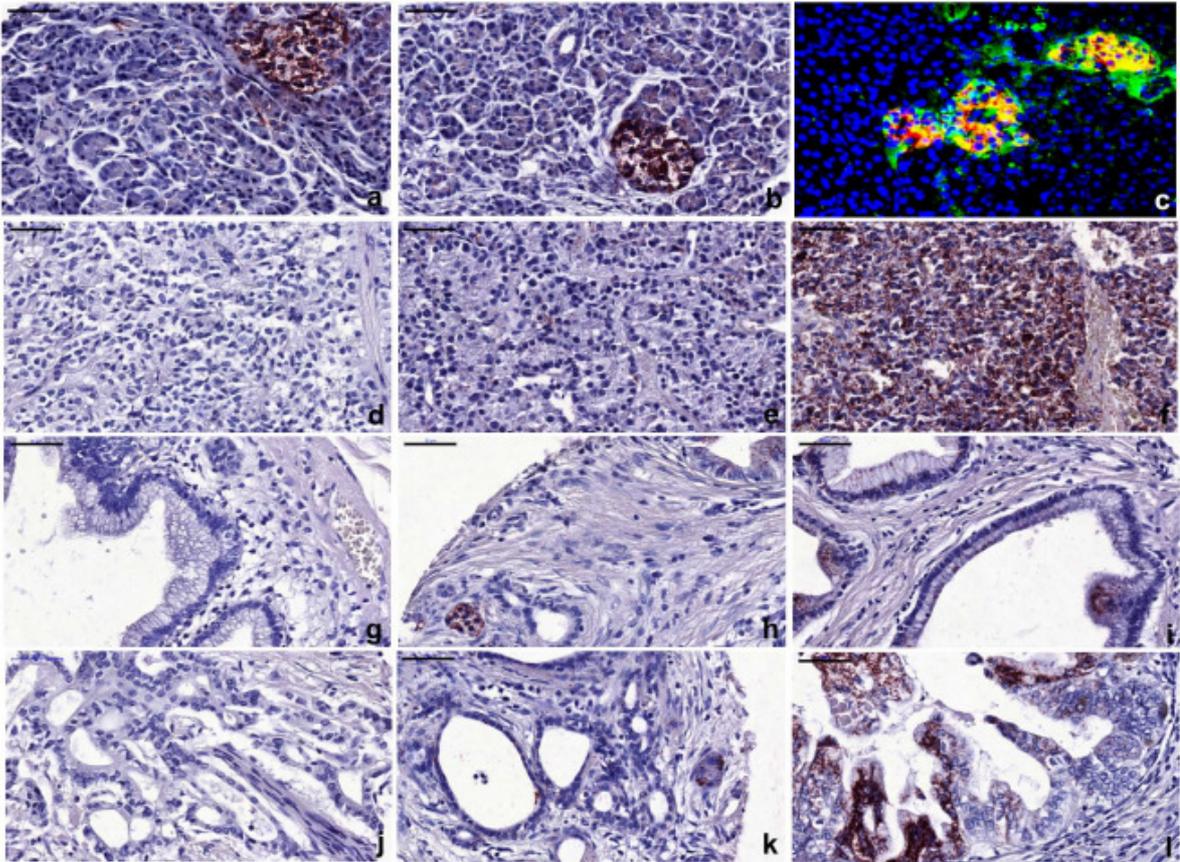
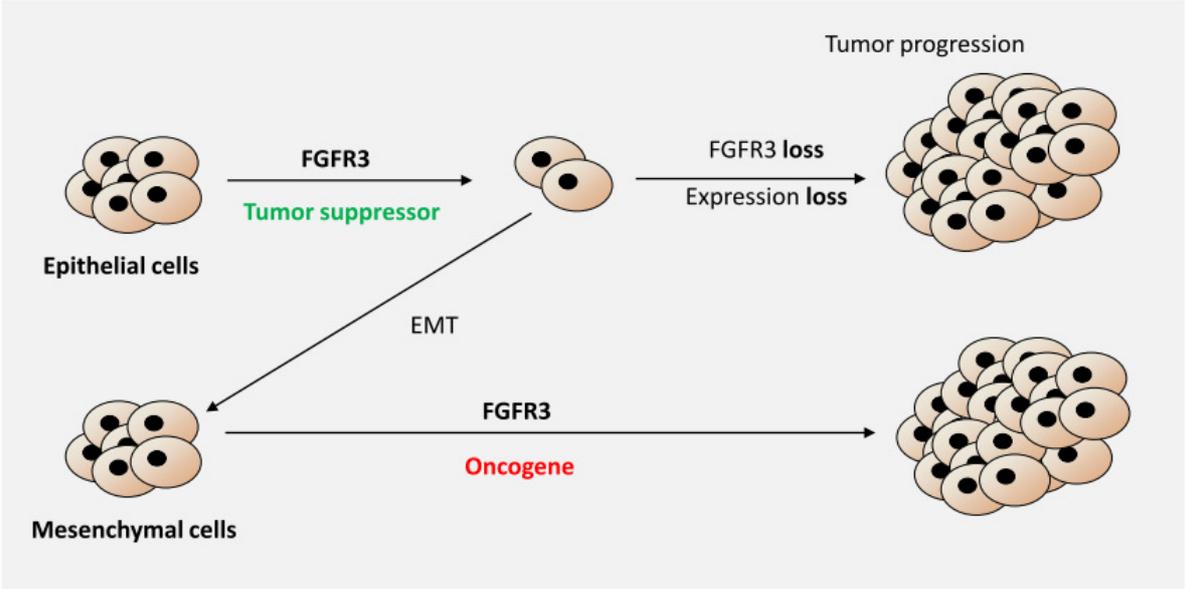
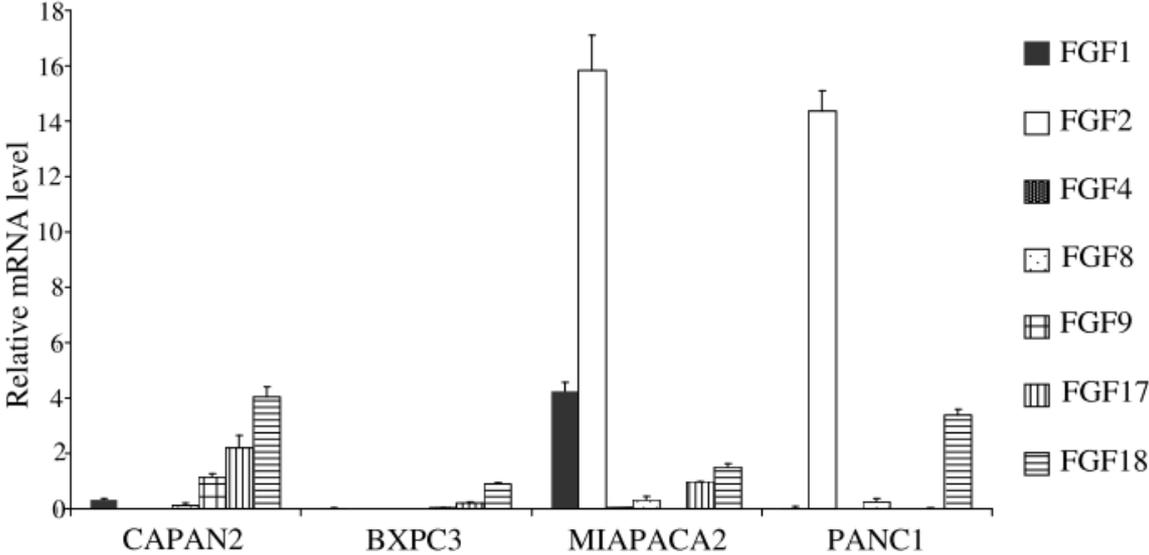


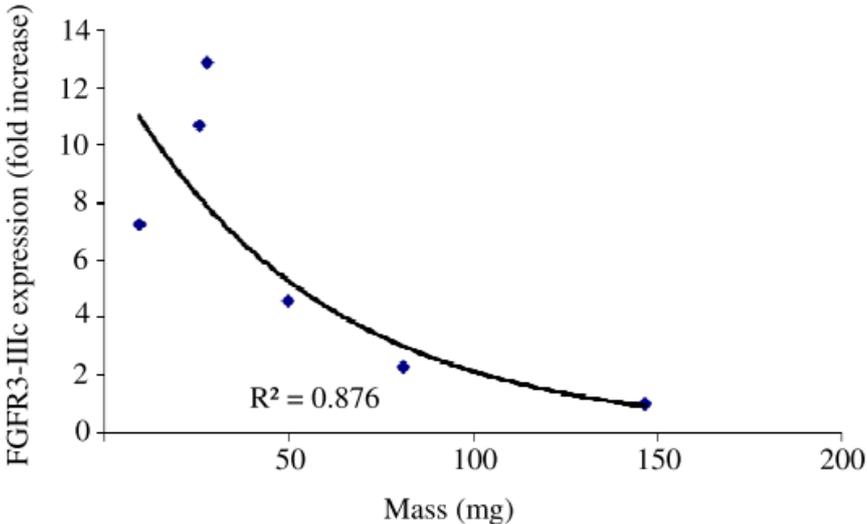
Figure 6



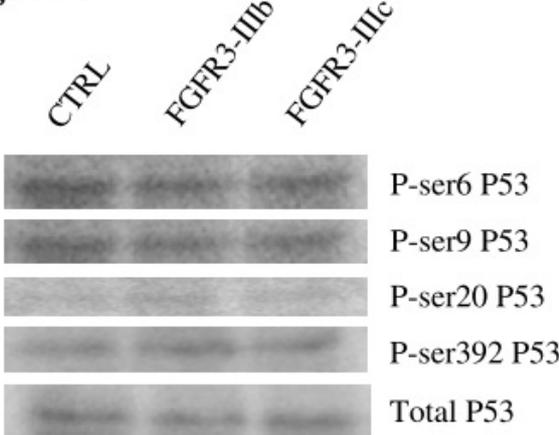
**Supplemental figure 1**



**Supplemental figure 2**



**Supplemental figure 3**



### III. Résultats supplémentaires.

#### III.1. Etude de la surexpression du FGFR3 dans les cellules PANC-1.

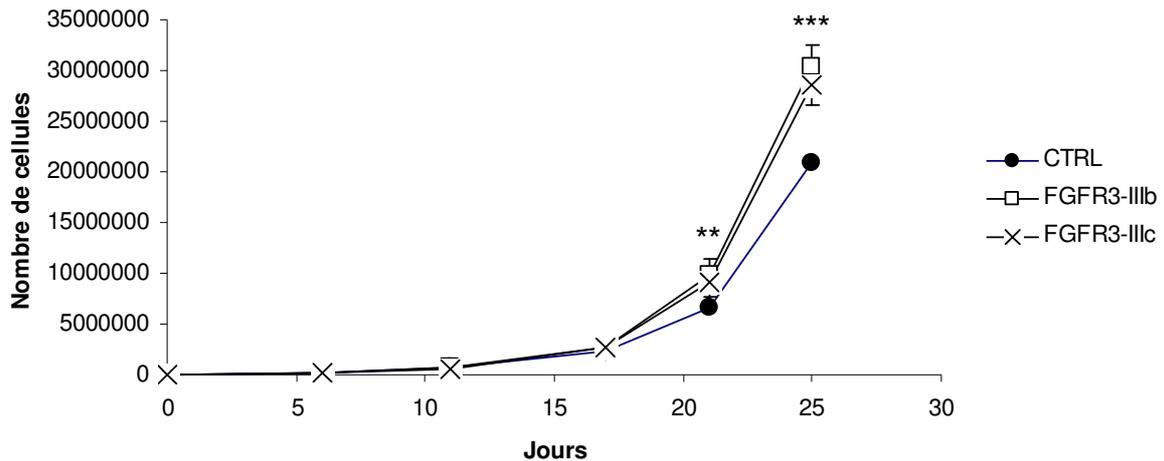
##### *III.1.1. Caractéristiques de la lignée cellulaire PANC-1.*

Il a été montré que les PANC-1 exprimaient le FGFR3 de façon modérée par rapport aux autres lignées avec l'isoforme IIIb comme forme prédominante du FGFR3. Ces cellules présentaient un phénotype intermédiaire avec une expression modérée d'E-cadhérine et une forte expression de vimentine. En culture les cellules PANC-1 présentent toujours un phénotype épithélial.

##### *III.1.2. Les isoformes IIIb et IIIc du FGFR3 activent la prolifération cellulaire des PANC-1 de façon tardive.*

Des expériences de prolifération ont été réalisées par comptage des cellules vivantes par exclusion du colorant bleu trypan dans un compteur de cellules Cellometer (Nexcelom Biosciences). Les cellules PANC-1 ont été transduites à 70% avec un vecteur contrôle, un vecteur surexprimant l'isoforme IIIb ou l'isoforme IIIc du récepteur et ont étéensemencées dans des conditions de culture optimales. Elles ont été comptées durant 25 jours.

Pendant les premières semaines, aucune différence de prolifération n'a été observée. A partir du 21<sup>ème</sup> jour, les cellules surexprimant les isoformes du FGFR3 présentaient un avantage prolifératif significatif par rapport aux cellules contrôles suggérant un effet activateur tardif du FGFR3 sur la prolifération cellulaire des cellules PANC-1 (IIIb  $p=0.008^{**}$ , IIIc  $p=0.01^{**}$ ,  $n=4$ ) (*Figure 1*). Au bout du 25<sup>ème</sup> jour, la différence de prolifération est encore plus grande, environ 1,5 fois plus de cellules pour les conditions de surexpression du FGFR3 par rapport au contrôle (IIIb  $p=0.0001^{***}$ , IIIc  $p=0.0002^{***}$ ,  $n=4$ ).



**Figure 1 : La surexpression des isoformes IIIb et IIIc du récepteur FGFR3 active la prolifération cellulaire des PANC-1 *in vitro*.** 10000 cellules ont étéensemencées dans des conditions optimales de culture et ont été comptées pendant 25 jours avec un compteur de cellules Cellometer (Nexcelom Biosciences)  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$ .

### III.1.3. Aucune sénescence cellulaire n'a été détectée dans les cellules PANC-1.

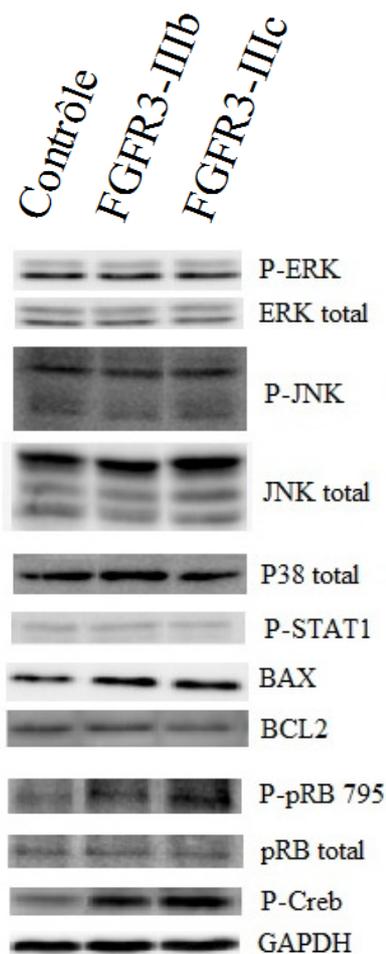
Comme pour les autres lignées tumorales pancréatiques, un marquage de l'activité  $\beta$ -galactosidase a été réalisé sur les cellules tumorales PANC-1 afin de détecter les cellules en processus de sénescence. Aucune cellule sénescence n'a été détectée dans les PANC-1 contrôle ni dans les conditions de surexpression des isoformes IIIb et IIIc (Figure 2).



**Figure 2 : Sénescence des cellules PANC-1.** Les cellules PANC-1 sauvages, surexprimant le FGFR3-IIIb et le FGFR3-IIIc ont étéensemencées dans des conditions de culture optimales. Un marquage de l'activité  $\beta$ -galactosidase a été réalisé pour détecter les cellules sénescences devenues bleues.

### III.1.4. La surexpression du FGFR3 dans les PANC-1 emprunte des voies de signalisation différentes des MIAPaCa2.

Les protéines des tumeurs PANC-1 ont été extraites et analysées par western-blots. L'activation des différentes MAPKinases a été explorée. Les protéines MAPKinases activées P-ERK et P-JNK ont été détectées mais ne sont pas régulées par la surexpression du FGFR3. La protéine p38 totale a également été détectée mais pas la protéine p38 activée (*Figure 3*).



**Figure 3 : La surexpression du FGFR3 dans les cellules PANC-1 emprunte différentes voies de signalisation.** Les protéines extraites de tumeurs PANC-1 contrôle, surexprimant le FGFR3-IIIb et le FGFR3-IIIc ont été analysées par western-blots en utilisant des anticorps spécifiques.

De la même façon, la protéine P-STAT1 a été détectée dans les extraits protéiques mais STAT1 n'était pas activée par la surexpression des isoformes du FGFR3. Les protéines BAX et BCL2 ont été détectées et la balance protéine pro-apoptotique/anti-apoptotique restait

inchangée. Ces premiers résultats montrent que l'effet oncogénique du FGFR3 observé dans les PANC-1 *in vitro* et *in vivo* n'implique pas les mêmes voies de signalisation que dans les MIAPaCa2 qui génèrent également un effet oncogénique mais de plus grande ampleur.

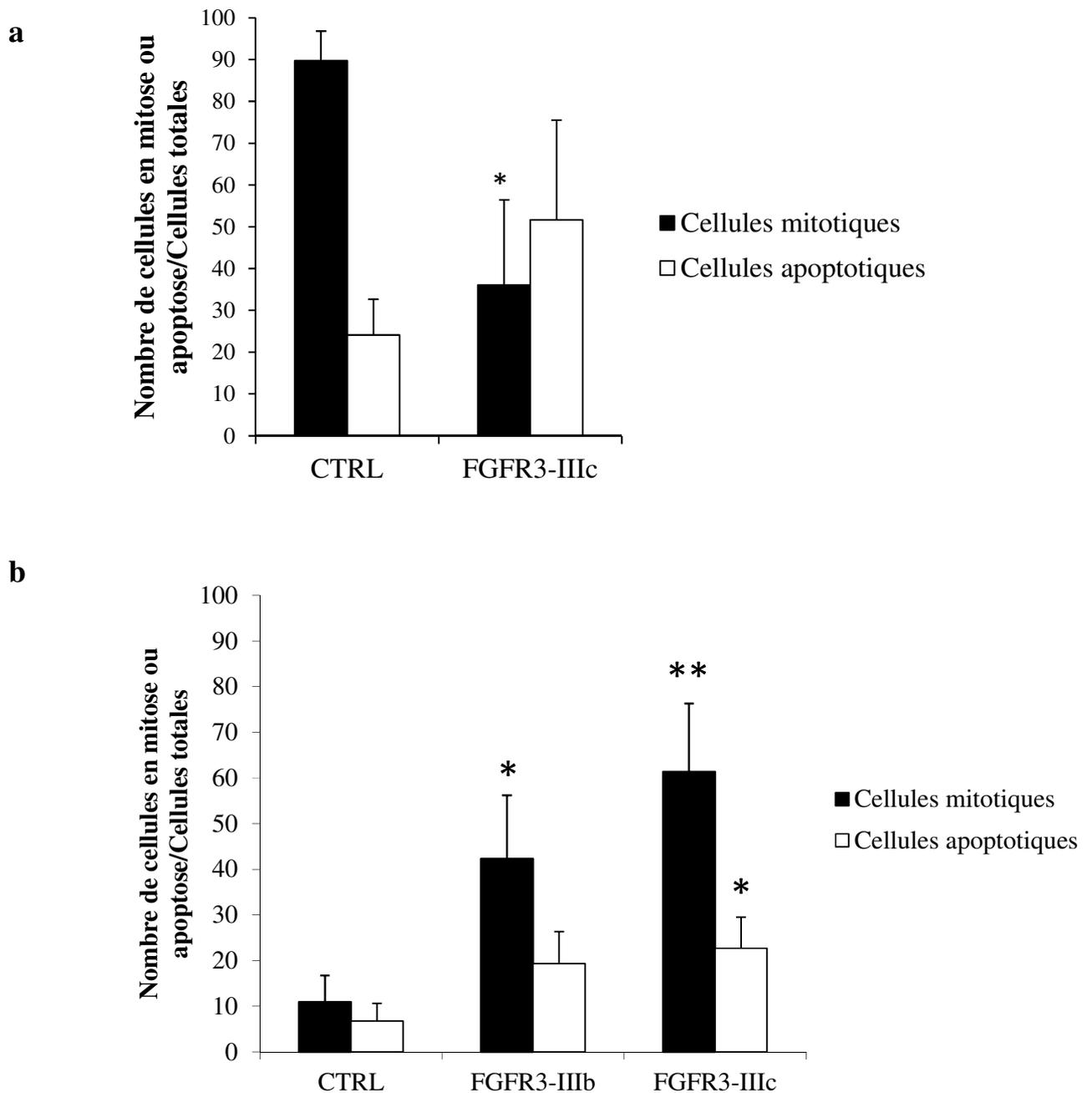
D'autres protéines ont donc été analysées par western-blot. Les capacités prolifératives des cellules peuvent être fortement modulées par la phosphorylation de la protéine pRb. Cette protéine est détectée et active dans beaucoup de lignées tumorales pancréatiques comme celles qui ont été utilisées dans cette étude (Plath *et al.* 2002). L'induction de la phosphorylation de la protéine pRb a été mise en évidence sur la sérine 795 dans les PANC-1 surexprimant le FGFR3 par rapport au contrôle. La phosphorylation de pRb empêche son activité inhibitrice du cycle cellulaire et induit donc la prolifération cellulaire. De la même façon, l'induction de la phosphorylation de la protéine Creb, qui est un facteur de transcription, a été mise en évidence dans les tumeurs PANC-1 surexprimant le FGFR3. Ces protéines activées ont également été testées dans les tumeurs MIAPaCa2 mais n'ont pas été détectées (non montré).

En conclusion, l'effet oncogénique du FGFR3 dans les cellules PANC-1 emprunte des voies de signalisation différentes de l'effet oncogénique induit dans les cellules MIAPaCa2. En effet, dans les cellules MIAPaCa2, le FGFR3 induit un fort effet oncogénique en activant les voies des MAPKinases ERK et p38, qui sont les principales voies pro-prolifératives d'une cellule. Dans les cellules PANC-1, le FGFR3 induit un effet oncogénique plus modéré qui emprunte des voies de signalisation alternatives comme CREB ou pRb. Ces différences pourraient provenir de leur état de différenciation. En effet, les cellules MIAPaCa2 semble avoir effectué une transition épithélium-mésenchyme alors que les cellules PANC-1 sont encore dans un état intermédiaire entre la cellule de phénotype de type épithélial et de type mésenchymateux.

### III.2. Index mitotiques et apoptotiques de cellules de type épithélial et de type mésenchymateux.

Afin d'étudier plus précisément les tumeurs de type épithélial formées à partir de cellules Capan-2 et les tumeurs de type mésenchymateux formées à partir de cellules MIAPaCa2, nous avons déterminé les indexs mitotiques et apoptotiques sur des coupes de tissus inclus en paraffine et colorés à l'hématoxyline/Eosine. Nous avons compté le nombre de cellules en mitose et le nombre de cellules en apoptose par rapport au nombre de cellules

comptées totales dans des tumeurs Capan-2 contrôle et surexprimant le FGFR3-IIIc (Figure 4a) et des tumeurs MIAPaCa2 contrôle, surexprimant le FGFR3-IIIb et IIIc (Figure 4b).



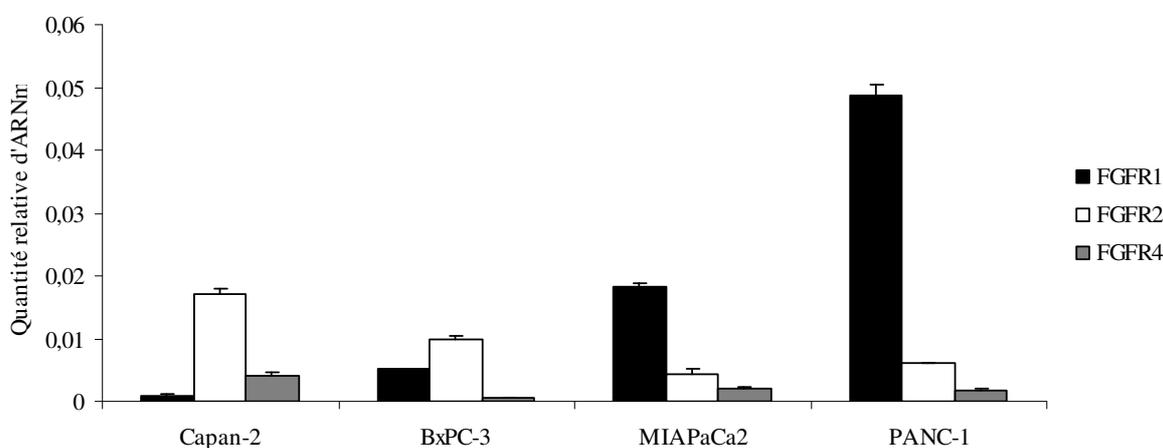
**Figure 4 : Etude tissulaire de la surexpression du FGFR3.** Des tumeurs Capan-2 et MIAPaCa2 ont été extraites et incluses en paraffine. Les coupes de tumeurs ont été colorées à l'hématoxyline/Eosine et les cellules en mitose et en apoptose ont été comptées pour les tumeurs Capan-2 contrôle et surexprimant le FGFR3-IIIc (a) ainsi que pour les tumeurs MIAPaCa2 contrôle, surexprimant le FGFR3-IIIb et le FGFR3-IIIc (b).

Les tumeurs Capan-2 surexprimant le FGFR3-IIIc présentaient significativement moins de cellules mitotiques que dans les tumeurs contrôle (*Figure 4a*) ( $p=0.04^*$ ). Aucune différence significative n'a été mise en évidence en ce qui concerne le nombre de cellules apoptotiques. Un nombre significativement plus important de cellules mitotiques a été retrouvé dans les tumeurs MIAPaCa2 surexprimant les deux isoformes du FGFR3 par rapport aux tumeurs contrôle (*Figure 4b*) (IIIb  $p=0.04^*$ , IIIc  $p=0.003^{**}$ ). Ceci démontre que le FGFR3 induirait un effet pro-tumoral dans les cellules MIAPaCa2 de phénotype mésenchymateux. L'injection intra-tumorale des vecteurs entraîne une transduction hétérogène des cellules et de ce fait la présence d'un grand nombre de copies du vecteur dans certaines cellules. C'est peut-être la raison pour laquelle on observe une légère augmentation de l'index apoptotique dans les tumeurs MIAPaCa2 surexprimant le FGFR3-IIIc (IIIc  $p=0.04^*$ ).

### III.3. Expression des récepteurs FGFRs et des ligands FGFs dans les lignées d'adénocarcinomes pancréatiques.

Outre le récepteur FGFR3, l'expression des autres FGFRs a été étudiée par RT-qPCR quantitative.

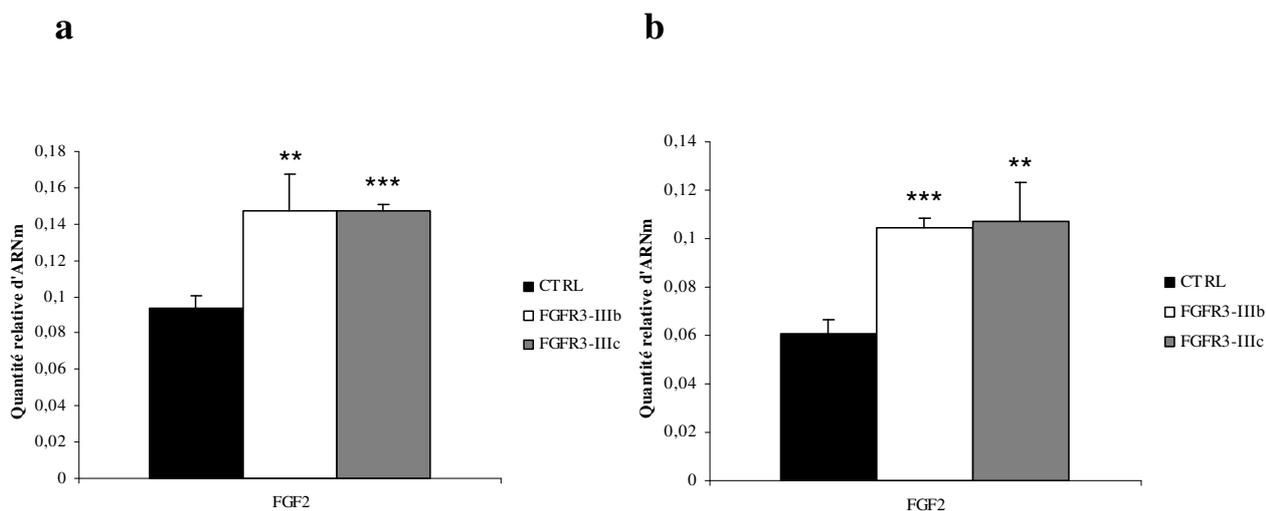
De façon générale, toutes les lignées testées expriment les 3 FGFRs de façon hétérogène (*Figure 5*). Le récepteur FGFR1 est fortement exprimé dans les lignées à phénotype de type mésenchymateux et particulièrement dans les cellules PANC-1. Au contraire, le récepteur FGFR2 est exprimé plus fortement dans les cellules à phénotype épithélial mais son expression reste modérée. Le FGFR4 est faiblement exprimé quelque soit la lignée pancréatique testée.



**Figure 5 : Expression des FGFRs et des FGFs dans les lignées d'adénocarcinome pancréatique.** L'ARN des différentes lignées cellulaires ont été extraits et des RT-qPCR quantitatives ont été réalisées pour explorer l'expression des FGFRs. Ces niveaux d'expression ont été déterminés après le contrôle de l'expression du gène de référence *RPLP0* (Ribosomal Protein, Large, P0).

L'activation d'un récepteur FGFR nécessite sa dimérisation avec un autre récepteur FGFR. Une hétérodimérisation du récepteur avec le FGFR1 ou le FGFR2 pourrait être impliquée dans les rôles opposés du FGFR3 dépendant du contexte cellulaire. En effet, le FGFR1 étant fortement exprimé dans les cellules MIAPaCa2 et PANC-1 il est possible que la formation du complexe FGFR3/FGFR1 soit facilitée et qu'il participe à l'effet pro-tumoral observé. De la même manière, le FGFR2 étant le plus exprimé dans les cellules de phénotype épithélial, le complexe FGFR3/FGFR2 pourrait être impliqué dans la signalisation anti-tumorale médiée par le FGFR3 dans ce type cellulaire.

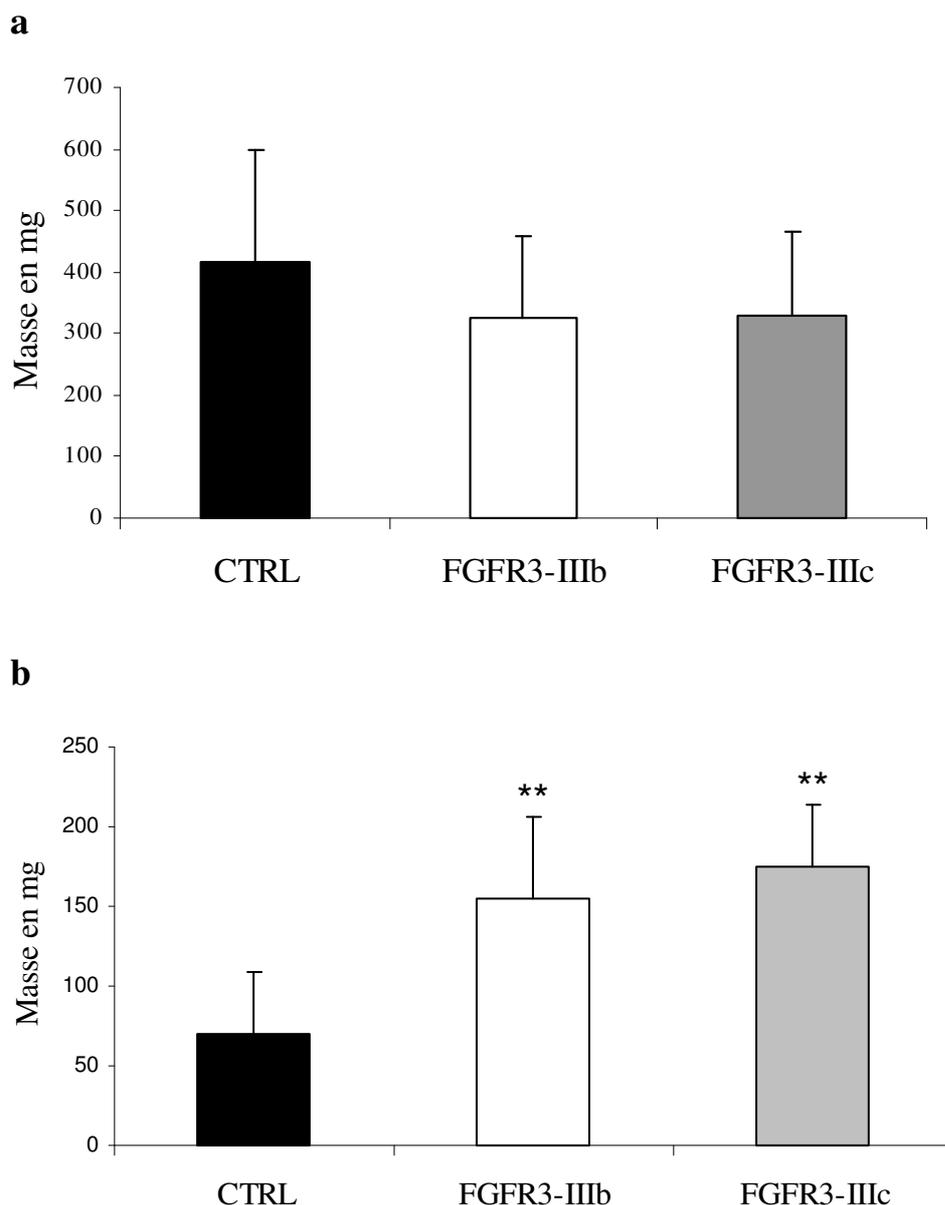
Il a été montré que les cellules MIAPaCa2 et PANC-1 exprimaient de très forts niveaux de FGF2, alors qu'il est très faiblement détectable dans les cellules à phénotype épithélial. De plus, les cellules Capan-2 expriment fortement le FGF9, qui a également été détecté dans les cellules BxPC-3 mais non détecté dans les cellules à phénotype mésenchymateux. Ainsi, il apparaît que des boucles autocrines distinctes sont présentes dans les lignées d'adénocarcinome pancréatique et qui seraient spécifique de l'état de différenciation de la lignée. Pour confirmer la présence de boucles autocrines des FGFs lors de la surexpression du FGFR3, nous avons étudié l'expression des différents FGFs dans des lignées contrôle et surexprimant les isoformes FGFR3-IIIb et IIIc par RT-qPCR quantitative dans les cellules MIAPaCa2 et PANC-1. L'expression des FGF1, 4, 8, 9, 17, 18 et 23 n'est pas modulée dans les cellules surexprimant le FGFR3 par rapport aux cellules contrôle. Toutefois, la surexpression du FGFR3 entraîne une augmentation du niveau d'expression du FGF2 que ce soit dans les cellules MIAPaCa2 (*Figure 6a*) (IIIb  $p=0.01^{**}$ , IIIc  $p=0.0002^{***}$ ) ou dans les PANC-1 (*Figure 6b*) (IIIb  $p=0.0004^{***}$ , IIIc  $p=0.008^{**}$ ). Il semblerait donc qu'une boucle autocrine FGF2/FGFR3 se soit mise en place. Il est très intéressant de noter que le FGF2 est fortement exprimé dans les cellules tumorales pancréatiques de phénotype mésenchymateux et presque indétectable dans les cellules à phénotype épithélial. Ces résultats suggèrent que le FGF2 serait impliqué dans l'effet oncogénique du FGFR3 dans les cellules tumorales pancréatiques MIAPaCa2 et PANC-1 de phénotype mésenchymateux.



**Figure 6 : La surexpression du FGFR3 dans les cellules MIAPaCa2 et PANC-1 induit des modulations d'expression des FGFs.** L'ARN des cellules MIAPaCa2 et PANC-1 sauvages et surexprimant les isoformes IIIb et IIIc du FGFR3 ont été extraits. Le niveau d'expression des FGFs a été déterminé par RT-qPCR quantitatives.

#### III.4. Injection intra-tumorale du FGFR3 dans les lignées d'adénocarcinome pancréatique.

Le FGFR3 induit un effet anti-tumoral dans les cellules tumorales pancréatiques de phénotype épithélial, il serait donc un candidat potentiel pour un transfert de gène à effet cytotoxique dans les cellules tumorales pancréatiques de ce type. Pour tester cette hypothèse, des vecteurs contrôles et surexprimant les isoformes FGFR3-IIIb et IIIc ont été injectés dans des xénogreffes sous-cutanées de souris formées à partir de cellules Capan-2 (*Figure 7a*). Ces injections ont été réalisées à partir du moment où les tumeurs atteignaient 30mm<sup>3</sup> et répétées tous les 5 jours. Au final, 4 injections ont été réalisées avant l'excision des tumeurs. Les tumeurs ont été pesées et analysées. Les tumeurs surexprimant le FGFR3, quelque soit l'isoforme, avait tendance à être plus petites que les tumeurs contrôles mais pas de façon significative (*Figure 7a*). Le FGFR3, dans ces conditions, n'a pas permis de générer un effet inhibiteur assez important pour l'observer *in vivo*.



**Figure 7 : Transfert du FGFR3 dans les lignées d'adénocarcinome pancréatique.** Des vecteurs contrôle, surexprimant le FGFR3-IIIb et IIIc ont été injectés dans des tumeurs formées à partir de cellules Capan-2 (a) et MIAPaCa2 (b). Après plusieurs injections virales, les tumeurs ont été extraites et pesées.

Afin d'observer un éventuel effet oncogénique du FGFR3 dans des cellules à phénotype de type mésenchymateux, des tumeurs sous-cutanées de souris ont été générées à partir de cellules PANC-1 dans des souris immuno-déficientes. Trois injections de virus contrôle, surexprimant le FGFR3-IIIb et IIIc ont été réalisées à partir du moment où les tumeurs atteignaient 30mm<sup>3</sup>. Les tumeurs ont ensuite été extraites, pesées et analysées. Les tumeurs surexprimant le FGFR3, quelque soit l'isoforme, étaient significativement plus

grosses que les tumeurs contrôles (IIIb  $p=0.03^{**}$ , IIIc= $0.01^{**}$ ) (Figure 7b). Le FGFR3 a montré, comme dans les expériences précédentes, qu'il induisait un effet pro-tumoral dans les cellules à phénotype mésenchymateux.

### III.5. Perte du FGFR3 au cours de la tumorigenèse pancréatique.

Un modèle de progression tumorale pancréatique regroupant les principales alterations génétiques qui surviennent au cours du temps a été établi (Bardeesy *et al.* 2002). Les mutations activatrices de l'oncogène KRAS et la surexpression des récepteurs EGFR et ERBB2 sont les évènements les plus précoces. L'inactivation du gène suppresseur de tumeur INK4A survient plus tard lors des stades PanIN-1A et -1B. Nous avons examiné le profil d'expression de p16-INK4A par immunohistochimie dans le même tissu micro-array de 88 PDACs, 30 IPMNs et 25 carcinomes endocrines pancréatiques (PEC) utilisé pour étudier l'expression du FGFR3 dans l'article 2.

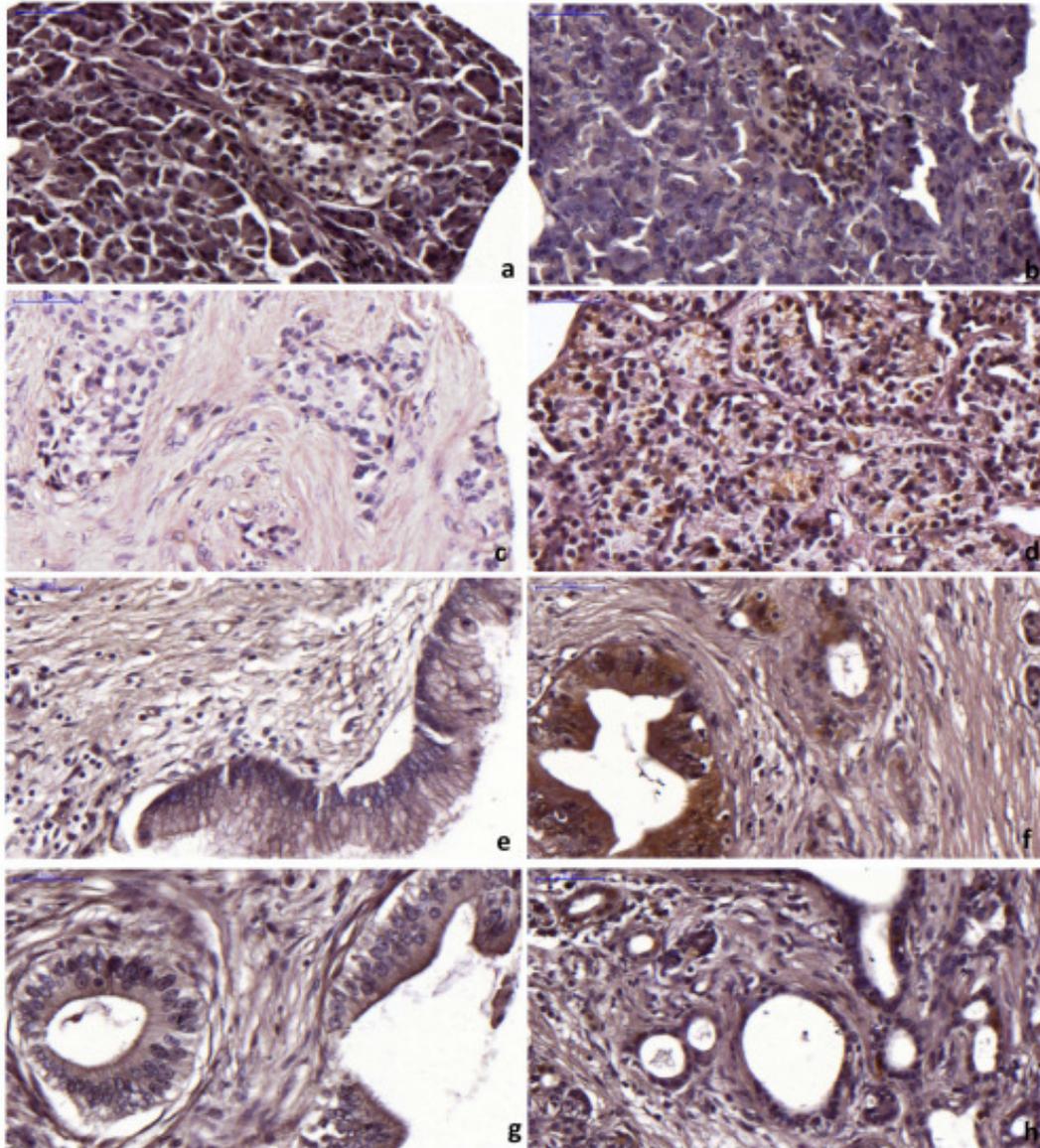
La perte d'expression du FGFR3 a été comparée avec la perte d'expression de p16-INK4A (Tableau 1). Quelque soit le type de tumeur, la perte d'expression de p16-INK4A était plus fréquente que la perte du FGFR3, suggérant que la perte du FGFR3 survient plus tard. De plus, cela a été confirmé en calculant le nombre de tumeurs p16-INK4A négatives qui ont toujours une expression du FGFR3 : 5/6 PECs (83%), 4/20 IPMNs (20%) and 26/51 PDACs (50%) (Figure 8).

Ainsi la perte du FGFR3 surviendrait après les mutations activatrices de KRAS et les surexpressions des récepteurs EGFR et ERBB2 ainsi que l'inactivation du gène suppresseur de tumeur INK4A. Pour poursuivre cette étude, la détermination du profil d'expression des protéines p53 et SMAD4 permettrait de situer la perte du FGFR3 de façon plus précise.

| Intensité du signal    | IPMN       | PEC      | PDAC       |
|------------------------|------------|----------|------------|
| Négatif                | 72.4% (21) | 24% (6)  | 60,7% (51) |
| Faiblement positif     | 24,2% (7)  | 36% (9)  | 33,3% (28) |
| Fortement positif      | 3,4%( 1)   | 40% (10) | 6 (5)      |
| Nombre total de tumeur | 29         | 25       | 84         |

**Tableau 1 : Expression de la protéine p16-INK4A dans différentes lésions pancréatiques.**

Un tissu micro-array contenant 88 PDAC, 30 IPMNs et 25 PECs a été marqué par immunohistochimie grâce à des anticorps anti-p16-INK4A. Les tumeurs ont été classées en fonction de l'intensité du signal d'expression évalué.



**Figure 8 : Expression de la protéine p16 dans des tissus pancréatiques normaux et tumoraux. (a, b) Un signal p16 a été trouvé dans les tissus normaux du pancréas. Carcinome endocrine pancréatique (PEC) sans (c) et avec expression de p16 (d). Néoplasmes intra-canaliaires papillaires et mucineux (IPMN) sans (e) et avec forte expression de p16 (f). Adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) sans (g) et avec expression de p16 (h).**

**DISCUSSION  
ET PERSPECTIVES**

## I. Le ciblage des cellules tumorales pancréatiques.

Cette étude consistait à développer un vecteur de ciblage cellulaire permettant de véhiculer un transgène d'intérêt dans les cellules tumorales pancréatiques pour trouver une alternative, ou un complément des traitements classiques préconisés dans le traitement du cancer pancréatique.

Dans un premier temps, nous avons identifié des marqueurs de surface spécifiquement exprimés à la surface des cellules tumorales pancréatiques grâce à une étude bibliographique. Nous avons ensuite combiné ces marqueurs de surface à une enveloppe virale modifiée à partir du Sindbis Virus et générée par l'équipe de Pariente *et al.* (Pariente *et al.* 2007). La transduction des cellules tumorales pancréatiques *in vitro* et *in vivo* dans des xénogreffes sous-cutanées et orthotopiques chez des souris NOD/Shi-SCID IL2R<sup>γnull</sup> a été montrée pour la première fois avec ce système de ciblage cellulaire. De plus, la génération de cellules tumorales pancréatiques fluorescentes et de virus bioluminescents nous a permis de suivre la croissance tumorale et le devenir des cellules transduites par bioimagerie. Enfin, il a été montré que le système de ciblage généré pouvait efficacement véhiculer un gène thérapeutique et entraîner la mort des cellules tumorales pancréatiques de façon spécifique.

La thérapie génique *in vivo* est largement limitée par les systèmes de délivrance inefficaces et leur manque de spécificité. Ces deux inconvénients ont été au centre des efforts de recherche ces dernières années mais restent les plus grands obstacles à l'applicabilité de la thérapie génique chez l'humain. Le système de délivrance idéal devrait être facile à produire, à administrer et devrait être non-toxique pour les cellules normales. Il devrait délivrer efficacement et spécifiquement le transgène au tissu ciblé pour permettre son intégration et son expression stable dans les cellules hôtes. L'expérience menée dans les tumeurs formées à partir de cellules bêta transformées de souris a permis d'évaluer le transfert aspécifique du transgène dans les cellules pancréatiques normales. Le système de ciblage avec l'anticorps MUC4 a montré qu'il ne transduisait que les cellules tumorales pancréatiques. De plus, l'utilisation de la hsv-TK a pour avantage de tuer la cellule transduite et dans le cas où son intégration entraînerait une mutagenèse insertionnelle, la cellule serait de toute façon éliminée.

L'application du ciblage cellulaire avec des rétrovirus a été problématique dans plusieurs études puisqu'inefficace *in vivo*. Dès lors, plusieurs techniques ont été utilisées pour modifier l'enveloppe du rétrovirus comme l'introduction de ligands, de peptides ou

d'anticorps à la surface de l'enveloppe rétrovirale (Han *et al.* 1995 ; Valsesia-Wittmann *et al.* 1994 ; Boerger *et al.* 1999). De manière générale, la modification de l'enveloppe rétrovirale a entraîné un défaut de spécificité et un faible titre viral. Il semblerait que l'amélioration de la fixation du virus entraîne des défauts de fusion empêchant l'entrée efficace des virus dans les cellules (Zhao *et al.* 1999).

En 2001 une équipe américaine a montré que l'enveloppe du Sindbis Virus Alpha pouvait pseudotyper les rétrovirus et les lentivirus (Morizono *et al.* 2001). Cette enveloppe possède des propriétés très intéressantes pour générer une enveloppe de ciblage spécifique. Elle comprend deux glycoprotéines distinctes E1 et E2, E2 permettant la fixation du virus à la cellule hôte et E1 permettant la fusion entre le virus et la membrane de la cellule. Morizono *et al.* ont modifié la glycoprotéine de fixation E2 de cette enveloppe en introduisant la séquence codant pour le domaine ZZ de la protéine A. Ce domaine permet de fixer le fragment Fc de n'importe quel anticorps. Un lentivirus pseudotypé avec cette enveloppe particulière ne pourra transduire que les cellules possédant à leur surface un antigène spécifique des anticorps fixés à la surface de l'enveloppe virale leur conférant un tropisme dicté uniquement par la réaction antigène/anticorps choisis.

L'utilisation de ce vecteur a montré un ciblage efficace des cellules métastatiques de mélanome par voie systémique en utilisant un anticorps anti-glycoprotéine P qui est exprimée à la surface de ces cellules tumorales. Certains organes présentaient tout de même une transduction aspécifique tels que le foie ou la rate (Morizono *et al.* 2005). Une autre étude a montré un ciblage de cellules métastatiques dans les os dont la tumeur était d'origine prostatique. Les vecteurs ont là-aussi été injectés par voie systémique en association avec l'anticorps PSCA mais ont montré une spécificité de transduction plus importante que pour l'étude des mélanomes. Cette potentialisation provient du vecteur qui, outre le fait de posséder l'enveloppe du Sindbis virus modifiée, présentait également un promoteur spécifique des cellules prostatiques permettant de générer des vecteurs de double ciblage, l'un à la transduction et l'autre à l'expression du transgène véhiculé (Pariante *et al.* 2007).

Ces données nous ont conduits à choisir l'enveloppe du Sindbis virus modifiée pour tester le ciblage des cellules tumorales pancréatiques. Plusieurs antigènes de surface surexprimés dans les cellules tumorales pancréatiques ont été testés y compris l'antigène PSCA qui avait justement été utilisé pour le ciblage des cellules prostatiques. Malheureusement les vecteurs lentiviraux couplés à l'anticorps dirigé contre le PSCA n'ont pas donné de résultats satisfaisants et cet anticorps a été abandonné en cours d'étude.

L'utilisation d'un anticorps anti-PAR-2 avait montré une bonne transduction des cellules tumorales pancréatiques *in vitro* mais également des fibroblastes. Cette transduction aspécifique n'étant pas acceptable, cet anticorps a également été abandonné. Les antigènes MUC4 et CLDN18 variant 2 ont montré, quant à eux, un ciblage efficace des cellules tumorales pancréatiques *in vitro* et ont été testés *in vivo* dans des xénogreffes sous-cutanées et orthotopiques réalisées à partir de cellules tumorales pancréatiques. Les résultats obtenus *in vivo* avec la CLDN18.2 ont été surprenants. En effet, une forte transduction des cellules tumorales *in vivo* a été détectée 15 jours après l'injection virale mais le signal de bioluminescence a disparu par la suite. Nous pensons que l'anticorps CLDN18.2 aurait eu un effet neutralisant qui a induit la mort des cellules transduites et ce serait la raison pour laquelle le signal de bioluminescence aurait disparu. Le laboratoire pharmaceutique Ganymed a justement mis au point un anticorps monoclonal anti-CLDN18.2 nommé IMAB362 qui est actuellement testé en essai clinique de phase I et de phase II pour une thérapie des adénocarcinomes gastriques, oesophagiens et gastro-oesophagiens en Allemagne. Il faudrait réitérer l'expérience de ciblage avec cet anticorps et prélever les tumeurs au cours du temps pour évaluer le pourcentage de cellules transduites par marquage immunohistologique de la luciférase et voir si ces cellules meurent au cours du temps. Les résultats obtenus avec l'anticorps anti-MUC4 *in vivo* ont quant à eux montré une bonne transduction des cellules tumorales pancréatiques. De plus, il a été montré que l'utilisation de cet anticorps pouvait également cibler d'autres cellules cancéreuses comme les SW480 *in vivo*, et il pourrait donc être utilisé pour une thérapie multi-cible. D'autres lignées tumorales devront être testées pour confirmer la faisabilité de cette thérapie.

En accord avec les études de ciblage précédemment publiées, nous avons obtenu des transductions aspécifiques en injectant les vecteurs par voie systémique. La mise au point de l'injection par voie systémique semblait plus longue que la voie intra-tumorale pour tester le transfert de gène thérapeutique et c'est pourquoi nous avons préféré utiliser la voie intra-tumorale. La voie systémique reste toutefois une voie de choix pour une thérapie anti-cancéreuse non-invasive. Celle-ci devra être étudiée avec plus d'expériences et de plus grands nombres de souris inclus, l'expérience pilote n'ayant été réalisée qu'une seule fois avec une seule souris par condition. Il faut également mettre en avant le fait que les tumeurs pancréatiques sont très peu vascularisées et ce pourrait être la raison pour laquelle les virus n'ont pas pu atteindre la tumeur. Pour améliorer la vascularisation, des études sont menées actuellement pour inhiber la voie de signalisation Hedgehog. L'inhibition pharmacologique de

cette voie a permis une meilleure délivrance de gemcitabine dans des tumeurs pancréatiques (Olive *et al.* 2009).

Une des approches les plus utilisées dans le transfert de gène cytotoxique est l'utilisation de système gène suicide/prodrogue. Le système thymidine kinase/ganciclovir (hsv-TK/GCV) a été transféré de nombreuses fois dans les cellules cancéreuses pancréatiques et a montré un réel potentiel thérapeutique. De plus ce système permet, même avec une faible transduction, d'induire un effet anti-tumoral majeur grâce à l'effet « *bystander* » qui propage la drogue aux cellules voisines (Cf : Introduction IV.1.3). Nous avons donc décidé de transférer la thymidine kinase dans des xénogreffes orthotopiques de cellules tumorales pancréatiques via nos vecteurs de ciblage couplés aux anticorps anti-MUC4. Après traitement au ganciclovir, les cellules transduites ont été tuées entraînant le ralentissement de la progression tumorale *in vivo*. En 2009, un mutant de la hsv-TK a été généré, la TK.007 qui a montré un effet cytotoxique plus important et plus rapide que la hsv-TK généralement utilisée (Preuss *et al.* 2010). Cette hsv-TK pourrait être testée en transfert de gène dans les cellules tumorales pancréatiques toutefois si l'effet cytotoxique est trop rapide, aucun effet « *bystander* » ne pourra être observé.

Afin de trouver d'autres candidats pour un transfert de gène cytotoxique, nous avons testé les gènes pro-apoptotiques *BAX* et *TRAIL* qui ont déjà montré un effet cytotoxique important dans les cellules tumorales pancréatiques (Wack *et al.* 2008). Nous avons retrouvé cet important effet cytotoxique dans les lignées d'adénocarcinome pancréatique étudiées mais nous n'avons pas trouvé d'effet synergique lors de l'utilisation combinée de *BAX* et de *TRAIL*. Toutefois, le test de survie ayant été réalisé au bout de 18 jours, l'effet cytotoxique induit par *BAX* ou *TRAIL* avait peut-être atteint son maximum, empêchant l'observation d'un effet synergique. Un test de survie plus précoce sera nécessaire. Les gènes pro-apoptotiques *BAX* et *TRAIL* sont de bons candidats pour le transfert de gène dans les cellules pancréatiques via le système de ciblage mis au point. Il faudrait évaluer leur effet cytotoxique *in vivo* dans des modèles de tumeurs pancréatiques pour confirmer les résultats obtenus *in vitro*. De plus, comme le système hsv-TK/GCV, *TRAIL* produit un effet « *bystander* » qui serait un avantage certain pour une thérapie anti-tumorale pancréatique (Kagawa *et al.* 2001).

Dans la recherche de nouveaux gènes induisant un fort effet cytotoxique, nous avons retenu un candidat potentiel, l'« *inducible caspase* » (icaspase). Les caspases sont des protéases qui sont impliquées dans l'apoptose. Pour conduire le signal de mort cellulaire elles

doivent être activées. Par biologie moléculaire, des caspases ont été fusionnées avec un domaine CID (Chemical Inducers of Dimerization) qui leur permet d'être activées lors de l'ajout d'un agent chimique AP20187 qui entraîne leur dimérisation. Le transfert d'icaspase-1 et d'icaspase-3 a entraîné une forte induction d'apoptose *in vitro* comme *in vivo* dans les cellules tumorales prostatiques (Shariat *et al.* 2001) de même que l'icaspase-9 dans les cellules cancéreuses orales (Pinsky *et al.* 2006). Le transfert de ces icaspases pourra être testé dans les cellules tumorales pancréatiques.

Tous les résultats obtenus durant cette étude ont fait la preuve de concept du système de ciblage des cellules tumorales pancréatiques *in vitro* et *in vivo*. Il existe toutefois plusieurs moyens d'améliorer ce système que ce soit au niveau de la transduction virale ou de l'expression du transgène d'intérêt.

En effet, le système de ciblage développé a permis de transduire les cellules tumorales pancréatiques dans un environnement immuno-déficient. Il est évident que dans un contexte immun intact, une compétition entre les anticorps attachés aux virus et les anticorps contenus dans l'organisme à traiter risque d'aboutir à des transductions aspécifiques des virus de ciblage. Pour contrecarrer ce problème, une liaison covalente entre l'enveloppe virale et les anticorps pourra être générée en produisant des protéines de fusion (Yang *et al.* 2006). Une autre méthode consiste à lier l'anticorps à l'enveloppe virale en utilisant la liaison avidine/biotine (Morizono *et al.* 2009).

Pour éviter toute transduction aspécifique, le système de ciblage cellulaire développé pourrait également être associé à un ciblage transcriptionnel grâce à des promoteurs spécifiques des cellules tumorales pancréatiques comme ceux du facteur Midkine ou de la cyclooxygénase-2 (Wesseling *et al.* 2001) ou encore le promoteur de *hTERT* réexprimé dans les cellules tumorales.

Nous avons mené une expérience pilote dans l'éventualité d'un double ciblage utilisant les antigènes de surface mais également le promoteur tumeur spécifique de *hTERT*. Une construction contenant le promoteur de *hTERT* en amont du gène codant pour la protéine GFP a été réalisée et utilisée pour transduire des cellules tumorales BxPC-3. L'activité transcriptionnelle du promoteur de *hTERT* n'a pas été détectée. Toutefois l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et il a déjà été montré que ce promoteur tumeur-spécifique pouvait conduire une transcription efficace dans des lignées tumorales pancréatiques à plusieurs reprises telles que les cellules AsPC-1, Capan-1, BxPC-3 ou encore les PANC-1 (Jacob *et al.* 2004 ; Jacob *et al.* 2005 ; Wack *et al.* 2008).

Comme nous avons pu le constater en effectuant la revue des différentes approches thérapeutiques utilisées dans le cancer du pancréas dans l'introduction de ce manuscrit, une solution semble être l'association de plusieurs traitements pour obtenir un effet anti-tumoral significatif. Le système de ciblage mis au point ici pourrait d'une part être amélioré grâce à des techniques de biologie moléculaire mais pourrait aussi être utilisé en association avec d'autres approches thérapeutiques. Le transfert de gènes à fort effet cytotoxique ou l'utilisation de chimiothérapeutique préconisé dans le traitement du cancer du pancréas comme la gemcitabine pourraient être des voies de choix pour une association thérapeutique ciblée du cancer du pancréas. Plus de 160 essais cliniques dans le monde sont actuellement en cours pour une thérapie combinée du cancer du pancréas utilisant jusqu'à 5 agents thérapeutiques.

## **II. Implication du FGFR3 dans la tumorigenèse pancréatique.**

Le travail réalisé sur le FGFR3 a permis de déterminer l'impact des différentes isoformes du récepteur au sein des cellules et des tumeurs pancréatiques humaines.

Les variants d'épissage FGFR3-IIIb et FGFR3-IIIc ont été surexprimés dans différentes lignées tumorales pancréatiques pour connaître l'impact du FGFR3 sur les propriétés cellulaires *in vitro*. La clonogénicité et la migration cellulaires des 4 lignées tumorales pancréatiques étudiées ont été induites par la surexpression du FGFR3. Les autres expériences menées *in vitro* ont toutefois montré des effets opposés du FGFR3 suivant l'état de différenciation cellulaire. En effet, le FGFR3 induit la sénescence et l'apoptose cellulaires dans les cellules à phénotype de type épithélial alors qu'il induit un effet pro-mitotique dans les cellules à phénotype de type mésenchymateux. Nous avons également montré que le FGFR3 induisait un effet pro-mitotique tardif dans une lignée cellulaire à phénotype intermédiaire qui procède à la transition épithélio-mésenchymateuse. Ces effets opposés du FGFR3 ont été expliqués par les différentes voies de signalisation induites dans les lignées à phénotype différents. L'effet pro-tumoral observé dans les MIAPaCa2 implique l'activation des MAPKinases ERK et p38 alors que l'effet pro-tumoral tardif observé dans les PANC-1 emprunte des voies pro-prolifératives alternatives conduisant à la phosphorylation des protéines pRb et Creb. Dans les cellules Capan-2 le fort effet anti-tumoral mis en évidence implique l'activation de STAT1, des protéines p21 et p27 et l'activation des protéines de

l'apoptose.

Il est important de porter plus d'attention au contexte cellulaire des différentes études réalisées sur les FGFRs et leurs isoformes dans les cancers. Des effets opposés des FGFRs ont été démontrés dans de nombreux cancers.

Un effet oncogénique du FGFR1 a été retrouvé dans le myélome multiple, un cancer d'origine mésenchymateuse, où le récepteur est constitutivement actif. (Cross *et al.* 2008). Dans le cancer du pancréas, des rôles opposés ont été retrouvés avec un effet oncogénique pour l'isoforme IIIc et suppresseur de tumeur pour l'isoforme IIIb (Wagner *et al.* 1998 ; Liu *et al.* 2007). Une deuxième étude a également mis en évidence cet effet opposé des isoformes dans la même lignée pancréatique PANC-1 (Chen *et al.* 2010). Récemment il a été montré que la stabilisation du FGFR1 par la mucine 4 induisait la migration et l'invasion des cellules tumorales pancréatiques BxPc-3 et Capan-1 (Rachagani *et al.* 2012). Il semblerait que pour le FGFR1 les effets opposés oncogénique et suppresseur de tumeurs dépendraient plutôt de l'isoforme du récepteur que du contexte cellulaire.

Concernant le FGFR2, une étude très récente a mis en évidence les mêmes rôles opposés que le FGFR3 en fonction du contexte cellulaire. En effet, le FGFR2-IIIc inhibe la prolifération des cellules épithéliales ainsi que le FGFR2-IIIb à moindre échelle alors que l'isoforme IIIb active la prolifération des cellules 3T3 murines dérivant de fibroblastes, cellules mésenchymateuses (Guo *et al.* 2012). De façon remarquable, dans des conditions physiologiques, les FGFR2 et FGFR3 ont des rôles très similaires comme par exemple dans le développement osseux puisqu'il a été mis en évidence que les mutations activatrices de ces deux récepteurs provoquaient des malformations du développement squelettique (Eswarakumar *et al.* 2005). Il est donc possible d'imaginer que ces deux récepteurs pourraient entraîner des effets opposés suivant le contexte cellulaire par le biais des mêmes voies de signalisation telles que l'induction de sénescence et d'apoptose dans les cellules épithéliales. Le rôle suppresseur de tumeurs du FGFR2 a été rapporté de nombreuses fois au cours de ces dernières années tel que dans le cancer de la vessie où le FGFR2-IIIb bloque la prolifération des cellules tumorales (Ricol *et al.* 1999) ou encore dans les adénocarcinomes salivaires où une perte d'expression du FGFR2-IIIb a été observée (Zhang *et al.* 2001).

Nous pouvons également discuter des différentes études menées sur le FGFR3 considéré comme oncogénique ces dernières années pour mettre en lumière ces rôles opposés d'oncogène et surtout de suppresseur de tumeur dans les différents cancers.

Son rôle de régulateur négatif de la croissance des chondrocytes est le plus connu et les mutations activatrices du récepteur provoquent le plus souvent des achondroplasies. Les patients atteints de cette maladie ne présentent pas de prédisposition à développer des cancers (Sahni *et al.* 1999). Dans les années 90, il a été démontré que le locus génique 4p16.3 était fréquemment perdu. Cette région précisément cartographiée en 2001 contient le gène *FGFR3* (Sibley *et al.* 2001). Dans certains cancers colorectaux, des inactivations du récepteur ont été retrouvées ainsi qu'une sous-expression de la protéine suggérant un rôle de régulateur négatif dans les cancers colorectaux (Jang *et al.* 2000). Dans les cancers urothéliaux, les mutations du *FGFR3* ont été associées à des tumeurs papillaires de bas grade et non-invasives (Zieger *et al.* 2009). A l'inverse, il a été montré une association entre la perte du *FGFR3* et les cancers de la vessie de haut grade (Mhawech-Fauceglia *et al.* 2006). Au vu de ces données, l'hypothèse selon laquelle le *FGFR3* serait un gène suppresseur de tumeur dans les cancers urothéliaux et dont la perte entraînerait la progression des tumeurs de bas grade vers un haut grade prend tout son sens et est en accord avec les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse.

Des mutations du *FGFR3* ont été mises en évidence dans des tumeurs bénignes telles que les kératoses séborrhéiques et les naevus épidermiques qui ne progressent que très rarement en maladie maligne (Hernandez *et al.* 2007).

La base de données Oncomine regroupe des études d'expression génique ([www.oncomine.org](http://www.oncomine.org)) dont l'expression génique du *FGFR3* dans des adénocarcinomes pancréatiques humains. Le nombre de copies du gène *FGFR3* dans les tumeurs pancréatiques reste inchangé dans deux études disponibles (Harasa, Maser). L'analyse d'expression des ARNs dans des micro-arrays a été réalisée avec une sonde *FGFR3-IIIc*. Sept études rapportent une comparaison entre l'expression des ARNs *FGFR3-IIIc* dans les tissus normaux et tumoraux du pancréas. Trois d'entre elles montrent une perte d'expression d'ARN dans les tumeurs par rapport aux tissus normaux de 1,75 fois à 5,2 fois (Logsdon, Ishikawa, Segara). La sous-expression des ARNs *FGFR3-IIIc* dans les adénocarcinomes pancréatiques est significative lorsque ces trois études sont regroupées ( $p=0.021^*$ ). Deux autres études rapportent une perte d'expression plus modeste 1,2 fois ( $p<0.01^{**}$ ) (Pei, Badea). Enfin, deux études supplémentaires ne montrent aucun changement d'expression d'ARN du *FGFR3-IIIc* entre les tissus normaux et tumoraux pancréatiques (Buchholz, Grutzmann).

Nous avons nous-même mis en évidence une perte d'expression du *FGFR3* dans des extraits d'ARN tumoraux et dans des tissus de tumeurs pancréatiques humaines soutenant un rôle suppresseur de tumeur du *FGFR3* dans le cancer du pancréas. L'étude de l'expression de la protéine p16-INK4A a également permis de savoir que la perte du *FGFR3* survenait après

la perte de p16-INK4A c'est-à-dire après la formation des lésions PanIN-1A et -1B. Pour compléter cette étude, l'expression des protéines TP53, SMAD4 ou encore BRCA2 qui sont des protéines perdues dans les lésions PanIN-2 et -3 permettrait de situer plus précisément la perte du FGFR3 au cours du processus de tumorigenèse pancréatique. Il serait très intéressant d'analyser si la perte du FGFR3 survient plutôt dans les tumeurs à phénotype de type mésenchymateux ou épithélial. Pour répondre à cette question, l'analyse de l'expression de la vimentine et l'E-cadhérine du tissu micro-array mettrait en évidence l'état de différenciation cellulaire des tumeurs.

Les résultats obtenus dans les lignées tumorales pancréatiques MIAPaCa2 et PANC-1 ont conduit à considérer le FGFR3 comme un oncogène dans le contexte de cellule de type mésenchymateux. Dans les myélomes multiples, la translocation chromosomique t(4;14)(p16.3;q32) entraîne une expression ectopique du récepteur FGFR3 (Chesi *et al.* 1997). De plus, il est considéré comme oncogénique dans les cellules hématopoïétiques (Li *et al.* 2001). Le FGFR3 est également associé au phénotype malin de tumeurs des tissus mous comme les carcinomes synoviaux et les rhabdomyosarcomes qui sont des tumeurs d'origine mésenchymateuse (Hirotsu *et al.* 2009 ; Ishibe *et al.* 2005).

Il est clair, selon nos résultats, que ces effets opposés empruntent différentes voies de signalisation. Nous avons vu que l'effet oncogénique majeur du récepteur impliquait les voies de signalisation pro-mitotiques ERK et p38 et que l'effet oncogénique tardif impliquait des voies alternatives conduisant à la phosphorylation des protéines Creb et pRb. En ce qui concerne l'effet suppresseur de tumeur, l'induction de la sénescence résulte de l'activation des protéines STATs ainsi que la production de la protéine p21. Il est important de noter que l'effet régulateur négatif du FGFR3 connu dans le développement osseux implique également ces protéines et induit la sénescence dans les chondrocytes (Krejci *et al.* 2010). L'effet anti-tumoral observé dans les cellules épithéliales pancréatiques résulte également, dans notre étude, de l'induction d'apoptose qui, là aussi, est retrouvée dans les chondrocytes (L'hôte *et al.* 2005).

Outre les voies de signalisation empruntées par le récepteur FGFR3, il était important d'étudier les ligands FGFs produits dans les différentes lignées tumorales pancréatiques qui pourrait également expliquer les effets opposés du FGFR3. Nous avons réalisé une étude préliminaire consistant à déterminer le niveau d'expression d'ARNs des FGFs dans les différentes lignées pancréatiques. Des boucles autocrines ont été mises en évidence. Le FGF2 n'a été détecté que dans les lignées à phénotype de type mésenchymateux et il est probable qu'il participe à la signalisation pro-mitotique observée. En effet une surexpression du FGF2

a été retrouvée dans les cellules MIAPaCa2 et PANC-1 surexprimant le FGFR3. Il serait intéressant d'étudier cette interaction FGFR3/FGF2 pour éventuellement contrecarrer l'effet pro-tumoral observé par l'utilisation d'un shRNA dirigé contre le FGF2. Le FGF9, quant à lui, est fortement exprimé dans la lignée Capan-2 et à moindre échelle dans les BxPC-3, cellules à phénotype de type épithélial. Ces premiers éléments laissent à penser que les différents couples FGF/FGFR pourraient être impliqués dans les multiples effets observés pour le FGFR3 dans les adénocarcinomes pancréatiques. Une expérience supplémentaire a permis de confirmer la mise en place d'une boucle autocrine FGF2/FGFR3 dans les cellules tumorales pancréatiques de phénotype de type mésenchymateux MIAPaCa2 et PANC-1 en étudiant l'expression des FGFs après surexpression du FGFR3. L'utilisation d'un shRNA dirigé contre le FGF2 dans ces cellules pourrait mettre en évidence un effet anti-tumoral qui confirmerait l'hypothèse selon laquelle le complexe FGFR3/FGF2 serait impliqué dans l'effet oncogénique du FGFR3 observé dans les cellules MIAPaCa2 et PANC-1. La possibilité que les FGFs puissent être impliqués dans les rôles opposés du FGFR3 pourrait également être mis en évidence par des expériences de surnageants croisés. En effet, en surexprimant par exemple le FGFR3 dans les cellules PANC-1 et en utilisant ensuite le surnageant de culture sur des cellules MIAPaCa2 parentales, on devrait observer un effet oncogénique dû à la production de FGFs et particulièrement du FGF2 dans le milieu. De même que le transfert du surnageant de culture des Capan-2 surexprimant le FGFR3 aux cellules BxPC-3 parentales pourrait mettre en évidence un effet anti-tumoral via les FGFs contenus dans le milieu.

Outre l'aspect ligand/récepteur, il serait également très intéressant d'étudier la dimérisation des différentes isoformes du FGFR3. En effet, lors de l'activation des FGFRs, une dimérisation du récepteur intervient. Elle peut s'effectuer entre deux mêmes récepteurs ou entre deux récepteurs FGFR différents. Il existe au total 7 isoformes différentes de FGFRs qui pourraient effectuer une hétérodimérisation. On pourrait imaginer que l'effet anti-tumoral observé dans les cellules tumorales pancréatiques à phénotype épithélial pourrait être potentialisé, par exemple, par l'hétérodimérisation entre le récepteur FGFR3 et l'isoforme FGFR1-IIIc. Cette dimérisation empêcherait le FGFR1-IIIc de déclencher une signalisation pro-tumorale comme l'a été observé dans les cellules pancréatiques (Chen *et al.* 2010) et potentialiser l'effet anti-tumoral du récepteur FGFR3. De plus, nous avons montré que le FGFR1 était fortement exprimé dans les cellules pancréatiques de phénotype de type mésenchymateux et le FGFR2 plus exprimé dans les cellules de phénotype de type épithélial. Il serait important de mettre en place des expériences de co-immunoprécipitation pour

conclure sur l'implication ou non des autres FGFRs dans les réponses cellulaires opposées du FGFR3 dans les lignées d'adénocarcinome pancréatique ou bien l'utilisation de shRNA dirigés contre les différents FGFRs en présence de surexpression du FGFR3 ou non.

Pour comprendre l'implication des FGFRs dans les cancers, beaucoup d'études devront encore être réalisées. Notre hypothèse selon laquelle le FGFR3 aurait des rôles opposés en fonction de l'état de différenciation des cellules devra être validée dans d'autres modèles de tumeurs. Nos résultats ainsi que l'interprétation des études menées ces dernières années nous amènent à nous poser des questions sur les thérapies anti-cancéreuses utilisant des inhibiteurs des FGFRs qui pourraient être plus dangereuses que bénéfiques dans de nombreux types de cancers. Il semble que ces thérapies doivent être utilisées au cas par cas chez les patients où il faudrait déterminer le contexte cellulaire de chaque tumeur pour espérer obtenir un effet anti-tumoral bénéfique. Utiliser le FGFR3 comme candidat pour une thérapie de l'adénocarcinome pancréatique semble impossible dans ces conditions. La caractérisation des tumeurs nécessiterait plusieurs mois de délai ce qui est généralement l'espérance de vie des patients diagnostiqués. Toutefois, des thérapies anti-cancéreuses via le FGFR3 pourraient être intéressantes dans d'autres types de cancers comme le myélome multiple où il est clairement établi qu'il agisse en tant qu'oncogène.

# LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

## Liste des publications relatives à la thèse:

1. Marie Lafitte, Isabelle Moranvillier, Stéphane Garcia, Evelyne Peuchant, Juan Iovanna, Benoit Rousseau, Pierre Dubus, Véronique Guyonnet-Dupérat, Geneviève Belleannée, Medecin Montpellier, Hubert de Verneuil, François Moreau-Gaudry and Sandrine Dabernat. **FGFR3 in pancreatic cancers: friend or foe?** (2012).  
*En soumission dans « Journal of National Cancer Institute ».*
2. Marie Lafitte, Benoit Rousseau, Isabelle Moranvillier, Miguel Taillepiere, Evelyne Peuchant, Véronique Guyonnet-Dupérat, Aurélie Bedel, Pierre Dubus, Hubert de Verneuil, François Moreau-Gaudry and Sandrine Dabernat. **In vivo gene transfer targeting in pancreatic adenocarcinoma with cell surface antigens** (2012).  
*Publié dans «Molecular Cancer».*

## Communications:

1. Lafitte M, Moranvillier I, Peuchant E, De Verneuil H, Moreau-Gaudry F, Dabernat S.  
**La surexpression du FGFR3 inhibe la croissance tumorale pancréatique.**  
Journée de l'école doctorale Arcachon 2010.  
*Prix des trois meilleures communications écrites.*
2. Marie Lafitte, François Moreau-Gaudry, Pierre Dubus, Evelyne Peuchant, Juan Iovanna, Sandrine Dabernat.  
**Le FGFR3 : un inhibiteur de tumeurs pancréatiques ?**  
Réunion annuelle du Club Français du Pancréas Bordeaux 2010.  
*Prix de la meilleure communication orale.*
3. Lafitte M, Moranvillier I, Peuchant E, De Verneuil H, Moreau-Gaudry F, Dabernat S.  
**La surexpression du FGFR3 inhibe la croissance tumorale pancréatique.**  
Journée de l'IFR66 Bordeaux 2010.
4. Marie Lafitte, Benoit Rousseau, Isabelle Moranvillier, Miguel Taillepiere, Evelyne Peuchant, Véronique Guyonnet-Dupérat, Aurélie Bedel, Pierre Dubus, Hubert de Verneuil, François Moreau-Gaudry and Sandrine Dabernat.  
**In vivo gene transfer targeting in pancreatic adenocarcinoma with cell surface antigens.**  
Réunion annuelle de l'«American Society of Gene and Cell Therapy» Philadelphie 2012.

# **REFERENCES**

- Abate-Daga, D., Garcia-Rodriguez, L., Sumoy, L. & Fillat, C. (2010) **Cell cycle control pathways act as conditioning factors for TK/GCV sensitivity in pancreatic cancer cells.** *Biochim Biophys Acta*, **1803**, 1175-1185.
- Abuharbeid, S., Czubayko, F. & Aigner, A. (2006) **The fibroblast growth factor-binding protein FGF-BP.** *Int J Biochem Cell Biol*, **38**, 1463-1468.
- Agus, D.B., Gordon, M.S., Taylor, C., Natale, R.B., Karlan, B., Mendelson, D.S., Press, M.F., Allison, D.E., Sliwkowski, M.X., Lieberman, G., Kelsey, S.M. & Fyfe, G. (2005) **Phase I clinical study of pertuzumab, a novel HER dimerization inhibitor, in patients with advanced cancer.** *J Clin Oncol*, **23**, 2534-2543.
- Alexakis, N., Halloran, C., Raraty, M., Ghaneh, P., Sutton, R. & Neoptolemos, J.P. (2004) **Current standards of surgery for pancreatic cancer.** *Br J Surg*, **91**, 1410-1427.
- Ali, S., Ahmad, A., Banerjee, S., Padhye, S., Dominiak, K., Schaffert, J.M., Wang, Z., Philip, P.A. & Sarkar, F.H. (2010) **Gemcitabine sensitivity can be induced in pancreatic cancer cells through modulation of miR-200 and miR-21 expression by curcumin or its analogue CDF.** *Cancer Res*, **70**, 3606-3617.
- Altinbas, M., Coskun, H.S., Er, O., Ozkan, M., Eser, B., Unal, A., Cetin, M., Soyuer, S. (2004) **A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer.** *J Thromb Haemost* **2**, **8**, 1266-1271.
- Altomare, D.A. & Testa, J.R. (2005) **Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer.** *Oncogene*, **24**, 7455-7464.
- Angelova, A.L., Aprahamian, M., Grekova, S.P., Hajri, A., Leuchs, B., Giese, N.A., Dinsart, C., Herrmann, A., Balboni, G., Rommelaere, J. & Raykov, Z. (2009) **Improvement of gemcitabine-based therapy of pancreatic carcinoma by means of oncolytic parvovirus H-1PV.** *Clin Cancer Res*, **15**, 511-519.
- Antoniou, A.C., Spurdle, A.B., Sinilnikova, O.M., Healey, S., Pooley, K.A., Schmutzler, R.K., Vermold, B., *et al.* (2008) **Common breast cancer-predisposition alleles are associated**

- with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers.** *Am J Hum Genet*, **82**, 937-948.
- Aoki, K., Furuhata, S., Hatanaka, K., Maeda, M., Remy, J.S., Behr, J.P., Terada, M. & Yoshida, T. (2001) **Polyethylenimine-mediated gene transfer into pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity.** *Gene Ther*, **8**, 508-514.
- Armstrong, L., Davydova, J., Brown, E., Han, J., Yamamoto, M. & Vickers, S.M. (2012) **Delivery of interferon alpha using a novel Cox2-controlled adenovirus for pancreatic cancer therapy.** *Surgery*, **152**, 114-122.
- Arnaud-Dabernat, S., Kritzik, M., Kayali, A.G., Zhang, Y.Q., Liu, G., Ungles, C. & Sarvetnick, N. (2007) **FGFR3 is a negative regulator of the expansion of pancreatic epithelial cells.** *Diabetes*, **56**, 96-106.
- Arnaud-Dabernat, S., Yadav, D. & Sarvetnick, N. (2008) **FGFR3 contributes to intestinal crypt cell growth arrest.** *J Cell Physiol*, **216**, 261-268.
- Artandi, S.E., Chang, S., Lee, S.L., Alson, S., Gottlieb, G.J., Chin, L. & DePinho, R.A. (2000) **Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice.** *Nature*, **406**, 641-645.
- Asa, S.L. (2011) **Pancreatic endocrine tumors.** *Mod Pathol*, **24 Suppl 2**, S66-77.
- Atkinson, H. & Chalmers, R. (2010) **Delivering the goods: viral and non-viral gene therapy systems and the inherent limits on cargo DNA and internal sequences.** *Genetica*, **138**, 485-498.
- Azzoli, C.G., Kris, M.G., Pfister, D.G. (2007) **Cisplatin versus carboplatin for patients with metastatic non-small-cell lung cancer--an old rivalry renewed.** *J Natl Cancer Inst*, **99**, 828-829.
- Baertschi, S., Zhuang, L. & Trueb, B. (2007) **Mice with a targeted disruption of the Fgfr1 gene die at birth due to alterations in the diaphragm.** *Febs J*, **274**, 6241-6253.

- Ballehaninna, U.K. and Chamberlain, R.S. (2012) **The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal.** *J Gastrointest Oncol*, **3**, 105-119.
- Bange, J., Prechtel, D., Cheburkin, Y., Specht, K., Harbeck, N., Schmitt, M., Knyazeva, T., Muller, S., Gartner, S., Sures, I., Wang, H., Imyanitov, E., Haring, H.U., Knayzev, P., Iacobelli, S., Hofler, H. & Ullrich, A. (2002) **Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele.** *Cancer Res*, **62**, 840-847.
- Bardeesy, N. & DePinho, R.A. (2002) **Pancreatic cancer biology and genetics.** *Nat Rev Cancer*, **2**, 897-909.
- Barteau, B., Chevre, R., Letrou-Bonneval, E., Labas, R., Lambert, O. & Pitard, B. (2008) **Physicochemical parameters of non-viral vectors that govern transfection efficiency.** *Curr Gene Ther*, **8**, 313-323.
- Berlin, J.D., Adak, S., Vaughn, D.J., Flinker, D., Blaszkowsky, L., Harris, J.E. & Benson, I. (2000) **A phase II study of gemcitabine and 5-fluorouracil in metastatic pancreatic cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E3296).** *Oncology*, **58**, 215-218.
- Bishop, J.R., Schuksz, M. & Esko, J.D. (2007) **Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology.** *Nature*, **446**, 1030-1037.
- Blume-Jensen, P. & Hunter, T. (2001) **Oncogenic kinase signalling.** *Nature*, **411**, 355-365.
- Boerger, A.L., Snitkovsky, S., Young, J.A. (1999) **Retroviral vectors preloaded with a viral receptor-ligand bridge protein are targeted to specific cell types.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 9867-9872.
- Böttcher, R.T., Pollet, N., Delius, H. & Niehrs, C. (2004) **The transmembrane protein XFLRT3 forms a complex with FGF receptors and promotes FGF signalling.** *Nat Cell Biol*, **6**, 38-44.
- Boucher, P.D., Im, M.M., Freytag, S.O. & Shewach, D.S. (2006) **A novel mechanism of synergistic cytotoxicity with 5-fluorocytosine and ganciclovir in double suicide gene therapy.** *Cancer Res*, **66**, 3230-3237.

- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R. (2002) **Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference.** *Cancer Cell*, **2**, 243-247.
- Brunner, T.B. & Scott-Brown, M. (2010) **The role of radiotherapy in multimodal treatment of pancreatic carcinoma.** *Radiat Oncol*, **5**, 64.
- Bruns, C.J., Solorzano, C.C., Harbison, M.T., Ozawa, S., Tsan, R., Fan, D., Abbruzzese, J., Traxler, P., Buchdunger, E., Radinsky, R. & Fidler, I.J. (2000) **Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma.** *Cancer Res*, **60**, 2926-2935.
- Buchler, M.W., Wagner, M., Schmied, B.M., Uhl, W., Friess, H. & Z'Graggen, K. (2003) **Changes in morbidity after pancreatic resection: toward the end of completion pancreatectomy.** *Arch Surg*, **138**, 1310-1314; discussion 1315.
- Burris, H. & Storniolo, A.M. (1997) **Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil.** *Eur J Cancer*, **33 Suppl 1**, S18-22.
- Calbo, J., Marotta, M., Cascallo, M., Roig, J.M., Gelpi, J.L., Fueyo, J. & Mazo, A. (2001) **Adenovirus-mediated wt-p16 reintroduction induces cell cycle arrest or apoptosis in pancreatic cancer.** *Cancer Gene Ther*, **8**, 740-750.
- Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J.P. & Radvanyi, F. (1999) **Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas.** *Nat Genet*, **23**, 18-20.
- Carrere, N., Vernejoul, F., Souque, A., Asnacios, A., Vaysse, N., Pradayrol, L., Susini, C., Buscail, L., Cordelier, P. (2005) **Characterization of the bystander effect of somatostatin receptor sst2 after in vivo gene transfer into human pancreatic cancer cells.** *Hum Gene Ther*, **16**, 1175-1193.
- Carrio, M., Romagosa, A., Mercade, E., Mazo, A., Nadal, M., Gomez-Foix, A.M. & Fillat, C. (1999) **Enhanced pancreatic tumor regression by a combination of adenovirus and retrovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene.** *Gene Ther*, **6**, 547-553.

- Carrio, M., Visa, J., Cascante, A., Estivill, X. & Fillat, C. (2002) **Intratumoral activation of cyclophosphamide by retroviral transfer of the cytochrome P450 2B1 in a pancreatic tumor model. Combination with the HSVtk/GCV system.** *J Gene Med*, **4**, 141-149.
- Cartwright, T.H., Cohn, A., Varkey, J.A., Chen, Y.M., Szatrowski, T.P., Cox, J.V. & Schulz, J.J. (2002) **Phase II study of oral capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer.** *J Clin Oncol*, **20**, 160-164.
- Cascallo, M., Mercade, E., Capella, G., Lluís, F., Fillat, C., Gomez-Foix, A.M. & Mazo, A. (1999) **Genetic background determines the response to adenovirus-mediated wild-type p53 expression in pancreatic tumor cells.** *Cancer Gene Ther*, **6**, 428-436.
- Cascante, A., Huch, M., Rodriguez, L.G., Gonzalez, J.R., Costantini, L. & Fillat, C. (2005) **Tat8-TK/GCV suicide gene therapy induces pancreatic tumor regression in vivo.** *Hum Gene Ther*, **16**, 1377-1388.
- Casci, T., Vinos, J. & Freeman, M. (1999) **Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling.** *Cell*, **96**, 655-665.
- Cascinu, S., Silva, R.R., Barni, S., Labianca, R., Frontini, L., Piazza, E., Pancera, G., Giordani, P., Giuliodori, L., Pessi, M.A., Fusco, V., Luporini, G., Cellerino, R. & Catalano, G. (1999) **A combination of gemcitabine and 5-fluorouracil in advanced pancreatic cancer, a report from the Italian Group for the Study of Digestive Tract Cancer (GISCAD).** *Br J Cancer*, **80**, 1595-1598.
- Chaudhuri, M.M., Moscatelli, D. & Basilico, C. (1993) **Involvement of the conserved acidic amino acid domain of FGF receptor 1 in ligand-receptor interaction.** *J Cell Physiol*, **157**, 209-216.
- Chawla, S.P., Chua, V.S., Fernandez, L., Quon, D., Blackwelder, W.C., Gordon, E.M. & Hall, F.L. (2010) **Advanced phase I/II studies of targeted gene delivery in vivo: intravenous REXIN-G for gemcitabine-resistant metastatic pancreatic cancer.** *Mol Ther*, **18**, 435-441.
- Chen, G., Tian X., Liu, Z., Zhou, S., Schmidt, B., Henne-Bruns, D., Bachem, M., Kornmann, M. (2010) **Inhibition of endogenous SPARC enhances pancreatic cancer cell growth: modulation by FGFR1-III isoform expression.** *Br J Cancer*, **102**, 188-195.

- Chen, H., Ma, J., Li, W., Eliseenkova, A.V., Xu, C., Neubert, T.A., Miller, W.T. & Mohammadi, M. (2007) **A molecular brake in the kinase hinge region regulates the activity of receptor tyrosine kinases.** *Mol Cell*, **27**, 717-730.
- Chene, P. (2001) **The role of tetramerization in p53 function.** *Oncogene*, **20**, 2611-2617.
- Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W.M. & Bergsagel, P.L. (1997) **Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3.** *Nat Genet*, **16**, 260-264.
- Colucci, G., Giuliani, F., Gebbia, V., Biglietto, M., Rabitti, P., Uomo, G., Cigolari, S., Testa, A., Maiello, E. & Lopez, M. (2002) **Gemcitabine alone or with cisplatin for the treatment of patients with locally advanced and/or metastatic pancreatic carcinoma: a prospective, randomized phase III study of the Gruppo Oncologia dell'Italia Meridionale.** *Cancer*, **94**, 902-910.
- Colvin, J.S., Bohne, B.A., Harding, G.W., McEwen, D.G. & Ornitz, D.M. (1996) **Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3.** *Nat Genet*, **12**, 390-397.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., Bennouna, J., Bachet, J.B., Khemissa-Akouz, F., Pere-Verge, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C. & Ducreux, M. (2011) **FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer.** *N Engl J Med*, **364**, 1817-1825.
- Conroy, T. & Mitry, E. (2011) **[Chemotherapy of metastatic pancreatic adenocarcinoma: challenges and encouraging results].** *Bull Cancer*, **98**, 1439-1446.
- Conroy, T., Paillet, B., Francois, E., Bugat, R., Jacob, J.H., Stein, U., Nasca, S., Metges, J.P., Rixe, O., Michel, P., Magherini, E., Hua, A. & Deplanque, G. (2005) **Irinotecan plus oxaliplatin and leucovorin-modulated fluorouracil in advanced pancreatic cancer--a Groupe Tumeurs Digestives of the Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer study.** *J Clin Oncol*, **23**, 1228-1236.

- Cross, N.C. & Reiter, A. (2008) **Fibroblast growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor abnormalities in eosinophilic myeloproliferative disorders.** *Acta Haematol*, **119**, 199-206.
- Cullinan, S.A., Moertel, C.G., Fleming, T.R., Rubin, J.R., Krook, J.E., Everson, L.K., Windschitl, H.E., Twito, D.I., Marschke, R.F., Foley, J.F. & et al. (1985) **A comparison of three chemotherapeutic regimens in the treatment of advanced pancreatic and gastric carcinoma. Fluorouracil vs fluorouracil and doxorubicin vs fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin.** *Jama*, **253**, 2061-2067.
- Cunningham, D., Chau, I., Stocken, D.D., Valle, J.W., Smith, D., Steward, W., Harper, P.G., Dunn, J., Tudur-Smith, C., West, J., Falk, S., Crellin, A., Adab, F., Thompson, J., Leonard, P., Ostrowski, J., Eatock, M., Scheithauer, W., Herrmann, R. & Neoptolemos, J.P. (2009) **Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer.** *J Clin Oncol*, **27**, 5513-5518.
- Dai, M.H., Zamarin, D., Gao, S.P., Chou, T.C., Gonzalez, L., Lin, S.F. & Fong, Y. (2010) **Synergistic action of oncolytic herpes simplex virus and radiotherapy in pancreatic cancer cell lines.** *Br J Surg*, **97**, 1385-1394.
- Davidoff, A.N. & Mendelow, B.V. (1993) **Cell-cycle disruptions and apoptosis induced by the cyclophosphamide derivative mafosfamide.** *Exp Hematol*, **21**, 922-927.
- Deharvengt, S., Rejiba, S., Wack, S., Aprahamian, M. & Hajri, A. (2007) **Efficient electrogene therapy for pancreatic adenocarcinoma treatment using the bacterial purine nucleoside phosphorylase suicide gene with fludarabine.** *Int J Oncol*, **30**, 1397-1406.
- Deharvengt, S., Wack, S., Uhring, M., Aprahamian, M. & Hajri, A. (2004) **Suicide gene/prodrug therapy for pancreatic adenocarcinoma by E. coli purine nucleoside phosphorylase and 6-methylpurine 2'-deoxyriboside.** *Pancreas*, **28**, E54-64.
- Delpu, Y., Hanoun, N., Lulka, H., Sicard, F., Selves, J., Buscail, L., Torrisani, J. & Cordelier, P. (2011) **Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis.** *Curr Genomics*, **12**, 15-24.

- Demols, A., Peeters, M., Polus, M., Marechal, R., Gay, F., Monsaert, E., Hendlisz, A. & Van Laethem, J.L. (2006) **Gemcitabine and oxaliplatin (GEMOX) in gemcitabine refractory advanced pancreatic adenocarcinoma: a phase II study.** *Br J Cancer*, **94**, 481-485.
- Dempe, S., Lavie, M., Struyf, S., Bhat, R., Verbeke, H., Paschek, S., Berghmans, N., Geibig, R., Rommelaere, J., Van Damme, J. & Dinsart, C. (2012) **Antitumoral activity of parvovirus-mediated IL-2 and MCP-3/CCL7 delivery into human pancreatic cancer: implication of leucocyte recruitment.** *Cancer Immunol Immunother.*
- Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A. & Leder, P. (1996) **Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth.** *Cell*, **84**, 911-921.
- Dode, C., Levilliers, J., Dupont, J.M., De Paepe, A., Le Du, N., Soussi-Yanicostas, N., Coimbra, R.S., Delmaghani, S., Compain-Nouaille, S., Baverel, F., Pecheux, C., Le Tessier, D., Cruaud, C., Delpech, M., Speleman, F., Vermeulen, S., Amalfitano, A., Bachelot, Y., Bouchard, P., Cabrol, S., Carel, J.C., Delemarre-van de Waal, H., Goulet-Salmon, B., Kottler, M.L., Richard, O., Sanchez-Franco, F., Saura, R., Young, J., Petit, C. & Hardelin, J.P. (2003) **Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome.** *Nat Genet*, **33**, 463-465.
- Du Rieu, M.C., Torrisani, J., Selves, J., Al Saati, T., Souque, A., Dufresne, M., Tsongalis, G.J., Suriawinata, A.A., Carrere, N., Buscail, L. & Cordelier, P. (2010) **MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions.** *Clin Chem*, **56**, 603-612.
- Ducreux, M., Rougier, P., Pignon, J.P., Douillard, J.Y., Seitz, J.F., Bugat, R., Bosset, J.F., Merouche, Y., Raoul, J.L., Ychou, M., Adenis, A., Berthault-Cvitkovic, F. & Luboinski, M. (2002) **A randomised trial comparing 5-FU with 5-FU plus cisplatin in advanced pancreatic carcinoma.** *Ann Oncol*, **13**, 1185-1191.
- Eisold, S., Schmidt, J., Ryschich, E., Gock, M., Klar, E., von Knebel Doeberitz, M. & Linnebacher, M. (2007) **Induction of an antitumoral immune response by wild-type adeno-associated virus type 2 in an in vivo model of pancreatic carcinoma.** *Pancreas*, **35**, 63-72.
- Elion, G.B. (1983) **The biochemistry and mechanism of action of acyclovir.** *J Antimicrob Chemother*, **12 Suppl B**, 9-17.

- Eswarakumar, V.P., Lax, I. & Schlessinger, J. (2005) **Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors.** *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**, 139-149.
- Eswarakumar, V.P. & Schlessinger, J. (2007) **Skeletal overgrowth is mediated by deficiency in a specific isoform of fibroblast growth factor receptor 3.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 3937-3942.
- Evans, D.B., Varadhachary, G.R., Crane, C.H., Sun, C.C., Lee, J.E., Pisters, P.W., Vauthey, J.N., Wang, H., Cleary, K.R., Staerkel, G.A., Charnsangavej, C., Lano, E.A., Ho, L., Lenzi, R., Abbruzzese, J.L. & Wolff, R.A. (2008) **Preoperative gemcitabine-based chemoradiation for patients with resectable adenocarcinoma of the pancreatic head.** *J Clin Oncol*, **26**, 3496-3502.
- Evoy, D., Hirschowitz, E.A., Naama, H.A., Li, X.K., Crystal, R.G., Daly, J.M. & Lieberman, M.D. (1997) **In vivo adenoviral-mediated gene transfer in the treatment of pancreatic cancer.** *J Surg Res*, **69**, 226-231.
- Farnell, M.B., Pearson, R.K., Sarr, M.G., DiMagno, E.P., Burgart, L.J., Dahl, T.R., Foster, N. & Sargent, D.J. (2005) **A prospective randomized trial comparing standard pancreatoduodenectomy with pancreatoduodenectomy with extended lymphadenectomy in resectable pancreatic head adenocarcinoma.** *Surgery*, **138**, 618-628; discussion 628-630.
- Fillat, C., Carrio, M., Cascante, A. & Sangro, B. (2003) **Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application.** *Curr Gene Ther*, **3**, 13-26.
- Fleming, J.B., Shen, G.L., Holloway, S.E., Davis, M. & Brekken, R.A. (2005) **Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras-directed therapy.** *Mol Cancer Res*, **3**, 413-423.
- Frampton, A.E., Krell, J., Jacob, J., Stebbing, J., Castellano, L., Jiao, L.R. (2012) **Loss of miR-126 is crucial to pancreatic cancer progression.** *Expert Rev Anticancer Ther*, **12**, 881-884.
- Franklin, M.C., Carey, K.D., Vajdos, F.F., Leahy, D.J., de Vos, A.M. & Sliwkowski, M.X. (2004) **Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex.** *Cancer Cell*, **5**, 317-328.

- Freeman, S.M., Abboud, C.N., Whartenby, K.A., Packman, C.H., Koeplin, D.S., Moolten, F.L. & Abraham, G.N. (1993) **The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified.** *Cancer Res*, **53**, 5274-5283.
- Frese, K.K., Neesse, A., Cook, N., Bapiro, T.E., Lolkema, M.P., Jodrell, D.I., Tuveson, D.A. (2012) **nab-Paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer.** *Cancer Discov*, **2**, 260-269.
- Fu, X., Tao, L., Li, M., Fisher, W.E. & Zhang, X. (2006) **Effective treatment of pancreatic cancer xenografts with a conditionally replicating virus derived from type 2 herpes simplex virus.** *Clin Cancer Res*, **12**, 3152-3157.
- Giovannetti, E., Funel, N., Peters, G.J., Del Chiaro, M., Erozenski, L.A., Vasile, E., Leon, L.G., Pollina, L.E., Groen, A., Falcone, A., Danesi, R., Campani, D., Verheul, H.M. & Boggi, U. (2010) **MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity.** *Cancer Res*, **70**, 4528-4538.
- Giri, D., Ropiquet, F. & Ittmann, M. (1999) **Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer.** *Clin Cancer Res*, **5**, 1063-1071.
- Gironella, M., Seux, M., Xie, M.J., Cano, C., Tomasini, R., Gommeaux, J., Garcia, S., Nowak, J., Yeung, M.L., Jeang, K.T., Chaix, A., Fazli, L., Motoo, Y., Wang, Q., Rocchi, P., Russo, A., Gleave, M., Dagorn, J.C., Iovanna, J.L., Carrier, A., Pebusque, M.J. & Dusetti, N.J. (2007) **Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 16170-16175.
- Goggins, M., Hruban, R.H. & Kern, S.E. (2000) **BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications.** *Am J Pathol*, **156**, 1767-1771.
- Goh, A.M., Coffill, C.R. & Lane, D.P. (2011) **The role of mutant p53 in human cancer.** *J Pathol*, **223**, 116-126.

- Gordon, E.M., Liu, P.X., Chen, Z.H., Liu, L., Whitley, M.D., Gee, C., Groshen, S., Hinton, D.R., Beart, R.W. & Hall, F.L. (2000) **Inhibition of metastatic tumor growth in nude mice by portal vein infusions of matrix-targeted retroviral vectors bearing a cytotoxic cyclin G1 construct.** *Cancer Res*, **60**, 3343-3347.
- Gotoh, N. (2008) **Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins.** *Cancer Sci*, **99**, 1319-1325.
- Graeven, U., Kremer, B., Sudhoff, T., Killing, B., Rojo, F., Weber, D., Tillner, J., Unal, C. & Schmiegel, W. (2006) **Phase I study of the humanised anti-EGFR monoclonal antibody matuzumab (EMD 72000) combined with gemcitabine in advanced pancreatic cancer.** *Br J Cancer*, **94**, 1293-1299.
- Green, N.K., Youngs, D.J., Neoptolemos, J.P., Friedlos, F., Knox, R.J., Springer, C.J., Anlezark, G.M., Michael, N.P., Melton, R.G., Ford, M.J., Young, L.S., Kerr, D.J. & Searle, P.F. (1997) **Sensitization of colorectal and pancreatic cancer cell lines to the prodrug 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954) by retroviral transduction and expression of the E. coli nitroreductase gene.** *Cancer Gene Ther*, **4**, 229-238.
- Grignet-Debrus, C., Cool, V., Baudson, N., Velu, T. & Calberg-Bacq, C.M. (2000) **The role of cellular- and prodrug-associated factors in the bystander effect induced by the Varicella zoster and Herpes simplex viral thymidine kinases in suicide gene therapy.** *Cancer Gene Ther*, **7**, 1456-1468.
- Guo, M., Liu, W., Serra, S., Asa, S.L., Ezzat, S. (2012) **FGFR2 isoforms support epithelial-stromal interactions in thyroid cancer progression.** *Cancer Res*, **72**, 2017-2027.
- Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluk, C.A., da Costa, L.T., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Fischer, A., Yeo, C.J., Hruban, R.H. & Kern, S.E. (1996) **DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1.** *Science*, **271**, 350-353.
- Haines, B.P., Wheldon, L.M., Summerbell, D., Heath, J.K. & Rigby, P.W. (2006) **Regulated expression of FLRT genes implies a functional role in the regulation of FGF signalling during mouse development.** *Dev Biol*, **297**, 14-25.

- Hajri, A., Wack, S., Lehn, P., Vigneron, J.P., Lehn, J.M., Marescaux, J., Aprahamian, M. (2004) **Combined suicide gene therapy for pancreatic peritoneal carcinomatosis using BGTC liposomes.** *Cancer Gene Ther*, **11**, 16-27.
- Hall, B., Andreeff, M. & Marini, F. (2007) **The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles.** *Handb Exp Pharmacol*, 263-283.
- Hamada, S., Satoh, K., Fujibuchi, W., Hirota, M., Kanno, A., Unno, J., Masamune, A., Kikuta, K., Kume, K. & Shimosegawa, T. (2012) **MiR-126 acts as a tumor suppressor in pancreatic cancer cells via the regulation of ADAM9.** *Mol Cancer Res*, **10**, 3-10.
- Han, L., Witmer, P.D., Casey, E., Valle, D. & Sukumar, S. (2007) **DNA methylation regulates MicroRNA expression.** *Cancer Biol Ther*, **6**, 1284-1288.
- Han, X., Kasahara, N., Kan, Y.W. (1995) **Ligand-directed retroviral targeting of human breast cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 9747-9751.
- Hance, K.W., Rogers, C.J., Zaharoff, D.A., Canter, D., Schlom, J. & Greiner, J.W. (2009) **The antitumor and immunoadjuvant effects of IFN-alpha in combination with recombinant poxvirus vaccines.** *Clin Cancer Res*, **15**, 2387-2396.
- Harada, N., Gansauge, S., Gansauge, F., Gause, H., Shimoyama, S., Imaizumi, T., Mattfeld, T., Schoenberg, M.H. & Beger, H.G. (1997) **Nuclear accumulation of p53 correlates significantly with clinical features and inversely with the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) in pancreatic cancer.** *Br J Cancer*, **76**, 299-305.
- Harder, J., Ihorst, G., Heinemann, V., Hofheinz, R., Moehler, M., Buechler, P., Kloeppe, G., Rocken, C., Bitzer, M., Boeck, S., Endlicher, E., Reinacher-Schick, A., Schmoor, C., Geissler, M. (2012) **Multicentre phase II trial of trastuzumab and capecitabine in patients with HER2 overexpressing metastatic pancreatic cancer.** *Br J Cancer*, **106**, 1033-1038.
- Haugk, B. (2010) **Pancreatic intraepithelial neoplasia-can we detect early pancreatic cancer?** *Histopathology*, **57**, 503-514.

- Haugsten, E.M., Sorensen, V., Brech, A., Olsnes, S. & Wesche, J. (2005) **Different intracellular trafficking of FGF1 endocytosed by the four homologous FGF receptors.** *J Cell Sci*, **118**, 3869-3881.
- Hecht, J.R., Bedford, R., Abbruzzese, J.L., Lahoti, S., Reid, T.R., Soetikno, R.M., Kim, D.H. & Freeman, S.M. (2003) **A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma.** *Clin Cancer Res*, **9**, 555-561.
- Heinemann, V., Quietzsch, D., Gieseler, F., Gonnermann, M., Schonekas, H., Rost, A., Neuhaus, H., Haag, C., Clemens, M., Heinrich, B., Vehling-Kaiser, U., Fuchs, M., Fleckenstein, D., Gesierich, W., Uthgenannt, D., Einsele, H., Holstege, A., Hinke, A., Schalhorn, A. & Wilkowski, R. (2006) **Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer.** *J Clin Oncol*, **24**, 3946-3952.
- Hernandez, S., Lopez-Knowles, E., Lloreta, J., Kogevinas, M., Amoros, A., Tardon, A., Carrato, A., Serra, C., Malats, N. & Real, F.X. (2006) **Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas.** *J Clin Oncol*, **24**, 3664-3671.
- Hernandez, S., Toll, A., Baselga, E., Ribe, A., Azua-Romeo, J., Pujol, R.M. & Real, F.X. (2007) **Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in epidermal nevi and associated low grade bladder tumors.** *J Invest Dermatol*, **127**, 1664-1666.
- Herrmann, R., Bodoky, G., Ruhstaller, T., Glimelius, B., Bajetta, E., Schuller, J., Saletti, P., Bauer, J., Figer, A., Pestalozzi, B., Kohne, C.H., Mingrone, W., Stemmer, S.M., Tamas, K., Kornek, G.V., Koeberle, D., Cina, S., Bernhard, J., Dietrich, D. & Scheithauer, W. (2007) **Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group.** *J Clin Oncol*, **25**, 2212-2217.
- Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N. & Depinho, R.A. (2006) **Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Genes Dev*, **20**, 1218-1249.

- Hidalgo, M., Castellano, D., Paz-Ares, L., Gravalos, C., Diaz-Puente, M., Hitt, R., Alonso, S. & Cortes-Funes, H. (1999) **Phase I-II study of gemcitabine and fluorouracil as a continuous infusion in patients with pancreatic cancer.** *J Clin Oncol*, **17**, 585-592.
- Hirotsu, M., Setoguchi, T., Matsunoshita, Y., Sasaki, H., Nagao, H., Gao, H., Sugimura, K., Komiya, S. (2009) **Tumour formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells.** *Br J Cancer*, **101**, 2030-2037.
- Hirsch-Lerner, D., Zhang, M., Eliyahu, H., Ferrari, M.E., Wheeler, C.J. & Barenholz, Y. (2005) **Effect of "helper lipid" on lipoplex electrostatics.** *Biochim Biophys Acta*, **1714**, 71-84.
- Ho, H.K., Pok, S., Streit, S., Ruhe, J.E., Hart, S., Lim, K.S., Loo, H.L., Aung, M.O., Lim, S.G. & Ullrich, A. (2009) **Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, anti-apoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention.** *J Hepatol*, **50**, 118-127.
- Hong, S.M., Park, J.Y., Hruban, R.H. & Goggins, M. (2011) **Molecular signatures of pancreatic cancer.** *Arch Pathol Lab Med*, **135**, 716-727.
- Howard, B.D., Boenicke, L., Schniewind, B., Henne-Bruns, D. & Kalthoff, H. (2000) **Transduction of human pancreatic tumor cells with vesicular stomatitis virus G-pseudotyped retroviral vectors containing a herpes simplex virus thymidine kinase mutant gene enhances bystander effects and sensitivity to ganciclovir.** *Cancer Gene Ther*, **7**, 927-938.
- Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E.S., Goodman, S.N., Kern, S.E., Klimstra, D.S., Kloppel, G., Longnecker, D.S., Luttges, J. & Offerhaus, G.J. (2001) **Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions.** *Am J Surg Pathol*, **25**, 579-586.
- Hu, M. C., Wang, Y.P., Qiu, W.R. (1999) **Human fibroblast growth factor-18 stimulates fibroblast cell proliferation and is mapped to chromosome 14p11.** *Oncogene*, **18**, 2635-2642.
- Huang, X., Yang, C., Jin, C., Luo, Y., Wang, F. & McKeegan, W.L. (2009) **Resident hepatocyte fibroblast growth factor receptor 4 limits hepatocarcinogenesis.** *Mol Carcinog*, **48**, 553-562.

- Huang, Z.Q., Buchsbaum, D.J., Raisch, K.P., Bonner, J.A., Bland, K.I. & Vickers, S.M. (2003) **Differential responses by pancreatic carcinoma cell lines to prolonged exposure to Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody.** *J Surg Res*, **111**, 274-283.
- Huber, B.E., Austin, E.A., Richards, C.A., Davis, S.T. & Good, S.S. (1994) **Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8302-8306.
- Huch, M., Abate-Daga, D., Roig, J.M., Gonzalez, J.R., Fabregat, J., Sosnowski, B., Mazo, A. & Fillat, C. (2006) **Targeting the CYP2B 1/cyclophosphamide suicide system to fibroblast growth factor receptors results in a potent antitumoral response in pancreatic cancer models.** *Hum Gene Ther*, **17**, 1187-1200.
- Huggett, M.T., Pereira, S.P. (2011) **Diagnosing and managing pancreatic cancer.** *Practitioner*, **255**, 21-25/2-3.
- Hughes, B.W., King, S.A., Allan, P.W., Parker, W.B. & Sorscher, E.J. (1998) **Cell to cell contact is not required for bystander cell killing by Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase.** *J Biol Chem*, **273**, 2322-2328.
- Hwang, H.W. & Mendell, J.T. (2006) **MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis.** *Br J Cancer*, **94**, 776-780.
- Hwang, R.F., Gordon, E.M., Anderson, W.F. & Parekh, D. (1998) **Gene therapy for primary and metastatic pancreatic cancer with intraperitoneal retroviral vector bearing the wild-type p53 gene.** *Surgery*, **124**, 143-150; discussion 150-141.
- Ibrahimi, O.A., Zhang, F., Eliseenkova, A.V., Linhardt, R.J. & Mohammadi, M. (2004) **Proline to arginine mutations in FGF receptors 1 and 3 result in Pfeiffer and Muenke craniosynostosis syndromes through enhancement of FGF binding affinity.** *Hum Mol Genet*, **13**, 69-78.
- Iorio, M.V. & Croce, C.M. (2009) **MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact.** *J Clin Oncol*, **27**, 5848-5856.

- Ishibe T, Nakayama T, Okamoto T, Aoyama T, Nishijo K, Shibata KR, Shima Y, Nagayama S, Katagiri T, Nakamura Y *et al.* (2005) **Disruption of fibroblast growth factor signal pathway inhibits the growth of synovial sarcomas: potential application of signal inhibitors to molecular target therapy.** *Clin Cancer Res*, **11**, 2702-2712.
- Jacob, D., Davis, J., Zhu, H., Zhang, L., Teraishi, F., Wu, S., Marini, F.C., 3rd & Fang, B. (2004) **Suppressing orthotopic pancreatic tumor growth with a fiber-modified adenovector expressing the TRAIL gene from the human telomerase reverse transcriptase promoter.** *Clin Cancer Res*, **10**, 3535-3541.
- Jacob, D., Davis, J.J., Zhang, L., Zhu, H., Teraishi, F. & Fang, B. (2005) **Suppression of pancreatic tumor growth in the liver by systemic administration of the TRAIL gene driven by the hTERT promoter.** *Cancer Gene Ther*, **12**, 109-115.
- Jang, J.H., Shin, K.H., Park, Y.J., Lee, R.J., McKeehan, W.L. & Park, J.G. (2000) **Novel transcripts of fibroblast growth factor receptor 3 reveal aberrant splicing and activation of cryptic splice sequences in colorectal cancer.** *Cancer Res*, **60**, 4049-4052.
- Ji, B., Tsou, L., Wang, H., Gaiser, S., Chang, D.Z., Daniluk, J., Bi, Y., Grote, T., Longnecker, D.S. & Logsdon, C.D. (2009) **Ras activity levels control the development of pancreatic diseases.** *Gastroenterology*, **137**, 1072-1082, 1082 e1071-1076.
- Jiang, C., Tan, T., Yi, X.P., Shen, H. & Li, Y.X. (2011) **Lentivirus-mediated shRNA targeting XIAP and survivin inhibit SW1990 pancreatic cancer cell proliferation in vitro and in vivo.** *Mol Med Report*, **4**, 667-674.
- Jimenez, T., Fox, W.P., Naus, C.C., Galipeau, J. & Belliveau, D.J. (2006) **Connexin over-expression differentially suppresses glioma growth and contributes to the bystander effect following HSV-thymidine kinase gene therapy.** *Cell Commun Adhes*, **13**, 79-92.
- Johnson, D.E. & Williams, L.T. (1993) **Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family.** *Adv Cancer Res*, **60**, 1-41.
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., Hong, S.M., Fu, B., Lin, M.T., Calhoun, E.S., Kamiyama, H., Walter, K., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Hartigan, J., Smith, D.R., Hidalgo, M., Leach, S.D., Klein, A.P., Jaffee, E.M., Goggins, M., Maitra, A., Lacobuzio-Donahue, C., Eshleman, J.R.,

- Kern, S.E., Hruban, R.H., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W. (2008) **Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses.** *Science*, **321**, 1801-1806.
- Kagawa, S., He, C., Gu, J., Koch, P., Rha, S.J., Roth, J.A., Curley, S.A., Stephens, L.C., Fang, B. (2001) **Antitumor activity and bystander effects of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene.** *Cancer Res*, **61**, 3330-3338.
- Kakkar, A.K., Levine, M.N., Kadziola, Z., Lemoine, N.R., Low, V., Patel, H.K., Rustin, G., Thomas, M., Quigley, M., Williamson, R.C. (2004) **Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS).** *J Clin Oncol*, **22**, 1944-1948.
- Kallifatidis, G., Beckermann, B.M., Groth, A., Schubert, M., Apel, A., Khamidjanov, A., Ryschich, E., Wenger, T., Wagner, W., Diehlmann, A., Saffrich, R., Krause, U., Eckstein, V., Mattern, J., Chai, M., Schutz, G., Ho, A.D., Gebhard, M.M., Buchler, M.W., Friess, H., Buchler, P. & Herr, I. (2008) **Improved lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells for therapeutic intervention in pancreatic cancer.** *Cancer Gene Ther*, **15**, 231-240.
- Kan, S.H., Elanko, N., Johnson, D., Cornejo-Roldan, L., Cook, J., Reich, E.W., Tomkins, S., Verloes, A., Twigg, S.R., Rannan-Eliya, S., McDonald-McGinn, D.M., Zackai, E.H., Wall, S.A., Muenke, M. & Wilkie, A.O. (2002) **Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis.** *Am J Hum Genet*, **70**, 472-486.
- Kang, S., Elf, S., Dong, S., Hitosugi, T., Lythgoe, K., Guo, A., Ruan, H., Lonial, S., Khoury, H.J., Williams, I.R., Lee, B.H., Roesel, J.L., Karsenty, G., Hanauer, A., Taunton, J., Boggon, T.J., Gu, T.L. & Chen, J. (2009) **Fibroblast growth factor receptor 3 associates with and tyrosine phosphorylates p90 RSK2, leading to RSK2 activation that mediates hematopoietic transformation.** *Mol Cell Biol*, **29**, 2105-2117.
- Kanyama, H., Tomita, N., Yamano, T., Aihara, T., Miyoshi, Y., Ohue, M., Sekimoto, M., Sakita, I., Tamaki, Y., Kaneda, Y., Senter, P.D. & Monden, M. (2001) **Usefulness of repeated direct intratumoral gene transfer using hemagglutinating virus of Japan-liposome method for cytosine deaminase suicide gene therapy.** *Cancer Res*, **61**, 14-18.

- Kasuya, H., Nishiyama, Y., Nomoto, S., Hosono, J., Takeda, S. & Nakao, A. (1999) **Intraperitoneal delivery of hrR3 and ganciclovir prolongs survival in mice with disseminated pancreatic cancer.** *J Surg Oncol*, **72**, 136-141.
- Kidd, S., Caldwell, L., Dietrich, M., Samudio, I., Spaeth, E.L., Watson, K., Shi, Y., Abbruzzese, J., Konopleva, M., Andreeff, M. & Marini, F.C. (2010) **Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment.** *Cytotherapy*, **12**, 615-625.
- Kim, M., Zinn, K.R., Barnett, B.G., Sumerel, L.A., Krasnykh, V., Curiel, D.T. & Douglas, J.T. (2002) **The therapeutic efficacy of adenoviral vectors for cancer gene therapy is limited by a low level of primary adenovirus receptors on tumour cells.** *Eur J Cancer*, **38**, 1917-1926.
- Kim, Y.C., Kim, H.J., Park, J.H., Park, D.I., Cho, Y.K., Sohn, C.I., Jeon, W.K., Kim, B.I., Shin, J.H. (2009) **Can preoperative CA19-9 and CEA levels predict the resectability of patients with pancreatic adenocarcinoma?** *J Gastroenterol Hepatol*, **24** 1869-1875.
- Klagsbrun, M. & Baird, A. (1991) **A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity.** *Cell*, **67**, 229-231.
- Koido, S., Homma, S., Takahara, A., Namiki, Y., Tsukinaga, S., Mitobe, J., Odahara, S., Yukawa, T., Matsudaira, H., Nagatsuma, K., Uchiyama, K., Satoh, K., Ito, M., Komita, H., Arakawa, H., Ohkusa, T., Gong, J., Tajiri, H. (2011) **Current immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer.** *Clin Dev Immunol*, **2011**, 267539.
- Kojima, K., Vickers, S.M., Adsay, N.V., Jhala, N.C., Kim, H.G., Schoeb, T.R., Grizzle, W.E., Klug, C.A. (2007) **Inactivation of Smad4 accelerates Kras(G12D)-mediated pancreatic neoplasia.** *Cancer Res*, **67**, 8121-8130.
- Koorstra, J.B., Hustinx, S.R., Offerhaus, G.J. & Maitra, A. (2008) **Pancreatic carcinogenesis.** *Pancreatology*, **8**, 110-125.
- Koprowski, H., Herlyn, M., Steplewski, Z., Sears, H.F. (1981) **Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma.** *Science*, **212**, 53-55.
- Kornmann, M., Beger, H.G., Korc, M. (1998) **Role of fibroblast growth factors and their receptors in pancreatic cancer and chronic pancreatitis.** *Pancreas*, **17**, 169-175.

- Kornmann, M., Ishiwata, T., Matsuda, K., Lopez, M.E., Fukahi, K., Asano, G., Beger, H.G. & Korc, M. (2002) **IIIc isoform of fibroblast growth factor receptor 1 is overexpressed in human pancreatic cancer and enhances tumorigenicity of hamster ductal cells.** *Gastroenterology*, **123**, 301-313.
- Krejci, P., Prochazkova, J., Smutny, J., Chlebova, K., Lin, P., Aklian, A., Bryja, V., Kozubik, A., Wilcox, W.R. (2010) **FGFR3 signaling induces a reversible senescence phenotype in chondrocytes similar to oncogene-induced premature senescence.** *Bone*, **47**, 102-110.
- Krejci, P., Salazar, L., Kashiwada, T.A., Chlebova, K., Salasova, A., Thompson, L.M., Bryja, V., Kozubik, A. & Wilcox, W.R. (2008) **Analysis of STAT1 activation by six FGFR3 mutants associated with skeletal dysplasia undermines dominant role of STAT1 in FGFR3 signaling in cartilage.** *PLoS One*, **3**, e3961.
- Kuriyama, S., Tsujinoue, H. & Yoshiji, H. (2004) **Immune response to suicide gene therapy.** *Methods Mol Med*, **90**, 353-369.
- Kurozumi, K., Tamiya, T., Ono, Y., Otsuka, S., Kambara, H., Adachi, Y., Ichikawa, T., Hamada, H. & Ohmoto, T. (2004) **Apoptosis induction with 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapy for human malignant glioma cells mediated by adenovirus.** *J Neurooncol*, **66**, 117-127.
- L'Hôte, C.G. & Knowles, M.A. (2005) **Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis.** *Exp Cell Res*, **304**, 417-431.
- Lacobuzio-Donahue, C.A. (2011) **Genetic evolution of pancreatic cancer: lessons learnt from the pancreatic cancer genome sequencing project.** *Gut*, **61**, 1085-1094.
- Lal, G., Liu, G., Schmocker, B., Kaurah, P., Ozcelik, H., Narod, S.A., Redston, M. & Gallinger, S. (2000) **Inherited predisposition to pancreatic adenocarcinoma: role of family history and germ-line p16, BRCA1, and BRCA2 mutations.** *Cancer Res*, **60**, 409-416.
- Larbouret, C., Robert, B., Navarro-Teulon, I., Thezenas, S., Ladjemi, M.Z., Morisseau, S., Campigna, E., Bibeau, F., Mach, J.P., Pelegrin, A. & Azria, D. (2007) **In vivo therapeutic synergism of anti-epidermal growth factor receptor and anti-HER2 monoclonal antibodies against pancreatic carcinomas.** *Clin Cancer Res*, **13**, 3356-3362.

- Laurila, E.M., Sandstrom, S., Rantanen, L.M., Autio, R. & Kallioniemi, A. (2012) **Both inhibition and enhanced expression of miR-31 lead to reduced migration and invasion of pancreatic cancer cells.** *Genes Chromosomes Cancer*, **51**, 557-568.
- Lauring, J., Abukhdeir, A.M., Konishi, H., Garay, J.P., Gustin, J.P., Wang, Q., Arceci, R.J., Matsui, W. & Park, B.H. (2008) **The multiple myeloma associated MMSET gene contributes to cellular adhesion, clonogenic growth, and tumorigenicity.** *Blood*, **111**, 856-864.
- Lee, A.Y., Rickles, F.R., Julian, J.A., Gent, M., Baker, R.I., Bowden, C., Kakkar, A.K., Prins, M., Levine, M.N. (2005) **Randomized comparison of low molecular weight heparin and coumarin derivatives on the survival of patients with cancer and venous thromboembolism.** *J Clin Oncol*, **23**, 2123-2129.
- Li, A., Omura, N., Hong, S.M. & Goggins, M. (2011) **Pancreatic cancer DNMT1 expression and sensitivity to DNMT1 inhibitors.** *Cancer Biol Ther*, **9**.
- Li, J., Kleeff, J., Giese, N., Buchler, M.W., Korc, M. & Friess, H. (2004) **Gefitinib ('Iressa', ZD1839), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, inhibits pancreatic cancer cell growth, invasion, and colony formation.** *Int J Oncol*, **25**, 203-210.
- Li, Z., Ding, Q., Li, Y., Miller, S.A., Abbruzzese, J.L. & Hung, M.C. (2006) **Suppression of pancreatic tumor progression by systemic delivery of a pancreatic-cancer-specific promoter driven Bik mutant.** *Cancer Lett*, **236**, 58-63.
- Li, Z., Zhu, Y. X., Plowright, E. E., Bergsagel, P. L., Chesi, M., Patterson, B., Hawley, T. S., Hawley, R. G., Stewart, A. K. (2001) **The myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 is transforming in hematopoietic cells.** *Blood*, **97**, 2413-2419.
- Liu, Z., Ishiwata, T., Zhou, S., Maier, S., Henne-Bruns, D., Korc, M., Bachem, M. & Kornmann, M. (2007) **Human fibroblast growth factor receptor 1-IIIb is a functional fibroblast growth factor receptor expressed in the pancreas and involved in proliferation and movement of pancreatic ductal cells.** *Pancreas*, **35**, 147-157.
- Lohr, M., Faulmann, G., Hummel, F., Singer, M.V. (2001) **Gene therapy of pancreatic cancer with microencapsulated CYP2B1-expressing cells.** *Onkologie* **24**, 60-64.

- Lopes, R.B., Gangeswaran, R., McNeish, I.A., Wang, Y. & Lemoine, N.R. (2007) **Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy.** *Int J Cancer*, **120**, 2344-2352.
- Louvet, C., Andre, T., Lledo, G., Hammel, P., Bleiberg, H., Bouleuc, C., Gamelin, E., Flesch, M., Cvitkovic, E. & de Gramont, A. (2002) **Gemcitabine combined with oxaliplatin in advanced pancreatic adenocarcinoma: final results of a GERCOR multicenter phase II study.** *J Clin Oncol*, **20**, 1512-1518.
- Louvet, C., Labianca, R., Hammel, P., Lledo, G., Zampino, M.G., Andre, T., Zaniboni, A., Ducreux, M., Aitini, E., Taieb, J., Faroux, R., Lepere, C. & de Gramont, A. (2005) **Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial.** *J Clin Oncol*, **23**, 3509-3516.
- Lu, Y., Bai, J.G. & Wang, H.H. (2006) **Gene therapeutic treatment of pancreatic cancer based on injection of pcDNA3.1/CCK plasmid with xenogeneic homologous cholecystokinin.** *Exp Oncol*, **28**, 136-140.
- Lu, Z.X., Liu, L.T. & Qi, X.R. (2011) **Development of small interfering RNA delivery system using PEI-PEG-APRPG polymer for antiangiogenic vascular endothelial growth factor tumor-targeted therapy.** *Int J Nanomedicine*, **6**, 1661-1673.
- Lüttges, J., Diederichs, A., Menke, M.A., Vogel, I., Kremer, B. & Kloppel, G. (2000) **Ductal lesions in patients with chronic pancreatitis show K-ras mutations in a frequency similar to that in the normal pancreas and lack nuclear immunoreactivity for p53.** *Cancer*, **88**, 2495-2504.
- Lüttges, J., Schlehe, B., Menke, M.A., Vogel, I., Henne-Bruns, D. & Kloppel, G. (1999) **The K-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in associated normal, hyperplastic, and metaplastic ductal epithelium.** *Cancer*, **85**, 1703-1710.
- Macdonald, J.S., McCoy, S., Whitehead, R.P., Iqbal, S., Wade, J.L., 3rd, Giguere, J.K. & Abbruzzese, J.L. (2005) **A phase II study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in pancreatic cancer: a Southwest oncology group (SWOG 9924) study.** *Invest New Drugs*, **23**, 485-487.

- Maitra, A., Adsay, N.V., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J.L., Yeo, C.J. & Hruban, R.H. (2003) **Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray.** *Mod Pathol*, **16**, 902-912.
- Maitra, A. & Hruban, R.H. (2008) **Pancreatic cancer.** *Annu Rev Pathol*, **3**, 157-188.
- Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S. & Allavena, P. (2001) **Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines.** *Trends Immunol*, **22**, 328-336.
- Maser, R.S. & DePinho, R.A. (2002) **Keeping telomerase in its place.** *Nat Med*, **8**, 934-936.
- Massague, J., Blain, S.W. & Lo, R.S. (2000) **TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders.** *Cell*, **103**, 295-309.
- Matano, E., Tagliaferri, P., Libroia, A., Damiano, V., Fabbrocini, A., De Lorenzo, S. & Bianco, A.R. (2000) **Gemcitabine combined with continuous infusion 5-fluorouracil in advanced and symptomatic pancreatic cancer: a clinical benefit-oriented phase II study.** *Br J Cancer*, **82**, 1772-1775.
- Meeker, A.K. & De Marzo, A.M. (2004) **Recent advances in telomere biology: implications for human cancer.** *Curr Opin Oncol*, **16**, 32-38.
- Meijer, D., Sieuwerts, A.M., Look, M.P., van Agthoven, T., Foekens, J.A. & Dorssers, L.C. (2008) **Fibroblast growth factor receptor 4 predicts failure on tamoxifen therapy in patients with recurrent breast cancer.** *Endocr Relat Cancer*, **15**, 101-111.
- Mesnil, M. & Yamasaki, H. (2000) **Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication.** *Cancer Res*, **60**, 3989-3999.
- Miwa, M., Ura, M., Nishida, M., Sawada, N., Ishikawa, T., Mori, K., Shimma, N., Umeda, I. & Ishitsuka, H. (1998) **Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue.** *Eur J Cancer*, **34**, 1274-1281.

- Miyata, K., Oba, M., Kano, M.R., Fukushima, S., Vachutinsky, Y., Han, M., Koyama, H., Miyazono, K., Nishiyama, N. & Kataoka, K. (2008) **Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor tissue.** *Pharm Res*, **25**, 2924-2936.
- Mohammadi, M., Honegger, A.M., Rotin, D., Fischer, R., Bellot, F., Li, W., Dionne, C.A., Jaye, M., Rubinstein, M. & Schlessinger, J. (1991) **A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1.** *Mol Cell Biol*, **11**, 5068-5078.
- Mohammadi, M., Olsen, S.K. & Ibrahimi, O.A. (2005) **Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation.** *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**, 107-137.
- Mohammadi, M., Schlessinger, J. & Hubbard, S.R. (1996) **Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism.** *Cell*, **86**, 577-587.
- Mohr, A., Albarenque, S.M., Deedigan, L., Yu, R., Reidy, M., Fulda, S. & Zwacka, R.M. (2010) **Targeting of XIAP combined with systemic mesenchymal stem cell-mediated delivery of sTRAIL ligand inhibits metastatic growth of pancreatic carcinoma cells.** *Stem Cells*, **28**, 2109-2120.
- Morisset, J. (2008) **Negative control of human pancreatic secretion: physiological mechanisms and factors.** *Pancreas*, **37**, 1-12.
- Morizane, C., Okusaka, T., Furuse, J., Ishii, H., Ueno, H., Ikeda, M., Nakachi, K., Najima, M., Ogura, T. & Suzuki, E. (2009) **A phase II study of S-1 in gemcitabine-refractory metastatic pancreatic cancer.** *Cancer Chemother Pharmacol*, **63**, 313-319.
- Morizono, K., Bristol, G., Xie, Y.M., Kung, S.K., Chen, I.S. (2001) **Antibody-directed targeting of retroviral vectors via cell surface antigens.** *J Virol*, **75**, 8016-8020.
- Morizono, K., Xie, Y., Helguera, G., Daniels, T.R., Lane, T.F., Penichet, M.L. *et al.* (2009) **A versatile targeting system with lentiviral vectors bearing the biotin-adaptor peptide.** *J Gene Med*, **11**, 655-63.

- Morizono, K., Xie, Y., Ringpis, G.E., Johnson, M., Nassanian, H., Lee, B., Wu, L., Chen, I.S. (2005) **Lentiviral vector retargeting to P-glycoprotein on metastatic melanoma through intravenous injection.** *Nat Med*, **11**, 346-352.
- Motoda, N., Matsuda, Y., Onda, M., Ishiwata, T., Uchida, E. & Naito, Z. (2011) **Overexpression of fibroblast growth factor receptor 4 in high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Int J Oncol*, **38**, 133-143.
- Motoi, F., Sunamura, M., Ding, L., Duda, D.G., Yoshida, Y., Zhang, W., Matsuno, S. & Hamada, H. (2000) **Effective gene therapy for pancreatic cancer by cytokines mediated by restricted replication-competent adenovirus.** *Hum Gene Ther*, **11**, 223-235.
- Muenke, M., Schell, U., Hehr, A., Robin, N.H., Losken, H.W., Schinzel, A., Pulley, L.J., Rutland, P., Reardon, W., Malcolm, S. & et al. (1994) **A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome.** *Nat Genet*, **8**, 269-274.
- Murphy, K.M., Brune, K.A., Griffin, C., Sollenberger, J.E., Petersen, G.M., Bansal, R., Hruban, R.H. & Kern, S.E. (2002) **Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%.** *Cancer Res*, **62**, 3789-3793.
- Mhaweche-Fauceglia, P., Cheney, R.T., Fischer, G., Beck, A., Herrmann, F.R. (2006) **FGFR3 and p53 protein expressions in patients with pTa and pT1 urothelial bladder cancer.** *Eur J Surg Oncol*, **32**, 231-237.
- Neilson, K.M. & Friesel, R.E. (1995) **Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor-2 by a point mutation associated with Crouzon syndrome.** *J Biol Chem*, **270**, 26037-26040.
- Niidome, T. & Huang, L. (2002) **Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors.** *Gene Ther*, **9**, 1647-1652.
- Noble, S. & Faulds, D. (1998) **Ganciclovir. An update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients.** *Drugs*, **56**, 115-146.
- Nomura, S., Yoshitomi, H., Takano, S., Shida, T., Kobayashi, S., Ohtsuka, M., Kimura, F., Shimizu, H., Yoshidome, H., Kato, A. & Miyazaki, M. (2008) **FGF10/FGFR2 signal induces cell migration and invasion in pancreatic cancer.** *Br J Cancer*, **99**, 305-313.

- Nord, H., Segersten, U., Sandgren, J., Wester, K., Busch, C., Menzel, U., Komorowski, J., Dumanski, J.P., Malmstrom, P.U., Diaz de Stahl, T. (2010) **Focal amplifications are associated with high grade and recurrences in stage Ta bladder carcinoma.** *Int J Cancer*, **126**, 1390-1402.
- Noro, T., Miyake, K., Suzuki-Miyake, N., Igarashi, T., Uchida, E., Misawa, T., Yamazaki, Y. & Shimada, T. (2004) **Adeno-associated viral vector-mediated expression of endostatin inhibits tumor growth and metastasis in an orthotropic pancreatic cancer model in hamsters.** *Cancer Res*, **64**, 7486-7490.
- Ocker, M., Neureiter, D., Lueders, M., Zopf, S., Ganslmayer, M., Hahn, E.G., Herold, C. & Schuppan, D. (2005) **Variants of bcl-2 specific siRNA for silencing antiapoptotic bcl-2 in pancreatic cancer.** *Gut*, **54**, 1298-1308.
- Oettle, H., Post, S., Neuhaus, P., Gellert, K., Langrehr, J., Ridwelski, K., Schramm, H., Fahlke, J., Zuelke, C., Burkart, C., Gutterlet, K., Kettner, E., Schmalenberg, H., Weigang-Koehler, K., Bechstein, W.O., Niedergethmann, M., Schmidt-Wolf, I., Roll, L., Doerken, B. & Riess, H. (2007) **Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial.** *Jama*, **297**, 267-277.
- Ohta, T., Shimizu, K., Yi, S., Takamura, H., Amaya, K., Kitagawa, H., Kayahara, M., Ninomiya, I., Fushida, S., Fujirama, T., Nishimura, G., Miwa, K. (2003) **Protease-activated receptor-2 expression and the role of trypsin in cell proliferation in human pancreatic cancers.** *Int J Oncol*, **23**, 61-66.
- Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., Frese, K.K., Denicola, G., Feig, C., Combs, C., Winter, S.P., Ireland-Zecchini, H., Reichelt, S., Howat, W.J., Chang, A., Dhara, M., Wang, L., Ruckert, F., Grutzmann, R., Pilarsky, C., Izeradjene, K., Hingorani, S.R., Huang, P., Davies, S.E., Plunkett, W., Egorin, M., Hruban, R.H., Whitebread, N., McGovern, K., Adams, J., Lacobuzio-Donahue, C., Griffiths, J., Tuveson, D.A. (2009) **Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer.** *Science*, **324**, 1457-1461.
- Olsen, S.K., Ibrahimi, O.A., Raucci, A., Zhang, F., Eliseenkova, A.V., Yayon, A., Basilico, C., Linhardt, R.J., Schlessinger, J. & Mohammadi, M. (2004) **Insights into the molecular basis**

**for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 935-940.

Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G. & Goldfarb, M. (1996) **Receptor specificity of the fibroblast growth factor family.** *J Biol Chem*, **271**, 15292-15297.

Otsuki, T., Yamada, O., Yata, K., Sakaguchi, H., Kurebayashi, J., Nakazawa, N., Taniwaki, M., Yawata, Y., Ueki, A. (1999) **Expression of fibroblast growth factor and FGF-receptor family genes in human myeloma cells, including lines possessing t(4;14)(q16.3;q32. 3) and FGFR3 translocation.** *Int J Oncol*, **15**, 1205-1212.

Pariente, N., Morizono, K., Virk, M.S., Petrigliano, F.A., Reiter, R.E., Lieberman, J.R., Chen, I.S. (2007) **A novel dual-targeted lentiviral vector leads to specific transduction of prostate cancer bone metastases in vivo after systemic administration.** *Mol Ther*, **15**, 1973-1981.

Parker, W.B., King, S.A., Allan, P.W., Bennett, L.L., Jr., Secrist, J.A., 3rd, Montgomery, J.A., Gilbert, K.S., Waud, W.R., Wells, A.H., Gillespie, G.Y. & Sorscher, E.J. (1997) **In vivo gene therapy of cancer with E. coli purine nucleoside phosphorylase.** *Hum Gene Ther*, **8**, 1637-1644.

Passos-Bueno, M.R., Wilcox, W.R., Jabs, E.W., Sertie, A.L., Alonso, L.G. & Kitoh, H. (1999) **Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations.** *Hum Mutat*, **14**, 115-125.

Pellegrini, L., Burke, D.F., von Delft, F., Mulloy, B. & Blundell, T.L. (2000) **Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin.** *Nature*, **407**, 1029-1034.

Peng, B., Fleming, J.B., Breslin, T., Grau, A.M., Fojioka, S., Abbruzzese, J.L., Evans, D.B., Ayers, D., Wathen, K., Wu, T., Robertson, K.D. & Chiao, P.J. (2002) **Suppression of tumorigenesis and induction of p15(ink4b) by Smad4/DPC4 in human pancreatic cancer cells.** *Clin Cancer Res*, **8**, 3628-3638.

Péron, J.M., Bureau, C., Gourdy, P., Lulka, H., Souque, A., Calippe, B., Selves, J., Al Saati, T., Bernad, J., Cordelier, P., Couderc, B., Pradayrol, L., Pipy, B., Buscail, L. & Vinel, J.P. (2007) **Treatment of experimental murine pancreatic peritoneal carcinomatosis with fibroblasts**

- genetically modified to express IL12: a role for peritoneal innate immunity.** *Gut*, **56**, 107-114.
- Philip, P.A. (2008) **Targeted therapies for pancreatic cancer.** *Gastrointest Cancer Res*, **2**, S16-19.
- Philip, P. A., Benedetti, J., Corless, C. L., Wong, R., O'Reilly, E. M., Flynn, P. J., Rowland, K. M., Atkins, J. N., Mirtsching, B. C., Rivkin, S. E., Khorana, A. A., Goldman, B., Fenoglio-Preiser, C. M., Abbruzzese, J. L., Blanke, C. D. (2010) **Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205.** *J Clin Oncol*, **28**, 3605-3610.
- Pingpank, J.F., Hoffman, J.P., Ross, E.A., Cooper, H.S., Meropol, N.J., Freedman, G., Pinover, W.H., LeVoyer, T.E., Sasson, A.R. & Eisenberg, B.L. (2001) **Effect of preoperative chemoradiotherapy on surgical margin status of resected adenocarcinoma of the head of the pancreas.** *J Gastrointest Surg*, **5**, 121-130.
- Pinsky, M.S., Song, W., Dong, Z., Warner, K., Zeitlin, B., Karl, E., Hall, D.E., Nor, J.E. (2006) **Activation of iCaspase-9 in neovessels inhibits oral tumor progression.** *J Dent Res*, **85**, 436-441.
- Pirollo, K.F., Rait, A., Zhou, Q., Hwang, S.H., Dagata, J.A., Zon, G., Hogrefe, R.I., Palchik, G. & Chang, E.H. (2007) **Materializing the potential of small interfering RNA via a tumor-targeting nanodelivery system.** *Cancer Res*, **67**, 2938-2943.
- Pittella, F., Miyata, K., Maeda, Y., Suma, T., Watanabe, S., Chen, Q., Christie, R.J., Osada, K., Nishiyama, N. & Kataoka, K. (2012) **Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles.** *J Control Release*, **161**, 868-874.
- Plath, T., Peters, M., Detjen, K., Welzel, M., Von Marschall, Z., Radke, C., Wiedenmann, B., Rosewicz, S. (2002) **Overexpression of pRB in human pancreatic carcinoma cells: function in chemotherapy-induced apoptosis.** *J Natl Cancer Inst*, **94**, 129-142.
- Pollock, P.M., Gartside, M.G., Dejeza, L.C., Powell, M.A., Mallon, M.A., Davies, H., Mohammadi, M., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Trent, J.M. & Goodfellow, P.J. (2007) **Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes.** *Oncogene*, **26**, 7158-7162.

- Portsmouth, D., Hlavaty, J. & Renner, M. (2007) **Suicide genes for cancer therapy.** *Mol Aspects Med*, **28**, 4-41.
- Preuss, E., Treschow, A., Newrzela, S., Brucher, D., Weber, K., Felldin, U., Alici, E., Gahrton, G., Von Laer, D., Dilber, M.S., Fehse, B. (2010) **TK.007: A novel, codon-optimized HSVtk(A168H) mutant for suicide gene therapy.** *Hum Gene Ther*, **21**, 929-941.
- Puligilla, C., Feng, F., Ishikawa, K., Bertuzzi, S., Dabdoub, A., Griffith, A.J., Fritsch, B. & Kelley, M.W. (2007) **Disruption of fibroblast growth factor receptor 3 signaling results in defects in cellular differentiation, neuronal patterning, and hearing impairment.** *Dev Dyn*, **236**, 1905-1917.
- Pützer, B.M., Rodicker, F., Hitt, M.M., Stiewe, T. & Esche, H. (2002) **Improved treatment of pancreatic cancer by IL-12 and B7.1 costimulation: antitumor efficacy and immunoregulation in a nonimmunogenic tumor model.** *Mol Ther*, **5**, 405-412.
- Rachagani, S., Macha, M.A., Ponnusamy, M.P., Haridas, D., Kaur, S., Jain, M., Batra, S.K. (2012) **MUC4 potentiates invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through stabilization of fibroblast growth factor receptor.** *Carcinogenesis*, sous presse.
- Rand, V., Huang, J., Stockwell, T., Ferriera, S., Buzko, O., Levy, S., Busam, D., Li, K., Edwards, J.B., Eberhart, C., Murphy, K.M., Tsiamouri, A., Beeson, K., Simpson, A.J., Venter, J.C., Riggins, G.J. & Strausberg, R.L. (2005) **Sequence survey of receptor tyrosine kinases reveals mutations in glioblastomas.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 14344-14349.
- Ravet, E., Lulka, H., Gross, F., Casteilla, L., Buscail, L. & Cordelier, P. (2010) **Using lentiviral vectors for efficient pancreatic cancer gene therapy.** *Cancer Gene Ther*, **17**, 315-324.
- Raybaud, C. & Di Rocco, C. (2007) **Brain malformation in syndromic craniosynostoses, a primary disorder of white matter: a review.** *Childs Nerv Syst*, **23**, 1379-1388.
- Raycroft, L., Wu, H.Y. & Lozano, G. (1990) **Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene.** *Science*, **249**, 1049-1051.

- Rejiba, S., Wack, S., Aprahamian, M. & Hajri, A. (2007) **K-ras oncogene silencing strategy reduces tumor growth and enhances gemcitabine chemotherapy efficacy for pancreatic cancer treatment.** *Cancer Sci*, **98**, 1128-1136.
- Rejiba, S., Bigand, C. Parmentier, C. Hajri, A. (2009) **Gemcitabine-based chemogene therapy for pancreatic cancer using Ad-dCK::UMK GDEPT and TS/RR siRNA strategies.** *Neoplasia*, **11**, 637-650.
- Ricol, D., Cappellen, D., El Marjou, A., Gil-Diez-de-Medina, S., Girault, J.M., Yoshida, T., Ferry, G., Tucker, G., Poupon, M.F., Chopin, D., Thiery, J.P. & Radvanyi, F. (1999) **Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer.** *Oncogene*, **18**, 7234-7243.
- Rieckmann, T., Kotevic, I. & Trueb, B. (2008) **The cell surface receptor FGFR1 forms constitutive dimers that promote cell adhesion.** *Exp Cell Res*, **314**, 1071-1081.
- Rieckmann, T., Zhuang, L., Fluck, C.E. & Trueb, B. (2009) **Characterization of the first FGFR1 mutation identified in a craniosynostosis patient.** *Biochim Biophys Acta*, **1792**, 112-121.
- Rohmann, E., Brunner, H.G., Kayserili, H., Uyguner, O., Nurnberg, G., Lew, E.D., Dobbie, A., Eswarakumar, V.P., Uzumcu, A., Ulubil-Emeroglu, M., Leroy, J.G., Li, Y., Becker, C., Lehnerdt, K., Cremers, C.W., Yuksel-Apak, M., Nurnberg, P., Kubisch, C., Schlessinger, J., van Bokhoven, H. & Wollnik, B. (2006) **Mutations in different components of FGF signaling in LADD syndrome.** *Nat Genet*, **38**, 414-417.
- Ryu, J.K., Hong, S.M., Karikari, C.A., Hruban, R.H., Goggins, M.G. & Maitra, A. (2010) **Aberrant MicroRNA-155 expression is an early event in the multistep progression of pancreatic adenocarcinoma.** *Pancreatology*, **10**, 66-73.
- Saeki, H., Yanoma, S., Takemiya, S., Sugimasa, Y., Akaike, M., Yukawa, N., Rino, Y. & Imada, T. (2007) **Antitumor activity of a combination of trastuzumab (Herceptin) and oral fluoropyrimidine S-1 on human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing pancreatic cancer.** *Oncol Rep*, **18**, 433-439.
- Sahni, M., Ambrosetti, D.C., Mansukhani, A., Gertner, R., Levy, D. & Basilico, C. (1999) **FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway.** *Genes Dev*, **13**, 1361-1366.

- Sarkar, D., Su, Z.Z., Vozhilla, N., Park, E.S., Randolph, A., Valerie, K. & Fisher, P.B. (2005) **Targeted virus replication plus immunotherapy eradicates primary and distant pancreatic tumors in nude mice.** *Cancer Res*, **65**, 9056-9063.
- Sato, F., Nagata, C., Liu, Y., Suzuki, T., Kondo, J., Morohashi, S., Imaizumi, T., Kato, Y. & Kijima, H. (2009) **PERIOD1 is an anti-apoptotic factor in human pancreatic and hepatic cancer cells.** *J Biochem*, **146**, 833-838.
- Sato, N., Maitra, A., Fukushima, N., van Heek, N.T., Matsubayashi, H., Iacobuzio-Donahue, C.A., Rosty, C. & Goggins, M. (2003) **Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Cancer Res*, **63**, 4158-4166.
- Sayed, D. & Abdellatif, M. (2011) **MicroRNAs in development and disease.** *Physiol Rev*, **91**, 827-887.
- Schild, C. & Trueb, B. (2005) **Aberrant expression of FGFR1, a novel FGF receptor, in ovarian tumors.** *Int J Mol Med*, **16**, 1169-1173.
- Schlessinger, J. & Ullrich, A. (1992) **Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases.** *Neuron*, **9**, 383-391.
- Schutte, M., Hruban, R.H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S.K., Moskaluk, C.A., Hahn, S.A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., Baylin, S.B., Kern, S.E. & Herman, J.G. (1997) **Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas.** *Cancer Res*, **57**, 3126-3130.
- Schwarte-Waldhoff, I., Volpert, O.V., Bouck, N.P., Sipos, B., Hahn, S.A., Klein-Scory, S., Luttes, J., Kloppel, G., Graeven, U., Eilert-Micus, C., Hintelmann, A. & Schmiegel, W. (2000) **Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9624-9629.
- Senderowicz, A.M., Johnson, J.R., Sridhara, R., Zimmerman, P., Justice, R. & Pazdur, R. (2007) **Erlotinib/gemcitabine for first-line treatment of locally advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas.** *Oncology (Williston Park)*, **21**, 1696-1706; discussion 1706-1699, 1712, 1715.

- Shanmugam, C., Jhala, N.C., Katkooori, V.R., Wan, W., Meleth, S., Grizzle, W.E., Manne, U. (2010) **Prognostic value of mucin 4 expression in colorectal adenocarcinomas.** *Cancer*, **116**, 3577-3586.
- Shariat, S.F., Desai, S., Song, W., Khan, T., Zhao, J., Nguyen, C., Foster, B.A., Greenberg, N., Spencer, D.M., Slawin, K.M. (2001) **Adenovirus-mediated transfer of inducible caspases: a novel "death switch" gene therapeutic approach to prostate cancer.** *Cancer Res*, **61**, 2562-2571.
- Shay, J.W. & Bacchetti, S. (1997) **A survey of telomerase activity in human cancer.** *Eur J Cancer*, **33**, 787-791.
- Shi, Q., Nguyen, A.T., Angell, Y., Deng, D., Na, C.R., Burgess, K., Roberts, D.D., Brunnicardi, F.C. & Templeton, N.S. (2010) **A combinatorial approach for targeted delivery using small molecules and reversible masking to bypass nonspecific uptake in vivo.** *Gene Ther*, **17**, 1085-1097.
- Shimokawa, K., Kimura-Yoshida, C., Nagai, N., Mukai, K., Matsubara, K., Watanabe, H., Matsuda, Y., Mochida, K. & Matsuo, I. (2011) **Cell surface heparan sulfate chains regulate local reception of FGF signaling in the mouse embryo.** *Dev Cell*, **21**, 257-272.
- Shin, J.W., Min, M., Larrieu-Lahargue, F., Canron, X., Kunstfeld, R., Nguyen, L., Henderson, J.E., Bikfalvi, A., Detmar, M. & Hong, Y.K. (2006) **Prox1 promotes lineage-specific expression of fibroblast growth factor (FGF) receptor-3 in lymphatic endothelium: a role for FGF signaling in lymphangiogenesis.** *Mol Biol Cell*, **17**, 576-584.
- Shirasaka, T., Shimamoto, Y., Ohshimo, H., Yamaguchi, M., Kato, T., Yonekura, K. & Fukushima, M. (1996) **Development of a novel form of an oral 5-fluorouracil derivative (S-1) directed to the potentiation of the tumor selective cytotoxicity of 5-fluorouracil by two biochemical modulators.** *Anticancer Drugs*, **7**, 548-557.
- Shrikhande, S.V. and D'Souza M.A. (2008) **Pancreatic fistula after pancreatectomy: evolving definitions, preventive strategies and modern management.** *World J Gastroenterol*, **14**, 5789-5796.
- Sibley, K., Cuthbert-Heavens, D. & Knowles, M.A. (2001) **Loss of heterozygosity at 4p16.3 and mutation of FGFR3 in transitional cell carcinoma.** *Oncogene*, **20**, 686-691.

- Sleeman, M., Fraser, J., McDonald, M., Yuan, S., White, D., Grandison, P., Kumble, K., Watson, J.D. & Murison, J.G. (2001) **Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5.** *Gene*, **271**, 171-182.
- Sonvilla, G., Allerstorfer, S., Heinzle, C., Stattner, S., Karner, J., Klimpfinger, M., Wrba, F., Fischer, H., Gauglhofer, C., Spiegl-Kreinecker, S., Grasl-Kraupp, B., Holzmann, K., Grusch, M., Berger, W. & Marian, B. (2010) **Fibroblast growth factor receptor 3-IIIc mediates colorectal cancer growth and migration.** *Br J Cancer*, **102**, 1145-1156.
- Spinola, M., Leoni, V., Pignatiello, C., Conti, B., Ravagnani, F., Pastorino, U. & Dragani, T.A. (2005a) **Functional FGFR4 Gly388Arg polymorphism predicts prognosis in lung adenocarcinoma patients.** *J Clin Oncol*, **23**, 7307-7311.
- Spinola, M., Leoni, V.P., Tanuma, J., Pettinicchio, A., Frattini, M., Signoroni, S., Agresti, R., Giovanazzi, R., Pilotti, S., Bertario, L., Ravagnani, F. & Dragani, T.A. (2005b) **FGFR4 Gly388Arg polymorphism and prognosis of breast and colorectal cancer.** *Oncol Rep*, **14**, 415-419.
- Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M.A., Dikic, I., Ladbury, J.E., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J. & Lax, I. (1994) **Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation.** *Cell*, **79**, 1015-1024.
- Springer, C.J., Bavetsias, V., Jackman, A.L., Boyle, F.T., Marshall, D., Pedley, R.B. & Bisset, G.M. (1996) **Prodrugs of thymidylate synthase inhibitors: potential for antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT).** *Anticancer Drug Des*, **11**, 625-636.
- Srivastava, S.K., Bhardwaj, A., Singh, S., Arora, S., Wang, B., Grizzle, W.E. & Singh, A.P. (2011) **MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells.** *Carcinogenesis*, **32**, 1832-1839.
- Steinberg, F., Gerber, S.D., Rieckmann, T. & Trueb, B. (2010a) **Rapid fusion and syncytium formation of heterologous cells upon expression of the FGFR1 receptor.** *J Biol Chem*, **285**, 37704-37715.

- Steinberg, F., Zhuang, L., Beyeler, M., Kalin, R.E., Mullis, P.E., Brandli, A.W. & Trueb, B. (2010b) **The FGFR1 receptor is shed from cell membranes, binds fibroblast growth factors (FGFs), and antagonizes FGF signaling in Xenopus embryos.** *J Biol Chem*, **285**, 2193-2202.
- Steinberg, W. (1990) **The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen.** *Am J Gastroenterol*, **85**, 350-355.
- Stoll, V., Calleja, V., Vassaux, G., Downward, J. & Lemoine, N.R. (2005) **Dominant negative inhibitors of signalling through the phosphoinositol 3-kinase pathway for gene therapy of pancreatic cancer.** *Gut*, **54**, 109-116.
- Streit, S., Bange, J., Fichtner, A., Ihrler, S., Issing, W. & Ullrich, A. (2004) **Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma.** *Int J Cancer*, **111**, 213-217.
- Strimpakos, A., Saif, M.W. & Syrigos, K.N. (2008) **Pancreatic cancer: from molecular pathogenesis to targeted therapy.** *Cancer Metastasis Rev*, **27**, 495-522.
- Strumberg, D., Schultheis, B., Scheulen, M.E., Hilger, R.A., Krauss, J., Marschner, N., Lordick, F., Bach, F., Reuter, D., Edler, L. & Mross, K. (2012) **Phase II study of nimotuzumab, a humanized monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody, in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer.** *Invest New Drugs*, **30**, 1138-1143.
- Su, G.H., Hruban, R.H., Bansal, R.K., Bova, G.S., Tang, D.J., Shekher, M.C., Westerman, A.M., Entius, M.M., Goggins, M., Yeo, C.J. & Kern, S.E. (1999) **Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers.** *Am J Pathol*, **154**, 1835-1840.
- Suehara, N., Mizumoto, K., Muta, T., Tominaga, Y., Shimura, H., Kitajima, S., Hamasaki, N., Tsuneyoshi, M. & Tanaka, M. (1997) **Telomerase elevation in pancreatic ductal carcinoma compared to nonmalignant pathological states.** *Clin Cancer Res*, **3**, 993-998.
- Tang, Z.H., Qiu, W.H., Wu, G.S., Yang, X.P., Zou, S.Q. & Qiu, F.Z. (2002) **The immunotherapeutic effect of dendritic cells vaccine modified with interleukin-18 gene and tumor cell lysate on mice with pancreatic carcinoma.** *World J Gastroenterol*, **8**, 908-912.

- Tavormina, P.L., Bellus, G.A., Webster, M.K., Bamshad, M.J., Fraley, A.E., McIntosh, I., Szabo, J., Jiang, W., Jabs, E.W., Wilcox, W.R., Wasmuth, J.J., Donoghue, D.J., Thompson, L.M. & Francomano, C.A. (1999) **A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys650Met mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene.** *Am J Hum Genet*, **64**, 722-731.
- Teschendorf, C., Emons, B., Muzyczka, N., Graeven, U. & Schmiegel, W. (2010) **Efficacy of recombinant adeno-associated viral vectors serotypes 1, 2, and 5 for the transduction of pancreatic and colon carcinoma cells.** *Anticancer Res*, **30**, 1931-1935.
- Thien, C.B. & Langdon, W.Y. (2001) **Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 294-307.
- Toucheffeu, Y., Harrington, K.J., Galmiche, J.P., Vassaux, G. (2010) **Review article: gene therapy, recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology.** *Aliment Pharmacol Ther*, **32**, 953-968.
- Trueb, B., Zhuang, L., Taeschler, S. & Wiedemann, M. (2003) **Characterization of FGFR1, a novel fibroblast growth factor (FGF) receptor preferentially expressed in skeletal tissues.** *J Biol Chem*, **278**, 33857-33865.
- Tsang, M. & Dawid, I.B. (2004) **Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway.** *Sci STKE*, **2004**, pe17.
- Tsiambas, E., Karameris, A., Dervenis, C., Lazaris, A.C., Giannakou, N., Gerontopoulos, K. & Patsouris, E. (2006) **HER2/neu expression and gene alterations in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparative immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization study based on tissue microarrays and computerized image analysis.** *Jop*, **7**, 283-294.
- Turner, N. & Grose, R. (2010) **Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer.** *Nat Rev Cancer*, **10**, 116-129.
- Ueno, H., Okusaka, T., Ikeda, M., Takezako, Y. & Morizane, C. (2005) **An early phase II study of S-1 in patients with metastatic pancreatic cancer.** *Oncology*, **68**, 171-178.

- Vaha-Koskela, M.J., Heikkila, J.E. & Hinkkanen, A.E. (2007) **Oncolytic viruses in cancer therapy.** *Cancer Lett*, **254**, 178-216.
- Valsesia-Wittmann, S., Drynda, A., Deleage, G., Aumailley, M., Heard, J.M., Danos, O., Verdier, G., Cosset, F.L. (1994) **Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors.** *J Virol*, **68**, 4609-4619.
- Van Cutsem, E., van de Velde, H., Karasek, P., Oettle, H., Vervenne, W.L., Szawlowski, A., Schoffski, P., Post, S., Verslype, C., Neumann, H., Safran, H., Humblet, Y., Perez Ruixo, J., Ma, Y. & Von Hoff, D. (2004) **Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer.** *J Clin Oncol*, **22**, 1430-1438.
- Van Geer, M.A., Brevoord, D., Kuhlmann, K.F., Bakker, C.T., Mizuguchi, H., Wesseling, J.G., Ten Kate, F.J., Gouma, D.J., Oude Elferink, R.P. & Bosma, P.J. (2010) **A fiber modified adenovirus vector that targets to the EphrinA2 receptor reveals enhanced gene transfer to ex vivo pancreatic cancer.** *Int J Oncol*, **36**, 233-244.
- Van Heek, N.T., Meeker, A.K., Kern, S.E., Yeo, C.J., Lillemoe, K.D., Cameron, J.L., Offerhaus, G.J., Hicks, J.L., Wilentz, R.E., Goggins, M.G., De Marzo, A.M., Hruban, R.H. & Maitra, A. (2002) **Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia.** *Am J Pathol*, **161**, 1541-1547.
- Vasen, H.F., Gruis, N.A., Frants, R.R., van Der Velden, P.A., Hille, E.T. & Bergman, W. (2000) **Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden).** *Int J Cancer*, **87**, 809-811.
- Vekony, H., Ylstra, B., Wilting, S.M., Meijer, G.A., Van de Wiel, M.A., Leemans, C.R., Van der Waal, I., Bloemena, E. (2007) **DNA copy number gains at loci of growth factors and their receptors in salivary gland adenoid cystic carcinoma.** *Clin Cancer Res* **11**, 3133-3139.
- Venkitaraman, A.R. (2002) **Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2.** *Cell*, **108**, 171-182.

- Vernejoul, F., Faure, P., Benali, N., Calise, D., Tiraby, G., Pradayrol, L., Susini, C., Buscail, L. (2002) **Antitumor effect of in vivo somatostatin receptor subtype 2 gene transfer in primary and metastatic pancreatic cancer models.** *Cancer Res*, **62**, 6124-6131.
- Vidrich, A., Buzan, J.M., Brodrick, B., Ilo, C., Bradley, L., Fendig, K.S., Sturgill, T. & Cohn, S.M. (2009) **Fibroblast growth factor receptor-3 regulates Paneth cell lineage allocation and accrual of epithelial stem cells during murine intestinal development.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **297**, G168-178.
- Vigant, F., Descamps, D., Jullienne, B., Esselin, S., Connault, E., Opolon, P., Tordjmann, T., Vigne, E., Perricaudet, M. & Benihoud, K. (2008) **Substitution of hexon hypervariable region 5 of adenovirus serotype 5 abrogates blood factor binding and limits gene transfer to liver.** *Mol Ther*, **16**, 1474-1480.
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R.H. & Goggins, M. (2011) **Pancreatic cancer.** *Lancet*, **378**, 607-620.
- Vogler, M., Durr, K., Jovanovic, M., Debatin, K.M. & Fulda, S. (2007) **Regulation of TRAIL-induced apoptosis by XIAP in pancreatic carcinoma cells.** *Oncogene*, **26**, 248-257.
- Volpers, C. & Kochanek, S. (2004) **Adenoviral vectors for gene transfer and therapy.** *J Gene Med*, **6 Suppl 1**, S164-171.
- Von Kopylow, K., Staeger, H., Schulze, W., Will, H., Kirchhoff, C. (2012) **Fibroblast growth factor receptor 3 is highly expressed in rarely dividing human type A spermatogonia.** *Histochem Cell Biol*.
- Wack, S., Rejiba, S., Parmentier, C., Arahamian, M. & Hajri, A. (2008) **Telomerase transcriptional targeting of inducible Bax/TRAIL gene therapy improves gemcitabine treatment of pancreatic cancer.** *Mol Ther*, **16**, 252-260.
- Wagner, M., Lopez, M.E., Cahn, M. & Korc, M. (1998) **Suppression of fibroblast growth factor receptor signaling inhibits pancreatic cancer growth in vitro and in vivo.** *Gastroenterology*, **114**, 798-807.

- Wang, H., Pei, W., Luan, Q., Ma, F., Zhou, S., Zhao, Z., Meng, X., Zhang, X., Liang, X., Chen, Y., Zhan, Q., Lin, C., Qian, H. & Zhao, P. (2012) **A feasibility study on gene therapy of pancreatic carcinoma with Ad-PUMA.** *Cancer Biol Ther*, **13**.
- Wang, J. & Sen, S. (2011) **MicroRNA functional network in pancreatic cancer: from biology to biomarkers of disease.** *J Biosci*, **36**, 481-491.
- Wang, J., Shi, Y.Q., Yi, J., Ye, S., Wang, L.M., Xu, Y.P., He, M. & Kong, X.M. (2008a) **Suppression of growth of pancreatic cancer cell and expression of vascular endothelial growth factor by gene silencing with RNA interference.** *J Dig Dis*, **9**, 228-237.
- Wang, J., Stockton, D.W. & Ittmann, M. (2004) **The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression.** *Clin Cancer Res*, **10**, 6169-6178.
- Wang, J., Yu, W., Cai, Y., Ren, C. & Ittmann, M.M. (2008b) **Altered fibroblast growth factor receptor 4 stability promotes prostate cancer progression.** *Neoplasia*, **10**, 847-856.
- Wang, J.K., Gao, G. & Goldfarb, M. (1994) **Fibroblast growth factor receptors have different signaling and mitogenic potentials.** *Mol Cell Biol*, **14**, 181-188.
- Wanisch, K. & Yanez-Munoz, R.J. (2009) **Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age.** *Mol Ther*, **17**, 1316-1332.
- Webster, M.K. & Donoghue, D.J. (1997) **FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing.** *Trends Genet*, **13**, 178-182.
- Wei, M.X., Tamiya, T., Chase, M., Boviatsis, E.J., Chang, T.K., Kowall, N.W., Hochberg, F.H., Waxman, D.J., Breakefield, X.O. & Chiocca, E.A. (1994) **Experimental tumor therapy in mice using the cyclophosphamide-activating cytochrome P450 2B1 gene.** *Hum Gene Ther*, **5**, 969-978.
- Weiner, L.M., Belldegrun, A.S., Crawford, J., Tolcher, A.W., Lockbaum, P., Arends, R.H., Navale, L., Amado, R.G., Schwab, G. & Figlin, R.A. (2008) **Dose and schedule study of panitumumab monotherapy in patients with advanced solid malignancies.** *Clin Cancer Res*, **14**, 502-508.

- Weinstein, M., Xu, X., Ohyama, K. & Deng, C.X. (1998) **FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung.** *Development*, **125**, 3615-3623.
- Weiss, F.U., Marques, I.J., Woltering, J.M., Vlecken, D.H., Aghdassi, A., Partecke, L.I., Heidecke, C.D., Lerch, M.M. & Bagowski, C.P. (2009) **Retinoic acid receptor antagonists inhibit miR-10a expression and block metastatic behavior of pancreatic cancer.** *Gastroenterology*, **137**, 2136-2145.
- Wennier, S., Li, S. & McFadden, G. (2011) **Oncolytic virotherapy for pancreatic cancer.** *Expert Rev Mol Med*, **13**, e18.
- Wesche, J., Haglund, K. & Haugsten, E.M. (2011) **Fibroblast growth factors and their receptors in cancer.** *Biochem J*, **437**, 199-213.
- Wesseling, J.G., Bosma, P.J., Krasnykh, V., Kashentseva, E.A., Blackwell, J.L., Reynolds, P.N., Li, H., Parameshwar, M., Vickers, S.M., Jaffee, E.M., Huibregtse, K., Curiel, D.T. & Dmitriev, I. (2001a) **Improved gene transfer efficiency to primary and established human pancreatic carcinoma target cells via epidermal growth factor receptor and integrin-targeted adenoviral vectors.** *Gene Ther*, **8**, 969-976.
- Wesseling, J.G., Yamamoto, M., Adachi, Y., Bosma, P.J., van Wijland, M., Blackwell, J.L., Li, H., Reynolds, P.N., Dmitriev, I., Vickers, S.M., Huibregtse, K. & Curiel, D.T. (2001b) **Midkine and cyclooxygenase-2 promoters are promising for adenoviral vector gene delivery of pancreatic carcinoma.** *Cancer Gene Ther*, **8**, 990-996.
- Wilentz, R.E., Iacobuzio-Donahue, C.A., Argani, P., McCarthy, D.M., Parsons, J.L., Yeo, C.J., Kern, S.E. & Hruban, R.H. (2000) **Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression.** *Cancer Res*, **60**, 2002-2006.
- Wolmark, N., Rockette, H., Fisher, B., Wickerham, D.L., Redmond, C., Fisher, E.R., Jones, J., Mamounas, E.P., Ore, L., Petrelli, N.J., et al. (1993) **The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03.** *J Clin Oncol*, **11**, 1879-1987.

- Xiong, H.Q. (2004) **Molecular targeting therapy for pancreatic cancer.** *Cancer Chemother Pharmacol*, **54 Suppl 1**, S69-77.
- Xiong, H.Q., Rosenberg, A., LoBuglio, A., Schmidt, W., Wolff, R.A., Deutsch, J., Needle, M. & Abbruzzese, J.L. (2004) **Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II Trial.** *J Clin Oncol*, **22**, 2610-2616.
- Xu, C., Sun, Y., Wang, Y., Yan, Y., Shi, Z., Chen, L., Lin, H., Lu, S., Zhu, M., Su, C. & Li, Z. (2012) **CEA promoter-regulated oncolytic adenovirus-mediated Hsp70 expression in immune gene therapy for pancreatic cancer.** *Cancer Lett*, **319**, 154-163.
- Yagasaki, F., Wakao, D., Yokoyama, Y., Uchida, Y., Murohashi, I., Kayano, H., Taniwaki, M., Matsuda, A., Bessho, M. (2001) **Fusion of ETV6 to fibroblast growth factor receptor 3 in peripheral T-cell lymphoma with a t(4;12)(p16;p13) chromosomal translocation.** *Cancer Res*, **61**, 8371-8374.
- Yamanaka, Y., Friess, H., Buchler, M., Beger, H.G., Uchida, E., Onda, M., Kobrin, M.S., Korc, M. (1993) **Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage.** *Cancer Res*, **53**, 5289-96.
- Yang, L., Bailey, L., Baltimore, D., Wang, P. (2006) **Targeting lentiviral vectors to specific cell types in vivo.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 11479-11484.
- Yang, L., Cao, Z., Li, F., Post, D.E., Van Meir, E.G., Zhong, H. & Wood, W.C. (2004) **Tumor-specific gene expression using the survivin promoter is further increased by hypoxia.** *Gene Ther*, **11**, 1215-1223.
- Yang, Y., Zhou, Y., Lu, M., An, Y., Li, R., Chen, Y., Lu, D.R., Jin, L., Zhou, W.P., Qian, J. & Wang, H.Y. (2011) **Association between fibroblast growth factor receptor 4 polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma.** *Mol Carcinog*, **51**, 515-521.
- Yasui, T., Ohuchida, K., Zhao, M., Cui, L., Onimaru, M., Egami, T., Fujita, H., Ohtsuka, T., Mizumoto, K., Matsumoto, K. & Tanaka, M. (2011) **Adenoviral therapy is more effective in gemcitabine-resistant pancreatic cancer than in gemcitabine-sensitive cells.** *Anticancer Res*, **31**, 1279-1287.

- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P. & Ornitz, D.M. (1991) **Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor.** *Cell*, **64**, 841-848.
- Yeh, B.K., Igarashi, M., Eliseenkova, A.V., Plotnikov, A.N., Sher, I., Ron, D., Aaronson, S.A. & Mohammadi, M. (2003) **Structural basis by which alternative splicing confers specificity in fibroblast growth factor receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2266-2271.
- Yoo, C., Hwang, J.Y., Kim, J.E., Kim, T.W., Lee, J.S., Park, D.H., Lee, S.S., Seo, D.W., Lee, S.K., Kim, M.H., Han, D.J., Kim, S.C. & Lee, J.L. (2009) **A randomised phase II study of modified FOLFIRI.3 vs modified FOLFOX as second-line therapy in patients with gemcitabine-refractory advanced pancreatic cancer.** *Br J Cancer*, **101**, 1658-1663.
- Yu, Z., Zhou, J. & Hoffman, R.M. (2012) **Lentivirus-Based DsRed-2-Transfected Pancreatic Cancer Cells for Deep In Vivo Imaging of Metastatic Disease.** *Methods Mol Biol*, **872**, 69-83.
- Zehe, C., Engling, A., Wegehingel, S., Schafer, T. & Nickel, W. (2006) **Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15479-15484.
- Zhang, Y.A., Nemunaitis, J., Samuel, S.K., Chen, P., Shen, Y. & Tong, A.W. (2006) **Antitumor activity of an oncolytic adenovirus-delivered oncogene small interfering RNA.** *Cancer Res*, **66**, 9736-9743.
- Zhang, Y., Wang, H., Toratani, S., Sato, J.D., Kan, M., McKeehan, W.L., Okamoto, T. (2001) **Growth inhibition by keratinocyte growth factor receptor of human salivary adenocarcinoma cells through induction of differentiation and apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11336-11340.
- Zhao, Y. & Zhang, Z.Y. (2001) **The mechanism of dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 by mitogen-activated protein kinase phosphatase 3.** *J Biol Chem*, **276**, 32382-32391.
- Zhao, Y., Zhu, L., Lee, S., Li, L., Chang, E., Soong, N.W., Douer, D., Anderson, W.F. (1999) **Identification of the block in targeted retroviral-mediated gene transfer.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 4005-4010.

Zhuang, L., Villiger, P. & Trueb, B. (2011) **Interaction of the receptor FGFR1 with the negative regulator Spred1.** *Cell Signal*, **23**, 1496-1504.

Zieger, K., Marcussen, N., Borre, M., Orntoft, T.F., Dyrskjot, L. (2009) **Consistent genomic alterations in carcinoma in situ of the urinary bladder confirm the presence of two major pathways in bladder cancer development.** *Int J Cancer*, **125**, 2095-2103.

## RÉSUMÉ

L'adénocarcinome canalaire pancréatique est une maladie agressive et dévastatrice qui est caractérisée par une progression rapide et une résistance aux traitements.

Le développement de nouveaux vecteurs à fort potentiel de transfert de gène dans les cellules tumorales pourrait être un outil performant et innovant pour améliorer les traitements existants. Nous avons développé un système de ciblage des cellules tumorales pancréatiques via l'antigène de surface Mucine 4 en utilisant des vecteurs lentiviraux spécifiques permettant le transfert efficace du gène cytotoxique de la Thymidine Kinase (hsv-TK) directement dans des modèles de tumeurs. La transduction lentivirale de cellules tumorales pancréatiques a été possible dans des xénogreffes orthotopiques. Le transfert du gène *TK* suivi d'un traitement au ganciclovir a montré des résultats encourageants *in vivo*. L'approche thérapeutique présentée ici semble être plus sécurisée, plus spécifique et aussi efficace qu'un lentivirus à large tropisme pour le transfert de gène dans les tumeurs pancréatiques.

La mise en évidence de nouvelles cibles moléculaires dont la dérégulation participe au développement et à l'agressivité des tumeurs pancréatiques pourraient être utilisées pour moduler favorablement les traitements thérapeutiques en cours. De plus, ces nouvelles cibles moléculaires pourraient également servir de facteur de détection précoce ou de marqueurs pronostiques de l'adénocarcinome pancréatique. L'implication des isoformes du récepteur FGFR3 dans les mécanismes moléculaires de l'adénocarcinome pancréatique a été évaluée pour la première fois. Un rôle opposé d'oncogène et de gène suppresseur de tumeur a été découvert pour le FGFR3 en fonction du contexte cellulaire. Des voies de signalisation différentes sont empruntées pour induire ces effets opposés dans les cellules tumorales pancréatiques. Cette nouvelle donnée devra être considérée pour des thérapies ciblées impliquant des inhibiteurs de tyrosine kinases qui, s'ils sont utilisés dans un mauvais contexte cellulaire, pourraient être plus dangereux que bénéfiques.

## ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma is an aggressive and devastating disease, which is characterized by rapid progression and resistance to treatment.

The development of new vectors with high potential of gene transfer in tumor cells could be an innovative and valuable tool. We have developed a strategy of pancreatic tumor cells targeting with the cell surface marker Mucin 4 using specific lentiviral vectors for the efficient transfer of the thymidine kinase cytotoxic gene within the tumor. Lentiviral transduction of human pancreatic tumor cells was possible when cells were grafted orthotopically. The hsv-TK/GCV anti-cancer system showed promising results *in vivo*. The approach presented here appeared to be a safer, much more specific and an as efficient way to perform gene delivery in pancreatic tumors, in comparison with a broad tropism lentivirus.

Discovering new molecular targets which modulation contributes to the development and aggressiveness of pancreatic tumors could favorably modulate the current therapies. Furthermore, these new molecular targets could also serve as factors of early detection or prognostic markers of pancreatic adenocarcinoma. The involvement of FGFR3 receptor in the molecular mechanisms of pancreatic adenocarcinoma was evaluated for the first time. Opposite roles of both oncogene and tumor suppressor gene have been discovered for FGFR3 depending on the cellular context. Importantly, molecular pathways supporting these effects are different. This new data should be considered for targeted therapies involving tyrosine kinase inhibitors. If used in the wrong cell context they could be more dangerous than beneficial.